



Dégénérescences cellulaires toxiques et photovieillissement : rôle des oxystérols et des purinorécepteurs P2X7 dans les mécanismes de mort cellulaire induits

Elodie Olivier

► To cite this version:

Elodie Olivier. Dégénérescences cellulaires toxiques et photovieillissement : rôle des oxystérols et des purinorécepteurs P2X7 dans les mécanismes de mort cellulaire induits. Toxicologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB166 . tel-04047453

HAL Id: tel-04047453

<https://theses.hal.science/tel-04047453>

Submitted on 27 Mar 2023

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

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

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS
ECOLE DOCTORALE
MEDICAMENT – TOXICOLOGIE – CHIMIE - IMAGERIES

**DEGENERESCENCES CELLULAIRES TOXIQUES ET
PHOTOVIEILLISSEMENT : ROLE DES OXYSTEROLS ET
DES PURINORECEPTEURS P2X7 DANS LES
MECANISMES DE MORT CELLULAIRE INDUITS**

THESE

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES
présentée et soutenue publiquement par

Elodie OLIVIER

le 29 novembre 2016

Membres du jury :

M. le Professeur Olivier LAPREVOTE, Président

M. le Professeur Pierre CUQ, Rapporteur

M. le Docteur Gérard LIZARD, Rapporteur

Mme le Professeur Josiane CILLARD, Examineur

M. le Professeur Jean-Michel WARNET, Examineur

Mme Anne ROSSIGNOL, Examineur

M. le Professeur Patrice RAT, Directeur de thèse

Titre de la thèse : Dégénérescences cellulaires toxiques et photovieillissement : rôle des oxystérols et des purinorécepteurs P2X7 dans les mécanismes de mort cellulaire induits.

Résumé : La dégénérescence est souvent liée au vieillissement de l'organisme. En effet, le vieillissement normal fait intervenir des phénomènes de dégénérescence et les pathologies dégénératives s'apparentent à un vieillissement anormal. Les mécanismes toxiques sous-jacents de certaines pathologies dégénératives impliquent les oxystérols, dérivés oxydés du cholestérol, et les récepteurs de dégénérescence P2X7. Nous avons étudié le rôle de ces deux acteurs dans une pathologie dégénérative, la DMLA. Pour cela, nous avons utilisé un modèle rétinien de dégénérescence, en incubant des cellules de rétine humaines avec le peptide β -amyloïde. Nous avons ainsi démontré l'importance des oxystérols dans la DMLA, ainsi que leur rôle dans le déclenchement de l'apoptose. Par la suite, nous nous sommes focalisée sur le rôle des oxystérols dans le processus de vieillissement accéléré de la peau. Nous avons mis en évidence l'impact de certains oxystérols sur différentes voies de mort cellulaire à travers l'étude des lipides membranaires, ainsi que sur le turnover des kératinocytes. L'ensemble de nos résultats tendent vers la conclusion que les oxystérols jouent un rôle clé dans les processus de dégénérescence et de vieillissement accéléré. Ils représentent donc une cible thérapeutique dans le développement de stratégies anti-dégénérescence et anti-vieillissement.

Discipline : Toxicologie

Mots-clés : oxystérols, dégénérescence, peau, rétine, vieillissement, méthodes alternatives.

Adresse de l'auteur : 31 rue Moxouris 78150 LE CHESNAY

Adresse électronique : elodie.eolivier@gmail.com

Title: Toxic cell degeneration and photoaging: role of oxysterols and P2X7 purinoreceptors in cell death.

Abstract: Degeneration and aging share numerous patterns. Indeed, physiological aging includes some degeneration processes and degenerative diseases are similar to accelerated aging. Toxic mechanisms of some degenerative diseases imply oxysterols, which are oxidation derivatives of cholesterol, and P2X7 degeneration receptors. We studied the role of these two actors in Age-Related Macular Degeneration (AMD). We developed a cell degenerative model using human retinal cells and peptide amyloid beta. We demonstrated that oxysterols trigger apoptosis and are key components of AMD pathogenesis. We then focused our attention on the role of oxysterols in skin photoaging. We highlighted the impact of oxysterols in different cell death pathways through the study of membrane lipid rafts and keratinocytes turnover. Our results tend to the conclusion that oxysterols play a pivotal role in degeneration processes and accelerated aging. Therefore, they represent an interesting therapeutic target to develop anti-degenerative and anti-aging strategies.

Keywords: oxysterols, degeneration, skin, retina, aging, alternative methods.

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Patrice Rat, Responsable du Pôle Toxicologie Cellulaire du Laboratoire de Chimie-Toxicologie Analytique et Cellulaire de l'Université Paris Descartes,

Je vous remercie de m'avoir intégrée à votre équipe, pour la confiance que vous m'avez accordée ainsi que pour vos grandes qualités d'écoute, de compréhension et votre curiosité scientifique ouvrant de nombreuses perspectives de recherche.

Monsieur le Professeur Olivier Laprévote, Directeur de l'UMR 8638 Chimie Organique Médicinale et Extractive et Toxicologie Expérimentale de l'Université Paris Descartes,

Je vous remercie de m'avoir témoigné votre bienveillance en m'accueillant au sein de votre laboratoire et de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Monsieur le Professeur Pierre Cuq, Directeur du Laboratoire Oncopharmacochimie et Pharmacotoxicologie cutanée de l'Université de MontpellierI,

Je vous remercie d'avoir accepté de porter votre jugement sur mon travail en tant que rapporteur.

Monsieur le Docteur Gérard Lizard, Directeur du Laboratoire Biochimie du Peroxysome, Inflammation et métabolisme Lipidique (Bio-PeroxiL) de l'Université de Bourgogne

Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, notamment lors des congrès ENOR, ainsi que d'avoir accepté la fonction de rapporteur.

Madame le Professeur Josiane Cillard, Professeur Emérite de l'Université de Rennes I,

Je vous remercie d'avoir accepté d'examiner mon travail et de siéger dans ce jury de thèse.

Monsieur le Professeur Jean-Michel Warnet, Professeur Emérite de l'Université Paris Descartes,

Je vous remercie de faire partie de ce jury mais surtout pour vos conseils, votre disponibilité, vos petites attentions et pour le temps que vous avez consacré à l'amélioration de ce manuscrit de thèse, avec toute ma reconnaissance,

Madame Anne Rossignol, de la Société Oléos,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être un des membres de ce jury de thèse.

Monsieur Alexis Rannou,

Je vous remercie de m'avoir intégrée à la société Soliance-Givaudan me permettant ainsi d'effectuer ma thèse sous contrat CIFRE et de me familiariser avec le monde de l'entreprise.

Monsieur Romain Reynaud,

Je vous remercie pour vos encouragements et la confiance que vous m'avez accordée.

Madame le Docteur Anne Regazzetti,

Je te remercie pour les expériences de Chimie Analytique que nous avons réalisées ensemble et pour les connaissances que tu as partagées avec moi.

Madame Delphine Dargère et Monsieur le Docteur Nicolas Auzeil,

Je vous remercie pour l'analyse et les conseils liés à mes expériences de Chimie Analytique.

Madame le futur Docteur Justine Lanzini,

Je te remercie pour ton soutien notamment dans la course contre le temps pour l'écriture de nos thèses respectives ! ainsi que pour nos discussions au labo tardives ou au détour d'un dîner, d'un verre ou d'un match ! Avec tous mes vœux de réussite pour ta thèse et ta vie future.

Madame le futur Docteur Julia Petit,

Je te remercie pour ton soutien, pour les bons moments passés ensemble entre nos deux bureaux voisins ou à l'extérieur particulièrement quand les conversations du déjeuner deviennent très ouvertes ! Bon courage pour la fin de ta thèse et l'écriture de ton manuscrit, avec tous mes vœux de réussite pour ta thèse et ta vie future.

Madame le Docteur France Massicot,

Je te remercie pour ton accueil chaleureux, ton soutien et nos conversations scientifiques ou non !

Madame le Docteur Sylvie Gillet,

Je te remercie pour ton soutien, les nombreux repas partagés ainsi que pour nos conversations à bâtons rompus dans et hors du labo !

Madame le Docteur Françoise Brignole-Baudouin,

Je te remercie pour ta gentillesse, tes conseils en cytométrie en flux et de m'avoir fourni des cellules HCE-T.

Aux membres de l'équipe d'enseignement de TP de Toxicologie : *Docteur Emmanuel Bourgogne, Docteur Anne-Laure Schang, Docteur Sophie Achard* merci de m'avoir intégrée à votre équipe et pour la bonne ambiance qui y règne.

Aux autres membres de l'équipe C-TAC *Madame Pascale Leproux, Docteur Grégory Genta-Jouve, Monsieur Jean-Baptiste Delmotte* merci pour votre présence et votre soutien. Avec tous mes vœux de réussite pour ta thèse *Jean-Baptiste* !

Madame Martine Radionoff,

Je te remercie pour ton soutien, ton écoute, ta disponibilité, ta bonne humeur, nos nombreux repas partagés et l'organisation d'événements festifs ainsi que pour les nombreux réactifs que tu m'as permis d'acheter !

Madame Marie Gence,

Je te remercie pour ta formation accélérée à l'Ecole de la Vie, les fruits exotiques que tu m'as fait découvrir et le confort de travail que tu nous apportes.

Madame Nicole Mazure,

Je te remercie pour toutes les commandes passées et la gestion des lignes de compte.

Aux stagiaires que j'ai encadrés au cours de ma thèse particulièrement le futur docteur *Alexandra Bourgeois*, je suis ravie de t'avoir donné le goût de la recherche, je te souhaite toute la réussite pour ta thèse qui commence !

Monsieur le Docteur Bruno Saubaméa, Monsieur René Lai-Kuen,

Je vous remercie pour vos conseils et votre aide pour la microscopie confocale.

Monsieur le Professeur Yves Mély, Monsieur le Docteur Klymchenko,

Je vous remercie de m'avoir fourni la sonde F2N12S ainsi que pour vos conseils.

Madame le Docteur Kersti Alm,

Je vous remercie pour le partage de vos connaissances en microscopie digitale holographique ainsi que pour votre aide.

Aux anciens membres du laboratoire *Monsieur le Docteur Teddy Leguillier*, merci pour ton aide, ton soutien et ta gentillesse, *Madame le Docteur Kamelia Ghazi*, merci pour ta gentillesse.

Madame le Docteur Anaïs Wakx, merci pour nos journées de manip partagées lors de ta thèse, pour ton soutien, tes conseils et nos diverses sorties !

Madame le Docteur Mélody Dutot, merci de m'avoir donné le virus de la recherche et plus particulièrement le goût de la culture cellulaire au cours de mon stage de master 1 ! Merci pour tous tes conseils, ta sollicitude, ta formation au sens critique, et le temps consacré à rendre cette thèse meilleure ! Sur un plan personnel merci pour ta formation accélérée ! En un mot merci pour tout ! En témoignage de toute ma reconnaissance !

A tous mes professeurs, merci pour leurs divers enseignements et leurs encouragements en particulier à ceux qui se reconnaîtront !

A tous mes amis de plus ou moins longue date merci d'avoir supporté ma période de thèse et mes indisponibilités de sortie ! Merci pour votre soutien en particulier *Sandrine* et *Mélanie*. Ainsi qu'à mes amis de fac pour avoir partagé un bout de chemin en particulier *Sophie* et *Aziz*. Sans oublier les membres des *Flûtes Avelaines* pour nos rendez-vous du mardi malgré toutes les difficultés de chacun ! Merci en particulier à *Christian-Noël* pour son soutien !

A ma famille pour leur soutien sans faille, en particulier à ma mère *Florence*. Merci d'avoir supporté toutes ses longues années d'étude depuis la maternelle ! Merci pour tout ! Et grande nouvelle ça y est je vais soutenir ma thèse ! (Après promis j'arrête les études !)

TABLE DES MATIERES

I. RAPPELS ET ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES	33
1. Dégénérescence et vieillissement.....	33
1.1. Pathologies neurodégénératives : exemples de la maladie d'Alzheimer et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)	33
1.1.1. Epidémiologie	34
1.1.2. Facteurs de risque	35
1.1.2.1. Facteurs de risque communs à la maladie d'Alzheimer et à la DMLA	35
1.1.2.2. Facteurs de risque spécifiques de la maladie d'Alzheimer	37
1.1.2.3. Facteurs de risque spécifiques de la DMLA.....	38
1.1.3. Physiopathologie.....	39
1.1.3.1. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	39
1.1.3.2. Physiopathologie de la DMLA.....	43
1.1.3.3. Rôle des oxystérols dans les pathologies neurodégénératives.....	46
1.2. Vieillissement cutané physiologique et accéléré	48
1.2.1. Physiologie de la peau	49
1.2.1.1. Structure de la peau	49
1.2.1.2. Fonctions de la peau.....	54
1.2.2. Caractéristiques cliniques et tissulaires du vieillissement	55
1.2.2.1. Caractéristiques cliniques et tissulaires du vieillissement physiologique	56
1.2.2.2. Caractéristiques cliniques et tissulaires du vieillissement accéléré	58
1.2.2.2.1. Photovieillissement.....	58
1.2.2.2.2. Tabagisme.....	62
1.2.2.2.3. Pollution	63
2. Processus toxiques associés aux phénomènes de dégénérescence et au vieillissement	64
2.1. Stress oxydant et inflammation	64
2.1.1. Généralités.....	64
2.1.2. Focus sur la DMLA.....	67
2.1.3. Focus sur la peau	69
2.2. Récepteurs P2X7	71
2.2.1. Rappels	71
2.2.2. Pharmacologie du récepteur P2X7	72

2.2.3. Conséquences cellulaires de l'activation du récepteur P2X7 et processus dégénératifs.....	75
2.3. Matrice extracellulaire.....	77
2.3.1. Généralités sur la matrice extracellulaire.....	77
2.3.2. Implication de la matrice extracellulaire dans les processus liés au vieillissement.....	80
3. Problématique	82
II. MATERIEL ET METHODES.....	84
1. Modèles d'étude.....	84
1.1. Modèles cellulaires <i>in vitro</i>	84
1.1.1. Lignée de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien humain	84
1.1.2. Lignée de cellules épithéliales cornéennes humaines	85
1.1.3. Lignée de kératinocytes humains.....	85
1.1.4. Cultures primaires de kératinocytes humains.....	86
1.2. Modèle d'exposition aux rayonnements UV solaires.....	87
1.3. Incubation avec les oxystérols.....	88
2. Techniques d'analyse	88
2.1. Microtitration cytofluorimétrique	88
2.1.1. Préparation des cellules pour la cytofluorimétrie	89
2.1.2. Tests effectués par microtitration cytofluorimétrique MiFALC de type I	89
2.1.2.1. <i>Evaluation de l'intégrité membranaire : test au rouge neutre</i>	89
2.1.2.2. <i>Evaluation de l'activité des caspases 3</i>	90
2.1.2.3. <i>Evaluation de l'activité des caspases 8</i>	91
2.1.2.4. <i>Evaluation de la masse mitochondriale : test à la nonylacridine orange</i>	91
2.1.3. Tests effectués par microtitration cytofluorimétrique MiFALC de type II	92
2.1.3.1. <i>Evaluation de l'état d'oxydo-réduction cellulaire : test à l'Alamar blue</i>	92
2.1.3.2. <i>Evaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène : test au H2DCF-DA</i>	92
2.1.3.3. <i>Evaluation de la condensation de la chromatine : test au Hoechst 33342</i>	93
2.1.3.4. <i>Evaluation de l'activation du récepteur P2X7 : test au YO-PRO-1</i> ... 94	
2.1.3.5. <i>Evaluation de l'activation de la pannexine-1 : test au YO-PRO-3</i>	94

2.1.3.6. <i>Evaluation de l'autophagie : test à la monodansylcadavérine (MDC)</i>	95
2.1.3.7. <i>Evaluation du taux de calcium intracellulaire : test au Fluo-4</i>	95
2.1.3.8. <i>Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial : test au JC-1</i>	95
2.1.3.9. <i>Evaluation de la composition en lipides polaires et en lipides neutres de la membrane : test au Nile red</i>	96
2.1.3.10. <i>Evaluation de l'asymétrie membranaire : test au F2N12S</i>	96
2.2. Microtitration colorimétrique	97
2.2.1. Principe des analyses par colorimétrie	97
2.2.2. Mesure d'activité de la succinate déshydrogénase	97
2.2.3. Mesure de la libération de la lactate déshydrogénase	98
2.2.4. Dosage des protéines	99
2.3. Microtitration par bioluminescence	99
2.3.1. Principe de l'analyse par bioluminescence	99
2.3.2. Evaluation des taux d'ATP extracellulaire et intracellulaire	99
2.3.3. Evaluation de l'activité de la caspase 1	100
2.4. Analyses par méthode immuno-enzymatique	100
2.4.1. Principe des analyses par méthode immuno-enzymatique	100
2.4.2. Préparation des échantillons	100
2.4.3. Dosage des cytokines pro-inflammatoires	101
2.4.4. Dosage des métalloprotéinases matricielles	101
2.4.5. Dosage du granzyme B	101
2.5. Cytométrie en flux	101
2.5.1. Principe de la cytométrie en flux	101
2.5.2. Préparation des cellules	102
2.5.3. Analyse du cycle cellulaire	102
2.5.4. Analyse de l'expression des protéines cavéoline-1 et involucrine	102
2.6. Microscopie optique	103
2.6.1. Principe de la microscopie optique	103
2.6.2. Etude de la prolifération des cellules	103
2.7. Microscopie holographique digitale	103
2.7.1. Principe de la microscopie holographique digitale	103
2.7.2. Préparation des échantillons	104
2.8. Microscopie confocale	104

2.8.1.	Principe de la microscopie confocale	104
2.8.2.	Préparation des échantillons pour analyse par microscopie confocale	105
2.8.3.	Observation du cytosquelette.....	105
2.8.4.	Evaluation de l'expression de la cavéoline-1, de P2X7 et de l'involucrine	106
2.8.5.	Evaluation des radeaux lipidiques.....	107
2.9.	Spectrométrie de masse	107
2.9.1.	Principe de la spectrométrie de masse	107
2.9.2.	Préparation des échantillons pour l'étude par UPLC-MS.....	108
2.9.3.	Analyse lipidomique.....	108
2.9.4.	Quantification des oxystérols.....	108
2.10.	Analyses statistiques	109
III.	RESULTATS ET DISCUSSION	110
1.	Rôle des oxystérols et des purinorécepteurs P2X7 dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)	110
	<i>Article 1 : P2X7-pannexin-1 and amyloid β-induced oxysterol input in human retinal cell: Role in age-related macular degeneration?</i>	
1.1.	Quantification des oxystérols après incubation avec du peptide amyloïde β	111
1.2.	Evaluation des effets des oxystérols sur la lignée cellulaire de l'épithélium pigmentaire rétinien ARPE-19	113
1.2.1.	Evaluation de la cytotoxicité des oxystérols.....	113
1.2.2.	Quantification de l'assimilation du 7-KC et du 25-OH dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.....	115
1.2.3.	Evaluation du stress oxydant induit par les oxystérols.....	117
1.2.4.	Evaluation de l'effet des oxystérols sur l'activité mitochondriale..	118
1.2.5.	Dosage de l'ATP intracellulaire et extracellulaire.....	121
1.2.6.	Activation du récepteur P2X7	123
1.2.7.	Modulation du récepteur P2X7	125
1.3.	Discussion	129
2.	Rôle des oxystérols dans le vieillissement et le photovieillissement de la peau	144
	<i>Article 2 : Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: Role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging.</i>	
2.1.	Analyse du taux d'oxystérols dans des cultures primaires de kératinocytes issus de donneurs « jeunes » et de donneurs « âgés »	145

2.1.1. Kératinocytes jeunes versus kératinocytes âgés	145
2.1.2. Effet d'une irradiation UV sur le taux de stérols dans les kératinocytes « jeunes » et « âgés ».....	147
2.2. Modifications du profil lipidique après irradiation UV sur lignée de kératinocytes humains HaCaT	149
2.2.1. Approche globale	149
2.2.2. Approche ciblée : les oxystérols.....	151
2.3. Evaluation des effets des oxystérols sur la lignée de kératinocytes HaCaT	154
2.3.1. Evaluation de la viabilité cellulaire après incubation avec les oxystérols.....	155
2.3.2. Quantification de l'assimilation du 7-KC et du 25-OH dans les kératinocytes	156
2.3.3. Effets sur les radeaux lipidiques et leurs constituants protéiques	161
2.3.3.1. Les radeaux lipidiques.....	161
2.3.3.2. Cavéoline-1.....	162
2.3.3.3. Récepteurs P2X7.....	166
2.3.4. Evaluation de l'inflammation	171
2.3.5. Etude de l'apoptose	177
2.3.6. Prolifération cellulaire et cycle cellulaire	181
2.3.7. Etude de la différenciation cellulaire	185
2.3.7.1. Evaluation de la morphologie cellulaire	185
2.3.7.2. Observation du cytosquelette	187
2.3.7.3. Evaluation de l'autophagie	189
2.3.7.4. Etude de l'expression de l'involucrine.....	190
2.3.7.5. Evaluation du calcium intracellulaire	193
2.4. Discussion	195
IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	211
V. Bibliographie.....	219
ANNEXES.....	252

VALORISATION DE NOS TRAVAUX

➤ Publications internationales dans des revues à comité de lecture

Une partie des travaux de cette thèse a fait l'objet de publications dans des revues internationales à comité de lecture.

- Article 1 : publié dans la revue Biochimie 2016 Aug;127:70-8

Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Leguillier T, Dargère D, Auzeil N, Laprèvote O, Rat P.

P2X7-pannexin-1 and amyloid β -induced oxysterol input in human retinal cell: Role in age-related macular degeneration?

- Article 2 : publié dans la revue The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 2016 May 18 DOI : 10.1016/j.jsbmb.2016.05.015

Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Dargère D, Auzeil N, Laprèvote O, Rat P.

Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: Role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging.

- Article 3 : en cours de soumission dans la revue Chemistry and Physics of Lipids

Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Dargère D, Auzeil N, Laprèvote O, Rat P.

25-hydroxycholesterol induces degenerative pathways in human skin cells involving P2X7 cell death receptor and granzyme B

- Article 4 : en révision favorable dans la revue Journal of Biological Methods

Dutot M, **Olivier E**, Wakx A, Rat P.

A fast and reproducible cell- and 96-well plate-based method for the evaluation of P2X7 receptor activation using YO-PRO-1 fluorescent dye

- Article 5 : publié dans la revue International journal of pharmaceutics Nov 30;495(2):1028-37

Zeng N, Mignet N, Dumortier G, **Olivier E**, Seguin J, Maury M, Scherman D, Rat P, Boudy V.

Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line.

➤ **Présentations réalisées au cours de congrès**

○ **Communications orales à des congrès avec comité de sélection**

- **2nd European Network for Oxysterol Research (ENOR) meeting, Septembre 2012, Dijon, France.**

Oxysterols induce cell death on human retinal pigmented epithelial cells with P2X7 cell death receptor activation.

Olivier E, Outin E, Dutot M, Rat P.

- **5th European Network for Oxysterol Research (ENOR) meeting, Septembre 2015, Bonn, Allemagne.**

Oxysterols involvement in skin aging.

Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Dargère D, Auzeil N, Laprèvote O, Rat P.

- **Colloque Adebitech stress oxydant, Mai 2016, Romainville, France.**

Role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging.

Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Dargère D, Auzeil N, Laprèvote O, Rat P.

- **6th European Network for Oxysterol Research (ENOR) meeting, Septembre 2016, Paris, France.**

Role of P2X7 cell degenerescence receptor and granzyme B in 25-hydroxycholesterol-induced apoptosis and degenerative pathways in skin

Olivier E, Dutot M, Rat P.

○ **Communications affichées à des congrès avec comité de sélection**

- **Colloque de la Société Française de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire (SPTC), juin 2013, Châtenay-Malabry, France.**

Sénescence, apoptose et activation du récepteur de mort P2X7 par les oxystérols sur cellules humaines de rétine.

Olivier E, Outin E, Dutot M, Auzeil N, Laprevote O, Rat P.

- **FEBS-EMBO 2014 Conference, Septembre 2014, Paris, France.**

Oxysterols-induced cytoskeleton disruption via modifications of P2X7 cell death receptor.

Olivier E, Dutot M, Rat P.

- **5th annual Young researchers in life sciences (YRLS) Conference, mai 2015, Paris, France.**

Amyloid β induces oxysterols formation in human retinal cells.

Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Dargère D, Auzeil N, Laprévote O, Rat P.

- **6th European Network for Oxysterol Research (ENOR) meeting, Septembre 2016, Paris, France.**

Effects of two plant extracts on two actors of skin photoaging: UV and 25-hydroxycholesterol

Olivier E, Dutot M, Reynaud R, Rat P.

- **19th International Congress on *in vitro* Toxicology (ESTIV2016), octobre 2016, Juan-les-Pins, France**

Oxysterols: a new model to study photoaging

Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Dargère D, Auzeil N, Laprévote O, Rat P.

ABBREVIATIONS

5-FU : 5-FluoroUracile
7- β OH : 7- β Hydroxycholestérol
7-KC : 7-KétoCholestérol
24-OH : 24-Hydroxycholestérol
25-OH : 25-Hydroxycholestérol
27-OH : 27-hydroxycholestérol
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AGE : produits de glycation avancée
APP : Précurseur du Peptide β Amyloïde
ATP : Adénosine TriPhosphate
BCA : Acide Bicinchoninique
BSA : Bovine Serum Albumin
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
HRMS : Spectrométrie de Masse à Haute Résolution
IL : InterLeukine
IR : InfraRouge
LDH : Lactate DésHydrogénase
MiFALC : Microtitration Fluorimetric Assay on Living Cells
MDC : MonoDansylCadavérine
MIF : Macrophage Inhibitory Factor
MMP : MétalloProtéinase Matricielle
NAO : Nonyl Acridine Orange
NF- κ B : Nuclear Factor κ B
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate Buffer Saline
pH : potentiel Hydrogène
SOD : SuperOxyde Dismutase
SVF : Sérum de Veau Fœtal

Tau : Tubule-associated unit

TNF : Tumor Necrosis Factor

UPLC : Chromatographie liquide à ultra-haute performance

UV : UltraViolet

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES

Figure 1 : Les deux voies de clivage de la protéine APP	40
Figure 2 : Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer suivant l'hypothèse de la cascade amyloïde.....	42
Figure 3 : Altérations de la vision des patients atteints de DMLA A. Grille de Amsler permettant d'évaluer les métamorphopsies.....	43
Figure 4 : Coupe de l'œil	44
Figure 5 : Coupe de la macula	45
Figure 6 : A. Localisation des drusen. B. Fond d'œil présentant des drusen	45
Figure 7 : Différentes voies de formation des dérivés oxydés du cholestérol ou oxystérols	46
Figure 8 : Structure de la peau	50
Figure 9 : Localisation des différentes cellules de l'épiderme	50
Figure 10 : Structure de l'épiderme	51
Figure 11 : Peau présentant les caractéristiques du vieillissement chronologique : peau flétrie formant des plis	56
Figure 12 : Spectre électromagnétique des rayonnements solaires (CNRS).....	58
Figure 13 : Peau présentant les caractéristiques du photovieillissement : rides profondes, élastose solaire, lentigos solaires	61
Figure 14 : Caractéristiques des effets du tabac sur la peau	62
Figure 15 : Formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO)	65
Figure 16 : Stress oxydant et inflammation dans le vieillissement et les pathologies liées à l'âge.....	66
Figure 17 : Structure du récepteur P2X7	72
Figure 18 : Représentation schématique de P2X7 suite à une activation brève ou prolongée.1. Conformation du récepteur P2X7 au repos. 2. Conformation du récepteur P2X7 sous sa forme canal ionique observée après une stimulation brève. 3. Conformation du récepteur P2X7 après une activation prolongée a. hypothèse de la transformation progressive du canal en pore. b. hypothèse de l'implication d'autres composants dans la formation du pore dont la protéine pannexine-1.....	74
Figure 19 : Tapis de cellules ARPE-19.....	84
Figure 20 : Tapis de cellules HCE-T	85
Figure 21 : Tapis de cellules HaCaT.....	86

Figure 22 : Tapis de kératinocytes primaires observés par microscopie optique.....	87
Figure 23 : Schéma d'un microscope holographique digital	104
Figure 24 : Quantification des stérols par spectrométrie de masse dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien après incubation avec du peptide β amyloïde	112
Figure 25 : Cytotoxicité des oxystérols sur les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.	114
Figure 26 : Observations microscopiques représentatives (x100) des cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 27-OH, le 25-OH ou le 7-KC à différentes concentrations.	115
Figure 27 : Dosage du 7-KC et du 25-OH dans les cellules ARPE-19	116
Figure 28 : Evaluation de la production des espèces réactives de l'oxygène après 48 heures d'incubation avec du 7-KC ou du 25-OH sur des cellules ARPE-19	117
Figure 29 : Evaluation de la peroxydation lipidique après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH sur des cellules ARPE-19	118
Figure 30 : Evaluation de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale	119
Figure 31 : Evaluation du potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec du 7-KC ou du 25-OH	119
Figure 32 : Evaluation de la masse mitochondriale des cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC et le 25-OH.....	120
Figure 33 : Dosage de l'ATP intracellulaire dans les cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC et le 25-OH.....	121
Figure 34 : Dosage de l'ATP extracellulaire dans les cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC et le 25-OH.....	122
Figure 35 : Evaluation de l'activation du récepteur P2X7 dans les cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH.....	123
Figure 36 : Evaluation de l'activation des canaux pannexine-1 sur les cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH	124
Figure 37 : Evaluation de l'effet de la co-incubation du probénécide avec du 7-KC pendant 48 heures sur l'activation des canaux pannexine-1 sur des cellules ARPE-19.	125
Figure 38 : Effets du BBG en préincubation sur l'activation du récepteur P2X7 induite par le 7-KC ou le 25-OH après 48 heures sur cellules ARPE-19.....	126
Figure 39 : Effets du probénécide en co-incubation sur l'activation du récepteur P2X7 induite par le 7-KC ou le 25-OH après 48 heures sur cellules ARPE-19	127

Figure 40 : Effets du BBG en préincubation sur la production d'ERO induite par le 7-KC ou le 25-OH après 48 heures sur cellules ARPE-19	128
Figure 41 : Effets du probénécide en co-incubation sur la production d'ERO induite par le 7-KC ou le 25-OH après 48 heures sur cellules ARPE-19.....	129
Figure 42 : Quantification des stérols de kératinocytes issus de biopsies cutanées de patients jeunes et âgés.....	146
Figure 43 : Quantification des stérols de kératinocytes primaires issus de donneurs jeunes et âgés après irradiation avec une dose UV de 2,5 J/cm ²	148
Figure 44 : Analyse des profils lipidiques avant et après irradiation UV.	150
Figure 45 : Quantification des stérols avant et après irradiation des kératinocytes HaCaT à deux doses d'UV différentes : 1 J/cm ² (A) et 2,5 J/cm ² (B)	152
Figure 46 : Evaluation de la viabilité cellulaire par le test au rouge neutre après 48 heures d'incubation avec des oxystérols.....	155
Figure 47 : Dosage du 7-KC (A) et du 25-OH (B) dans les cellules HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC à 5 et 20 µM ou le 25-OH à 10 et 40 µM	157
Figure 48 : Altérations lipidiques induites par le 7-KC (A) et le 25-OH (B) après 48 heures d'incubation avec les cellules HaCaT.....	159
Figure 49 : Altérations de l'asymétrie lipidique membranaire induite par le 7-KC (A) et le 25-OH (B) après 48 heures d'incubation avec les cellules HaCaT	160
Figure 50 : Expression du ganglioside GM1, composant exclusif des radeaux lipidiques, après incubation avec le 7-KC et le 25-OH sur cellules HaCaT.....	162
Figure 51 : Expression de la cavéoline-1 dans des cellules HaCaT incubées pendant 48 heures avec du 7-KC (A) ou du 25-OH (B)	163
Figure 52: Quantification de l'expression de la cavéoline-1 dans des cellules HaCaT incubées pendant 48 heures avec du 7-KC (A) ou du 25-OH (B).....	164
Figure 53 : Localisation cellulaire de la cavéoline-1 dans les kératinocytes HaCaT incubés pendant 48 heures avec du 7-KC ou du 25-OH	165
Figure 54 : Expression des récepteurs P2X7 dans les kératinocytes HaCaT incubés pendant 48 heures avec le 7-KC ou le 25-OH	167
Figure 55 : Activation des pore P2X7 des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B)	168
Figure 56 : Effets du BBG sur l'activation des récepteurs P2X7 après 48 heures d'incubation avec le 25-OH sur les kératinocytes HaCaT.....	169

Figure 57 : Effets du probénécide sur l'activation des récepteurs P2X7 induite par le 25-OH après 48 heures d'incubation avec les kératinocytes HaCaT (n=4).....	170
Figure 58 : Activité de la caspase 1 des cellules HaCaT incubées pendant 48 heures avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B)	171
Figure 59 : Dosage de MMP-9 dans les surnageants cellulaires de cellules HaCaT incubées pendant 48 heures avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B)	172
Figure 60 : Dosage de la cytokine IL-1 α dans les surnageants des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B).....	173
Figure 61 : Dosage de la cytokine IL-6 dans les surnageants des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B).....	174
Figure 62 : Dosage de la cytokine IL-8 dans les surnageants des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B).....	175
Figure 63 : Dosage de la cytokine MIF dans les surnageants des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B).....	176
Figure 64 : Evaluation de la condensation de la chromatine après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B)	177
Figure 65 : Activité de la caspase 8 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B).....	178
Figure 66 : Activité de la caspase 3 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B).....	179
Figure 67 : Dosage du granzyme B dans les surnageants cellulaires des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B).....	180
Figure 68 : Prolifération cellulaire des kératinocytes HaCaT en présence de 7-KC (A) ou de 25-OH (B).....	182
Figure 69 : Etude du cycle cellulaire des kératinocytes HaCaT après incubation avec le 7-KC à 5 μ M et 20 μ M, le 25-OH 20 et 40 μ M et le 5-FU à 10 μ M	184
Figure 70 : Morphologie cellulaire après incubation avec le 7-KC ou le 25-OH ou après irradiation UV	186
Figure 71 : Observation en microscopie confocale des filaments d'actine des cellules HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH.....	188
Figure 72 : Evaluation de l'autophagie sur les kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B)	190

Figure 73 : Observation microscopiques de l'expression de l'involucrine dans les kératinocytes HaCaT incubés pendant 48 heures avec le 7-KC ou le 25-OH	191
Figure 74 : Quantification de l'expression de l'involucrine dans des kératinocytes HaCaT incubés pendant 48 heures avec du 7-KC (A) ou du 25-OH (B).....	192
Figure 75 : Evaluation du taux de calcium intracellulaire dans les kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B)	194
Figure 76 : Quantification des oxystérols dans les cellules de l'épithélium cornéen avant et après irradiation UV à 2,5 J/cm ²	199
Figure 77 : Schéma du processus dégénératif conduisant à la dégénérescence rétinienne	214
Figure 78 : Processus de dégénérescence induit par le 25-OH dans les kératinocytes ..	215
Tableau I : Classification des types de peau d'après Fitzpatrick.....	60
Tableau II : Informations concernant les sujets à l'origine des cultures primaires de kératinocytes.....	86
Tableau III : Classes de lipides modifiés dans les kératinocytes HaCaT suite à une irradiation UV de 2,5 J/cm ²	151
Annexe A : Article 4 : A fast and reproducible cell- and 96-well plate-based method for the evaluation of P2X7 receptor activation using YO-PRO-1 fluorescent dye.....	253
Annexe B : Article 5 : Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line.	273
Annexe C : Détail des lipides modifiés après irradiation UV.....	283
Annexe D : Article 3 : 25-hydroxycholesterol induces degenerative pathways in human skin cells involving P2X7 cell death receptor and granzyme B.....	287

INTRODUCTION

Les processus de dégénérescence et de vieillissement semblent intrinsèquement liés : le vieillissement normal fait intervenir des phénomènes de dégénérescence et les pathologies dégénératives s'apparentent à un vieillissement anormal. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et le photovieillissement cutané sont de parfaits exemples de la relation entre ces deux processus. Nous avons choisi ces deux désordres à l'interface entre dégénérescence et vieillissement pour explorer les mécanismes sous-jacents. En effet, la compréhension de ces processus apparaît comme un élément essentiel pour retarder leur apparition et leur progression ainsi que pour la recherche de modulateurs.

Les oxystérols, dérivés oxydés du cholestérol, sont associés aux mécanismes toxiques de certaines pathologies dégénératives telles que les maladies d'Alzheimer ou encore la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Toutefois, l'élément déclencheur de ces mécanismes toxiques est mal connu. Les purinorécepteurs P2X7 jouent un rôle crucial dans les processus de dégénérescence et de mort cellulaire. Nous avons ainsi centré notre étude sur la relation entre les oxystérols et les récepteurs P2X7.

Dans un premier temps, nous avons identifié le rôle de ces deux acteurs dans une pathologie dégénérative, la DMLA. Nous avons choisi un modèle cellulaire de dégénérescence rétinienne utilisant le peptide β amyloïde pour étudier le lien entre ce peptide et les oxystérols. Puis, nous avons évalué les effets des oxystérols sur les cellules de rétine en plaçant le récepteur P2X7 au centre de notre étude.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes focalisée sur le rôle des oxystérols dans le processus de vieillissement accéléré de la peau. Nous avons étudié les effets de ces oxystérols sur les kératinocytes en mettant l'accent sur les mécanismes de mort cellulaire et le turnover des kératinocytes.

Cette thèse débutera par un état des connaissances actuelles sur l'ensemble des domaines de recherche abordés au cours de nos travaux personnels. Nous détaillerons l'épidémiologie ainsi que la physiopathogenèse de deux pathologies dégénératives, la maladie d'Alzheimer et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Puis, nous rappellerons la physiologie de la peau et les caractéristiques cliniques et tissulaires du

vieillissement cutané. Enfin, les processus toxiques associés aux dégénérescences et vieillissement seront décrits.

Cette partie sera suivie par le matériel et les méthodes utilisés dans notre étude. La partie suivante sera consacrée à l'exposition de nos principaux résultats et à leur interprétation. Ces résultats seront divisés en deux sous-parties, la première centrée sur la DMLA et la seconde sur le photovieillissement. Nous terminerons par une conclusion résumant les points clés et tirerons les principaux enseignements de notre travail, avant d'ouvrir l'étude vers de nouvelles perspectives.

I. RAPPELS ET ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

1. Dégénérescence et vieillissement

La dégénérescence correspond à l'altération d'une cellule ou d'un tissu lui faisant perdre ses caractéristiques fonctionnelles normales et pouvant aboutir à sa disparition, selon la définition de l'encyclopédie Larousse. La dégénérescence, souvent liée au vieillissement de l'organisme, demeure un processus multifactoriel puisque, outre le facteur biologique (âge), des facteurs génétiques ou encore physiques (tel que le rayonnement UV) peuvent intervenir.

Le terme vieillissement fait référence, quant à lui, à l'ensemble des processus physiologiques et psychologiques qui modifient la structure et les fonctions de l'organisme à partir de l'âge mûr (Collège national des enseignants de gériatrie (France), 2000). Il s'agit d'un processus normal, lent et progressif. De la même façon, le vieillissement résulte de deux facteurs, le premier est intrinsèque, dû aux effets du temps, tandis que le second, extrinsèque, est dû à des facteurs extérieurs auxquels est soumis l'organisme (facteurs environnementaux).

1.1. Pathologies neurodégénératives : exemples de la maladie d'Alzheimer et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

Il existe de nombreuses pathologies dégénératives, dont certaines sont liées à l'âge, pouvant affecter différents tissus. La maladie dégénérative la plus répandue dans le monde est la maladie d'Alzheimer, pathologie neurodégénérative évolutive débutant dans la plupart des cas après 65 ans, induisant une altération des fonctions cognitives (démence) plus importante que lors d'un vieillissement normal. Il est à noter que la maladie peut survenir plus jeune, notamment dans le cas de formes familiales héréditaires. Cette pathologie est la principale cause de démence selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) présente des similitudes avec la maladie d'Alzheimer comme en témoigne l'expression « l'Alzheimer de l'œil » pour désigner la DMLA (Kaarniranta et al., 2011). La DMLA est une pathologie dégénérative chronique évolutive de la rétine débutant après 50 ans. Deux formes évolutives de la maladie peuvent être rencontrées : une forme « sèche » ou atrophique, la plus fréquente, et une forme « humide » appelée aussi exsudative ou néovasculaire.

Nous nous focaliserons ici sur ces deux pathologies dont la prévalence tend à augmenter du fait du vieillissement de la population.

1.1.1. Epidémiologie

La maladie d'Alzheimer et les syndromes qui lui sont apparentés (maladies présentant les mêmes types de symptômes) constituent un problème de santé publique. En effet, il a été estimé que cette pathologie touchait plus de 47 millions de personnes dans le monde en 2015 ; plus de 7 millions de cas sont diagnostiqués chaque année dans le monde soit un nouveau cas toutes les 4 secondes environ (World Health Organization, 2015).

La prévalence de la maladie d'Alzheimer augmente avec l'âge. En Europe, d'après le projet EuroCoDe (European Collaboration on Dementia), la prévalence de cette pathologie est de 0,6% pour la tranche d'âge de 60 à 64 ans. Cette prévalence augmente jusqu'à atteindre 46,3% chez les personnes d'âge supérieur à 95 ans. La prévalence de cette maladie est plus élevée chez les femmes que chez les hommes. En effet, pour la tranche d'âge de 85 à 89 ans par exemple, celle-ci est de 20,9% chez les hommes contre 28,5% chez les femmes (EuroCoDe European Collaboration on Dementia, 2006). En France, le nombre de personnes atteintes par la maladie d'Alzheimer a été estimé à 754 000 en 2010, une augmentation de ce nombre est attendue dans les prochaines décennies du fait du vieillissement de la population (Mura et al., 2010).

D'après l'OMS, la DMLA est, au niveau mondial, la troisième cause de déficience visuelle. Dans les pays industrialisés, cette pathologie représente même la principale cause de déficience visuelle (World Health Organization, 2016). Selon une étude épidémiologique réalisée au niveau européen entre les années 2000 et 2003 (étude

EUREYE the European Eye Study), la prévalence de la DMLA au sein de la population européenne âgée de 65 ans ou plus est évaluée à 3,3% soit 2,5 millions de personnes (Augood et al., 2006).

La prévalence de la DMLA augmente avec l'âge, d'environ 1% pour la tranche 65-69 ans à 7% chez les hommes et 15% chez les femmes pour la tranche d'âge supérieure à 80 ans. Au niveau mondial d'autres études ont été réalisées notamment aux Etats-Unis et en Australie. Ces études ont mis en évidence une différence de prévalence selon l'origine ethnique : les personnes hispaniques, caucasiennes et asiatiques semblent plus exposées que les personnes noires (Fisher et al., 2016; Klein R et al., 2011). En France, selon l'étude ALIENOR (Antioxydants, Lipides Essentiels, Nutrition et maladies OculaiRes, 2006-2008), la prévalence de la DMLA sévère (associée à une déficience visuelle) est comprise entre 1,8% (chez les femmes) et 3,5% (chez les hommes) pour une population comprise entre 73 et 79 ans. Cette prévalence augmente avec l'âge atteignant, après 80 ans, 6,8% chez les hommes et 10,4% chez les femmes (Delcourt et al., 2010). Du fait du vieillissement de la population, une augmentation de cette pathologie liée à l'âge est attendue dans les prochaines années.

D'après les données épidémiologiques, le développement d'une DMLA ne semble pas lié à celui de la maladie d'Alzheimer au niveau individuel bien que ces deux pathologies présentent des facteurs de risque communs (Keenan et al., 2014).

1.1.2. Facteurs de risque

1.1.2.1. Facteurs de risque communs à la maladie d'Alzheimer et à la DMLA

Certains facteurs de risque sont associés à la fois à la survenue et au développement de la maladie d'Alzheimer mais aussi de la DMLA. Le principal facteur de risque de ces deux pathologies est l'âge. En effet, comme nous venons de le voir, les différentes études épidémiologiques réalisées ont établi que la prévalence de ces deux maladies augmentait avec l'âge.

De nombreux facteurs de risques cardiovasculaires ont été associés à la survenue et au développement de la maladie d'Alzheimer ou de la DMLA, notamment

l'hypertension artérielle, l'obésité ou encore l'hypercholestérolémie. Ces trois facteurs de risque sont clairement établis dans le cas de la maladie d'Alzheimer (EuroCoDe European Collaboration on Dementia, 2008). En ce qui concerne la DMLA, l'étude AREDS (Age-Related Study Research Group) a notamment confirmé le lien entre l'hypertension artérielle, l'obésité et la DMLA (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2000). Le métabolisme lipidique, en particulier le taux de cholestérol, pourrait également constituer un facteur de risque de la DMLA (Cohen et al., 2014). Le diabète, un autre facteur de risque cardiovasculaire, pourrait aussi représenter un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer et la DMLA. Cependant, cette association reste à établir clairement dans le cas de la maladie d'Alzheimer car les résultats des études sont contradictoires : certaines études établissent un lien entre diabète et maladie d'Alzheimer (Bitra et al., 2015; Li et al., 2015b) tandis que d'autres réfutent ce lien, affirmant que le diabète constitue un facteur de risque pour le développement de pathologies cérébrovasculaires mais pas de la maladie d'Alzheimer (Abner et al., 2016). Dans le cas de la DMLA, le diabète semble également être un facteur de risque, mais ces résultats demandent à être confirmés par des études supplémentaires (Chen et al., 2014).

Au niveau environnemental, le tabagisme est un facteur de risque commun aux deux pathologies. En effet, le tabagisme augmente d'environ deux fois le risque de développer la maladie d'Alzheimer (Cataldo et al., 2010). La consommation de tabac, connue pour son implication dans de nombreuses maladies, induit au niveau cérébral des modifications sur le volume de l'hippocampe mais aussi sur les fonctions cognitives telles que la mémoire ; ce type de modification a été retrouvé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ce qui peut corroborer l'association entre tabac et maladie d'Alzheimer (Durazzo et al., 2014). Le tabagisme est également un facteur de risque connu de la DMLA, multipliant le risque de développer une DMLA de deux à quatre pour les fumeurs comparé aux personnes n'ayant jamais fumé (Velilla et al., 2013). Une étude a montré que les signes de la DMLA survenaient plus précocement, en moyenne 10 ans plus tôt, chez les fumeurs que chez les non-fumeurs (Mitchell P et al., 2002).

Au niveau nutritionnel, le régime alimentaire pourrait avoir un effet sur la maladie d'Alzheimer et la DMLA. En effet, le suivi d'un régime alimentaire de type méditerranéen est associé à une réduction du risque de développer la maladie

d'Alzheimer (Scarmeas et al., 2006). Le régime méditerranéen consiste en une forte consommation de légumes, fruits, céréales, ainsi que d'acides gras insaturés (contenus dans l'huile d'olive par exemple) accompagnée d'une faible consommation d'acides gras saturés (huile de palme, beurre...). Ce régime est pauvre en cholestérol, or l'hypercholestérolémie constitue un facteur de risque de la maladie d'Alzheimer. Dans le cas de la DMLA également, le suivi d'un régime alimentaire de type méditerranéen permet un ralentissement de l'évolution de la DMLA vers une forme avancée (Merle et al., 2015). L'étude EUREYE a montré que le suivi de ce régime protégeait des formes néovasculaires (Hogg et al., 2015; Piermarocchi et al., 2015). De plus, selon l'étude AREDS, une supplémentation en vitamines C, E, bêta-carotène, cuivre et zinc retarde la progression de la DMLA (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001).

La pratique d'exercice physique aurait, elle aussi, un impact sur la maladie d'Alzheimer ou la DMLA. En effet, un risque plus faible de développement de la maladie d'Alzheimer est observé lors d'une pratique d'exercice physique régulière (Scarmeas et al., 2009). Chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, cette pratique sportive est bénéfique puisqu'elle semble retarder la progression des signes cliniques de cette pathologie et stimuler les fonctions cognitives des patients (Holthoff et al., 2015). En ce qui concerne la DMLA, une étude épidémiologique réalisée aux Etats-Unis montre un effet protecteur de la pratique d'activité physique, en particulier la marche, sur la survenue d'une DMLA, plus particulièrement de type exsudatif (Knudtson et al., 2006).

1.1.2.2. Facteurs de risque spécifiques de la maladie d'Alzheimer

Des facteurs génétiques peuvent prédisposer au développement de la maladie d'Alzheimer. Cette susceptibilité génétique est particulièrement observée dans les formes familiales précoces de la maladie. Des mutations sur certains gènes ont été identifiées, notamment sur le gène précurseur du peptide β amyloïde (APP) ou encore sur les gènes de la préséniline (Migliore and Coppédè, 2009). L'étude de cas sporadiques de la maladie d'Alzheimer a également mis en évidence plus d'une vingtaine de gènes pouvant être associés à cette pathologie, parmi lesquels l'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (Van Cauwenberghe et al., 2015). Cet allèle avait initialement été associé aux formes familiales de la maladie d'Alzheimer à début tardif (Strittmatter et al., 1993).

Le sexe constitue un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer. En effet, dans l'ensemble, cette pathologie touche préférentiellement les femmes, comme le démontrent les études épidémiologiques (*cf* sous-partie 1.1.2.1.). Cette différence est plus ou moins marquée selon les tranches d'âge. L'espérance de vie plus élevée chez les femmes pourrait en partie expliquer cette différence (EuroCoDe European Collaboration on Dementia, 2008).

L'effet de la consommation d'alcool sur la maladie d'Alzheimer reste controversé. Certaines études semblent montrer un effet protecteur d'une consommation modérée de boissons alcoolisées, en particulier le vin, sur la survenue de la maladie d'Alzheimer (Luchsinger et al., 2004; Orgogozo et al., 1997). Cet effet pourrait être notamment dû à la présence d'antioxydants de type resvératrol dans certaines boissons alcoolisées telles que le vin. A l'inverse, l'alcoolisme est connu pour ses effets néfastes sur la fonction cérébrale (Tan et al., 2012), des études ont ainsi associé une importante consommation d'alcool à une augmentation du risque de survenue de la maladie d'Alzheimer (Langballe et al., 2015; Ruitenberg et al., 2002). Les effets néfastes ou protecteurs de la consommation d'alcool sur la survenue de la maladie d'Alzheimer semblent dose-dépendants, cependant il conviendrait de réaliser de nouvelles études pour pouvoir conclure clairement sur le rôle de l'alcool en tant que facteur de risque dans la maladie d'Alzheimer (EuroCoDe European Collaboration on Dementia, 2008).

La dépression pourrait être associée à la survenue et au développement de la maladie d'Alzheimer (Green et al., 2003). Cependant, ce lien est parfois difficile à établir car une dépression peut également marquer le début de la maladie d'Alzheimer.

1.1.2.3. Facteurs de risque spécifiques de la DMLA

L'origine ethnique représente un facteur de risque de la DMLA puisque les personnes de type caucasien sont plus prédisposées à développer une DMLA que les personnes noires (*cf* sous-partie 1.1.2.2.).

Des facteurs génétiques ont également été associés à la survenue de la DMLA. Des gènes impliqués dans l'immunité (système du complément), dans le transport membranaire, dans le développement vasculaire ou encore dans le métabolisme lipidique ont été identifiés (Mousavi and Armstrong, 2013).

L'exposition à la lumière du soleil semble également constituer un facteur de risque de la DMLA. Plusieurs études rapportent une association entre une forte exposition à la lumière du soleil et la survenue d'une DMLA (Klein et al., 2014; Schick et al., 2015; Sui et al., 2013).

L'hypermétropie, les iris clairs ou encore une chirurgie de la cataracte sont suspectés d'être des facteurs de risque de survenue ou de progression d'une DMLA (Fraser-Bell et al., 2010).

1.1.3. Physiopathologie

1.1.3.1. *Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer*

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative évolutive. Cette pathologie est initialement caractérisée, en général, par des troubles mnésiques épisodiques de la mémoire récente. Avec l'évolution de la maladie, ces troubles peuvent être suivis par des troubles des fonctions exécutives, ainsi que par des troubles de l'orientation dans le temps et dans l'espace. D'autres fonctions cognitives sont ensuite altérées avec des troubles de la parole (aphasie) et de l'écriture (dysorthographe), des troubles des gestes volontaires (apraxie) et troubles de la reconnaissance visuelle et auditive (agnosie). Des troubles psychocomportementaux surviennent également : dépression, irritabilité en sont des exemples. Ces différents troubles conduisent à une perte d'autonomie des personnes atteintes de cette pathologie.

Deux types de lésions tissulaires sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer : les dégénérescences neurofibrillaires et les plaques amyloïdes ou plaques séniles.

Les dégénérescences neurofibrillaires sont dues à une hyperphosphorylation de la protéine Tau (tubule-associated unit) principalement dans les corps cellulaires des neurones. La protéine Tau est une phosphoprotéine normalement présente dans le cerveau, en particulier au niveau des neurones. Cette protéine soluble assure la stabilité des microtubules axonaux *via* son interaction avec la tubuline. En cas d'hyperphosphorylation, comme cela a été observé dans la maladie d'Alzheimer, la solubilité de cette protéine est modifiée, et une agrégation, notamment au niveau des

neurones, est observée conduisant à la formation de filaments insolubles. Les microtubules se désintègrent alors, empêchant le transport des nutriments contribuant à une mort neuronale. L'hyperphosphorylation de la protéine Tau apparaît donc comme un élément important dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Khan and Bloom, 2016; Lebon and Duyckaerts, 2014).

Les plaques amyloïdes, situées entre les neurones dans le cerveau, sont des dépôts extracellulaires principalement composés de peptide β amyloïde. Ce peptide est riche en feuillets β , structure protéique secondaire qui semble liée à sa toxicité (Simmons et al., 1994). Le peptide β amyloïde est formé à partir d'une protéine transmembranaire appelée APP (Amyloid Precursor Protein), lorsqu'elle est clivée par une β -sécrétase (ou BACE1) puis une γ -sécrétase (Nhan et al., 2015; Puzzo et al., 2015; Vassar et al., 1999). Le clivage de la protéine APP peut aussi former un composé non amyloïdogène suite à l'action de l' α -sécrétase puis de la γ -sécrétase (figure 1).

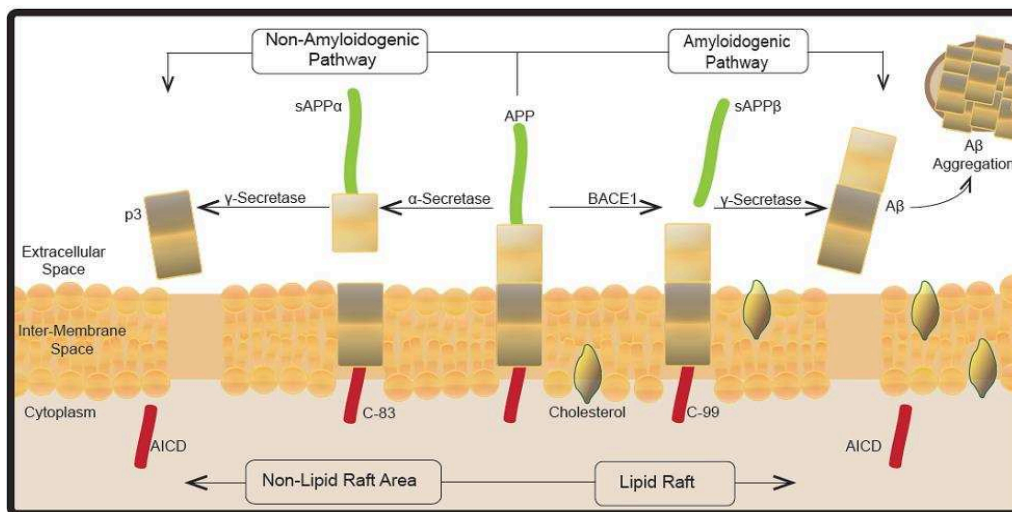


Figure 1 : Les deux voies de clivage de la protéine APP (Read and Suphioglu, 2013)

Le clivage de la protéine APP a lieu dans la membrane plasmique. Pour la voie amyloïdogène, ce clivage se produit dans des zones particulières de la membrane plasmique : les radeaux lipidiques (ou lipid rafts) (Ehehalt et al., 2003). Les radeaux lipidiques sont des zones particulièrement riches en sphingolipides et en cholestérol (Simons and Ikonen, 1997).

Le peptide β amyloïde est naturellement présent dans le cerveau (Haass et al., 1992). Les mécanismes conduisant de la physiologie à la pathologie demeurent mal connus. Différentes altérations peuvent conduire à une accumulation de peptide β amyloïde. En effet, les formes familiales de la pathologie ont été notamment associées à des mutations sur les gènes APP ou sur les gènes de la préséniline (composants de la γ -sécrétase) (Migliore and Coppèdè, 2009). Dans les formes non familiales, des mécanismes épigénétiques ont entraîné des modifications, notamment des hypométhylations sur les gènes codant pour APP, BACE ou la préséniline (Wang et al., 2013). Ainsi, une accumulation de peptide β amyloïde serait observée suite à une augmentation de production de ce peptide ou à une augmentation de la production de certaines isoformes de ce peptide. En effet, le peptide β amyloïde existe sous différentes isoformes comprenant en général 39 à 43 acides aminés, du fait de la variabilité des sites de clivage du précurseur APP. L'isoforme du peptide β amyloïde comprenant 42 acides aminés fait partie des isoformes les moins solubles et possède une forte tendance à s'agréger *via* l'association des feuillets β qui la composent, formant alors des oligomères, des fibrilles, ou des protofibrilles (Selkoe, 2001). Ainsi, les plaques amyloïdes sont principalement composées de cette isoforme. L'accumulation de peptide β amyloïde peut également être due à une diminution de sa dégradation. Le peptide β amyloïde est dégradé principalement *via* la néprilysine. Or, une diminution de la concentration de néprilysine a été observée dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, principalement au niveau des plaques amyloïdes (Yasojima et al., 2001). Par conséquent, des modifications de cette enzyme peuvent aussi jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer.

L'accumulation du peptide β amyloïde, plus particulièrement sous sa forme oligomérisée, est à l'origine d'un processus appelé « cascade amyloïde » (Hardy and Higgins, 1992). Selon cette hypothèse, le peptide β amyloïde jouerait un rôle central dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. En effet, les oligomères de peptide amyloïde β sont non seulement à l'origine de la formation des plaques amyloïdes mais provoquent également un stress oxydant, un dysfonctionnement mitochondrial et une inflammation (figure 2). De plus, ils induisent une hyperphosphorylation de la protéine Tau et activent la microglie (cellules immunitaires non nerveuses). Cette activation conduit à un processus inflammatoire stimulant alors les astrocytes qui à leur tour vont favoriser la mort neuronale et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau (Kumar et al.,

2015; Lebon and Duyckaerts, 2014; Puzzo et al., 2015). L'ensemble de ces différentes altérations se traduit par le développement de la maladie d'Alzheimer.

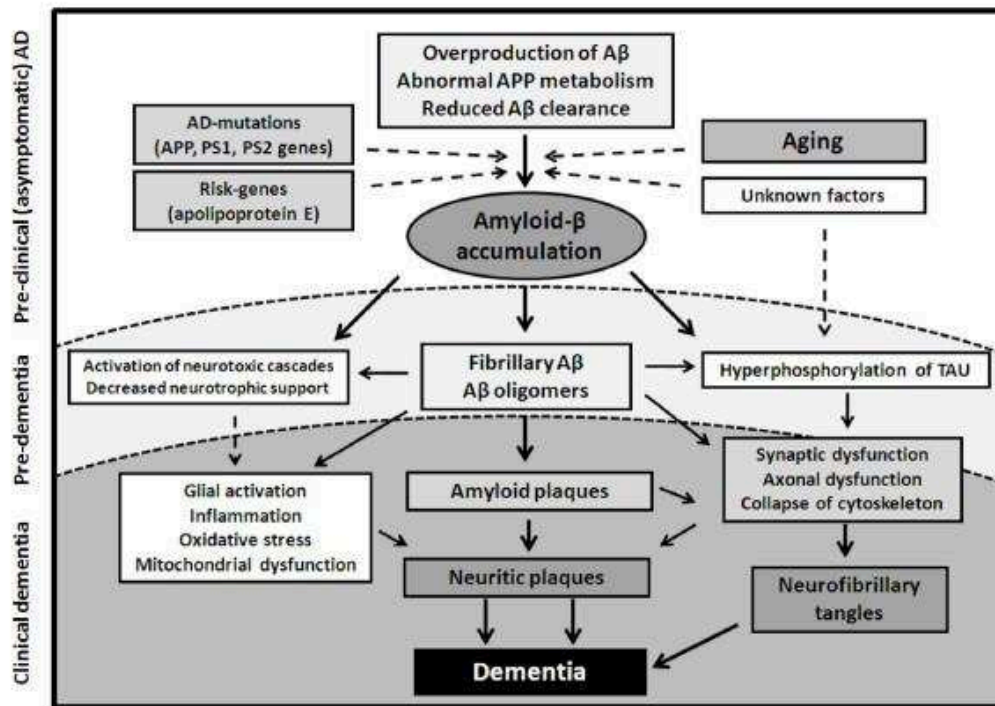


Figure 2 : Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer suivant l'hypothèse de la cascade amyloïde (Forlenza et al., 2010) APP : protéine précurseur du peptide β amyloïde, PS1/2 : préséniline 1 et 2

Certains facteurs peuvent venir aggraver la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Ainsi une hypercholestérolémie modifie le microenvironnement au niveau de la barrière hémato-encéphalique, en augmentant la perméabilité de cette dernière, ce qui permet une entrée de cholestérol dans les cellules du système nerveux central (Chen et al., 2008). En cas d'augmentation du cholestérol intracellulaire, celui-ci s'accumule dans les zones riches en cholestérol des membranes plasmiques : les radeaux lipidiques. Une augmentation du taux de cholestérol dans la membrane cellulaire augmente l'affinité de l'APP pour cette membrane. Or, les β - et γ -sécrétases, responsables du clivage de l'APP, sont également situées dans les radeaux lipidiques, une augmentation de la production de peptide β amyloïde est ainsi observée (Cordy et al., 2006). De plus, l'augmentation du taux de cholestérol favorise également l'agrégation de ce peptide. Le

cholestérol et ses dérivés oxydés, les oxystérols, apparaissent donc comme des facteurs clés dans la formation du peptide β amyloïde.

1.1.3.2. *Physiopathologie de la DMLA*

La DMLA se traduit au cours de son évolution par une diminution de l'acuité visuelle. Une déformation de la vision appelée métamorphopsie peut survenir : les lignes droites deviennent courbes (figure 3A). De plus, une tache centrale ou scotome peut apparaître (figure 3 A et B). D'autres symptômes tels qu'une diminution de la vision des contrastes peuvent être observés. Ces différents symptômes entraînent une altération de la qualité de vie des patients.

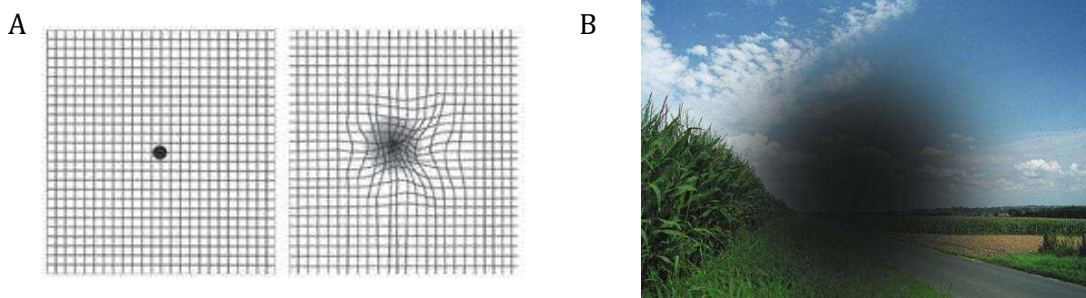


Figure 3 : Altérations de la vision des patients atteints de DMLA A. Grille de Amsler permettant d'évaluer les métamorphopsies (à gauche grille observée par un patient non atteint de DMLA, à droite, grille observée par un patient atteint de DMLA avec une métamorphopsie et un scotome). B. Vision d'un patient atteint d'un scotome

http://www.upmc.fr/fr/recherche/actualites_de_la_recherche/dossiers_thematiques/trajec-toires_de_vies/dmla_quatre_lettres_pour_une_tache_inde ; <http://www.leem.org/degenerescence-maculaire>

Il existe deux formes de DMLA : une forme exsudative et une forme atrophique. La forme exsudative, dont l'évolution peut être rapide, est définie par la formation de nouveaux vaisseaux au niveau de la choroïde. Ces nouveaux vaisseaux fragiles peuvent répandre dans la rétine du sérum, des lipides, ou encore du sang entraînant alors une hémorragie rétinienne. La forme atrophique, d'évolution lente en général, se caractérise

par des lésions au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien puis des photorécepteurs menant à leur disparition progressive.

Quelle que soit sa forme, la DMLA est une pathologie dégénérative affectant la zone centrale de la rétine, appelée macula (figure 4). La macula joue un rôle primordial dans la vision. En effet, les rayons lumineux diurnes convergent vers cette zone de la rétine. La macula comporte en son centre une zone appelée fovéa, siège des photorécepteurs.

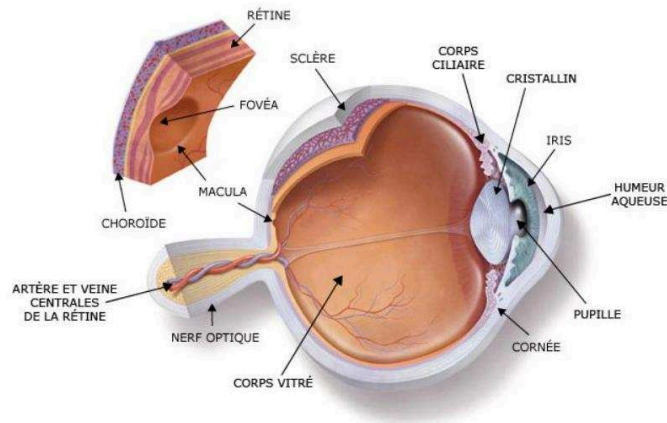


Figure 4 : Coupe de l'œil (issu site Dr Leininger)

<http://dr-leininger.fr/loeil-et-la-vision/anatomie-de-loeil>

Les photorécepteurs reposent sur une monocouche cellulaire, l'épithélium pigmentaire rétinien. Cet épithélium a une fonction de soutien et d'apport en éléments nutritifs pour les photorécepteurs. La choroïde est une zone richement vascularisée permettant l'apport d'oxygène et de nutriments. Le choriocapillaire, faisant partie de la choroïde, est séparé de l'épithélium pigmentaire rétinien par la membrane de Bruch (figure 5).

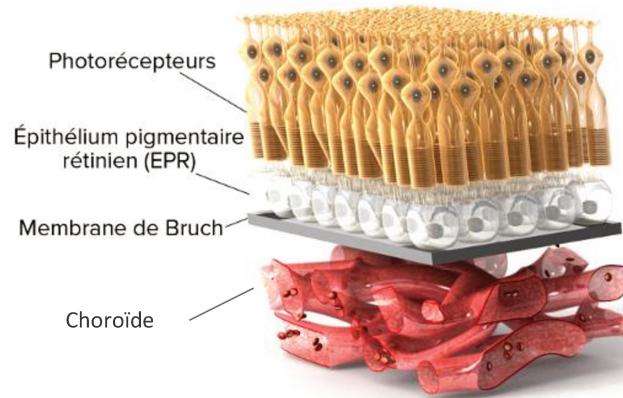


Figure 5 : Coupe de la macula (<http://www.scienceofdme.org/fr/learn/>)

Au stade précoce de la pathologie, appelé maculopathie liée à l'âge, des altérations de l'épithélium pigmentaire rétinien, ainsi que des dépôts appelés drusen situés dans la membrane de Bruch entre les photorécepteurs et la choroïde, sont observés (figure 6A). Lors de la réalisation d'un fond d'œil, ces dépôts se présentent sous forme de taches jaunâtres (figure 6B).

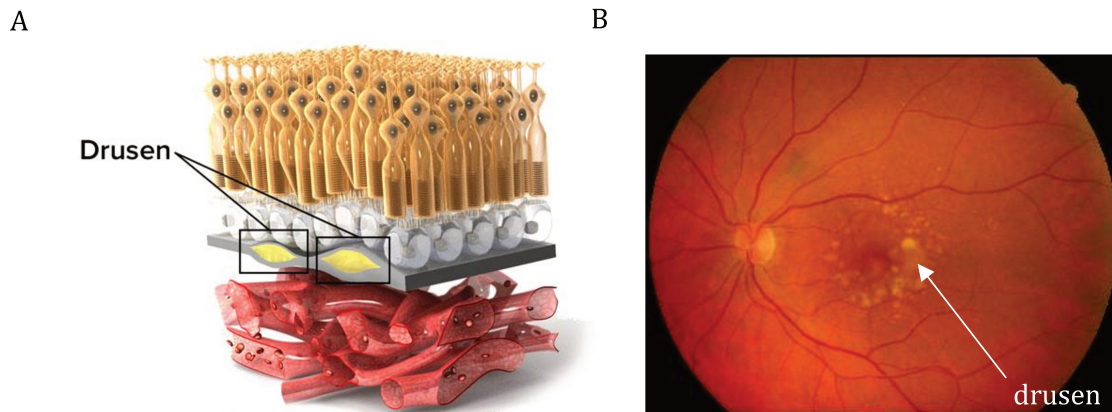


Figure 6 : A. Localisation des drusen. B. Fond d'œil présentant des drusen
(<http://www.scienceofdme.org/fr/learn/>, <http://www.creteilophtalmo.fr/dmla/>)

Ces dépôts extracellulaires sont principalement composés de lipides et de protéines. Les drusen ont été comparés au développement des plaques séniles dans la maladie d'Alzheimer (cf 1.1.3.1. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer). Le premier point commun entre ces deux types de dépôts extracellulaires est la présence de peptide β amyloïde (Anderson et al., 2004; Dentchev et al., 2003; Johnson et al., 2002). Plus

récemment, un second point commun à ces dépôts extracellulaires a été identifié, il s'agit de la présence de certains oxystérols (Javitt and Javitt, 2009).

1.1.3.3. Rôle des oxystérols dans les pathologies neurodégénératives

Le cholestérol peut former par métabolisation enzymatique ou non enzymatique des dérivés oxydés (figure 7) appelés oxystérols (Smith and Johnson, 1989). L'oxydation peut survenir au niveau du squelette stérol mais également sur la chaîne latérale, produisant une diversité de molécules.

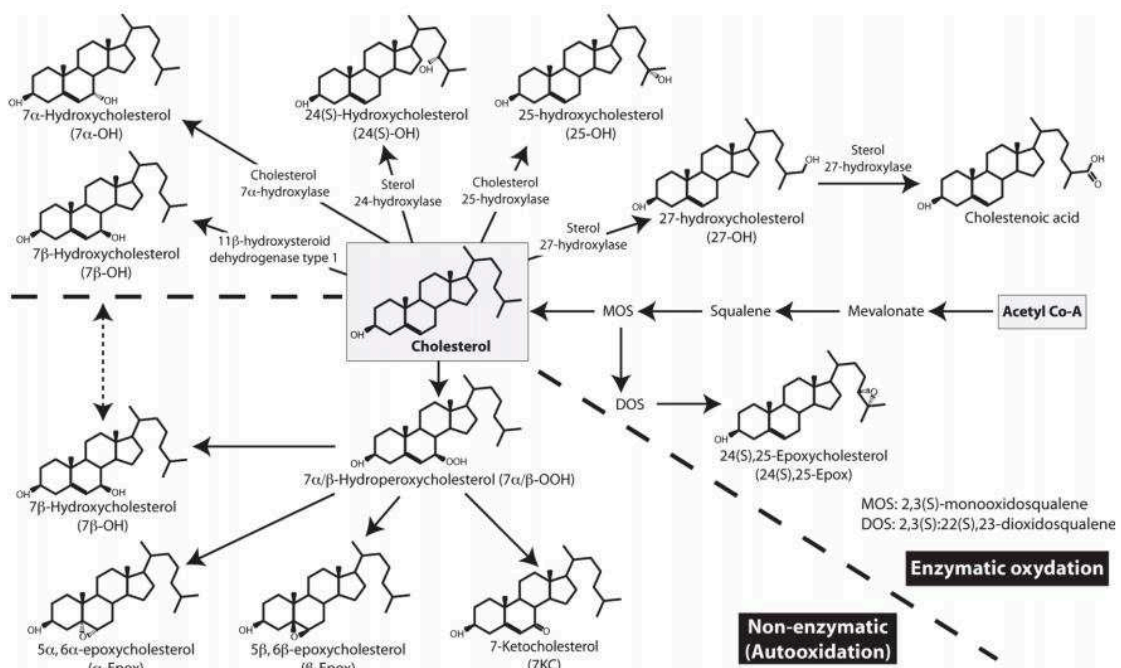


Figure 7 : Différentes voies de formation des dérivés oxydés du cholestérol ou oxystérols (Garenc et al., 2010)

Les oxystérols sont des ligands naturels des récepteurs nucléaires LXR α (Liver X Receptor) et LXR β (Janowski et al., 1996, 1999; Lehmann et al., 1997). Ces récepteurs régulent l'homéostasie du cholestérol (Peet et al., 1998; Zhao and Dahlman-Wright, 2010) mais possèdent également d'autres fonctions métaboliques notamment pour les acides gras et le glucose (Baranowski, 2008).

Certains oxystérols ont été associés à la maladie d'Alzheimer et à la DMLA, ainsi plusieurs chercheurs évoquent le rôle des oxystérols comme biomarqueurs de pathologies dégénératives (Leoni and Caccia, 2011; Wang et al., 2016).

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les recherches se sont majoritairement axées sur le 24 (S)-hydroxycholestérol (24-OH) et le 27-hydroxycholestérol (27-OH). Le 24-OH est en effet principalement produit au niveau cérébral par l'enzyme cholestérol-24S-hydroxylase (isoforme 46A1 du cytochrome P450) (Lütjohann et al., 1996). Le 27-OH quant à lui, est l'oxystérol majoritaire présent dans la circulation sanguine (Narayanaswamy et al., 2015; Schroepfer, 2000). Il est important de préciser que les oxystérols, contrairement au cholestérol, peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (Leoni et al., 2003; Lütjohann et al., 1996). Il a ainsi été démontré que le taux de 27-OH est augmenté tandis que le taux de 24-OH est diminué dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (*post-mortem*) comparés aux taux observés chez des patients « en bonne santé » décédés suite à des accidents (Heverin et al., 2004). Le 27-OH a été associé au déclin cognitif observé chez des souris (Heverin et al., 2015). En effet, le 27-OH induit la production du peptide β amyloïde qui comprend 42 acides aminés, *via* une augmentation de l'expression des protéines APP et de la β -sécrétase (Marwarha et al., 2010; Prasanthi et al., 2009). De plus, le 27-OH induit une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau également impliquée dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer.

Le 24-OH semble, quant à lui, limiter la production de peptide β amyloïde, notamment *via* l'inhibition du transport intracellulaire de son précurseur l'APP (Urano et al., 2013) et la stimulation de la voie non amyloïdogène (Prasanthi et al., 2009). Ainsi une diminution cérébrale des taux de 24-OH, peut induire une augmentation de la production de peptide β amyloïde, favorisant son accumulation.

La conservation du ratio 27-OH/24-OH joue un rôle clé dans le fonctionnement cérébral et la prévention de la maladie d'Alzheimer, d'autant que ce ratio est dépendant des zones cérébrales ; il est par exemple plus faible dans les noyaux gris centraux que dans le cortex (Heverin et al., 2004). Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ce ratio est ainsi modifié.

Le 7-kétocholestérol (7-KC) a également été identifié dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (*post-mortem*) (Hascalovici et al., 2009).

Dans la DMLA, le 27-OH et le 24-OH ne semblent pas être les principaux oxystérols retrouvés, cependant le nombre d'études réalisées concernant les oxystérols et la DMLA est plus faible que le celui concernant les oxystérols et la maladie d'Alzheimer. D'importants taux de cholesterol-24S-hydroxylase ont été retrouvés au niveau de la rétine (Bretillon et al., 2007) ; ainsi, le 24-OH pourrait également jouer un rôle dans le développement de la DMLA. Le 27-OH semble lui aussi associé à la DMLA. En effet, cet oxystérol présente non seulement des effets toxiques pour l'épithélium pigmenté rétinien mais augmente également la production et l'accumulation de peptide β amyloïde dans l'œil (Dasari et al., 2010). Ce second effet est similaire à celui observé au niveau cérébral. Le principal oxystérol associé à la DMLA est le 7-KC. En effet, cet oxystérol a été identifié dans les drusen de patients atteints de DMLA (Javitt and Javitt, 2009). Des études *in vitro* se sont intéressées à d'autres oxystérols tels que le 7- β hydroxycholestérol (7 β -OH), le 25-hydroxycholestérol (25-OH) et notamment à leurs interactions avec le peptide β amyloïde (Nelson and Alkon, 2005; Phan et al., 2013).

1.2. Vieillessement cutané physiologique et accéléré

L'organe dont le vieillissement est le plus visible est la peau puisqu'elle constitue l'enveloppe extérieure du corps humain, en continuité avec les muqueuses tapissant les cavités de l'organisme. La peau constitue l'organe le plus étendu avec une surface d'environ deux mètres carrés mais également le plus lourd avec un poids d'environ cinq kilogrammes chez l'adulte (Dréno, 2009). Les glandes cutanées, sébacées et sudoripares, ainsi que les phanères, poils et ongles, sont définis comme des annexes cutanées. Nous décrivons d'abord la physiologie de la peau, avant de nous focaliser sur le vieillissement cutané.

1.2.1. Physiologie de la peau

1.2.1.1. Structure de la peau

La peau est recouverte d'un film hydrolipidique constitué d'un mélange de sueur et de sébum ainsi que de quelques lipides issus de la couche la plus externe de l'épiderme (Dréno, 2009; Pappas, 2009). Les composants hydrosolubles de ce film sont apportés par la sueur : chlorure de sodium, oligo-éléments, acide lactique, acide urique, acides aminés... (Mélissopoulos and Levacher, 2012). Ces composants sont responsables du pH légèrement acide (compris entre 5 et 6) de la peau. La partie lipidique de ce film est majoritairement apportée par le sébum. Le sébum est principalement composé de lipides non polaires tels que des triglycérides, de cires, de squalène ainsi que d'une faible quantité de cholestérol (Smith and Thiboutot, 2008). La composition du film hydrolipidique diffère en fonction de l'âge, du sexe et des régions du corps (Mélissopoulos and Levacher, 2012). Le film hydrolipidique constitue une barrière protectrice pour la peau en préservant son l'hydratation et en évitant la pénétration de certains agents pathogènes. Certains acides gras libres possèdent notamment des propriétés antimicrobiennes protégeant ainsi la peau de certains agents bactériens (Drake et al., 2008). En outre, le pH légèrement acide contribue également à ces fonctions protectrices et au maintien de la flore bactérienne cutanée (Mélissopoulos and Levacher, 2012).

La peau est divisée en trois couches principales, de la superficie vers l'intérieur de l'organisme : épiderme, derme et hypoderme (figure 8) (Mélissopoulos and Levacher, 2012). Du fait de l'absence de limite franche entre le derme et l'hypoderme, l'hypoderme n'est pas toujours reconnu comme une couche à part entière mais peut être associé au derme. L'épiderme est plus ou moins épais suivant les zones de l'organisme. Son épaisseur varie entre 0,1 millimètre au niveau des paupières contre 1 millimètre au niveau de la paume des mains ou de la plante des pieds (Dréno, 2009). Ainsi, par convention, une peau est dite épaisse ou fine en fonction de l'épaisseur de l'épiderme.

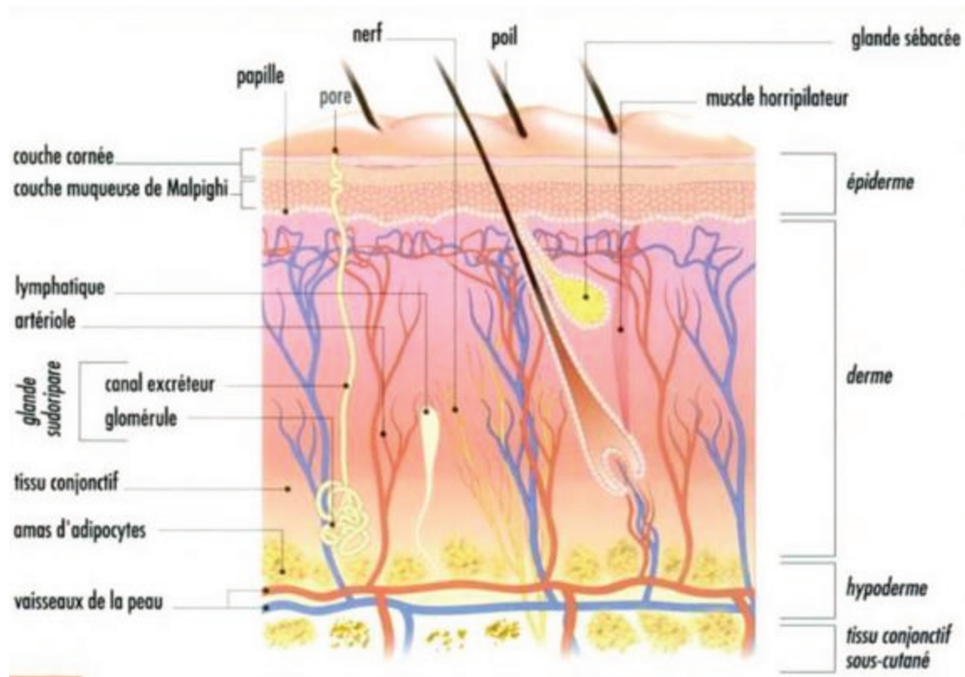


Figure 8 : Structure de la peau (Lacombe, 2006)

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé constitué de plus de 80 % de kératinocytes (Mélissopoulos and Levacher, 2012; Tortora and Derrickson, 2011). En outre, d'autres types cellulaires minoritaires sont présents dans l'épiderme (figure 9).

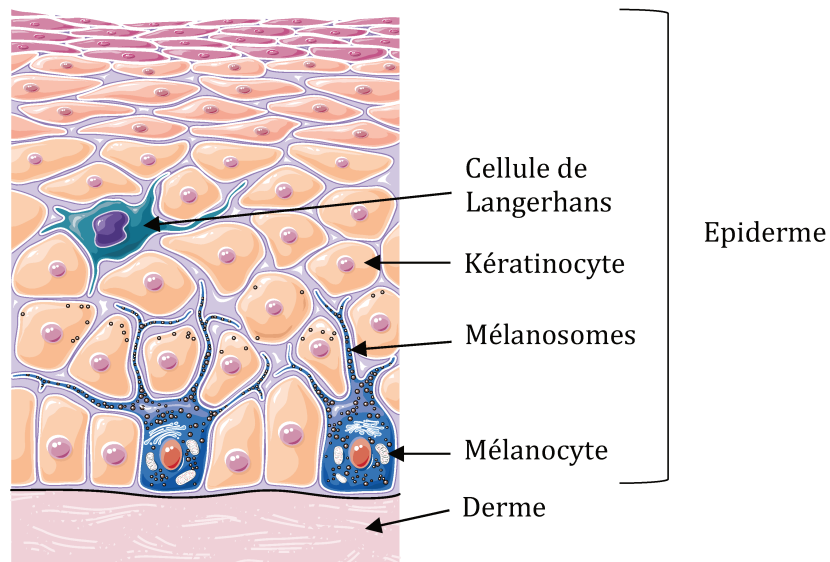


Figure 9 : Localisation des différentes cellules de l'épiderme (adaptée du site Servier Medical Art)

Les kératinocytes sont des cellules capables de se différencier. Au cours de ce processus, la production d'une protéine insoluble dans l'eau est observée : la kératine. L'épiderme peut être divisé en quatre couches, de la plus superficielle à la plus profonde : couche cornée, couche granuleuse, couche spinieuse et couche basale (figure 10). Au cours de leur différenciation, les kératinocytes migrent en trois à quatre semaines depuis la couche basale jusqu'à la couche cornée.

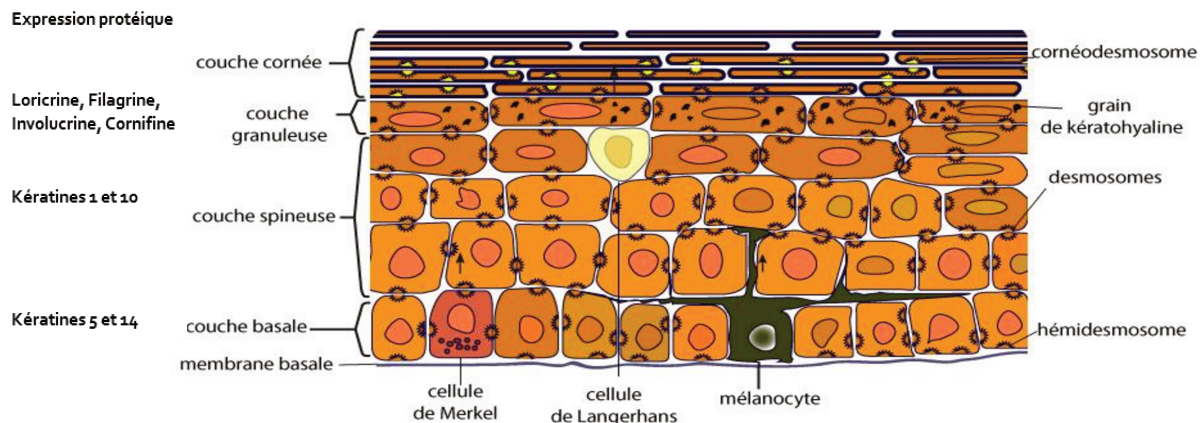


Figure 10 : Structure de l'épiderme (adapté du site Biologie de la peau)

Les quatre couches de l'épiderme sont représentées sur ce schéma ainsi que les cellules qui les composent. L'expression protéique des kératinocytes de ces différentes couches est également indiquée.

La couche la plus superficielle, couche cornée ou *stratum corneum*, est composée de cornéocytes correspondant à l'état de différenciation terminale des kératinocytes (Dréno, 2009; Tortora and Derrickson, 2011). Les cornéocytes sont de forme aplatie, ils ne comportent plus de noyaux ni d'organelles cytoplasmiques. Les cellules sont desquamantes à la surface de cette couche mais compactes en profondeur où les cornéocytes sont reliés entre eux par des cornéodesmosomes. Les cornéocytes reposent dans un milieu extracellulaire composé principalement de céramides, de cholestérol et d'acides gras libres (Weerheim and Ponc, 2001). Ces lipides jouent un rôle important dans les fonctions de barrière exercées par la peau.

La couche granuleuse ou *stratum granulosum* se situe sous la couche cornée. Les kératinocytes de cette couche sont aplatis mais comportent un noyau, contrairement aux

cornéocytes. Ces kératinocytes comportent des grains basophiles appelés grains de kératohyaline. Ces grains sont composés de profilagrine qui se transforme en filagrine dans la couche cornée, capable d'agréger des filaments de kératine notamment. Une autre protéine, la loricrine, est également présente dans la couche granuleuse ainsi qu'au début de la couche cornée. De plus, les kératinocytes jouxtant la couche cornée libèrent leurs composants lipidiques dans l'espace intercellulaire, formant une sorte de ciment permettant une cohésion avec la couche cornée et une meilleure fonction barrière.

La couche spinieuse ou *stratum spinosum* comportant plusieurs assises cellulaires est située sous la couche granuleuse. Le passage des kératinocytes de la couche spinieuse à la couche granuleuse est notamment régi par l'augmentation du taux de calcium extracellulaire. Les kératinocytes de cette couche sont de forme polyédrique, ils sont reliés entre eux par des desmosomes pouvant donner une apparence d'épines à la surface des cellules, d'où le nom de couche spinieuse. Les desmosomes forment des plaques protéiques au niveau des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes. Des filaments de kératine ou tonofilaments sont fixés sur chaque plaque. Les protéines transmembranaires reliant les deux plaques appartiennent à la famille des cadhérines. Les desmosomes permettent ainsi une cohésion cellulaire conférant à la peau sa résistance mécanique. Une altération de ces desmosomes, notamment d'ordre auto-immun, est source de pathologies de type pemphigus (Jones et al., 1984). Des cellules de Langerhans, cellules dendritiques capturant les antigènes et activant les lymphocytes T, sont présentes dans cette couche. Les cellules de la partie supérieure de la couche spinieuse ont tendance à s'aplatir comparées aux cellules de la partie inférieure. De plus, l'expression de kératines 1 et 10 ainsi que d'involucrine et de cornifine est observée de la partie supérieure de cette couche jusqu'au début de la couche cornée.

La couche basale ou *stratum basale* est la couche la plus profonde de l'épiderme, elle est en général composée d'une seule assise de cellules. Les kératinocytes cylindriques qui la composent assurent le renouvellement de l'épiderme. Ainsi, ces cellules présentent une importante activité mitotique. Les desmosomes permettent la liaison des kératinocytes entre eux. Ces kératinocytes expriment les kératines 5 et 14. Cette couche comporte également d'autres types cellulaires tels que les mélanocytes ou les cellules de Merkel. Les mélanocytes ont pour fonction de synthétiser la mélanine. Il

existe deux types de mélanine : les phéomélanines (pigments jaune-rouge) et les eumélanines (pigments brun-noir). La mélanine permet de donner à la peau et aux cheveux leurs couleurs respectives. Les cellules de Merkel sont des cellules neuro-épithéliales, principalement présentes au niveau des lèvres, des paumes, de la pulpe des doigts et du dos des pieds, ayant une fonction de mécanorécepteur. Les kératinocytes sont également reliés à la lame basale par des hémidesmosomes ce qui constitue la jonction dermo-épidermique.

La jonction dermo-épidermique sépare l'épiderme du derme en permettant d'assurer une bonne adhérence et une bonne cohésion entre ces deux couches. Cette jonction acellulaire comporte plusieurs zones visibles notamment en microscopie électronique. De l'épiderme vers le derme, sont retrouvées les membranes cytoplasmiques des cellules de la lame basale de l'épiderme (kératinocytes, mélanocytes et cellules de Merkel), puis la *lamina lucida* et enfin la *lamina densa*. Les kératinocytes présents dans la lame basale sont ancrés dans le derme par des hémidesmosomes, permettant une forte adhésion épiderme-derme grâce notamment à leurs plaques protéiques et aux multiples interactions entre les composants de ces plaques, les kératines et les fibres de collagène. En cas d'altérations des hémidesmosomes suite à un désordre auto-immun par exemple, des pathologies de type pemphigoïdes sont rencontrées (Mutasim et al., 1985). La *lamina lucida* est une zone riche en filaments d'ancrage riches en laminine permettant le maintien des hémidesmosomes. La *lamina densa* est majoritairement composée de collagène de type IV. Les extrémités des fibrilles d'ancrage formées de collagène de type VII provenant du derme sont situées dans cette zone.

Le derme, situé sous l'épiderme est plus épais que celui-ci (1 à 2 mm d'épaisseur). L'épaisseur du derme est variable selon les endroits du corps humain, ainsi est-il plus épais au niveau du dos. Le derme est un tissu conjonctif comportant, au niveau cellulaire, de nombreux fibroblastes, mais également des cellules d'origine sanguine telles que les macrophages, les cellules dendritiques dermiques et les mastocytes. Le derme a ainsi une double fonction de soutien et d'apport de nutriments à l'épiderme. Le derme peut être divisé en deux parties : le derme papillaire et le derme réticulaire. Le derme papillaire est le plus superficiel. Le derme comporte une importante matrice extracellulaire que nous développerons dans la partie 2.3. Des vaisseaux sanguins et

lymphatiques ainsi que des annexes cutanées comme les follicules pileux, les glandes sébacées et sudoripares sont situés dans le derme, de même que des terminaisons nerveuses (Dréno, 2009; Hwa et al., 2011; Vivier, 1996).

L'hypoderme constitue la couche la plus profonde de la peau. Cette couche richement vascularisée est composée de cellules adipeuses situées dans des lobules séparés les uns des autres par du tissu conjonctif. L'hypoderme possède plusieurs fonctions : des fonctions d'isolation thermique et mécanique en protégeant notamment des chocs et du froid, mais aussi une fonction de réserve énergétique (Dréno, 2009; Hwa et al., 2011).

1.2.1.2. Fonctions de la peau

La fonction la plus connue de la peau est celle de barrière de protection entre l'intérieur du corps et le milieu extérieur, que ce soit au niveau mécanique, physique, chimique, ou biologique. A ce titre, la peau protège par exemple des chocs, du rayonnement ultraviolet (UV), de la pollution ou encore des microbes.

La peau ne se réduit pas à sa fonction barrière, elle possède d'autres fonctions. En effet, la peau remplit également des fonctions au niveau métabolique. En effet, 80 à 90 % de la vitamine D, vitamine liposoluble, proviennent d'une synthèse au niveau cutané à partir du 7-déshydrocholestérol (dérivé du cholestérol), sous l'effet du rayonnement ultraviolet.

La peau joue aussi un rôle important dans la régulation thermique grâce à la sécrétion de sueur, laquelle augmente avec la température, ce qui permet un rafraîchissement suite à son évaporation à la surface de la peau. En cas de diminution de la température, la sécrétion de sueur diminue, ce qui favorise le maintien de la température corporelle.

La peau possède également une fonction sensorielle grâce aux nombreuses terminaisons nerveuses qu'elle contient. Les très nombreuses terminaisons nerveuses situées au niveau de l'extrémité des doigts sont notamment impliquées dans le sens du toucher. Elles permettent plus précisément de ressentir pression, chaleur et douleur *via* respectivement les mécanorécepteurs, thermorécepteurs et nocicepteurs.

De plus, la peau remplit également des fonctions immunitaires. En effet, les cellules de Langerhans, après avoir rencontré un antigène, sont capables de migrer de l'épiderme vers le derme afin d'aller activer les lymphocytes T des ganglions lymphatiques en leur présentant l'antigène conduisant ainsi au déclenchement d'une réaction immunitaire. Les cellules dendritiques du derme sont également des cellules capables de présenter des antigènes aux lymphocytes. D'autres cellules participent également à cette fonction immunitaire. Les kératinocytes, par exemple, sont non seulement capables d'induire une réaction inflammatoire *via* la libération de cytokines et de chimiokines mais également de produire des peptides antimicrobiens tels que les β -défensines.

Grâce aux nombreux vaisseaux sanguins situés dans le derme et l'hypoderme, la peau possède une fonction de vascularisation. A titre d'exemple, en cas d'effort ces vaisseaux peuvent se contracter permettant un apport sanguin aux muscles.

La peau possède également une fonction dans les relations sociales et la communication. En effet, la peau constitue la première impression que renvoie une personne. De plus, la peau peut être un vecteur de messages sociaux. A titre d'exemple, une rougeur fulgurante de la peau peut refléter la gêne d'une personne. L'odeur de la peau a également son importance dans les relations humaines. Les bébés savent par exemple reconnaître l'odeur de la peau de leur mère.

La peau posséderait également une fonction sur l'état psychologique des personnes. En effet, sous l'action du rayonnement UV, des endorphines sont libérées par la peau et agissent au niveau de notre organisme en nous procurant une sensation de bien-être (Dréno, 2009). Ces endorphines seraient cependant aussi responsables de l'addiction de certaines personnes au rayonnement UV (Fell et al., 2014).

1.2.2. Caractéristiques cliniques et tissulaires du vieillissement

La peau, comme tout l'organisme humain, subit les effets du temps. Ces effets sont à l'origine de son vieillissement physiologique. Cependant, de par son exposition au milieu extérieur, d'autres paramètres peuvent influencer le vieillissement de la peau induisant un vieillissement accéléré.

1.2.2.1. *Caractéristiques cliniques et tissulaires du vieillissement physiologique*

Des modifications structurelles du tissu cutané interviennent au cours du temps. Ces changements constituent un processus physiologique appelé vieillissement intrinsèque ou chronologique. Ce processus est régi par des facteurs génétiques et endocriniens. Par exemple, les modifications hormonales faisant suite à la ménopause ont un effet sur la peau. En effet, la ménopause induit une diminution du taux d'œstrogènes accompagnée d'une accélération dans l'apparition des signes de vieillissement cutané (Thornton, 2013).

Au niveau clinique, le vieillissement intrinsèque se traduit par une peau fine, sèche avec des démangeaisons. La peau est moins pigmentée et de fines rides sont également observées. L'élasticité de la peau est altérée, sa tonicité est diminuée, la peau pouvant apparaître flétrie, des plis peuvent même se former (figure 11). La sensibilité cutanée est diminuée. De plus, le processus de cicatrisation est ralenti. Suite à ces différentes modifications, la peau remplit moins efficacement ses différentes fonctions. Les annexes cutanées subissent également les effets du vieillissement physiologique. Ainsi, les cheveux blanchissent, les ongles jaunissent et ternissent, leur croissance est ralentie, et les follicules pileux sont moins nombreux. Une diminution de la transpiration est aussi rapportée (Beylot, 2009; Poljšak et al., 2012; Rittié and Fisher, 2015).



Figure 11 : Peau présentant les caractéristiques du vieillissement chronologique : peau flétrie formant des plis (Beylot, 2009)

Au niveau histologique, de nombreuses modifications sont observées. L'épaisseur de l'épiderme diminue, mise à part celle de la couche cornée. La production basale de

kératinocytes est également diminuée, le taux de renouvellement cellulaire se trouvant ainsi allongé. Ce ralentissement du renouvellement cellulaire contribue au ralentissement du processus de cicatrisation. Les kératinocytes sont de forme et de taille irrégulières, induisant un alignement moins régulier des cellules. Les mélanocytes sont moins nombreux, ce qui entraîne une diminution de la capacité de la peau à bronzer et à absorber le rayonnement ultraviolet, et ainsi faciliter la survenue de cancers cutanés. La jonction entre l'épiderme et le derme est plus plate, le derme est également plus mince et le nombre de fibroblastes plus faible. La matrice extracellulaire est aussi altérée avec une diminution des fibres de collagène qui sont en outre plus épaisses et moins organisées, ainsi qu'une diminution des fibres d'élastine et des glycosaminoglycanes en particulier de l'acide hyaluronique (favorisant l'apparition de fines rides). L'accumulation des effets observés sur les protéines fibreuses est due à leur longue durée de vie. En effet, les fibres de collagène de la peau ont une demi-vie de 15 ans (Verzijl et al., 2000), les fibres élastiques ont le même âge que la personne dont elles sont issues (Naylor et al., 2011). Par conséquent, le faible renouvellement de ces fibres les rend d'autant plus vulnérables au vieillissement.

Les réseaux vasculaires du derme et de l'hypoderme sont raréfiés. Les vaisseaux ont tendance à se dilater et leur épaisseur est réduite. Les glandes sébacées et sudoripares sont plus rares, d'où une réduction de la capacité de transpiration, ce qui contribue à une perturbation de la fonction thermorégulatrice de la peau. De plus, les cellules immunitaires, telles que les cellules de Langerhans ou les mastocytes, sont elles aussi moins nombreuses ce qui a pour conséquence de diminuer la fonction immunitaire de la peau. Les terminaisons nerveuses étant moins nombreuses, la fonction sensorielle de la peau est altérée (Beylot, 2009; Passeron and Ortonne, 2003).

Ce processus de vieillissement chronologique, dépendant de facteurs intrinsèques, survient de façon concomitante avec le processus de vieillissement accéléré, dépendant quant à lui de facteurs extrinsèques.

1.2.2.2. *Caractéristiques cliniques et tissulaires du vieillissement accéléré*

Plusieurs facteurs extérieurs peuvent induire des effets délétères au niveau cutané. Les effets de ces facteurs extérieurs s'ajoutent aux effets du vieillissement physiologique, ce qui entraîne une accélération du vieillissement. Le principal facteur extérieur connu pour son implication dans le vieillissement accéléré est l'exposition au soleil, plus précisément à ses rayons UV. Le processus induit par l'exposition au soleil est appelé photovieillissement. Le tabagisme et la pollution sont également connus pour leur rôle dans la survenue du vieillissement cutané prématuré.

1.2.2.2.1. *Photovieillissement*

Le photovieillissement, également appelé dermatohéliose, désigne les effets des rayons UV provenant du soleil (ou de sources artificielles) sur le vieillissement de la peau.

La principale source de rayonnement UV provient de l'exposition au soleil. En effet, les rayonnements électromagnétiques solaires, couramment appelés lumière, sont composés, par ordre croissant de longueurs d'ondes, du rayonnement ultraviolet (UV), du rayonnement visible et du rayonnement infrarouge (IR). L'énergie dégagée par ces rayonnements est inversement proportionnelle à leurs longueurs d'ondes, par conséquent les rayons UV possèdent la plus forte énergie et sont ainsi potentiellement les plus nocifs. L'œil humain perçoit uniquement la partie du rayonnement solaire comprise entre 400 et 780 nm, appelée de ce fait domaine visible (figure 12).

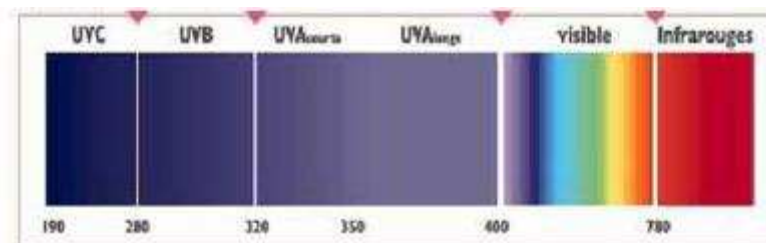


Figure 12 : Spectre électromagnétique des rayonnements solaires (CNRS)

http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/voir_autobronzants.html

Le rayonnement UV peut être divisé en rayonnements UVC, UVB et UVA. Les UVC ont des longueurs d'onde comprises entre 190 et 280 nm. Ces rayonnements sont potentiellement très dangereux pour les organismes vivants du fait de leur très haute énergie. Cependant ils sont arrêtés par la couche d'ozone, nous n'y sommes donc pas exposés.

Les UVB, dont les longueurs d'onde sont comprises entre 280 et 320 nm, ne sont que partiellement arrêtés par la couche d'ozone. Ces rayonnements pénètrent dans la peau jusqu'à la couche basale de l'épiderme, induisant coups de soleil et photovieillissement. Ces rayonnements peuvent également agir sur l'ADN des cellules, ce qui cause des lésions mutagènes. L'accumulation de ces mutations dans les cellules de la peau joue un rôle important dans le développement de cancers cutanés.

Les UVA ont une énergie plus faible que les UVB, leurs longueurs d'onde sont comprises entre 315 et 400 nm. Ces rayonnements pénètrent plus profondément dans la peau et atteignent le derme. Les UVA ont par le passé été considérés comme moins dangereux, cependant ils sont également responsables du photovieillissement et de la formation de rides. Les UVA peuvent également avoir un effet sur l'ADN, formant alors des bases oxydées, ce qui augmente le risque de développement de cancers cutanés (Dupont et al., 2013).

Le processus de photovieillissement touche préférentiellement le visage, le cou et le dos des mains qui sont les zones les plus exposées à ces rayonnements. Certains types de peaux sont plus sensibles aux rayonnements UV. En effet, Fitzpatrick a établi une classification des différents types de peau en fonction de leur sensibilité à ce type de rayonnements (tableau I) (Fitzpatrick, TB, 1975; Fitzpatrick, T.B., 1988).

Type de peau	Caractéristiques principales	Comportement lors d'exposition solaire	Sensibilité aux UV
I	Peau très claire, taches de rousseur, cheveux blond-roux, yeux clairs	Brûle toujours, ne bronze jamais	Extrême
II	Peau claire, souvent taches de rousseur, cheveux clairs ou châains, yeux clairs	Brûle toujours, bronze peu	Forte
III	Peau légèrement mate, cheveux bruns, yeux bruns ou clairs	Brûle modérément, bronze progressivement	Modérée
IV	Peau très mate, cheveux bruns foncés ou noirs, yeux bruns	Brûle faiblement, bronze très facilement	Faible
V	Peau foncée, cheveux noirs, yeux foncés	Brûle rarement, bronze intensément	Très faible
VI	Peau noire, cheveux noirs, yeux noirs	Ne brûle jamais, fortement pigmentée	Pratiquement nulle

Tableau I : Classification des types de peau d'après Fitzpatrick (*Fitzpatrick, TB, 1975; Fitzpatrick, T.B., 1988*)

Les personnes à la peau claire ou relativement claire, c'est-à-dire de type I à III selon la classification de Fitzpatrick, sont plus sensibles au photovieillissement (Han et al., 2014).

Le photovieillissement est lié à la dose cumulative de rayonnement UV reçue, par conséquent ce processus augmente avec l'âge. Il dépend également des habitudes d'exposition individuelle (travail extérieur, loisirs extérieurs, sources UV artificielles). La latitude et l'altitude peuvent également influencer le photovieillissement car le rayonnement UV solaire est plus intense et donc plus nocif au niveau de l'équateur et en altitude.

Au niveau clinique, le photovieillissement est caractérisé par une peau d'apparence rugueuse, tannée, épaissie et jaunâtre (appelée citréine) avec de nombreux sillons ainsi que des rides pouvant être profondes (figure 13). L'élastose solaire, altération de l'élasticité de la peau, est également observée, la peau apparaissant relâchée et flasque. Les vaisseaux sanguins peuvent être dilatés (télangiectasie). La peau

est pigmentée par des lentigos solaires, taches brunes rondes ou ovales. Des lésions précancéreuses de type kératose actinique (zone rouge et squameuse) peuvent aussi apparaître (Beylot, 2009; Han et al., 2014; Rabe et al., 2006; Rittié and Fisher, 2015).



Figure 13 : Peau présentant les caractéristiques du photovieillissement : rides profondes, élastose solaire, lentigos solaires (*Kohl et al., 2011*)

Au niveau histologique, le photovieillissement se traduit par une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme, malgré un amincissement de la couche spinieuse, et un aplatissement de la jonction dermo-épidermique. Des kératinocytes et des mélanocytes anormaux sont observés avec une perte de polarité et une maturation altérée des kératinocytes notamment. En effet, le processus de différenciation des kératinocytes est modifié, l'involucrine, marqueur de cette différenciation, étant augmentée après irradiation de kératinocytes avec un rayonnement UV (Bosset et al., 2003). Une inflammation chronique appelée héliodermatite peut être observée. Dans le derme, les fibroblastes sont également altérés ainsi que la matrice extracellulaire. En effet, les fibres de collagène sont moins nombreuses et désorganisées, à l'inverse les fibres d'élastine anormales sont plus nombreuses et remplacent le collagène, pouvant conduire à la survenue d'une élastose (Han et al., 2014; Rabe et al., 2006). Un effet sur les vaisseaux est observé avec un aplatissement des cellules endothéliales et une dilatation vasculaire (Rittié and Fisher, 2015). Certaines études ont par ailleurs montré que le rayonnement UV pourrait favoriser l'angiogenèse (Rabe et al., 2006).

1.2.2.2.2. Tabagisme

Le tabagisme induit également un vieillissement accéléré de la peau. Lors de l'exposition solaire, une synergie est observée entre les effets délétères du photovieillissement et du tabac même dans le cas du tabagisme passif (Chung et al., 2001).

Au niveau clinique, les effets du tabac sont multiples, la peau semble terne, grisâtre et décharnée avec des contours osseux marqués (figure 14). De plus, la peau est fine, sèche, semble « affaissée » et de nombreuses rides sont observées. Ces effets sont corrélés au nombre de paquets fumés (Chung et al., 2001; Doshi et al., 2007).



Figure 14 : Caractéristiques des effets du tabac sur la peau (jumelle A « Twin A » non fumeuse *versus* jumelle B « Twin B » fumeuse) Photographie du Docteur Bahman Guyuron, Department of Plastic Surgery, University Hospitals Case Medical Center, Cleveland, Ohio, Etats-Unis

Au niveau histologique, le tabagisme induit une diminution de l'hydratation de la couche cornée, favorisant la sécheresse cutanée. De plus, une dégradation importante de la matrice extracellulaire est observée suite notamment à une augmentation de l'expression des métalloprotéinases (MMP). L'augmentation de l'expression des métalloprotéinases, en particulier de MMP-1, fait suite à l'activation de la voie AhR (Ono et al., 2013). La synthèse du collagène est également diminuée. Une accumulation de fibres élastiques dystrophiques est observée. Le tabagisme peut diminuer localement le taux d'œstrogènes, ce qui peut augmenter les signes de vieillissement cutané.

En plus du vieillissement, le tabagisme favorise également l'apparition de cancers cutanés et leurs métastases. En effet, certaines substances du tabac possèdent des propriétés carcinogènes telles que les nitrosamines tandis que d'autres favorisent la prolifération et la dispersion des cellules cancéreuses, telle la nicotine (Ortiz and Grando, 2012).

1.2.2.2.3. Pollution

La pollution de l'air entraîne également un vieillissement accéléré de la peau. En effet, outre les effets sur les maladies pulmonaires, cardiaques ou les cancers, il est désormais établi que l'exposition à un environnement pollué induit des effets au niveau du vieillissement cutané (Li et al., 2015a; Vierkötter et al., 2010). La pollution peut provenir de l'air extérieur suite à la production de particules et de nanoparticules, notamment de suie (Vierkötter et al., 2010). Ces substances sont produites par la circulation automobile, les rejets industriels ou domestiques issus de combustions incomplètes. La pollution intérieure consécutive notamment à la cuisson utilisant des combustibles solides (charbon de bois...) est également source de vieillissement cutané (Li et al., 2015a).

Au niveau clinique, les effets de la pollution se traduisent par des taches de vieillesse également appelées taches brunes notamment sur les zones non protégées par les vêtements telles que le visage (Vierkötter et al., 2010). Plus l'exposition aux sources de pollution est importante, par exemple lorsque le domicile est proche d'une route fréquentée, plus le nombre de taches de vieillesse semble important. L'exposition à la pollution notamment intérieure, induit une augmentation des rides et une augmentation du relâchement de la peau (Li et al., 2015a). Les effets de la pollution sur le vieillissement cutané pourraient être dus au stress oxydant induit par les particules (Vierkötter et al., 2010). Au niveau histologique, les effets de la pollution sont similaires aux effets induits par le tabagisme.

2. Processus toxiques associés aux phénomènes de dégénérescence et au vieillissement

Différents processus toxiques sont associés aux phénomènes de dégénérescence et au vieillissement, nous nous focaliserons ici sur le stress oxydant et l'inflammation, le rôle des récepteurs de dégénérescence P2X7 et de la matrice extracellulaire.

2.1. Stress oxydant et inflammation

2.1.1. Généralités

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les espèces oxydantes et les mécanismes de défense antioxydants en faveur des espèces oxydantes, entraînant une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et/ou des altérations moléculaires (Sies and Cadenas, 1985; Sies and Jones, 2007). L'inflammation est, quant à elle, une réaction de défense des cellules face à une agression menaçant l'homéostasie cellulaire. Le but de cette réaction est d'éliminer la cause initiale de cette atteinte cellulaire, ainsi que d'éventuelles cellules nécrotiques et d'initier des mécanismes de réparation si nécessaire. Dans ce cas, l'inflammation est un processus bénéfique pour l'organisme. Cependant, l'inflammation peut devenir chronique et se transformer en un processus délétère pour l'organisme.

La principale source d'espèces oxydantes est l'oxygène. En effet, cette molécule diatomique (O_2) possède un rôle paradoxal puisqu'elle est à la fois indispensable à la vie des cellules mais aussi source d'espèces réactives (ERO) qui peuvent s'avérer toxiques pour les cellules. Le dioxygène comporte deux électrons célibataires dans deux orbitales différentes. Dans certaines conditions telles que la présence de métaux ou la fuite d'électrons suite à la respiration cellulaire (en particulier au niveau des complexes I ou III de la chaîne respiratoire mitochondriale), la molécule de dioxygène peut se transformer en radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (figure 15). Cet anion superoxyde est une molécule contenant au moins un électron non apparié ; en général ces molécules sont très instables et réactives. L'anion superoxyde peut ensuite former d'autres molécules. Par exemple, il peut contribuer à la formation d'espèces réactives de l'azote telles que l'anion peroxynitrique ($ONOO^-$) en réagissant avec le monoxyde d'azote (NO). Le

monoxyde d'azote est, quant à lui, produit à partir de l'arginine par la monoxyde d'azote-synthase (NOS). L'anion peroxy-nitrique est hautement réactif, il peut notamment induire une oxydation lipidique ou protéique, ou encore au niveau de l'ADN (Pacher et al., 2007). L'anion superoxyde peut également former de l'eau oxygénée (H_2O_2) suite à l'action des superoxyde-dismutases (SOD). L'eau oxygénée est moins réactive, elle peut être neutralisée par certaines enzymes telles que la catalase et la glutathion-péroxydase. Lorsqu'elle n'est pas neutralisée par ces enzymes, l'eau oxygénée peut, suite à la réaction de Fenton catalysée par le fer, former le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Ce radical peut également être formé suite à une exposition à des radiations ionisantes. Le radical hydroxyle est l'ERO le plus réactif, il peut induire une peroxydation lipidique altérant ainsi les membranes cellulaires, mais aussi entraîner une oxydation des protéines, des acides nucléiques ou encore des glucides (Achev and Duryea, 1974; Cervellati et al., 2016; Davies et al., 1991; Gutteridge, 1984). Le glutathion et les vitamines telles que les vitamines C ou E peuvent neutraliser les effets du radical hydroxyle.

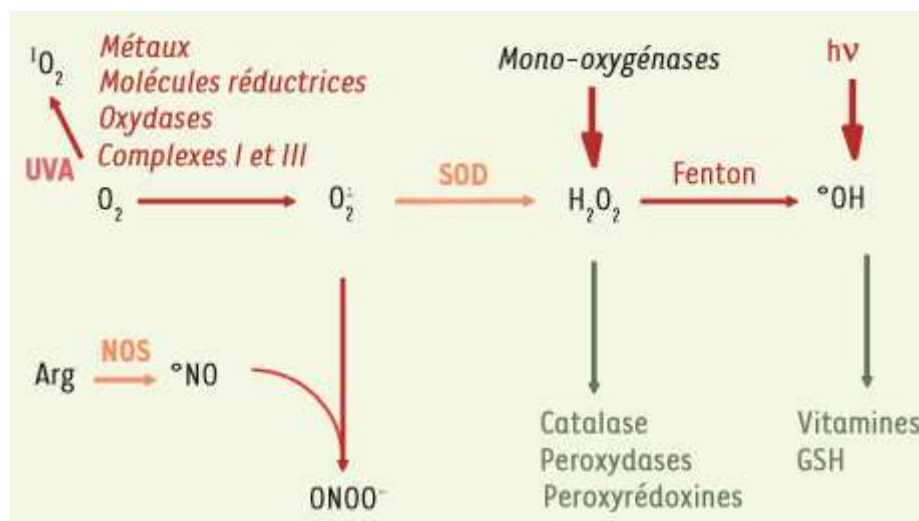


Figure 15 : Formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Barouki, 2006)

La principale source endogène de production d'ERO sont les mitochondries qui produisent l'énergie nécessaire aux cellules mais sont sources de fuite d'électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces électrons contribuent alors à la formation d'ERO. Cette production d'ERO est physiologique, cependant des dysfonctionnements dans la chaîne respiratoire mitochondriale ou une diminution du système de défense antioxydant peut faire basculer l'équilibre pro-oxydant/antioxydant vers le stress oxydant.

Les ERO sont impliquées dans de nombreuses pathologies dont l'athérosclérose, et les pathologies dégénératives telles que les maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou la DMLA (Beatty et al., 2000; Jenner, 1996; Popovici et al., 1992). De plus, les ERO ont été associées au processus de vieillissement notamment de la peau (Harman, 1956).

Le stress oxydant est étroitement lié aux processus inflammatoires. En effet, le stress oxydant est source d'inflammation et l'inflammation est source de stress oxydant (figure 16). La production d'ERO et le déséquilibre de la balance entre production d'ERO et défenses antioxydantes conduit à l'activation de facteurs de transcription tels que AP-1 (Activator Protein 1) et NF- κ B (Nuclear Factor κ B) (Li et al., 1994; Schreck et al., 1991). Ces facteurs de transcription entraînent alors la transcription de différents gènes notamment des gènes pro-inflammatoires. Une augmentation de molécules pro-inflammatoires, telles que les cytokines IL-1 β , IL-6 ou TNF α , est ensuite observée. Ces cytokines ont notamment pour rôle de prévenir les cellules voisines d'un danger.

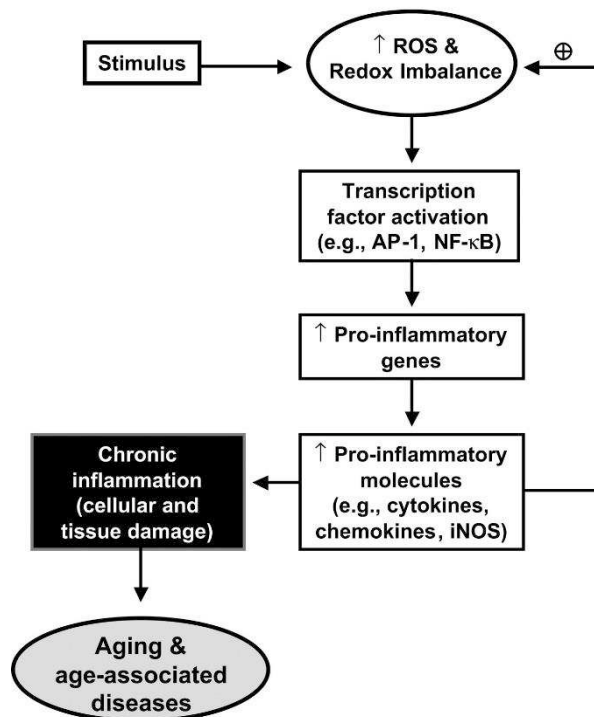


Figure 16 : Stress oxydant et inflammation dans le vieillissement et les pathologies liées à l'âge (Kregel and Zhang, 2007)

Dans certains cas, l'inflammation peut devenir néfaste lorsqu'elle se prolonge et devient chronique. En effet, le rôle de l'inflammation chronique a été établi dans les processus de vieillissement et dans la pathogenèse de nombreux désordres dégénératifs liés à l'âge tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la DMLA, l'athérosclérose (Chung et al., 2011; McGeer and McGeer, 2004)... L'inflammation peut notamment devenir chronique suite au cercle vicieux créé par le stress oxydant et l'inflammation elle-même (figure 16). Les molécules pro-inflammatoires peuvent générer la production d'ERO qui vont à leur tour favoriser la production de molécules pro-inflammatoires et ainsi de suite conduisant à une inflammation chronique.

2.1.2. Focus sur la DMLA

De nombreuses pathologies dégénératives dont la DMLA sont dépendantes de l'âge. Or, le taux d'espèces réactives de l'oxygène augmente tandis que les capacités du système antioxydant déclinent avec l'âge (Squier, 2001). Ainsi, le stress oxydant a été associé à différentes pathologies dégénératives liées à l'âge telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore la DMLA (Beatty et al., 2000; Götz et al., 1994). Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur la DMLA.

La rétine est un tissu particulièrement exposé aux espèces réactives de l'oxygène pour diverses raisons. Premièrement, la rétine est un tissu fortement consommateur d'oxygène (Yu and Cringle, 2001), d'où une possible génération importante d'espèces réactives de l'oxygène. Deuxièmement, les rayonnements lumineux absorbés par les photorécepteurs peuvent être sources de stress oxydant (Beatty et al., 2000). Parmi ces rayonnements, la lumière bleue (400-500 nm), très énergétique, qui peut notamment être émise par les LEDs, est plus génératrice de stress oxydant (Beatty et al., 2000; Jaadane et al., 2015; Kernt et al., 2012)(Beatty et al., 2000; Jaadane et al., 2015)(Beatty et al., 2000; Jaadane et al., 2015)^{134,144}[134,144](Beatty et al., 2000; Jaadane et al., 2015). De plus, les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien comportent des molécules photosensibles telles que les pigments de type lipofuchsine ou rhodopsine pouvant générer des radicaux suite à une exposition lumineuse (Beatty et al., 2000). Enfin, l'épithélium pigmentaire rétinien possède une fonction de phagocytose des extrémités des photorécepteurs, permettant ainsi leur épuration et la régénération des pigments visuels ; cette fonction de phagocytose constitue un apport d'espèces réactives

de l'oxygène, notamment de H₂O₂ (Beatty et al., 2000; Tate et al., 1995). La principale conséquence néfaste de ce stress oxydant généré dans la rétine est l'oxydation des lipides membranaires. En effet, les membranes cellulaires des photorécepteurs sont composées d'une grande proportion d'acides gras polyinsaturés. Les insaturations sont très sensibles à l'oxydation, or l'oxydation de ces lipides par les espèces réactives de l'oxygène entraîne notamment une perte d'intégrité membranaire pouvant conduire à la mort cellulaire.

Plusieurs études tendent à montrer les effets bénéfiques d'un apport en agents antioxydants sur la progression de la DMLA. En effet, l'étude AREDS a établi les effets bénéfiques d'une formulation combinant plusieurs molécules ayant des propriétés antioxydantes : vitamine C, vitamine E, zinc, cuivre et β -carotène (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001). D'autres caroténoïdes exerceraient des effets protecteurs suivant le stade d'avancement de la DMLA. Ainsi la lutéine et la zéaxanthine réduiraient le risque de DMLA avancée (Wu et al., 2015) tandis que la méso-zéaxanthine aurait des effets protecteurs sur les DMLA débutantes (Akuffo et al., 2015). D'autres molécules aux propriétés antioxydantes telles que la curcumine (pigment du curcuma) ont montré des effets protecteurs sur des cellules issues de patients souffrant de DMLA (Chang et al., 2014).

L'inflammation, notamment lorsqu'elle est chronique, joue elle-aussi un rôle prépondérant au cours de la pathogenèse de la DMLA. Cette inflammation peut faire suite au processus de stress oxydant. Les drusen, de par leur composition notamment en peptide β amyloïde et en protéines faisant partie de la cascade du complément (protéines réagissant en cascade pour activer la réponse inflammatoire), constituent des inducteurs potentiels d'inflammation (Anderson et al., 2004). En effet, des études ont montré le rôle du peptide β amyloïde dans l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires de type IL-6, IL-1 β ou TNF α au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien (Kurji et al., 2010; Liu et al., 2013). Le déclenchement des processus inflammatoires par le peptide β amyloïde semble être dû à plusieurs facteurs tels que l'activation de l'inflammasome NLRP3 (complexe intracellulaire multiprotéique activant la cascade inflammatoire) (Liu et al., 2013), du facteur de transcription NF- κ B (Liu et al., 2014) ou encore du système du complément (Zhao et al., 2015). Ces effets induits par les drusen s'inscrivent dans un cercle vicieux puisque l'inflammation et l'activation du

système du complément entraînent à leur tour la formation de drusen (Anderson et al., 2002). D'autres facteurs, comme la lumière bleue, peuvent également activer l'inflammasome NLRP3 et ainsi conduire à une inflammation (Brandstetter et al., 2015).

2.1.3. Focus sur la peau

Depuis de nombreuses années, le stress oxydant est associé au vieillissement de la peau (Harman, 1956). Ainsi, le stress oxydant est reconnu comme un acteur du vieillissement intrinsèque. Les ERO induisent en effet une oxydation des protéines, des sucres, une peroxydation lipidique et des altérations au niveau de l'ADN. De plus, il a été montré que le stress oxydant favorise le raccourcissement des télomères des fibroblastes, processus impliqué dans le vieillissement (Richter and Zglinicki, 2007). L'ensemble de ces altérations conduit aux différents effets cliniques du vieillissement de la peau.

Lors du processus de vieillissement extrinsèque, la production d'ERO est accentuée par les nombreux facteurs extérieurs pouvant entraîner la production d'ERO tels qu'une exposition au rayonnement UV, mais aussi à la pollution ou encore à la fumée de cigarette (Punnonen et al., 1991a; Valacchi et al., 2004; Yin et al., 2000). Ainsi, la moitié des dommages causés par le rayonnement UV pourrait être une conséquence de la formation de radicaux (Rabe et al., 2006). De plus, le rayonnement UV induit à court terme une diminution de l'activité des défenses antioxydantes telles que la superoxyde-dismutase ou la catalase (Punnonen et al., 1991c, 1991a, 1991b). Il est important de préciser que plus l'âge est avancé, plus la production d'ERO augmente et plus les défenses antioxydantes diminuent, favorisant ainsi les dommages du stress oxydant (Squier, 2001). Avec l'âge, les systèmes de réparation, notamment lors d'altérations au niveau des bases nucléiques de l'ADN, sont également altérés, ce qui favorise ainsi l'impact des ERO sur l'organisme (Pons et al., 2010). L'activité du protéasome, complexe multiprotéique dégradant les protéines, notamment les protéines oxydées, décroît avec l'âge, ce qui réduit l'élimination des protéines oxydées et aggrave ainsi les effets du stress oxydant (Petropoulos et al., 2000).

Ainsi comme dans la DMLA, la production d'ERO entraîne une inflammation *via* des facteurs de transcription de type AP-1 ou NF- κ B (*cf* figure 16) lors du vieillissement

cutané. Cette inflammation peut être aggravée par les facteurs extérieurs responsables du vieillissement accéléré tels que le rayonnement UV, lequel est non seulement générateur d'ERO mais stimule également directement la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, notamment au niveau des kératinocytes et des mastocytes. Ainsi, sous l'effet du rayonnement UV, les mastocytes sécrètent des prostaglandines, des leucotriènes et de l'histamine, et les kératinocytes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α (Lembo et al., 2014; Luo et al., 2004; Park et al., 2014). Par ailleurs, le rayonnement UV induit une infiltration des neutrophiles à travers le derme et l'épiderme. Suite à cette infiltration, les macrophages peuvent également sécréter des cytokines pro-inflammatoires venant entretenir et aggraver le phénomène inflammatoire.

L'ensemble de ces paramètres constitue une boucle d'amplification des processus de stress oxydant et d'inflammation, celle-ci se trouve ainsi auto-entretenu pour devenir chronique.

Durant les processus d'inflammation chronique, le granzyme B, une sérine protéase, s'accumule dans le milieu extracellulaire (Boivin et al., 2009). Cette enzyme initialement considérée comme étant spécifique des cellules immunitaires activées, est désormais reconnue comme étant exprimée dans des cellules non immunitaires telles que les kératinocytes. En effet, des études ont montré une augmentation de la libération de granzyme B après irradiation de kératinocytes par des rayonnements UVA et UVB (Hernandez-Pigeon et al., 2006, 2007). Cette libération est corrélée à la cytotoxicité cellulaire.

2.2. Récepteurs P2X7

Les récepteurs P2X7 ont été associés au développement de différentes maladies dégénératives et semblent jouer un rôle central dans les processus de dégénérescence.

2.2.1. Rappels

La famille des récepteurs P2, dont le ligand est l'ATP, comprend la famille des récepteurs métabotropiques P2Y qui sont couplés à la protéine G et la famille des récepteurs ionotropiques P2X qui sont des canaux cationiques (Abbracchio and Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1994). La famille des récepteurs trimériques P2X compte sept membres différents (P2X1 à P2X7). Les récepteurs P2X présentent une homologie de séquence de leurs acides aminés entre 35 et 54 % (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). Ces récepteurs comportent des parties N- et C-terminales intracellulaires, une longue boucle extracellulaire permettant la fixation des ligands et deux domaines transmembranaires (figure 17). La boucle extracellulaire, très conservée entre les différents récepteurs de la famille, comprend dix résidus cystéine pouvant former cinq ponts disulfures qui stabilisent la structure de ces récepteurs et permettent la mise en place de sa structure tertiaire (Clyne et al., 2002; Ennion and Evans, 2002; Hansen et al., 1997). Plusieurs sites de N-glycosylation sont également retrouvés sur cette boucle extracellulaire (Ennion and Evans, 2002; Lenertz et al., 2010; Rettinger et al., 2000; Torres et al., 1998; Vacca et al., 2011). Ces sites sont importants pour la localisation des récepteurs P2X dans la membrane plasmique ainsi que pour leur fonctionnement. Les parties N-terminales des différents récepteurs de la famille P2X sont de longueurs comparables. En revanche, les parties C-terminales sont de longueurs plus variables, de 26 acides aminés pour P2X6 à 239 acides aminés pour P2X7. Ainsi, le récepteur P2X7 humain composé de 595 acides aminés possède la plus longue partie C-terminale.

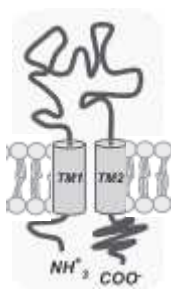


Figure 17 : Structure du récepteur P2X7 (*Skaper et al., 2010*)

Ce récepteur est présent dans de nombreux tissus. En effet, il a été initialement identifié dans les cellules hématopoïétiques mais il est aussi présent dans les cellules épithéliales, les cellules du système nerveux central et périphérique, les ostéoblastes, les fibroblastes... (Bartlett et al., 2014). Ce récepteur, anciennement nommé P2Z, a été cloné pour la première fois à partir de cerveau de rat (Surprenant et al., 1996).

2.2.2. Pharmacologie du récepteur P2X7

L'agoniste naturel des récepteurs P2X est l'ATP. Le récepteur P2X7 est le récepteur de cette famille nécessitant le taux d'ATP le plus élevé pour être activé, de l'ordre de 100 μ M (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). Des agonistes synthétiques existent tels que le BzATP (2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)ATP), plus puissant que l'ATP. Certains agonistes synthétiques sont moins puissants que l'ATP, parmi eux le 2-méthylthioATP ou l'adénosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) (Bartlett et al., 2014).

Plusieurs antagonistes du récepteur P2X7 ont été décrits. Il est difficile de trouver l'antagoniste idéal, les concentrations d'inhibition dépendant des espèces et les antagonistes étant pour la plupart non spécifiques de P2X7. Les cations divalents tels que le calcium, le zinc ou encore le magnésium inhibent le récepteur P2X7 chez le rat (Virginio et al., 1997) ; plus récemment, cet effet inhibiteur a été démontré sur des cellules humaines oculaires (Dutot et al., 2008). Cette inhibition pourrait être expliquée par un facteur allostérique, le site de fixation des activateurs étant bloqué par la fixation de ces cations (Surprenant et al., 1996; Virginio et al., 1997). D'autres inhibiteurs ont été étudiés tels que le colorant Brilliant Blue G (BBG), dérivé d'un colorant alimentaire le Brilliant Blue FCF. Cet inhibiteur est actif à des concentrations plus faibles chez le rat

que chez l'homme (Bartlett et al., 2014). Du fait de son innocuité et de sa sélectivité, il est couramment employé dans les études scientifiques (Dutot et al., 2008; Jiang et al., 2000; Niyadurupola et al., 2013; Wakx et al., 2015). L'ATP oxydé bloque irréversiblement le récepteur P2X7 mais cette molécule inhibe notamment d'autres récepteurs P2X (Di Virgilio, 2003). Le KN-62, inhibiteur de la protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline dépendante, est un inhibiteur non compétitif du récepteur P2X7, cet antagoniste est moins actif chez le rat que chez l'homme (Michel et al., 2009). Le PPADS (acide pyridoxalphosphate-6-azophény-2',4'-disulfonique) inhibe le récepteur P2X7 avec une faible affinité et de façon non compétitive (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007). L'industrie pharmaceutique développe notamment des dérivés de tétrazole comme la molécule A438079 qui est un inhibiteur réversible et compétitif du récepteur P2X7 (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007).

Le récepteur P2X7 est un récepteur au fonctionnement complexe et non totalement connu, possédant deux fonctions distinctes. En effet, ce récepteur possède une fonction canal ionique, entraînant un efflux des ions K^+ et un influx d'ions Ca^{2+} et Na^+ , retrouvée lors d'une stimulation brève du récepteur P2X7 (figure 18). En revanche, lors d'une stimulation prolongée avec des concentrations d'ATP plus importantes (de l'ordre du mM), ce récepteur forme alors un pore non sélectif permettant l'entrée dans la cellule de molécules de poids moléculaire pouvant aller jusqu'à 900 Daltons (Tewari and Seth, 2015). Ce pore possède alors des fonctions cytolytiques. La formation de ce pore est mal connue. Plusieurs hypothèses ont été envisagées. La première hypothèse est une transformation progressive du canal en pore au fur et à mesure de son activation. En fonction de sa dilatation, le récepteur P2X7 laisserait ainsi pénétrer dans la cellule des ions puis des molécules de taille de plus en plus importantes. La seconde hypothèse implique l'intervention de composants additionnels dans la formation du pore P2X7 (Alves et al., 2014). La protéine membranaire pannexine-1 semble faire partie de ces composants (Locovei et al., 2007; Pelegrin and Surprenant, 2006). La pannexine-1 est une protéine transmembranaire comportant des extrémités C- et N-terminales intracellulaires, quatre domaines transmembranaires ainsi que deux boucles extracellulaires. La pannexine-1 est exprimée dans de nombreux tissus tels que le cerveau, la rétine, la peau, les muscles... Cette protéine forme un canal libérant de l'ATP dans le milieu extracellulaire. Ce canal peut être inhibé notamment par le probénécide (Penuela et al., 2013). Le rôle de la pannexine-1 dans la formation du pore P2X7 reste

discuté, une étude sur des macrophages murins ayant conclu à l'absence d'implication de la pannexine-1 dans la formation des pores P2X7 (Alberto et al., 2013).

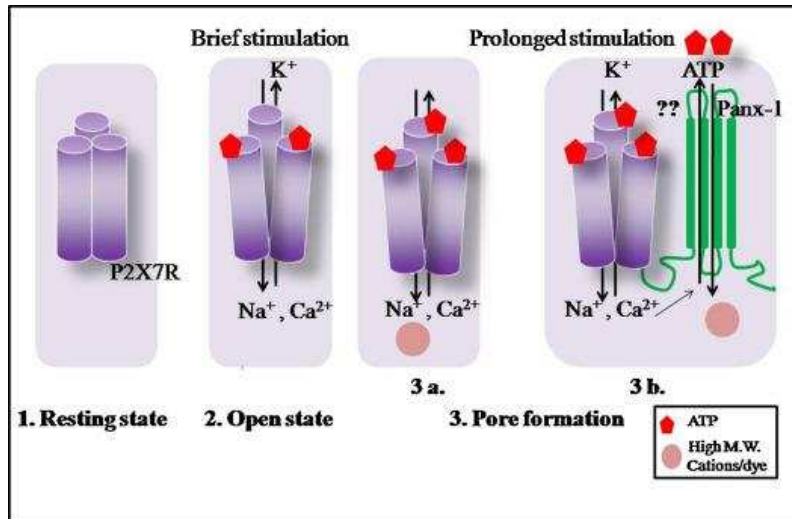


Figure 18 : Représentation schématique de P2X7 suite à une activation brève ou prolongée. 1. Conformation du récepteur P2X7 au repos. 2. Conformation du récepteur P2X7 sous sa forme canal ionique observée après une stimulation brève.

3. Conformation du récepteur P2X7 après une activation prolongée a. hypothèse de la transformation progressive du canal en pore. b. hypothèse de l'implication d'autres composants dans la formation du pore dont la protéine pannexine-1 (Tewari and Seth, 2015).

Ainsi la formation du pore P2X7 reste mal connue et l'implication de la pannexine-1 dans la formation de ce pore demeure controversée suite à ces résultats contradictoires.

La formation du pore P2X7 pourrait également être liée à sa localisation cellulaire. En effet, les récepteurs P2X7 sont situés à l'intérieur et à l'extérieur des radeaux lipidiques, zones riches en cholestérol de la membrane plasmique (Barth et al., 2007; Garcia-Marcos et al., 2006). Une expression nucléaire du récepteur P2X7 a également été montrée notamment dans les cellules des muscles lisses (Menzies et al., 2003). La fonction du récepteur P2X7 au niveau nucléaire demeure peu étudiée, ce récepteur pourrait avoir un rôle dans le transport d'ions tels que le calcium.

Il semblerait que, suivant l'espèce ou le type cellulaire, le mécanisme de formation du pore P2X7 soit différent et implique ainsi des protéines différentes.

2.2.3. Conséquences cellulaires de l'activation du récepteur P2X7 et processus dégénératifs

Le récepteur P2X7 a été associé à plusieurs processus dégénératifs, notamment dans le développement de la maladie d'Alzheimer au niveau de la microglie autour des plaques de peptide β amyloïde (McLarnon et al., 2006; Parvathenani et al., 2003; Sanz et al., 2009). L'implication du récepteur P2X7 dans les processus de toxicité synaptique des neurones de la voie dopaminergique ainsi que dans l'activation des cellules de la microglie a été démontrée, associant ce récepteur à la maladie de Parkinson (Carmo et al., 2014; Jiang et al., 2015). Le récepteur P2X7 a également été associé à la dégénérescence neuronale observée lors de la chorée de Huntington (Díaz-Hernández et al. 2009). Au niveau oculaire, le récepteur P2X7 a été impliqué dans les dégénérescences rétinienne et en particulier dans la DMLA (Wakx et al. 2015; Reichenbach et Bringmann 2015).

Le récepteur P2X7 peut induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). En effet, une augmentation des ERO a été observée sur plusieurs types cellulaires tels que les macrophages, les cellules microgliales, les cellules des glandes submandibulaires ou encore les cellules érythroïdes. Cette production d'ERO semble liée à la NADPH-oxydase, enzyme catalysant une réaction générant des anions superoxyde (Bartlett et al., 2014). Différentes publications ont démontré l'implication du récepteur P2X7 dans la surproduction d'ERO associée à la maladie d'Alzheimer (Lee et al., 2011; Parvathenani et al., 2003).

Le récepteur P2X7 induit également l'activation du complexe NLRP3-inflammasome. Cette activation a été montrée sur des macrophages, entraînant un relargage des cytokines IL-1 β et IL-18 dans le milieu extracellulaire (Deplano et al., 2013). De plus, le récepteur P2X7 entraîne l'activation de la caspase-1, un des composants de l'inflammasome (Ferrari et al., 1999). Ce récepteur s'associe à NLRP3 suite à l'augmentation du taux de calcium cytoplasmique induisant alors la cascade inflammatoire (Franceschini et al., 2015). La libération de la cytokine IL-1 α dans le

milieu extracellulaire a également été observée suite à l'activation du récepteur P2X7 (Pelegrin et al., 2008). Le récepteur P2X7 peut également avoir un effet sur le facteur de transcription NF- κ B notamment impliqué dans les processus inflammatoires. En effet, certaines études ont démontré une régulation de ce facteur de transcription par le récepteur P2X7 au niveau des cellules microgliales ou des ostéoclastes (Bartlett et al., 2014).

De plus, le récepteur P2X7 est impliqué dans les mécanismes d'apoptose. En effet, ce récepteur lorsqu'il est stimulé conduit à l'activation des caspases 3, 8 et 9 (Ferrari et al., 1999; Kong et al., 2005). Ce récepteur est impliqué dans la réorganisation des filaments d'actine ainsi que dans la formation de bourgeons (blebs) au niveau de la membrane plasmique *via* l'activation de la p38 MAPK (mitogen-activated protein kinases) et de Rho-GTPases (Ras homologous) (Pfeiffer et al., 2004).

Le récepteur P2X7 induit également le processus d'autophagie, qui entraîne une dégradation d'organelles intracellulaires ainsi que de complexes protéiques par les lysosomes (Biswas et al., 2008; Takenouchi et al., 2009). Il convient de souligner que l'autophagie et les lysosomes sont impliqués dans les processus dégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer ainsi que dans les processus de vieillissement (Levine and Kroemer, 2008; Rajawat et al., 2009).

Le récepteur P2X7 induit également des effets non impliqués dans les processus de dégénérescence. En effet, ce récepteur est également impliqué dans la prolifération cellulaire. En effet, Baricordi *et al.* ont démontré le rôle du récepteur P2X7 dans la prolifération cellulaire de cellules lymphoïdes en l'absence de facteurs de croissance (Baricordi et al., 1999). L'expression du récepteur P2X7 est augmentée dans de nombreuses cellules cancéreuses permettant la survie et la prolifération de ces cellules (Adinolfi et al., 2012; Giannuzzo et al., 2015).

2.3. Matrice extracellulaire

2.3.1. Généralités sur la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire de la peau fait partie du derme. Cette matrice forme une sorte de gel composé de protéines fibreuses, de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes (glycosaminoglycanes liés à des protéines). Différents types de protéines fibreuses sont retrouvées dans la matrice extracellulaire : le collagène, l'élastine, la laminine et la fibronectine. Les deux premières confèrent à la peau résistance mécanique et élasticité tandis que les deux dernières ont des fonctions adhésives permettant notamment les interactions entre les cellules et la matrice ainsi que la migration cellulaire.

Le collagène, sécrété par les fibroblastes, est formé de trois chaînes polypeptidiques subissant des modifications post-traductionnelles de type hydroxylation des résidus prolyle ou lysyle, ou glycosylation ce qui favorise l'association de ces trois chaînes pour former une triple hélice. Cette conformation est rendue possible par l'abondance de glycine qui représente un acide aminé de cette chaîne sur trois. Ainsi la chaîne est formée par l'association de triplets lysine-X-Y, X étant le plus souvent une proline et Y une hydroxyproline. Le collagène est d'abord synthétisé sous forme de procollagène comportant des extensions terminales avec des fonctions amine ou carboxyle. Ces extensions doivent être clivées par des protéinases formant alors une triple hélice mature, le tropocollagène. Le tropocollagène peut, suivant les types de collagène, se polymériser par liaison covalente entre deux molécules de lysine pour former des fibrilles. Ces fibrilles peuvent s'associer entre elles, conduisant alors à la formation de fibres de collagène (Krieg and Aumailley, 2011). Le derme papillaire comporte principalement de fines fibres de collagène de type III (réticuline) alors que le derme réticulaire, plus profond, est composé d'un réseau épais de fibres de collagène de type I et de fibres d'élastine orienté parallèlement à la surface cutanée.

Les fibres d'élastine, présentes dans le derme, confèrent à la peau son élasticité. Elles sont formées d'élastine et de microfibrilles riches en fibrillines. L'élastine, synthétisée par les fibroblastes, est formée d'une chaîne polypeptidique. Les molécules de tropoélastine se lient entre elles grâce à leurs acides aminés de type lysine qui peuvent notamment réagir entre eux pour former des desmosines (assemblage de 4

résidus lysine). Cette réaction formant des acides aminés de pontage est catalysée par la lysyl-oxydase. Les microfibrilles servent à l'assemblage des molécules de tropoélastine. Le composant majoritaire de ces microfibrilles est une glycoprotéine, la fibrilline (Kielty et al., 2002).

Les protéoglycanes ont un rôle notamment dans la prolifération, l'adhésion et la migration cellulaires, mais aussi dans l'assemblage et le remodelage de la matrice extracellulaire. Les protéoglycanes sont des molécules hydrophiles composées de glycosaminoglycanes associés de façon covalente à des protéines. Ces molécules peuvent comprendre un seul glycosaminoglycane comme c'est le cas pour la décorine, ou plusieurs, jusqu'à plus de cent comme c'est le cas pour l'aggrécan. Les glycosaminoglycanes, de nature glucidique, peuvent être répartis en quatre familles suivant leur combinaison en disaccharides : les acides hyaluroniques, les sulfates d'héparane, les sulfates de kératane, les sulfates de chondroïtine/dermatane. Une hétérogénéité est observée au sein de ces familles suite, entre autres, à la variabilité de longueur des chaînes polysaccharidiques. Les trois derniers types de glycosaminoglycanes forment des protéoglycanes en s'associant à des protéines tandis que l'acide hyaluronique reste sous forme de glycosaminoglycane libre (Naylor et al., 2011; Sandjeu and Haftck, 2009).

L'acide hyaluronique est une molécule ubiquitaire présente dans le liquide synovial, l'humeur vitrée et le cordon ombilical, mais surtout dans la peau, la moitié de la teneur en acide hyaluronique du corps humain se situant dans cet organe (Stern and Maibach, 2008). Ainsi, l'acide hyaluronique, majoritairement retrouvé au niveau du derme papillaire, est un composant abondant de la matrice extracellulaire. Ce glycosaminoglycane, dont la structure a été initialement étudiée par Meyer et Palmer (Meyer and Palmer, 1934) est un biopolymère constitué de la répétition de deux saccharides : l'acide β -glucuronique et la N-acétylglucosamine liés alternativement par des liaisons glycosidiques β 1-4 puis β 1-3 (Weissmann and Meyer, 1952). L'acide hyaluronique a la capacité de retenir jusqu'à 1000 fois son poids en eau (Baumann, 2007). Cette propriété apporte à l'acide hyaluronique un rôle majeur dans l'hydratation de la peau. De plus, cette molécule comporte des propriétés viscoélastiques lui permettant de se déformer tout en assurant l'hydratation des tissus et favorisant des fonctions de lubrification au niveau articulaire. Outre ces fonctions, l'acide hyaluronique

est, notamment, un acteur des processus de cicatrisation (Abatangelo et al., 1983; Ghazi et al., 2012), de l'inflammation (Horton et al., 1998; McKee et al., 1996) et des processus cancéreux (Tammi et al., 2008). Au niveau cellulaire, le rôle de l'acide hyaluronique dans la prolifération et la migration cellulaires a été démontré (Ghazi et al., 2012; Goldberg and Toole, 1987; Schor, 1994). Cependant, les activités biologiques de l'acide hyaluronique sont dépendantes de son poids moléculaire. A titre d'exemple, les acides hyaluroniques de haut poids moléculaires (plus d'un million de Daltons) possèdent des propriétés anti-inflammatoires tandis que les acides hyaluroniques de faible poids moléculaire (moins de 700 000 Daltons) ont des propriétés pro-inflammatoires (Cyphert et al., 2015; Nusgens, 2010). L'existence d'acide hyaluronique de différents poids moléculaire est due aux enzymes extracellulaires capables de cliver les molécules d'acide hyaluronique telles que la hyaluronidase ainsi qu'à l'activité des hyaluronane-synthases, enzymes responsables de la synthèse de l'acide hyaluronique. En effet, l'acide hyaluronique est synthétisé dans les fibroblastes grâce aux hyaluronane-synthases I, II ou III situées dans le feuillet interne de la membrane plasmique, puis sécrété directement dans l'espace extracellulaire. Le renouvellement de l'acide hyaluronique de la peau est primordial, car sa demi-vie est inférieure à une journée. Les récepteurs de l'acide hyaluronique, CD44 et RHAMM, sont présents dans la peau. Le récepteur CD44 est une glycoprotéine transmembranaire ubiquitaire. Lors de la liaison de l'acide hyaluronique à ce récepteur, des cascades de signalisation régulant la prolifération ou la migration cellulaires peuvent être activées (Lee and Spicer, 2000). De plus, le récepteur CD44 permet l'endocytose de l'acide hyaluronique. Le récepteur RHAMM est quant à lui présent à la surface cellulaire, dans le cytoplasme et le noyau. La liaison de l'acide hyaluronique à ce récepteur active également des cascades de signalisation, notamment en ce qui concerne la migration cellulaire (Stern and Maibach, 2008; Turley, 1992). Le récepteur RHAMM est également associé aux processus cancéreux.

L'acide hyaluronique est également présent, en moindre quantité, au niveau de l'épiderme. Plus précisément, sa localisation est extracellulaire dans la partie supérieure de la couche spinieuse et dans la couche granuleuse, alors que l'acide hyaluronique est localisé au niveau intracellulaire dans la couche basale de l'épiderme (Nusgens, 2010) ; de fait, les kératinocytes sont capables de produire de l'acide hyaluronique *via* les hyaluronane-synthases, en particulier la hyaluronane-synthase III.

Certains effets sur la matrice extracellulaires peuvent être liés au récepteur P2X7. En effet, ce récepteur peut entraîner des effets sur le microenvironnement membranaire, notamment sur la molécule d'adhésion CD44, responsable entre autres des interactions cellule-cellule, cellule-matrice ou encore de la migration cellulaire. Une étude sur des macrophages a montré que l'activation du récepteur P2X7 induisait une diminution de la molécule d'adhésion CD44 (Lin et al., 2012). En outre, le récepteur P2X7 induit un relargage de la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9) responsable d'une dégradation de la matrice extracellulaire (Gu and Wiley, 2006).

2.3.2. Implication de la matrice extracellulaire dans les processus liés au vieillissement

L'arrêt de prolifération et la mort des fibroblastes lors du vieillissement induisent *de facto* un appauvrissement de la matrice extracellulaire puisqu'elle est synthétisée principalement par les fibroblastes. Ceci a été confirmé par différentes études qui ont démontré notamment une diminution des taux de collagènes I et III dans des biopsies cutanées de personnes âgées de plus de 80 ans par rapport à des biopsies cutanées de personnes âgées de 18 à 29 ans (Varani et al., 2000). Des diminutions de la synthèse de la fibronectine et des protéoglycanes inversement proportionnelles au nombre de passages de culture de fibroblastes humains ont également été observées (Takeda et al., 1992).

Outre ces altérations quantitatives, des altérations qualitatives de la matrice extracellulaire sont observées durant le vieillissement cutané. Une dégradation enzymatique des composants de la matrice extracellulaire tels que l'élastine, le collagène et l'acide hyaluronique a été démontrée (Rijken et al., 2006; Tzellos et al., 2009; Varani et al., 2001). Parmi les enzymes impliquées, on peut citer les métalloprotéinases matricielles (MMP) dont le taux et l'activité sont modifiés après exposition au rayonnement UV. Les ERO dégradent également les molécules d'acide hyaluronique en fragments de taille inférieure (Panasyuk et al., 1994).

La matrice extracellulaire peut également être modifiée par la présence de produits de glycation avancée (ou AGE) dont la formation est complexe. En effet, les protéines de la matrice extracellulaire peuvent subir des modifications post-

traductionnelles non enzymatiques impliquant la réaction de la fonction amine libre de certains acides aminés, tels la lysine ou l'arginine, avec la fonction aldéhyde de sucres (réaction de Maillard) comme le glucose, le ribose ou le fructose, présents dans des molécules de type glycosaminoglycanes. Les AGE peuvent se fixer à divers composants de la peau tels que les fibres de collagène. Une accumulation des AGE a été observée au cours du vieillissement chronologique de la peau. En effet, il a été rapporté que le taux de certaines de ces molécules de type N-carboxyméthyl-lysine, N-carboxyéthyl-lysine ou encore pentosidine était en moyenne multiplié par trois entre 20 et 80 ans. Cette accumulation des AGE est notamment favorisée par la demi-vie longue des fibres de collagène (environ 15 ans) (Verzijl et al., 2000). La présence de ces AGE contribuerait à la modification des propriétés mécaniques de la peau ainsi qu'à sa perte d'élasticité. Les AGE seraient responsables d'une modification d'expression et de synthèse des molécules de la matrice extracellulaire se traduisant par une augmentation du collagène de type I et une réduction de l'acide hyaluronique, ainsi que par une modulation des MMP. L'accumulation des AGE est également observée lors du vieillissement accéléré de la peau lié au rayonnement UV (Pageon, 2010).

3. Problématique

Les pathologies dégénératives, en particulier les maladies neurodégénératives, constituent un réel problème de santé publique. Les traitements disponibles actuellement sont des thérapeutiques symptomatiques et non curatives. De nombreuses recherches sont menées et certaines molécules sont actuellement en cours de développement. L'une des pistes de recherche est centrée sur un acteur clé de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer, mais aussi de la DMLA, à savoir le peptide β amyloïde. Cependant, plusieurs molécules ciblant le peptide β amyloïde ont été développées ces dernières années mais n'ont pas été retenues, du fait notamment d'effets secondaires importants.

Aussi, cibler d'autres acteurs des maladies dégénératives pourrait ainsi constituer une piste de recherche intéressante dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

C'est dans cette nouvelle perspective que notre recherche de nouvelles cibles s'est portée sur les dérivés d'oxydation du cholestérol ou oxystérols, compte tenu de l'importance du cholestérol dans l'homéostasie cellulaire et de la survenue de stress oxydant dans la pathogenèse des maladies dégénératives.

Le processus de vieillissement comportant des phases de dégénérescence, nous nous sommes posé la question suivante : cette nouvelle cible est-elle commune à d'autres modèles de vieillissement ou de dégénérescence ? La peau constituant une barrière entre le milieu extérieur et le corps humain, cet organe est très exposé aux effets délétères de facteurs extérieurs tels le rayonnement UV qui induit un processus de vieillissement accéléré. En conséquence, nos recherches ont porté sur le rôle des oxystérols dans un modèle de vieillissement accéléré cutané, en nous focalisant sur des marqueurs cellulaires d'apoptose et de vieillissement.

Nous avons fait le choix de réaliser majoritairement notre étude sur des lignées cellulaires, car les résultats obtenus avec ces modèles sont reproductibles. Nos conditions d'exposition *in vitro* sont proches de conditions pathologiques réelles avec l'utilisation du peptide β amyloïde, molécule clé de maladies dégénératives, ainsi que celle d'un irradiateur UV mimant le rayonnement UV du spectre solaire.

TRAVAUX PERSONNELS

II. MATERIEL ET METHODES

1. Modèles d'étude

1.1. Modèles cellulaires *in vitro*

La culture cellulaire a été effectuée dans un environnement stérile, sous hotte à flux laminaire (PSM II, Astec). Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75 cm² (Corning) placées dans un incubateur (Binder) thermostaté à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% en humidité. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours.

Lorsqu'elles atteignent la confluence, les cellules sont décollées par ajout de trypsine-EDTA (Eurobio) et repiquées à plus faible densité cellulaire.

1.1.1. Lignée de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien humain

La lignée de cellules humaines oculaires ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™) est issue de l'épithélium pigmenté rétinien d'un jeune homme de 19 ans. Ces cellules sont spontanément immortalisées et présentent les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de l'épithélium pigmenté rétinien (Dunn et al., 1996).

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM:F12 (1:1, Eurobio) stérile supplémenté en SVF 10% (Eurobio), glutamine 2 mM (Eurobio) et 50 UI/mL de streptomycine et pénicilline (Eurobio).

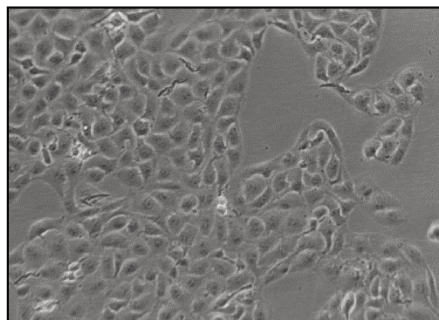


Figure 19 : Tapis de cellules ARPE-19 (x100)

1.1.2. Lignée de cellules épithéliales cornéennes humaines

La lignée de cellules épithéliales cornéennes humaines HCE-T est issue de la cornée d'une femme de 49 ans. Ces cellules, immortalisées par un adénovirus virus simien SV-40 en 1995, possèdent les caractéristiques morphologiques des cellules épithéliales cornéennes humaines et expriment les cytokératines spécifiques de la cornée (Araki-Sasaki et al., 1995).

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM:F12 (1:1, Eurobio) stérile supplémenté en SVF 10%, glutamine 2 mM et 50 UI/mL de streptomycine et pénicilline.

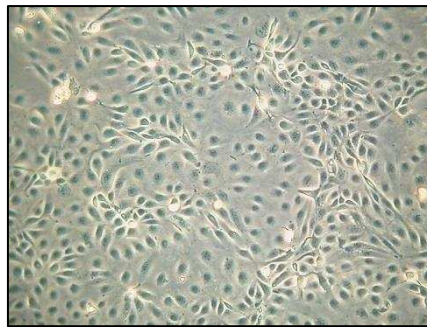


Figure 20 : Tapis de cellules HCE-T (x100)

1.1.3. Lignée de kératinocytes humains

La lignée de kératinocytes humains HaCaT est issue de de la peau d'un homme caucasien de 62 ans (moitié supérieure du dos relativement peu exposée au soleil). Ces cellules, spontanément immortalisées, sont proches des kératinocytes humains possédant notamment leur capacité de différenciation (Boukamp et al., 1988).

Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Eurobio) stérile supplémenté en SVF 10%, glutamine 2 mM et 50 UI/mL de streptomycine et de pénicilline.

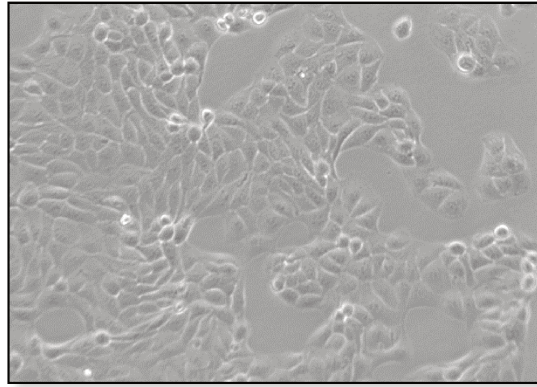


Figure 21 : Tapis de cellules HaCaT (x100)

1.1.4. Cultures primaires de kératinocytes humains

Les cultures primaires de kératinocytes utilisées dans notre étude proviennent de Promocell et Tébu-bio. Ces cultures sont issues de biopsies cutanées de cinq donneurs masculins de type caucasien : deux donneurs jeunes et trois donneurs « âgés ». Les informations concernant les sujets sont référencées dans le tableau ci-après.

Type de donneur	Age	Localisation de la biopsie
Jeune	2 ans	Prépuce
Jeune	3 ans	Prépuce
« Agé »	64 ans	Visage
« Agé »	70 ans	Visage
« Agé »	83 ans	Dos

Tableau II : Informations concernant les sujets à l'origine des cultures primaires de kératinocytes

Les cellules sont cultivées dans du milieu Keratinocytes Growth Medium 2 (Promocell) complémenté avec des facteurs de croissance (Supplement mix Promocell) et 50 UI/mL de streptomycine et de pénicilline.

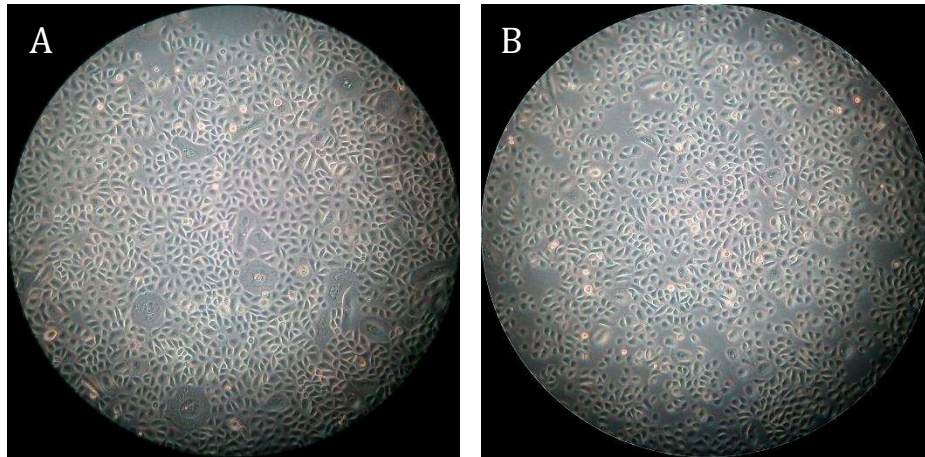


Figure 22 : Tapis de kératinocytes primaires observés par microscopie optique (x100)
A. Kératinocytes issus de biopsie de sujet jeune. B. Kératinocytes issus de biopsie de sujet « âgé ».

1.2. Modèle d'exposition aux rayonnements UV solaires

Le rayonnement solaire est reproduit par un simulateur de lumière solaire Suntest CPS+ (Atlas). En effet, ce simulateur est équipé d'une lampe à arc au xénon de 1500 W et d'un filtre UV limitant la transmission de la lumière pour les longueurs d'onde inférieures à 290 nm, reproduisant ainsi approximativement le spectre solaire auquel l'Homme est exposé.

Les cellules sontensemencées en flasques. Lorsque les cellules atteignent la sub-confluence, elles sont rincées avec du PBS (Eurobio) puis irradiées dans le simulateur Suntest CPS+ en présence de PBS. Le temps d'exposition des cellules dépend de la dose d'irradiation ainsi que de la puissance du rayonnement UVA. Pour une puissance de 250 W/m² soit une quantité d'UVA de 26, la formule est :

$$\text{Temps d'exposition} = \text{dose d'irradiation souhaitée (J/m}^2\text{)} / \text{Quantité d'UVA (26)} \times 60$$

Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS et incubées pendant 24 heures avec du milieu de culture. En parallèle, des cellules sont incubées avec du PBS pour servir de contrôle négatif, « cellules non irradiées ».

1.3. Incubation avec les oxystéroïdes

Le 7-KC (AvantiPolar Lipid), le 27-OH (AvantiPolar Lipid) et le 25-OH (Sigma-Aldrich) sont dissous dans l'éthanol absolu afin de réaliser des solutions mères à 40 mM. Des solutions filles sont préparées extemporéneement par dilution de la solution mère dans du milieu de culture supplémenté en SVF à 2,5%. La concentration finale en éthanol sur les cellules n'a pas dépassé 0,25% (v/v). Aucune différence n'a été observée entre le contrôle négatif (milieu de culture) et le contrôle éthanol seul.

2. Techniques d'analyse

2.1. Microtitration cytofluorimétrique

Cette technique permet une mesure de fluorescence directement sur cellules vivantes, adhérentes, en microplaques grâce à un spectrofluorimètre adapté aux microplaques. Dans notre étude, un spectrofluorimètre composé de deux monochromateurs (Safire, Tecan) a été utilisé. Avec cet appareil, la fluorescence peut être lue de 230 à 850 nm, des spectres de fluorescence en excitation et en émission peuvent également être réalisés. La microplaque est scannée suivant les longueurs d'ondes définies pour le test choisi pendant une durée de 0,3 seconde, évitant ainsi les phénomènes de « fading » ou affaiblissement du signal pouvant être rencontrés avec les sondes fluorescentes.

Cette technique présente une sensibilité élevée (pg-fg/mL), une spécificité et une reproductibilité importantes. Ces paramètres en font une technique de choix pour la mise au point de méthodes standardisées d'analyse des fonctionnalités cellulaires telles que la cytotoxicité ou encore le stress oxydant. Cette technique fait ainsi partie des méthodes alternatives de premier choix en toxicologie cellulaire.

Les tests réalisés en microtitration fluorimétrique peuvent être effectués sur cellules vivantes au cours des premières étapes du test mais nécessiter une étape finale d'extraction pour la détection et la révélation, comme c'est le cas pour le test au rouge neutre, que nous détaillerons dans le paragraphe 2.2.1.3.1. Dans ce cas les essais sont appelés test MiFALC (Microtitration Fluorimetric Assay on Living Cells) de type I. Les tests MiFALC de type II sont, quant à eux, réalisés sur cellules vivantes d'un bout à

l'autre de l'essai y compris pour la détection, permettant ainsi d'effectuer des cinétiques après ajout de la sonde fluorimétrique dans les puits de la microplaque. A titre d'exemple le test de mesure de condensation de la chromatine Hoechst 33342, que nous détaillerons dans le paragraphe 2.2.1.4.3., fait partie des tests MiFALC de type II.

2.1.1. Préparation des cellules pour la cytofluorimétrie

Suivant le type cellulaire, les cellules sontensemencées dans des microplaques 96 puits à différentes concentrations afin de permettre l'adhésion des cellules et l'obtention d'un tapis cellulaire à quasi-confluence en 24 heures. Les concentrations utilisées sont les suivantes :

- Lignée de cellules ARPE-19 : 90 000 cellules/mL
- Lignée de cellules HaCaT : 80 000 cellules/mL.

Les puits des bords de la microplaque, ou puits périphériques, ne sont pasensemencés mais remplis de tampon PBS afin d'éviter l'« effet de bord ». Cet effet traduit une hygrométrie non homogène et une température inégale entre les puits situés au centre et ceux situés sur les bords de la microplaque, induisant une modification de la croissance cellulaire, rendant alors l'exploitation des résultats difficiles.

Les microplaques sont placées dans un incubateur thermostaté à 37°C, sous une atmosphère contrôlée à 5% en CO₂ et 95% en humidité. Après 24 heures, les plaques sont vidées par retournement puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS afin d'éliminer les débris cellulaires et les reliquats de milieu de culture complété à 10% de SVF. Les produits à l'essai sont incubés pendant la durée souhaitée. Après cette incubation, les tests de microtitration cytofluorimétrique sont effectués.

2.1.2. Tests effectués par microtitration cytofluorimétrique MiFALC de type I

2.1.2.1. Evaluation de l'intégrité membranaire : test au rouge neutre

L'intégrité membranaire est mesurée par le test au rouge neutre (Fluka). Ce colorant traverse de façon passive la membrane cellulaire et s'accumule au niveau de la membrane des lysosomes. Lorsque les membranes sont intactes, le rouge neutre

s'accumule dans les membranes lysosomales mais ne peut en ressortir, en revanche, en cas d'altération de l'intégrité membranaire, le rouge neutre est exclu de la cellule (Borenfreund and Puerner, 1985). Le rouge neutre peut être mesuré en fluorimétrie. La norme ISO 10993-5 relative à l'évaluation biologique des dispositifs médicaux recommande l'utilisation du test au rouge neutre pour l'évaluation de la cytotoxicité des dispositifs médicaux dans l'annexe A de la norme.

Une solution mère à 0,4 mg/mL est préparée dans de l'eau distillée. Cette solution est conservée à l'abri de la lumière. Le test est réalisé avec une solution diluée au 1/80^{ème} de la solution mère dans du milieu de culture non complété. Cette solution est centrifugée à 3500 tours/minute pendant 10 minutes afin d'éviter que les éventuels cristaux formés n'endommagent les cellules. Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. La solution fille de rouge neutre est alors distribuée à raison de 200 µL/puits. Après 3 heures d'incubation à 37°C dans l'incubateur, la plaque est vidée par retournement puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS afin d'éliminer l'excès de solution de rouge neutre. Les cellules sont alors lysées avec une solution composée d'éthanol absolu (50,6%), d'eau distillée (48,4%) et d'acide acétique glacial (1%). Une lecture du signal de fluorescence est effectuée au Safire après 15 minutes d'agitation permettant une homogénéisation de la coloration ($\lambda_{\text{excitation}} = 540 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 600 \text{ nm}$).

2.1.2.2. Evaluation de l'activité des caspases 3

L'activité de la caspase 3 est mesurée par le kit Caspase 3 Assay Kit (Sigma-Aldrich). Le peptide de synthèse acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-méthylcoumarine est hydrolysé par la caspase 3 libérant ainsi le dérivé fluorescent 7-amino-4-méthylcoumarine. La fluorescence mesurée est proportionnelle à la 7-amino-4-méthylcoumarine libérée et donc à l'activité de la caspase 3.

Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. Selon le protocole du fournisseur, 25 µL de solution de lyse sont distribués dans chaque puit. Après 20 minutes d'incubation dans la glace, 200 µL d'Assay buffer contenant le peptide de synthèse, substrat de la

caspase 3, sont ajoutés dans chaque puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C, la microplaque est lue au Safire ($\lambda_{\text{excitation}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 460 \text{ nm}$).

2.1.2.3. *Evaluation de l'activité des caspases 8*

L'activité de la caspase 8 est mesurée par le kit Caspase 8 Assay Kit (Sigma-Aldrich). Le peptide de synthèse Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-7-amino-4-méthylcoumarine est hydrolysé par la caspase 8 libérant ainsi le dérivé fluorescent 7-amino-4-méthylcoumarine. La fluorescence mesurée est proportionnelle à la 7-amino-4-méthylcoumarine libérée et donc à l'activité de la caspase 8.

Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. Selon le protocole du fournisseur, 25 μL de solution de lyse sont distribués dans chaque puit. Après 20 minutes d'incubation dans de la glace, 65 μL d'Assay buffer et 10 μL de caspase 8 substrate solution (contenant le peptide de synthèse) sont ajoutés dans chaque puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C, la microplaque est lue au Safire ($\lambda_{\text{excitation}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 440 \text{ nm}$).

2.1.2.4. *Evaluation de la masse mitochondriale : test à la nonylacridine orange*

La nonylacridine orange (NAO, ThermoFisher Scientific) est une sonde se fixant à la membrane interne mitochondriale. La fixation de cette sonde fluorescente est indépendante du potentiel membranaire mitochondrial.

Une solution mère à 0,01 M est préparée dans du DMSO (Sigma-Aldrich). Cette solution est conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Le test est réalisé avec une solution diluée au 1/1000^{ème} de la solution mère dans du milieu de culture non complétement. Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. La solution diluée de NAO est alors distribuée à raison de 200 μL /puits. Après 30 minutes d'incubation à 37°C dans l'incubateur, la microplaque est vidée par retournement. Les cellules sont rincées avec du PBS, puis incubées dans du milieu de culture pendant 1 heure à 37°C dans l'incubateur. La microplaque est alors vidée par retournement puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS afin d'éliminer l'excès de solution de NAO. Les cellules sont alors lysées avec une solution

composée d'éthanol absolu (50,6%), d'eau distillée (48,4%) et d'acide acétique glacial (1%). Une lecture de la plaque est effectuée au Safire après 15 minutes d'agitation permettant une homogénéisation du signal de fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 530 \text{ nm}$).

2.1.3. Tests effectués par microtitration cytofluorimétrique MiFALC de type II

2.1.3.1. *Evaluation de l'état d'oxydo-réduction cellulaire : test à l'Alamar blue*

L'état d'oxydo-réduction cellulaire est évalué par le test à l'Alamar blue (Sigma-Aldrich). Cette sonde fluorogène bleue, également appelée résazurine, pénètre passivement dans les cellules. Lorsque les enzymes d'oxydo-réduction intracellulaires sont fonctionnelles, la résazurine est alors réduite en résorufine (O'Brien et al., 2000). La résorufine, rouge et fluorescente, diffuse hors des cellules, dans le milieu de culture permettant sa mesure par fluorimétrie. Ce test est fréquemment utilisé pour l'évaluation de la viabilité cellulaire (Riss et al., 2004).

Une solution mère à 0,1 mg/mL est préparée dans du tampon PBS. Cette solution est conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Le test est réalisé avec une solution diluée au 1/11^{ème} de la solution mère dans du milieu de culture complémenté à 2,5% de SVF. Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. Enfin la solution fille d'Alamar blue est distribuée à raison de 200 μL /puits. Après 6 heures d'incubation à 37°C dans l'incubateur, une lecture au Safire est effectuée ($\lambda_{\text{excitation}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 600 \text{ nm}$).

2.1.3.2. *Evaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène : test au H2DCF-DA*

La production d'espèces réactives de l'oxygène est évaluée par le test au 2',7'-diacétate de dihydrodichlorofluorescéine (H2DCF-DA, ThermoFisher Scientific). Cette sonde fluorogène traverse la membrane cellulaire par diffusion passive et s'accumule dans le cytosol où elle est hydrolysée par les estérases cellulaires en 2',7'-dihydrodichlorofluorescéine. Cette molécule peut alors être oxydée par les espèces

réactives de l'oxygène (ERO), formant ainsi un dérivé fluorescent, la 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF).

La solution mère de H₂DCF-DA à 0,1 M dans du DMSO est diluée au 1/5000^{ème} dans du tampon PBS afin d'obtenir une solution fille à 20 µM. Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. La solution diluée de H₂DCF-DA est alors distribuée à raison de 200 µL/puits. Après 20 minutes d'incubation à 37°C dans l'incubateur, la microplaque est lue au Safire (λ_{excitation} = 485 nm, λ_{émission} = 535 nm).

2.1.3.3. Evaluation de la condensation de la chromatine : test au Hoechst 33342

La condensation de la chromatine est évaluée par le test au Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific). Cette sonde fluorescente dans l'UV, franchit la membrane cytoplasmique sans altération, puis se fixe préférentiellement sur les séquences riches en bases A-T de l'ADN, émettant une fluorescence proportionnelle à la condensation de la chromatine. Le Hoechst 33342 marque les cellules vivantes mais également les cellules en apoptose et en nécrose. Lors de la condensation de la chromatine, un effet hyperchrome et bathochrome est observé dans le spectre de fluorescence. Un contre-marquage est effectué avec du iodure de propidium (ThermoFisher Scientific) qui ne marque que les cellules en nécrose.

Une solution composée de Hoechst 33342 à 10 mg/mL et de iodure de propidium à 0,5 mg/mL dans du tampon PBS est préparée. Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. La solution est alors distribuée dans les puits. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante à l'obscurité, la microplaque est lue au Safire (λ_{excitation} = 350 nm, λ_{émission} = 450 nm).

2.1.3.4. *Evaluation de l'activation du récepteur P2X7 : test au YO-PRO-1*

Le YO-PRO®-1 (ThermoFisher Scientific) est une sonde fluorogène de la famille des carbocyanines qui ne peut entrer dans les cellules qu'après activation des récepteurs P2X7 entraînant l'ouverture de pores. La sonde se fixe alors aux acides nucléiques et émet une fluorescence, permettant une mesure par fluorimétrie.

La solution mère de YO-PRO®-1 à 1 mM dans du DMSO est diluée au 1/500^{ème} dans du tampon PBS afin d'obtenir une solution fille à 2 µM. Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. 200 µL/puits de solution diluée de YO-PRO®-1 sont alors distribués. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, la microplaque est lue au Safire ($\lambda_{\text{excitation}} = 491 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 509 \text{ nm}$).

Cette technique fait l'objet d'un article "A fast and reproducible cell- and 96-well plate-based method for the evaluation of P2X7 receptor activation using YO-PRO-1 fluorescent dye" en révision favorable dans la revue Journal of Biological Methods (Annexe A).

2.1.3.5. *Evaluation de l'activation de la pannexine-1 : test au YO-PRO-3*

Le YO-PRO®-3 (ThermoFisher Scientific) est une sonde fluorogène, de la famille des carbocyanines, qui ne peut entrer dans les cellules qu'après activation des canaux pannexine-1. La sonde se fixe alors aux acides nucléiques et émet une fluorescence pouvant être mesurée.

La solution mère de YO-PRO®-3 à 1 mM dans du DMSO est diluée au 1/1000^{ème} dans du milieu de culture non complétement afin d'obtenir une solution fille à 1 µM. Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. 200 µL/puits de solution diluée de YO-PRO®-3 sont alors distribués. Après 30 minutes d'incubation à 37°C dans l'incubateur, la microplaque est lue au Safire ($\lambda_{\text{excitation}} = 612 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 631 \text{ nm}$).

2.1.3.6. *Evaluation de l'autophagie : test à la monodansylcadavérine (MDC)*

Le test à la monodansylcadavérine (MDC, Sigma-Aldrich) constitue une méthode rapide d'évaluation de l'autophagie. En effet, la MDC est un composé fluorescent s'accumulant dans les vacuoles d'autophagie et pouvant être mesuré par fluorimétrie.

Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. Une solution à 0,05 mM est préparée dans du tampon PBS et distribuée à raison de 100 µL par puits. Après 30 minutes d'incubation à 37°C dans l'incubateur, la plaque est vidée par retournement puis rincée 3 fois avec du PBS avant d'être lue au Safire ($\lambda_{\text{excitation}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 525 \text{ nm}$).

2.1.3.7. *Evaluation du taux de calcium intracellulaire : test au Fluo-4*

Le taux de calcium intracellulaire est évalué par le kit Fluo-4 Direct Assay (ThermoFisher Scientific). La sonde Fluo-4 pénètre dans les cellules et se lie au calcium libre en émettant de la fluorescence.

Les produits à tester sont incubés à raison de 100 µL par puits. Après le temps d'incubation choisi, le réactif Fluo-4 Direct Calcium est ajouté dans les puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C dans l'incubateur, la microplaque est lue au Safire ($\lambda_{\text{excitation}} = 494 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 516 \text{ nm}$).

2.1.3.8. *Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial : test au JC-1*

Le potentiel membranaire mitochondrial est évalué par la sonde JC-1 (ThermoFisher Scientific). Lorsque l'activité mitochondriale est faible, cette sonde se fixe sous forme de monomère dans la membrane interne des mitochondries en émettant une fluorescence dans le vert. En revanche, lorsque l'activité mitochondriale est élevée, la sonde se fixe sous forme d'agrégats à la membrane interne des mitochondries en émettant une fluorescence dans le rouge.

Une solution mère à 6,5 mg/mL dans du DMSO est préparée sous agitation pour éviter la formation d'agrégats. Le test est réalisé avec une solution diluée au 1/1000^{ème} de la solution mère dans du PBS. Les produits à tester sont éliminés par retournement

de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du PBS. La solution fille de JC-1 est distribuée à raison de 200 μL /puits. Après 15 minutes d'incubation à 37°C, la microplaque est lue au Safire aux deux longueurs d'onde dans le vert ($\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$) et dans le rouge ($\lambda_{\text{excitation}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 600 \text{ nm}$).

2.1.3.9. Evaluation de la composition en lipides polaires et en lipides neutres de la membrane : test au Nile red

Le test au Nile red permet d'évaluer la composition en lipides neutres et en lipides polaires des cellules. En effet, le phénoxazine métachromatique (9-diéthylamino-5H-benzo[a]phénoxazine-5-one) émet une fluorescence dans le jaune lorsqu'il s'incorpore dans les lipides neutres et dans le rouge-orangé lorsqu'il s'insère dans les lipides polaires.

Une solution mère à 100 $\mu\text{g/mL}$ dans du DMSO est préparée sous agitation pour éviter la formation d'agrégats. Le test est réalisé avec une solution diluée au 1/1000^{ème} de la solution mère dans du PBS. Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du PBS. La solution fille de Nile red est distribuée à raison de 200 μL /puits. Après 15 minutes d'incubation à 37°C, la microplaque est lue au Safire aux deux longueurs d'onde dans le jaune ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 580 \text{ nm}$) et dans le rouge ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 630 \text{ nm}$).

2.1.3.10. Evaluation de l'asymétrie membranaire : test au F2N12S

Le test au F2N12S (4'-N,N-diéthylamino-6-(N,N,N-dodécyl-méthylamino-sulfopropyl)-méthyl-3-hydroxyflavone) permet d'évaluer l'asymétrie membranaire. La composition lipidique des deux feuillets de la membrane plasmique diffère, les sphingomyéline et phosphatidylcholines étant préférentiellement situées dans le feuillet externe tandis que les phosphatidylsérines et phosphatidyléthanolamines se trouvent dans le feuillet interne. La sonde F2N12S s'insère dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Cette sonde possède la particularité, lorsqu'elle est à l'état excité de pouvoir transférer un proton intramoléculaire. Après excitation, deux types d'émission sont alors possibles correspondant à un état normal (N^*) et à un état

tautomère (T*) dans lequel un proton intramoléculaire a été transféré. Lors de la perte de l'asymétrie membranaire, l'émission correspondant à l'état normal est augmentée tandis que l'émission de l'état tautomère demeure inchangée. Le rapport N^*/T^* permet ainsi d'observer les variations de l'asymétrie membranaire.

Une solution mère à 2,1 mM dans du DMSO est préparée sous agitation pour éviter la formation d'agrégats. Le test est réalisé avec une solution diluée au 1/21000^{ème} de la solution mère dans du PBS. Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du PBS. La solution fille F2N12S est distribuée à raison de 200 μ L/puits. Après 5 minutes d'incubation à 37°C, la microplaque est lue au Safire aux deux longueurs d'onde correspondant à l'état excité normal N^* ($\lambda_{\text{excitation}} = 407 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 530 \text{ nm}$) et à l'état excité de la forme tautomère T^* ($\lambda_{\text{excitation}} = 407 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 585 \text{ nm}$).

2.2. Microtitration colorimétrique

2.2.1. Principe des analyses par colorimétrie

Les analyses par colorimétrie sont basées sur la production de composés colorés suite à une réaction chimique. L'intensité de coloration, mesurée par absorbance, est proportionnelle à la quantité de composé coloré formée. Nous avons réalisé ces analyses sur les tapis cellulaires (mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase) ou sur les surnageants cellulaires (mesure de la libération de la lactate déshydrogénase) ou encore sur des culots cellulaires (dosage des protéines). Les mesures d'absorbance ont été effectuées par un lecteur de microplaques Safire (Tecan).

2.2.2. Mesure d'activité de la succinate déshydrogénase

L'activité de la succinate déshydrogénase, enzyme du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale, a été mesurée par le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide ou MTT (Sigma-Aldrich). Ce test est basé sur la réduction du sel de tétrazolium MTT (de couleur jaune) dans les mitochondries, par la succinate déshydrogénase, en cristaux de formazan (de couleur violette). L'absorbance des cristaux de formazan peut ainsi être mesurée. Cette réduction ne peut avoir lieu que

dans les cellules viables, c'est pourquoi ce test peut être extrapolé à la viabilité cellulaire. Ce test est notamment utilisé pour évaluer l'irritation cutanée *in vitro* selon les lignes directrices de l'OCDE 439 et recommandé dans la norme ISO 10993-5 relative à l'évaluation biologique des dispositifs médicaux pour l'évaluation de la cytotoxicité (Annexe C de la norme).

Une solution de MTT à 0,5 mg/mL est préparée dans du milieu de culture non complémenté. Les produits à tester sont éliminés par retournement de la plaque, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. La solution fille de MTT est distribuée à raison de 100 µL/puits. Après 3 heures d'incubation à 37°C dans l'incubateur, la microplaque est vidée par retournement puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS pour éliminer la solution de MTT en excès. Les cellules sont alors lysées avec du DMSO permettant la solubilisation des cristaux de formazan présents. Une lecture est effectuée au Safire après 15 minutes d'agitation permettant une homogénéisation de la coloration ($\lambda_{\text{abs}} = 540 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{réf}} = 630 \text{ nm}$).

2.2.3. Mesure de la libération de la lactate déshydrogénase

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique libérée dans les surnageants cellulaires en cas d'altération de la membrane cytoplasmique. Le taux de lactate déshydrogénase dans les surnageants cellulaires a été corrélé à la mort cellulaire (Legrand et al., 1992). La quantité de LDH libérée dans les surnageants cellulaires est évaluée par le kit *in vitro* toxicology assay (Sigma-Aldrich). Le test est basé sur la réduction de la NAD en NADH par la LDH. Le NADH permet la conversion d'un sel de tétrazolium formant un composé coloré dont l'absorbance peut être mesurée.

Une solution composée d'un mélange à volume égal de LDH Assay Substrate, LDH Assay Cofactor and LDH Assay Dye est préparée selon les instructions du fournisseur. 50 µL de cette solution sont ajoutés à 50 µL de surnageant cellulaire. Après 30 minutes sous agitation à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée par lecture de la microplaque au Safire ($\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{réf}} = 690 \text{ nm}$).

2.2.4. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées par l'acide bicinchoninique (BCA). Cette technique est basée sur la réduction des ions Cu^{2+} en ions Cu^{+} par les protéines présents dans l'échantillon. Puis, les ions Cu^{+} forment un complexe de couleur pourpre avec l'acide bicinchoninique, permettant ainsi une mesure d'absorbance.

Une solution composée de BCA (Sigma-Aldrich) et de sulfate de cuivre (II) (Sigma-Aldrich) est préparée selon un ratio 50:1. Dans une microplaque, 80 μL de cette solution auxquels sont ajoutés 10 μL d'extraits protéiques à doser sont distribués par puits. Après 2 heures sous agitation à température ambiante à l'abri de la lumière, la microplaque est lue au Safire ($\lambda_{\text{abs}} = 562 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{réf}} = 700 \text{ nm}$).

2.3. Microtitration par bioluminescence

2.3.1. Principe de l'analyse par bioluminescence

L'analyse par bioluminescence est basée sur l'émission de photons. Dans la plupart des cas, cette émission résulte de la transformation enzymatique de la luciférine catalysée par la luciférase produisant de l'oxyluciférine et des photons. Les mesures de luminescence sont effectuées grâce à un lecteur Victor™ (PerkinElmer).

2.3.2. Evaluation des taux d'ATP extracellulaire et intracellulaire

La quantité d'ATP extracellulaire et intracellulaire est évaluée par le kit CellTiter-Glo® 2.0 (Promega). Afin de pouvoir catalyser la transformation de la luciférine en oxyluciférine et ainsi émettre des photons, la luciférase doit être en présence d'ATP. Par conséquent, l'émission de photons est proportionnelle à la quantité d'ATP.

50 μL de CellTiter-Glo® Reagent sont ajoutés à 50 μL de surnageant cellulaire pour la mesure de l'ATP extracellulaire. La microplaque est placée à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant 10 minutes avant d'être lue au Victor™.

Pour la mesure de l'ATP intracellulaire, la microplaque est vidée par retournement puis rincée avec du PBS. 50 μL de CellTiter-Glo® Reagent sont ajoutés, la microplaque est placée sur l'agitateur à température ambiante, à l'abri de la lumière

pendant 2 minutes. Après 10 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière, la microplaque est lue au Victor™.

2.3.3. Evaluation de l'activité de la caspase 1

La caspase 1 est un composant de l'inflammasome. L'activité de cette caspase est évaluée par le kit Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay (Promega). Ce test est basé sur l'ajout d'un substrat de la caspase 1 couplé à la luciférine. Selon l'activité de la caspase 1, le substrat est clivé entraînant la libération de la luciférine qui sera transformée par la luciférase, ce qui induit l'émission de photons.

50 µL de Caspase-Glo® 1 Reagent sont ajoutés à 50 µL de surnageant cellulaire. La microplaque est placée à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant 1 heure avant d'être lue au Victor™.

2.4. Analyses par méthode immuno-enzymatique

2.4.1. Principe des analyses par méthode immuno-enzymatique

La méthode immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) permet de doser une protéine dans les surnageants cellulaires notamment. La protéine d'intérêt se lie à l'anticorps de capture dirigé contre celle-ci qui est fixé au fond de la microplaque. Le dosage est réalisé par la liaison d'un autre anticorps conjugué à une enzyme. Un substrat de cet enzyme est ajouté entraînant la survenue d'une réaction colorimétrique. Suite à cette réaction colorimétrique, une mesure d'absorbance est effectuée avec un lecteur Safire.

2.4.2. Préparation des échantillons

Les cellules sontensemencées et incubées avec les différents produits dans des microplaques 96 puits. Après la période d'incubation voulue, les microplaques sont centrifugées pour culoter les débris pouvant interférer avec les dosages par méthode immuno-enzymatique. Les surnageants cellulaires sont prélevés et conservés à -20°C jusqu'à la réalisation des dosages.

2.4.3. Dosage des cytokines pro-inflammatoires

Lors d'une réaction inflammatoire, les cytokines et chemokines pro-inflammatoires telles que IL-1 α , IL-6, IL-8 et MIF sont libérées par les cellules. Ces différentes cytokines sont dosées dans les surnageants cellulaires selon les protocoles fournis par le fabricant (R&DSystems).

2.4.4. Dosage des métalloprotéinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont impliquées dans le maintien et le remodelage de la matrice extracellulaire car elles ont pour fonction la dégradation des composants de cette matrice. La MMP-9 a été dosée, dans les surnageants cellulaires, selon le protocole fourni par le fabricant (R&DSystems).

2.4.5. Dosage du granzyme B

Le granzyme B est une sérine protéase impliquée dans les réponses à des toxiques, *via* l'apoptose ou dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Boivin et al., 2009; Hernandez-Pigeon et al., 2007). Le granzyme B a été dosé dans les surnageants cellulaires selon le protocole fourni par le fabricant (Abcam).

2.5. Cytométrie en flux

2.5.1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de caractériser individuellement, de façon qualitative et quantitative des cellules en suspension dans un liquide. Les paramètres tels que la taille de la cellule et sa forme peuvent être évalués, ainsi que tout autre paramètre pouvant être mesuré par un composé fluorescent, grâce au passage de la cellule devant un système d'illumination (laser) et de détection. Le cytomètre en flux utilisé dans notre étude est un Accuri™ C6 (BD).

2.5.2. Préparation des cellules

Les cellules HaCaT sontensemencées en plaques 6 puits à 45 000 cellules/mL pour l'évaluation du cycle cellulaire et à 130 000 cellules/mL pour l'évaluation de l'expression de la protéine cavéoline-1 ou de l'involucrine. Les plaques sont placées dans l'incubateur thermostaté à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% en CO₂ et 95% en humidité. Après 24 heures, les plaques sont vidées par retournement puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS afin d'éliminer les débris cellulaires et les reliquats de milieu de culture complémenté à 10% de SVF. Les produits sont incubés pendant la durée souhaitée à raison de 2 mL par puits.

2.5.3. Analyse du cycle cellulaire

Les plaques sont vidées par retournement et rincées avec du PBS. Les cellules sont décollées par la trypsine. Les culots cellulaires sont centrifugés et rincés avec du PBS. Les cellules sont perméabilisées par une solution de triton (Sigma-Aldrich) à 0,1% contenant 0,5 mg/mL de RNase (Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes dans la glace. Les cellules sont ensuite incubées avec une solution d'iodure de propidium à 0,5 µg/mL pendant 3 minutes dans la glace. Les cellules sont centrifugées permettant l'élimination du iodure de propidium en excès (non lié à l'ADN) puis les cellules sont remises en suspension dans du PBS et la fluorescence des cellules est mesurée par le cytomètre en flux (laser d'excitation à 488 nm).

2.5.4. Analyse de l'expression des protéines cavéoline-1 et involucrine

Les plaques sont vidées par retournement et rincées avec du PBS. Les cellules sont décollées par de la trypsine. Les cellules sont perméabilisées par une solution de triton à 0,1% pendant 5 minutes dans la glace. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire de chèvre dirigé contre la cavéoline-1 (Sigma-Aldrich) dilué au 1/200^{ème} ou avec l'anticorps primaire de souris dirigé contre l'involucrine (Sigma-Aldrich) dilué au 1/200^{ème} dans du PBS supplémenté en BSA à 0,5% (Sigma-Aldrich) pendant 30 minutes dans la glace. Les cellules sont rincées par une solution de PBS supplémenté en BSA à 0,5% puis incubées avec l'anticorps secondaire fluorescent dirigé contre l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été produit (Alexa Fluor®488,

ThermoFisher Scientific) dilué au 1/2000^{ème} pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont centrifugées et rincées avec du PBS supplémenté en BSA à 0,5% permettant l'élimination de l'anticorps secondaire en excès. Enfin, les cellules sont remises en suspension dans du PBS et la fluorescence des cellules est mesurée par le cytomètre en flux (laser d'excitation à 488 nm).

2.6. Microscopie optique

2.6.1. Principe de la microscopie optique

La microscopie optique est une technique permettant d'observer une image agrandie d'un objet grâce à un système de lentilles. Le microscope optique utilisé dans notre étude est un Leica DMIRB.

2.6.2. Etude de la prolifération des cellules

La prolifération cellulaire est étudiée par dénombrement quotidien pendant 3 jours. A J0, les cellules HacaT sontensemencées à 50 000 cellules/mL dans du milieu de culture contenant 10% de SVF dans une microplaque 48 puits. Les produits à tester sont incubés dans du milieu complétement à 10% en SVF. Chaque jour un puits par condition est dénombré par un hématimètre (cellule de Thoma). Pour cela les cellules sont décollées grâce à de la trypsine.

2.7. Microscopie holographique digitale

2.7.1. Principe de la microscopie holographique digitale

La microscopie holographique est une technique basée sur les propriétés de déformation des ondes lumineuses lorsqu'elles rencontrent une cellule. En effet, le faisceau laser est divisé en deux. Le premier faisceau est dirigé sur l'échantillon tandis que le second appelé faisceau de référence n'entre pas en contact avec l'échantillon. Les deux faisceaux se rejoignent permettant de créer l'hologramme. Cette technique permet notamment l'observation et l'analyse de la morphologie des cellules sans avoir recours à la fixation des cellules ni à l'utilisation de marqueurs. Le microscope holographique

digital utilisé dans notre étude est un HoloMonitor M3 (Phase Holographic Imaging PHI AB).

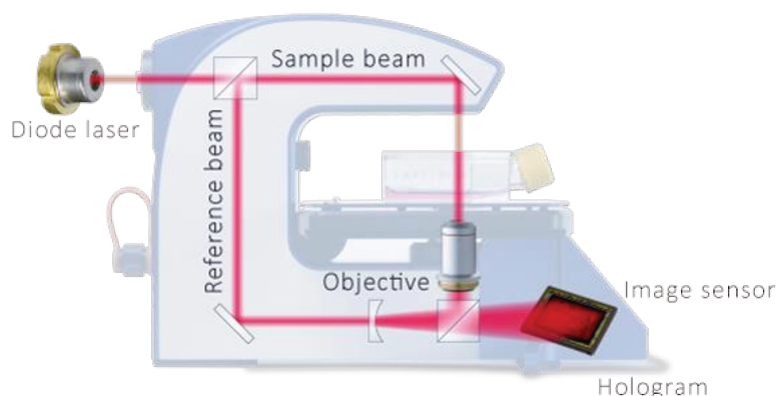


Figure 23 : Schéma d'un microscope holographique digital (PHI AB)

2.7.2. Préparation des échantillons

Les cellules HaCaT sontensemencées en plaques 6 puits. Après 24 heures, les plaques sont vidées par retournement et rincées avec du PBS. Les produits à tester sont incubés pendant la durée souhaitée. Les plaques sont alors observées en microscopie holographique digitale. Le logiciel HStudio (Phase Holographic Imaging PHI AB) permet l'analyse des observations.

Nous avons par ailleurs utilisé la technique de microscopie holographique digitale dans l'article « Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line » publié dans International Journal of Pharmaceutics (Annexe B) pour valider la cytotoxicité de formulations hydrogel à visée thérapeutique.

2.8. Microscopie confocale

2.8.1. Principe de la microscopie confocale

La microscopie confocale permet l'étude de marqueurs situés à l'intérieur d'un tissu ou d'une cellule en éliminant les signaux de fluorescence provenant de l'extérieur du plan focal choisi, responsables du bruit de fond observé en microscopie à

épifluorescence. En effet, la microscopie confocale consiste à détecter un signal sur une coupe optique (ou plan focal). Pour cela, un fluorochrome est excité avec un laser, ce marqueur fluorescent émet alors un signal lumineux. Grâce à un diaphragme situé devant le photomultiplicateur, seule la lumière provenant du plan focal est sélectionnée avant amplification par le photomultiplicateur et numérisation. Plusieurs plans focaux peuvent être analysés en se déplaçant dans l'épaisseur de l'objet selon l'axe z. La zone illuminée par le laser étant très petite, un système de deux miroirs galvanométriques permet le balayage du faisceau laser selon les coordonnées x et y. L'image peut ainsi être construite point par point.

2.8.2. Préparation des échantillons pour analyse par microscopie confocale

Les cellules HaCaT sontensemencées à 80 000 cellules/mL dans les chambres de culture Lab-Tek™ I (8 compartiments, Nunc) à raison de 200 µL par compartiment. Les chambres de culture Lab-Tek™ permettent l'adhésion des cellules et leur incubation avec différents produits dans des compartiments fixés sur une lame traitée pour culture cellulaire. La chambre, contenant les compartiments, peut ensuite être séparée de la lame afin de réaliser une analyse microscopique.

Après ensemencement des cellules, les Lab-Tek™ sont placées dans l'incubateur thermostaté à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% en CO₂ et 95% en humidité. Après 24 heures, les Lab-Tek™ sont vidées par retournement puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS afin d'éliminer les débris cellulaires et les reliquats de milieu de culture complémenté à 10% de SVF. Les produits sont incubés pendant la durée souhaitée. Après cette incubation, les marquages immunofluorescents sont effectués.

2.8.3. Observation du cytosquelette

Les produits à tester sont éliminés par retournement de la Lab-Tek™, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich) à 2% pendant 20 minutes à température ambiante. Après 2 rinçages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées avec du triton à 0,2% pendant 5 minutes à température ambiante. Après 2 rinçages avec du PBS supplémenté

en BSA à 0,5%, les cellules sont incubées avec 200 UI/mL de phalloïdine marquée à l'Alexa Fluor®488 (ThermoFisher Scientific) pendant 30 minutes à température ambiante. La phalloïdine possède une affinité importante pour les filaments d'actine. Après 2 rinçages avec du PBS supplémenté en BSA à 0,5%, un marquage des noyaux est effectué avec une solution de TO-PRO-3 (ThermoFisher Scientific) dilué au 1/500^{ème} dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante. La chambre comportant les compartiments de la Lab-Tek™ est retirée après 2 rinçages au PBS. Le montage est réalisé avec une lamelle reposant sur du Vectashield™ (Vector Laboratories). La lamelle est fixée à la lame par du vernis à ongles. Les cellules sont alors observées en microscopie confocale.

2.8.4. Evaluation de l'expression de la cavéoline-1, de P2X7 et de l'involucrine

Les produits à tester sont éliminés par retournement de la Lab-Tek™, puis les cellules sont rincées avec du tampon PBS. Les cellules sont ensuite fixées par du paraformaldéhyde à 2% pendant 20 minutes à température ambiante. Après 2 rinçages avec du PBS, les cellules sont perméabilisées avec du triton à 0,2% pendant 5 minutes à température ambiante. Après 2 rinçages avec du PBS, les cellules sont incubées avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué dans une solution de PBS+BSA à 1% pendant 1 heure à température ambiante : anticorps de chèvre dirigé contre la cavéoline-1 (Sigma-Aldrich) dilué au 1/100^{ème}, anticorps de souris dirigé contre l'involucrine (Sigma-Aldrich) dilué au 1/100^{ème}, anticorps de lapin dirigé contre P2X7 (Santa-Cruz) dilué au 1/50^{ème}. Après 3 rinçages avec du PBS, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire fluorescent dirigé contre l'espèce chez laquelle l'anticorps primaire a été produit, dilué au 1/125^{ème} dans une solution de PBS+BSA 1% pendant 1 heure à température ambiante (Alexa Fluor®488, LifeTechnologies). 4 rinçages au PBS sont effectués afin d'éliminer la fixation non spécifique des anticorps. Un marquage des noyaux est effectué avec une solution de TO-PRO-3 dilué au 1/500^{ème} dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante. La chambre comportant les compartiments de la Lab-Tek™ est retirée après 2 rinçages au PBS. Le montage est réalisé avec une lamelle reposant sur du Vectashield™. La lamelle est fixée à la lame par du vernis à ongles. Les cellules sont alors observées en microscopie confocale.

2.8.5. Evaluation des radeaux lipidiques

Les cellules sont rincées avec du tampon PBS après élimination des produits à tester par retournement de la Lab-Tek™. L'étude des radeaux lipidiques est réalisée avec le kit Vybrant® Lipid Raft Labeling (Thermo Fisher Scientific). Les cellules sont incubées avec une solution à 1 µg/mL de la sous-unité B de la toxine cholérique conjuguée à un fluorochrome (Alexa Fluor 488, dilution dans du milieu de culture complémenté à 10% en SVF) pendant 10 minutes à 4°C. Après 3 rinçages avec du PBS, les cellules sont incubées avec un anticorps anti-sous unité B de la toxine cholérique produit chez le lapin dilué 200 fois dans du milieu de culture complémenté à 10% en SVF pendant 15 minutes à 4°C. Les cellules sont rincées 4 fois avec du PBS, puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 2% pendant 20 minutes à température ambiante. Après 2 rinçages avec du PBS, les cellules sont ensuite perméabilisées avec du triton à 0,2% pendant 5 minutes à température ambiante. Après 2 rinçages avec du PBS, les noyaux sont marqués avec du TO-PRO-3 dilué au 1/500^{ème} pendant 10 minutes à température ambiante. Après 2 rinçages, la chambre comportant les compartiments est retirée, puis le montage de la lame est réalisé avec du Vectashield™. La lamelle est fixée à la lame avec du vernis à ongles.

2.9. Spectrométrie de masse

2.9.1. Principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique permettant la détermination, l'identification et la quantification de molécules d'intérêt *via* leur masse moléculaire. En effet, les molécules de l'échantillon sont ionisées, puis séparées selon leur rapport masse sur nombre de charges (m/z), avant d'être détectées. La spectrométrie de masse est fréquemment couplée à une chromatographie liquide, ce qui permet d'apporter des données supplémentaires pour l'identification des molécules grâce aux temps de rétention, mais aussi de faciliter leur détection et leur identification en purifiant et concentrant les molécules avant l'arrivée dans la source d'ions. Dans notre étude, nous avons utilisé une chromatographie liquide à ultra-haute performance (UPLC Ultra Performance Liquid Chromatography, Waters), qui permet une meilleure efficacité de la

séparation des molécules et une réduction du rapport signal sur bruit grâce à son système de haute pression.

2.9.2. Préparation des échantillons pour l'étude par UPLC-MS

Les cellules sontensemencées en flasques. Lorsqu'elles atteignent la sub-confluence, les cellules sont incubées avec les produits à l'essai ou irradiées. Les cellules sont par la suite décollées par ajout de trypsine-EDTA. Les cellules sont rincées deux fois avec du tampon PBS, puis remises en suspension dans 600 µL d'eau doublement distillée avant d'être soumises à des ultra-sons pendant 5 minutes à 4°C pour rompre les membranes cellulaires, ce qui permet d'améliorer la phase d'extraction.

2.9.3. Analyse lipidomique

La composition lipidique des kératinocytes est étudiée par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse à haute résolution (UPLC-HRMS). Les lipides des cellules sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer, 1959). Les extraits lipidiques sont solubilisés dans une solution contenant acétonitrile/isopropanol/chloroforme/eau (35:35:20:10 v/v/v/v) et analysés par UPLC-HRMS sur un spectromètre de masse Synapt™ G2 HDMS™ (Waters MS Technologies). Les données obtenues ont été analysées de façon non supervisée avec une analyse en composante principale (ACP). L'annotation des lipides a été réalisée en utilisant les bases de données LIPID MAPS et METLIN avec une fenêtre de tolérance de 5 ppm pour la précision de masse. Les temps de rétention attendus et obtenus ont été comparés pour chaque lipide afin de confirmer l'annotation réalisée, une différence relative inférieure à 15% entre ces deux temps de rétention a été jugée acceptable.

2.9.4. Quantification des oxystérols

La quantification des stérols dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien ainsi que dans les kératinocytes humains issus de donneurs ou de la lignée HaCaT a été réalisée selon la méthode développée par Ayciriex *et al.* (Ayciriex et al., 2012) utilisant une chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à un spectromètre de

masse à haute résolution (UPLC-HRMS). L'extraction des stérols est réalisée par un mélange hexane/méthanol (7 :1, v/v) sous agitation pendant 40 minutes. Les stérols sont ensuite dérivatisés en carbamates grâce à une solution de 4-(diméthylamino)phényl isocyanate dans du dichlorométhane. Le dichlorométhane est évaporé sous une pression réduite et les oxystérols dérivatisés sont mis en suspension dans un mélange acétonitrile/isopropanol (1 :1, v/v). L'analyse par UPLC-HRMS est ensuite effectuée sur un spectromètre de masse Synapt™ G2 HDMS™ (Waters MS Technologies). Les taux d'oxystérols sont normalisés aux taux de protéines, évalués par la méthode BCA.

Nous avons réalisé les expériences d'analyse lipidomique et de quantification des oxystérols avec l'aide du Docteur Anne Régazzetti.

2.10. Analyses statistiques

Chaque test a été réalisé au moins trois fois indépendamment et les moyennes des résultats obtenus ont été calculées. Pour comparer deux échantillons entre eux, un test de Student est réalisé (logiciel GraphPad Prism 6.01). Pour comparer trois échantillons ou plus au témoin négatif, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur suivie d'un test Dunnett est réalisé, et pour comparer ces échantillons entre eux, un test de Tukey est préféré. Le risque α est fixé à 5%. Les seuils de significativité sont *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ et * $p < 0,05$ comparé au milieu de culture.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rôle des oxystérols et des purinorécepteurs P2X7 dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue Biochimie « P2X7-Pannexin-1 and amyloid β -induced oxysterol input in human retinal cell: role in age-related macular degeneration? », parue en août 2016 (DOI 10.1016/j.biochi.2016.04.014).

CONTEXTE

Le peptide β amyloïde est connu pour son implication dans les pathologies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer au niveau cérébral ou encore la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) au niveau rétinien. En effet, une accumulation de ce peptide est observée dans les plaques séniles ainsi que dans les drusen. Par ailleurs, des modifications des taux des dérivés oxydés du cholestérol, ou oxystérols, ont été relatées chez des patients atteints de ces maladies dégénératives.

OBJECTIFS

L'objectif de cette partie est d'explorer l'existence d'une relation entre le peptide β amyloïde et les oxystérols. Pour cela, nous avons étudié, dans un premier temps, les modifications qualitatives et quantitatives des oxystérols après incubation des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien avec le peptide β amyloïde. Dans un second temps, nous avons étudié les effets de certains de ces oxystérols sur le même modèle cellulaire de rétine, en nous focalisant plus particulièrement sur l'implication du récepteur de mort et de dégénérescence P2X7.

APPROCHE EXPERIMENTALE

Nous avons réalisé notre étude sur des cellules issues de la lignée ARPE-19, car ces cellules partagent les caractéristiques structurales et fonctionnelles des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine *in vivo* (Dunn et al., 1996).

1.1. Quantification des oxystérols après incubation avec du peptide amyloïde β

Nous avons choisi d'incuber les cellules avec du peptide β amyloïde car cette protéine est un constituant des drusen (Isas et al., 2010). De plus, lorsqu'elle sont sénescents comme lors de la DMLA (Kozłowski, 2012), les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien sécrètent l'isoforme 1-42 du peptide β amyloïde en excès (Glotin et al., 2008). Cette isoforme, peu soluble, forme principalement des agrégats (Selkoe, 2001). Après 48 heures d'incubation avec du peptide β amyloïde 1-42 agrégé, nous avons dosé le taux d'oxystérols dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS-HRMS) selon une méthode développée au laboratoire (Ayciriex et al., 2012).

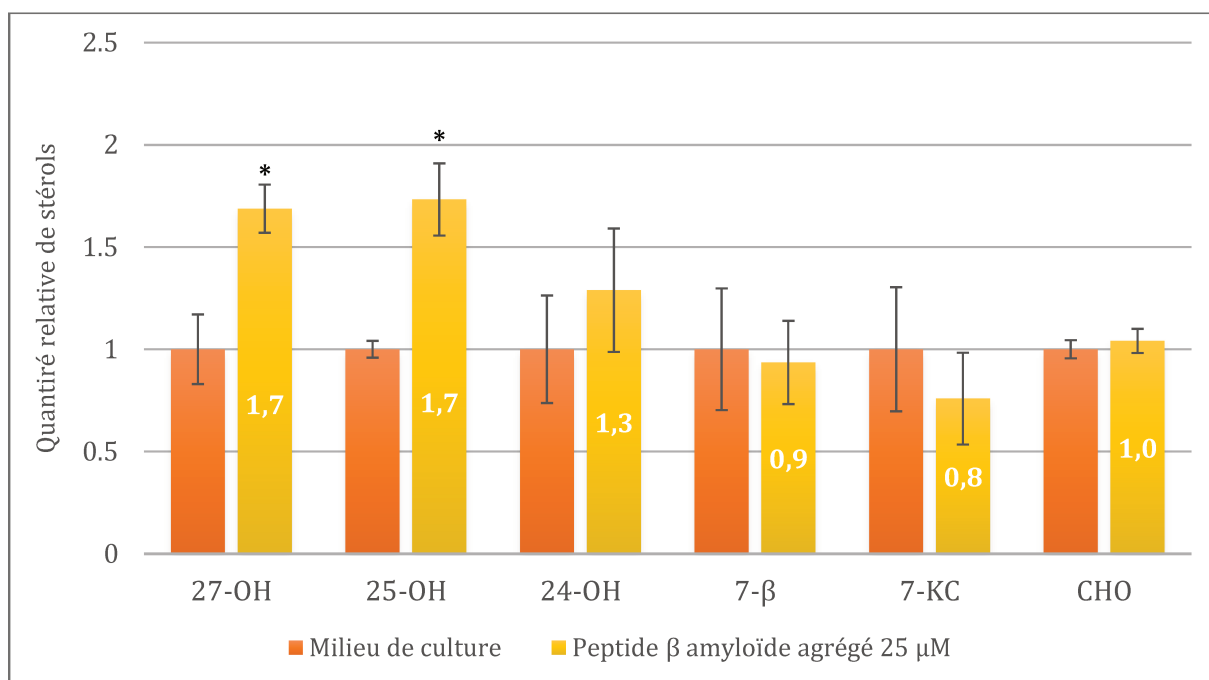


Figure 24 : Quantification des stérols par spectrométrie de masse dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien après incubation avec du peptide β amyloïde. Les cellules ARPE-19 sont incubées avec 25 μ M de peptide β amyloïde agrégé avant quantification des stérols (par UPLS-MS-HRMS). Le taux de chaque stérol dans les cellules contrôle est fixé arbitrairement à 1. (n=5), *p<0,05 comparé au milieu de culture
 27-OH: 27-hydroxycholestérol, 25-OH: 25-hydroxycholestérol, 24-OH: 24-hydroxycholestérol, 7- β : 7- β hydroxycholestérol, 7-KC: 7-kétocholestérol, CHO: cholestérol.

Après 48 heures d'incubation avec 25 μ M de peptide β amyloïde agrégé, les taux de stérols sont modifiés dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. En effet, une augmentation significative des taux de 27-hydroxycholestérol (27-OH, x1,7 comparé au milieu de culture) et de 25-hydroxycholestérol (25-OH, x1,7 comparé au milieu de culture) a été observée. Le peptide β amyloïde agrégé induit également une légère augmentation (x1,3 comparé au milieu de culture), statistiquement non significative, du taux de 24-hydroxycholestérol (24-OH). Le taux de 7- β hydroxycholestérol (7- β) demeure inchangé comme le taux de cholestérol. En revanche, le taux de 7-kétocholestérol (7-KC) est légèrement diminué (statistiquement non significatif).

Nous avons poursuivi nos recherches en incubant les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien avec des oxystérols, afin d'étudier plus en détail les effets des oxystérols sur ces cellules.

1.2. Evaluation des effets des oxystérols sur la lignée cellulaire de l'épithélium pigmentaire rétinien ARPE-19

Nous avons sélectionné les deux oxystérols dont le taux était le plus modifié après incubation des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien avec du peptide β amyloïde, soit le 27-OH et le 25-OH. De plus, le 7-KC ayant été retrouvé dans les drusen de patients atteints de DMLA, nous avons également étudié les effets de cet oxystérol.

1.2.1. Evaluation de la cytotoxicité des oxystérols

Nous avons au préalable étudié la cytotoxicité du 27-OH, du 25-OH et du 7-KC après 48 heures d'incubation. La nécrose cellulaire a été mesurée par la libération de la lactate déshydrogénase (LDH).

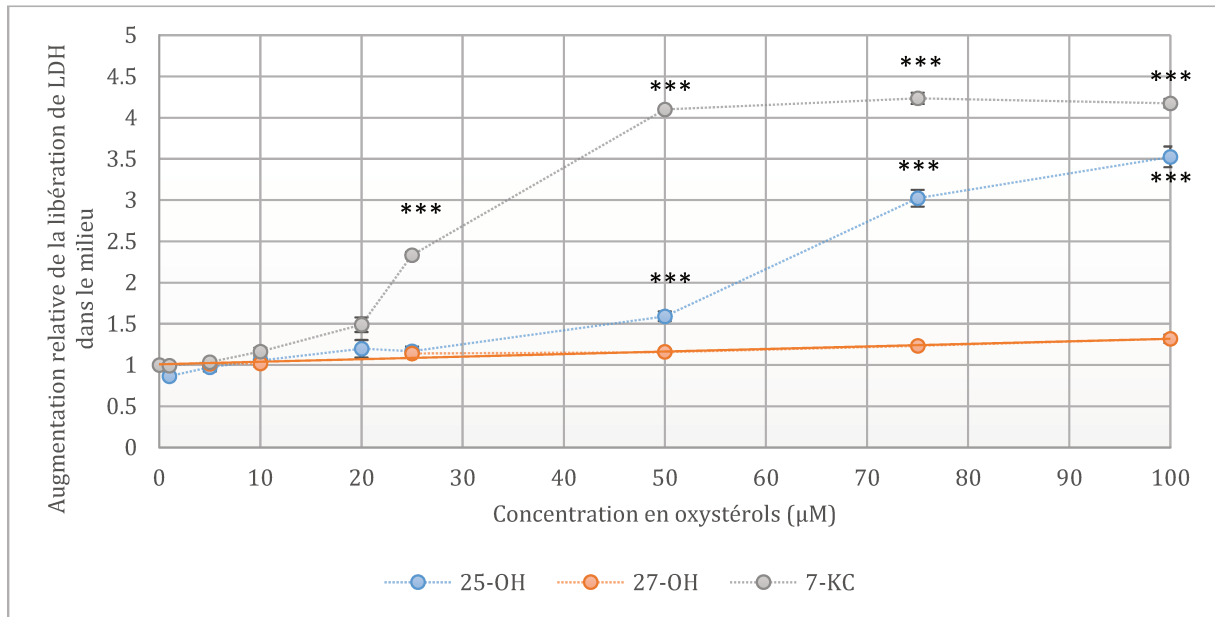


Figure 25 : Cytotoxicité des oxystérols sur les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Evaluation de la nécrose cellulaire par la libération de la LDH après 48 heures d'incubation avec différents oxystérols (n=5), *** p<0,001 comparé au milieu de culture.

Les trois oxystérols testés ont des profils de cytotoxicité différents. Le 7-KC apparaît comme étant fortement nécrotique dès 25 µM tandis que le 25-OH ne devient fortement nécrotique qu'au-delà de 50 µM. Jusqu'à 100 µM, le 27-OH est faiblement voire non cytotoxique.

Ces résultats ont été confirmés par une observation microscopique des cellules.

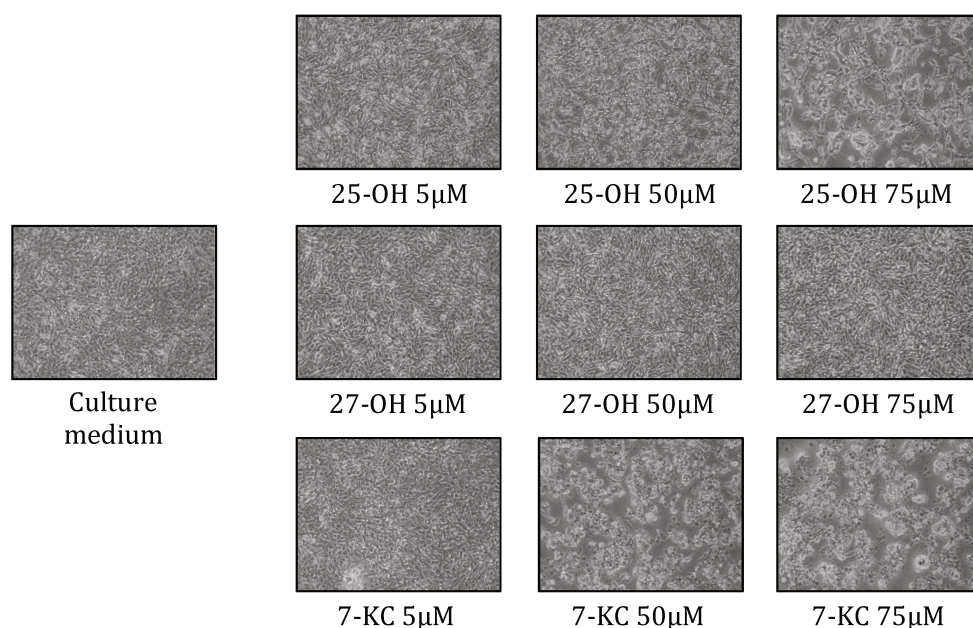


Figure 26 : Observations microscopiques représentatives (x100) des cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 27-OH, le 25-OH ou le 7-KC à différentes concentrations.

La morphologie et la densité cellulaires n'apparaissent pas modifiées après 48 heures d'incubation avec le 27-OH. En revanche, le tapis cellulaire est altéré dès 50 μ M de 7-KC et 75 μ M de 25-OH. Les cellules sont réfringentes et rondes après 48 heures d'incubation avec le 7-KC à 50 μ M et réfringentes et étirées après 48 heures d'incubation avec le 25-OH 75 μ M.

L'étude de la cytotoxicité des oxystérols nous a permis de définir des concentrations pour la suite de nos travaux. Nous avons donc poursuivi notre étude avec le 25-OH et le 7-KC à des concentrations subcytotoxiques, soit inférieures ou égales à 20 μ M.

1.2.2. Quantification de l'assimilation du 7-KC et du 25-OH dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien

Nous avons étudié l'assimilation du 7-KC et du 25-OH par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien lors d'un apport exogène. Pour cela nous avons dosé par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de

masse (UPLC-MS-HRMS) le 7-KC et le 25-OH dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH à une concentration faible de notre étude (5 μ M) ainsi qu'à la plus forte concentration de notre étude (20 μ M).

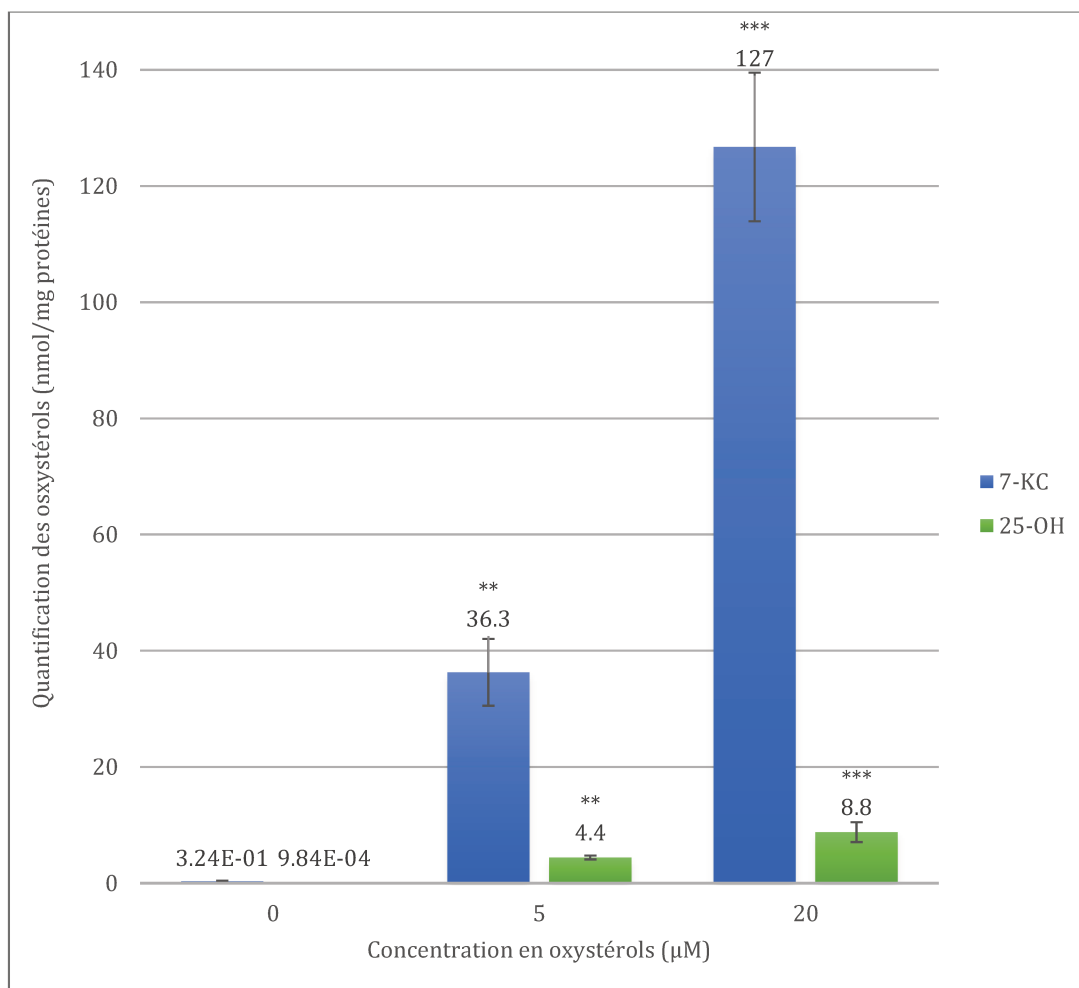


Figure 27 : Dosage du 7-KC et du 25-OH dans les cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec ces oxystérols à 5 et 20 μ M (n=3), **p<0,01 et ***p<0,001 comparé au milieu de culture.

Après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH, une augmentation concentration-dépendante statistiquement significative du taux de ces oxystérols est observée dans les cellules. Ces augmentations indiquent une assimilation des oxystérols par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

1.2.3. Evaluation du stress oxydant induit par les oxystérols

Après nous être assurée que les oxystérols apportés par voie exogène étaient assimilés par les cellules ARPE-19, nous avons étudié l'effet des deux oxystérols 7-KC et 25-OH sur le stress oxydant. En effet, les oxystérols étant des produits de l'oxydation du cholestérol, et le stress oxydant jouant un rôle dans la pathogenèse de la DMLA, il nous a paru pertinent de nous focaliser sur les dommages oxydatifs que peuvent entraîner le 7-KC et le 25-OH au niveau de la rétine. Nous avons en premier lieu mesuré le taux des espèces réactives de l'oxygène.

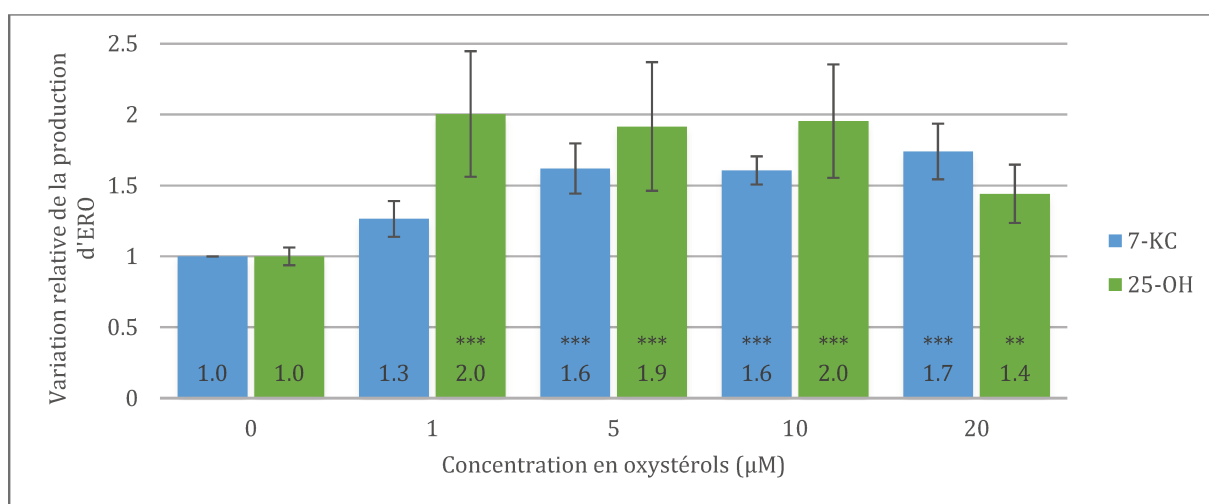


Figure 28 : Evaluation de la production des espèces réactives de l'oxygène après 48 heures d'incubation avec du 7-KC ou du 25-OH sur des cellules ARPE-19 (n=3), **p<0,01 et ***p<0,001 comparé au milieu de culture.

Une augmentation statistiquement significative des espèces réactives de l'oxygène a été observée après incubation avec le 7-KC ou le 25-OH. Cette augmentation des espèces réactives de l'oxygène n'est pas concentration-dépendante.

Le cholestérol cellulaire et ses dérivés oxydés étant membranaires, nous avons ensuite évalué l'effet des deux oxystérols sur la peroxydation lipidique.

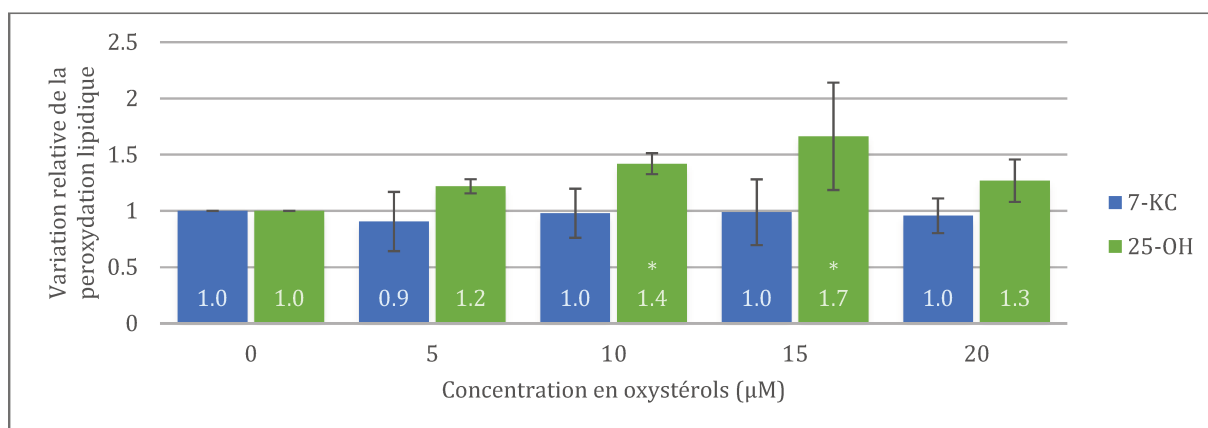


Figure 29 : Evaluation de la peroxydation lipidique après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH sur des cellules ARPE-19 (n=3), *p<0,05 comparé au milieu de culture.

Aucune modification de la peroxydation lipidique n'est observée après incubation avec le 7-KC. Une augmentation statistiquement significative de la peroxydation lipidique est observée après incubation avec le 25-OH à 10   M et 15   M.

Une augmentation du stress oxydant impliquant différentes voies telles que les espèces réactives de l'oxygène, ou encore la peroxydation lipidique a été observée. Le stress oxydant pouvant être associé à des altérations mitochondriales, nous nous sommes ensuite focalisée sur l'étude de la mitochondrie.

1.2.4. Evaluation de l'effet des oxystérols sur l'activité mitochondriale

La mitochondrie est une source majeure d'espèces réactives de l'oxygène, notamment *via* la chaîne respiratoire mitochondriale. Nous nous sommes intéressée à la mitochondrie et plus particulièrement à la succinate déshydrogénase qui fait partie du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Résultats et Discussion

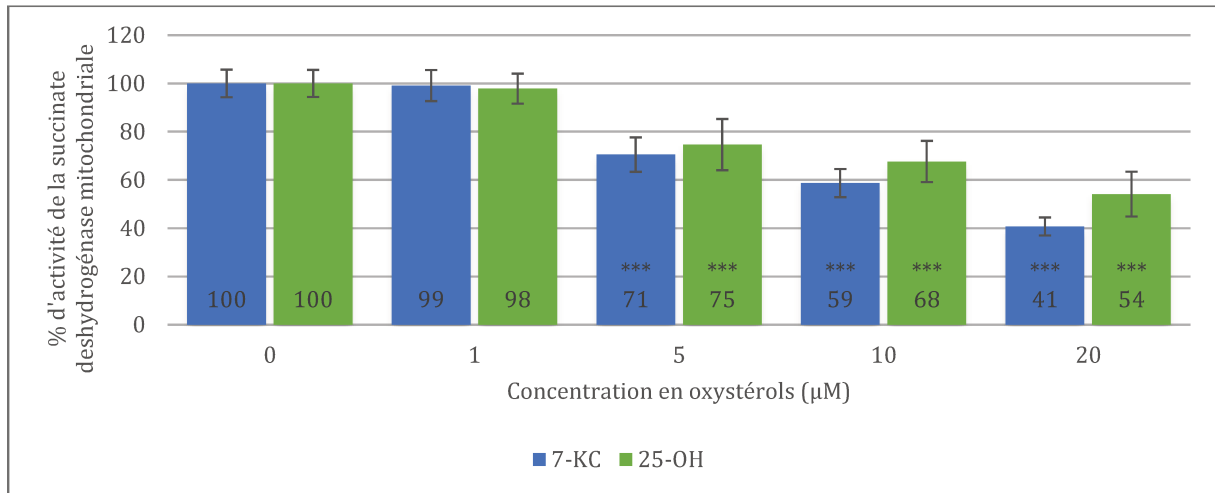


Figure 30 : Evaluation de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale (n=4), ***p<0,001 comparé au milieu de culture.

Une diminution statistiquement significative et concentration-dépendante de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale a été observée après incubation avec le 7-KC ou le 25-OH.

Nous avons ensuite étudié le potentiel transmembranaire mitochondrial car la production d'ERO peut être dépendante de ce potentiel.

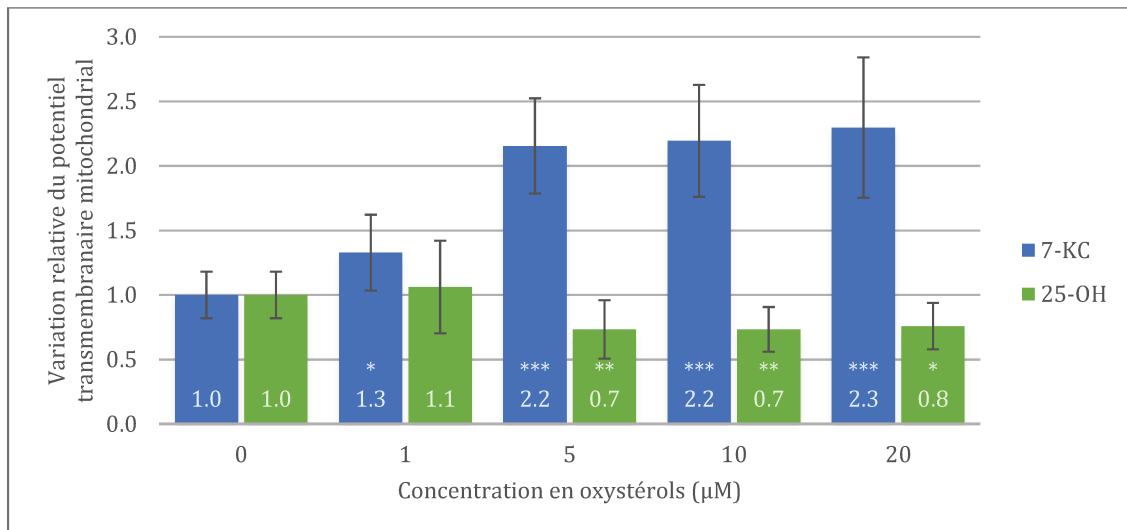


Figure 31 : Evaluation du potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec du 7-KC ou du 25-OH (n=3), *p<0,05 ; **p<0,01 et ***p<0,001 comparé au milieu de culture.

Le potentiel transmembranaire mitochondrial est légèrement diminué après 48 heures d'incubation avec le 25-OH à partir de 5 μM . En revanche, le potentiel transmembranaire mitochondrial est augmenté de façon statistiquement significative après 48 heures d'incubation avec le 7-KC. Cette augmentation n'est pas concentration-dépendante.

Suite aux résultats obtenus avec l'étude du potentiel transmembranaire mitochondrial, nous avons évalué la masse mitochondriale, un marqueur de la fonction mitochondriale.

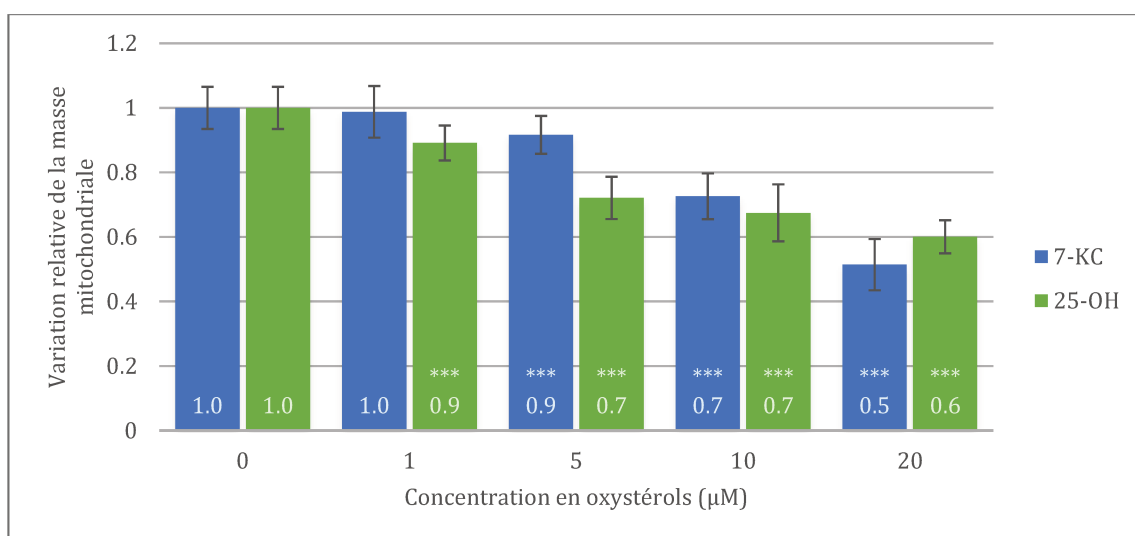


Figure 32 : Evaluation de la masse mitochondriale des cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC et le 25-OH (n=4), ***p < 0,001 comparé au milieu de culture.

La masse mitochondriale diminue après 48 heures d'incubation avec les deux oxystérols étudiés. Cette diminution est statistiquement significative et concentration-dépendante.

Nous avons observé des altérations des fonctions mitochondriales avec les deux oxystérols. La principale fonction de la mitochondrie étant la synthèse d'ATP pour fournir de l'énergie aux tissus, nous avons étudié la production d'ATP.

1.2.5. Dosage de l'ATP intracellulaire et extracellulaire

Dans un premier temps, nous avons évalué le taux d'ATP intracellulaire.

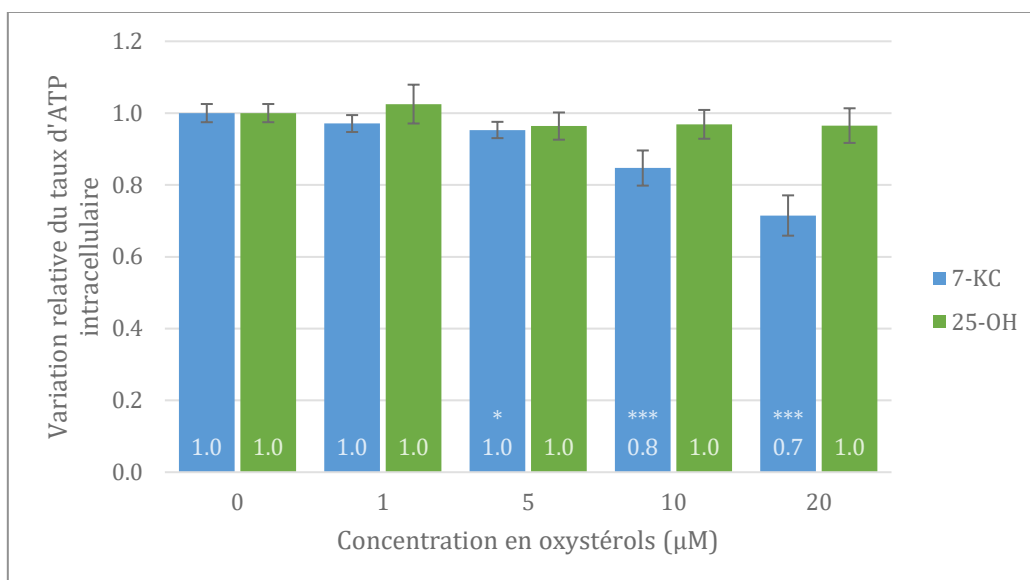


Figure 33 : Dosage de l'ATP intracellulaire dans les cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC et le 25-OH (n=5), *p < 0,05 et ***p < 0,001 comparé au milieu de culture.

La quantité d'ATP intracellulaire reste constante après incubation avec le 25-OH. En revanche, après incubation avec le 7-KC, une diminution statistiquement significative et concentration-dépendante du taux d'ATP intracellulaire est observée. Cette diminution semble corrélée aux altérations mitochondriales observées après incubation avec le 7-KC.

Dans un second temps, nous avons quantifié l'ATP extracellulaire.

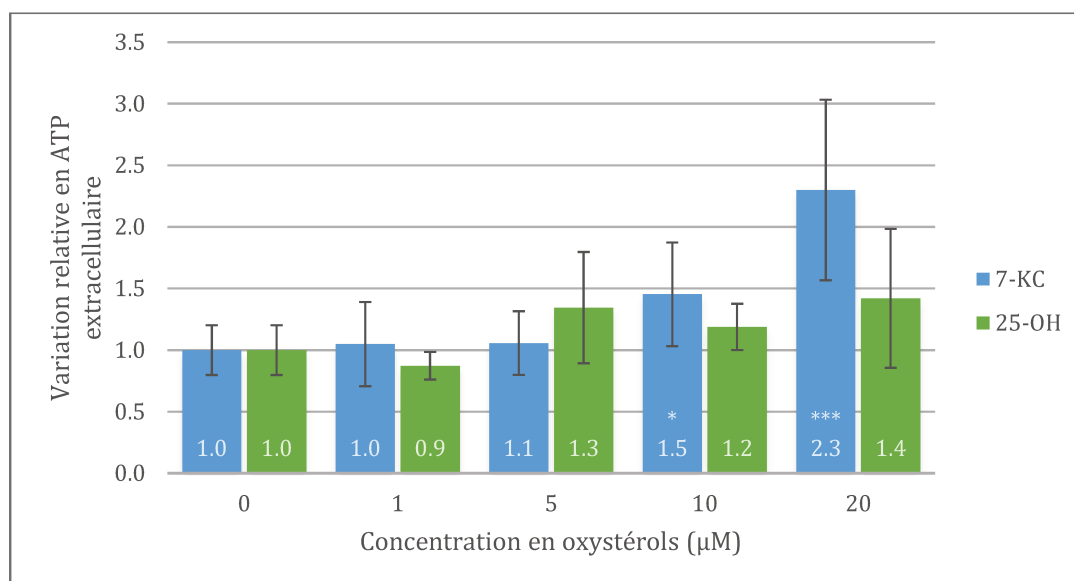


Figure 34 : Dosage de l'ATP extracellulaire dans les cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC et le 25-OH (n=4), *p < 0,05 et ***p < 0,001 comparé au milieu de culture.

La quantité d'ATP extracellulaire est légèrement augmentée après incubation avec le 25-OH même si cette augmentation n'est pas statistiquement significative. En revanche, la quantité d'ATP extracellulaire est augmentée de façon concentrations-dépendante et statistiquement significative à partir de 10 μM de 7-KC.

L'ATP est le ligand naturel des purinorécepteurs de dégénérescence P2X7. Nous nous avons donc ensuite étudié l'activité de ce récepteur après incubation avec le 25-OH et le 7-KC.

1.2.6. Activation du récepteur P2X7

Nous avons étudié l'activation du récepteur purinorécepteur P2X7 par la mesure de l'ouverture du pore membranaire.

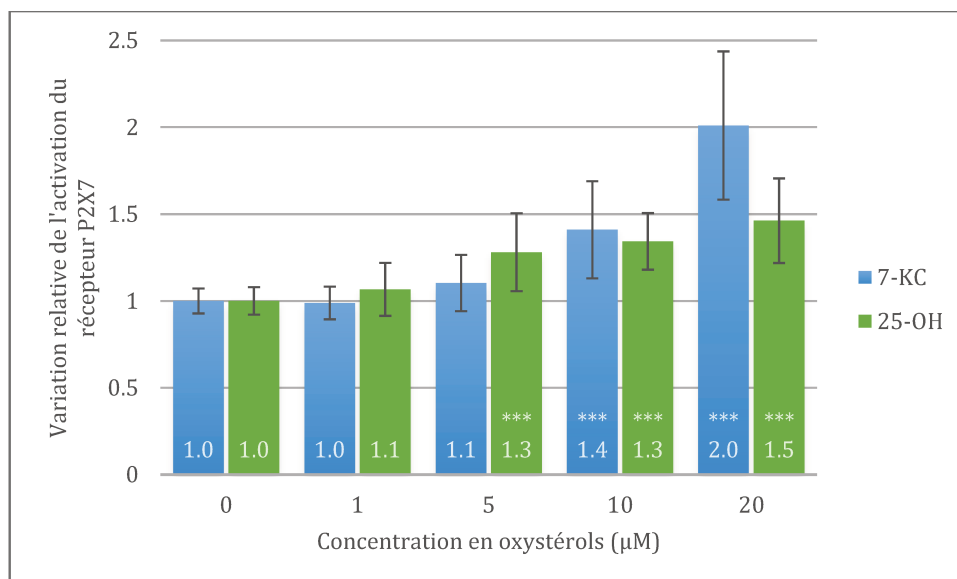


Figure 35 : Evaluation de l'activation du récepteur P2X7 dans les cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH (n=9), ***p<0,001 comparé au milieu de culture.

Après incubation avec le 7-KC, une activation concentration-dépendante et statistiquement significative des récepteurs P2X7 est observée à partir de 10 μM. Après incubation avec le 25-OH, une activation statistiquement significative non concentration-dépendante est observée à partir de 5 μM.

La formation du pore P2X7 pouvant impliquer l'activation du canal pannexine-1, nous avons évalué l'activation de ce canal après incubation des cellules ARPE-19 avec le 7-KC et le 25-OH.

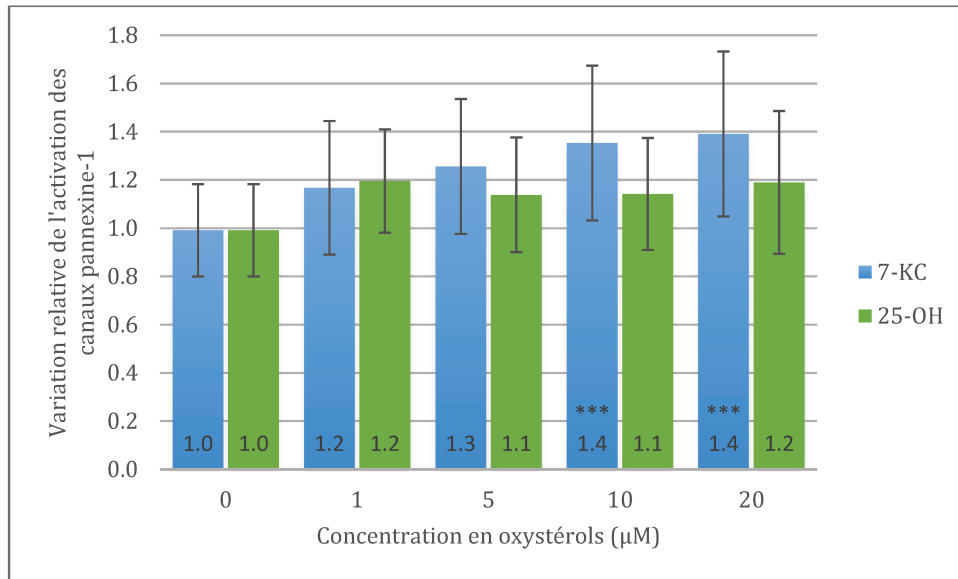


Figure 36 : Evaluation de l'activation des canaux pannexine-1 sur les cellules ARPE-19 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH (n=7), ***p<0,001 comparé au milieu de culture.

Après 48 heures d'incubation avec le 25-OH, aucune activation du canal pannexine-1 n'est observée. Après 48 heures d'incubation avec le 7-KC, une activation concentration-dépendante statistiquement significative est observée. Le 7-KC active donc les récepteurs P2X7 ainsi que le canal pannexine-1.

Nous avons alors observé l'effet d'un inhibiteur de pannexine-1, le probénécide sur l'activation des canaux pannexine-1 par le 7-KC.

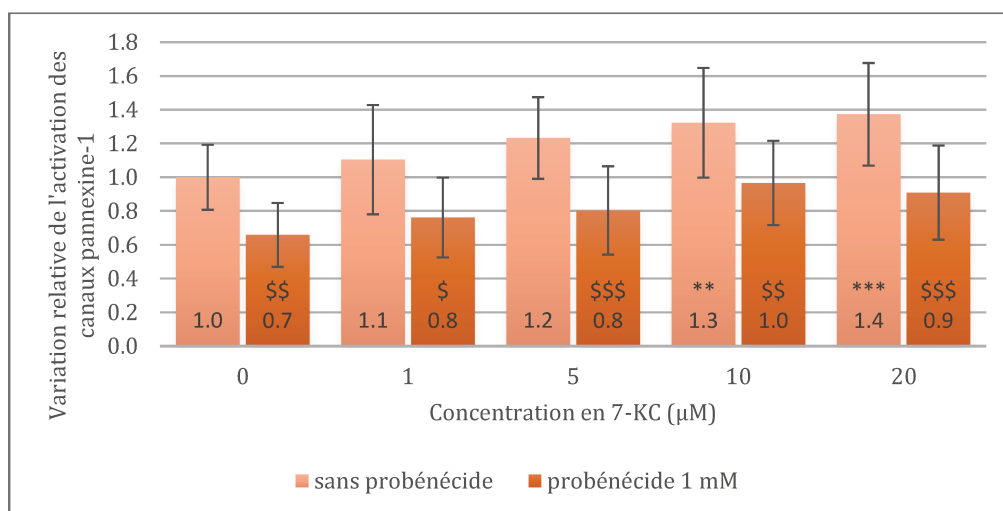


Figure 37 : Evaluation de l'effet de la co-incubation du probénécide avec du 7-KC pendant 48 heures sur l'activation des canaux pannexine-1 sur des cellules ARPE-19. (n=5) **p<0,01 et ***p<0,001 comparé au témoin négatif et \$p<0,05 ; \$\$p<0,01 et \$\$\$p<0,001 comparé à la même concentration en 7-KC sans probénécide

Une diminution significative de l'activation des canaux pannexine-1 est observée lors de la co-incubation avec le probénécide et 7-KC notamment pour les concentrations de 10 et 20 μM.

1.2.7. Modulation du récepteur P2X7

Afin d'étudier le rôle du récepteur P2X7 dans les effets négatifs du 25-OH et du 7-KC, nous avons étudié les effets de deux modulateurs, un inhibiteur du récepteur P2X7, le Brilliant Blue G (BBG), et un inhibiteur du canal pannexine-1, le probénécide, sur les marqueurs étudiés précédemment.

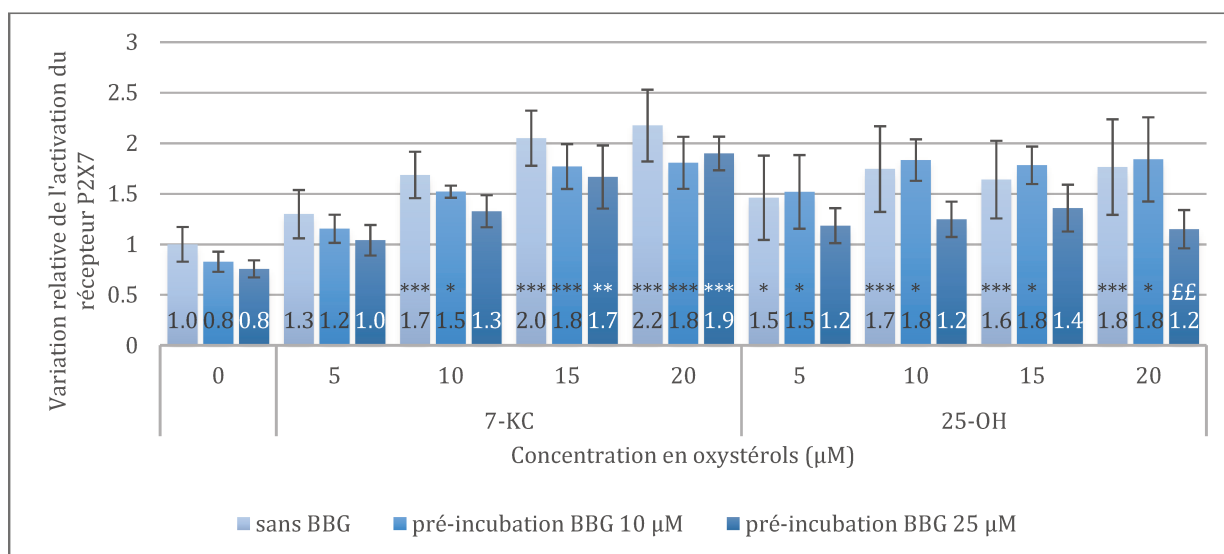


Figure 38 : Effets du BBG en préincubation sur l'activation du récepteur P2X7 induite par le 7-KC ou le 25-OH après 48 heures sur cellules ARPE-19 (n=3), *p<0,05 et ***p<0,001 comparé au milieu de culture et £p<0,05 et £££p<0,001 comparé à la même concentration en oxystérols sans BBG.

La préincubation des cellules avec le BBG n'a aucun effet statistiquement significatif sur l'activation du récepteur P2X7, excepté pour le 25-OH 20 μM, partiellement inhibé par le BBG 25 μM. Cependant, une tendance à la diminution de l'activation des récepteurs P2X7 est observée, que ce soit avec le 7-KC ou avec le 25-OH.

Le BBG n'ayant pas montré d'effet inhibiteur probant statistiquement, nous avons donc testé par la suite un inhibiteur du canal pannexine-1 : le probénécide.

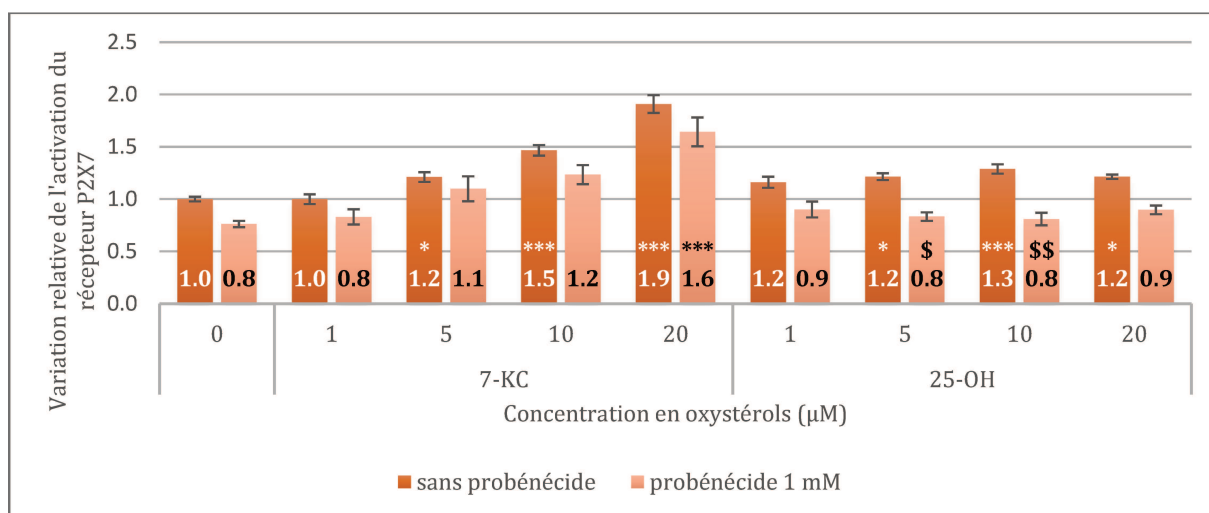
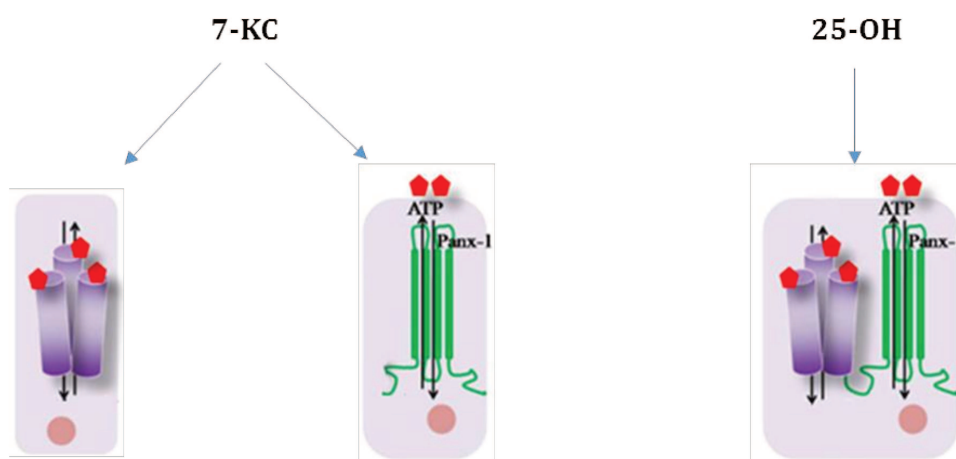


Figure 39 : Effets du probénécide en co-incubation sur l'activation du récepteur P2X7 induite par le 7-KC ou le 25-OH après 48 heures sur cellules ARPE-19 (n=3), *p<0,05 et ***p<0,001 comparé au milieu de culture et \$p<0,05 et \$\$p<0,01 comparé à la même concentration en oxystérols sans probénécide.

Le probénécide n'a aucun effet significatif sur l'activation du récepteur P2X7 induite par le 7-KC. En revanche, le probénécide inhibe significativement l'activation du récepteur P2X7 induite par le 25-OH 5 et 10 μM. L'activation du récepteur P2X7 par le 7-KC semble donc indépendante de l'activation de la pannexine-1, à l'inverse de l'activation induite par le 25-OH qui semble impliquer la pannexine-1 :



Afin de mieux comprendre l'implication du récepteur P2X7 et de la pannexine-1 dans le stress oxydant généré par le 7-KC et le 25-OH, nous avons ensuite étudié l'effet du probénécide sur la production d'ERO induite par ces deux oxystérols.

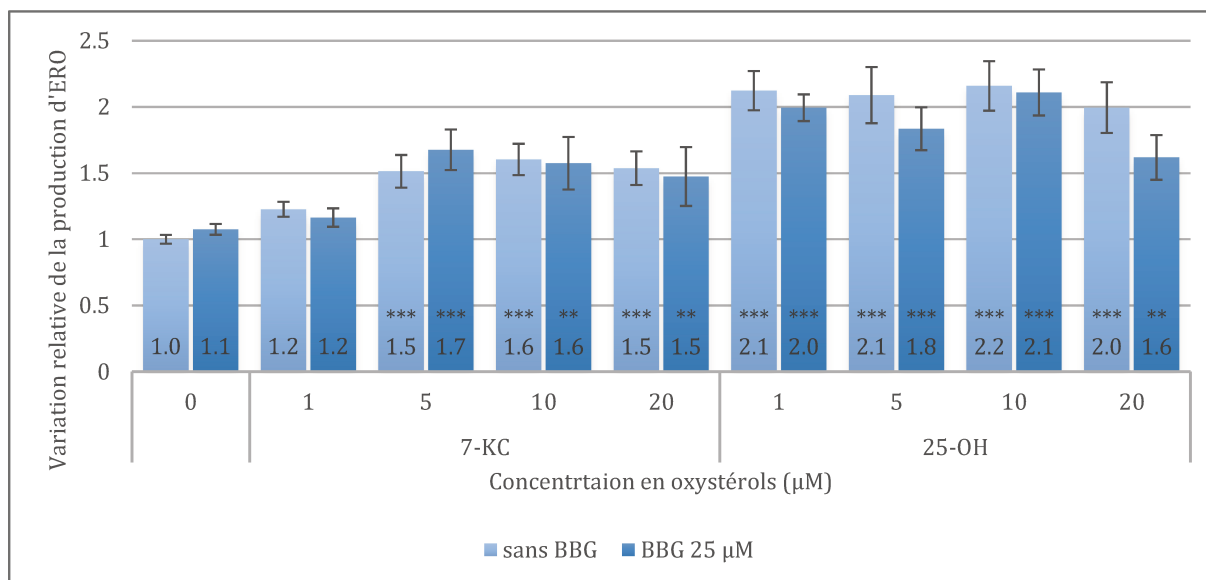


Figure 40 : Effets du BBG en préincubation sur la production d'ERO induite par le 7-KC ou le 25-OH après 48 heures sur cellules ARPE-19 (n=3), **p<0,01 et ***p<0,001 comparé au milieu de culture

Le BBG n'a aucun effet sur la production d'ERO induite par le 7-KC quelle que soit la concentration. Il semble induire une légère diminution de la production d'ERO induite par le 25-OH, en particulier à 20 μM ; cependant, cette diminution n'est pas statistiquement significative.

Nous avons donc ensuite étudié l'effet du probénécide sur la production d'ERO induite par le 7-KC et le 25-OH.

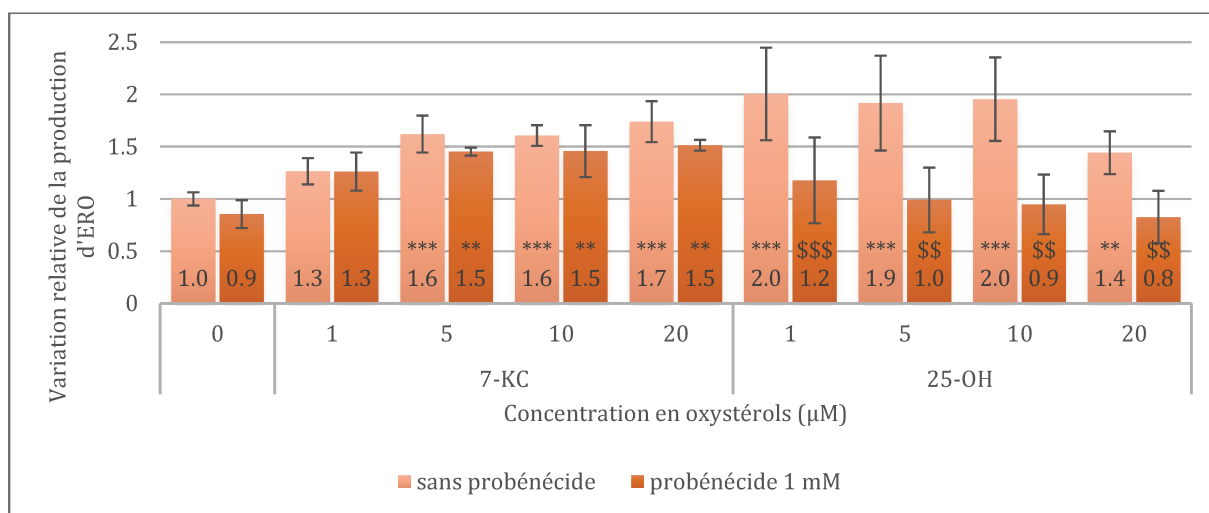


Figure 41 : Effets du probénécide en co-incubation sur la production d'ERO induite par le 7-KC ou le 25-OH après 48 heures sur cellules ARPE-19 (n=4), **p<0,01 et ***p<0,001 comparé au milieu de culture et \$\$\$p<0,001 et \$\$\$p<0,001 comparé à la même concentration en oxystérols sans probénécide.

Le probénécide n'a aucun effet sur la production d'ERO induite par le 7-KC, quelle que soit la concentration, tandis que le probénécide inhibe totalement la production d'ERO induite par le 25-OH.

1.3. Discussion

Le peptide β amyloïde est reconnu, particulièrement l'isoforme 1-42, comme un acteur clé du développement de plusieurs maladies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou encore la DMLA (Gupta et al., 2016; Jarrett et al., 1993; Johnson et al., 2002; Selkoe, 2001). Dans notre étude, nous avons incubé des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien avec le peptide β amyloïde 1-42 pour modéliser *in vitro* la DMLA. Nous avons choisi les cellules de la lignée ARPE-19 qui partagent avec les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien *in vivo* des propriétés structurales et fonctionnelles (Dunn et al., 1996).

Les oxystérols sont, comme le peptide β amyloïde, associés au développement de multiples pathologies dégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer et la DMLA (Björkhem et al., 2013; Leoni and Caccia, 2011; Rodríguez and Larrayoz, 2010; Zarrouk

et al., 2014). Il a été préalablement montré par Dasari *et al.* que l'oxystérol 27-OH conduisait à la formation de peptide β amyloïde dans des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (Dasari et al., 2010). En revanche, à ce jour, aucune donnée n'est disponible sur une éventuelle formation d'oxystérols induite par le peptide β amyloïde. Nos travaux montrent que, dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, la présence de peptide β amyloïde conduit à la formation d'oxystérols principalement de type hydroxylés tels que le 27-OH ou le 25-OH. Ainsi, ces données viennent compléter les données de Dasari *et al.* : le peptide β amyloïde entraîne la formation d'oxystérols et les oxystérols stimulent la production de peptide β amyloïde. La relation entre le peptide β amyloïde et les oxystérols forme une boucle d'amplification pouvant être source de processus dégénératifs chroniques. Il est important de préciser que nous n'avons pas observé d'augmentation du 7-KC après incubation des cellules de rétine avec le peptide β amyloïde ; or, le 7-KC a été détecté dans les drusen de patients atteints de DMLA (Rodriguez et al., 2014; Rodríguez and Larrayoz, 2010). L'absence de 7-KC lors de la quantification des stérols que nous avons réalisée pourrait être expliquée par sa localisation extracellulaire, au sein des drusen et non dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

Après avoir conclu qu'une relation de réciprocité existait entre le peptide β amyloïde et les oxystérols, nous avons étudié les effets toxiques de ces oxystérols sur les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Nous nous sommes concentrée sur les deux oxystérols dont les taux étaient significativement augmentés après incubation avec le peptide β amyloïde, le 27-OH et le 25-OH, ainsi que sur le 7-KC présent dans les drusen de patients. Le 7-KC entraîne une toxicité sur l'épithélium pigmentaire rétinien dès 25 μ M, tandis que le 25-OH n'est nécrotique qu'au-delà de 50 μ M et que le 27-OH n'est pas cytotoxique jusqu'à 100 μ M. Ces résultats soulignent les différents profils de toxicité des oxystérols. Du fait de l'absence de cytotoxicité induite par le 27-OH, nous avons poursuivi notre étude avec le 25-OH et le 7-KC.

Les concentrations en oxystérols ont été sélectionnées suite à l'étude de leur cytotoxicité pour pouvoir identifier des concentrations subcytotoxiques. Ces concentrations, de l'ordre du micromolaire, peuvent sembler élevées mais il est important de préciser que nous avons modélisé des effets dégénératifs au long cours grâce à un modèle monocouche et unicellulaire soumis à un stress unique et ponctuel

(un seul oxystérol, une seule d'incubation) ; il n'est donc pas inhabituel en toxicologie cellulaire de maximiser les concentrations des produits à l'essai pour observer des effets *in vitro*. Par ailleurs, les concentrations que nous avons utilisées sont de l'ordre de celles des études préalablement publiées sur d'autres types cellulaires (Ichikawa et al., 2013; Joffre et al., 2007; Koarai et al., 2012; Lemaire-Ewing et al., 2009).

Pour nous assurer qu'ils étaient intégrés par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, nous avons quantifié les taux de 7-KC et de 25-OH dans les cellules après 48 heures d'incubation avec ces oxystérols. Ces deux oxystérols sont bien assimilés par les cellules puisque les taux sont augmentés par rapport aux taux basaux. Ainsi, les effets observés suite à une incubation de 48 heures avec ces oxystérols sont bien consécutifs à leur intégration par les cellules.

Les pathologies dégénératives telles que la DMLA sont associées à un stress oxydant (Beatty et al., 2000; Bonne and Muller, 2000) ; nous nous sommes donc posé la question du rôle du 7-KC et du 25-OH dans la survenue d'un stress oxydant au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien. Nos résultats montrent que les deux oxystérols étudiés entraînent une augmentation des ERO. De plus, le 7-KC diminue les défenses antioxydantes assurées par le glutathion et le 25-OH induit une augmentation de la peroxydation lipidique. Cette augmentation du stress oxydant pourrait également favoriser l'oxydation du cholestérol en oxystérols.

Le stress oxydant pouvant conduire à des altérations mitochondriales et la mitochondrie étant impliquée dans les processus dégénératifs, nous avons évalué le rôle des deux oxystérols sur les fonctions mitochondriales des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Une diminution de l'activité de la succinate déshydrogénase accompagnée d'une hyperpolarisation des membranes mitochondriales et d'une diminution de la masse mitochondriale est induite par le 7-KC. Le 25-OH entraîne une diminution de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale ainsi qu'une légère dépolarisation des membranes mitochondriales et une diminution de la masse mitochondriale. Ces altérations mitochondriales sont associées, pour le 7-KC uniquement, à une diminution du taux d'ATP intracellulaire et une augmentation du taux d'ATP extracellulaire.

Les modifications du taux d'ATP nous ont amenée à nous intéresser à un purinorécepteur : P2X7. Ce récepteur est connu pour son implication dans les processus dégénératifs (Le Feuvre et al., 2002; Marcellino et al., 2010; Reichenbach and Bringmann, 2016; Wakx et al., 2015). Les oxystérols jouent-ils un rôle dans ce mécanisme ? Le 7-KC et le 25-OH entraînent tous les deux une activation du récepteur P2X7. Cette activation est associée à celle du canal pannexine-1 pour le 25-OH, mais pas pour le 7-KC qui semble activer le récepteur P2X7 et la pannexine-1 de façon indépendante. En effet, le récepteur P2X7 peut lors de la formation du pore entraîner l'activation du canal pannexine-1 (Pelegrín, 2011).

Ainsi, le récepteur P2X7 semble se comporter différemment selon l'oxystérol : le 7-KC, connu pour ses effets nécrotiques, stimule la formation du pore P2X7 et entraîne également une activation du canal pannexine-1. Le BBG a tendance à diminuer la formation du pore P2X7 induite par le 7-KC même si cette diminution n'est pas statistiquement significative. Le probénécide, quant à lui, inhibiteur du canal pannexine-1, bloque l'activation de ce canal mais ne réduit que légèrement l'activation du récepteur P2X7. Les deux voies, P2X7 et pannexine-1, semblent donc indépendantes. Aucune de ces deux voies n'est à l'origine de la production d'ERO induite par le 7-KC. Le 7-KC pourrait être lui-même un agent pro-oxydant et ainsi être directement à l'origine des ERO.

En revanche, le 25-OH qui semble plutôt avoir des effets apoptotiques d'après la littérature (Choi et al., 2008; Trousson et al., 2009; Zhang et al., 1997), stimule la formation d'un complexe P2X7/pannexine-1, que le probénécide inhibe. L'activation de ce complexe P2X7/pannexine-1 est à l'origine de la production d'ERO induite par le 25-OH puisque lorsqu'il est inhibé, la production d'ERO l'est aussi.

Les deux oxystérols étudiés induisent des effets différents sur les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Cette observation est en accord avec les résultats observés sur des modèles cellulaires différents tels que les monocytes ou sur des modèles membranaires (Lemaire-Ewing et al., 2005; Phan et al., 2013). Les effets induits par le 7-KC et le 25-OH présentent des similitudes avec les effets induits par le peptide β amyloïde : stress oxydant et activation du récepteur P2X7 ainsi qu'apoptose pour le 25-OH (Ding et al., 2015; Parvathenani et al., 2003).

Ainsi, les oxystérols semblent s'inscrire comme des biomarqueurs de dégénérescence rétinienne. Le récepteur de mort et de dégénérescence P2X7 et le canal pannexine-1 jouent un rôle prépondérant dans les effets induits par les oxystérols et pourraient constituer une cible dans le développement de nouveaux traitements des dégénérescences rétiniennes.

Article 1

Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Leguillier T, Dargère D, Auzeil N, Laprèvote O, Rat P.

P2X7-pannexin-1 and amyloid β -induced oxysterol input in human retinal cell: Role in age-related macular degeneration?

Biochimie. 2016 Aug;127:70-8.



Research paper

P2X7-pannexin-1 and amyloid β -induced oxysterol input in human retinal cell: Role in age-related macular degeneration?



Elodie Olivier^{a, b}, Mélody Dutot^{a, c}, Anne Regazzetti^a, Teddy Leguillier^a,
Delphine Dargère^a, Nicolas Auzeil^a, Olivier Laprèvote^a, Patrice Rat^{a, *}

^a UMR CNRS 8638-Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie de Paris, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

^b Soliance-Givaudan, Route de Bazancourt, 51110 Pomacle, France

^c Recherche et Développement, Laboratoire d'Evaluation Physiologique, Yslab, 2 Rue Félix le Dantec, 29000 Quimper, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2015

Accepted 15 April 2016

Available online 21 April 2016

Keywords:

Degenerative disease

Eye/retina

Lipids

Receptors

Toxicology

ABSTRACT

Age-related macular degeneration (AMD) is the most common cause of severe vision loss worldwide. Amyloid β involvement in degenerative diseases such as AMD is well known and its toxicity has been related to P2X7 receptor-pannexin-1. Recently, oxysterols (oxidized derivatives of cholesterol) have been implicated in AMD pathogenesis. The aim of our study was to highlight amyloid β /oxysterols relationship and to describe P2X7 receptor-pannexin-1 role in oxysterols toxicity. Using retinal epithelial cells, we first quantified sterols levels after amyloid β incubation and second we investigated the cytotoxic effects induced by oxysterols. For the first time, our results showed that amyloid β induced oxysterols formation in human retinal pigmented epithelial cells. We showed that oxysterol toxicity is mediated by P2X7 receptor activation. This activation was dependent on pannexin-1 with 25-hydroxycholesterol whereas P2X7 receptor signaling pathway was pannexin-1-independent for 7-ketocholesterol. Taken together our data suggest a pivotal role of P2X7 receptor-pannexin-1 in oxysterols toxicity in retinal cells which could be an important target to develop new treatments for AMD

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is the most common cause of severe vision loss worldwide with 25–30 million affected persons [1]. The prevalence of this disease increases with age and lifespan extension tends to worsen this issue [2]. Consequently, this disease is considered as a major public health challenge.

One of the clinical signs of this multifactorial disease is the accumulation of drusen in the retina between retinal pigmented epithelium (RPE) and Bruch's membrane [3]. Drusen are extracellular proteolipidic deposits, which contain amyloid β peptide as the main component. Moreover, other components such as 7-

ketocholesterol (7-KC), an auto-oxidized form of cholesterol (oxysterol) have been detected in human drusen [4,5]; consequently, other oxysterols are suspected to be associated to AMD [4,6,7]. In an interesting manner, cholesterol is the only precursor of oxysterols and hypercholesterolaemia was described as a risk factor to develop AMD [8]. Therefore, it is reasonable to expect high levels of oxysterols in case of hypercholesterolaemia and then AMD. In the literature, the product of cholesterol autooxidation 7- β hydroxycholesterol (7- β) and the cholesterol enzymatically derived 25-hydroxycholesterol (25-OH) and 27-hydroxycholesterol (27-OH) are known for their association to AMD [9,10]. Therefore, these compounds are more and more described as putative biomarkers of degenerative diseases [11,12].

The main component in drusen, amyloid β aggregated form, is well-known as an inducer of oxidative stress, cell death and apoptosis [13–15]. Moreover, P2X7, a cell death purinoreceptor, has been related to amyloid β peptide toxicity in Alzheimer's disease models [16,17] and AMD models [18]. Interestingly, oxysterols are involved in apoptosis [19,20] but no data have been reported regarding the relationship between oxysterols and P2X7 receptor.

Abbreviations: 7-KC, 7-ketocholesterol; 7- β , 7- β hydroxycholesterol; 24-OH, 24-hydroxycholesterol; 25-OH, 25-hydroxycholesterol; 27-OH, 27-hydroxycholesterol; AMD, Age-related Macular Degeneration; HRMS, High Resolution Mass Spectrometry; ROS, Reactive Oxygen Species; RPE, Retinal Pigmented Epithelium; UPLC, Ultra-Performance Liquid Chromatography.

* Corresponding author.

E-mail address: patrice.rat@parisdescartes.fr (P. Rat).

Activation of P2X7 receptor triggers the formation of large nonselective membranes pores which results in inflammation through the inflammasome, oxidative stress and, ultimately, cell death especially by apoptosis [21,22]. The formation of these death pores probably require other components and it has been described that pannexin-1, previously associated to amyloid β peptide toxicity [23], could be one of the involved proteins [24].

As amyloid β is a key factor in AMD pathogenesis and oxysterols are thought to be biomarkers of this pathology, the aim of our study was first to highlight the amyloid β /oxysterols relationship and second to describe P2X7-pannexin-1 receptor involvement in oxysterols toxicity on RPE cells.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of aggregated amyloid β (1–42) peptide

Amyloid β (Bachem, Bubendorf, Switzerland) was dissolved in double-distilled water to a final concentration of 500 μ M. Amyloid β fibrillation was performed by heating at 37 °C this solution for 6 days in a waterbath according to Perini's protocol [25]. Aggregation of amyloid β was checked using the thioflavin T binding assay [26] (data not shown).

2.2. Cell culture

The human RPE cell-line ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™), widely used in AMD *in vitro* studies, was grown in DMEM/F12 (volumetric ratio of 1:1, Eurobio, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM of glutamine, 50 IU/mL of penicillin and 50 IU/mL of streptomycin (Eurobio) in a 37 °C incubator with 5% CO₂. When cells reached confluency, cell dispersion was done using trypsin (Eurobio) and cells were counted. The cellular suspension was diluted and seeded in flasks to reach subconfluency for mass spectrometry analysis or seeded either in 96-well or in 6-well microplates to reach subconfluency for cytometric assays. In the first experiment, cells were incubated with aggregated amyloid β at 25 μ M, as previous studies used micromolar amyloid β concentrations in ARPE-19 and MIO-M1 retinal cell lines to mimic *in vitro* AMD [15,18]. In further experiments, cells were incubated with 7-ketocholesterol (7-KC, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), 27-hydroxycholesterol (27-OH, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) or 25-hydroxycholesterol (25-OH, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) at final concentrations ranging from 1 μ M to 100 μ M for 48 h, as previous experiments used micromolar concentrations to study oxysterols cellular effects on ARPE-19 cells [10,27]. For stock solutions, oxysterols were dissolved in absolute ethanol. Probenecid (Sigma-Aldrich), a pannexin-1 inhibitor [28], was used at a final concentration of 1 mM in oxysterol solution for 48 h.

2.3. Cell necrosis evaluation

Cell necrosis was evaluated through lactate dehydrogenase (LDH) quantitation. LDH is a cytoplasmic enzyme, which is released in the extracellular compartment in case of membrane damage. The extracellular rate of lactate dehydrogenase has been correlated with cell death [29]. LDH mixture was prepared according to manufacturer instructions (Sigma-Aldrich). 50 μ L of cell supernatant were added to 50 μ L of LDH mixture, and plate was incubated under agitation for 30 min at room temperature. Reaction was stopped with 10 μ L HCL 1N and absorbance was read at 490 nm (λ_{ref} = 690 nm) using a cytometer (Safire, Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.4. Sterols quantification

Quantification of sterols in human RPE cells was performed according to the method developed by Aycirix et al. [30] using ultra-performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry analysis (UPLC-HRMS) after a special derivation by isocyanate to improve electrospray ionization (ESI).

ARPE-19 cells were incubated with, or without, 25 μ M amyloid β in flasks. After 48 h, cells were dispersed with trypsin and rinsed. Cell pellets were dissolved in 600 μ L double-distilled water, vortexed for 30 s and sonicated for 5 min. Sterols were extracted with hexane/methanol mixture (7:1, v/v) under agitation for 40 min and dried under reduce pressure. Sterols were derivatized into carbamate using a solution of 4-(dimethylamino) phenyl isocyanate in dichloromethane. Dichloromethane was evaporated under reduced pressure, derivatized sterols were resuspended in an acetonitrile/isopropanol mixture (1:1, v/v) and analyzed using UPLC-ESI-HRMS on a Synapt™ G2 HDMS™ mass spectrometer (Waters MS Technologies, Manchester, UK). Oxysterols levels were normalized to protein content measured by BCA method.

2.5. Cell morphology observation

After a 48-h incubation time with oxysterols, non-fixed cells were observed under optical microscope (Leica DMIRB, Wetzlar, Germany). Representative pictures were taken using Nikon Coolpix camera (Nikon, Shinjuku, Japan).

2.6. P2X7 pore formation assessment

YO-PRO-1 was first used to discriminate cells dying by apoptosis versus necrosis with flow cytometry [31]. The YO-PRO-1 probe only enters into cells after P2X7 receptor activation-induced pore opening, and binds to DNA emitting fluorescence. A 1 mM YO-PRO-1 (Life Technologies, Saint Aubin, France) stock solution was diluted at 1/500 in PBS just before use to be distributed in each well (200 μ L/well). After a 10-min incubation period at room temperature, fluorescence signal was read (λ_{ex} = 491 nm, λ_{em} = 509 nm) using a cytofluorometer (Safire, Tecan) [32,33].

2.7. Chromatin condensation evaluation

The UV fluorescent probe Hoechst 33342 (Life Technologies) enters living and apoptotic cells, intercalating into DNA. The fluorescent signal is proportional to chromatin condensation as in apoptosis. A 10 μ g/mL Hoechst 33342 solution was distributed into wells (200 μ L/well). After a 30-min incubation period at room temperature, the fluorescence signal was read (λ_{ex} = 350 nm, λ_{em} = 450 nm) using a cytofluorometer (Safire, Tecan) [34].

2.8. Cell oxidative stress study

2.8.1. Reactive oxygen species (ROS) production: H2DCF-DA assay

Intracellular ROS were measured using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA, Life Technologies) [35], which is hydrolyzed by cell esterases in 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and oxidized by ROS in highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein. A 10 μ M solution of H2DCF-DA was distributed into wells (200 μ L/well). After a 20-min incubation period at 37 °C, the fluorescence signal was read (λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 535 nm) using a cytofluorometer (Safire, Tecan) [36].

2.8.2. Lipid peroxidation evaluation: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay

Lipid peroxidation was evaluated using TBARS assay:

malondialdehyde, a product of lipid peroxidation in cell membranes, reacts with thiobarbituric acid (TBA) to generate a fluorescent compound. Briefly, following oxysterols incubation on human RPE cells in 6-well plates, 10% trichloroacetic acid was added. Cells were scraped off, centrifuged and pellet was used to measure protein content using bicinchoninic acid (BCA) reagent (Sigma Aldrich) whereas supernatant was incubated with 10% TBA under agitation at 90 °C for 30 min. The TBA reaction was stopped by cooling the reaction mixture at 4 °C. Fluorescence signal of the upper layer was scanned ($\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 555 \text{ nm}$) using a cytofluorometer (Safire, Tecan).

2.9. Statistical analysis

In all cytometry experiments, no effect of absolute ethanol, the solvent used for oxysterol dissolving, was reported. Indeed, cell incubation with absolute ethanol showed the same results as with culture medium (data not shown).

Means of at least three independent experiments were calculated and normalized to control cells. In the figures, results were expressed as fold change relative to control cells ($\pm$ SEM). Statistical analysis was performed on at least three independent experiments with GraphPad Prism 6. Mann-Whitney or one-way ANOVA followed by Tukey assays with a risk α at 5% were used. Thresholds of significance were *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ compared to culture medium and \$\$\$ $p < 0.001$, \$\$\$ $p < 0.01$ and \$ $p < 0.05$ compared to the same concentration without probenecid.

3. Results

3.1. Amyloid β leads to cytotoxicity on retinal cells

The LDH assay was used to evaluate cell necrosis after incubation with aggregated amyloid β on human RPE cells. As expected, 25 μM aggregated amyloid β induced a 1.56-fold increase in LDH release compared to control (Fig. 1). We then investigated oxysterols level after aggregated amyloid β incubation.

3.2. Oxysterols level is modified after amyloid β incubation on retinal cells

Mass spectrometry was used as preliminary assay to identify changing in oxysterols level after amyloid β incubation on human RPE cells. Among the oxysterols studied, 27-OH and 25-OH showed a marked level increase in ARPE-19 cells after amyloid β incubation (Fig. 2). By contrast, a slight decrease in 7-KC level was noticed. Moreover, no change was observed in cholesterol level between

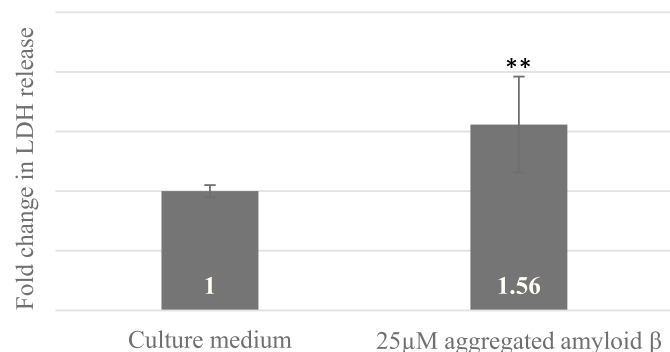


Fig. 1. Aggregated amyloid β cytotoxicity on ARPE-19 cells. Cell necrosis evaluation with LDH release assay after a 48-h incubation time with 25 μM aggregated amyloid β ($n = 5$) ** $p < 0.01$ compared to culture medium.

cells incubated with 25 μM aggregated amyloid β and control. Taken together, these data suggest a link between the presence of amyloid β aggregates and the levels of hydroxylated oxysterols 27-OH and 25-OH in ARPE-19 cells. That is why we further investigated the cytotoxicity of these oxysterols on ARPE-19 cells.

3.3. Oxysterols induces necrosis on retinal cells

The LDH assay was used to evaluate the necrosis induced by 27-OH and 25-OH on human RPE cells. 7-KC cytotoxicity was also evaluated, as this oxysterol was previously detected in drusen of patients suffering from AMD [4,5]. As seen in Fig. 3A, 25-OH (100 μM) and 7-KC (75 μM) induced the highest increases ($\times 3.5$ and $\times 4.2$ respectively) in LDH release on ARPE-19 cells compared to control. By contrast, 27-OH (100 μM) induced the lowest increase ($\times 1.3$) in LDH release. Thus, our data clearly demonstrated that 25-OH and 7-KC are the most necrotic oxysterols on ARPE-19 cells. At 20 μM , 25-OH and 7-KC induced a slight increase in LDH release ($\times 1.2$ and $\times 1.5$, respectively compared to control).

Furthermore, these results were confirmed by microscopic observations of cells (Fig. 3B). Indeed, 27-OH incubation did not modify cell layer, whereas 25-OH (75 μM) and 7-KC (50 μM) impaired cell layers and changed cell morphology. Following incubation with 25-OH 75 μM , cells became refringent and stretched and following incubation with 7-KC 50 μM , cells also became refringent and exhibited a round shape. In view of these results, we explored the mechanism of cytotoxicity focusing on 25-OH and 7-KC at slightly cytotoxic concentrations to target hallmarks of AMD, apoptosis and oxidative stress.

3.4. Oxysterols-induced P2X7 activation

The YO-PRO-1 assay was used to assess pore formation resulting from P2X7 activation. As pannexin-1 can be required for P2X7 pore formation, 7-KC and 25-OH were incubated on ARPE-19 cells with or without probenecid, a pannexin-1 inhibitor. Interestingly, 7-KC and 25-OH incubation induced both significant increases in P2X7 pore opening compared to control (Fig. 4). This increase was significantly higher for 7-KC 20 μM than for 25-OH 20 μM . Furthermore, 7-KC but not 25-OH effect was concentration-dependent. Indeed, when compared to control, it raised from 1.2 to 1.9 between 7-KC 5 μM and 20 μM while it was almost unchanged for 25-OH whatever the concentration. Taken together, these data suggest that 25-OH and 7-KC could play a role in AMD pathogenesis through P2X7 activation.

Pannexin-1 role in P2X7 activation was then investigated. P2X7 pore opening induced by 25-OH was significantly inhibited by probenecid 1 mM ($\times 0.8$ with probenecid vs $\times 1.2$ without probenecid for 25-OH 5 μM and $\times 0.8$ vs $\times 1.3$ for 25-OH 10 μM) suggesting that 25-OH cytotoxicity is pannexin-1-dependent. In contrast to 25-OH, pore opening induced by 7-KC was not inhibited by probenecid 1 mM. As P2X7 is associated to apoptosis, we further investigate if P2X7 activation induced by oxysterols leads to chromatin condensation.

3.5. Oxysterols-induced chromatin condensation

The Hoechst 33342 assay was used to evaluate chromatin condensation. As P2X7 is related to apoptosis, pannexin-1 inhibition using probenecid was also investigated in the chromatin condensation study. 7-KC incubation induced no chromatin condensation (Fig. 5A). Therefore, the co-incubation with probenecid 1 mM was not performed. By contrast, 25-OH induced a significant increase in chromatin condensation ($\times 1.4$ compared to control for all concentrations except for 1 μM) as shown in Fig. 5B.

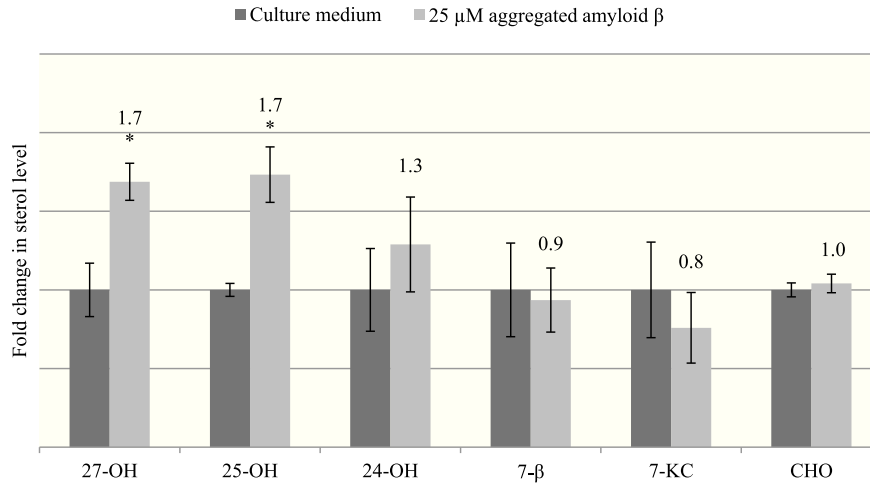


Fig. 2. Sterols quantification using mass spectrometry in ARPE-19 cells membranes after amyloid β incubation. Sterols were quantified using UPLC-ESI-HRMS after a 48-h incubation time with 25 μ M aggregated amyloid β . Sterol levels in control cells were arbitrarily fixed at 1. (n = 5) 27-OH: 27-hydroxycholesterol, 25-OH: 25-hydroxycholesterol, 24-OH: 24-hydroxycholesterol, 7- β : 7- β -hydroxycholesterol, 7-KC: 7-ketocholesterol, CHO: cholesterol.

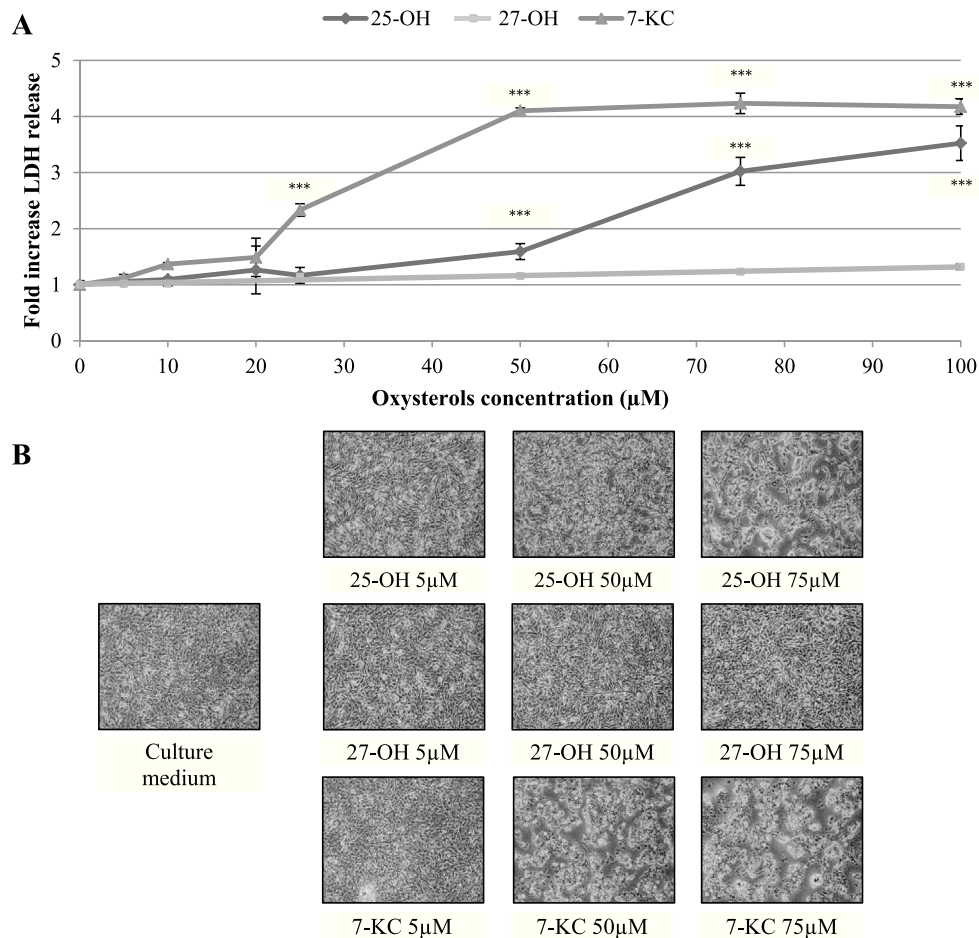


Fig. 3. Oxysterols cytotoxicity on ARPE-19 cells. A. Cell necrosis evaluation with LDH release assay after a 48-h incubation with different oxysterols at different concentrations (n = 3) ***p < 0.001 compared to culture medium. B. Representative microscopic observations ($\times 100$) of ARPE-19 cells after a 48-h incubation time with different oxysterols at different concentrations.

These data highlight that 25-OH-induced chromatin condensation was concentration-independent. Moreover, probenecid 1 mM did not prevent 25-OH-induced chromatin condensation (e.g. x 1.4

without probenecid vs x 1.3 with probenecid for 25-OH 10 μ M). These results show that the chromatin condensation induced by 25-OH is pannexin-1-independent.

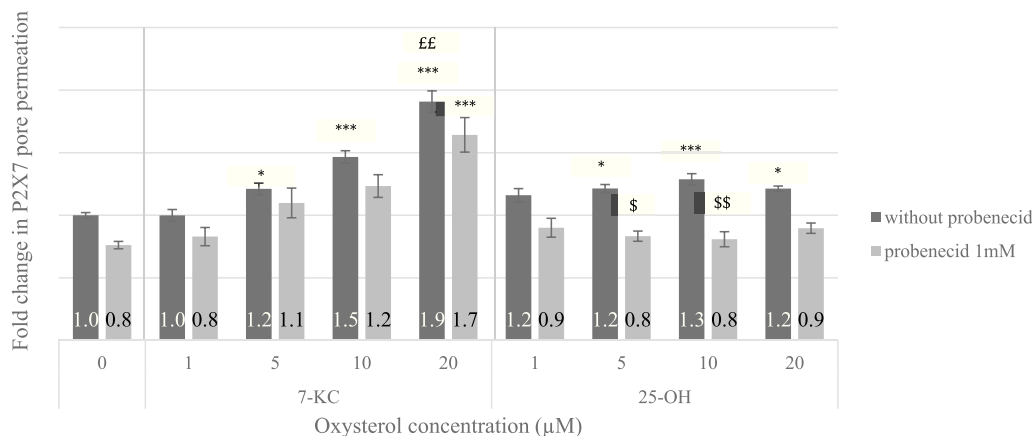


Fig. 4. Oxysterols-induced P2X7 pore formation. YO-PRO-1 assay after a 48-h incubation time with different oxysterols with or without probenecid 1 mM. Values are the mean ± standard deviation (n = 4). ***p < 0.001, *p < 0.05 compared to culture medium; \$\$\$p < 0.001 and \$p < 0.05 compared to the same concentration without probenecid and \$\$\$p < 0.001 compared to the same concentration of 25-OH.

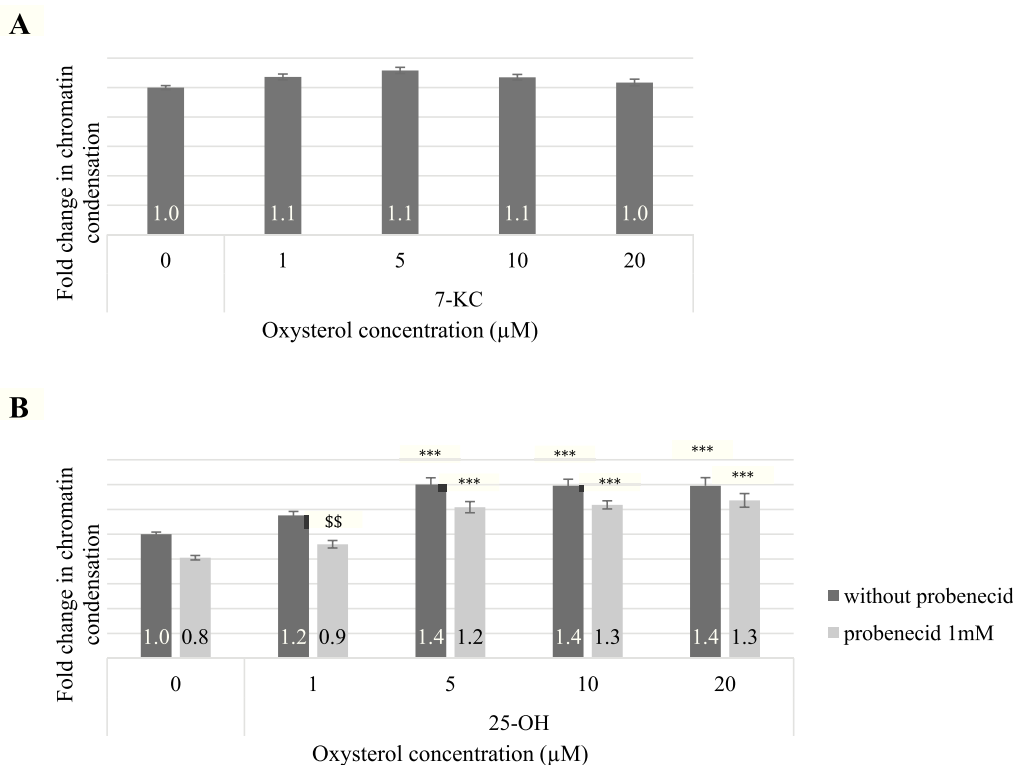


Fig. 5. Chromatin condensation induced by oxysterols. Hoechst 33342 assay after a 48-h incubation with different oxysterols. A. Chromatin condensation after 7-KC incubation. B. Chromatin condensation after 25-OH incubation with or without probenecid 1 mM. Values are the mean ± standard deviation (n = 3). ***p < 0.001 compared to culture medium and \$p < 0.01 compared to the same concentration without probenecid.

3.6. Oxysterols-induced oxidative stress

P2X7 was shown to be associated with oxidative stress, which can be responsible for the oxidation of cholesterol in oxysterols; that is why oxidative stress was investigated. The H2DCF-DA assay was used to quantify reactive oxygen species (ROS) production. As shown in Fig. 6A, a significant increase in ROS production was observed after 7-KC incubation (x 1.7 for 7-KC 5 μM compared to control). This increase was not associated with lipid peroxidation (Fig. 6C). Furthermore, probenecid 1 mM had no inhibiting effect on ROS production induced by 7-KC, meaning that 7-KC-induced ROS

production is pannexin-1-independent.

Regarding 25-OH, a significant ROS production was also observed after incubation with 1, 5, 10 and 20 μM (respectively x 2.0; x 1.9; x 2.0; x 1.4 compared to control, Fig. 6B). As shown in Fig. 6C, this increase was associated with lipid peroxidation (x 1.4 after 25-OH 10 μM compared to control). After co-incubation with probenecid 1 mM, 25-OH-induced ROS production was significantly decreased (x 1.0 with probenecid vs x 1.9 without probenecid for 25-OH 5 μM and x 0.9 vs x 2.0 for 25-OH 10 μM, Fig. 6B). These results show that, unlike 7-KC, 25-OH induces pannexin-1-dependent ROS production.

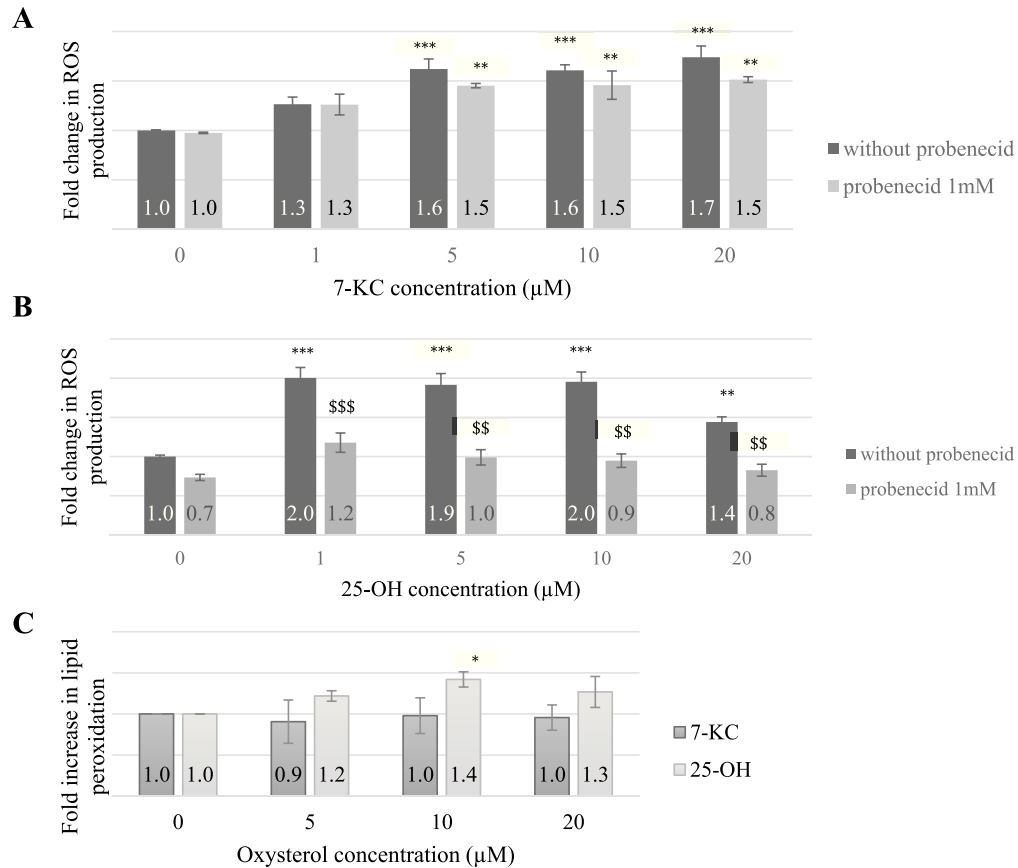


Fig. 6. Oxysterols-induced oxidative stress evaluation. A. ROS formation evaluation with H2DCF-DA assay after a 48-h incubation with 7-KC with or without probenecid 1 mM. B. ROS formation evaluation with H2DCF-DA assay after a 48-h incubation with 25-OH with or without probenecid 1 mM. C. Lipid peroxidation evaluation with TBARS assay after a 48-h incubation with oxysterols. Values are the mean $\pm$ standard deviation (n = 4). ***p < 0.001, **p < 0.01 and *p < 0.05 compared to culture medium and \$\$\$p < 0.001 compared to the same concentration without probenecid.

4. Discussion

Involvement of amyloid β and oxysterols has been separately investigated in age-related macular degeneration (AMD) pathogenesis [37–40]. Dasari et al. showed that the 27-OH oxysterol lead to the formation of amyloid β in retinal pigmented epithelial cells [10]. This observation suggests a link between oxysterol and amyloid β in AMD pathogenesis. However, there is no data highlighting that amyloid β is able to induce the formation of oxysterols in retinal cells, which could also contribute to AMD pathogenesis. Therefore, the purposes of our study were first to investigate if amyloid β could be involved in oxysterol formation, and second to further analyze the cellular mechanisms of oxysterols cytotoxicity. As amyloid β peptide toxicity has been related to P2X7 receptor [16,17], we focus our attention on this key receptor. To achieve our purpose, we used as model the human RPE cell line ARPE-19 because it shares structural and functional properties of RPE cells in vivo [41].

Our data highlight, for the first time, an increase in hydroxylated oxysterols levels after amyloid β incubation in a human RPE cell model. Using ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry we were able to identify the two oxysterols that showed the highest increased level after amyloid β incubation: 27-OH and 25-OH. By contrast with hydroxylated oxysterols, the level of 7-KC was almost unchanged in our model of retinal degeneration. These data could be explained by the localization of 7-KC in extracellular deposits called drusen and not in retinal cells [5]. Amyloid β induces oxysterols formation and in

turn, oxysterols lead to amyloid β formation. Besides, Phan et al. showed that 7-KC and 25-OH increase amyloid β level in artificial membranes: 7-KC through an absorption process, 25-OH by enhancing amyloid β insertion into the membrane bilayer [42]. These data are consistent with a relationship between oxysterols and amyloid β , which could amplify the toxic effects due to each molecule and probably plays a key role in AMD pathogenesis (Fig. 7).

As 27-OH, 25-OH and 7-KC have been associated to AMD [9,10], we measured their cytotoxicity on retinal pigmented epithelial cells and showed that 25-OH and 7-KC were cytotoxic contrary to 27-OH. In our model, we observed that both amyloid β and oxysterols were cytotoxic, suggesting that amyloid β cytotoxicity could be related to 25-OH and 7-KC cytotoxicity. Therefore, we decided to focus our further investigations on 25-OH and 7-KC.

Recently, upregulation of P2X7 receptor has been correlated to cellular retinal degeneration [43,44] and activation of this cell death receptor was induced by amyloid β on human retinal cells [18]. At a cellular level, P2X7 receptor is associated to many cellular events like oxidative stress and apoptosis [22,33,45], both believed to be involved in AMD pathogenesis [46–49]. P2X7 death pore formation is probably associated to pannexin-1 [50].

To investigate P2X7-pannexin-1 receptor involvement in oxysterols cytotoxicity, we used a pannexin-1 inhibitor, probenecid [28], to first evaluate the P2X7 pore opening using YO-PRO-1 assay. 7-KC leads to necrosis via pannexin-1-independent P2X7 receptor activation and oxidative stress without chromatin condensation. In this case, the oxysterol seems to induce the cytolytic activity of

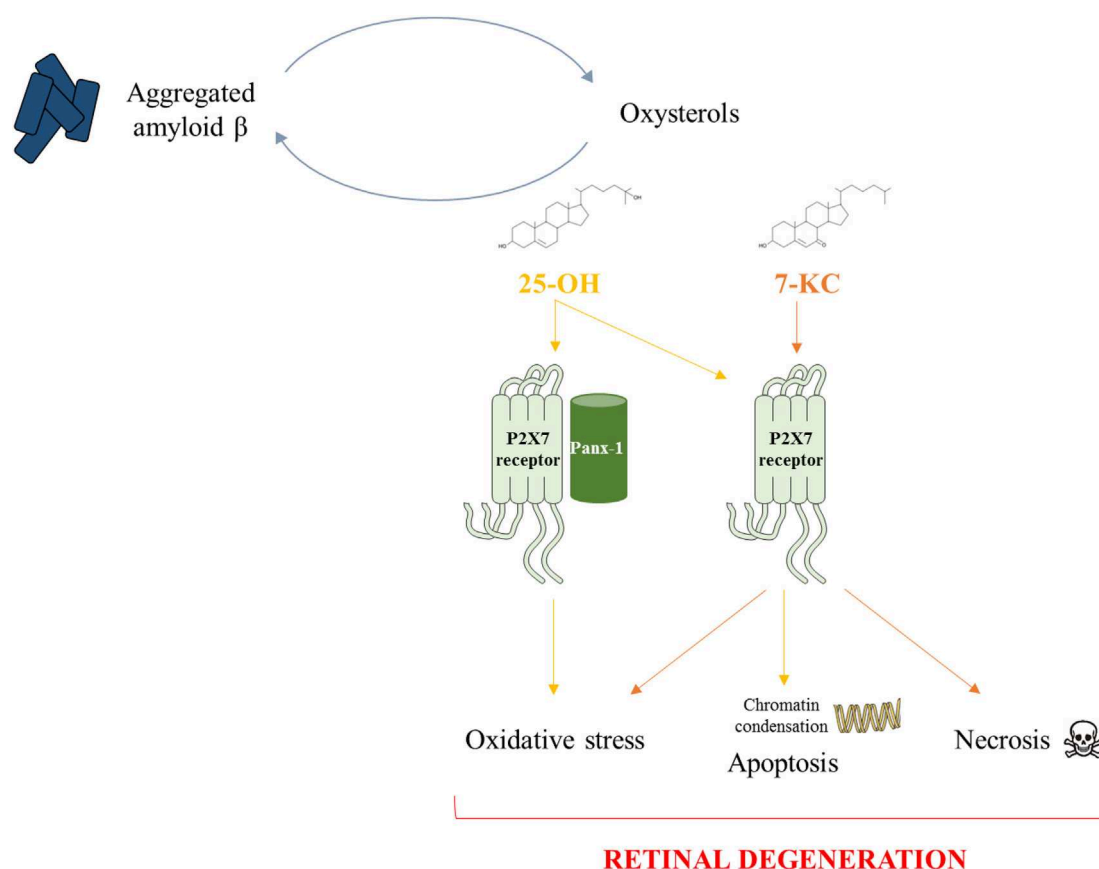


Fig. 7. Representative schema of amyloid β and oxysterols roles in retinal degeneration through P2X7 pathway. In retinal cells, oxysterols lead to amyloid β formation and vice versa. 7-KC activates P2X7 receptor leading to necrosis and oxidative stress, and 25-OH activates both P2X7 receptor and P2X7-pannexin-1 (Panx-1) leading to chromatin condensation and oxidative stress, all involved in retinal degeneration.

P2X7 receptor. P2X7 receptor is an interesting protein that is endowed with the ability to kill cells either by necrosis (P2X7 receptor was first identified as P2Z cytolytic pore) or apoptosis, as well as to trigger many responses such as inflammation and oxidative stress [51,52]. In our study, 25-OH induces pannexin-1-dependent increase in P2X7 receptor activation and oxidative stress, and pannexin-1-independent chromatin condensation up to 20 μ M 25-OH seems to induce two distinct pathways on retinal epithelial cells: one implying P2X7 receptor-pannexin-1 associated to oxidative stress and the other being P2X7 receptor-pannexin-1-independent and leading to chromatin condensation. 25-OH shares similarities with amyloid β in their toxic mechanisms; indeed, amyloid β also induces oxidative stress, apoptosis and P2X7 receptor activation [17,53].

The difference of toxicity profiles for 7-KC and 25-OH in our data is consistent with differences previously observed in membrane models or in different cell types [42,54]. Indeed, Lemaire-Ewing et al. showed on a human monocytes cell line that, depending on oxysterols, cytotoxicity, oxidative stress or cytokine secretion are observed. Moreover, Phan et al., as we already reported [42], demonstrated oxysterols-depending effects on amyloid β and membrane association, 7-KC facilitates amyloid β localization whereas 25-OH acts on membrane transformation.

5. Conclusion

The potential relationship between oxysterols and amyloid β in AMD supports the notion that oxysterols can be considered as biomarkers of retinal degeneration. In light of the pivotal role of

P2X7 receptor activation in oxysterols cytotoxicity, it could be an important target to develop treatments for this disease.

Declaration of interest statement

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgments

We would like to thank Dr A. Wakx and Pr J.-M. Warnet for technical advice, helpful discussions and analyse of this manuscript. We acknowledge support from Adebipharm (Paris).

References

- [1] E. Prokofyeva, E. Zrenner, Epidemiology of major eye diseases leading to blindness in Europe: a literature review, *Ophthalmic Res.* 47 (2012) 171–188, <http://dx.doi.org/10.1159/000329603>.
- [2] D.B. Rein, J.S. Wittenborn, X. Zhang, A.A. Honeycutt, S.B. Lesesne, J. Saaddine, et al., Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments, *Arch. Ophthalmol.* 127 (2009) 533–540, <http://dx.doi.org/10.1001/archophthalmol.2009.58>.
- [3] E. Buschini, A. Piras, R. Nuzzi, A. Vercelli, Age related macular degeneration and drusen: neuroinflammation in the retina, *Prog. Neurobiol.* 95 (2011) 14–25, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.05.011>.
- [4] N.B. Javitt, J.C. Javitt, The retinal oxysterol pathway: a unifying hypothesis for the cause of age-related macular degeneration, *Curr. Opin. Ophthalmol.* 20 (2009) 151–157, <http://dx.doi.org/10.1097/ICU.0b013e32832af468>.
- [5] I.R. Rodriguez, M.E. Clark, J.W. Lee, C.A. Curcio, 7-ketocholesterol accumulates in ocular tissues as a consequence of aging and is present in high levels in drusen, *Exp. Eye Res.* 128 (2014) 151–155, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2014.09.009>.

- [6] I.R. Rodríguez, I.M. Larrayoz, Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 2847–2862, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R004820>.
- [7] A. Zarrouk, A. Vejux, J. Mackrill, Y. O'Callaghan, M. Hammami, N. O'Brien, et al., Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes, *Ageing Res. Rev.* 18 (2014) 148–162, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2014.09.006>.
- [8] K. Kaarniranta, A. Salminen, A. Haapasalo, H. Soininen, M. Hiltunen, Age-related macular degeneration (AMD): Alzheimer's disease in the eye? *J. Alzheimers Dis. JAD* 24 (2011) 615–631, <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2011-101908>.
- [9] G. Poli, F. Biasi, G. Leonarduzzi, Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases, *Redox Biol.* 1 (2013) 125–130, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.001>.
- [10] B. Dasari, J.R.P. Prasanthi, G. Marwarha, B.B. Singh, O. Ghribi, The oxysterol 27-hydroxycholesterol increases β -amyloid and oxidative stress in retinal pigment epithelial cells, *BMC Ophthalmol.* 10 (2010) 22, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2415-10-22>.
- [11] I. Björkhem, A. Cedazo-Minguez, V. Leoni, S. Meaney, Oxysterols and neurodegenerative diseases, *Mol. Asp. Med.* 30 (2009) 171–179, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.001>.
- [12] V. Leoni, C. Caccia, Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases, *Chem. Phys. Lipids* 164 (2011) 515–524, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.04.002>.
- [13] M. Obulesu, M.J. Lakshmi, Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues, *Neurochem. Res.* 39 (2014) 2301–2312, <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-014-1454-4>.
- [14] M. Gschwind, G. Huber, Apoptotic cell death induced by β -amyloid 1–42 peptide is cell type dependent, *J. Neurochem.* 65 (1995) 292–300.
- [15] J. Bruban, A.-L. Glotin, V. Dinet, N. Chalour, F. Sennlaub, L. Jonet, et al., Amyloid- β (1–42) alters structure and function of retinal pigmented epithelial cells, *Aging Cell* 8 (2009) 162–177, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00456.x>.
- [16] J.G. McLarnon, J.K. Ryu, D.G. Walker, H.B. Choi, Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid- β peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65 (2006) 1090–1097, <http://dx.doi.org/10.1097/01.jnen.0000240470.97295.d3>.
- [17] L.K. Parvathenani, S. Tertyshnikova, C.R. Greco, S.B. Roberts, B. Robertson, R. Posmantur, P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 13309–13317, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209478200>.
- [18] A. Wakx, M. Dutot, F. Massicot, F. Mascarelli, G.A. Limb, P. Rat, Amyloid β peptide induces apoptosis through P2X7 cell death receptor in retinal cells: modulation by marine omega-3 fatty acid DHA and EPA, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-015-1878-6>.
- [19] S. Luthra, J. Dong, A.L. Gramajo, M. Chwa, D.W. Kim, A. Neekhra, et al., 7-Ketocholesterol activates caspases-3/7, -8, and -12 in human microvascular endothelial cells in vitro, *Microvasc. Res.* 75 (2008) 343–350, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mvr.2007.10.003>.
- [20] L. Malvitte, T. Montange, A. Vejux, C. Joffre, A. Bron, C. Creuzot-Garcher, et al., Activation of a caspase-3-independent mode of cell death associated with lysosomal destabilization in cultured human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) exposed to 7 β -Hydroxycholesterol, *Curr. Eye Res.* 33 (2008) 769–781, <http://dx.doi.org/10.1080/02713680802337397>.
- [21] B. Rissiek, F. Haag, O. Boyer, F. Koch-Nolte, S. Adriouch, P2X7 on mouse T cells: one channel, many functions, *Front. Immunol.* 6 (2015) 204, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00204>.
- [22] S. Seeland, H. Kettiger, M. Murphy, A. Treiber, J. Giller, A. Kiss, et al., ATP-induced cellular stress and mitochondrial toxicity in cells expressing purinergic P2X7 receptor, *Pharmacol. Res. Perspect.* 3 (2015) e00123, <http://dx.doi.org/10.1002/prp2.123>.
- [23] J.A. Orellana, N. Froger, P. Ezan, J.X. Jiang, M.V.L. Bennett, C.C. Naus, et al., ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels, *J. Neurochem.* 118 (2011) 826–840, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07210.x>.
- [24] S. Locovei, E. Scemes, F. Qiu, D.C. Spray, G. Dahl, Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex, *FEBS Lett.* 581 (2007) 483–488, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.12.056>.
- [25] G. Perini, V. Della-Bianca, V. Politi, G. Della Valle, I. Dal-Pra, F. Rossi, et al., Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by β -amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 907–918, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20011797>.
- [26] H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, T. Takeda, Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1, *Anal. Biochem.* 177 (1989) 244–249.
- [27] B. Dugas, S. Charbonnier, M. Baarine, K. Ragot, D. Delmas, F. Ménétrier, et al., Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol, *Eur. J. Nutr.* 49 (2010) 435–446, <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-010-0102-2>.
- [28] W. Silverman, S. Locovei, G. Dahl, Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295 (2008) C761–C767, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00227.2008>.
- [29] C. Legrand, J.M. Bour, C. Jacob, J. Capiaumont, A. Martial, A. Marc, et al., Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected], *J. Biotechnol.* 25 (1992) 231–243.
- [30] S. Aycirix, A. Regazzetti, M. Gaudin, E. Prost, D. Dargère, F. Massicot, et al., Development of a novel method for quantification of sterols and oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: application to a neuroinflammation rat model, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 3049–3059, <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6396-6>.
- [31] T. Idziorek, J. Estaquier, F. De Bels, J.C. Ameisen, YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability, *J. Immunol. Methods* 185 (1995) 249–258.
- [32] M. Dutot, J.-M. Warnet, C. Baudouin, P. Rat, Cytotoxicity of contact lens multipurpose solutions: role of oxidative stress, mitochondrial activity and P2X7 cell death receptor activation, *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 33 (2008) 138–145, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2007.10.006>.
- [33] M. Dutot, H. Liang, T. Pauloin, F. Brignole-Baudouin, C. Baudouin, J.-M. Warnet, et al., Effects of toxic cellular stresses and divalent cations on the human P2X7 cell death receptor, *Mol. Vis.* 14 (2008) 889–897.
- [34] M. Dutot, F. Pouzaud, I. Larosche, F. Brignole-Baudouin, J.-M. Warnet, P. Rat, Fluoroquinolone eye drop-induced cytotoxicity: role of preservative in P2X7 cell death receptor activation and apoptosis, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2006) 2812–2819, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.06-0224>.
- [35] C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy, Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 227–231.
- [36] M. Dutot, F. de la Tourrette, R. Fagon, P. Rat, New approach to modulate retinal cellular toxic effects of high glucose using marine epa and dha, *Nutr. Metab.* 8 (2011) 39, <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-8-39>.
- [37] T. Yoshida, K. Ohno-Matsui, S. Ichinose, T. Sato, N. Iwata, T.C. Saido, et al., The potential role of amyloid β in the pathogenesis of age-related macular degeneration, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2793–2800, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI24635>.
- [38] T. Dementchev, A.H. Milam, V.M.-Y. Lee, J.Q. Trojanowski, J.L. Dunaief, Amyloid- β is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas, *Mol. Vis.* 9 (2003) 184–190.
- [39] A. Vejux, G. Lizard, Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis, *Mol. Asp. Med.* 30 (2009) 153–170, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.006>.
- [40] K. Ohno-Matsui, Parallel findings in age-related macular degeneration and Alzheimer's disease, *Prog. Retin. Eye Res.* 30 (2011) 217–238, <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.02.004>.
- [41] K.C. Dunn, A.E. Aotaki-Keen, F.R. Putkey, L.M. Hjelmeland, ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties, *Exp. Eye Res.* 62 (1996) 155–169, <http://dx.doi.org/10.1006/exer.1996.0020>.
- [42] H.T.T. Phan, T. Hata, M. Morita, T. Yoda, T. Hamada, M.C. Vestergaard, et al., The effect of oxysterols on the interaction of Alzheimer's amyloid β with model membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1828 (2013) 2487–2495, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmem.2013.06.021>.
- [43] S.J. Hu, B. Calippe, S. Lavalette, C. Roubeix, F. Montassar, M. Housset, et al., Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-deficient mononuclear phagocytes leads to increased interleukin-1 β secretion and photoreceptor neurodegeneration, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35 (2015) 6987–6996, <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3955-14.2015>.
- [44] S. Notomi, T. Hisatomi, Y. Murakami, H. Terasaki, S. Sonoda, R. Asato, et al., Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage, *PloS One* 8 (2013) e53338, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0053338>.
- [45] D.L. Donnelly-Roberts, M.T. Namovic, C.R. Faltynek, M.F. Jarvis, Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308 (2004) 1053–1061, <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.103.059600>.
- [46] C.P. Ardeljan, D. Ardeljan, M. Abu-Asab, C.-C. Chan, Inflammation and cell death in age-related macular degeneration: an immunopathological and ultrastructural model, *J. Clin. Med.* 3 (2014) 1542–1560, <http://dx.doi.org/10.3390/jcm3041542>.
- [47] S.G. Jarrett, M.E. Boulton, Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration, *Mol. Asp. Med.* 33 (2012) 399–417, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2012.03.009>.
- [48] J. Kopitz, F.G. Holz, E. Kaemmerer, F. Schutt, Lipids and lipid peroxidation products in the pathogenesis of age-related macular degeneration, *Biochimie* 86 (2004) 825–831, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.029>.
- [49] J.Z. Nowak, Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration, *Pharmacol. Rep. R.* 65 (2013) 288–304.
- [50] P. Pelegrin, A. Surprenant, Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1 β release through a dye uptake-independent pathway, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 2386–2394, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M610351200>.
- [51] A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, R.A. North, G. Buell, The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7), *Science* 272 (1996) 735–738.
- [52] C. Volonté, S. Apolloni, S.D. Skaper, G. Burnstock, P2X7 receptors: channels, pores and more, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 11 (2012) 705–721.
- [53] H. Ding, H. Wang, Y. Zhao, D. Sun, X. Zhai, Protective effects of baicalin on A β 1-

- 42-induced learning and memory deficit, oxidative stress, and apoptosis in rat, *Cell. Mol. Neurobiol.* 35 (2015) 623–632, <http://dx.doi.org/10.1007/s10571-015-0156-z>.
- [54] S. Lemaire-Ewing, C. Prunet, T. Montange, A. Vejux, A. Berthier, G. Bessède, et al., Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols, *Cell Biol. Toxicol.* 21 (2005) 97–114, <http://dx.doi.org/10.1007/s10565-005-0141-2>.

2. Rôle des oxystérols dans le vieillissement et le photovieillissement de la peau

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology sous le titre « **Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: Role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging** » en 2016 (DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.05.015).

CONTEXTE

Une dérégulation des lipides, en particulier des oxystérols, est associée à certaines maladies dégénératives. Etant donné que le photovieillissement cutané est considéré comme un processus dégénératif, nous avons émis l'hypothèse que des lipides clés pourraient jouer un rôle important dans son développement.

OBJECTIFS

Le but des travaux de cette partie est d'étudier les altérations lipidiques et les taux d'oxystérols dans les kératinocytes ainsi que leur rôle dans le photovieillissement. Pour cela, nous avons exploré les modifications lipidiques sur des modèles cellulaires de photovieillissement.

Dans un premier temps, nous avons analysé le profil lipidique de kératinocytes d'origine humaine en fonction de l'âge puis après irradiation UV. Dans un second temps, nous nous sommes focalisée sur les effets des oxystérols sur les kératinocytes en explorant les voies de mort et de dégénérescence cellulaire induites ainsi que le processus de différenciation cellulaire.

APPROCHE EXPERIMENTALE

2.1. Analyse du taux d'oxystérols dans des cultures primaires de kératinocytes issus de donneurs « jeunes » et de donneurs « âgés »

2.1.1. Kératinocytes jeunes versus kératinocytes âgés

Afin d'étudier l'impact de l'âge sur la teneur en oxystérols dans les kératinocytes, nous avons sélectionné deux types de donneurs sains : des donneurs dits « jeunes » (2-3 ans, biopsies de prépuce) et des donneurs dits « âgés » (64-83 ans, biopsies de dos ou visage). Nous avons mesuré le taux de cholestérol ainsi que celui de différents oxystérols (27-OH, 25-OH, 24-OH, 7- β OH et 7-KC) dans les kératinocytes issus des biopsies de ces donneurs.

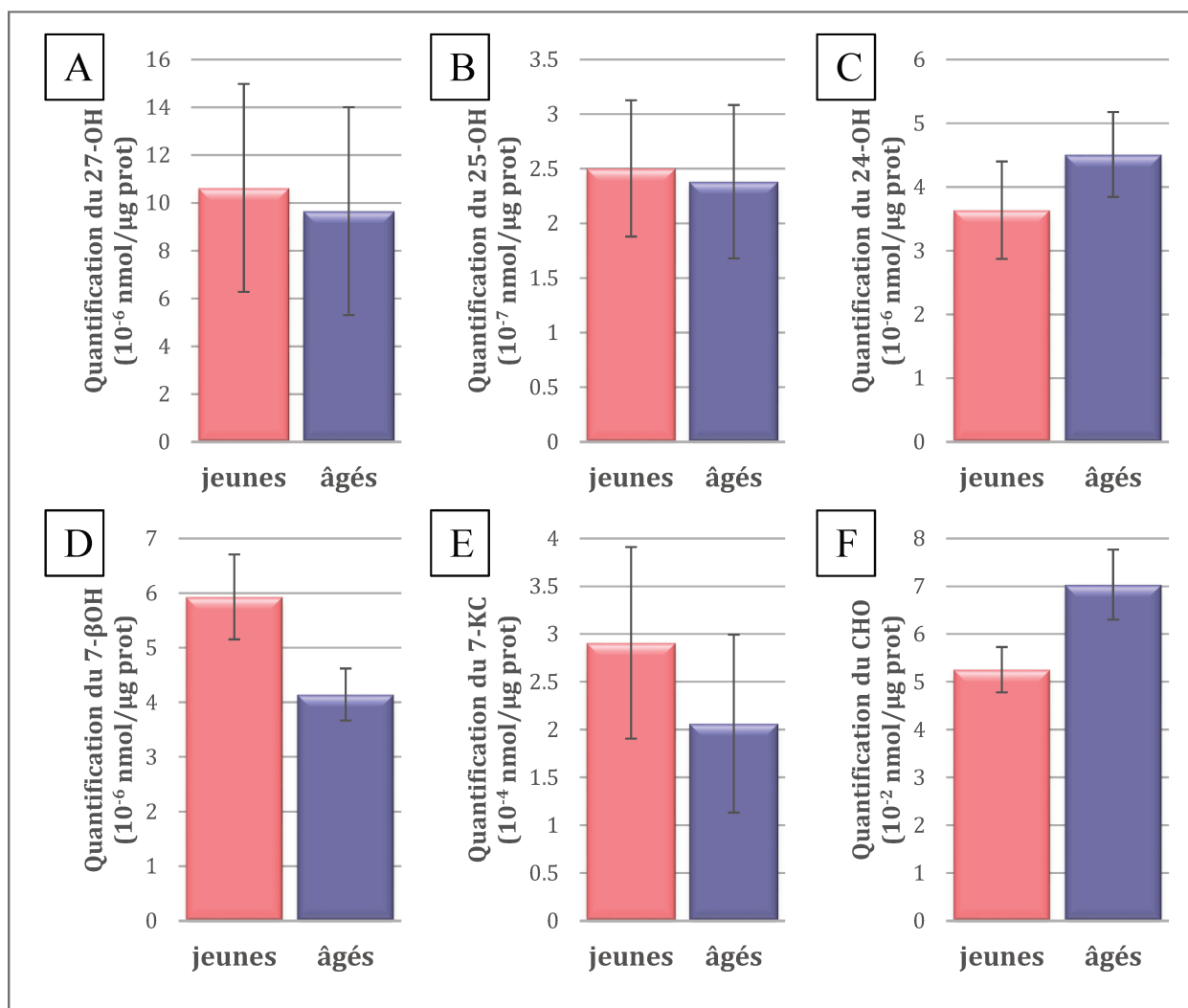


Figure 42 : Quantification des stérols de kératinocytes issus de biopsies cutanées de patients jeunes et âgés (n=10) : 27-OH (A), 25-OH (B), 24-OH (C), 7-βOH (D), 7-KC (E) et cholestérol (F).

Les taux d'oxystérols semblent comparables entre les kératinocytes « jeunes » et « âgés ». Globalement, l'oxystérol le plus abondant dans les kératinocytes primaires, parmi ceux étudiés, est le 7-KC. Le taux de 7-βOH est plus faible dans les kératinocytes « âgés » que dans les kératinocytes « jeunes » et c'est l'inverse pour le cholestérol, mais ces différences ne sont pas statistiquement significatives du fait d'une grande variabilité des résultats. En effet, les intervalles de confiance à 95% sont très étendus ; à titre d'exemple, l'intervalle de confiance à 95% est compris entre 0,60 et 20,65 10^{-6} nmol/μg de protéines pour la quantification du 27-OH chez les donneurs « jeunes », et entre -1,94 et 6,07 10^{-4} nmol/μg de protéines pour le 7-KC chez les donneurs « âgés ».

2.1.2. Effet d'une irradiation UV sur le taux de stérols dans les kératinocytes « jeunes » et « âgés »

Dans les mêmes kératinocytes « jeunes » et « âgés », nous avons quantifié les mêmes stérols avant et après irradiation reproduisant le rayonnement UV du spectre solaire. Nous nous sommes basée sur les travaux de Marionnet *et al.* qui ont montré que la dose d'UV journalière au mois d'avril dans le monde est comprise entre 11 et 70 J/cm². Notre modèle d'exposition étant un modèle d'exposition à dose unique d'UV, nous avons choisi une dose UV de 2,5 J/cm².

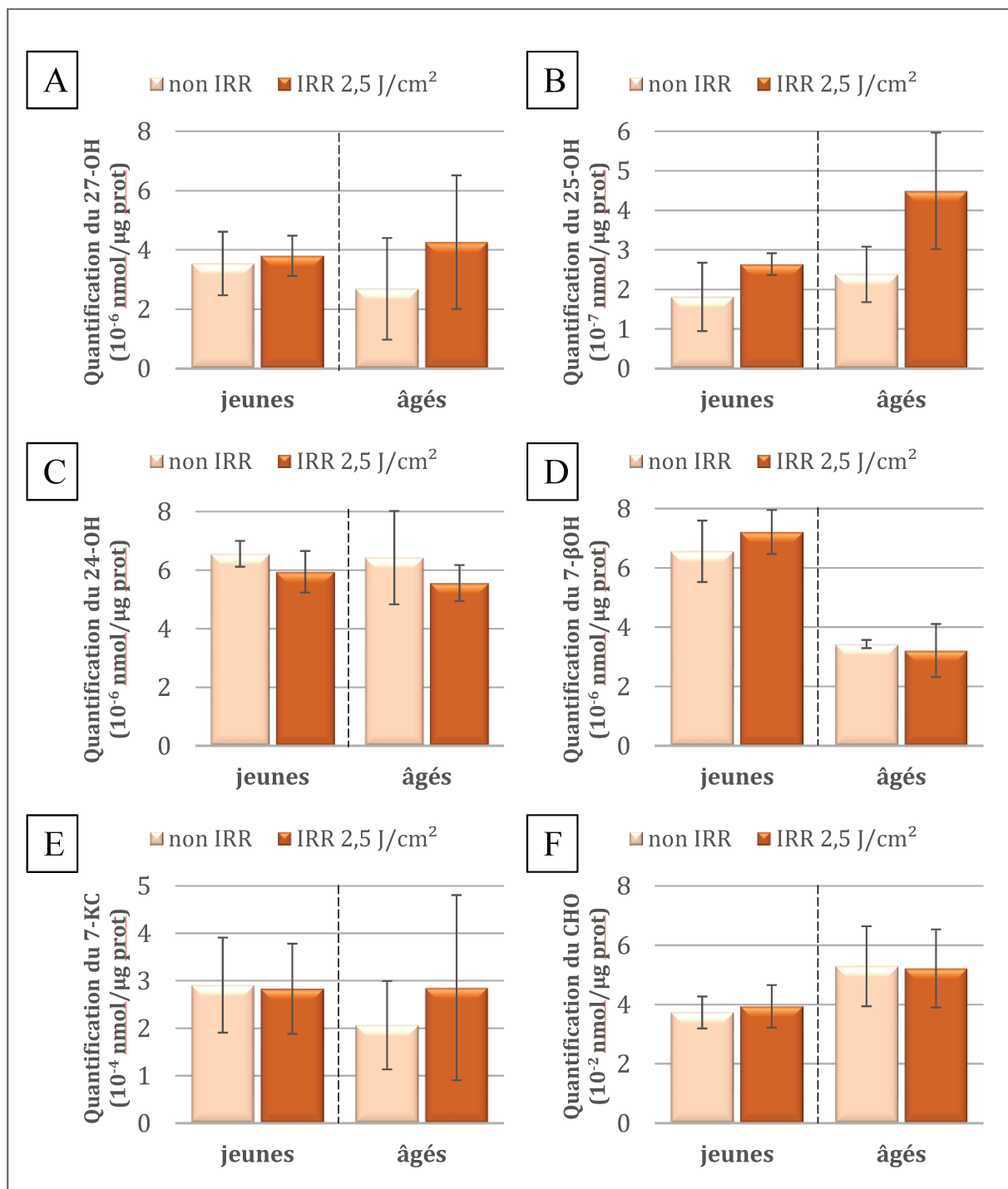


Figure 43 : Quantification des stérols de kératinocytes primaires issus de donneurs jeunes et âgés après irradiation avec une dose UV de 2,5 J/cm², (n=3) : 27-OH (A), 25-OH (B), 24-OH (C), 7-βOH (D), 7-KC (E) et cholestérol (F).

Les taux d'oxystérols et de cholestérol ne sont globalement pas modifiés après irradiation avec une dose d'UV de 2,5 J/cm², que ce soit dans les kératinocytes « jeunes » ou « âgés ». Seul le taux de 25-OH est augmenté après irradiation UV et cette

augmentation est plus marquée dans les kératinocytes « âgés ». Ces résultats ne sont toutefois pas statistiquement significatifs du fait d'une grande variabilité. Les intervalles de confiance à 95% sont très larges, par exemple de -5,54 à 11,25 10^{-4} nmol/ μ g de protéines pour la quantification du 7-KC dans les kératinocytes âgés irradiés.

En résumé :

- le cholestérol est plus élevé dans les kératinocytes issus des sujets « âgés » que dans ceux des sujets jeunes,
- le 7-KC est l'oxystérol le plus abondant dans les kératinocytes,
- l'irradiation UV augmente le taux de 25-OH.

Néanmoins, l'importante variabilité rencontrée dans la quantification des oxystérols dans des kératinocytes issus de biopsies cutanées peut masquer certains effets du rayonnement UV sur le taux d'oxystérols et biaiser l'interprétation des résultats. Par conséquent, nous nous sommes orientée vers un modèle de kératinocytes humains établi, la lignée cellulaire HaCaT.

2.2. Modifications du profil lipidique après irradiation UV sur lignée de kératinocytes humains HaCaT

Nous avons comparé les profils lipidiques de kératinocytes HaCaT avant et après irradiation avec le rayonnement UV du spectre solaire. Deux doses d'exposition au rayonnement UV ont été choisies : 1 J/cm² et 2,5 J/cm². Nous avons effectué d'abord une analyse du profil lipidique global puis une analyse ciblée sur le cholestérol et certains de ses produits d'oxydation : les oxystérols.

2.2.1. Approche globale

Les lipides contenus dans les cellules HaCaT avant et après irradiation sont analysés par HPLC-HRMS. En premier lieu, un traitement statistique non ciblé avec la méthode d'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisé avec les deux doses d'irradiation UV. Les résultats sont représentés de façon graphique sous forme de score plot 2D. Ces scores plots permettent une visualisation aisée d'une différence éventuelle entre les cellules irradiées et non irradiées.

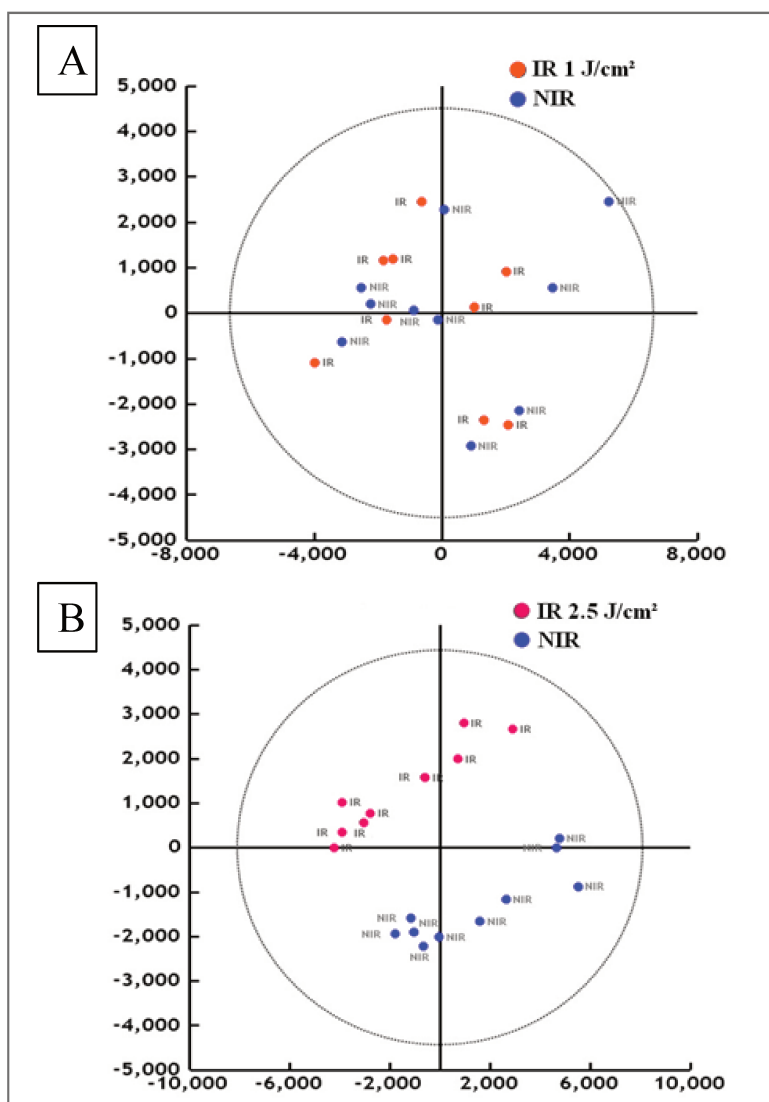


Figure 44 : Analyse des profils lipidiques avant et après irradiation UV. Les résultats sont présentés sous forme de scores plots créés à partir du modèle généré par ACP entre les kératinocytes HaCaT irradiés (IR) à 1 J/cm² (A) et 2,5 J/cm² (B) versus kératinocytes non irradiés (NIR), (n=10).

Suite à l'exposition des kératinocytes HaCaT à un rayonnement UV de 1 J/cm², aucune séparation n'est observée entre les cellules irradiées et les cellules non irradiées (figure 44A). En revanche, après une exposition à la dose de 2,5 J/cm², une séparation nette est observée entre les cellules irradiées et les cellules non irradiées (figure 44B).

Par conséquent, l'exposition à une dose de rayonnement UV de 2,5 J/cm² induit une modification du profil lipidique des kératinocytes HaCaT. Nous avons ensuite

analysé les classes de lipides concernées par cette modification. Ces classes sont répertoriées dans le tableau III.

		% UR	% DR
Céramides (Cer)	Cer	91 (8)	36 (1)
	GlcCer	49 (6)	39 (2)
	LacCer	32 (2)	
Phosphatidylcholines (PC)	PC	52 (10)	
	PC-P	21 (2)	40 (5)
Phosphatidyléthanolamines (PE)	PE	43 (12)	34 (1)
	PE-P	44 (7)	31 (2)
Sphingomyélines (SM)	SM		35 (11)

Tableau III : Classes de lipides modifiés dans les kératinocytes HaCaT suite à une irradiation UV de 2,5 J/cm². Les valeurs correspondent au pourcentage moyen de sur-régulation (UR) ou de sous-régulation (DR) et les valeurs entre parenthèses font état du nombre d'espèces sur-régulées ou sous-régulées pour chaque classe de lipides. GlcCer :

Galactosylcéramides, LacCer : Lactosylcéramide, PC-P : Phosphatidylcholine-Plasmalogène, PE-P : Phosphatidyléthanolamine-Plasmalogène

Une augmentation des céramides, des phosphatidyléthanolamines et des phosphatidylcholines est observée ainsi qu'une diminution des sphingomyélines et phosphatidylcholine-plasmalogène. Le détail des formules chimiques et des variations relatives est présenté dans l'annexe C.

2.2.2. Approche ciblée : les oxystérols

Un dosage ciblé a été effectué afin d'observer l'impact de l'irradiation UV sur le contenu en oxystérols des kératinocytes HaCaT. Nous avons quantifié le cholestérol et cinq oxystérols : le 7-bêtahydroxycholestérol (7-βOH), le 7-kétocholestérol (7-KC), le 24-hydroxycholestérol (24-OH), le 25-hydroxycholestérol (25-OH) et le 27-hydroxycholestérol (27-OH) avant et après irradiation avec les deux mêmes doses de rayonnement UV que dans l'expérience précédente (1 J/cm² et 2,5 J/cm²).

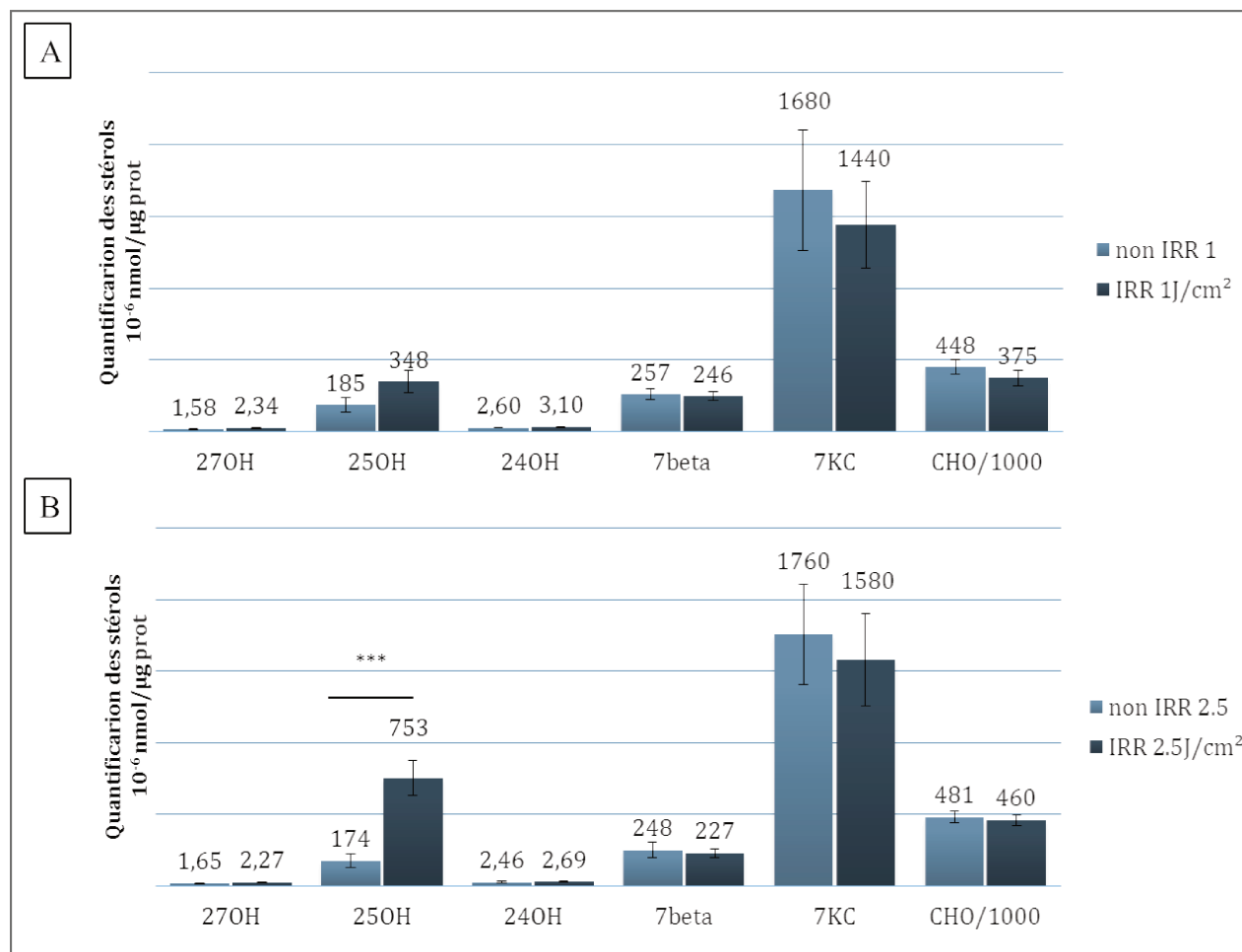


Figure 45 : Quantification des stérols avant et après irradiation des kératinocytes HaCaT à deux doses d'UV différentes : 1 J/cm² (A) et 2,5 J/cm² (B), ***p<0,001 comparé aux cellules non-irradiées, (n=10).

Comme dans les kératinocytes issus de biopsies cutanées, le 7-KC est l'oxystérol le plus abondant dans les kératinocytes de la lignée HaCaT. Le taux de cet oxystérol n'est pas modifié par l'irradiation UV. Une augmentation statistiquement significative du taux de 25-OH est observée après irradiation des HaCaT à 1J/cm² (figure 45A) et à 2,5 J/cm² (figure 45B). Cette augmentation est UV dose-dépendante. Les taux des autres oxystérols étudiés (27-OH, 24-OH, 7beta) ainsi que celui du cholestérol ne sont pas modifiés significativement après irradiation UV, quelle que soit la dose utilisée.

D'après la littérature, les lipides sont particulièrement impactés lors des processus dégénératifs (Di Paolo and Kim, 2011; Ebrahimi and Handa, 2011). Or, peu d'études portent sur l'altération des lipides membranaires au cours du processus dégénératif induit lors du photovieillissement de la peau. Aussi avons-nous porté une attention toute particulière aux modifications lipidiques susceptibles d'être induites au cours du photovieillissement sur des modèles de kératinocytes. Tout d'abord, nous avons travaillé sur des kératinocytes issus de biopsies pratiquées sur des donneurs jeunes et « âgés » pour comparer les taux d'oxystérols en fonction de l'âge. En effet, les oxystérols sont des lipides connus pour leur implication dans les processus de dégénérescence tels que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou la DMLA, comme nous l'avons décrit dans la partie précédente portant sur la rétine. Le premier modèle de kératinocytes que nous avons choisi, la culture primaire, s'est révélé insatisfaisant du fait d'une très grande variabilité dans les résultats obtenus d'un individu à l'autre et d'une série d'expériences à l'autre. Les cultures primaires de kératinocytes représentent un modèle de choix, car ces cellules ne sont pas modifiées et sont, qui plus est, très proches des cellules *in vivo*. Cependant, outre la quantité limitée de ces cellules, nous ne connaissons pas le statut d'exposition solaire des donneurs. Ces inconvénients limitent donc leur utilisation dans le cadre de notre étude. Néanmoins, nous avons pu observer quelques éléments intéressants. D'après nos résultats, le taux de cholestérol est plus élevé dans les kératinocytes provenant de donneurs « âgés » que dans ceux issus de donneurs jeunes. Cette observation est en cohérence avec les données disponibles dans la littérature qui font état d'une augmentation des taux de cholestérol avec l'âge, notamment dans le plasma (Parini et al., 1999). Suite à l'irradiation UV, une tendance à l'augmentation des taux de 25-OH dans les kératinocytes issus de donneurs jeunes et « âgés » est observée. Cette augmentation semble plus importante chez les sujets « âgés ».

Pour corroborer ces résultats, nous avons mené ces mêmes investigations sur la lignée de kératinocytes humains HaCaT. Cette lignée, spontanément immortalisée, constitue un bon modèle d'étude des altérations lipidiques car elle contient les mêmes lipides majeurs et dans les mêmes proportions que les kératinocytes *in vivo* (Schürer et al., 1993). L'utilisation d'une lignée cellulaire de kératinocytes, plus stable qu'une culture primaire issue de biopsies de différents patients, nous a permis d'obtenir des résultats plus reproductibles et, par conséquent, statistiquement significatifs. Ceci nous

a encouragé à aller plus en avant dans nos investigations. Nous nous sommes donc intéressée à l'impact de l'irradiation UV non seulement sur les oxystérols, mais également sur d'autres lipides. Après irradiation UV, une augmentation du contenu en céramides a été observée. Ces résultats que nous avons obtenus sur kératinocytes complètent ceux de Wefers qui a observé la même chose sur cornéocytes (Wefers et al., 1991). Nous avons également observé une diminution des sphingomyélines ainsi qu'une augmentation des phosphatidylcholines. Or, les sphingomyélines peuvent être métabolisées par les sphingomyélinases formant alors des céramides et des phosphocholines, intermédiaires des phosphatidylcholines. Cette métabolisation tend ainsi à augmenter le taux de céramides. Il est important de préciser que les céramides ont été associées à des processus dégénératifs (Chen et al., 2012; Cutler et al., 2004).

Notre analyse quantitative des oxystérols montre que le 7-KC est l'oxystérol le plus abondant dans les biopsies, quel que soit l'âge du donneur, ainsi que dans la lignée de kératinocytes humains HaCaT. Rappelons que c'est également le cas dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, comme nous l'avons relaté dans le chapitre précédent. Ainsi, le 7-KC apparaît comme étant un oxystérol ubiquitaire des membranes cellulaires. Après irradiation UV, le résultat le plus significatif que nous avons observé est l'augmentation du 25-OH dans les kératinocytes HaCaT.

Ces résultats mettent en exergue le rôle des lipides dans les processus dégénératifs de photovieillessement. Parmi ces lipides, les oxystérols, en particulier le 25-OH, semblent jouer un rôle central. En conséquence, nous avons poursuivi nos travaux par l'étude des effets des oxystérols sur la lignée de kératinocytes HaCaT.

2.3. Evaluation des effets des oxystérols sur la lignée de kératinocytes HaCaT

Lors de la quantification des oxystérols après irradiation UV, il est apparu que le 25-OH était l'oxystérol dont le taux était le plus augmenté dans les kératinocytes HaCaT. Le 7-KC est, quant à lui, l'oxystérol le plus abondant dans les kératinocytes, que ce soit dans la lignée HaCaT ou dans les cultures primaires. Nous avons donc étudié, sur les kératinocytes HaCaT, les effets de ces deux oxystérols sur différents marqueurs dans le but de mieux comprendre leur rôle dans les mécanismes de dégénérescence cutanée.

2.3.1. Evaluation de la viabilité cellulaire après incubation avec les oxystérols

En premier lieu, nous avons évalué la viabilité des kératinocytes HaCaT après incubation avec les oxystérols afin de déterminer une gamme de concentrations pour la suite des tests.

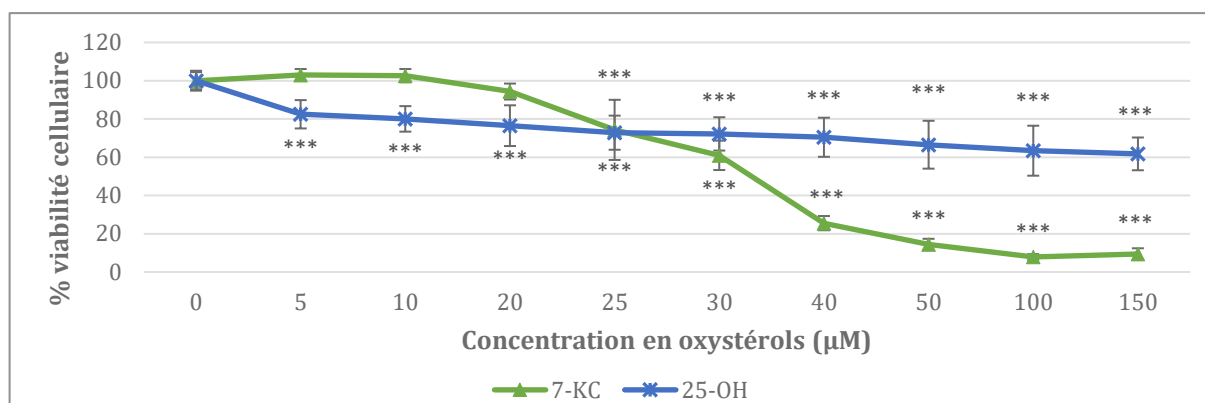


Figure 46 : Evaluation de la viabilité cellulaire par le test au rouge neutre après 48 heures d'incubation avec des oxystérols, *** $p < 0,001$ comparé au milieu de culture (n=12)

Le pourcentage de viabilité cellulaire dans le milieu de culture (témoin négatif) est fixé à 100. Selon la norme de l'organisation internationale ISO 10993-5 pour l'évaluation biologique des dispositifs médicaux, les produits sont considérés comme cytotoxiques au-delà d'une perte de viabilité de 30%. Certes, les oxystérols ne sont pas des dispositifs médicaux, mais en l'absence de consensus, nous avons décidé de nous baser sur cette norme. Après 48 heures d'incubation, le 7-KC induit une perte de viabilité statistiquement significative à partir de la concentration de 25 µM. Cependant, cette perte de viabilité n'est supérieure à 30% qu'à partir de 30 µM. Le 25-OH induit une perte de viabilité supérieure à 30% pour des concentrations supérieures à 40 µM.

Dans ces conditions, nous avons fixé pour la suite de notre étude les concentrations comprises entre 5 et 20 µM pour le 7-KC et entre 5 et 40 µM pour le 25-OH.

2.3.2. Quantification de l'assimilation du 7-KC et du 25-OH dans les kératinocytes

Avant d'étudier les effets cellulaires du 7-KC et du 25-OH, il nous a fallu vérifier l'assimilation de ces oxystérols par les kératinocytes lors d'un apport exogène. Pour cela, nous avons dans un premier temps dosé par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS-HRMS) le 7-KC et le 25-OH dans les kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC aux concentrations minimales et maximales préalablement fixées à 5 et 20 μM ainsi qu'avec le 25-OH à une concentration faible (10 μM) et une concentration forte (40 μM).

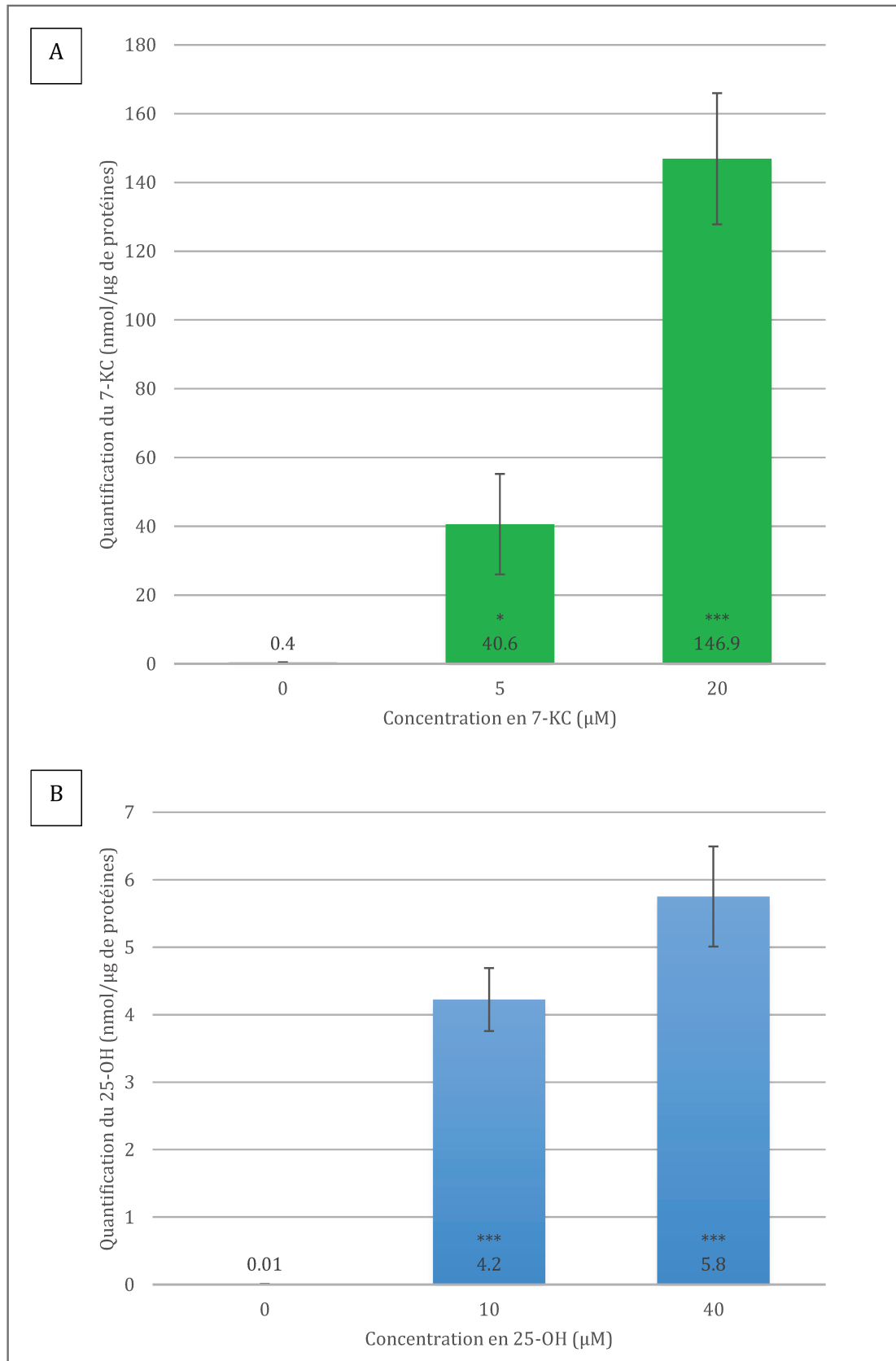


Figure 47 : Dosage du 7-KC (A) et du 25-OH (B) dans les cellules HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC à 5 et 20 μM ou le 25-OH à 10 et 40 μM, * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ comparé au milieu de culture (n=3)

Une augmentation concentration-dépendante et statistiquement significative du taux de 7-KC ou de 25-OH a été observée dans les kératinocytes après 48 heures d'incubation avec ces oxystérois.

Les membranes cellulaires sont constituées d'une bicouche lipidique comprenant majoritairement des lipides dits « polaires » tels que les phospholipides ou les sphingolipides, mais aussi des lipides dits « neutres » tels que les triglycérides. Ce rapport peut être modifié notamment dans les processus dégénératifs. Ainsi, dans un second temps, nous avons mesuré les modifications du rapport lipides polaires sur lipides neutres.

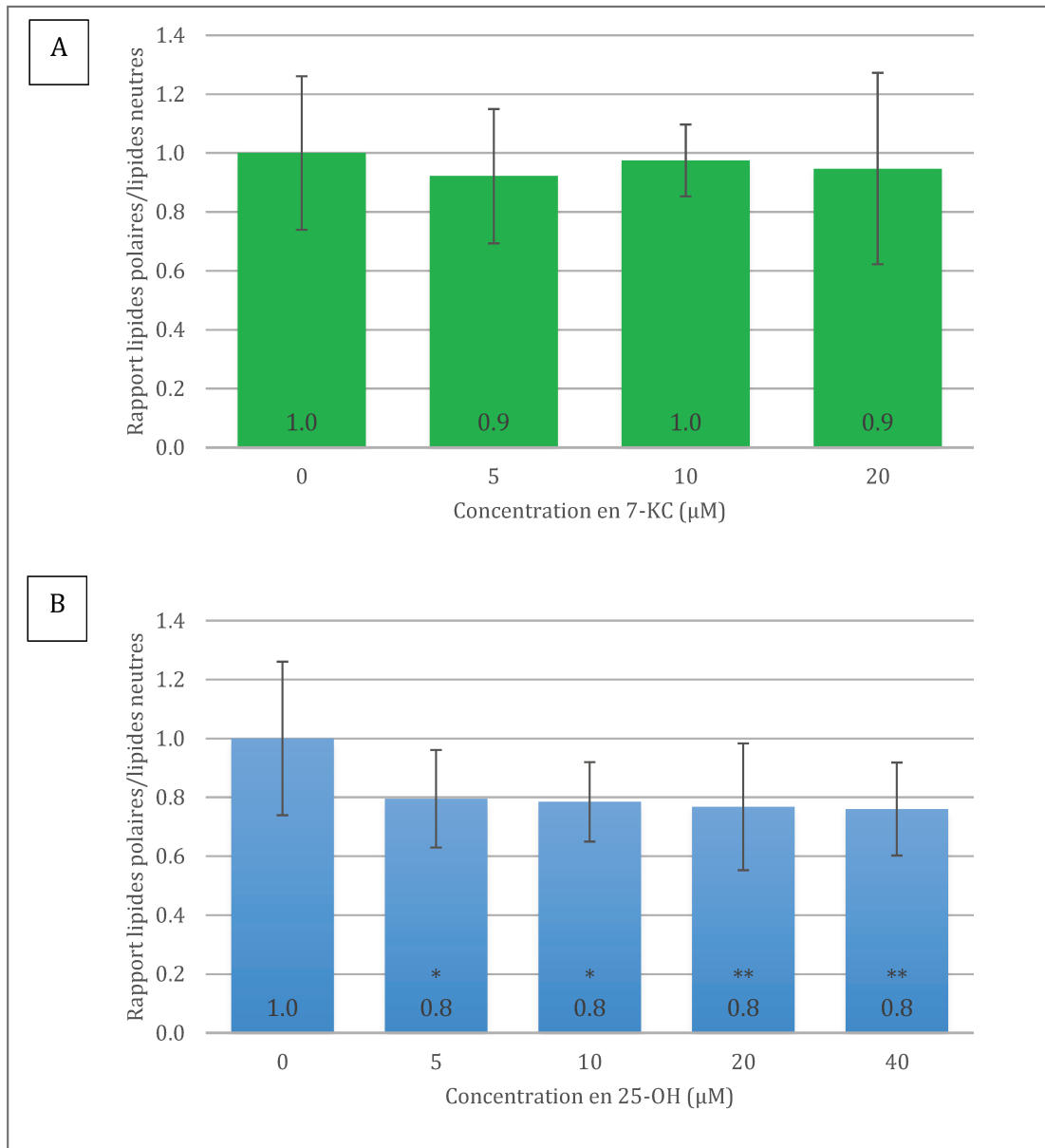


Figure 48 : Altérations lipidiques induites par le 7-KC (A) et le 25-OH (B) après 48 heures d'incubation avec les cellules HaCaT, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ comparé au milieu de culture (n=4)

Après 48 heures d'incubation avec le 7-KC, le rapport lipides polaires/lipides neutres demeure inchangé. En revanche, après 48 heures d'incubation avec le 25-OH, une diminution statistiquement significative du rapport lipides polaires/lipides neutres est observée.

Enfin dans un troisième temps, nous avons étudié l'asymétrie lipidique de la membrane plasmique avec la sonde F2N12S. La composition lipidique des deux feuillet

de la membrane plasmique diffère : les sphingomyélines et les phosphatidylcholines sont majoritairement situées sur le feuillet externe tandis que les phosphatidylsérines et les phosphatidyléthanolamines sont préférentiellement situées au niveau du feuillet interne. Des altérations dans la répartition des lipides au sein de la membrane sont associées aux processus de dégénérescence.

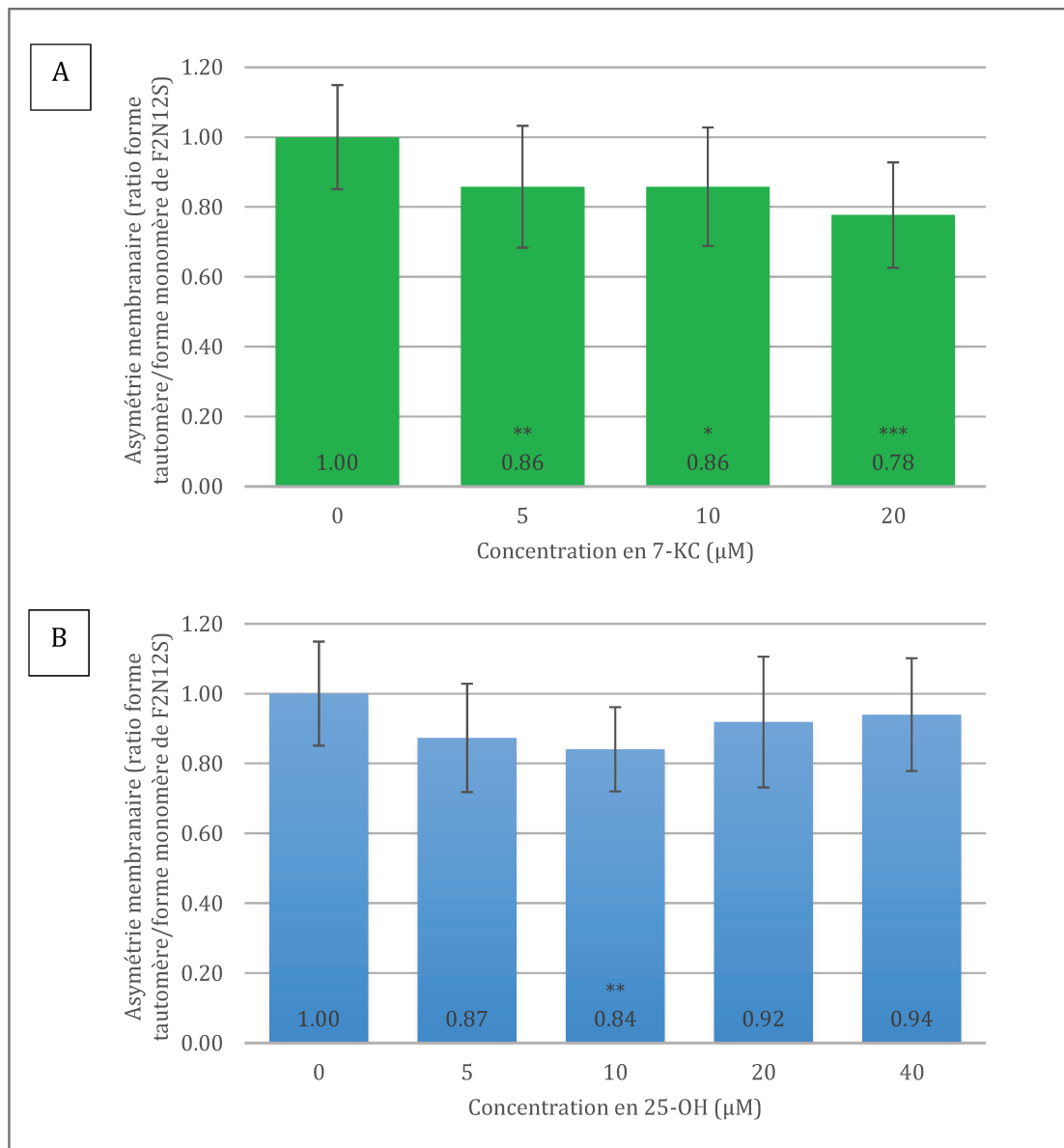


Figure 49 : Altérations de l'asymétrie lipidique membranaire induite par le 7-KC (A) et le 25-OH (B) après 48 heures d'incubation avec les cellules HaCaT, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ comparé au milieu de culture, (n=4)

L'asymétrie membranaire est modifiée de façon statistiquement significative après 48 heures d'incubation avec le 7-KC. Après 48 heures d'incubation avec le 25-OH, l'asymétrie membranaire est modifiée uniquement pour les faibles concentrations, cette altération est statistiquement significative pour la concentration de 10 μ M.

Au total, ces trois tests indiquent une assimilation des oxystérols par les kératinocytes qui se traduit par des altérations lipidiques membranaires. Ces résultats nous ont donc amenée à orienter la suite de nos expériences vers l'étude de zones spécifiques des membranes cellulaires riches en cholestérol, les radeaux lipidiques. Ces radeaux lipidiques, notamment les cavéoles, contiennent de nombreuses protéines transductrices du signal et de nombreux récepteurs tels que le récepteur P2X7.

2.3.3. Effets sur les radeaux lipidiques et leurs constituants protéiques

2.3.3.1. Les radeaux lipidiques

Nous avons étudié l'expression d'un composant exclusif des radeaux lipidiques, le ganglioside GM1, en ayant recours à la microscopie confocale.

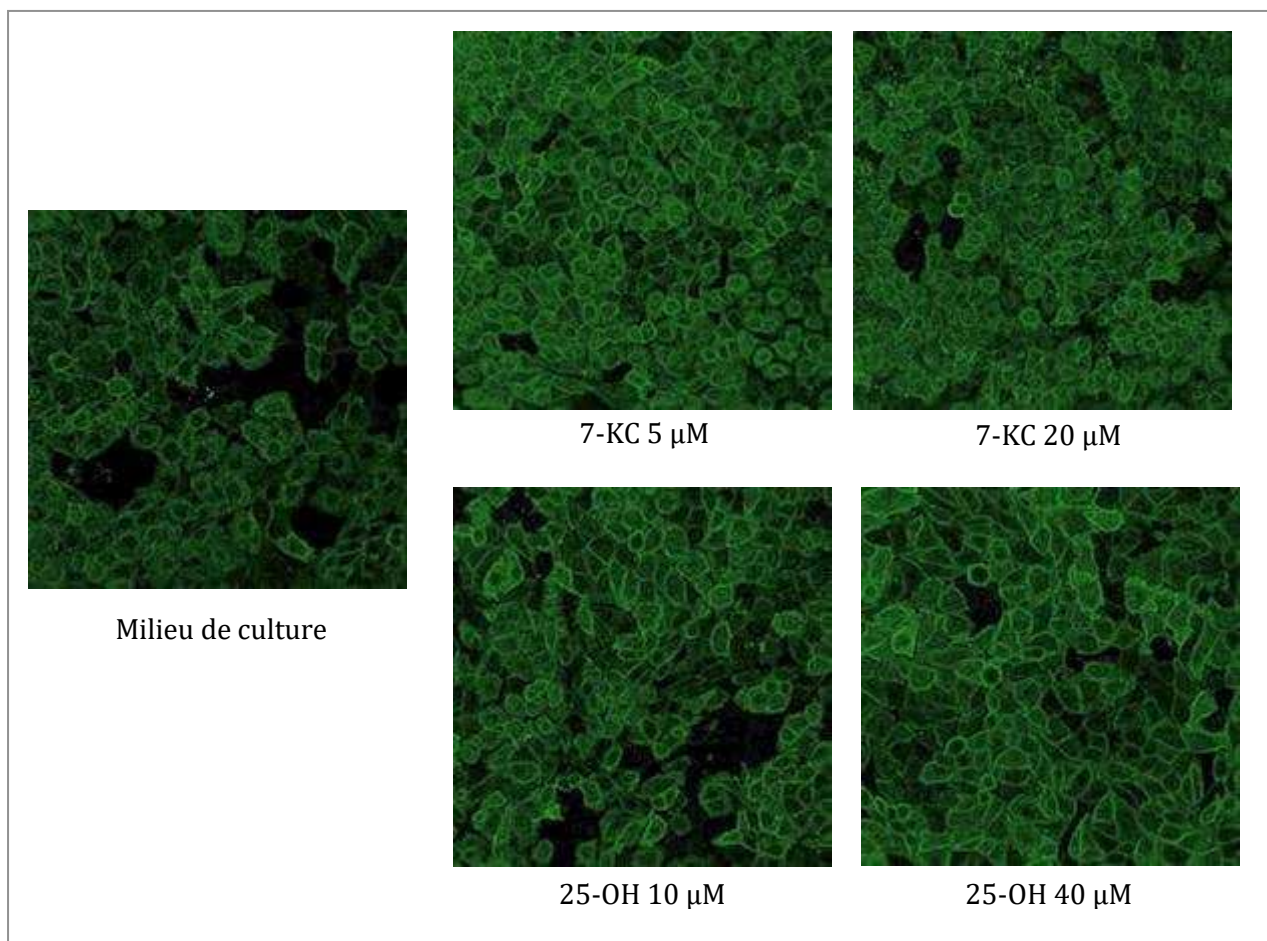


Figure 50 : Expression du ganglioside GM1, composant exclusif des radeaux lipidiques, après incubation avec le 7-KC et le 25-OH sur cellules HaCaT (photographies représentatives de trois expériences indépendantes)

L'expression du ganglioside GM1 des radeaux lipidiques est augmentée principalement avec le 25-OH et plus légèrement avec le 7-KC. Nous nous sommes ensuite intéressée à certains composants protéiques des radeaux lipidiques.

2.3.3.2. Cavéoline-1

L'expression de la cavéoline-1, protéine présente dans les cavéoles impliquées dans certains mécanismes d'endocytose, a été étudiée par cytométrie en flux.

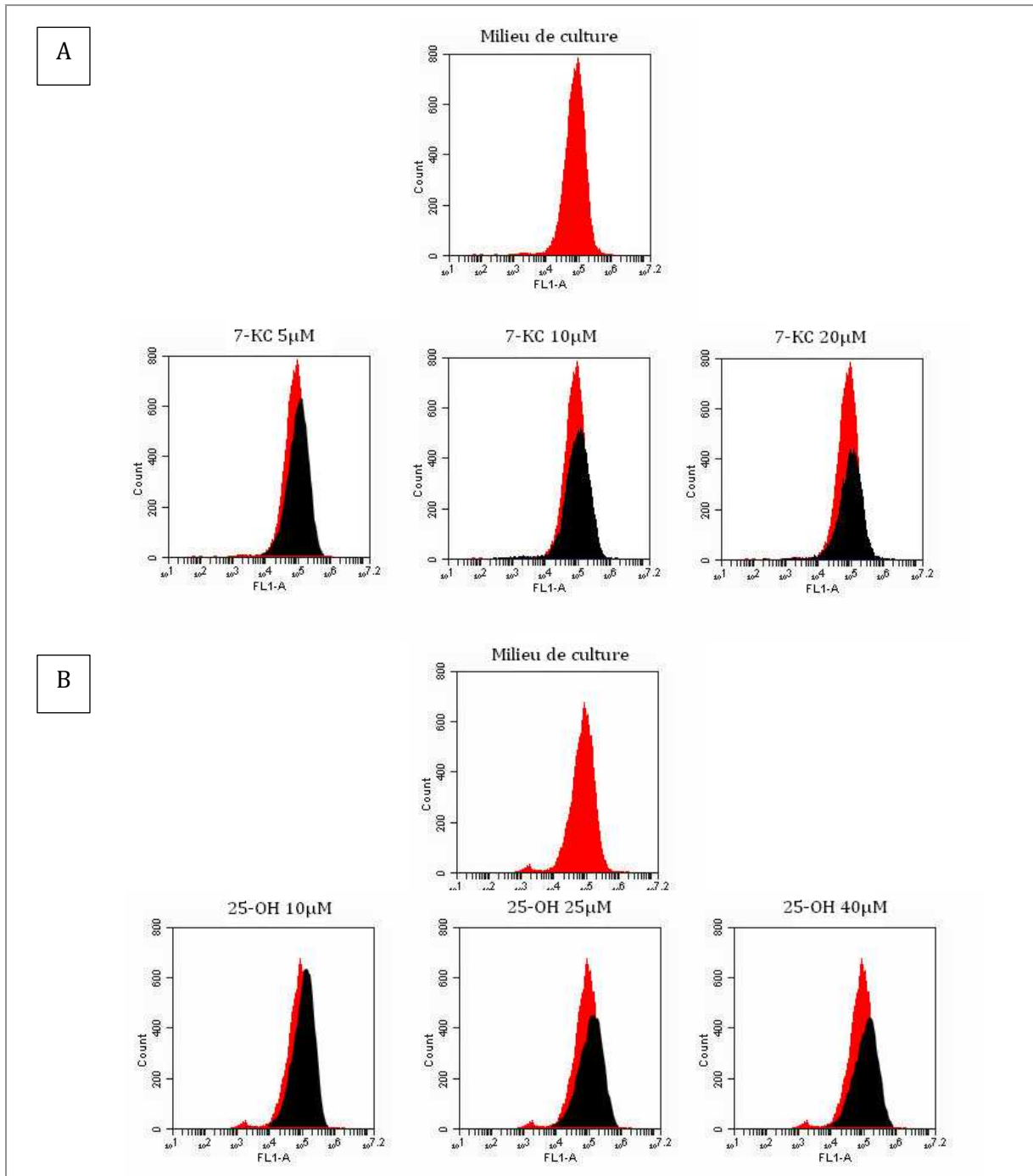


Figure 51 : Expression de la cavéoline-1 dans des cellules HaCaT incubées pendant 48 heures avec du 7-KC (A) ou du 25-OH (B). Les spectres sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH, un décalage vers la droite du spectre de fluorescence est observé, ce qui traduit une augmentation de l'expression de la cavéoline-1. La moyenne des intensités de fluorescence de trois expériences indépendantes est représentée sous forme de variation relative rapportée au témoin négatif dans les histogrammes ci-après :

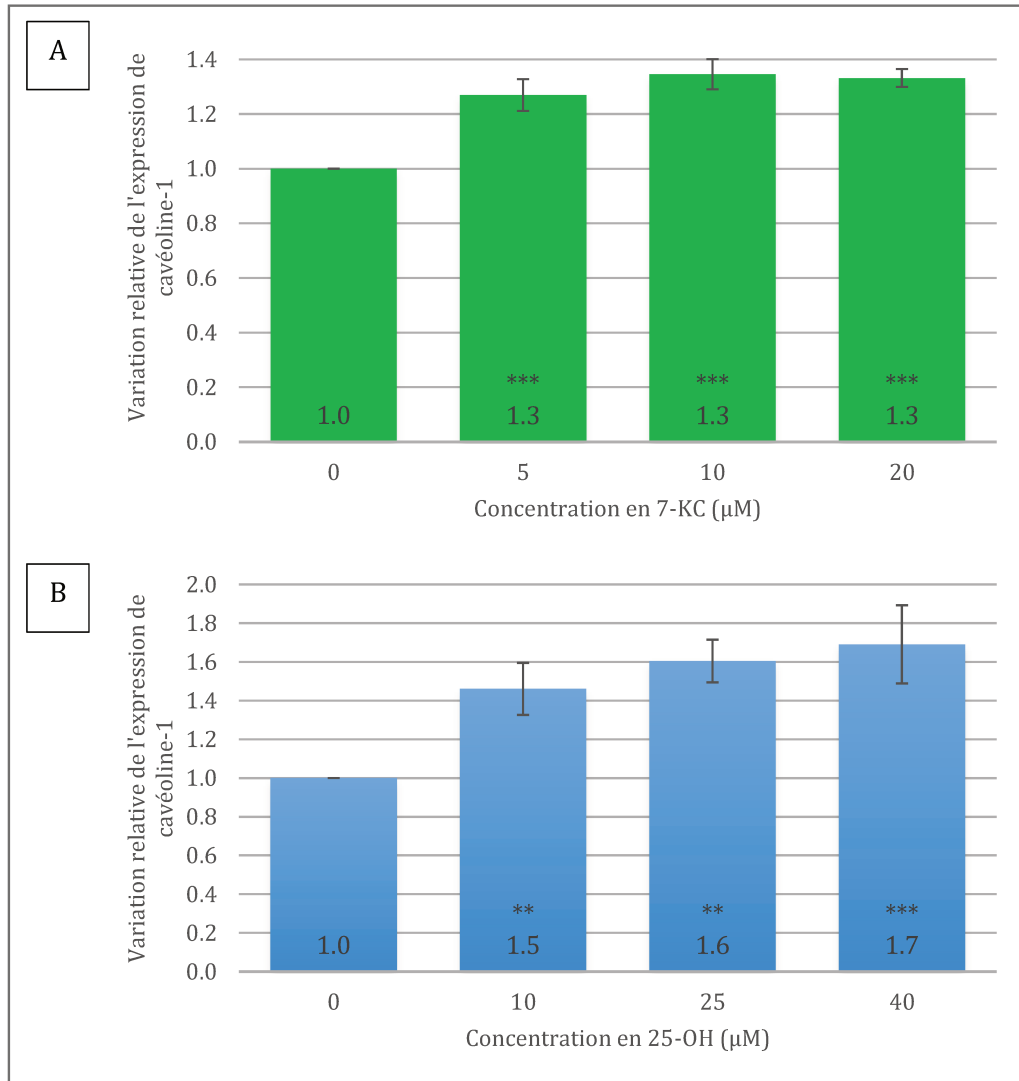


Figure 52: Quantification de l'expression de la cavéoline-1 dans des cellules HaCaT incubées pendant 48 heures avec du 7-KC (A) ou du 25-OH (B), ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ comparé au milieu de culture, (n=3)

Une augmentation statistiquement significative de l'expression globale de la cavéoline-1 a été observée après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH. La cavéoline-1 est localisée principalement dans la membrane plasmique, mais elle est

également présente au niveau des organites cellulaires. Afin de visualiser l'expression de la cavéoline-1 après incubation avec le 7-KC et le 25-OH, nous avons observé cette protéine en microscopie confocale.

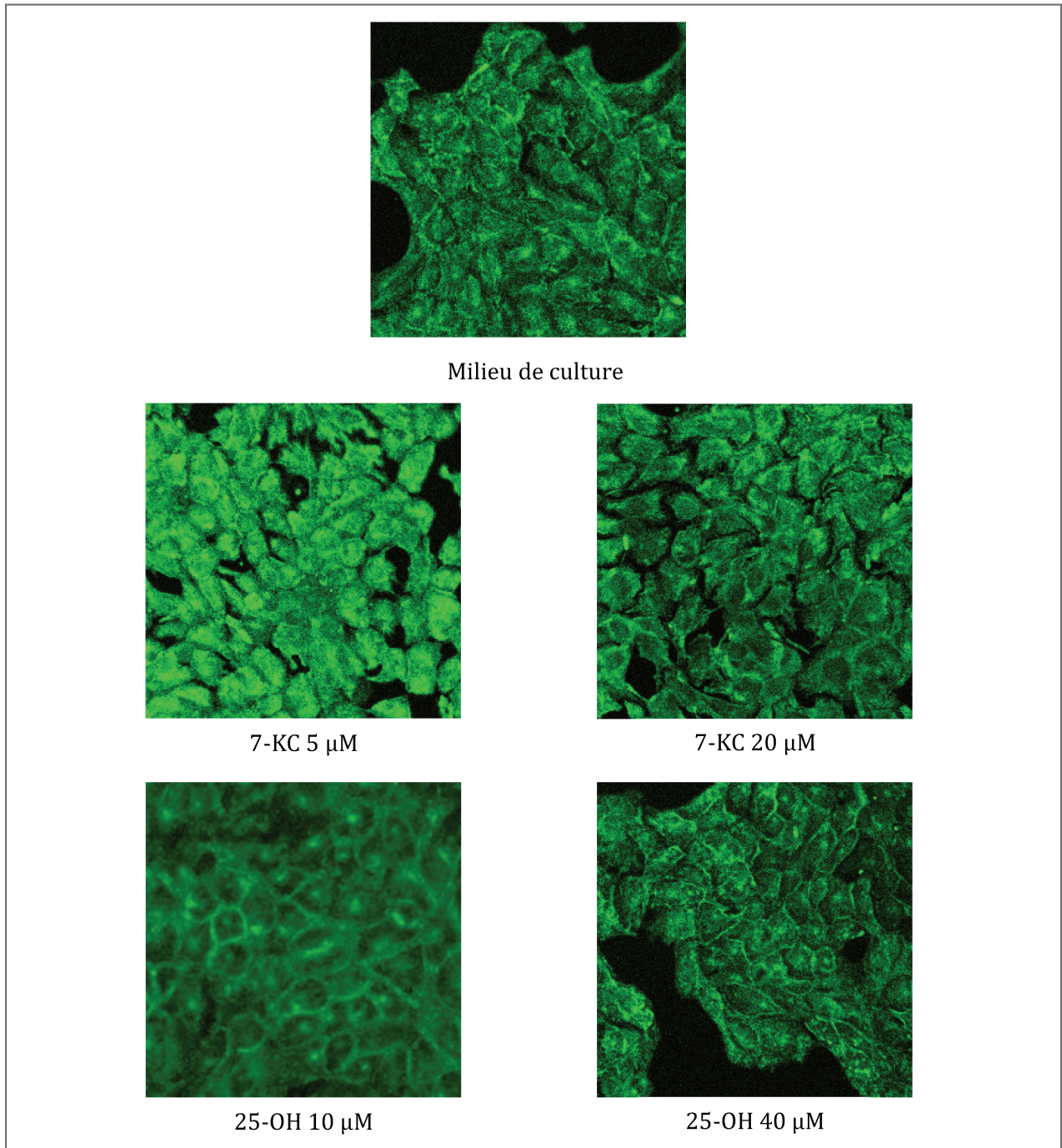


Figure 53 : Localisation cellulaire de la cavéoline-1 dans les kératinocytes HaCaT incubés pendant 48 heures avec du 7-KC ou du 25-OH (photographies représentatives de trois expériences indépendantes).

Lorsque les cellules sont incubées avec le milieu de culture (témoin négatif), la localisation de la cavéoline-1 est membranaire (membrane plasmique) et intracellulaire. Après incubation avec le 25-OH, l'expression de la cavéoline-1 est renforcée au niveau membranaire. De plus, son expression intracellulaire est plus ponctiforme avec le 25-OH 40 μ M. Après incubation avec le 7-KC, principalement à 5 μ M, la localisation de la cavéoline-1 semble plus intracellulaire qu'avec le milieu de culture.

L'expression de la cavéoline-1 est donc augmentée et délocalisée après incubation avec le 25-OH et le 7-KC.

2.3.3.3. Récepteurs P2X7

Lorsque la fonction pore cytolytique du récepteur P2X7 est activée, le récepteur P2X7 est localisé dans les radeaux lipidiques. En premier lieu, nous nous sommes intéressée à l'expression en immunocytochimie des récepteurs P2X7 après incubation avec le 25-OH et le 7-KC.

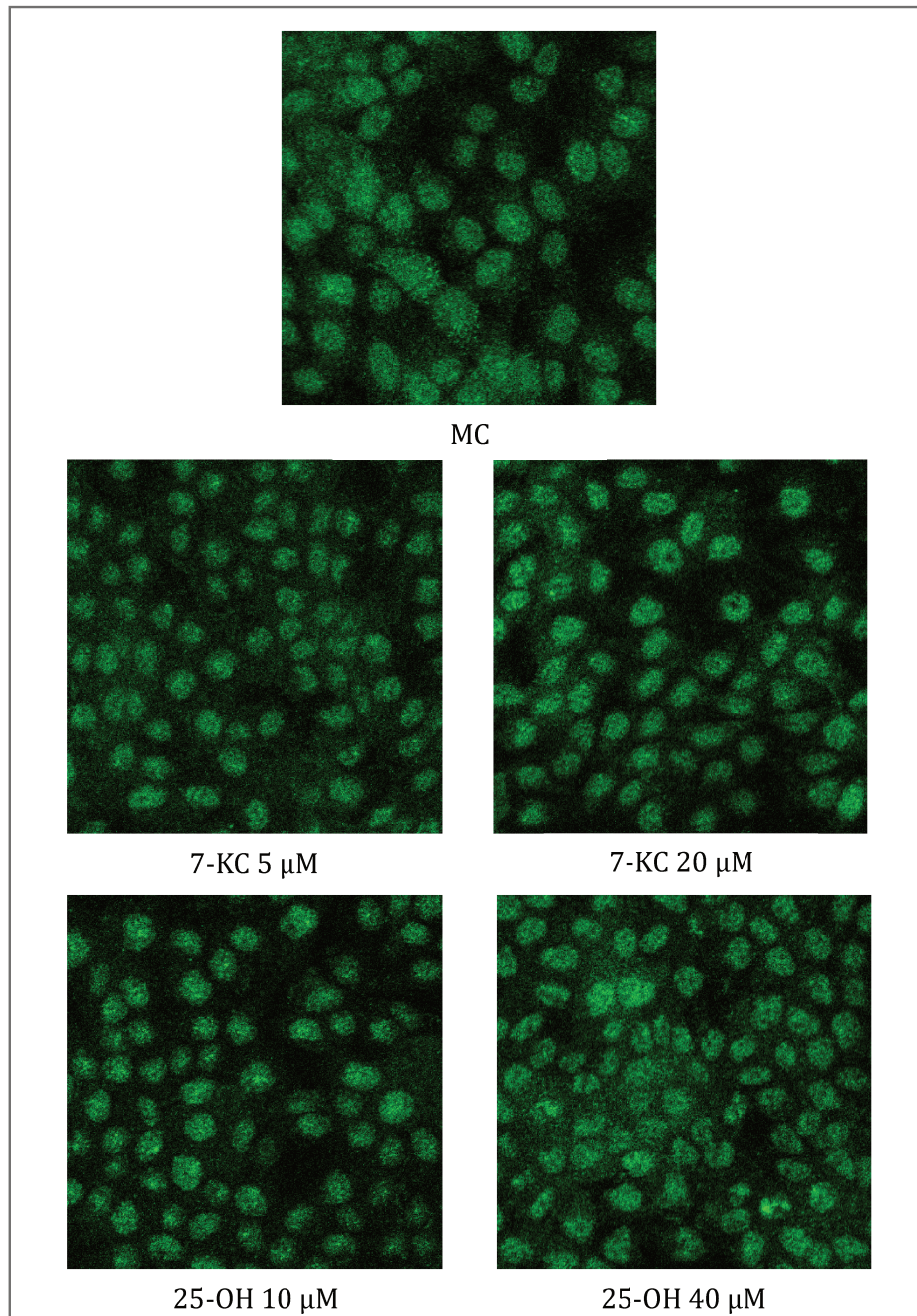


Figure 54 : Expression des récepteurs P2X7 dans les kératinocytes HaCaT incubés pendant 48 heures avec le 7-KC ou le 25-OH (photographies représentatives de trois expériences indépendantes).

L'expression des récepteurs P2X7 ne semble pas modifiée après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH. En effet, les récepteurs P2X7 sont exprimés au niveau de toute la cellule.

Comme nous l'avons vu précédemment, les récepteurs P2X7 ont la particularité de former un pore lorsqu'ils sont activés. Nous avons donc ensuite mesuré l'activation des récepteurs P2X7 après incubation avec le 7-KC ou le 25-OH.

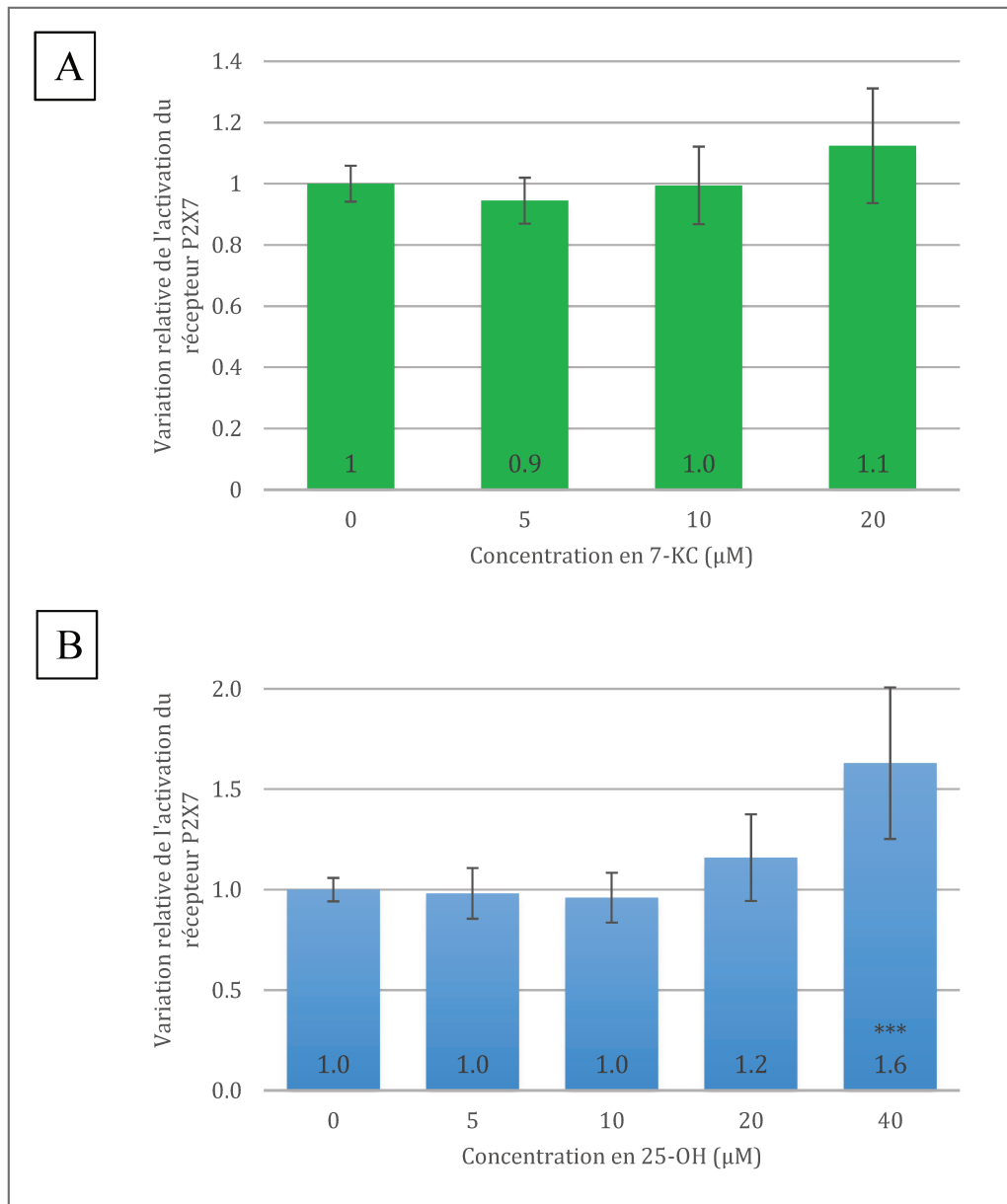


Figure 55 : Activation des pore P2X7 des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B) (n=5), ***p<0,001 comparé au milieu de culture

Aucune activation des récepteurs P2X7 n'est observée après 48 heures d'incubation avec le 7-KC. En revanche, le 25-OH induit l'activation des récepteurs P2X7 à partir de 20 μ M. Cette augmentation est statistiquement significative à 40 μ M.

Pour confirmer l'activation des récepteurs P2X7 par le 25-OH, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique des récepteurs P2X7, le BBG. Les kératinocytes HaCaT sont incubés avec le BBG puis avec le 25-OH aux mêmes concentrations que celles précédemment étudiées.

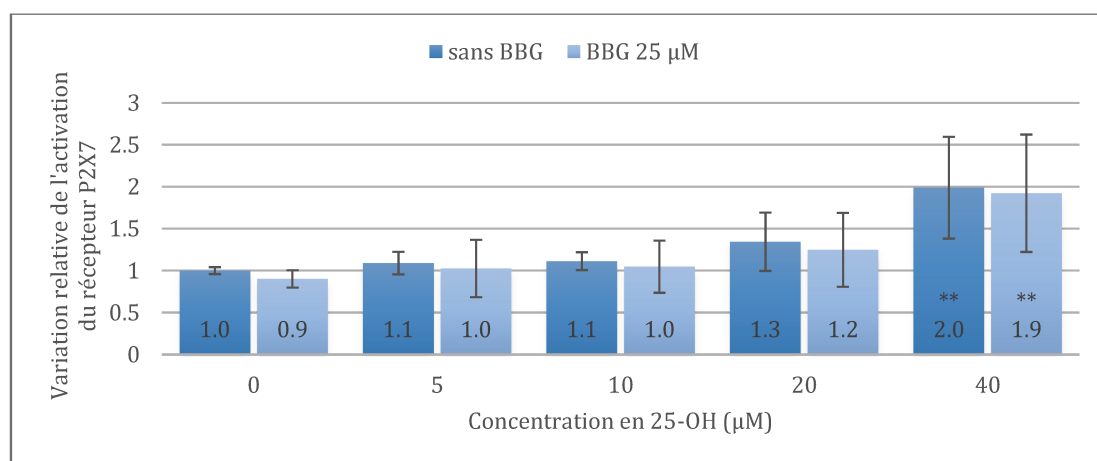


Figure 56 : Effets du BBG sur l'activation des récepteurs P2X7 après 48 heures d'incubation avec le 25-OH sur les kératinocytes HaCaT, (n=3) **p<0,01 comparé au milieu de culture

Le BBG, dans nos conditions expérimentales, n'inhibe pas l'activation des récepteurs P2X7 induite par le 25-OH. Nous avons donc testé un inhibiteur du canal pannexine-1 : le probénécide. En effet, le canal pannexine-1 peut former un complexe avec le récepteur P2X7, entraînant l'ouverture d'un pore.

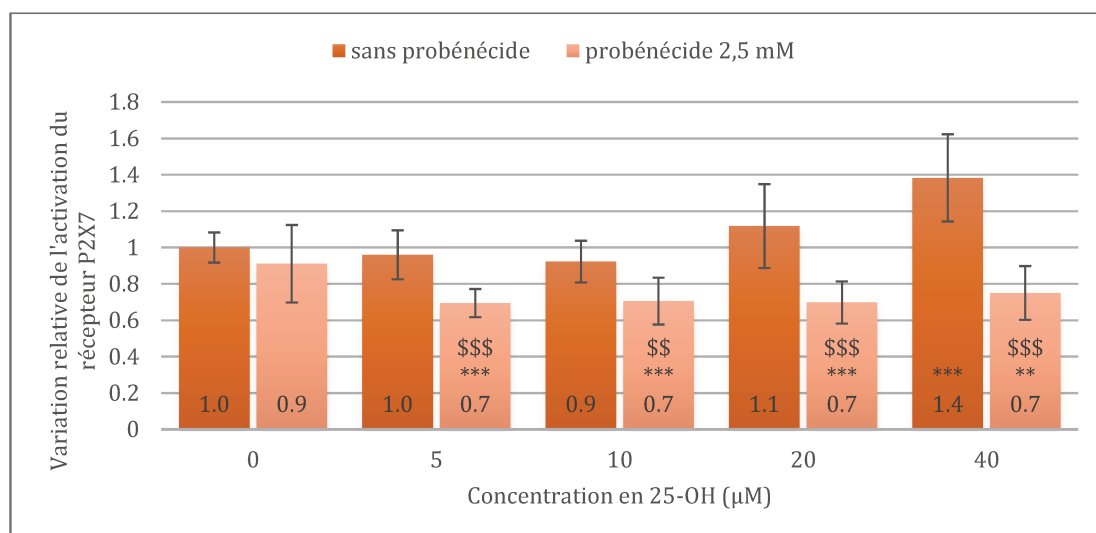


Figure 57 : Effets du probénécide sur l'activation des récepteurs P2X7 induite par le 25-OH après 48 heures d'incubation avec les kératinocytes HaCaT (n=4), **p<0,01 et ***p<0.001 comparé au milieu de culture \$\$\$p<0,001 comparé à la même concentration sans probénécide

Contrairement au BBG, le probénécide diminue significativement l'activation du récepteur P2X7 induite par le 25-OH. L'activation du récepteur P2X7 induite par le 25-OH est donc pannexine-1-dépendante.

En résumé, le 7-KC et le 25-OH induisent tous deux des modifications au niveau des radeaux lipidiques. Le 7-KC augmente l'expression intracellulaire de la cavéoline-1, tandis que le 25-OH en augmente l'expression membranaire et active le complexe membranaire P2X7-pannexine-1.

Les protéines contenues dans les radeaux lipidiques peuvent déclencher différentes voies de signalisation cellulaire conduisant selon les cas à l'inflammation ou à l'apoptose. Il devenait donc important d'étudier les effets du 7-KC et du 25-OH sur la réaction inflammatoire et des marqueurs de l'apoptose.

2.3.4. Evaluation de l'inflammation

Les récepteurs P2X7 sont associés aux phénomènes inflammatoires *via* l'activation de l'inflammasome, en particulier au niveau des cellules immunitaires. Aussi avons-nous étudié l'activité d'un composant majeur de l'inflammasome, la caspase 1, après incubation avec le 7-KC ou le 25-OH.

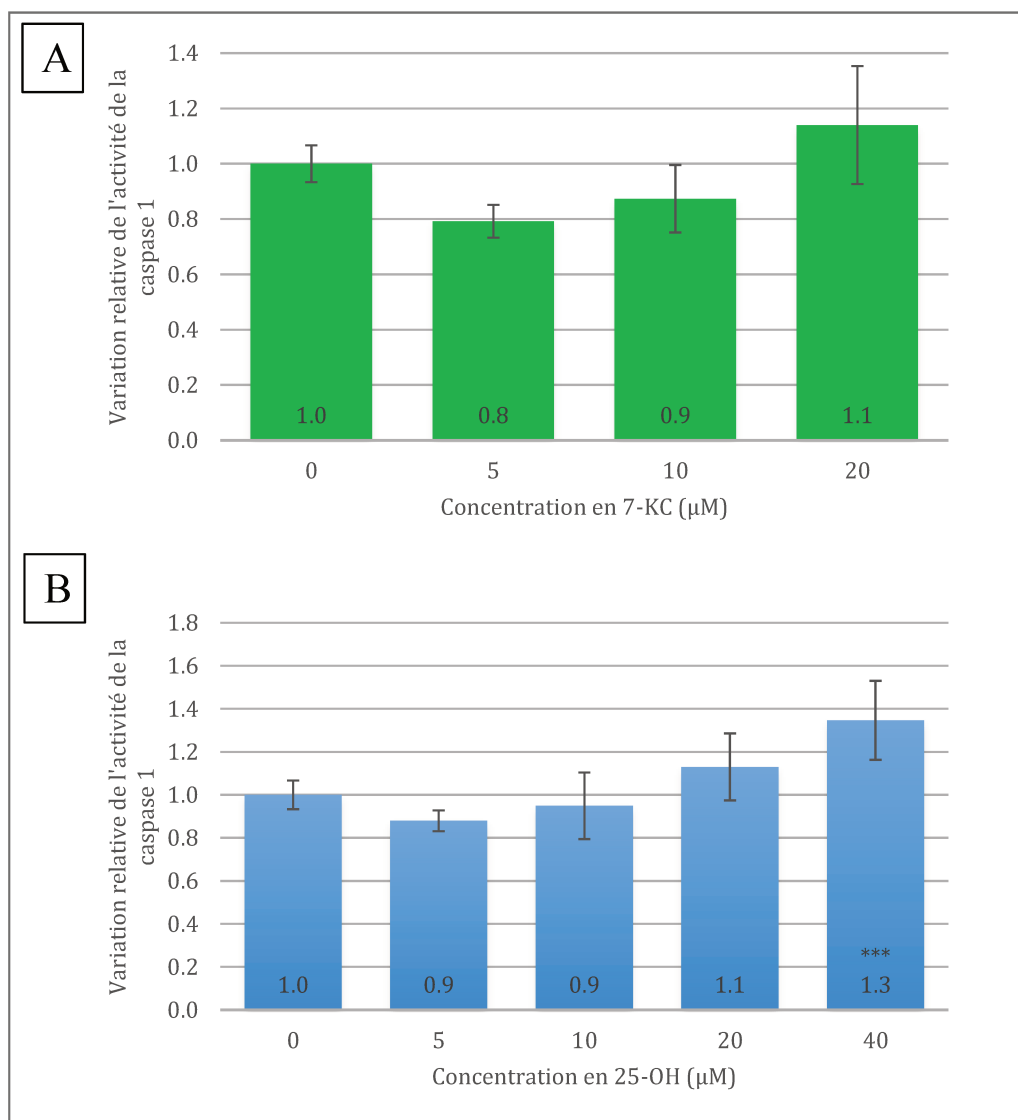


Figure 58 : Activité de la caspase 1 des cellules HaCaT incubées pendant 48 heures avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B), *** $p < 0,001$ comparé au milieu de culture, (n=3)

L'activité de la caspase 1 n'est pas modifiée après incubation avec le 7-KC. En revanche, cette activité est augmentée de façon statistiquement significative après incubation avec le 25-OH à 40 µM, traduisant une activation de l'inflammasome. Il

convient de remarquer que cette activation de l'inflammasome se produit à la même concentration que celle entraînant l'activation des récepteurs P2X7.

Les récepteurs P2X7 interviennent également dans la réaction inflammatoire en augmentant la libération d'une protéine de la matrice extracellulaire, la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9) (Gu and Wiley, 2006). Nous avons ainsi étudié les effets d'une incubation des kératinocytes avec le 7-KC ou le 25-OH sur la libération de MMP-9.

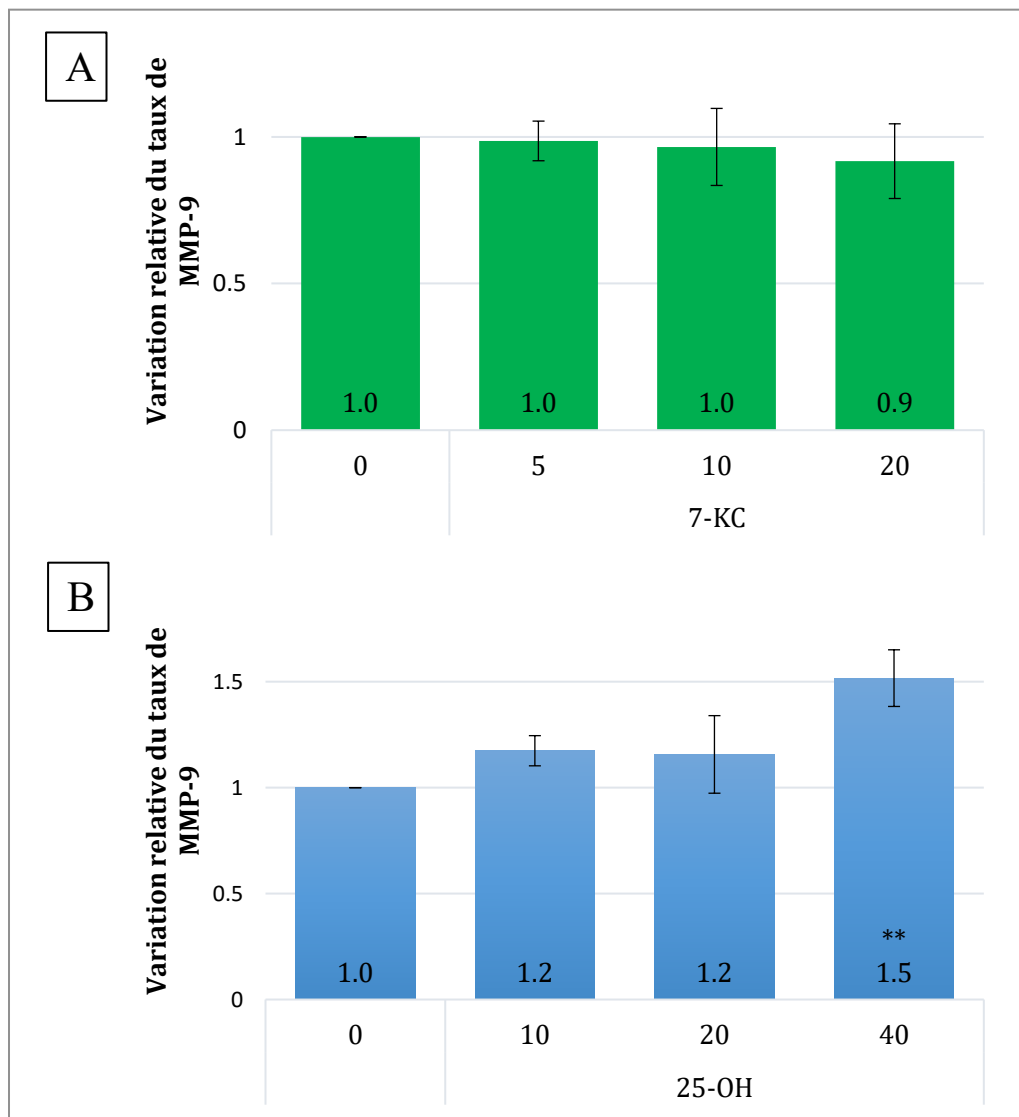


Figure 59 : Dosage de MMP-9 dans les surnageants cellulaires de cellules HaCaT incubées pendant 48 heures avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B), **p<0,01 comparé au milieu de culture, (n=3)

Après incubation avec le 7-KC, le taux de MMP-9 demeure constant. En revanche, après incubation avec le 25-OH, une augmentation de la sécrétion est observée dès 10 μ M mais cette augmentation n'est statistiquement significative qu'à la concentration de 40 μ M.

Nous avons ensuite ciblé quatre cytokines secrétées par les kératinocytes : IL-1 α , IL-6, IL-8 et MIF. Ces cytokines ont par ailleurs été associées aux processus dégénératifs comme la maladie d'Alzheimer ou la DMLA. Par conséquent, nous avons étudié l'effet du 7-KC ou du 25-OH sur la sécrétion de ces cytokines.

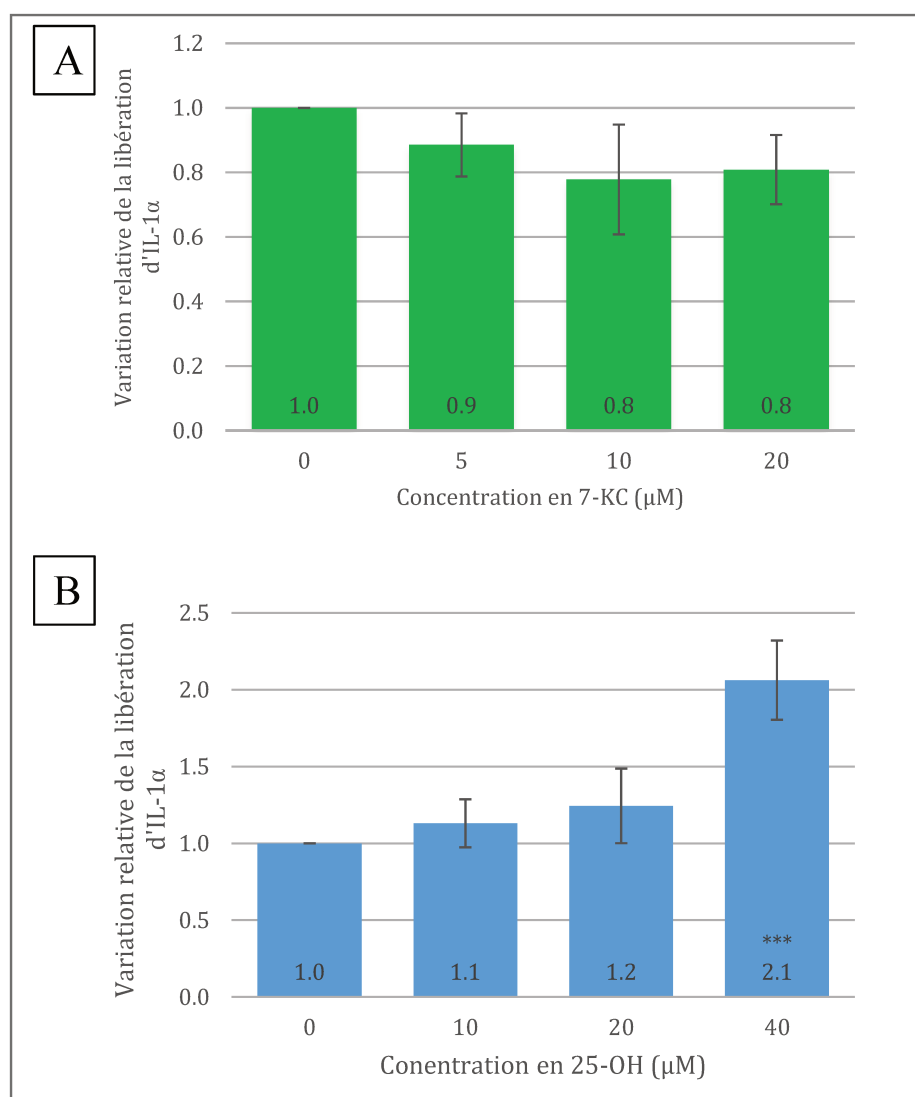


Figure 60 : Dosage de la cytokine IL-1 α dans les surnageants des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B), ***p<0,001 comparé au milieu de culture, (n=3)

Après 48 heures d'incubation, le 7-KC induit une diminution non significative de la sécrétion d'IL-1 α . Le 25-OH induit une augmentation statistiquement significative de la sécrétion de cette cytokine à 40 μ M.

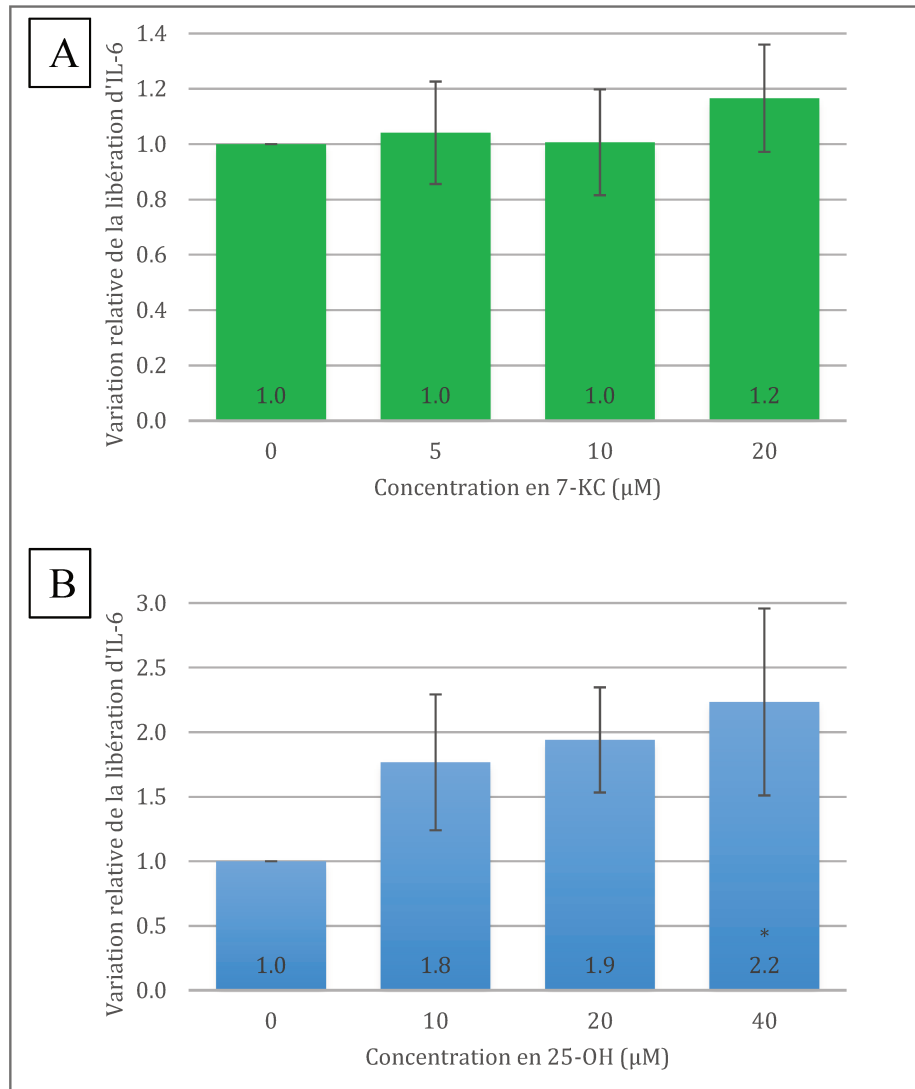


Figure 61 : Dosage de la cytokine IL-6 dans les surnageants des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B), * $p < 0,05$ comparé au milieu de culture, (n=4)

Le 7-KC, après 48 heures d'incubation n'a aucun effet sur la libération de la cytokine IL-6. En revanche, une augmentation de la libération de cette cytokine, statistiquement significative uniquement à 40 μ M, est observée après 48 heures d'incubation avec le 25-OH.

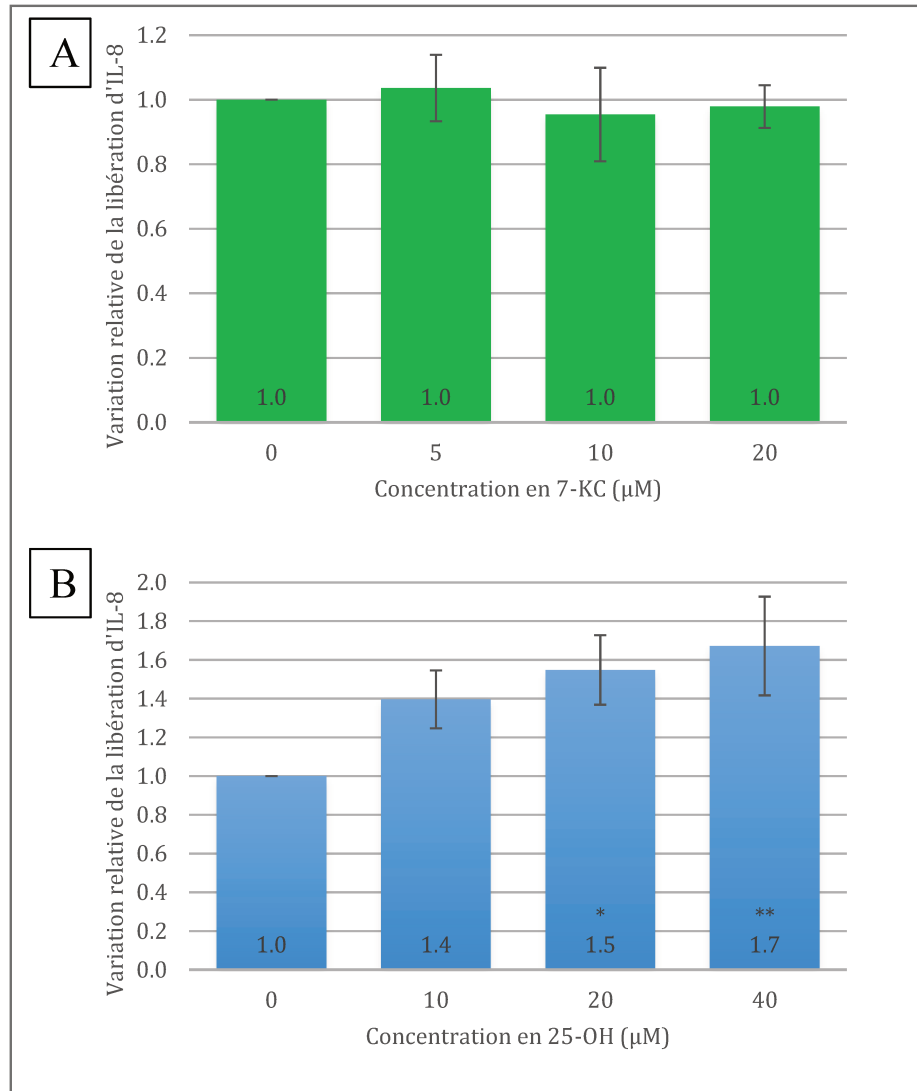


Figure 62 : Dosage de la cytokine IL-8 dans les surnageants des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B), * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ comparé au milieu de culture, (n=3)

Aucun effet n'est observé sur la libération de la cytokine IL-8 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC. En revanche, après 48 heures d'incubation avec le 25-OH, une augmentation de la libération de cette cytokine statistiquement significative dès 20 μM est observée.

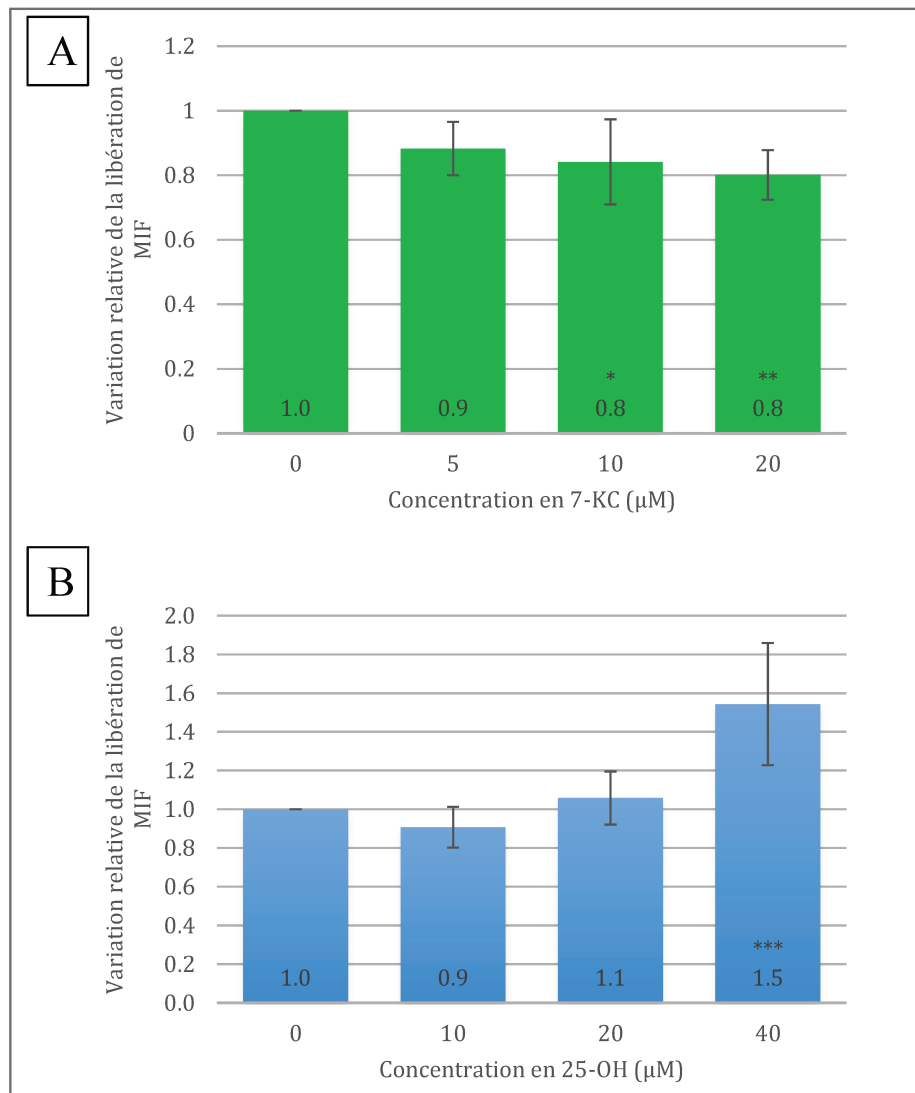


Figure 63 : Dosage de la cytokine MIF dans les surnageants des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B), * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ comparé au milieu de culture, (n=4)

Une diminution statistiquement significative de la libération de MIF est observée après 48 heures d'incubation avec le 7-KC à partir de 10 µM. Le 25-OH, quant à lui, induit une augmentation statistiquement significative de la libération de MIF à 40 µM.

En résumé, le 25-OH induit la libération de la MMP-9 et des cytokines pro-inflammatoires IL-1 α , IL-6, IL-8 et MIF, et ce principalement à la concentration qui active la caspase-1 et les récepteurs P2X7. Le 7-KC, quant à lui, n'induit pas de libération de ces cytokines mais diminue la libération de MIF.

2.3.5. Etude de l'apoptose

Les récepteurs P2X7 pouvant jouer un rôle central dans le déclenchement du processus d'apoptose, nous nous sommes donc intéressée aux effets du 7-KC et du 25-OH sur l'apoptose. Nous avons commencé par mesurer la condensation de la chromatine.

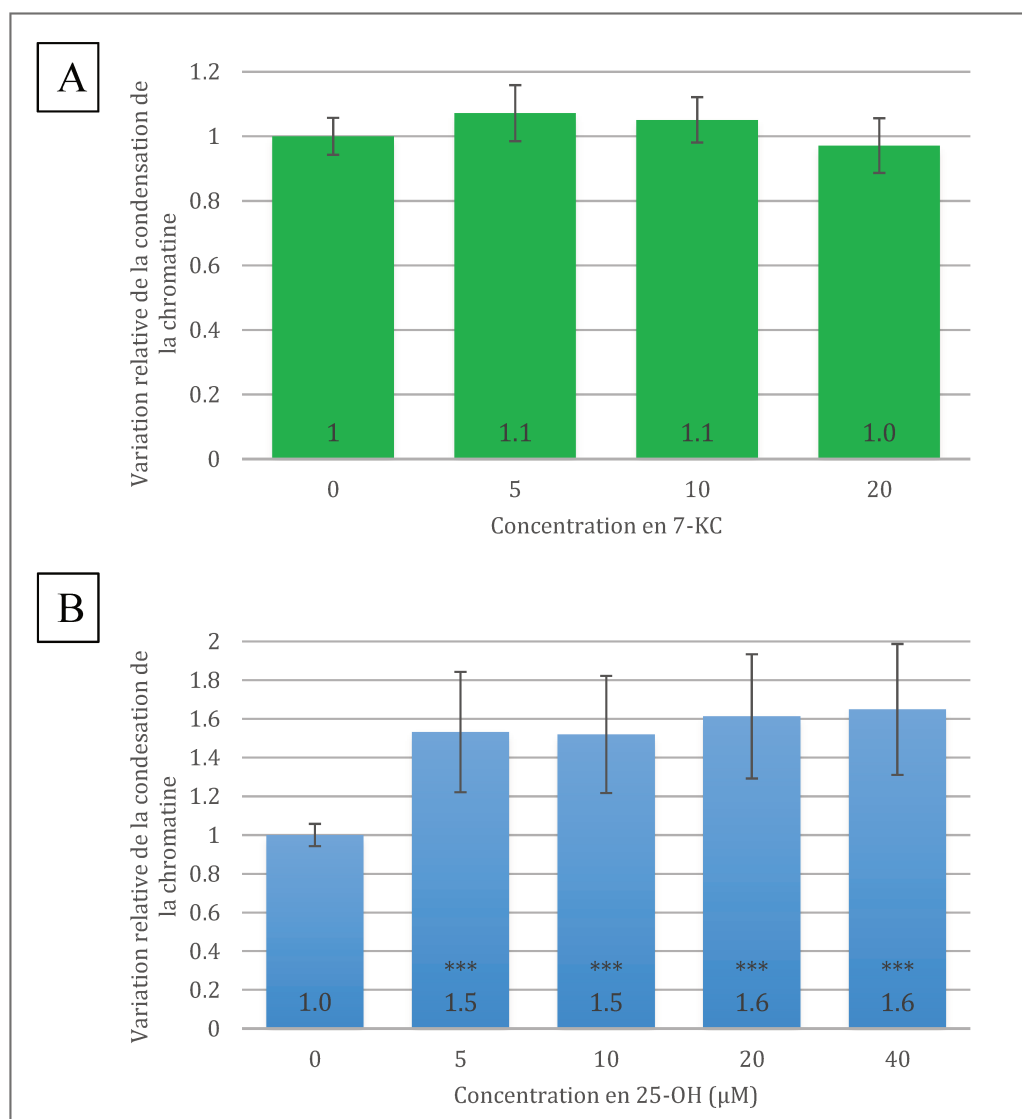


Figure 64 : Evaluation de la condensation de la chromatine après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B), *** $p < 0,001$ comparé au milieu de culture, (n=4)

Le 7-KC n'induit aucune condensation de la chromatine. En revanche, après incubation avec le 25-OH, une augmentation concentration-indépendante et

statistiquement significative de la condensation de la chromatine est observée dès la plus faible concentration (entre x1,5 et 1,6 par rapport au témoin négatif).

Nous avons poursuivi l'étude de l'apoptose avec l'évaluation de l'activité de la caspase 8, caspase activatrice, ainsi que de la caspase 3, caspase effectrice.

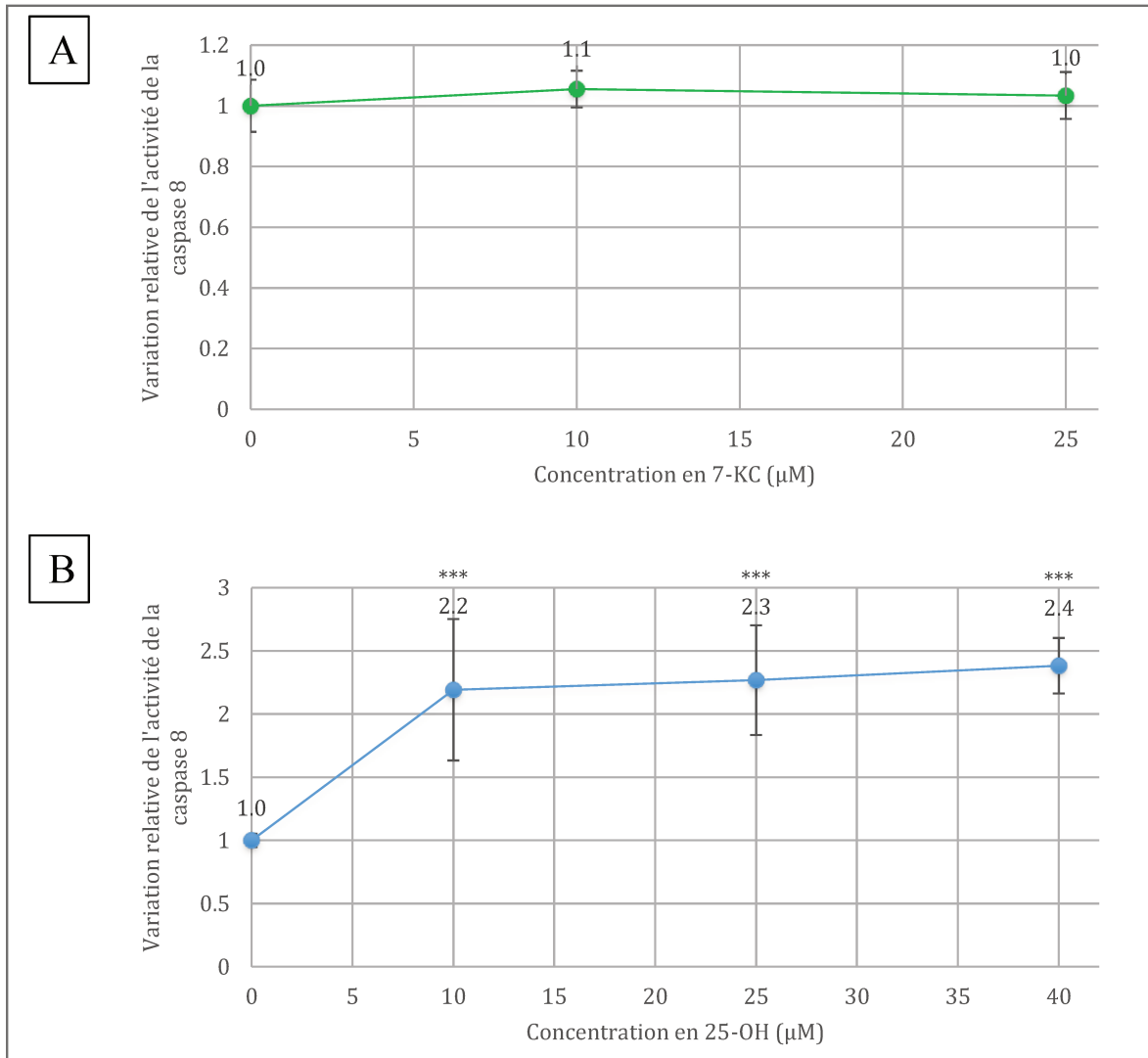


Figure 65 : Activité de la caspase 8 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B), *** $p < 0,001$ comparé au milieu de culture, (n=3)

Après 48 heures d'incubation avec le 7-KC, aucune augmentation de l'activité de la caspase 8 n'est observée. En revanche, une augmentation statistiquement significative de l'activité de la caspase 8 est induite par le 25-OH dès la plus faible concentration (entre x2,2 et x2,4 par rapport au témoin négatif).

Nous avons ensuite étudié l'activité de la caspase 3.

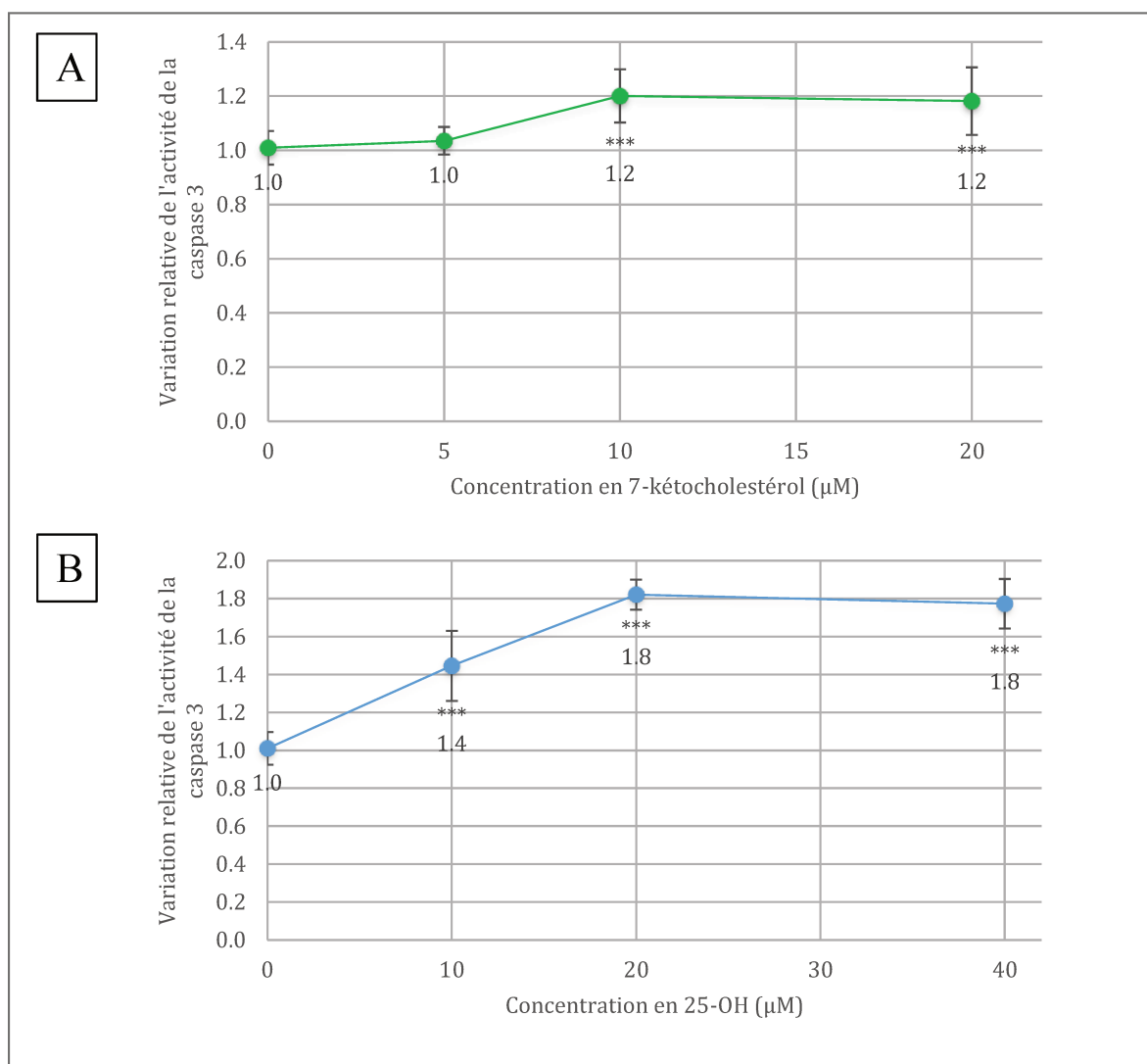


Figure 66 : Activité de la caspase 3 après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B), *** $p < 0,001$ comparé au milieu de culture, ($n=3$)

Le 7-KC induit une légère activation de la caspase 3 aux deux concentrations les plus élevées (x1,2 par rapport au témoin négatif). Le 25-OH, quant à lui, induit une augmentation statistiquement significative de l'activité de la caspase 3 dès la plus faible concentration (entre x1,4 et x1,8 par rapport au témoin négatif).

En ce qui concerne le 25-OH, les trois marqueurs d'apoptose que nous avons étudiés sont concordants ; nous pouvons donc conclure que le 25-OH induit l'apoptose des kératinocytes dès 10 μM . Quant au 7-KC, nos résultats sont plus nuancés car il n'induit ni condensation de la chromatine, ni activation de la caspase 8, mais seulement

une légère activation de la caspase 3. Pour aller plus loin dans nos investigations, nous nous sommes intéressée à une autre voie d'activation de la caspase 3, le granzyme B.

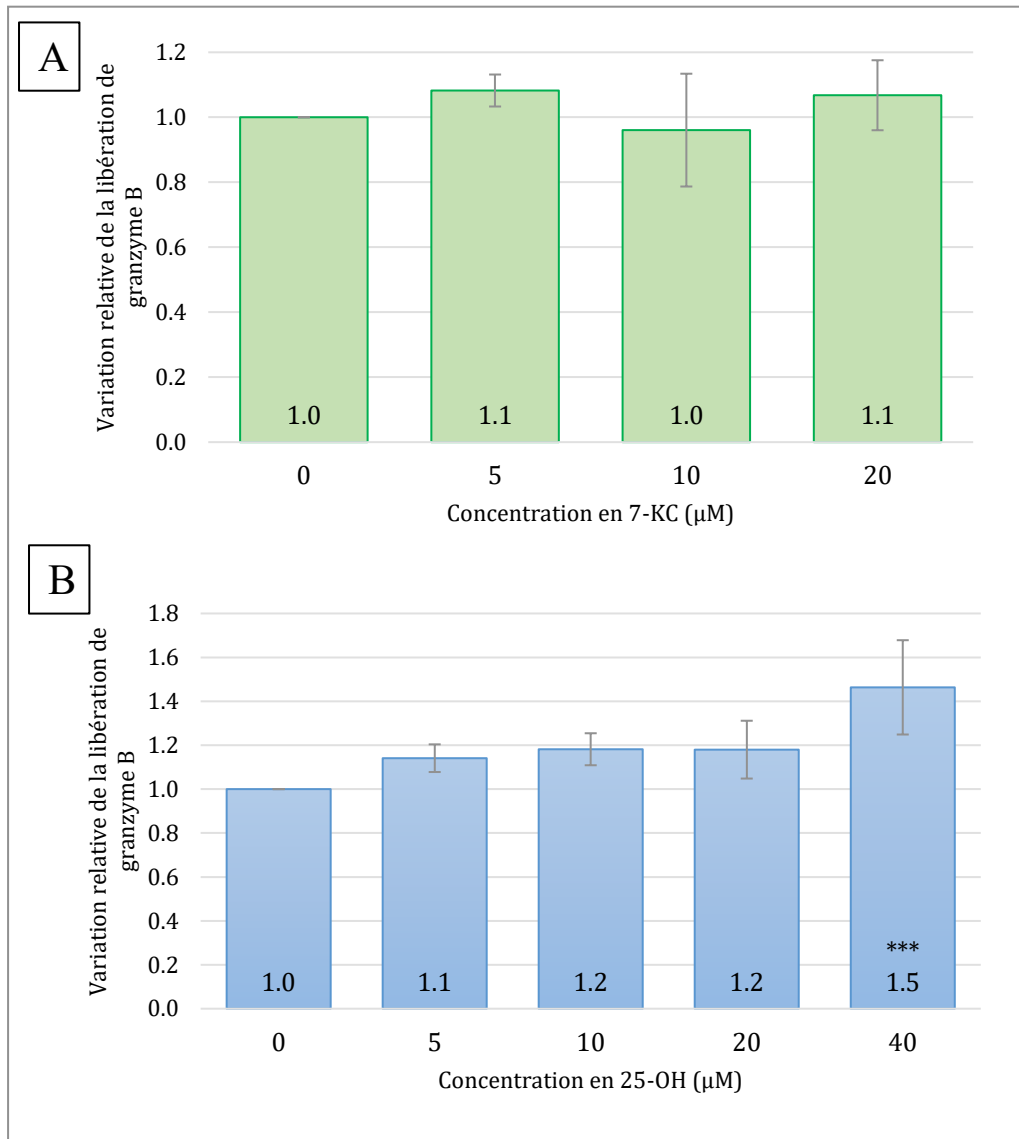


Figure 67 : Dosage du granzyme B dans les surnageants cellulaires des kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) ou le 25-OH (B) (n=3 pour le 7-KC et n=5 pour le 25-OH), ***p<0,001 comparé au témoin négatif

Aucune variation de la libération de granzyme B n'est observée après 48 heures d'incubation avec le 7-KC. En revanche, une augmentation de la libération de cette sérine protéase est observée après incubation avec le 25-OH, particulièrement à la concentration de 40 μM pour laquelle cette augmentation est statistiquement très significative.

Ainsi, le 25-OH induit des effets apoptotiques par différentes voies, voie extrinsèque et voie du granzyme B notamment. Le 7-KC induit moins d'effets apoptotiques et ces effets sont caspase 8 et granzyme B indépendants.

2.3.6. Prolifération cellulaire et cycle cellulaire

En premier lieu, nous avons étudié l'effet des oxystérols sur la prolifération cellulaire des kératinocytes HaCaT. La prolifération cellulaire a été évaluée par dénombrement cellulaire.

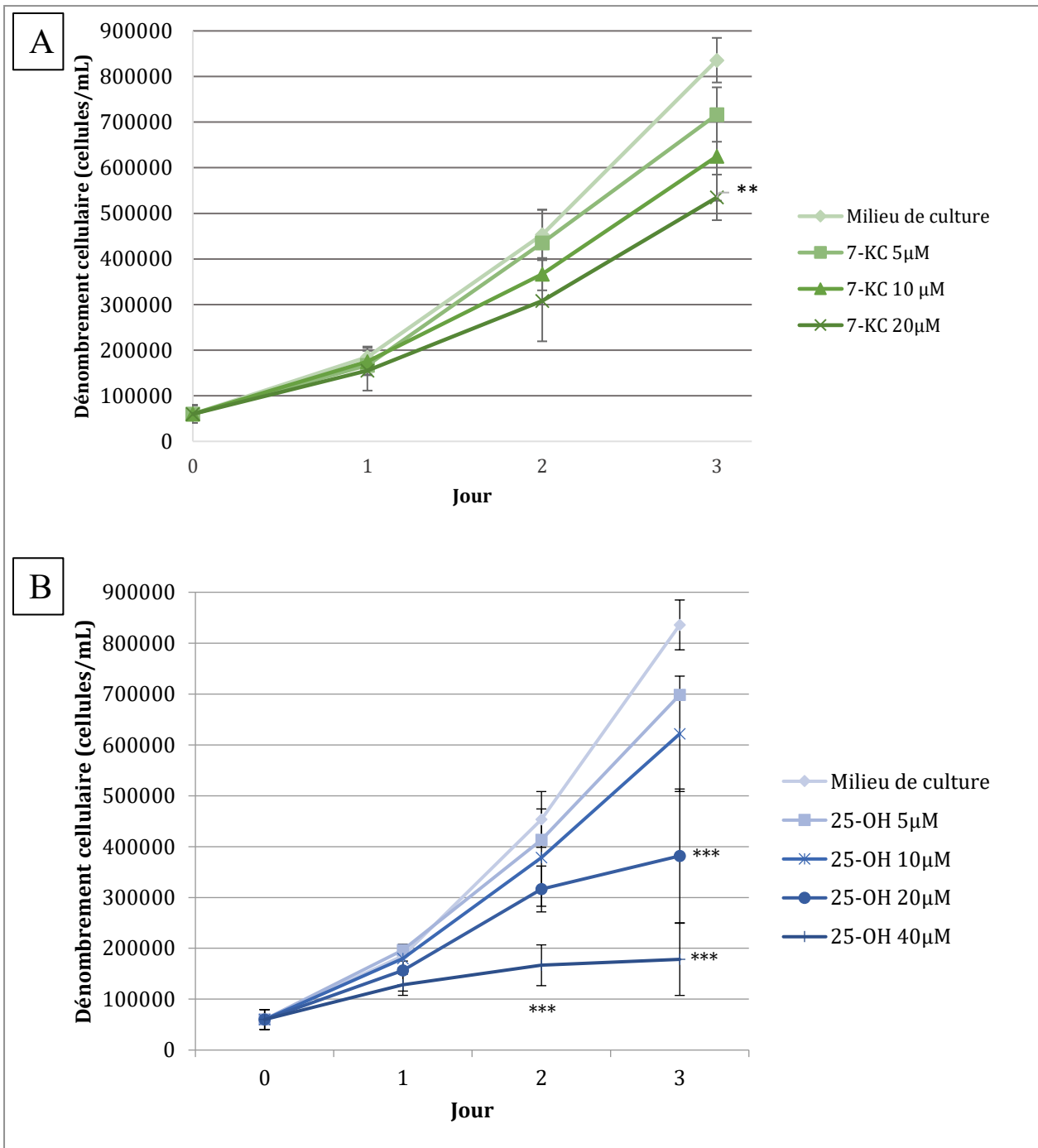


Figure 68 : Prolifération cellulaire des kératinocytes HaCaT en présence de 7-KC (A) ou de 25-OH (B), **p<0,01 et ***p<0,001 comparé au milieu de culture, (n=3)

Le 7-KC et le 25-OH diminuent la prolifération cellulaire de manière concentration dépendante. Plus précisément, le 25-OH altère de façon statistiquement significative la prolifération cellulaire dès le deuxième jour d'incubation à 40 μ M et le troisième jour à 20 μ M. Le 7-KC induit une diminution de la prolifération cellulaire

statistiquement significative uniquement le troisième jour à 20 μM . Les autres concentrations de 7-KC ou de 25-OH n'induisent pas de changement significatif de la prolifération cellulaire.

Le 25-OH et le 7-KC perturbant tous deux la prolifération cellulaire, nous nous sommes intéressée au cycle cellulaire afin de savoir si les effets des oxystérols sur la prolifération cellulaire sont associés à un blocage du cycle cellulaire.

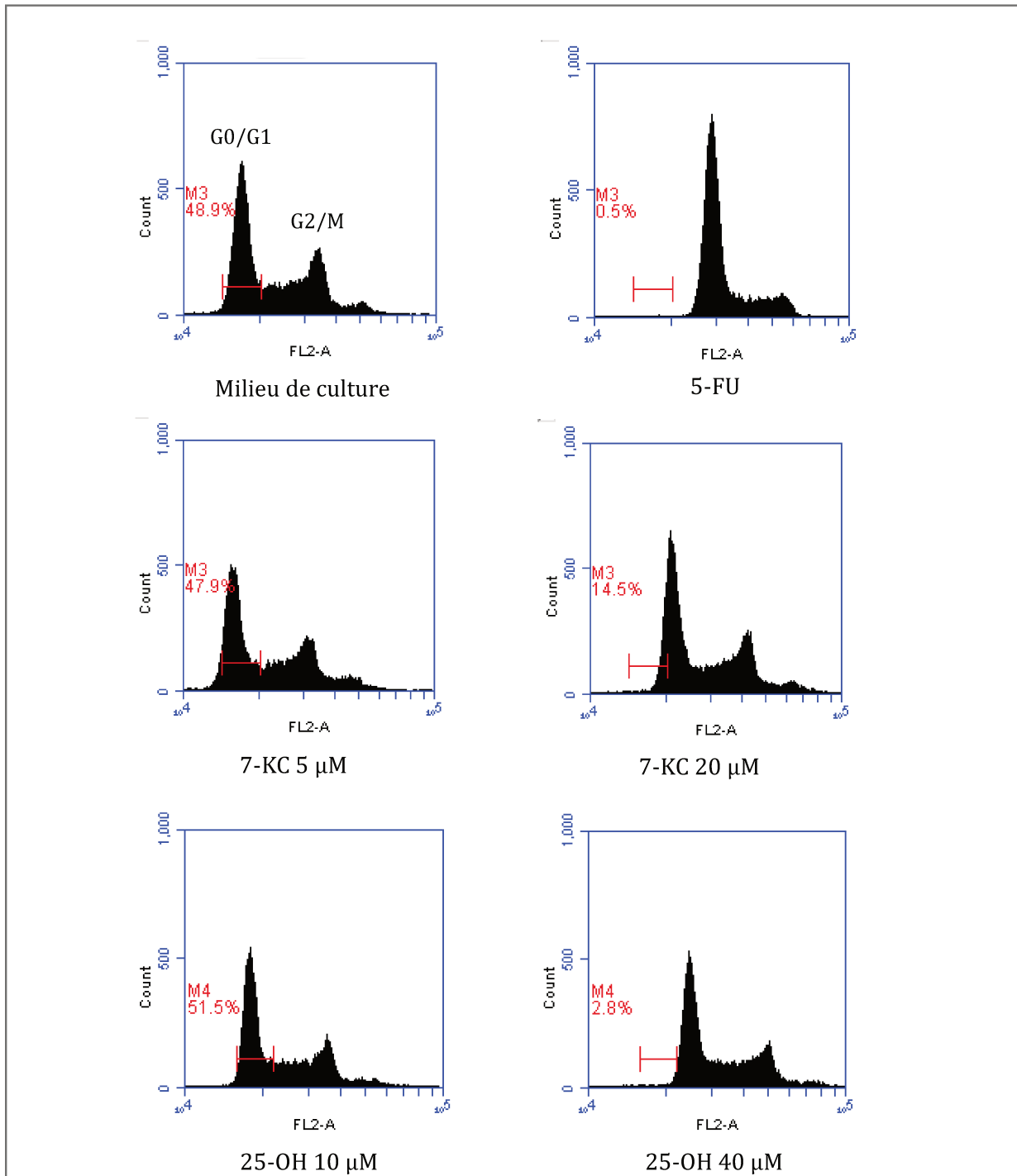


Figure 69 : Etude du cycle cellulaire des kératinocytes HaCaT après incubation avec le 7-KC à 5 μ M et 20 μ M, le 25-OH 20 et 40 μ M et le 5-FU à 10 μ M. Les spectres sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Le 5-fluorouracile (5-FU) est utilisé ici comme témoin positif d'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 : le pic de fluorescence G1 (premier pic) est plus haut et décalé vers la droite par rapport au milieu de culture, et le pic correspondant aux phases G2/M (deuxième pic) a disparu. Après incubation avec le 7-KC à 20 μ M, un décalage vers la droite de tous les pics de fluorescence est observé, mais le pic correspondant aux phases G2/M reste présent. En revanche, après incubation avec le 25-OH à 40 μ M, le décalage des pics est associé à une diminution du pic des phases G2/M.

Ainsi, nous observons un ralentissement de la prolifération cellulaire des kératinocytes ainsi que des perturbations du cycle cellulaire avec le 25-OH et le 7-KC. Ces deux phénomènes peuvent être associés notamment à un déclenchement de la différenciation des kératinocytes en cornéocytes. Aussi avons-nous continué nos investigations par l'étude de marqueurs de la différenciation cellulaire.

2.3.7. Etude de la différenciation cellulaire

Lors du processus de différenciation, les kératinocytes, se transforment progressivement en cornéocytes. Cette différenciation entraîne des modifications morphologiques et structurelles, ainsi que des changements dans l'expression de certains marqueurs telle l'involucrine et une augmentation du taux de calcium intracellulaire.

2.3.7.1. *Evaluation de la morphologie cellulaire*

La morphologie cellulaire des cellules HaCaT a été étudiée en microscopie holographique digitale après 48 heures d'incubation avec le 7-KC et le 25-OH et après irradiation UV. Seuls les paramètres modifiés sont représentés dans la figure 71.

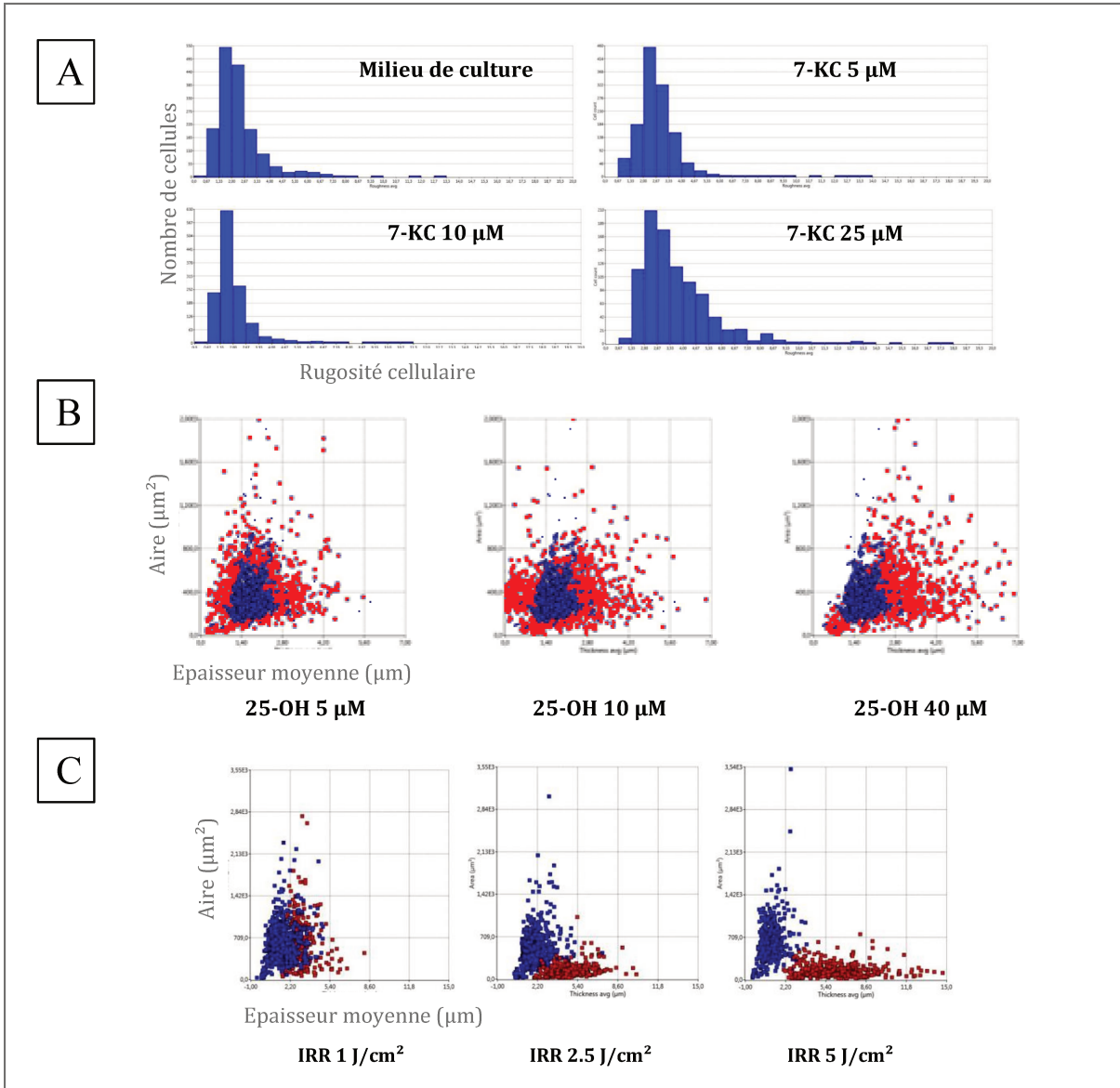


Figure 70 : Morphologie cellulaire après incubation avec le 7-KC ou le 25-OH ou après irradiation UV. A. Impact du 7-KC sur la rugosité cellulaire. B. Modification de l'épaisseur moyenne des cellules induite par le 25-OH (bleu : kératinocytes incubés avec le milieu de culture, rouge : kératinocytes incubés avec le 25-OH). C. Modification de l'épaisseur moyenne des cellules induite par une irradiation UV (bleu : kératinocytes non-irradiés, rouge : kératinocytes irradiés). Les graphiques sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

La rugosité des cellules est augmentée après incubation avec le 7-KC à partir de 25 μ M.

Lorsque les kératinocytes sont incubés avec le milieu de culture, leur épaisseur moyenne est relativement identique d'une cellule à l'autre, alors que lorsque les kératinocytes sont incubés avec le 25-OH à 5 et 10 μ M, l'épaisseur moyenne est très hétérogène. De plus, cette épaisseur est augmentée à partir de 40 μ M. Cet effet sur l'épaisseur moyenne des cellules est similaire à celui observé après irradiation avec des rayons UV, lesquels induisent également une diminution de l'aire des kératinocytes.

Pour conclure, le 7-KC et le 25-OH induisent tous deux des altérations morphologiques manifestes des cellules HaCaT.

2.3.7.2. Observation du cytosquelette

La morphologie cellulaire étant étroitement liée à l'organisation du cytosquelette, nous avons étudié les effets des deux oxystérols sur l'organisation des filaments d'actine.

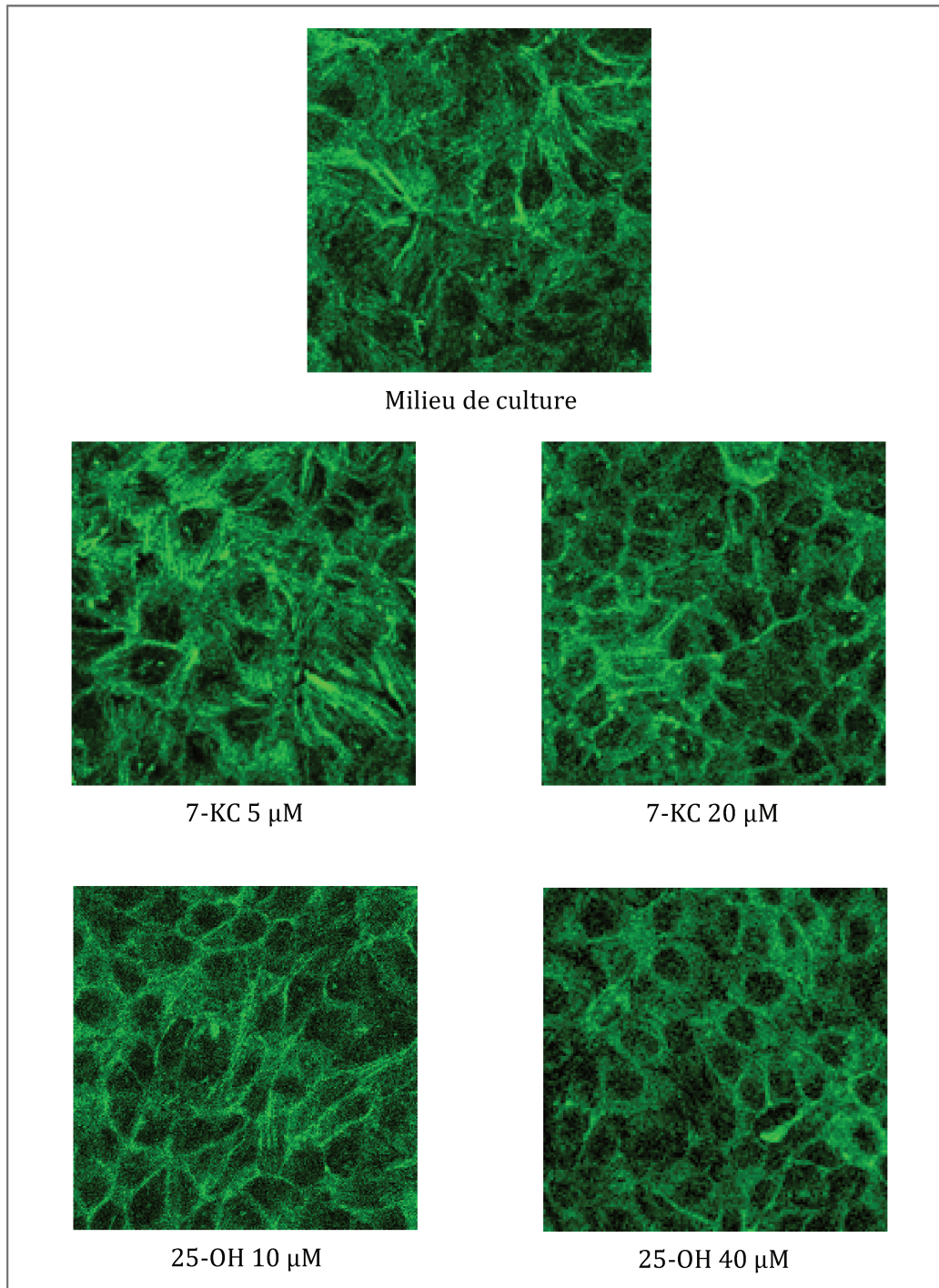


Figure 71 : Observation en microscopie confocale des filaments d'actine des cellules HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH. Photographies représentatives de trois expériences indépendantes.

Les nombreux filaments d'actine sont organisés en fuseau dans le milieu de culture. Ces fuseaux sont encore observés après 48 heures d'incubation avec le 7-KC 5 μ M, mais sont très peu visibles avec le 7-KC 20 μ M. La perte des filaments d'actine est plus nette après incubation avec le 25-OH. En effet, très peu de filaments sont visibles avec le 25-OH 10 μ M et une disparition totale de ces filaments est observée à 40 μ M. Ainsi, une désorganisation totale du cytosquelette d'actine est observée après 48 heures d'incubation avec le 7-KC et de façon plus drastique avec le 25-OH.

2.3.7.3. Evaluation de l'autophagie

L'autophagie peut constituer un signe précoce de différenciation cellulaire (Aymard et al., 2011). Nous avons donc évalué les effets des oxystérols sur l'induction de l'autophagie.

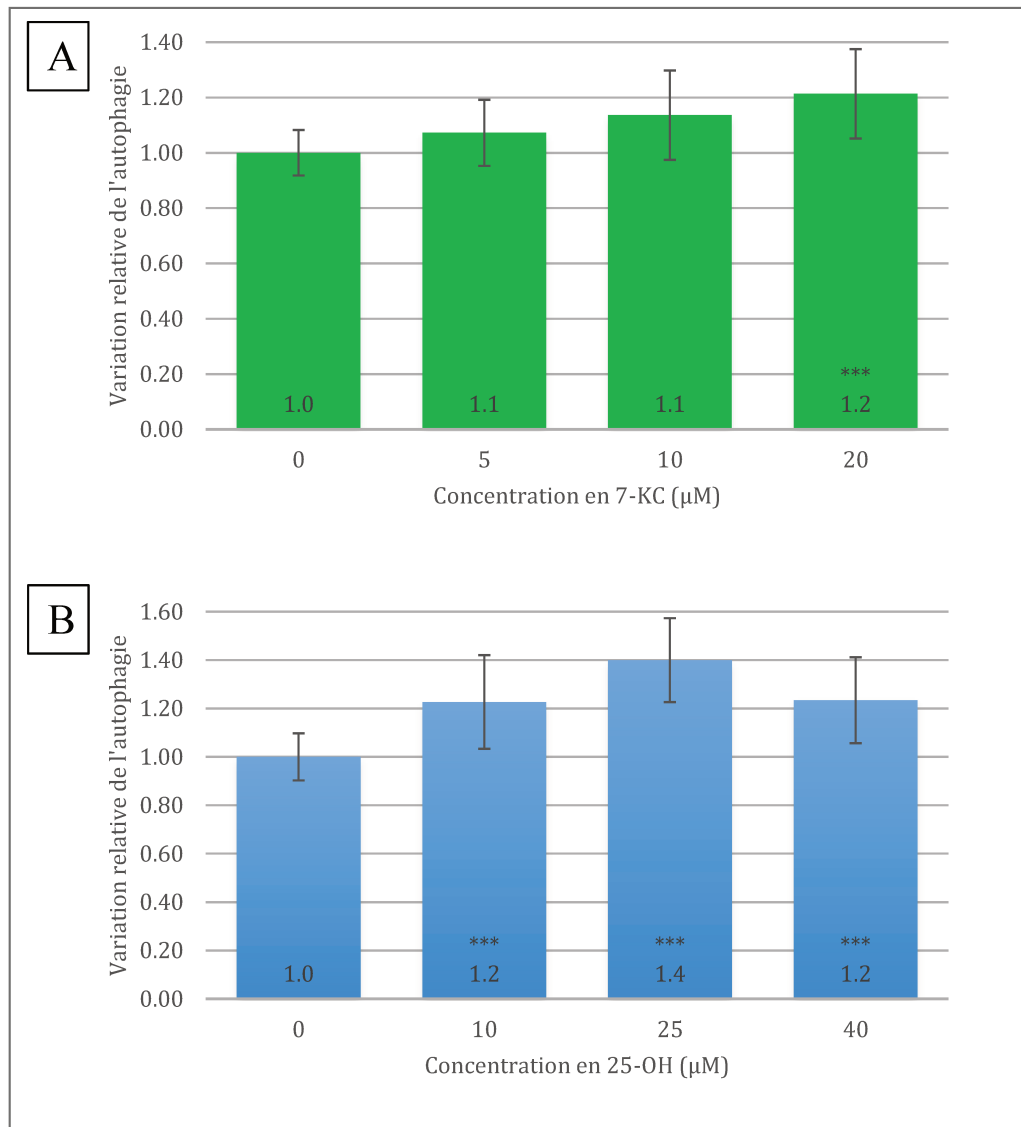


Figure 72 : Evaluation de l'autophagie sur les kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B), *** $p < 0,001$ comparé au milieu de culture (n=4)

Le 7-KC induit une augmentation statistiquement significative de l'autophagie après 48 heures d'incubation à 20 μM . Le 25-OH, quant à lui, entraîne une augmentation de l'autophagie statistiquement significative dès 10 μM .

2.3.7.4. Etude de l'expression de l'involucrine

L'involucrine est une protéine cytoplasmique exprimée dans les kératinocytes durant les premières phases de la différenciation. Nous avons étudié son expression en

immunocytochimie (observation en microscopie confocale) après 48 heures d'incubation avec le 7-KC ou le 25-OH.

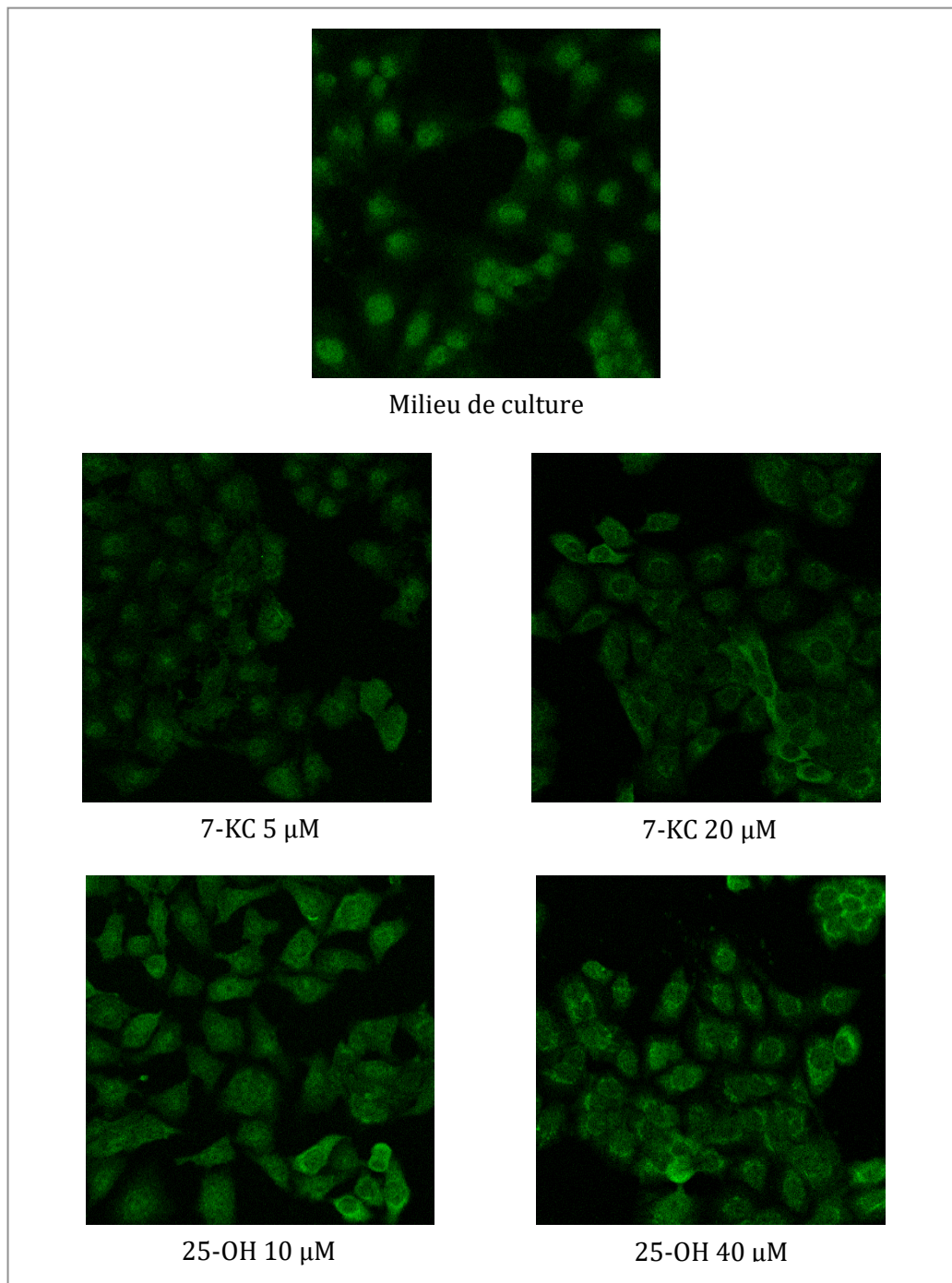


Figure 73 : Observation microscopiques de l'expression de l'involucrine dans les kératinocytes HaCaT incubés pendant 48 heures avec le 7-KC ou le 25-OH.

Photographies représentatives de trois expériences indépendantes.

L'expression de l'involucrine ne semble pas augmentée après 48 heures d'incubation avec le 7-KC. En revanche, une augmentation de l'expression de l'involucrine est observée après 48 heures d'incubation avec le 25-OH. Afin de confirmer ces observations qualitatives, nous avons quantifié l'expression de l'involucrine par cytométrie en flux.

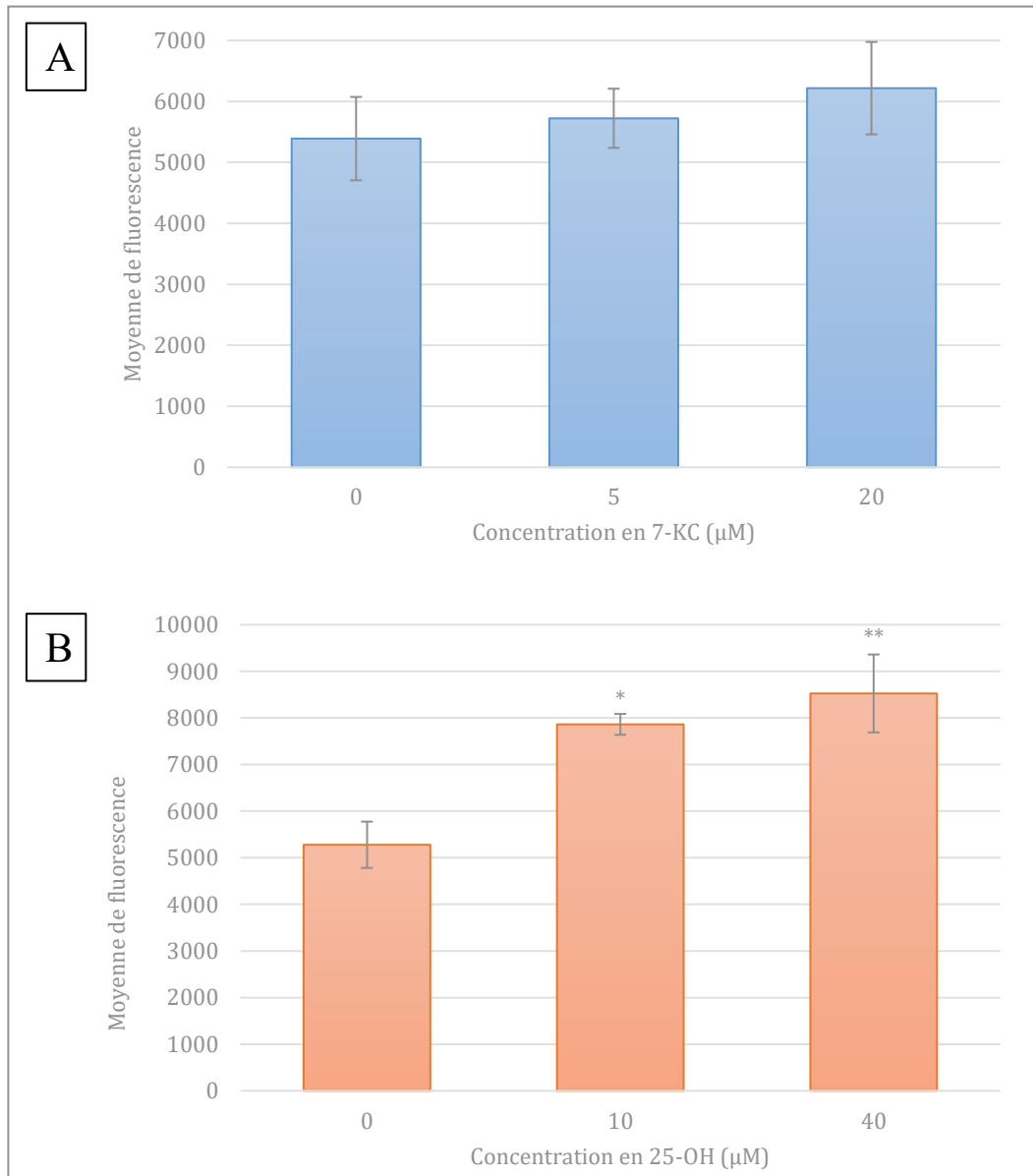


Figure 74 : Quantification de l'expression de l'involucrine dans des kératinocytes HaCaT incubés pendant 48 heures avec du 7-KC (A) ou du 25-OH (B), * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ comparé au milieu de culture, (n=3)

Aucune augmentation statistiquement significative de l'expression de l'involucrine n'a été observée après 48 heures d'incubation avec le 7-KC. En revanche, une augmentation statistiquement significative de l'expression de l'involucrine a été observée après 48 heures d'incubation avec le 25-OH dès 10 μ M.

2.3.7.5. *Evaluation du calcium intracellulaire*

Le calcium est impliqué, entre autres, dans la différenciation des kératinocytes ; une augmentation des taux de calcium intracellulaire est en effet observée lors de la différenciation (Elsholz et al., 2014). Nous avons donc poursuivi notre étude en quantifiant le calcium intracellulaire.

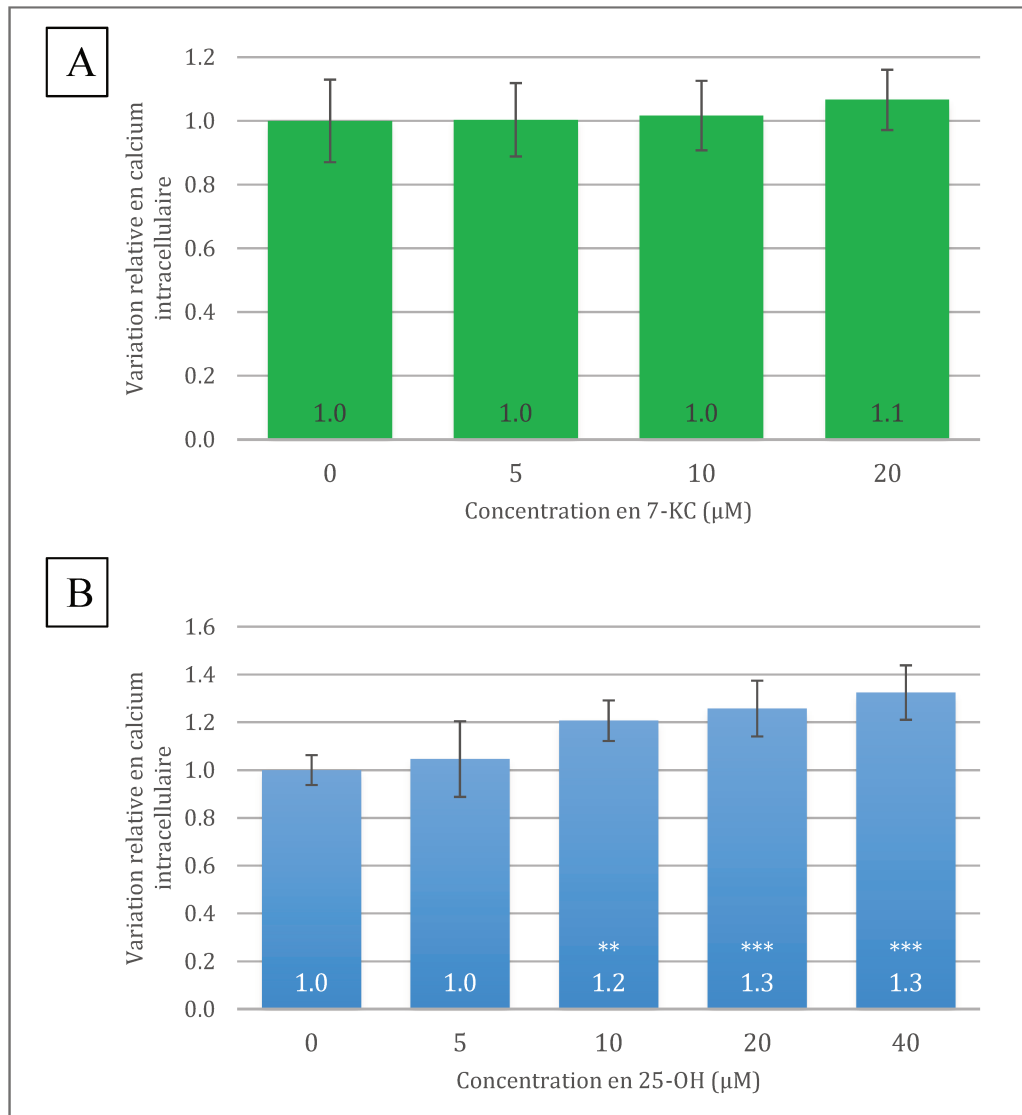


Figure 75 : Evaluation du taux de calcium intracellulaire dans les kératinocytes HaCaT après 48 heures d'incubation avec le 7-KC (A) et le 25-OH (B), ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ comparé au milieu de culture, (n=4)

Aucune modification du taux de calcium intracellulaire n'a été observée après 48 heures d'incubation avec le 7-KC. En revanche, une augmentation statistiquement significative du taux de calcium intracellulaire est induite par le 25-OH à partir de 10 µM.

En résumé, le 7-KC et le 25-OH induisent des modifications de la morphologie cellulaire ainsi que du cytosquelette d'actine. Cependant, seul le 25-OH entraîne une augmentation des différents marqueurs de différenciation : autophagie, expression de l'involucrine et taux de calcium intracellulaire.

Ainsi, à la lumière de nos résultats, nous pouvons conclure que le 25-OH stimule la différenciation des kératinocytes, tandis que le 7-KC induit principalement des altérations morphologiques et structurelles sans différenciation.

2.4. Discussion

Dans notre étude, nous avons travaillé sur des kératinocytes humains issus de biopsies de sujets jeunes, des kératinocytes humains issus de biopsies de sujets « âgés », et des kératinocytes humains de la lignée HaCaT. Dans tous les cas, le 7-KC est l'oxystérol le plus abondant et lorsque les cellules sont irradiées par un rayonnement UV identique à celui du spectre solaire, le 25-OH est l'oxystérol dont le taux est le plus augmenté.

L'étude de la cytotoxicité du 7-KC et du 25-OH sur les kératinocytes HaCaT nous a permis de sélectionner les concentrations sub-cytotoxiques, de l'ordre du micromolaire, à utiliser pour la suite de nos expériences. Nous avons suivi le même raisonnement que dans l'étude de la DMLA réalisée sur les cellules ARPE-19.

Avant d'étudier les effets de ces deux oxystérols sur les kératinocytes, nous avons vérifié leur assimilation par les kératinocytes HaCaT. Non seulement le 7-KC et le 25-OH sont assimilés par les kératinocytes HaCaT, mais ils altèrent également la composition lipidique des membranes et modifient les radeaux lipidiques en augmentant notamment l'expression de la cavéoline-1, protéine présente dans les cavéoles. La cavéoline-1 a été associée à des processus dégénératifs tels que la maladie d'Alzheimer (Gaudreault et al., 2004; Heathfield et al., 2008), aussi notre attention s'est portée sur des récepteurs présents dans les radeaux lipidiques, les récepteurs de dégénérescence P2X7 (McLarnon et al., 2006; Parvathenani et al., 2003; Wakx et al., 2015). D'après nos résultats, seul le 25-OH stimule l'activation des pores P2X7. Cependant, le BBG, inhibiteur des récepteurs P2X7, n'a eu aucun effet sur la formation de ces pores, contrairement au probénécide qui est un inhibiteur du canal pannexine-1. Il a été démontré dans la littérature que la formation des pores P2X7 peut entraîner l'activation du canal pannexine-1 (Pelegrín, 2011). Ainsi, le 25-OH semble induire la formation du complexe P2X7/pannexine-1, à l'origine de nombreuses voies de signalisation telles que l'inflammation et l'apoptose.

L'inflammation, particulièrement lorsqu'elle est chronique, est impliquée dans les processus de vieillissement de la peau et dans les pathologies dégénératives (McGeer and McGeer, 2004; Thornfeldt, 2008). Nous nous sommes alors posé la question : le 7-KC et le 25-OH induisent-ils une réaction inflammatoire ? Le 25-OH induisant une activation des récepteurs P2X7, notre attention s'est par conséquent portée sur l'inflammasome. Le 25-OH induit certains composants de l'inflammasome ainsi qu'une protéine de la matrice extracellulaire, MMP-9. Cette métalloprotéinase matricielle peut elle aussi être induite par les récepteurs P2X7. Nous avons ensuite évalué la libération de plusieurs cytokines pro-inflammatoires connues pour leur implication dans les processus de dégénérescence. Ainsi le 25-OH induit la libération de l'IL-1 α , l'IL-6, l'IL-8 et le MIF. Une étude a démontré qu'une irradiation UV induit la sécrétion de cytokines et chemokines pro-inflammatoires tels que IL-6 ou IL-8 (Yoshizumi et al., 2008). Le 25-OH semble donc induire une réaction inflammatoire similaire à celle induite au cours du photovieillissement. A l'inverse, le 7-KC entraîne une diminution significative de MIF ainsi qu'une diminution non significative de l'IL-1 α . MIF pouvant être associée à IL-1 α (Watanabe et al., 2004), la diminution de la libération de MIF et de IL-1 α pourraient être liées. Dans le vieillissement chronologique, une diminution d'IL-1 α est observée (Sauder et al., 1989; Ye et al., 2002). La réaction inflammatoire induite par le 7-KC serait donc quant à elle similaire à celle du vieillissement chronologique.

Les processus dégénératifs sont associés à l'apoptose cellulaire, c'est pourquoi nous avons étudié les effets du 7-KC et du 25-OH sur des marqueurs de l'apoptose. D'après nos résultats, le 25-OH induit la voie extrinsèque de l'apoptose (activation de la caspase 8), autrement appelée voie des récepteurs de mort. Ces résultats rejoignent ceux démontrant l'activation du récepteur P2X7 par le 25-OH. En effet, le récepteur P2X7 est connu pour ses effets apoptotiques *via* les caspases 8 et 3 (Ferrari et al., 1999; Kong et al., 2005). De plus, le 25-OH a déjà été associé à des processus apoptotiques sur d'autres types cellulaires tels que les monocytes humains, les cellules musculaires humaines ou les cellules de l'appareil reproducteur mâle du rat (Ares et al., 1997; Le Goff et al., 2006; Lee and Chau, 2001; Lim et al., 2003; Lordan et al., 2009; Travert et al., 2006). Le 7-KC, quant à lui, induit uniquement une augmentation de l'activité de la caspase 3 mais pas de la caspase 8. Nous avons alors étudié une autre voie apoptotique, la voie du granzyme B. Cette sérine-protéase, initialement considérée comme spécifique des cellules immunitaires, est désormais reconnue comme étant libérée par des cellules non-

immunitaires telles que les kératinocytes, notamment lors d'une exposition aux rayons UVA ou UVB (Hernandez-Pigeon et al., 2006, 2007). Là encore, le 7-KC n'a pas eu d'effet sur la libération de granzyme B, contrairement au 25-OH qui a stimulé la libération de granzyme B. Il a été préalablement démontré que, lors d'une exposition de kératinocytes aux UVA, la sécrétion de granzyme B est augmentée en lien avec l'augmentation de la libération de la cytokine MIF (Hernandez-Pigeon et al., 2007). Nos résultats obtenus avec le 25-OH tendent donc vers la même conclusion que celle issue de travaux réalisés avec une irradiation UV.

La prolifération des kératinocytes étant ralentie au cours du vieillissement et du photovieillissement (Gilchrest, 1983), nous nous sommes posé la question de l'effet des oxystérols 7-KC et 25-OH sur ce processus. Le 7-KC et le 25-OH diminuent la prolifération des kératinocytes sans blocage du cycle cellulaire, cependant des perturbations de ce cycle sont observées. Ces processus peuvent être associés à une différenciation des kératinocytes en cornéocytes.

Le 7-KC et le 25-OH agissent-ils sur la différenciation des kératinocytes ? Nous avons observé des altérations de la morphologie cellulaire et du cytosquelette d'actine, que ce soit avec le 7-KC ou avec le 25-OH, qui concordent avec les altérations observées au cours des processus de vieillissement et de photovieillissement (Alpermann and Vogel, 1978; Gourlay and Ayscough, 2005; Lopez et al., 2004; Rao and Cohen, 1991; Reed et al., 2001). Ces modifications s'accompagnent, pour le 25-OH, d'une augmentation de différents paramètres associés à la différenciation kératinocytaire qui peut être induite par le photovieillissement (Soroka et al., 2008) : autophagie pour recycler les débris cellulaires (Aymard et al., 2011), expression de l'involucrine impliquée dans la synthèse de l'enveloppe cornifiée (Kalinin et al., 2002; Watt, 1983), taux de calcium intracellulaire car l'expression de l'involucrine est calcium-dépendante (Deucher et al., 2002; Li et al., 1995). Les effets induits par le 25-OH, dont le taux est augmenté suite à une irradiation UV, sont donc similaires à ceux induits lors du photovieillissement.

Le 7-KC induit une réponse totalement différente de celle induite par le 25-OH : pas d'apoptose, pas d'inflammation, et pas de différenciation cellulaire. En revanche, le 7-KC modifie les radeaux lipidiques en augmentant l'endocytose de la cavéoline-1 et ralentit la prolifération cellulaire, tout en activant la caspase 3. Comme nous l'avons dit précédemment, les radeaux lipidiques contiennent de nombreux récepteurs, notamment

le récepteur du facteur de croissance épidermique, EGF (Epidermal Growth Factor). Aussi, le 7-KC ne semble pas être impliqué dans les phénomènes de dégénérescence cutanée mais pourrait exercer d'autres effets cellulaires *via* l'endocytose des récepteurs de croissance.

Modification du taux d'oxystérols après irradiation UV sur une lignée de cellules de la surface oculaire (HCE)

Lors d'une exposition aux UV, deux organes du corps humains sont directement irradiés : la peau et l'œil. Nous avons constaté que le 25-OH joue un rôle central dans les processus de dégénérescence cutanée induits par les UV, nous nous sommes alors demandée si c'était également le cas dans la cornée, située au niveau de la surface oculaire.

Suite aux résultats obtenus sur les kératinocytes primaires et les kératinocytes HaCaT, nous avons étudié l'effet des rayons UV sur une lignée de cellules de l'épithélium cornéen (HCE – Human Corneal Epithelium). Nous avons donc comparé le taux de stérols dans les cellules de la lignée HCE après irradiation à $2,5 \text{ J/cm}^2$ au taux observé dans des cellules de la même lignée non-irradiées.

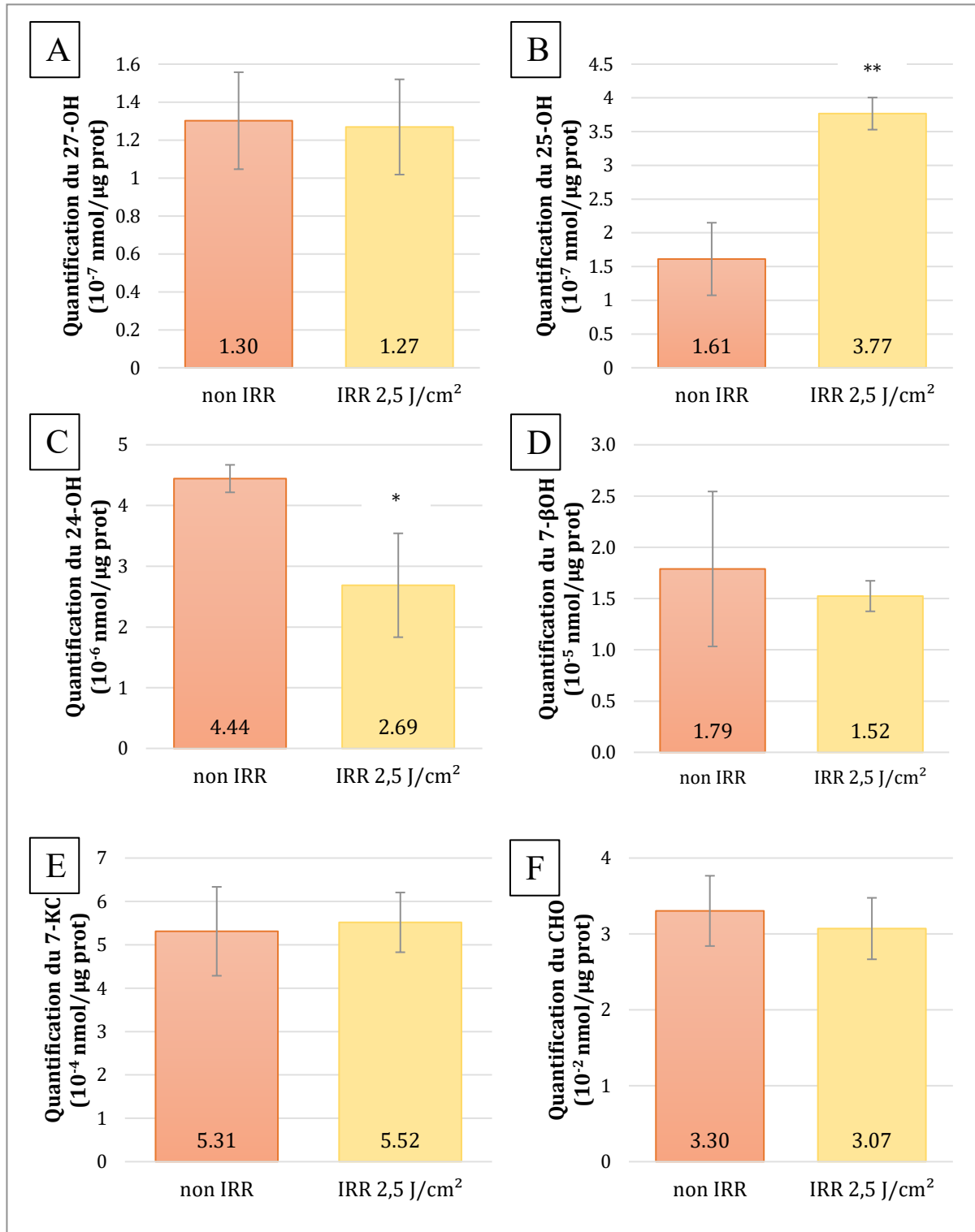


Figure 76 : Quantification des oxystérols dans les cellules de l'épithélium cornéen avant et après irradiation UV à 2,5 J/cm², *p<0,05 et **p<0,01 comparé aux cellules non-irradiées, (n=3)

D'après la figure 76, le 7-KC est l'oxystérol le plus abondant dans les cellules de l'épithélium cornéen.

Après irradiation UV à $2,5 \text{ J/cm}^2$, une augmentation significative du taux de 25-OH est observée (figure 76B). D'après la figure 76C, le taux de 24-OH est significativement diminué suite à l'irradiation. Les taux des autres oxystérols : 27-OH (figure 76A), 7-BOH (figure 76D), 7-KC (figure 76E) ou encore du cholestérol (figure 76F) ne sont pas modifiés après irradiation.

Encore une fois, l'oxystérol dont le taux est augmenté après irradiation est le 25-OH. Le 25-OH apparaît donc comme un élément central des effets des UV.

Article 2

Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Dargère D, Auzeil N, Laprèvote O, Rat P.

Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: Role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging.

The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 2016 May 18 DOI : 10.1016/j.jsbmb.2016.05.015



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb



Review

Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: Role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging

Elodie Olivier^{a,b}, Méloody Dutot^{a,c}, Anne Regazzetti^a, Delphine Dargère^a, Nicolas Auzeil^a, Olivier Laprévotte^a, Patrice Rat^{a,*}

^a UMR CNRS 8638-Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie de Paris, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

^b Soliance-Givaudan, Route de Bazancourt, 51110 Pomacle, France

^c Recherche et Développement, Laboratoire d'Evaluation Physiologique, Yslab, 2 rue Félix le Dantec, 29000 Quimper, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 January 2016

Received in revised form 11 May 2016

Accepted 12 May 2016

Available online xxx

Keywords:

Cell morphology

Keratinocyte differentiation

Oxysterol

Photoaging

Skin

ABSTRACT

Skin photoaging due to UV irradiation is a degenerative process that appears more and more as a growing concern. Lipids, including oxysterols, are involved in degenerative processes; as skin cells contain various lipids, the aim of our study was to evaluate first, changes in keratinocyte lipid levels induced by UV exposure and second, cellular effects of oxysterols in cell morphology and several hallmarks of keratinocyte differentiation. Our mass spectrometry results demonstrated that UV irradiation induces changes in lipid profile of cultured keratinocytes; in particular, ceramides and oxysterols, specifically 25-hydroxycholesterol (25-OH), were increased. Using holography and confocal microscopy analyses, we highlighted cell thickening and cytoskeletal disruption after incubation of keratinocytes with 25-OH. These alterations were associated with keratinocyte differentiation patterns: autophagy stimulation and intracellular calcium increase as measured by cytofluorometry, and increased involucrin level detected by immunocytochemistry. To conclude, oxysterol deregulation could be considered as a common marker of degenerative disorders. During photoaging, 25-OH seems to play a key role inducing morphological changes and keratinocyte differentiation.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Population aging constitutes one of the most significant trends of the 21st century; indeed, nowadays one in eight people in the world are aged 60 or over and this proportion tends to increase

dramatically [1]. As a result, skin aging appears as a growing concern. Skin aging is characterized in particular by wrinkles, sagging skin and elasticity loss. Physiologically, the most abundant cells of the skin are keratinocytes, which are located in the epidermis, the outermost layer of the skin. Epidermis continuously regenerates throughout the life: keratinocytes migrate into the upper layer of the epidermis during a process called differentiation. During this process, keratinocytes are gradually modified to become flat cells named corneocytes, which have lost their nucleus and cytoplasmic organelles [2]. Changes occurring through keratinocyte differentiation are characterized, amongst others, by remodeling of actin cytoskeleton [3], increased levels of involucrin and keratin [4], increased calcium level [5] and autophagy [6]. Keratinocyte differentiation can be abnormal or accelerated under certain stresses such as UV irradiation after sun exposure [7]. In this particular case, the abnormal and accelerated keratinocyte differentiation is part of photoaging.

Abbreviations: 27-OH, 27-hydroxycholesterol; 25-OH, 25-hydroxycholesterol; 24-OH, 24-hydroxycholesterol; 7- β OH, 7- β hydroxycholesterol; 7-KC, 7-ketocholesterol; BSA, bovine serum albumin; Cer, ceramide; CHO, cholesterol; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DR, down-regulated; ESI, electrospray ionization; GlcCer, glucosylceramide; HRMS, high resolution mass spectrometry; LacCer, lactosylceramide; MDC, monodansylcadaverine; OPLS-DA, orthogonal partial least squares discriminant analysis; PBS, phosphate buffered saline; PC, phosphatidylcholine; PCA, principal component analysis; PC-P, phosphatidylcholine plasmalogen; PE, phosphatidylethanolamine; PE-P, phosphatidylethanolamine-plasmalogen; SM, sphingomyelin; UPLC, ultra-performance liquid chromatography; UR, up-regulated.

* Corresponding author.

E-mail address: patrice.rat@parisdescartes.fr (P. Rat).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.05.015>

0960-0760/© 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

At a molecular level, skin cells contain various lipids such as sphingolipids, phospholipids, cholesterol and triglycerides. Lipid deregulation, particularly in ceramides and oxidized derivatives of cholesterol called oxysterols, has been associated with Alzheimer disease and age-related macular degeneration (AMD) [8–15]. As photoaging is considered as a multisystem degenerative process [16], we hypothesize that some key lipids could play an important role in photoaging.

In this *in vitro* study, our aim was to evaluate first, the modifications of keratinocyte lipid levels induced by UV irradiation, and second, the cellular effects of oxysterols on cell morphology and hallmarks of keratinocyte differentiation.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

HaCaT cells, spontaneously transformed human keratinocytes, were obtained from Cell lines service (Cell lines service-CLS-Germany). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Eurobio, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM of glutamine, 50 IU/ml of penicillin and 50 IU/ml of streptomycin (Eurobio). Cell cultures were maintained in controlled atmospheric conditions: CO₂ 5%, humidity 95% and temperature 37 °C. When the cells reached confluency, they were dispersed using trypsin and counted. Depending on cellular concentration, the cellular suspension was diluted and seeded in flasks or microplates.

2.2. UV irradiation experiments

2.2.1. UV irradiation

UV irradiation was performed with a solar light simulator Suntest CPS+ (Atlas, Mount Prospect, IL, USA). This simulator equipped with a xenon arc lamp and special glass filters restricting transmission of light below 290 nm, provides irradiance that approximates sunlight. HaCaT cells were seeded in flasks and irradiated at a dose of 1 or 2.5 J/cm². The cells were subsequently rinsed and incubated for 24 h in culture medium. Non-irradiated cells were used as control.

2.2.2. Lipidomic analysis

Lipid composition of keratinocytes was analyzed by ultra-performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS). After cell dispersion using trypsin, cell pellets were dissolved in 600 µL double-distilled water, vortexed for 30 s and sonicated for 5 min. Total lipids were extracted by the method of Bligh and Dyer [17]. Lipids extracts were resuspended in a 35:35:20:10 v/v/v/v acetonitrile/isopropanol/chloroform/water solution and analyzed using UPLC-HRMS on a SynaptTM G2 HDMSTM mass spectrometer (Waters MS Technologies, Manchester, UK). Data were analyzed using unsupervised principal component analysis (PCA) and supervised partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Moreover, an orthogonal partial least squares discriminant analysis model (OPLS-DA) was built on the PLS model using SIMCA-P+ software version 13.0.3 (Umetrics, Umeå, Sweden). Annotation of lipid species was performed using LIPID MAPS and METLIN online databases with a tolerance window for the mass accuracy of 5 ppm. Expected and actual retention times were compared for each lipid to confirm the previous annotation, a relative difference between these two retention times below 15% was accepted [18].

2.2.3. Sterols dosage

Quantitation of sterols in human keratinocytes was performed according to the method developed by Aycirix et al. [19] using ultra-performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry analysis (UPLC-HRMS). After cell dispersion using trypsin, cell pellets were dissolved in 600 µL double-distilled water, vortexed for 30 s and sonicated for 5 min. Sterols were extracted with a hexane/methanol mixture (7:1, v/v) under agitation for 40 min and dried under reduce pressure. Sterols were derivatized into carbamate using a solution of 4-(dimethylamino)phenyl isocyanate in dichloromethane. Dichloromethane was evaporated under reduced pressure, derivatized sterols were resuspended in an acetonitrile/isopropanol mixture (1:1, v/v) and analyzed using UPLC-ESI-HRMS on a SynaptTM G2 HDMSTM mass spectrometer (Waters MS Technologies, Manchester, UK). Oxysterol levels were normalized to protein content measured by BCA method.

2.3. Oxysterol incubation experiments

2.3.1. Keratinocytes incubation with 25-hydroxycholesterol

HaCaT cells were incubated with 25-hydroxycholesterol (25-OH, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). 25-OH was dissolved in absolute ethanol to obtain a 40 mM stock solution. Solutions were sonicated to solubilize oxysterol. 25-OH was diluted in culture medium to obtain targeted concentrations ranging from 5 to 40 µM.

2.3.2. Cell viability evaluation

Cell viability was evaluated through membrane integrity using the neutral red assay. HaCaT cells, cultured in 96-well microplates, were incubated with 25-OH for 48 h. After this incubation time, the cells were washed with PBS and incubated with a 50 µg/mL neutral red solution for 3 h at 37 °C according to Borenfreund and Puerner validated protocol [20]. Then, the cells were rinsed with PBS and lysed with a solution of acetic acid-ethanol (ethanol 50.6%, water 48.4% and acetic acid 1%). After homogenization, the fluorescence signal was scanned (λ_{exc} = 540 nm, λ_{em} = 600 nm) using a cytofluorometre (Safire, Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.3.3. Necrosis evaluation

Cell necrosis was assessed using the lactate dehydrogenase (LDH) release assay. In case of membrane damage, LDH, a cytoplasmic enzyme, is released in the extracellular compartment. The extracellular rate of lactate dehydrogenase is therefore correlated with cell death [21]. LDH mixture was prepared according to manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). 50 µL of cell supernatant were added to 50 µL of LDH mixture, and the microplate was agitated for 30 min at room temperature. Reaction was stopped with 10 µL HCl 1 N and absorbance was read at 490 nm (λ_{ref} = 690 nm) using a cytometer (Safire, Tecan).

2.3.4. Cell morphology assessment

Cell morphology was studied on living cells with the label-free technique digital holographic microscopy using a HoloMonitor M3 (Phase Holographic Imaging PHI AB, Lund, Sweden). HaCaT cells, cultured in 6-well microplates, were incubated with 25-OH for 48 h. Cell morphological changes (thickness, roughness, volume, area) were analyzed by the software provided with the HoloMonitor (HoloStudio).

2.3.5. Cell cytoskeleton actin analysis

Cytoskeletal changes in actin stained with phalloidin were observed by confocal microscopy. HaCaT cells were cultured in

Lab-Tek® (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA). After a 48-h incubation with 25-OH, the keratinocytes were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde 2% for 20 min. The cells were permeabilized with Triton TX-100 (0.2%) for 5 min, and then incubated with Alexa Fluor® 488 Phalloidin (1:40 dilution, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) during 2 h. The cells were rinsed with PBS and TO-PRO-3 (1:500 dilution, ThermoFisher Scientific) was added for 10 min to stain nuclear DNA. Lab-Tek® were observed under a Leica TCS SP2 microscope (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA) with a 40x oil immersion objective. Confocal imaging was performed at IFR71-IMTCE Cellular and Molecular Imaging platform (Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France).

2.3.6. Keratinocyte differentiation study

2.3.6.1. Autophagy. Monodansylcadaverine (MDC) constitutes an easy and fast method to evaluate autophagy [22] because MDC accumulates specifically in autophagic vacuoles [23–25]. For this experiment, HaCaT cells, cultured in 96-well microplates, were incubated with 25-OH for 48 h. After this incubation period, the cells were washed with PBS and a 0.05 mM MDC solution was distributed into wells. After a 30-min incubation time at 37 °C, the cells were rinsed three times with PBS and the fluorescence signal was scanned (λ_{exc} = 380 nm, λ_{em} = 525 nm) using a cytofluorometre (Safire, Tecan). Then, the cells were observed under fluorescence microscopy (Leica DMIRB, Wetzlar, Germany) and representative pictures were taken using Nikon Coolpix camera (Nikon, Shinjuku, Japan).

2.3.6.2. Involucrin level

2.3.6.2.1. Confocal microscopy. HaCaT cells were cultured in Lab-Tek® (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA). After a 48-h incubation time with 25-OH, the cells were washed with PBS and fixed with paraformaldehyde 2% for 20 min. The cells were permeabilized with Triton TX-100 (0.2%) for 5 min. A 45-min incubation time with anti-involucrin mouse monoclonal primary antibody (Sigma-Aldrich) diluted at 1:200 in PBS-BSA 1% was performed at room temperature. After three washes in PBS, the cells were incubated for 45 min at room temperature with Alexa fluor 488-labeled goat IgG (ThermoFisher Scientific) diluted at 1:500 in PBS-BSA 1%. The cells were rinsed with PBS and incubated with TO-PRO-3 (1:500 dilution, ThermoFisher Scientific) for 10 min to stain nuclear DNA. Lab-Tek® were observed under a Leica TCS SP2 microscope (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL, USA) with a 40x oil immersion objective.

2.3.6.2.2. Flow cytometry. HaCaT cells were cultured in 6-well plates and harvested with trypsin-EDTA, pelleted, washed twice in PBS, and fixed in paraformaldehyde 2%. After permeabilization with Triton 0.2%, the cells were incubated with anti-involucrin mouse monoclonal primary antibody (Sigma-Aldrich) diluted at 1:500 in PBS-BSA 0.5% for 45 min. After wash, the cells were incubated with Alexa fluor 488-labeled goat IgG (1:2000 dilution, ThermoFisher Scientific) for 45 min. Flow cytometric quantitation of fluorescence signal was measured using C6-Flow® cytometer (Accuri, France).

2.3.6.3. Intracellular calcium measurement. Intracellular calcium was measured using Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Fluo-4 probe loads into cells and binds to free calcium, leading to fluorescence emission. HaCaT cells were cultured in 96-well microplates. After a 48-h incubation

time with 25-OH, HaCaT cells were incubated with the Fluo-4 Direct Calcium Reagent solution (according to the manufacturer's instructions) for 1 h at 37 °C. Fluorescence signal was scanned (λ_{exc} = 494 nm, λ_{em} = 516 nm) using a cytofluorometre (Safire, Tecan).

2.3.7. Statistical analysis

In all 25-OH experiments, no difference was observed between negative control (culture medium) and absolute ethanol solvent (data not shown).

Statistical analysis was performed on at least three independent experiments with GraphPadPrism 6 software. A one-way ANOVA followed by a Dunnett test with a risk α at 5% was used. Thresholds of significance were *** p < 0.001, ** p < 0.01 and * p < 0.05 compared to culture medium.

3. Results

3.1. Changes in keratinocyte lipid composition after UV irradiation

As degenerative diseases are associated with increases in ceramides and oxysterols, we explored lipid modifications after UV irradiation of HaCaT keratinocytes using mass spectrometry.

First, an untargeted approach was used to characterize the changes in keratinocyte lipid content after UV irradiation. A two-component PCA score plot of UPLC-HRMS data was used to visualize general variation of lipids between irradiated and non-irradiated cells. Undistinguished clusters of irradiated HaCaT cells at 1 J/cm² and non-irradiated cells were observed (Fig. 1A), whereas a clear separation between 2.5 J/cm² irradiated HaCaT cells and non-irradiated HaCaT cells was observed (Fig. 1B). A supervised analysis using OPLS-DA method was realized to enhance the identification of similarities or differences between non-irradiated cells and 2.5 J/cm² irradiated cells. The score plot of the OPLS-DA method showed an excellent separation between 2.5 J/cm² irradiated HaCaT cells and non-irradiated HaCaT cells (Fig. 1C). The lipid changes we observed after 2.5 J/cm² UV irradiation on keratinocytes were: increases in ceramides, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, and decreases in sphingomyelin and phosphatidylcholine-plasmalogen (Table 1). Details on chemical formulas and fold changes were listed on supplementary data (table S1).

Second, a targeted approach was used to investigate changes in cholesterol and oxidized metabolites of cholesterol called oxysterols in UV-irradiated cells. Among the studied oxysterols, 25-OH level was significantly increased after irradiation (Fig. 2). This increase was UV dose-dependent; indeed, 25-OH level was higher after a 2.5 J/cm² irradiation (753.10⁻⁶ nmol/ μ g protein compared to 174.10⁻⁶ nmol/ μ g protein in control cells, corresponding to a 4.3-fold increase in Fig. 2B) than after a 1 J/cm² irradiation (348.10⁻⁶ nmol/ μ g protein compared to 185.10⁻⁶ nmol/ μ g protein in control cells corresponding to a 2.1-fold increase in Fig. 2A). No significant change was observed in the level of either cholesterol or other studied oxysterols. These data suggest a link between UV irradiation and 25-OH level in keratinocytes. That is why we further investigated the effects of 25-OH on keratinocytes.

3.2. 25-OH cytotoxicity on keratinocytes

Cytotoxicity was evaluated after a 48-h incubation time with 25-OH through two markers: cell viability using the neutral red assay, and necrosis using the LDH release assay. As we can observe

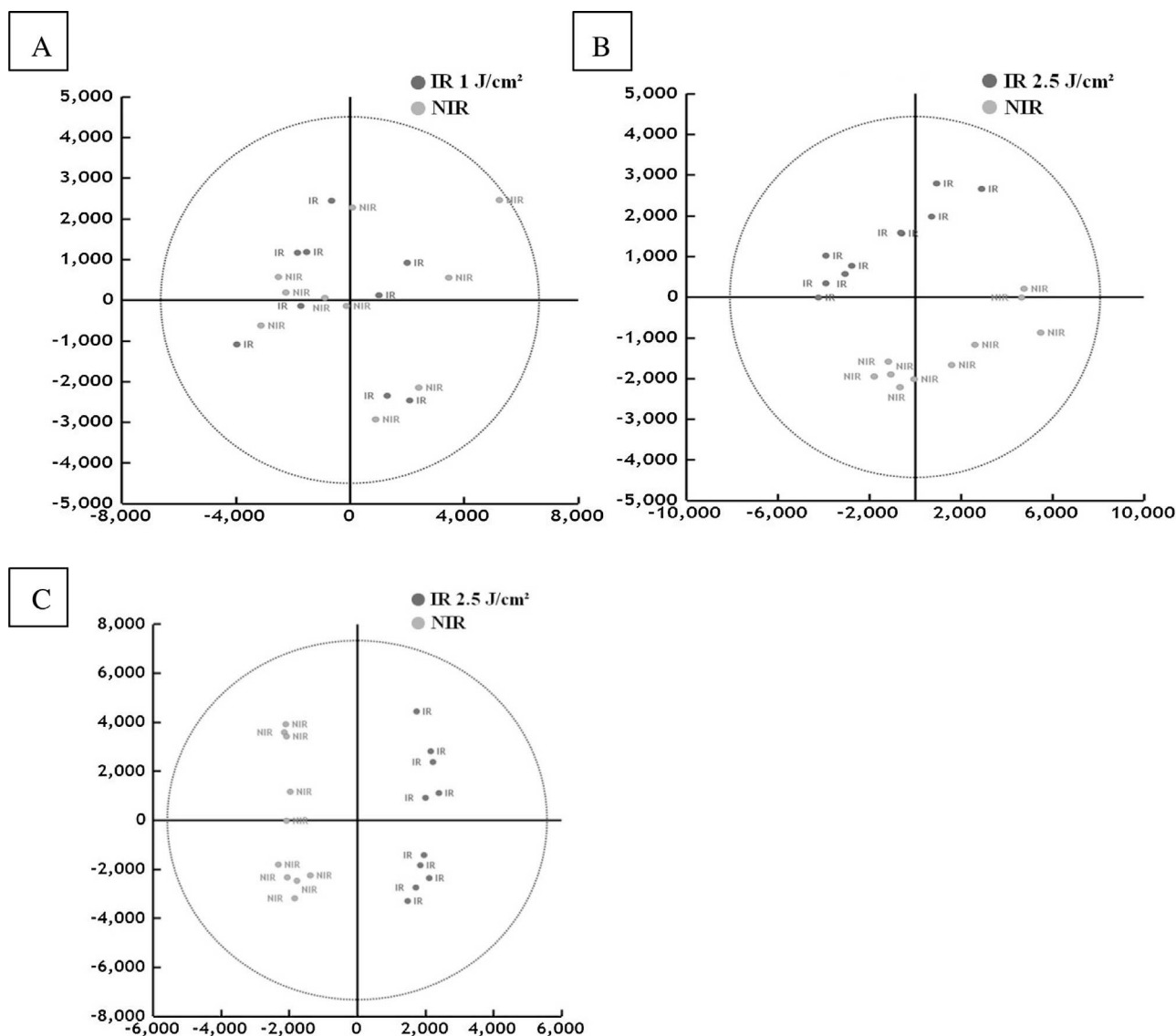


Fig. 1. Lipid profiles analysis after UV irradiation of HaCaT cells (n = 10). A. Score plot of the model generated by unsupervised principal component analysis (PCA) between irradiated cells at 1 J/cm² (IR) and non-irradiated cells (NIR). B. Score plot of the model generated by unsupervised principal component analysis (PCA) between irradiated cells at 2.5 J/cm² (IR) and non-irradiated cells (NIR). C. Score plot of the model generated by supervised analysis (OPLS-DA) between irradiated cells at 2.5 J/cm² (IR) and non-irradiated cells (NIR).

Table 1

List of the lipids upregulated and downregulated resulting in the separation between 2.5 J/cm² irradiated cells and non-irradiated cells. Values correspond to upregulation (UR) or downregulation (DR) mean percentages of cells irradiated at 2.5 J/cm². In brackets are given the corresponding numbers of Cer, PC, PE and SM species that were upregulated or downregulated. Cer: Ceramide, GlcCer: GlucosylCeramide, LacCer: LactosylCeramide, PC: Phosphatidylcholine, PC-P: Phosphatidylcholine Plasmalogen, PE: phosphatidylethanolamines, PE-P: Phosphatidylethanolamine-Plasmalogen, SM: Sphingomyelin.

		% UR	% DR
Ceramides (Cer)	Cer	91 (8)	36 (1)
	GlcCer	49 (6)	39 (2)
	LacCer	32 (2)	
Phosphatidylcholines (PC)	PC	52 (10)	
	PC-P	21 (2)	40 (5)
Phosphatidylethanolamines (PE)	PE	43 (12)	34 (1)
	PE-P	44 (7)	31 (2)
Sphingomelins (SM)	SM		35 (11)

in Fig. 3A, the viability percentage was equal or superior to 70 until 40 μ M. Considering a 30% viability loss as an acceptable cytotoxicity is a standard practice in toxicology [26]. Consequently, for further experiments, we selected concentrations ranging from 5 μ M to 40 μ M. No change in LDH release was observed after 25-OH incubation from 5 μ M to 40 μ M (Fig. 3B).

3.3. Keratinocyte morphology and cytoskeleton after 25-OH incubation

Cell morphology was studied using digital holographic microscopy. After a 48-h incubation time with 25-OH, we observed a concentration-dependent increase in thickness average, meaning that HaCaT cells are thicker than in culture medium (Fig. 4). These morphological alterations could be linked to changes in cytoskeleton, so we further studied 25-OH effects on keratinocytes actin cytoskeleton.

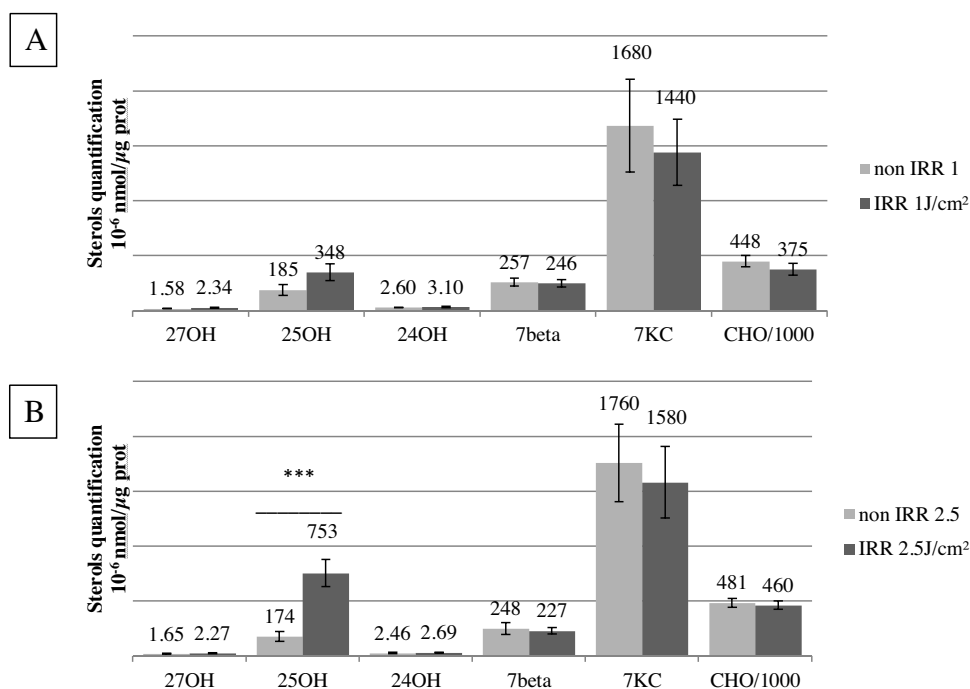


Fig. 2. Sterol quantitation in HaCaT cells after UV irradiation. A. Comparison of sterol quantitation between irradiated cells at 1 J/cm² and non-irradiated cells. B. Comparison of sterol quantitation between irradiated cells at 2.5 J/cm² and non-irradiated cells. 27OH: 27-hydroxycholesterol, 25OH: 25-hydroxycholesterol, 24OH: 24-hydroxycholesterol, 7beta: 7-β-hydroxycholesterol, 7KC: 7-ketocholesterol, CHO: cholesterol. ***p < 0.001 compared to non-irradiated cells (n = 10).

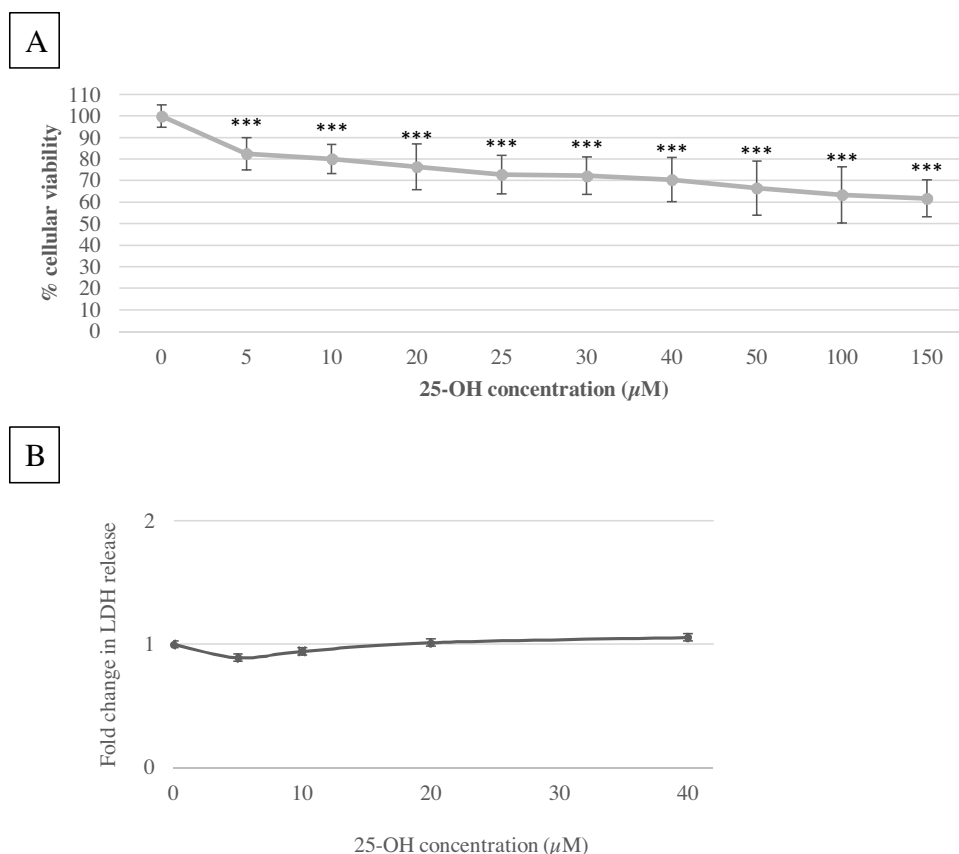


Fig. 3. 25-OH cytotoxicity in HaCaT cells after a 48-h incubation time. A. HaCaT cell viability evaluation using the neutral red assay to select subtoxic concentrations of 25-OH (n = 18). ***p < 0.001 compared to control cells. B. Necrosis evaluation using the LDH release assay (n = 5).

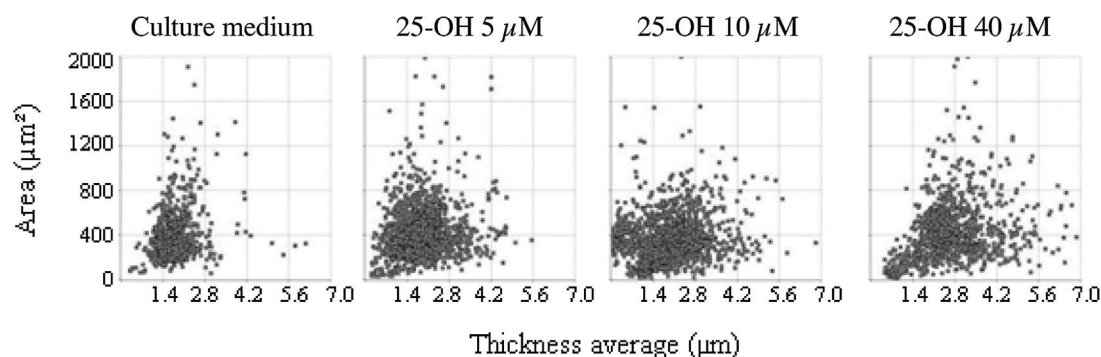


Fig. 4. Morphological observation of HaCaT cells after a 48-h incubation time with 25-OH (representative of three independent experiments) using digital holographic microscopy. Cell area was expressed as a function of cell average thickness. Each dot represents one cell.

Actin cytoskeleton was observed by immunofluorescence on confocal microscopy. We observed numerous organized actin filaments in control cells (culture medium), whereas they became fewer after a 48-h incubation time with 25-OH at 10 μ M and absent at 40 μ M (Fig. 5). As cells undergo remodeling of actin cytoskeleton during keratinocyte differentiation [3], we decided to study other hallmarks of keratinocytes differentiation.

3.4. Autophagy after 25-OH incubation

As autophagy occurs during keratinocyte differentiation [6], we evaluated autophagy using the monodansylcadaverine (MDC) assay. Microscopic observations of MDC show increase in MDC fluorescence signal after 25-OH 10, 25 and 40 μ M compared to culture medium (Fig. 6A). To confirm our observations, we quantified MDC fluorescence signal using microplate cytometry. A statistically significant increase in autophagy was observed at 25-OH 10, 25 and 40 μ M (x1.23, 1.40 and 1.23, respectively compared to negative control, Fig. 6B). This increase reached a maximum at 25-OH 25 μ M.

3.5. Involucrin level after 25-OH incubation

Involucrin, a specific marker of keratinocyte differentiation [4], was studied with immunofluorescence using confocal microscopy and flow cytometry. As seen in confocal microscopy pictures, involucrin level seemed higher after a 48-h incubation time with 25-OH than in culture medium (Fig. 7A). This increase is

statistically significant for 25-OH 10 μ M and 25-OH 40 μ M (Fig. 7B).

3.6. Intracellular calcium quantitation after 25-OH incubation

Calcium plays a key role in keratinocyte differentiation process [5]. Intracellular calcium was quantified using the Fluo-4 Direct assay (Fig. 8). A significant increase in intracellular calcium was observed after a 48-h incubation time with 25-OH 10, 20 and 40 μ M (x1.21, 1.26 and 1.32, respectively compared to negative control).

4. Discussion

The photoaging of skin is a degenerative process induced by sun exposure. UVA or UVB spectra are mostly used to reproduce sun exposure in labs; and yet, skin is exposed to a combination of UVA and UVB. Consequently, we chose an irradiator that approximates sun UV irradiation to expose keratinocytes to both UVA and UVB. As many degenerative diseases are correlated with lipid deregulation [8,9], we explored changes in lipid composition after UV irradiation of HaCaT human keratinocytes. HaCaT cell line constitutes a suitable model to study this parameter as these cells have the same total lipid content and the same distribution of major lipid species as native keratinocytes [27]. No change in keratinocytes lipid composition was observed after 1 J/cm² UV dose, whereas significant modifications were observed after 2.5 J/cm² UV dose. Marionnet et al. showed that UV daylight dose is

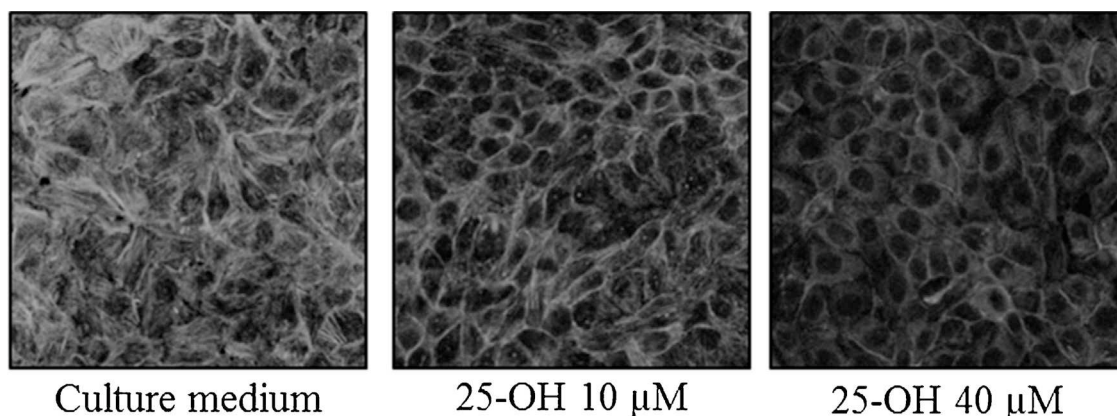


Fig. 5. Representative pictures of cytoskeletal observation of HaCaT cells after a 48-h incubation time with 25-OH (representative of three independent experiments). Actin staining was studied using confocal microscopy.

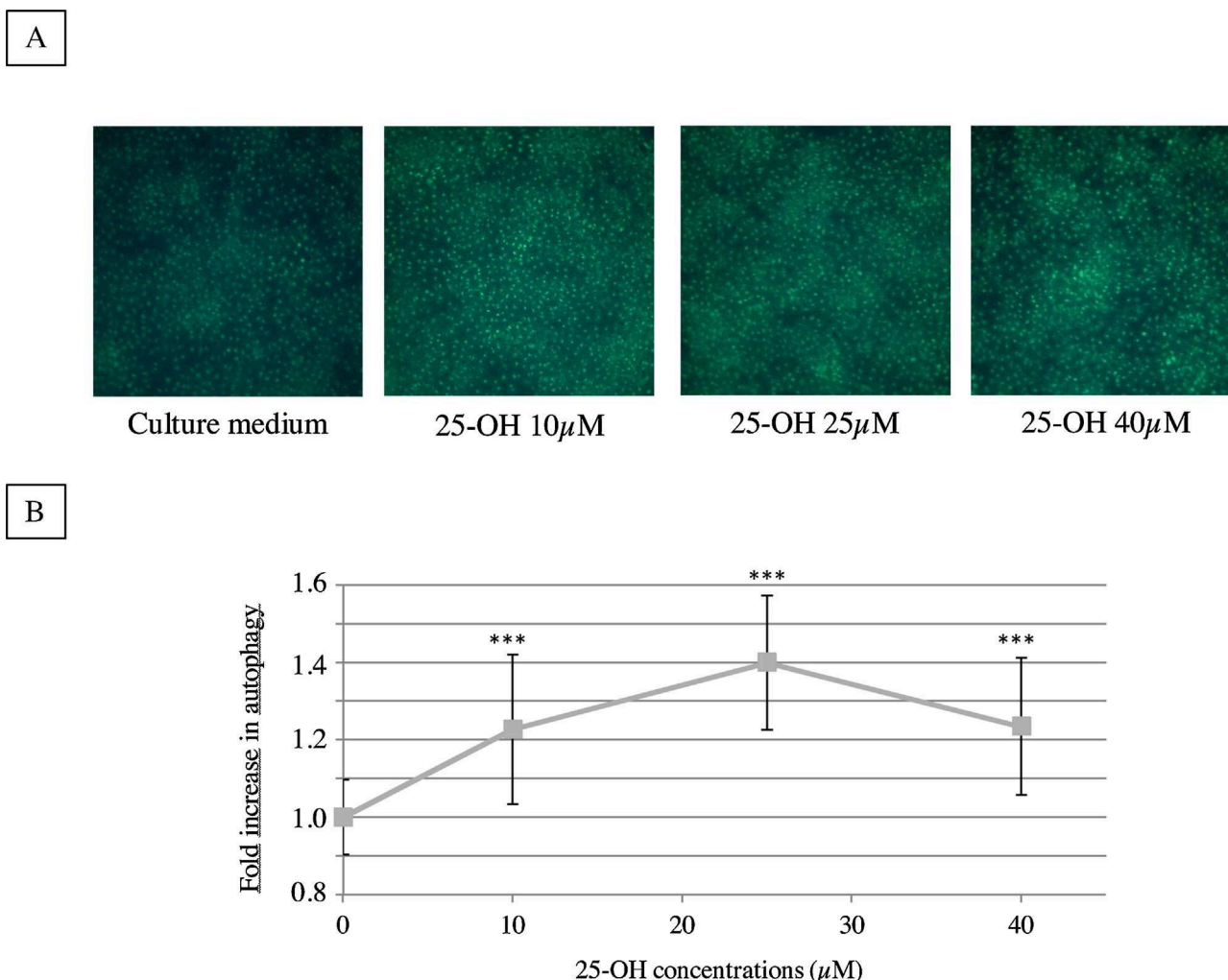


Fig. 6. Autophagy evaluation using the monodansylcadaverine (MDC) assay in HaCaT cells after a 48-h incubation time with 25-OH. A. Representative pictures of MDC labelling observed under fluorescence microscopy (representative of three independent experiments). B. Quantitation of MDC fluorescence signal using microplate cytometry ($n = 24$). *** $p < 0.001$ compared to control cells.

comprised between 11 and 70 J/cm² in April around the world [28]. Our irradiation model, consisting of a single exposure at a dose close to UV daylight dose, is sufficient to induce dramatic changes in keratinocyte lipid profile.

In our study, UV irradiation exposure led to an increase in ceramides content of human keratinocytes. Our results complete those obtained by Wefers who showed that UV irradiation increased ceramides abundance in human stratum corneum [29]. The increase in ceramides observed in our study was concomitant with a decrease in sphingomyelin and an increase in phosphatidylcholine. As sphingomyelin can be metabolized by sphingomyelinase to form ceramides and phosphocholine, an intermediate of phosphatidylcholine, it would be interesting to study the activity of sphingomyelinase after keratinocyte UV irradiation in further experiments.

To us, oxysterols appear of most interest in UV irradiation studies because oxysterols are oxidized derivatives of cholesterol and UV irradiation is known to induce oxidative stress [30]. For the first time, we observed an increase in oxysterol levels, mainly 25-OH, after UV irradiation on keratinocytes. Previous studies demonstrated the involvement of ceramides and oxysterols in degenerative diseases [11–14]. Taken together, our observations and the literature data tend to highlight that ceramide and

oxysterol deregulation appears to be a hallmark of degenerative disorders.

Oxysterols were the lipids with the greatest increase after UV irradiation. Therefore, we focused on oxysterols, especially 25-OH, for the following experiments.

In our model, 25-OH increased keratinocyte thickness and disrupted cytoskeleton. Previous studies underlined morphological changes in photoaging models after UV irradiation [31,32] and actin cytoskeletal network disruption in aging skin [33–35]. This actin cytoskeleton remodeling can trigger keratinocyte differentiation [3]. During early steps of keratinocyte differentiation, autophagy pathway is activated to recycle cellular wastes [6]. We observed that 25-OH acts not only on autophagy but also on other hallmarks of keratinocyte differentiation such as involucrin and intracellular calcium. Involucrin is a protein rich in glutamine and lysine, which are essential for crosslinking by transglutaminase to build the cornified envelope during the maturation of keratinocytes in corneocytes [36]. The onset of involucrin synthesis marks an early stage in terminal keratinocyte differentiation [37]: a layer of involucrin serves as a scaffold for the subsequent attachment of other reinforcement proteins such as loricrin, small proline rich proteins and flaggrin, and of the lipid envelope [38]. Therefore, involucrin expression is widely used in

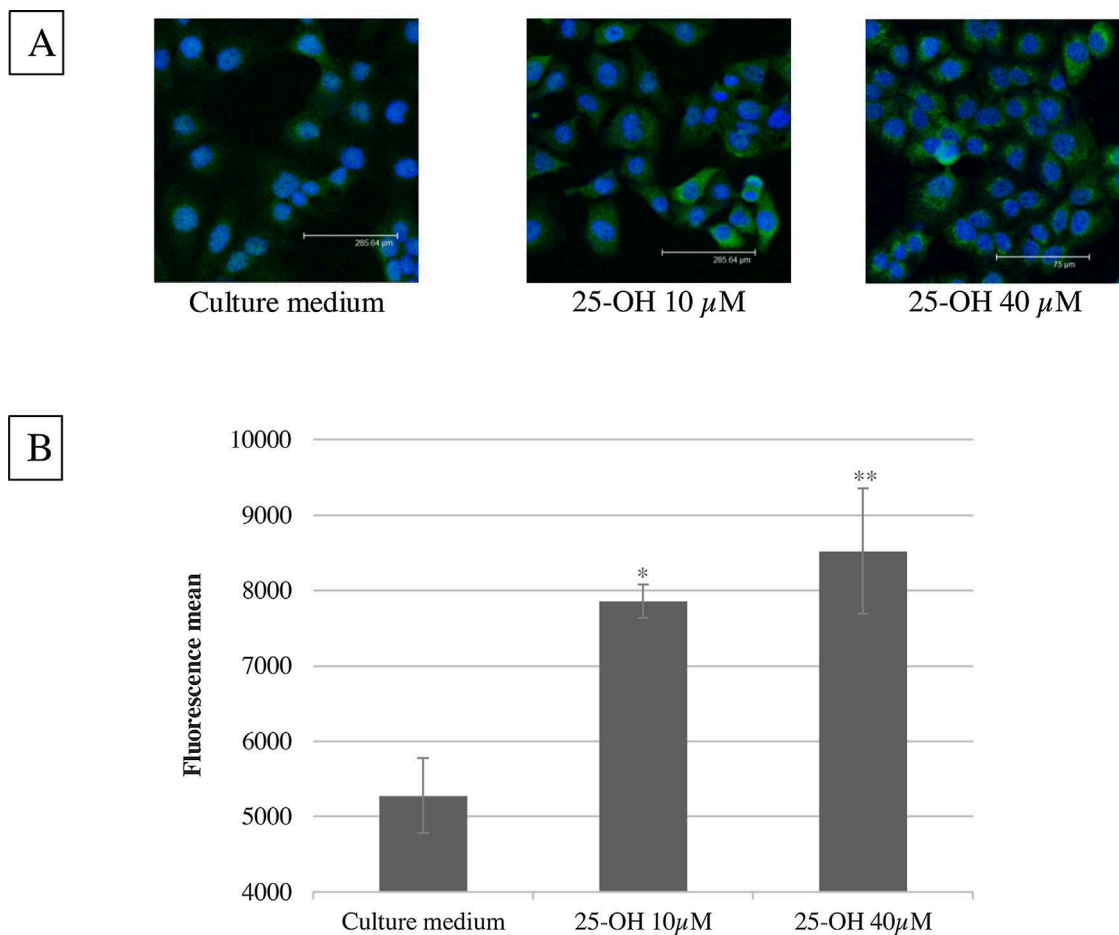


Fig. 7. Involucrin level evaluation using involucrin in HaCaT cells after a 48-h incubation time with 25-OH. A. Representative pictures of involucrin immunolabelling observed under confocal microscopy (representative of three independent experiments). B. Involucrin level increase using flow cytometry (n = 5). *p < 0.05 and **p < 0.01 compared to control cells.

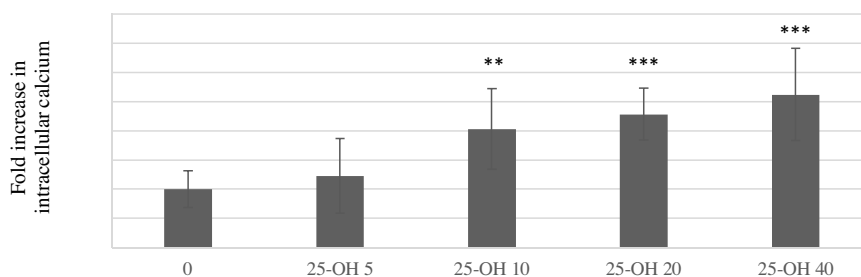


Fig. 8. Intracellular calcium evaluation using Fluo-4 Direct assay (n = 12). **p < 0.01 and ***p < 0.001 compared to control cells.

keratinocyte differentiation studies. Especially, the expression of involucrin is strictly calcium dependent. Indeed, increase in intracellular calcium stimulates the expression of markers of cell differentiation such as involucrin [39,40]. Keratinocyte differentiation is observed during photoaging process [41] and in our study, 25-OH, generated after UV irradiation, induced typical hallmarks of skin aging or photoaging.

To conclude, ceramide and oxysterol deregulation could be considered as a marker of degenerative disorders, including

photoaging. During this process, 25-OH seems to play a key role inducing several patterns of keratinocyte differentiation.

Acknowledgments

We would like to thank Dr K. Alm, Phase Holographic Imaging PHI AB, for technical support, helpful advice and data analysis about digital holographic microscopy. We acknowledge support from Adebipharm ER67 (Paris).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.05.015>.

References

- [1] United Nations Population Fund, Ageing | UNFPA—United Nations Population Fund, (n.d.). <http://www.unfpa.org/ageing> (accessed 09.01.16).
- [2] E. Houben, K. De Paepe, V. Rogiers, A keratinocyte's course of life, *Skin Pharmacol. Physiol.* 20 (2007) 122–132, doi:<http://dx.doi.org/10.1159/000098163>.
- [3] I. Amelio, A.M. Lena, G. Viticchiè, R. Shalom-Feuerstein, A. Terrinoni, D. Dinsdale, G. Russo, C. Fortunato, E. Bonanno, L.G. Spagnoli, D. Aberdam, R.A. Knight, E. Candi, G. Melino, MiR-24 triggers epidermal differentiation by controlling actin adhesion and cell migration, *J. Cell Biol.* 199 (2012) 347–363, doi:<http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201203134>.
- [4] R.L. Eckert, J.F. Crish, T. Efimova, S.R. Dashti, A. Deucher, F. Bone, G. Adhikary, G. Huang, R. Gopalakrishnan, S. Balasubramanian, Regulation of involucrin gene expression, *J. Invest. Dermatol.* 123 (2004) 13–22, doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22723.x>.
- [5] F. Elsholz, C. Harteneck, W. Muller, K. Friedland, Calcium—a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease, *Eur. J. Dermatol.* 24 (2014) 650–661, doi:<http://dx.doi.org/10.1684/ejd.2014.2452>.
- [6] E. Aymard, V. Barruche, T. Naves, S. Bordes, B. Closs, M. Verdier, M.-H. Ratinaud, Autophagy in human keratinocytes: an early step of the differentiation? *Exp. Dermatol.* 20 (2011) 263–268, doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01157.x>.
- [7] J.H. Lee, H.T. An, J.H. Chung, K.H. Kim, H.C. Eun, K.H. Cho, Acute effects of UVB radiation on the proliferation and differentiation of keratinocytes, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 18 (2002) 253–261.
- [8] K.B. Ebrahimi, J.T. Handa, Lipids, lipoproteins, and age-related macular degeneration, *J. Lipids* 2011 (2011) e802059, doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2011/802059>.
- [9] G. Di Paolo, T.-W. Kim, Linking lipids to alzheimer's disease: cholesterol and beyond, *Nat. Rev. Neurosci.* 12 (2011) 284–296, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/nrn3012>.
- [10] I. Björkhem, A. Cedazo-Minguez, V. Leoni, S. Meaney, Oxysterols and neurodegenerative diseases, *Mol. Asp. Med.* 30 (2009) 171–179, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.001>.
- [11] H. Chen, J.-T.A. Tran, R.S. Brush, A. Saadi, A.K. Rahman, M. Yu, D. Yasumura, M.T. Matthes, K. Ahern, H. Yang, M.M. LaVail, M.N.A. Mandal, Ceramide signaling in retinal degeneration, *Adv. Exp. Med. Biol.* 723 (2012) 553–558, doi:http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-0631-0_70.
- [12] R.G. Cutler, J. Kelly, K. Storie, W.A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J.C. Troncoso, M.P. Mattson, Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 2070–2075, doi:<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0305799101>.
- [13] V. Leoni, C. Caccia, Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases, *Chem. Phys. Lipids* 164 (2011) 515–524, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.04.002>.
- [14] A. Zarrouk, A. Vejux, J. Mackrill, Y. O'Callaghan, M. Hammami, N. O'Brien, G. Lizard, Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes, *Ageing Res. Rev.* 18 (2014) 148–162, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2014.09.006>.
- [15] E. Olivier, M. Dutot, A. Regazzetti, T. Leguillier, D. Dargere, N. Auzeil, O. Laprevote, P. Rat, P2 × 7-Pannexin-1 and amyloid β-induced oxysterol input in human retinal cell: role in age-related macular degeneration? *Biochimie* (2016), doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2016.04.014>.
- [16] I. Sjerobabski Masnec, S. Poduje, Photoaging, *Coll. Antropol.* 32 (Suppl. 2) (2008) 177–180.
- [17] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917, doi:<http://dx.doi.org/10.1139/o59-099>.
- [18] J. Lanzini, D. Dargère, A. Regazzetti, A. Tebani, O. Laprevote, N. Auzeil, Changing in lipid profile induced by the mutation of Foxn1 gene: a lipidomic analysis of nude mice skin, *Biochimie* 118 (2015) 234–243, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.029>.
- [19] S. Ayciriex, A. Regazzetti, M. Gaudin, E. Prost, D. Dargère, F. Massicot, N. Auzeil, O. Laprevote, Development of a novel method for quantification of sterols and oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: application to a neuroinflammation rat model, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 3049–3059, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6396-6>.
- [20] E. Borenfreund, J.A. Puerner, A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90), *J. Tissue Cult. Methods* 9 (1985) 7–9, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/BF01666038>.
- [21] C. Legrand, J.M. Bour, C. Jacob, J. Capiaumont, A. Martial, A. Marc, M. Wudtke, G. Kretzmer, C. Demangel, D. Duval, Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected], *J. Biotechnol.* 25 (1992) 231–243.
- [22] C.L. Vázquez, M.I. Colombo, Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA, *Methods Enzymol.* 452 (2009) 85–95, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03606-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03606-9).
- [23] G. Petrovski, G. Zahuczky, K. Katona, G. Vereb, W. Martinet, Z. Nemes, W. Bursch, L. Fésüs, Clearance of dying autophagic cells of different origin by professional and non-professional phagocytes, *Cell Death Differ.* 14 (2007) 1117–1128, doi:<http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4402112>.
- [24] D.B. Munafó, M.I. Colombo, Induction of autophagy causes dramatic changes in the subcellular distribution of GFP-Rab24, *Traffic* 3 (2002) 472–482, doi:<http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30704.x>.
- [25] A. Biederick, H.F. Kern, H.P. Elsässer, Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles, *Eur. J. Cell Biol.* 66 (1995) 3–14.
- [26] International Standard Organisation (ISO), Évaluation biologique des dispositifs médicaux—Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro, n.d.
- [27] N. Schürer, A. Köhne, V. Schliep, K. Barlag, G. Goerz, Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes, *Exp. Dermatol.* 2 (1993) 179–185.
- [28] C. Marionnet, C. Tricaud, F. Bernerd, Exposure to non-extreme solar UV daylight: spectral characterization, effects on skin and photoprotection, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 68–90, doi:<http://dx.doi.org/10.3390/ijms16010068>.
- [29] H. Wefers, B.C. Melnik, M. Flür, C. Bluhm, P. Lehmann, G. Plewig, Influence of UV irradiation on the composition of human stratum corneum lipids, *J. Invest. Dermatol.* 96 (1991) 959–962.
- [30] L. Rittié, G.J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res. Rev.* 1 (2002) 705–720.
- [31] H. Alpermann, H.G. Vogel, Effect of repeated ultraviolet irradiation on skin of hairless mice, *Arch. Dermatol. Res.* 262 (1978) 15–25, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/BF00455569>.
- [32] H. Lopez, J.Z. Beer, S.A. Miller, B.Z. Zmudzka, Ultrasound measurements of skin thickness after UV exposure: a feasibility study, *J. Photochem. Photobiol. B* 73 (2004) 123–132, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.11.004>.
- [33] C.W. Gourlay, K.R. Ayscough, A role for actin in aging and apoptosis, *Biochem. Soc. Trans.* 33 (2005) 1260–1264, doi:<http://dx.doi.org/10.1042/BST20051260>.
- [34] K.M. Rao, H.J. Cohen, Actin cytoskeletal network in aging and cancer, *Mutat. Res.* 256 (1991) 139–148.
- [35] M.J. Reed, N.S. Ferara, R.B. Vernon, Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors, *Mech. Ageing Dev.* 122 (2001) 1203–1220, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00260-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00260-3).
- [36] A.E. Kalinin, A.V. Kajava, P.M. Steinert, Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope, *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 24 (2002) 789–800, doi:<http://dx.doi.org/10.1002/bies.10144>.
- [37] F.M. Watt, Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation, *J. Invest. Dermatol.* 81 (1983) 100s–103s.
- [38] P.M. Steinert, L.N. Marekov, Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 2021–2030.
- [39] L. Li, R.W. Tucker, H. Hennings, S.H. Yuspa, Inhibitors of the intracellular Ca(2+) -ATPase in cultured mouse keratinocytes reveal components of terminal differentiation that are regulated by distinct intracellular Ca²⁺ compartments, *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6 (1995) 1171–1184.
- [40] A. Deucher, T. Efimova, R.L. Eckert, Calcium-dependent involucrin expression is inversely regulated by protein kinase C (PKC)α and PKCδ, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 17032–17040, doi:<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109076200>.
- [41] Y. Soroka, Z. Ma'or, Y. Leshem, L. Verochovsky, R. Neuman, F.M. Brégégère, Y. Milner, Aged keratinocyte phenotyping: morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals, *Exp. Gerontol.* 43 (2008) 947–957, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2008.08.003>.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les oxystérols ont été associés à plusieurs maladies dégénératives et neurodégénératives, mais peu d'informations sont disponibles sur l'origine de la formation de ces molécules et les mécanismes cellulaires qu'elles induisent. Le déclenchement de ces processus dégénératifs implique, au niveau cellulaire, des voies de signalisation entraînant des réactions inflammatoires et de l'apoptose dans lesquels les récepteurs membranaires P2X7 interviennent. En effet, ces purinorécepteurs sont impliqués notamment dans la formation de l'inflammasome, mais aussi dans le déclenchement de l'apoptose par l'activation des caspases. Aussi, l'étude du rôle de ces récepteurs dans les effets induits par les oxystérols apparaît essentielle. Nous avons en premier lieu centré notre étude sur une pathologie dégénérative, la DMLA puis nous nous sommes demandé si ces acteurs étaient retrouvés lors du vieillissement et du photovieillissement de la peau, ces processus comportant une part de dégénérescence.

L'originalité de notre travail repose sur le fait que nous avons utilisé les appareils et les modèles cellulaires les mieux adaptés au tissu étudié.

Pour la mise en place le modèle *in vitro* de DMLA, nous avons privilégié les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien humain issues de la lignée ARPE-19, reconnues pour leurs caractéristiques identiques à celle de l'épithélium pigmenté rétinien *in vivo*, que nous avons incubées avec le peptide β amyloïde 1-42, identifié dans la littérature comme étant un responsable majeur de la pathogenèse de la DMLA.

Au cours de l'étude du vieillissement et du photovieillissement, nous avons utilisé des kératinocytes issus de biopsies de patients, ainsi que des kératinocytes humains de la lignée HaCaT qui possèdent une composition lipidique ainsi que des capacités d'organisation et de différenciation similaires aux kératinocytes *in vivo*. Nous avons également travaillé sur des cellules de cornée de type HCE-T qui partagent les mêmes caractéristiques morphologiques et expriment les mêmes cytokératines spécifiques que l'épithélium cornéen *in vivo*.

Dans le but de mimer le photovieillissement, nous avons choisi un irradiateur UV reproduisant le spectre solaire afin de nous approcher au maximum des conditions réelles d'exposition des cellules humaines.

Au cours de notre étude, nous avons utilisé de nombreuses techniques permettant d'explorer les principales caractéristiques de nos modèles *in vitro* afin de constituer des méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Cette démarche répond totalement à la règle des 3R : réduction, raffinement, remplacement dans le cadre de l'expérimentation animale. Nous avons ainsi eu recours à des quantifications par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse afin d'étudier la composition lipidique, et plus précisément la composition en stérols de nos différents modèles, ainsi que les évolutions de ces compositions lors de processus dégénératifs. Nous avons ensuite utilisé des techniques de cytométrie en plaque afin d'explorer par criblage différents marqueurs, que ce soit la viabilité cellulaire, la production d'espèces réactives de l'oxygène, les lipides membranaires ou l'activation des récepteurs P2X7. Ces explorations ont été complétées avec des techniques de cytométrie en flux pour l'étude du cycle cellulaire ainsi que de l'expression de différentes protéines. Les méthodes immuno-enzymatiques ont permis l'étude de différents marqueurs sécrétés dans le milieu extracellulaire tels que les cytokines pro-inflammatoires. L'utilisation de la microscopie confocale nous a, quant à elle, permis d'étudier le cytosquelette mais aussi l'expression de différentes protéines et la microscopie holographique digitale nous a fait appréhender la morphologie cellulaire d'une façon totalement innovante.

Il convient de souligner que nos approches expérimentales font appel à des modèles *in vitro* à exposition unique qui nous permettent d'étudier des processus dégénératifs, qui par définition, sont des processus au long cours.

Dans notre étude, nous avons sélectionné deux oxystérols, le 7-KC et le 25-OH. Le 7-KC est l'oxystérol le plus abondant quel que soit le type cellulaire étudié ; ceci peut s'expliquer par son mode de production exclusivement par auto-oxydation du cholestérol, très abondant dans les membranes cellulaires, à l'inverse des autres oxystérols dont la formation est d'ordre enzymatique. Dans nos travaux, nous n'avons pas observé de variation significative du taux de 7-KC, que ce soit dans le modèle de DMLA ou après irradiation UV mais nous avons choisi d'étudier ses effets car il est associé à différentes pathologies dégénératives dans la littérature. En effet, le 7-KC est un composant des drusen dans la DMLA ; cet oxystérol est également le plus abondant

dans les plaques d'athérosclérose (Brown and Jessup, 1999; Rodriguez et al., 2014). En outre, le taux de cet oxystérol est augmenté dans les mélanocytes issus de biopsies pratiquées sur des patients atteints de vitiligo, pathologie entraînant une dégénérescence des mélanocytes (Bellei et al., 2013). Contrairement au 7-KC, dans nos résultats, le 25-OH est l'oxystérol dont le taux est le plus modifié que ce soit après incubation avec le peptide β amyloïde ou après irradiation UV, il nous a paru donc essentiel d'étudier ses effets cellulaires.

Nos travaux sur l'épithélium pigmentaire rétinien ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, qu'un acteur clé dans le développement des maladies dégénératives, le peptide β amyloïde, induit la formation d'oxystérols, et notamment de 25-OH (article 1). Dasari *et al.* ayant montré que les oxystérols conduisaient à la formation de peptide β amyloïde, une boucle de chronicité se dessine entre les oxystérols et ce peptide, conduisant à la dégénérescence rétinienne. Nous avons précédemment démontré au sein du laboratoire que le peptide β amyloïde active les récepteurs de dégénérescence P2X7. Par conséquent nous nous sommes demandé si les oxystérols activaient également ces récepteurs. Le 7-KC et le 25-OH agissent différemment sur les cellules de rétine. En effet, le 25-OH induit la formation d'un complexe entre le récepteur P2X7 et le canal pannexine-1 tandis que le 7-KC les active séparément. Nos résultats nous permettent de synthétiser le processus dégénératif conduisant à la dégénérescence rétinienne de la manière suivante :

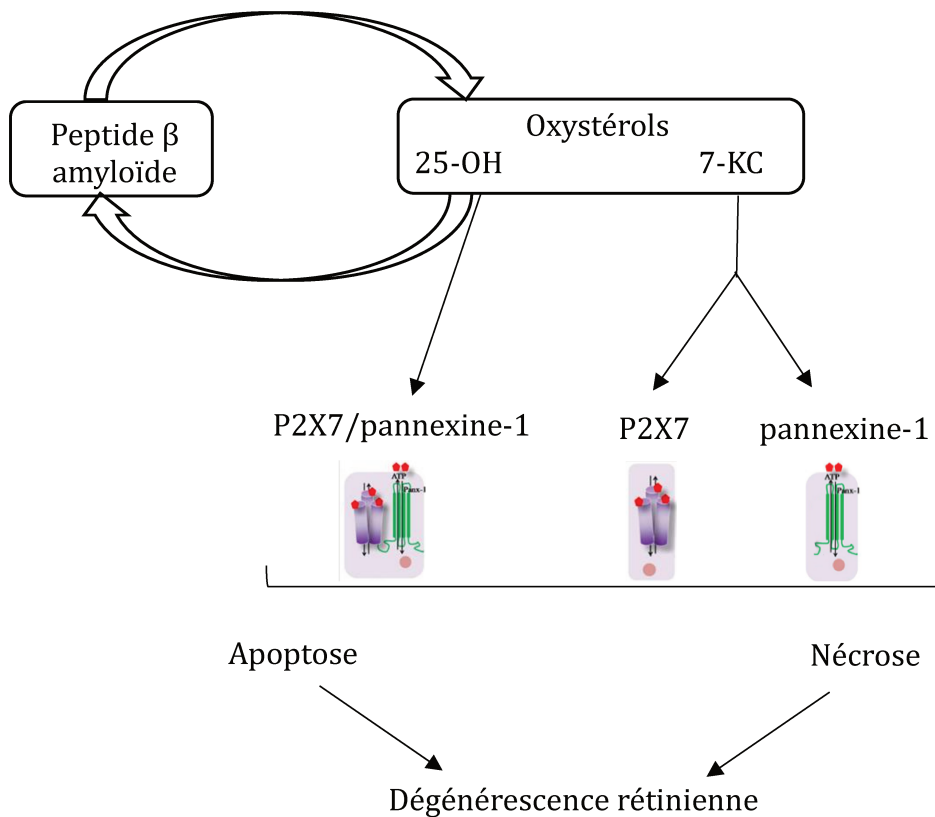


Figure 77 : Schéma du processus dégénératif conduisant à la dégénérescence rétinienne

Hormis la rétine, d'autres tissus subissent les processus dégénératifs liés à l'âge. La peau est l'organe le plus exposé aux agents exogènes, aussi bien physiques (rayonnement UV...) que chimiques (pollution...). Elle est ainsi sujette aux processus dégénératifs qu'ils soient physiologiques au cours du vieillissement ou accélérés lors du photovieillissement. Nous nous sommes posé la question du rôle des oxystérols dans les processus de vieillissement. Pour y répondre nous avons utilisé un modèle de rayonnement UV mimant les rayons UV solaires et démontré pour la première fois que les rayons UV induisent la formation d'oxystérols, particulièrement de 25-OH, dans les kératinocytes. Le 25-OH induit des modifications lipidiques membranaires en particulier au niveau des cavéoles, en augmentant l'expression de la cavéoline-1, et stimule l'activation des pores P2X7 en induisant la formation du complexe P2X7/pannexine-1. Le 25-OH agit également sur deux composantes des pathologies dégénératives : l'apoptose caspase-dépendante et l'inflammation. Nous avons observé une augmentation de multiples cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1 α , IL-6, IL-8 et MIF. La sécrétion de MIF peut être déclenchée par IL-1 α (Watanabe et al., 2004) qui peut

elle-même être contrôlée par le granzyme B, une sérine-protéase dont la libération est également induite par le 25-OH (Afonina et al., 2011). En outre, les récepteurs P2X7 stimulent la libération d'IL-1 α (Ferrari et al., 2006; Pelegrin et al., 2008). Ainsi, une boucle d'amplification entre ces deux cytokines et le granzyme B est instaurée et peut conduire à rendre l'inflammation induite par le 25-OH chronique. Dans le tissu cutané, le granzyme B peut être associé à une dégradation de la matrice extracellulaire, que nous pouvons suspecter avec le 25-OH du fait de son effet inducteur sur la sécrétion de la métalloprotéinase MMP-9. Ainsi, le 25-OH semble activer des voies de signalisation mettant en jeu les récepteurs P2X7 et conduisant à une dégénérescence. Les effets du 25-OH que nous avons révélés sur les kératinocytes peuvent ainsi être représentés par le schéma suivant :

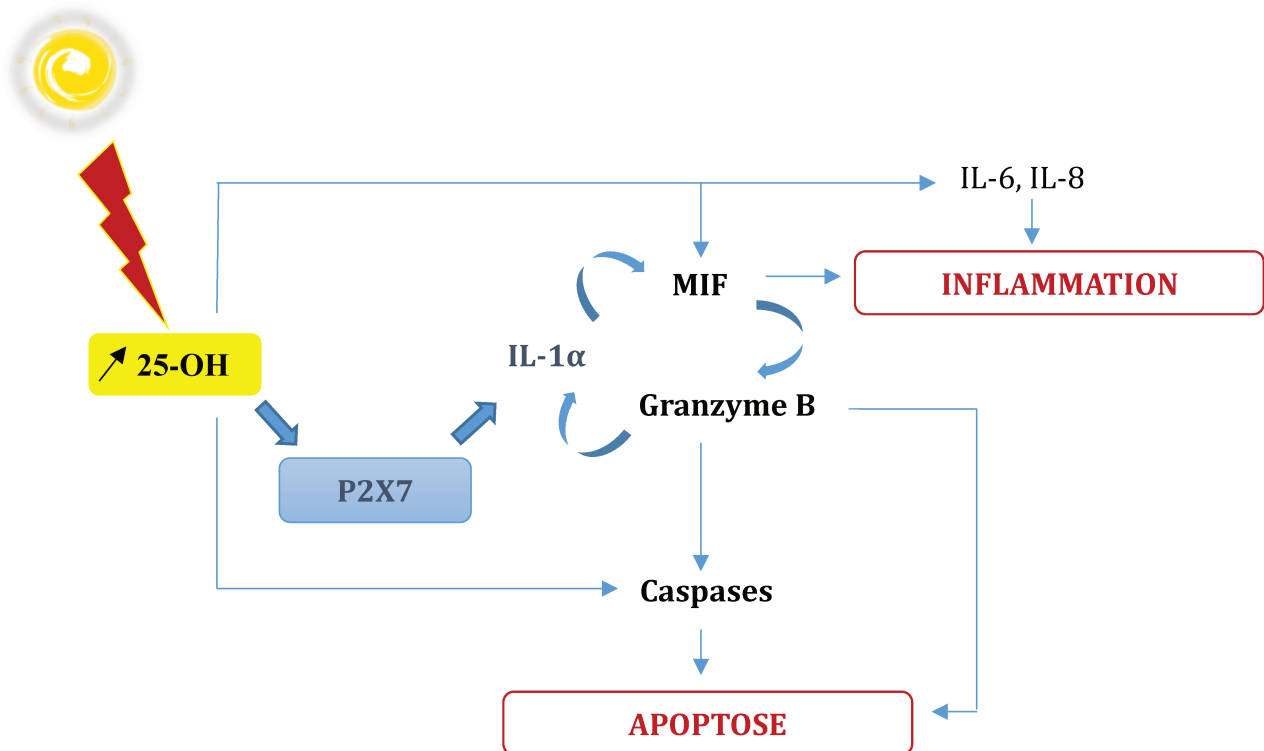


Figure 78 : Processus de dégénérescence induit par le 25-OH dans les kératinocytes

Non seulement le 25-OH déclenche l'apoptose et l'inflammation rencontrées lors des phénomènes de dégénérescence, mais il déclenche également le processus de différenciation des kératinocytes en cornéocytes, accélérant le vieillissement cutané (article 2).

Au niveau cutané, le 25-OH semble donc être une molécule clé, inductrice de nombreuses voies de signalisation, se traduisant par des effets cellulaires dégénératifs. Le 7-KC, quant à lui, semble plus nécrotique au vu de sa courbe de cytotoxicité et des altérations morphologiques et du cytosquelette qu'il induit.

Nos travaux étayent le rôle central des oxystérols dans les processus dégénératifs que ce soit au niveau de l'œil avec la DMLA ou au niveau de la peau avec le photovieillissement. Le cholestérol, mais aussi ses dérivés oxydés, sont donc à prendre en considération dans le diagnostic de ces pathologies.

Nous avons relié pour la première fois les effets cellulaires des oxystérols aux purinorécepteurs P2X7. Cette relation permet de mieux comprendre les mécanismes conduisant les oxystérols à la dégénérescence cellulaire rétinienne et cutanée puisque les récepteurs P2X7 jouent un rôle clé dans les mécanismes de pathologies dégénératives. Ainsi, les oxystérols et les purinorécepteurs P2X7 apparaissent comme des biomarqueurs potentiels pour l'évaluation de nouveaux modulateurs des pathologies dégénératives et du photovieillissement.

Ces travaux permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives dans la recherche de traitements pour la DMLA mais aussi dans la recherche de formulations protectrices du photovieillissement. La modulation des effets des oxystérols par les récepteurs P2X7 apparaît en effet prometteuse. Les formulations lipidiques semblent particulièrement attractives pour diverses raisons, notamment car les oxystérols ont des effets significatifs sur les radeaux lipidiques et les récepteurs P2X7 qui y sont présents, et parce que les profils lipidiques des cellules soumises à un stress dégénératif sont modifiés. Ainsi, des formulations lipidiques pourraient protéger les lipides membranaires des effets toxiques des oxystérols. De précédents travaux réalisés au laboratoire ont montré l'efficacité de formulations riches en acides gras polyinsaturés dans l'inhibition des récepteurs P2X7 lorsqu'ils sont activés par le peptide β amyloïde. Il serait pertinent d'évaluer l'inhibition des récepteurs P2X7 par ces formulations composées d'acides gras insaturés sur nos modèles oxystérols. Par ailleurs, nos travaux préliminaires montrent qu'une formulation lipidique à base d'huile de *Calophyllum inophyllum* (extrait PR20) est capable d'inhiber les récepteurs P2X7 lorsqu'ils sont

activés par le 25-OH. Une étude approfondie des mécanismes mis en jeu permettra de valider l'intérêt de ces formulations lipidiques.

Nous pourrions compléter nos travaux par l'utilisation de modèles intégrant l'épiderme et le derme. D'une part, le derme est principalement constitué de matrice extracellulaire, nous pourrions ainsi mieux identifier le rôle des oxystérols sur la matrice extracellulaire. D'autre part, les différentes cellules cutanées interagissent notamment *via* la sécrétion de facteurs de croissance ; l'étude des effets des oxystérols sur ces communications nous apparaît pertinente. Des modèles tridimensionnels de peau reconstituée comportant tous les types cellulaires présents dans la peau (kératinocytes, mélanocytes, fibroblastes...) constituent un bon outil pour étudier la matrice extracellulaire et prendre en compte les communications intercellulaires.

Nous pouvons également nous poser la question du rôle des oxystérols et des récepteurs P2X7 dans d'autres pathologies dégénératives. Par exemple, les mécanismes cellulaires conduisant au développement de la maladie de Parkinson sont à ce jour peu connus ; les oxystérols activeraient-ils les récepteurs P2X7 ? En outre, le vitiligo est une pathologie caractérisée par une dégénérescence des mélanocytes qui pourrait également être induite par les oxystérols et les récepteurs P2X7. Il apparaît donc nécessaire d'explorer le rôle des oxystérols et des récepteurs P2X7 sur d'autres modèles cellulaires adaptés à la pathologie étudiée.

BIBLIOGRAPHIE

V. Bibliographie

Abatangelo, G., Martelli, M., and Vecchia, P. (1983). Healing of hyaluronic acid-enriched wounds: histological observations. *J. Surg. Res.* 35, 410–416.

Abbracchio, M.P., and Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.* 64, 445–475.

Abner, E.L., Nelson, P.T., Kryscio, R.J., Schmitt, F.A., Fardo, D.W., Woltjer, R.L., Cairns, N.J., Yu, L., Dodge, H.H., Xiong, C., et al. (2016). Diabetes is associated with cerebrovascular but not Alzheimer neuropathology. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.*

Achey, P., and Duryea, H. (1974). Production of DNA strand breaks by the hydroxyl radical. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 25, 595–601.

Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A.L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., Bianchi, G., Kroemer, G., Pistoia, V., and Di Virgilio, F. (2012). Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res.* 72, 2957–2969.

Age-Related Eye Disease Study Research Group (2000). Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology* 107, 2224–2232.

Age-Related Eye Disease Study Research Group (2001). A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss. *Arch. Ophthalmol.* 119, 1417–1436.

Akuffo, K.O., Nolan, J.M., Howard, A.N., Moran, R., Stack, J., Klein, R., Klein, B.E., Meuer, S.M., Sabour-Pickett, S., Thurnham, D.I., et al. (2015). Sustained supplementation and monitored response with differing carotenoid formulations in early age-related macular degeneration. *Eye* 29, 902–912.

Alberto, A.V.P., Faria, R.X., Couto, C.G.C., Ferreira, L.G.B., Souza, C. a. M., Teixeira, P.C.N., Fróes, M.M., and Alves, L.A. (2013). Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 386, 775–787.

Alpermann, H., and Vogel, H.G. (1978). Effect of repeated ultraviolet irradiation on skin of hairless mice. *Arch. Dermatol. Res.* 262, 15–25.

Alves, L.A., de Melo Reis, R.A., de Souza, C.A.M., de Freitas, M.S., Teixeira, P.C.N., Neto Moreira Ferreira, D., and Xavier, R.F. (2014). The P2X7 receptor: Shifting from a low- to a high-conductance channel — An enigmatic phenomenon? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1838, 2578–2587.

Anderson, D.H., Mullins, R.F., Hageman, G.S., and Johnson, L.V. (2002). A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am. J. Ophthalmol.* 134, 411–431.

Anderson, D.H., Talaga, K.C., Rivest, A.J., Barron, E., Hageman, G.S., and Johnson, L.V. (2004). Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 78, 243–256.

Araki-Sasaki, K., Ohashi, Y., Sasabe, T., Hayashi, K., Watanabe, H., Tano, Y., and Handa, H. (1995). An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 614–621.

Ares, M.P., Pörn-Ares, M.I., Thyberg, J., Juntti-Berggren, L., Berggren, P.O., Diczfalusy, U., Kallin, B., Björkhem, I., Orrenius, S., and Nilsson, J. (1997). Ca²⁺ channel blockers verapamil and nifedipine inhibit apoptosis induced by 25-hydroxycholesterol in human aortic smooth muscle cells. *J. Lipid Res.* 38, 2049–2061.

Augood, C.A., Vingerling, J.R., de Jong, P.T.V.M., Chakravarthy, U., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Bentham, G., Rahu, M., et al. (2006). Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 124, 529–535.

Ayciriex, S., Regazzetti, A., Gaudin, M., Prost, E., Dargère, D., Massicot, F., Auzeil, N., and Laprévote, O. (2012). Development of a novel method for quantification of sterols and oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: application to a neuroinflammation rat model. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 3049–3059.

- Aymard, E., Barruche, V., Naves, T., Bordes, S., Closs, B., Verdier, M., and Ratinaud, M.-H. (2011). Autophagy in human keratinocytes: an early step of the differentiation? *Exp. Dermatol.* 20, 263–268.
- Baranowski, M. (2008). Biological role of liver X receptors. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 59 *Suppl* 7, 31–55.
- Baricordi, O.R., Melchiorri, L., Adinolfi, E., Falzoni, S., Chiozzi, P., Buell, G., and Virgilio, F.D. (1999). Increased Proliferation Rate of Lymphoid Cells Transfected with the P2X7 ATP Receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 33206–33208.
- Barouki, R. (2006). [Ageing free radicals and cellular stress]. *Médecine Sci.* MS 22, 266–272.
- Barth, K., Weinhold, K., Guenther, A., Young, M.T., Schnittler, H., and Kasper, M. (2007). Caveolin-1 influences P2X7 receptor expression and localization in mouse lung alveolar epithelial cells. *FEBS J.* 274, 3021–3033.
- Bartlett, R., Stokes, L., and Sluyter, R. (2014). The P2X7 Receptor Channel: Recent Developments and the Use of P2X7 Antagonists in Models of Disease. *Pharmacol. Rev.* 66, 638–675.
- Baumann, L. (2007). Skin ageing and its treatment. *J. Pathol.* 211, 241–251.
- Bazan, N.G. (1989). The metabolism of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the eye: the possible role of docosahexaenoic acid and docosanoids in retinal physiology and ocular pathology. *Prog. Clin. Biol. Res.* 312, 95–112.
- Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., and Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 45, 115–134.
- Bellei, B., Pitisci, A., Ottaviani, M., Ludovici, M., Cota, C., Luzi, F., Dell’Anna, M.L., and Picardo, M. (2013). Vitiligo: A Possible Model of Degenerative Diseases. *PLOS ONE* 8, e59782.

- Beylot, C. (2009). Vieillissement cutané: aspects cliniques, histologiques et physiopathologiques. *Ann. Dermatol. Vénéréologie* 136, S263–S269.
- Biswas, D., Qureshi, O.S., Lee, W.-Y., Croudace, J.E., Mura, M., and Lammas, D.A. (2008). ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunol.* 9, 35.
- Bitra, V.R., Rapaka, D., and Akula, A. (2015). Prediabetes and Alzheimer's Disease. *Indian J. Pharm. Sci.* 77, 511–514.
- Björkhem, I., Lövgren-Sandblom, A., Leoni, V., Meaney, S., Brodin, L., Salveson, L., Winge, K., Pålhagen, S., and Svenningsson, P. (2013). Oxysterols and Parkinson's disease: evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neurosci. Lett.* 555, 102–105.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Boivin, W.A., Cooper, D.M., Hiebert, P.R., and Granville, D.J. (2009). Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Lab. Invest.* 89, 1195–1220.
- Bonne, C., and Muller, A. (2000). [Role of oxidative stress in age-related macular degeneration]. *J. Fr. Ophtalmol.* 23, 835–840.
- Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Cult. Methods* 9, 7–9.
- Bosset, S., Bonnet-Duquennoy, M., Barré, P., Chalon, A., Lazou, K., Kurfurst, R., Bonté, F., Schnébert, S., Disant, F., Le Varlet, B., et al. (2003). Decreased expression of keratinocyte beta1 integrins in chronically sun-exposed skin in vivo. *Br. J. Dermatol.* 148, 770–778.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761–771.

- Brandstetter, C., Mohr, L.K.M., Latz, E., Holz, F.G., and Krohne, T.U. (2015). Light induces NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells via lipofuscin-mediated photooxidative damage. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 93, 905–916.
- Bretillon, L., Diczfalusy, U., Björkhem, I., Maire, M.A., Martine, L., Joffre, C., Acar, N., Bron, A., and Creuzot-Garcher, C. (2007). Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr. Eye Res.* 32, 361–366.
- Brown, A.J., and Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142, 1–28.
- Carmo, M.R.S., Menezes, A.P.F., Nunes, A.C.L., Pliássova, A., Rolo, A.P., Palmeira, C.M., Cunha, R.A., Canas, P.M., and Andrade, G.M. (2014). The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of Parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. *Neuropharmacology* 81, 142–152.
- Cataldo, J.K., Prochaska, J.J., and Glantz, S.A. (2010). Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's disease: An analysis controlling for tobacco industry affiliation. *J. Alzheimers Dis. JAD* 19, 465–480.
- Cervellati, C., Wood, P.L., Romani, A., Valacchi, G., Squerzanti, M., Sanz, J.M., Ortolani, B., and Zuliani, G. (2016). Oxidative challenge in Alzheimer's disease: state of knowledge and future needs. *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* 64, 21–32.
- Chang, Y.-C., Chang, W.-C., Hung, K.-H., Yang, D.-M., Cheng, Y.-H., Liao, Y.-W., Woung, L.-C., Tsai, C.-Y., Hsu, C.-C., Lin, T.-C., et al. (2014). The generation of induced pluripotent stem cells for macular degeneration as a drug screening platform: identification of curcumin as a protective agent for retinal pigment epithelial cells against oxidative stress. *Front. Aging Neurosci.* 6, 191.
- Chen, H., Tran, J.-T.A., Brush, R.S., Saadi, A., Rahman, A.K., Yu, M., Yasumura, D., Matthes, M.T., Ahern, K., Yang, H., et al. (2012). Ceramide Signaling in Retinal Degeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 723, 553–558.

- Chen, X., Gawryluk, J.W., Wagener, J.F., Ghribi, O., and Geiger, J.D. (2008). Caffeine blocks disruption of blood brain barrier in a rabbit model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 5, 12.
- Chen, X., Rong, S.S., Xu, Q., Tang, F.Y., Liu, Y., Gu, H., Tam, P.O.S., Chen, L.J., Brelén, M.E., Pang, C.P., et al. (2014). Diabetes Mellitus and Risk of Age-Related Macular Degeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE* 9, e108196.
- Choi, Y.K., Kim, Y.S., Choi, I.Y., Kim, S.-W., and Kim, W.-K. (2008). 25-hydroxycholesterol induces mitochondria-dependent apoptosis via activation of glycogen synthase kinase-3 β in PC12 cells. *Free Radic. Res.* 42, 544–553.
- Chung, H.Y., Lee, E.K., Choi, Y.J., Kim, J.M., Kim, D.H., Zou, Y., Kim, C.H., Lee, J., Kim, H.S., Kim, N.D., et al. (2011). Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J. Dent. Res.* 90, 830–840.
- Chung, J.H., Lee, S.H., Youn, C.S., Park, B.J., Kim, K.H., Park, K.C., Cho, K.H., and Eun, H.C. (2001). Cutaneous photodamage in Koreans: influence of sex, sun exposure, smoking, and skin color. *Arch. Dermatol.* 137, 1043–1051.
- Clyne, J.D., Wang, L.-F., and Hume, R.I. (2002). Mutational Analysis of the Conserved Cysteines of the Rat P2X2 Purinoceptor. *J. Neurosci.* 22, 3873–3880.
- Cohen, S.-Y., Souied, E., and Quentel, G. (2014). Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) / Myopie et étiologies de la néovascularisation choroïdienne (volume 7 - coffret rétine) (Lavoisier).
- Collège national des enseignants de gériatrie (France) (2000). Corpus de gériatrie. Tome 1 Tome 1 (Montmorency, France: 2M2 Edition et communication).
- Cordy, J.M., Hooper, N.M., and Turner, A.J. (2006). The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol. Membr. Biol.* 23, 111–122.
- Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., and Mattson, M.P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2070–2075.

- Cyphert, J.M., Trempus, C.S., and Garantziotis, S. (2015). Size Matters: Molecular Weight Specificity of Hyaluronan Effects in Cell Biology. *Int. J. Cell Biol.* 2015.
- Dasari, B., Prasanthi, J.R.P., Marwarha, G., Singh, B.B., and Ghribi, O. (2010). The oxysterol 27-hydroxycholesterol increases β -amyloid and oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *BMC Ophthalmol.* 10, 22.
- Davies, M.J., Gilbert, B.C., and Haywood, R.M. (1991). Radical-induced damage to proteins: e.s.r. spin-trapping studies. *Free Radic. Res. Commun.* 15, 111–127.
- Delcourt, C., Korobelnik, J.-F., Barberger-Gateau, P., Delyfer, M.-N., Rougier, M.-B., Le Goff, M., Malet, F., Colin, J., and Dartigues, J.-F. (2010). Nutrition and age-related eye diseases: the Alienor (Antioxydants, Lipides Essentiels, Nutrition et maladies OculaiRes) Study. *J. Nutr. Health Aging* 14, 854–861.
- Dentchev, T., Milam, A.H., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., and Dunaief, J.L. (2003). Amyloid-beta is found in drusen from some age-related macular degeneration retinas, but not in drusen from normal retinas. *Mol. Vis.* 9, 184–190.
- Deplano, S., Cook, H.T., Russell, R., Franchi, L., Schneider, S., Bhangal, G., Unwin, R.J., Pusey, C.D., Tam, F.W.K., and Behmoaras, J. (2013). P2X7 receptor-mediated Nlrp3-inflammasome activation is a genetic determinant of macrophage-dependent crescentic glomerulonephritis. *J. Leukoc. Biol.* 93, 127–134.
- Deucher, A., Efimova, T., and Eckert, R.L. (2002). Calcium-dependent involucrin expression is inversely regulated by protein kinase C (PKC) α and PKC δ . *J. Biol. Chem.* 277, 17032–17040.
- Di Paolo, G., and Kim, T.-W. (2011). Linking Lipids to Alzheimer's Disease: Cholesterol and Beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 284–296.
- Di Virgilio, F. (2003). Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X7 receptor is not the only target. *Br. J. Pharmacol.* 140, 441–443.
- Ding, H., Wang, H., Zhao, Y., Sun, D., and Zhai, X. (2015). Protective Effects of Baicalin on A β 1-42-Induced Learning and Memory Deficit, Oxidative Stress, and Apoptosis in Rat. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 623–632.

- Donnelly-Roberts, D.L., and Jarvis, M.F. (2007). Discovery of P2X₇ receptor-selective antagonists offers new insights into P2X₇ receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br. J. Pharmacol.* *151*, 571–579.
- Doshi, D.N., Hanneman, K.K., and Cooper, K.D. (2007). Smoking and skin aging in identical twins. *Arch. Dermatol.* *143*, 1543–1546.
- Drake, D.R., Brogden, K.A., Dawson, D.V., and Wertz, P.W. (2008). Thematic Review Series: Skin Lipids. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J. Lipid Res.* *49*, 4–11.
- Dréno, B. (2009). Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Ann. Dermatol. Vénéréologie* *136*, S247–S251.
- Dunn, K.C., Aotaki-Keen, A.E., Putkey, F.R., and Hjelmeland, L.M. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp. Eye Res.* *62*, 155–169.
- Dupont, E., Gomez, J., and Bilodeau, D. (2013). Beyond UV radiation: a skin under challenge. *Int. J. Cosmet. Sci.* *35*, 224–232.
- Durazzo, T.C., Mattsson, N., and Weiner, M.W. (2014). Smoking and increased Alzheimer's disease risk: A review of potential mechanisms. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* *10*, S122–S145.
- Dutot, M., Liang, H., Pauloin, T., Brignole-Baudouin, F., Baudouin, C., Warnet, J.-M., and Rat, P. (2008). Effects of toxic cellular stresses and divalent cations on the human P2X₇ cell death receptor. *Mol. Vis.* *14*, 889–897.
- Ebrahimi, K.B., and Handa, J.T. (2011). Lipids, Lipoproteins, and Age-Related Macular Degeneration. *J. Lipids* *2011*, e802059.
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., and Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* *160*, 113–123.

- Elsholz, F., Harteneck, C., Muller, W., and Friedland, K. (2014). Calcium--a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur. J. Dermatol. EJD* 24, 650–661.
- Ennion, S.J., and Evans, R.J. (2002). Conserved Cysteine Residues in the Extracellular Loop of the Human P2X1 Receptor Form Disulfide Bonds and Are Involved in Receptor Trafficking to the Cell Surface. *Mol. Pharmacol.* 61, 303–311.
- EuroCoDe European Collaboration on Dementia (2006). *Dementia in Europe Yearbook 2006*.
- EuroCoDe European Collaboration on Dementia (2008). *Dementia in Europe Yearbook 2008*.
- Fell, G.L., Robinson, K.C., Mao, J., Woolf, C.J., and Fisher, D.E. (2014). Skin β -endorphin mediates addiction to UV light. *Cell* 157, 1527–1534.
- Ferrari, D., Los, M., Bauer, M.K., Vandenabeele, P., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1999). P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett.* 447, 71–75.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Di Virgilio, F. (2006). The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *J. Immunol.* 176, 3877–3883.
- Fisher, D.E., Klein, B.E.K., Wong, T.Y., Rotter, J.I., Li, X., Shrager, S., Burke, G.L., Klein, R., and Cotch, M.F. (2016). Incidence of Age-Related Macular Degeneration in a Multi-Ethnic United States Population: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Ophthalmology*.
- Fitzpatrick, TB (1975). [Soleil et peau]. *J Med Esthet* 2, 33–34.
- Fitzpatrick, T.B. (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types i through vi. *Arch. Dermatol.* 124, 869–871.
- Forlenza, O.V., Diniz, B.S., and Gattaz, W.F. (2010). Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Med.* 8, 89.

- Franceschini, A., Capece, M., Chiozzi, P., Falzoni, S., Sanz, J.M., Sarti, A.C., Bonora, M., Pinton, P., and Di Virgilio, F. (2015). The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29, 2450–2461.
- Fraser-Bell, S., Choudhury, F., Klein, R., Azen, S., and Varma, R. (2010). Ocular Risk Factors for Age-related Macular Degeneration: The Los Angeles Latino Eye Study (LALES). *Am. J. Ophthalmol.* 149, 735–740.
- Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Daly, J.W., Harden, T.K., Jacobson, K.A., Leff, P., and Williams, M. (1994). Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46, 143–156.
- Garcia-Marcos, M., Pérez-Andrés, E., Tandel, S., Fontanils, U., Kumps, A., Kabré, E., Gómez-Muñoz, A., Marino, A., Dehaye, J.-P., and Pochet, S. (2006). Coupling of two pools of P2X7 receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland. *J. Lipid Res.* 47, 705–714.
- Garenc, C., Julien, P., and Levy, E. (2010). Oxysterols in biological systems: the gastrointestinal tract, liver, vascular wall and central nervous system. *Free Radic. Res.* 44, 47–73.
- Gaudreault, S.B., Dea, D., and Poirier, J. (2004). Increased caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging* 25, 753–759.
- Ghazi, K., Deng-Pichon, U., Warnet, J.-M., and Rat, P. (2012). Hyaluronan fragments improve wound healing on in vitro cutaneous model through P2X7 purinoreceptor basal activation: role of molecular weight. *PloS One* 7, e48351.
- Giannuzzo, A., Pedersen, S.F., and Novak, I. (2015). The P2X7 receptor regulates cell survival, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Mol. Cancer* 14, 203.
- Gilchrest, B.A. (1983). In vitro assessment of keratinocyte aging. *J. Invest. Dermatol.* 81, 184s–9s.

- Glottin, A.-L., Debaq-Chainiaux, F., Brossas, J.-Y., Faussat, A.-M., Tréton, J., Zubielewicz, A., Toussaint, O., and Mascarelli, F. (2008). Prematurely senescent ARPE-19 cells display features of age-related macular degeneration. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1348–1361.
- Goldberg, R.L., and Toole, B.P. (1987). Hyaluronate inhibition of cell proliferation. *Arthritis Rheum.* 30, 769–778.
- Götz, M.E., König, G., Riederer, P., and Youdim, M.B. (1994). Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmacol. Ther.* 63, 37–122.
- Gourlay, C.W., and Ayscough, K.R. (2005). A role for actin in aging and apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1260–1264.
- Green, R.C., Cupples, L.A., Kurz, A., Auerbach, S., Go, R., Sadovnick, D., Duara, R., Kukull, W.A., Chui, H., Edeki, T., et al. (2003). Depression as a risk factor for Alzheimer disease: the MIRAGE Study. *Arch. Neurol.* 60, 753–759.
- Gu, B.J., and Wiley, J.S. (2006). Rapid ATP-induced release of matrix metalloproteinase 9 is mediated by the P2X7 receptor. *Blood* 107, 4946–4953.
- Gupta, V., Gupta, V.B., Chitranshi, N., Gangoda, S., Wall, R.V., Abbasi, M., Golzan, M., Dheer, Y., Shah, T., Avolio, A., et al. (2016). One protein, multiple pathologies: multifaceted involvement of amyloid β in neurodegenerative disorders of the brain and retina. *Cell. Mol. Life Sci.* 1–19.
- Gutteridge, J.M.C. (1984). Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Lett.* 172, 245–249.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., and Teplow, D.B. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322–325.
- Han, A., Chien, A.L., and Kang, S. (2014). Photoaging. *Dermatol. Clin.* 32, 291–299, vii.

- Hansen, M.A., Barden, J.A., Balcar, V.J., Keay, K.A., and Bennett, M.R. (1997). Structural Motif and Characteristics of the Extracellular Domain of P2XReceptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *236*, 670–675.
- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* *256*, 184–185.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* *11*, 298–300.
- Hascalovici, J.R., Vaya, J., Khatib, S., Holcroft, C.A., Zukor, H., Song, W., Arvanitakis, Z., Bennett, D.A., and Schipper, H.M. (2009). Brain sterol dys-regulation in sporadic AD and MCI: Relationship to heme oxygenase-1. *J. Neurochem.* *110*, 1241–1253.
- Heathfield, S.K., Le Maitre, C.L., and Hoyland, J.A. (2008). Caveolin-1 expression and stress-induced premature senescence in human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res. Ther.* *10*, R87.
- Hernandez-Pigeon, H., Jean, C., Charruyer, A., Haure, M.-J., Titeux, M., Tonasso, L., Quillet-Mary, A., Baudouin, C., Charveron, M., and Laurent, G. (2006). Human Keratinocytes Acquire Cellular Cytotoxicity under UV-B Irradiation IMPLICATION OF GRANZYME B AND PERFORIN. *J. Biol. Chem.* *281*, 13525–13532.
- Hernandez-Pigeon, H., Jean, C., Charruyer, A., Haure, M.-J., Baudouin, C., Charveron, M., Quillet-Mary, A., and Laurent, G. (2007). UVA Induces Granzyme B in Human Keratinocytes through MIF IMPLICATION IN EXTRACELLULAR MATRIX REMODELING. *J. Biol. Chem.* *282*, 8157–8164.
- Heverin, M., Bogdanovic, N., Lütjohann, D., Bayer, T., Pikuleva, I., Bretillon, L., Diczfalusy, U., Winblad, B., and Björkhem, I. (2004). Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* *45*, 186–193.
- Heverin, M., Maioli, S., Pham, T., Mateos, L., Camporesi, E., Ali, Z., Winblad, B., Cedazo-Minguez, A., and Björkhem, I. (2015). 27-hydroxycholesterol mediates negative effects of dietary cholesterol on cognition in mice. *Behav. Brain Res.* *278*, 356–359.

- Hogg, R.E., Woodside, J., Chakravarthy, U., and Fletcher, A.E. (2015). Association of a Mediterranean type diet with age-related macular degeneration in the EUREYE study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 3760–3760.
- Holthoff, V.A., Marschner, K., Scharf, M., Steding, J., Meyer, S., Koch, R., and Donix, M. (2015). Effects of Physical Activity Training in Patients with Alzheimer's Dementia: Results of a Pilot RCT Study. *PLOS ONE* 10, e0121478.
- Horton, M.R., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Bao, C., and Noble, P.W. (1998). Regulation of Hyaluronan-Induced Chemokine Gene Expression by IL-10 and IFN- γ in Mouse Macrophages. *J. Immunol.* 160, 3023–3030.
- Hwa, C., Bauer, E.A., and Cohen, D.E. (2011). Skin biology. *Dermatol. Ther.* 24, 464–470.
- Isas, J.M., Luibl, V., Johnson, L.V., Kaye, R., Wetzel, R., Glabe, C.G., Langen, R., and Chen, J. (2010). Soluble and mature amyloid fibrils in drusen deposits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 1304–1310.
- Jaadane, I., Boulenguez, P., Chahory, S., Carré, S., Savoldelli, M., Jonet, L., Behar-Cohen, F., Martinsons, C., and Torriglia, A. (2015). Retinal damage induced by commercial light emitting diodes (LEDs). *Free Radic. Biol. Med.* 84, 373–384.
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728–731.
- Janowski, B.A., Grogan, M.J., Jones, S.A., Wisely, G.B., Kliewer, S.A., Corey, E.J., and Mangelsdorf, D.J. (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 266–271.
- Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry (Mosc.)* 32, 4693–4697.
- Javitt, N.B., and Javitt, J.C. (2009). The retinal oxysterol pathway: a unifying hypothesis for the cause of age-related macular degeneration. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 20, 151–157.

- Jenner, P. (1996). Oxidative stress in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Pathol. Biol. (Paris)* 44, 57–64.
- Jiang, L.-H., Mackenzie, A.B., North, R.A., and Surprenant, A. (2000). Brilliant Blue G Selectively Blocks ATP-Gated Rat P2X7 Receptors. *Mol. Pharmacol.* 58, 82–88.
- Jiang, T., Hoekstra, J., Heng, X., Kang, W., Ding, J., Liu, J., Chen, S., and Zhang, J. (2015). P2X7 receptor is critical in α -synuclein--mediated microglial NADPH oxidase activation. *Neurobiol. Aging* 36, 2304–2318.
- Johnson, L.V., Leitner, W.P., Rivest, A.J., Staples, M.K., Radeke, M.J., and Anderson, D.H. (2002). The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11830–11835.
- Jones, J.C., Arnn, J., Staehelin, L.A., and Goldman, R.D. (1984). Human autoantibodies against desmosomes: possible causative factors in pemphigus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 2781–2785.
- Kaarniranta, K., Salminen, A., Haapasalo, A., Soininen, H., and Hiltunen, M. (2011). Age-related macular degeneration (AMD): Alzheimer's disease in the eye? *J. Alzheimers Dis. JAD* 24, 615–631.
- Kaczmarek-Hájek, K., Lörinczi, E., Hausmann, R., and Nicke, A. (2012). Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal.* 8, 375–417.
- Kalinin, A.E., Kajava, A.V., and Steinert, P.M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 24, 789–800.
- Keenan, T.D.L., Goldacre, R., and Goldacre, M.J. (2014). Associations between age-related macular degeneration, Alzheimer disease, and dementia: record linkage study of hospital admissions. *JAMA Ophthalmol.* 132, 63–68.
- Kernt, M., Walch, A., Neubauer, A.S., Hirneiss, C., Haritoglou, C., Ulbig, M.W., and Kampik, A. (2012). Filtering blue light reduces light-induced oxidative stress, senescence and

accumulation of extracellular matrix proteins in human retinal pigment epithelium cells. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* *40*, e87-97.

Khan, S.S., and Bloom, G.S. (2016). Tau: The Center of a Signaling Nexus in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* *10*.

Kielty, C.M., Sherratt, M.J., and Shuttleworth, C.A. (2002). Elastic fibres. *J. Cell Sci.* *115*, 2817–2828.

Klein, B.E.K., Howard, K.P., Iyengar, S.K., Sivakumaran, T.A., Meyers, K.J., Cruickshanks, K.J., and Klein, R. (2014). Sunlight exposure, pigmentation, and incident age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *55*, 5855–5861.

Klein R, Chou C, Klein BK, Zhang X, Meuer SM, and Saaddine JB (2011). PRevalence of age-related macular degeneration in the us population. *Arch. Ophthalmol.* *129*, 75–80.

Knudtson, M.D., Klein, R., and Klein, B.E.K. (2006). Physical activity and the 15-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Br. J. Ophthalmol.* *90*, 1461–1463.

Kohl, E., Steinbauer, J., Landthaler, M., and Szeimies, R.-M. (2011). Skin ageing. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* *25*, 873–884.

Kong, Q., Wang, M., Liao, Z., Camden, J.M., Yu, S., Simonyi, A., Sun, G.Y., Gonzalez, F.A., Erb, L., Seye, C.I., et al. (2005). P2X7 nucleotide receptors mediate caspase-8/9/3-dependent apoptosis in rat primary cortical neurons. *Purinergic Signal.* *1*, 337–347.

Kozlowski, M.R. (2012). RPE cell senescence: a key contributor to age-related macular degeneration. *Med. Hypotheses* *78*, 505–510.

Kregel, K.C., and Zhang, H.J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* *292*, R18–R36.

Krieg, T., and Aumailley, M. (2011). The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions. *Exp. Dermatol.* *20*, 689–695.

- Kumar, A., Singh, A., and Ekavali (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol. Rep.* 67, 195–203.
- Kurji, K.H., Cui, J.Z., Lin, T., Harriman, D., Prasad, S.S., Kojic, L., and Matsubara, J.A. (2010). Microarray analysis identifies changes in inflammatory gene expression in response to amyloid-beta stimulation of cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 1151–1163.
- Lacombe, M. (2006). *Abrégé d'anatomie et de physiologie humaines* (De Boeck).
- Langballe, E.M., Ask, H., Holmen, J., Stordal, E., Saltvedt, I., Selbæk, G., Fikseaunet, A., Bergh, S., Nafstad, P., and Tambs, K. (2015). Alcohol consumption and risk of dementia up to 27 years later in a large, population-based sample: the HUNT study, Norway. *Eur. J. Epidemiol.* 30, 1049–1056.
- Le Feuvre, R., Brough, D., and Rothwell, N. (2002). Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 261–269.
- Le Goff, D., Viville, C., and Carreau, S. (2006). Apoptotic effects of 25-hydroxycholesterol in immature rat Sertoli cells: prevention by 17beta-estradiol. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 21, 329–334.
- Lebon, V., and Duyckaerts, C. (2014). *Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer*.
- Lee, J.Y., and Spicer, A.P. (2000). Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 581–586.
- Lee, T., and Chau, L. (2001). Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C709-718.
- Lee, H.G., Won, S.M., Gwag, B.J., and Lee, Y.B. (2011). Microglial P2X₇ receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Mol. Med.* 43, 7–14.
- Legrand, C., Bour, J.M., Jacob, C., Capiaumont, J., Martial, A., Marc, A., Wudtke, M., Kretzmer, G., Demangel, C., and Duval, D. (1992). Lactate dehydrogenase (LDH) activity

of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected]. *J. Biotechnol.* 25, 231–243.

Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., et al. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 3137–3140.

Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Montange, T., Vejux, A., Berthier, A., Bessède, G., Corcos, L., Gambert, P., Néel, D., and Lizard, G. (2005). Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol. Toxicol.* 21, 97–114.

Lembo, S., Balato, A., Di Caprio, R., Cirillo, T., Giannini, V., Gasparri, F., and Monfrecola, G. (2014). The modulatory effect of ellagic acid and rosmarinic acid on ultraviolet-B-induced cytokine/chemokine gene expression in skin keratinocyte (HaCaT) cells. *BioMed Res. Int.* 2014, 346793.

Lenertz, L.Y., Wang, Z., Guadarrama, A., Hill, L.M., Gavala, M.L., and Bertics, P.J. (2010). Mutation of Putative N-linked Glycosylation Sites on the Human Nucleotide Receptor P2X7 Reveals a Key Residue Important for Receptor Function. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 4611–4619.

Leoni, V., and Caccia, C. (2011). Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chem. Phys. Lipids* 164, 515–524.

Leoni, V., Masterman, T., Patel, P., Meaney, S., Diczfalusy, U., and Björkhem, I. (2003). Side chain oxidized oxysterols in cerebrospinal fluid and the integrity of blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J. Lipid Res.* 44, 793–799.

Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 132, 27–42.

Li, Vierkötter, A., Schikowski, T., Hüls, A., Ding, A., Matsui, M.S., Deng, B., Ma, C., Ren, A., Zhang, J., et al. (2015a). Epidemiological evidence that indoor air pollution from cooking with solid fuels accelerates skin aging in Chinese women. *J. Dermatol. Sci.* 79, 148–154.

- Li, L., Tucker, R.W., Hennings, H., and Yuspa, S.H. (1995). Inhibitors of the intracellular Ca(2+)-ATPase in cultured mouse keratinocytes reveal components of terminal differentiation that are regulated by distinct intracellular Ca²⁺ compartments. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6, 1171–1184.
- Li, W.C., Wang, G.M., Wang, R.R., and Spector, A. (1994). The redox active components H₂O₂ and N-acetyl-L-cysteine regulate expression of c-jun and c-fos in lens systems. *Exp. Eye Res.* 59, 179–190.
- Li, X., Song, D., and Leng, S.X. (2015b). Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clin. Interv. Aging* 10, 549–560.
- Lim, H.-K., Kang, H.-K., Yoo, E.-S., Kim, B.-J., Kim, Y.-W., Cho, M., Lee, J.-H., Lee, Y.-S., Chung, M.-H., and Hyun, J.-W. (2003). Oxysterols induce apoptosis and accumulation of cell cycle at G(2)/M phase in the human monocytic THP-1 cell line. *Life Sci.* 72, 1389–1399.
- Lin, C., Ren, S., Zhang, L., Jin, H., Sun, J., and Zuo, Y. (2012). Extracellular ATP induces CD44 shedding from macrophage-like P388D1 cells via the P2X7 receptor. *Hematol. Oncol.* 30, 70–75.
- Liu, R.T., Gao, J., Cao, S., Sandhu, N., Cui, J.Z., Chou, C.L., Fang, E., and Matsubara, J.A. (2013). Inflammatory mediators induced by amyloid-beta in the retina and RPE in vivo: implications for inflammasome activation in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 2225–2237.
- Liu, R.T., Wang, A., To, E., Gao, J., Cao, S., Cui, J.Z., and Matsubara, J.A. (2014). Vinpocetine inhibits amyloid-beta induced activation of NF-κB, NLRP3 inflammasome and cytokine production in retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 127, 49–58.
- Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D.C., and Dahl, G. (2007). Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett.* 581, 483–488.
- Lopez, H., Beer, J.Z., Miller, S.A., and Zmudzka, B.Z. (2004). Ultrasound measurements of skin thickness after UV exposure: a feasibility study. *J. Photochem. Photobiol. B* 73, 123–132.

- Lordan, S., Mackrill, J.J., and O'Brien, N.M. (2009). Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J. Nutr. Biochem.* 20, 321–336.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.-X., Siddiqui, M., Shea, S., and Mayeux, R. (2004). Alcohol intake and risk of dementia. *J. Am. Geriatr. Soc.* 52, 540–546.
- Luo, D., Yaar, M., Tsai, A., and Gilchrest, B.A. (2004). Solar-simulated irradiation evokes a persistent and biphasic IL-1alpha response. *Exp. Dermatol.* 13, 11–17.
- Lütjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Sidén, A., Diczfalussy, U., and Björkhem, I. (1996). Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9799–9804.
- Marcellino, D., Suárez-Boomgaard, D., Sánchez-Reina, M.D., Aguirre, J.A., Yoshitake, T., Yoshitake, S., Hagman, B., Kehr, J., Agnati, L.F., Fuxe, K., et al. (2010). On the role of P2X(7) receptors in dopamine nerve cell degeneration in a rat model of Parkinson's disease: studies with the P2X(7) receptor antagonist A-438079. *J. Neural Transm.* 117, 681–687.
- Marwarha, G., Dasari, B., Prasanthi, J.R.P., Schommer, J., and Ghribi, O. (2010). Leptin reduces the accumulation of Abeta and phosphorylated tau induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit organotypic slices. *J. Alzheimers Dis. JAD* 19, 1007–1019.
- McGeer, P.L., and McGeer, E.G. (2004). Inflammation and the Degenerative Diseases of Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1035, 104–116.
- McKee, C.M., Penno, M.B., Cowman, M., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Bao, C., and Noble, P.W. (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J. Clin. Invest.* 98, 2403–2413.
- McLarnon, J.G., Ryu, J.K., Walker, D.G., and Choi, H.B. (2006). Upregulated expression of purinergic P2X(7) receptor in Alzheimer disease and amyloid-beta peptide-treated microglia and in peptide-injected rat hippocampus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 1090–1097.

- Mélassopoulos, A., and Levacher, C. (2012). *La peau* (2e ed.) (Lavoisier).
- Menzies, J., Paul, A., and Kennedy, C. (2003). P2X7 subunit-like immunoreactivity in the nucleus of visceral smooth muscle cells of the guinea pig. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* *106*, 103–109.
- Merle, B.M.J., Silver, R.E., Rosner, B., and Seddon, J.M. (2015). Adherence to a Mediterranean diet, genetic susceptibility, and progression to advanced macular degeneration: a prospective cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.* *102*, 1196–1206.
- Meyer, K., and Palmer, J.W. (1934). The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *J. Biol. Chem.* *107*, 629–634.
- Michel, A.D., Clay, W.C., Ng, S.W., Roman, S., Thompson, K., Condreay, J.P., Hall, M., Holbrook, J., Livermore, D., and Senger, S. (2009). Identification of regions of the P2X7 receptor that contribute to human and rat species differences in antagonist effects: Receptor regions affecting P2X7 antagonist potency. *Br. J. Pharmacol.* *155*, 738–751.
- Migliore, L., and Coppedè, F. (2009). Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. *Mutat. Res.* *667*, 82–97.
- Mitchell P, Wang J, Smith W, and Leeder SR (2002). Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: The blue mountains eye study. *Arch. Ophthalmol.* *120*, 1357–1363.
- Mousavi, M., and Armstrong, R.A. (2013). Genetic risk factors and age-related macular degeneration (AMD). *J. Optom.* *6*, 176–184.
- Mura, T., Dartigues, J.-F., and Berr, C. (2010). How many dementia cases in France and Europe? Alternative projections and scenarios 2010-2050. *Eur. J. Neurol.* *17*, 252–259.
- Mutasim, D.F., Takahashi, Y., Labib, R.S., Anhalt, G.J., Patel, H.P., and Diaz, L.A. (1985). A pool of bullous pemphigoid antigen(s) is intracellular and associated with the basal cell cytoskeleton-hemidesmosome complex. *J. Invest. Dermatol.* *84*, 47–53.
- Narayanaswamy, R., Iyer, V., Khare, P., Bodziak, M.L., Badgett, D., Zivadinov, R., Weinstock-Guttman, B., Rideout, T.C., Ramanathan, M., and Browne, R.W. (2015).

Simultaneous Determination of Oxysterols, Cholesterol and 25-Hydroxy-Vitamin D3 in Human Plasma by LC-UV-MS. *PLOS ONE* 10, e0123771.

Naylor, E.C., Watson, R.E.B., and Sherratt, M.J. (2011). Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 69, 249–256.

Nelson, T.J., and Alkon, D.L. (2005). Oxidation of Cholesterol by Amyloid Precursor Protein and β -Amyloid Peptide. *J. Biol. Chem.* 280, 7377–7387.

Nhan, H.S., Chiang, K., and Koo, E.H. (2015). The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 1–19.

Niyadurupola, N., Sidaway, P., Ma, N., Rhodes, J.D., Broadway, D.C., and Sanderson, J. (2013). P2X7 receptor activation mediates retinal ganglion cell death in a human retina model of ischemic neurodegeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 2163–2170.

Nusgens, B.-V. (2010). [Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?]. *Ann. Dermatol. Vénéréologie* 137 Suppl 1, S3-8.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem. FEBS* 267, 5421–5426.

Ono, Y., Torii, K., Fritsche, E., Shintani, Y., Nishida, E., Nakamura, M., Shirakata, Y., Haarmann-Stemmann, T., Abel, J., Krutmann, J., et al. (2013). Role of the aryl hydrocarbon receptor in tobacco smoke extract-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Exp. Dermatol.* 22, 349–353.

Orgogozo, J.M., Dartigues, J.F., Lafont, S., Letenneur, L., Commenges, D., Salamon, R., Renaud, S., and Breteler, M.B. (1997). Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Rev. Neurol. (Paris)* 153, 185–192.

Ortiz, A., and Grando, S.A. (2012). Smoking and the skin. *Int. J. Dermatol.* 51, 250–262.

Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.

- Pageon, H. (2010). Reaction of glycation and human skin: the effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. *Pathol. Biol. (Paris)* 58, 226–231.
- Panasyuk, A., Frati, E., Ribault, D., and Mitrovic, D. (1994). Effect of reactive oxygen species on the biosynthesis and structure of newly synthesized proteoglycans. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 157–167.
- Pappas, A. (2009). Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol.* 1, 72–76.
- Parini, P., Angelin, B., and Rudling, M. (1999). Cholesterol and Lipoprotein Metabolism in Aging. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 832–839.
- Park, J., Seok, J.K., Suh, H.-J., and Boo, Y.C. (2014). Gardenia jasminoides Extract Attenuates the UVB-Induced Expressions of Cytokines in Keratinocytes and Indirectly Inhibits Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Human Dermal Fibroblasts. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2014, 429246.
- Parvathenani, L.K., Tertyshnikova, S., Greco, C.R., Roberts, S.B., Robertson, B., and Posmantur, R. (2003). P2X7 Mediates Superoxide Production in Primary Microglia and Is Up-regulated in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* 278, 13309–13317.
- Passeron, T., and Ortonne, J.-P. (2003). [Skin ageing and its prevention]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 32, 1474–1482.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693–704.
- Pelegrín, P. (2011). Many ways to dilate the P2X7 receptor pore. *Br. J. Pharmacol.* 163, 908–911.
- Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25, 5071–5082.

- Pelegri n, P., Barroso-Gutierrez, C., and Surprenant, A. (2008). P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1  in mouse macrophage. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 7147–7157.
- Penuela, S., Gehi, R., and Laird, D.W. (2013). The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1828*, 15–22.
- Petropoulos, I., Conconi, M., Wang, X., Hoenel, B., Br  g  re, F., Milner, Y., and Friguet, B. (2000). Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *55*, B220-227.
- Pfeiffer, Z.A., Aga, M., Prabhu, U., Watters, J.J., Hall, D.J., and Bertics, P.J. (2004). The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 1173–1182.
- Phan, H.T.T., Hata, T., Morita, M., Yoda, T., Hamada, T., Vestergaard, M.C., and Takagi, M. (2013). The effect of oxysterols on the interaction of Alzheimer’s amyloid beta with model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1828*, 2487–2495.
- Piermarocchi, S., Tognetto, D., Piermarocchi, R., Masetto, M., Monterosso, G., Segato, T., Cavarzeran, F., Turrini, A., Peto, T., and for the PAMDI Study Group (2015). Risk Factors and Age-Related Macular Degeneration in a Mediterranean-Basin Population: The PAMDI (Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Italy) Study - Report 2. *Ophthalmic Res.* *55*, 111–118.
- Polj  ak, B., Dahmane, R.G., and Godi  , A. (2012). Intrinsic skin aging: the role of oxidative stress. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.* *21*, 33–36.
- Pons, B., Belmont, A.-S., Masson-Genteuil, G., Chapuis, V., Oddos, T., and Sauvaigo, S. (2010). Age-associated modifications of Base Excision Repair activities in human skin fibroblast extracts. *Mech. Ageing Dev.* *131*, 661–665.
- Popovici, D., Olinescu, R., and Hertoghe, J. (1992). The negative impact of oxidative stress in chronic cardiac failure and coronary heart disease calls for a new pathophysiologic and therapeutic approach. *Romanian J. Endocrinol. Spons. Sic Acad. Med. Sci.* *30*, 87–101.

- Prasanthi, J.R., Huls, A., Thomasson, S., Thompson, A., Schommer, E., and Ghribi, O. (2009). Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Neurodegener.* 4, 1.
- Punnonen, K., Autio, P., Kiistala, U., and Ahotupa, M. (1991a). In-vivo effects of solar-simulated ultraviolet irradiation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in human epidermis. *Br. J. Dermatol.* 125, 18–20.
- Punnonen, K., Jansén, C.T., Puntala, A., and Ahotupa, M. (1991c). Effects of In Vitro UVA Irradiation and PUVA Treatment on Membrane Fatty Acids and Activities of Antioxidant Enzymes in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 96, 255–259.
- Punnonen, K., Puntala, A., Jansén, C.T., and Ahotupa, M. (1991b). UVB irradiation induces lipid peroxidation and reduces antioxidant enzyme activities in human keratinocytes in vitro. *Acta Derm. Venereol.* 71, 239–242.
- Puzzo, D., Gulisano, W., Arancio, O., and Palmeri, A. (2015). The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A β physiology. *Neuroscience* 307, 26–36.
- Rabe, J.H., Mamelak, A.J., McElgunn, P.J.S., Morison, W.L., and Sauder, D.N. (2006). Photoaging: mechanisms and repair. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55, 1–19.
- Rajawat, Y.S., Hilioti, Z., and Bossis, I. (2009). Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Res. Rev.* 8, 199–213.
- Rao, K.M., and Cohen, H.J. (1991). Actin cytoskeletal network in aging and cancer. *Mutat. Res.* 256, 139–148.
- Read, J., and Suphioglu, C. (2013). Dropping the BACE: Beta Secretase (BACE1) as an Alzheimer's Disease Intervention Target. In *Neurodegenerative Diseases*, U. Kishore, ed. (InTech), p.
- Reed, M.J., Ferara, N.S., and Vernon, R.B. (2001). Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1203–1220.

- Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2016). Purinergic signaling in retinal degeneration and regeneration. *Neuropharmacology* 104, 194–211.
- Rettinger, J., Aschrafi, A., and Schmalzing, G. (2000). Roles of individual N-glycans for ATP potency and expression of the rat P2X1 receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 33542–33547.
- Richter, T., and Zglinicki, T. von (2007). A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 42, 1039–1042.
- Rijken, F., Kiekens, R.C.M., van den Worm, E., Lee, P.L., van Weelden, H., and Bruijnzeel, P.L.B. (2006). Pathophysiology of photoaging of human skin: focus on neutrophils. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 5, 184–189.
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J., and Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, N. Gal-Edd, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, V. Lemmon, Z. Li, et al., eds. (Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences), p.
- Rittié, L., and Fisher, G.J. (2015). Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, a015370.
- Rodríguez, I.R., and Larrayoz, I.M. (2010). Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration. *J. Lipid Res.* 51, 2847–2862.
- Rodriguez, I.R., Clark, M.E., Lee, J.W., and Curcio, C.A. (2014). 7-ketocholesterol accumulates in ocular tissues as a consequence of aging and is present in high levels in drusen. *Exp. Eye Res.* 128, 151–155.
- Ruitenbergh, A., van Swieten, J.C., Witteman, J.C.M., Mehta, K.M., van Duijn, C.M., Hofman, A., and Breteler, M.M.B. (2002). Alcohol consumption and risk of dementia: the Rotterdam Study. *Lancet Lond. Engl.* 359, 281–286.
- Sandjeu, Y., and Haftek, M. (2009). Desmosealin and other components of the epidermal extracellular matrix. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 60 Suppl 4, 23–30.

- Sanz, J.M., Chiozzi, P., Ferrari, D., Colaianna, M., Idzko, M., Falzoni, S., Fellin, R., Trabace, L., and Virgilio, F.D. (2009). Activation of Microglia by Amyloid β Requires P2X7 Receptor Expression. *J. Immunol.* *182*, 4378–4385.
- Sauder, D.N., Ponnapan, U., and Cinader, B. (1989). Effect of age on cutaneous interleukin 1 expression. *Immunol. Lett.* *20*, 111–114.
- Scarmeas, N., Stern, Y., Tang, M.-X., Mayeux, R., and Luchsinger, J.A. (2006). Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* *59*, 912–921.
- Scarmeas, N., Luchsinger, J.A., Schupf, N., Brickman, A.M., Cosentino, S., Tang, M.X., and Stern, Y. (2009). Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA* *302*, 627–637.
- Schick, T., Ersoy, L., Lechanteur, Y.T.E., Saksens, N.T.M., Hoyng, C.B., den Hollander, A.I., Kirchhof, B., and Fauser, S. (2015). HISTORY OF SUNLIGHT EXPOSURE IS A RISK FACTOR FOR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. *Retina Phila. Pa.*
- Schor, S.L. (1994). Cytokine control of cell motility: modulation and mediation by the extracellular matrix. *Prog. Growth Factor Res.* *5*, 223–248.
- Schreck, R., Rieber, P., and Baeuerle, P.A. (1991). Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* *10*, 2247–2258.
- Schroepfer, G.J. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* *80*, 361–554.
- Schürer, N., Köhne, A., Schliep, V., Barlag, K., and Goerz, G. (1993). Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp. Dermatol.* *2*, 179–185.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* *81*, 741–766.
- Sies, H., and Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *311*, 617–631.

- Sies, H., and Jones, D. (2007). Oxidative Stress. In *Encyclopedia of Stress* (Second Edition), (New York: Academic Press), pp. 45–48.
- Simmons, L.K., May, P.C., Tomaselli, K.J., Rydel, R.E., Fuson, K.S., Brigham, E.F., Wright, S., Lieberburg, I., Becker, G.W., and Brems, D.N. (1994). Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol. Pharmacol.* *45*, 373–379.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569–572.
- Skaper, S.D., Debetto, P., and Giusti, P. (2010). The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *24*, 337–345.
- Smith, K.R., and Thiboutot, D.M. (2008). Thematic review series: Skin Lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J. Lipid Res.* *49*, 271–281.
- Smith, L.L., and Johnson, B.H. (1989). Biological activities of oxysterols. *Free Radic. Biol. Med.* *7*, 285–332.
- Soroka, Y., Ma'or, Z., Leshem, Y., Verochovsky, L., Neuman, R., Brégégère, F.M., and Milner, Y. (2008). Aged keratinocyte phenotyping: morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals. *Exp. Gerontol.* *43*, 947–957.
- Squier, T.C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp. Gerontol.* *36*, 1539–1550.
- Stern, R., and Maibach, H.I. (2008). Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clin. Dermatol.* *26*, 106–122.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 1977–1981.

- Sui, G.-Y., Liu, G.-C., Liu, G.-Y., Gao, Y.-Y., Deng, Y., Wang, W.-Y., Tong, S.-H., and Wang, L. (2013). Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Ophthalmol.* 97, 389–394.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., and Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735–738.
- Takeda, K., Gosiewska, A., and Peterkofsky, B. (1992). Similar, but not identical, modulation of expression of extracellular matrix components during in vitro and in vivo aging of human skin fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 153, 450–459.
- Takenouchi, T., Nakai, M., Iwamaru, Y., Sugama, S., Tsukimoto, M., Fujita, M., Wei, J., Sekigawa, A., Sato, M., Kojima, S., et al. (2009). The Activation of P2X7 Receptor Impairs Lysosomal Functions and Stimulates the Release of Autophagolysosomes in Microglial Cells. *J. Immunol.* 182, 2051–2062.
- Tammi, R.H., Kultti, A., Kosma, V.-M., Pirinen, R., Auvinen, P., and Tammi, M.I. (2008). Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Semin. Cancer Biol.* 18, 288–295.
- Tan, J.E., Springate, B.A., and Tremont, G. (2012). Neuropsychologists' beliefs about alcohol and dementia. *Clin. Neuropsychol.* 26, 879–893.
- Tate, D.J., Miceli, M.V., and Newsome, D.A. (1995). Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 1271–1279.
- Tewari, M., and Seth, P. (2015). Emerging role of P2X7 receptors in CNS health and disease. *Ageing Res. Rev.* 24, 328–342.
- Thornfeldt, C.R. (2008). Chronic inflammation is etiology of extrinsic aging. *J. Cosmet. Dermatol.* 7, 78–82.
- Thornton, M.J. (2013). Estrogens and aging skin. *Dermatoendocrinol.* 5, 264–270.

- Torres, G.E., Egan, T.M., and Voigt, M.M. (1998). N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 14845–14851.
- Tortora, G.J., and Derrickson, B. (2011). Principles of anatomy and physiology: international student version (New York, Etats-Unis d'Amérique: John Wiley).
- Travert, C., Carreau, S., and Le Goff, D. (2006). Induction of apoptosis by 25-hydroxycholesterol in adult rat Leydig cells: protective effect of 17beta-estradiol. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 22, 564–570.
- Trousseau, A., Bernard, S., Petit, P.X., Liere, P., Pianos, A., El Hadri, K., Lobaccaro, J.-M.A., Said Ghandour, M., Raymondjean, M., Schumacher, M., et al. (2009). 25-hydroxycholesterol provokes oligodendrocyte cell line apoptosis and stimulates the secreted phospholipase A2 type IIA via LXR beta and PXR. *J. Neurochem.* 109, 945–958.
- Turley, E.A. (1992). Hyaluronan and cell locomotion. *Cancer Metastasis Rev.* 11, 21–30.
- Tzellos, T.G., Klagas, I., Vahtsevanos, K., Triaridis, S., Printza, A., Kyrgidis, A., Karakioulakis, G., Zouboulis, C.C., and Papakonstantinou, E. (2009). Extrinsic ageing in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. *Exp. Dermatol.* 18, 1028–1035.
- Urano, Y., Ochiai, S., and Noguchi, N. (2013). Suppression of amyloid- β production by 24S-hydroxycholesterol via inhibition of intracellular amyloid precursor protein trafficking. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 4305–4315.
- Vacca, F., D'Ambrosi, N., Nestola, V., Amadio, S., Giustizieri, M., Cucchiaroni, M.L., Tozzi, A., Velluz, M.C., Mercuri, N.B., and Volonté, C. (2011). N-Glycans mutations rule oligomeric assembly and functional expression of P2X3 receptor for extracellular ATP. *Glycobiology* 21, 634–643.
- Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A.M., Olano, E., Davis, P.A., Packer, L., and Cross, C.E. (2004). In vivo ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 673–681.

- Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C., and Sleegers, K. (2015). The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.*
- Varani, J., Warner, R.L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S.H., Kang, S., Chung, J.H., Wang, Z.Q., Datta, S.C., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2000). Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* 114, 480–486.
- Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligiel, S.E., Datta, S.C., Wang, Z.Q., Shao, Y., Kang, S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2001). Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am. J. Pathol.* 158, 931–942.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.
- Velilla, S., García-Medina, J.J., García-Layana, A., Dolz-Marco, R., Pons-Vázquez, S., Pinazo-Durán, M.D., Gómez-Ulla, F., Arévalo, J.F., Díaz-Llopis, M., and Gallego-Pinazo, R. (2013). Smoking and Age-Related Macular Degeneration: Review and Update. *J. Ophthalmol.* 2013.
- Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S.R., Bank, R.A., Shaw, J.N., Lyons, T.J., Bijlsma, J.W.J., Lefeber, F.P.J.G., Baynes, J.W., and TeKoppele, J.M. (2000). Effect of Collagen Turnover on the Accumulation of Advanced Glycation End Products. *J. Biol. Chem.* 275, 39027–39031.
- Vierkötter, A., Schikowski, T., Ranft, U., Sugiri, D., Matsui, M., Krämer, U., and Krutmann, J. (2010). Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2719–2726.
- Virginio, C., Church, D., North, R.A., and Surprenant, A. (1997). Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36, 1285–1294.

- Vivier, A.D. (1996). Atlas de dermatologie clinique (De Boeck Supérieur).
- Wakx, A., Dutot, M., Massicot, F., Mascarelli, F., Limb, G.A., and Rat, P. (2015). Amyloid β Peptide Induces Apoptosis Through P2X7 Cell Death Receptor in Retinal Cells: Modulation by Marine Omega-3 Fatty Acid DHA and EPA. *Appl. Biochem. Biotechnol.*
- Wang, H.-L., Wang, Y.-Y., Liu, X.-G., Kuo, S.-H., Liu, N., Song, Q.-Y., and Wang, M.-W. (2016). Cholesterol, 24-Hydroxycholesterol, and 27-Hydroxycholesterol as Surrogate Biomarkers in Cerebrospinal Fluid in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *J. Alzheimers Dis. JAD* 51, 45–55.
- Wang, J., Yu, J.-T., Tan, M.-S., Jiang, T., and Tan, L. (2013). Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Ageing Res. Rev.* 12, 1024–1041.
- Watanabe, H., Shimizu, T., Nishihira, J., Abe, R., Nakayama, T., Taniguchi, M., Sabe, H., Ishibashi, T., and Shimizu, H. (2004). Ultraviolet A-induced Production of Matrix Metalloproteinase-1 Is Mediated by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Dermal Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279, 1676–1683.
- Watt, F.M. (1983). Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 81, 100s–3s.
- Weerheim, A., and Ponc, M. (2001). Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch. Dermatol. Res.* 293, 191–199.
- Wefers, H., Melnik, B.C., Flür, M., Bluhm, C., Lehmann, P., and Plewig, G. (1991). Influence of UV irradiation on the composition of human stratum corneum lipids. *J. Invest. Dermatol.* 96, 959–962.
- Weissmann, B., and Meyer, K. (1952). Structure of hyaluronic acid. The glucuronic linkage. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 4729–4729.
- World Health Organization (2015). Thematic briefs for the First WHO Ministerial Conference on Global Action Against Dementia, 16-17 March 2015.

- World Health Organization (2016). Priority eye diseases. <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/>. consulté le 21/02/2016.
- Wu, J., Cho, E., Willett, W.C., Sastry, S.M., and Schaumberg, D.A. (2015). Intakes of Lutein, Zeaxanthin, and Other Carotenoids and Age-Related Macular Degeneration During 2 Decades of Prospective Follow-up. *JAMA Ophthalmol.* 133, 1415–1424.
- Yasojima, K., Akiyama, H., McGeer, E.G., and McGeer, P.L. (2001). Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci. Lett.* 297, 97–100.
- Ye, J., Garg, A., Calhoun, C., Feingold, K.R., Elias, P.M., and Ghadially, R. (2002). Alterations in cytokine regulation in aged epidermis: implications for permeability barrier homeostasis and inflammation. I. IL-1 gene family. *Exp. Dermatol.* 11, 209–216.
- Yin, L., Morita, A., and Tsuji, T. (2000). Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Arch. Dermatol. Res.* 292, 188–194.
- Yoshizumi, M., Nakamura, T., Kato, M., Ishioka, T., Kozawa, K., Wakamatsu, K., and Kimura, H. (2008). Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biol. Int.* 32, 1405–1411.
- Yu, D.Y., and Cringle, S.J. (2001). Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 20, 175–208.
- Zarrouk, A., Vejux, A., Mackrill, J., O’Callaghan, Y., Hammami, M., O’Brien, N., and Lizard, G. (2014). Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res. Rev.* 18, 148–162.
- Zhang, J., Xue, Y., Jondal, M., and Sjövall, J. (1997). 7 α -Hydroxylation and 3-dehydrogenation abolish the ability of 25-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol to induce apoptosis in thymocytes. *Eur. J. Biochem. FEBS* 247, 129–135.
- Zhao, C., and Dahlman-Wright, K. (2010). Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J. Endocrinol.* 204, 233–240.

Bibliographie

Zhao, T., Gao, J., Van, J., To, E., Wang, A., Cao, S., Cui, J.Z., Guo, J.-P., Lee, M., McGeer, P.L., et al. (2015). Age-related increases in amyloid beta and membrane attack complex: evidence of inflammasome activation in the rodent eye. *J. Neuroinflammation* 12, 121.

ANNEXES

Annexe A :

Article 4

Dutot M, **Olivier E**, Wakx A, Rat P.

A fast and reproducible cell- and 96-well plate-based method for the evaluation of P2X7 receptor activation using YO-PRO-1 fluorescent dye

En révision favorable dans *Journal of Biological Methods*

A fast and reproducible cell- and 96-well plate-based method for the evaluation of P2X7 receptor activation using YO-PRO-1 fluorescent dye

Mélody DUTOT (1,2), Elodie OLIVIER (1,3), Anaïs WAKX (1), Patrice RAT (1)

(1) UMR 8638 CNRS COMETE, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

(2) Recherche et Développement, Laboratoire d'Evaluation Physiologique, Yslab, 2 rue Félix Le Dantec, 29000 Quimper, France

(3) Soliance-Givaudan, Route de Bazancourt, 51110 Pomacle, France

melody.dutot@yslab.fr

elodie.eolivier@gmail.com

anais.wakx@parisdescartes.fr

patrice.rat@parisdescartes.fr

Telephone number: +33/1 53 73 98 21

Fax number: +33/1 43 26 71 22

ABSTRACT

The YO-PRO-1 assay provides a quantitative estimation of P2X7 receptor activation. P2X7 receptor is associated to pathological conditions including infectious, inflammatory, neurological, musculoskeletal disorders, pain and, cancer. To study the activation of P2X7 receptor by chemicals or biological agents, we established a microplate-based cytometry protocol to accurately and rapidly quantify the activation of P2X7 receptor. The YO-PRO-1 assay is based on the ability of cells to incorporate and bind YO-PRO-1 dye to DNA after activation of P2X7 receptor. Most primary cells and cell lines from diverse origin may be used thanks to the ubiquitous distribution of P2X7 receptor. Cells are seeded in 96-well plates and incubated with the compound being tested for the appropriate time. The microplate is then incubated for 10 minutes with YO-PRO-1 staining solution. Fluorescence signal is read using a microplate reader in 1 minute. This procedure is easier and requires less handling steps than flow cytometry. 96-well plate based YO-PRO-1 assay is a reproducible and fast method to study both P2X7 receptor activation by toxic agents and P2X7 receptor inhibition by protective agents.

BACKGROUND

High throughput screening methods in toxicology are emerging approaches allowing a quick and efficient toxicity evaluation through a battery of assays that target cellular processes. These in vitro assays are useful for rapidly evaluating a large number of compounds to provide insight on potential human health effects. These compounds include chemicals, drugs, plant extracts, environmental substances, formulations...

P2X7 receptor, originally classified as P2Z receptor, has attracted more and more interest from researchers in the biomedical scientific community over the years (Fig. 1).

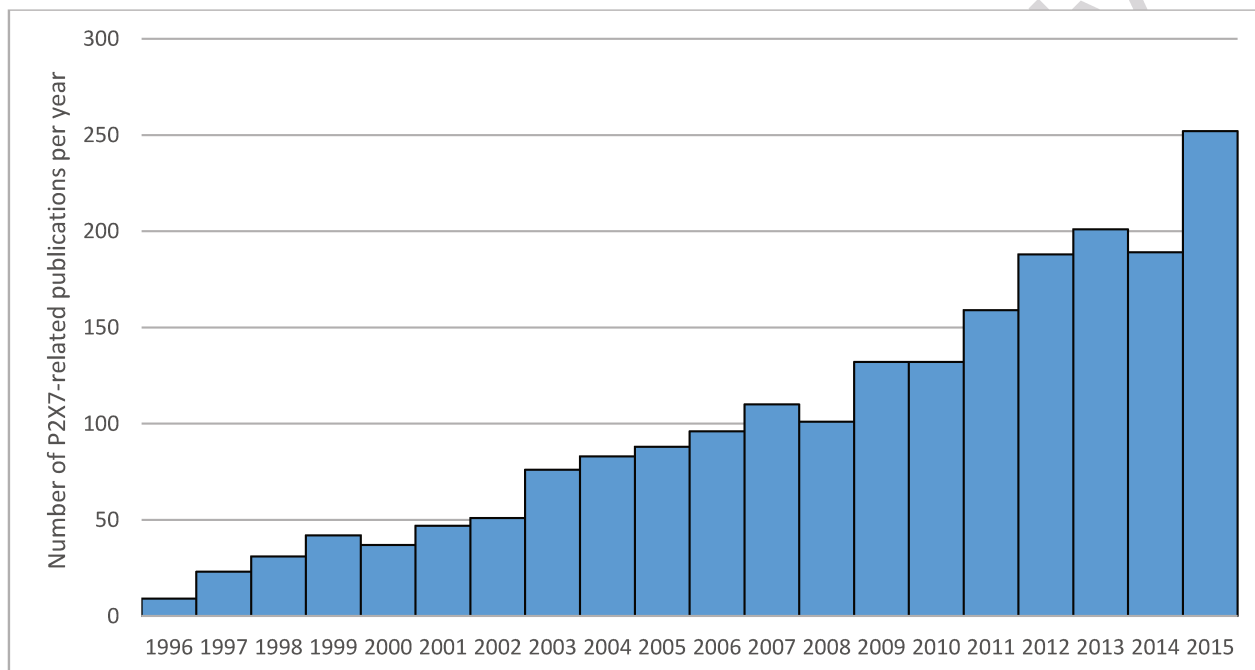


Figure 1. Number of P2X7-related publications per year (source: Pubmed).

P2X7 receptor is expressed by virtually all types of cells [1-3]. This receptor belongs to P2X family ionotropic receptor binding ATP [4]. P2X7 receptors require higher concentrations of ATP for activation compared with other P2X receptors, and 2,3-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) is approximately 30-fold more potent than ATP in the human and rat [4,5]. BzATP is extensively used in research as the agonist of choice for P2X7 receptor [6-8]. Brief stimulation of P2X7 receptor leads to an increase in intracellular calcium influx whereas repeated or prolonged stimulation of P2X7 receptor induces the formation of a non-selective pore. This pore allows the entry of solutes up to 900 Da in size, which eventually leads to membrane blebbing, release of cytokines and activation of caspases ultimately leading to cell death [9-14]. Due to the large number of biological processes P2X7 receptors activation is responsible for, P2X7 receptor has been associated to pathological conditions including infectious, inflammatory, autoimmune, neurological, musculoskeletal disorders, pain and, cancer [7,15-22]. The role of P2X7 receptor in numerous pathologic conditions makes it a major therapeutic target, both in studies aiming at

inhibiting P2X7 receptor and in studies aiming at activating P2X7 receptor (during the development of anticancer strategies).

Development of the method

Through the formation of P2X7 pore, the cells become permeable for cationic dyes such as quinolinium,4-[(3-methyl-2(3H)-benzoxazolylidene)methyl]-1[3-(triethylammonio)propyl]-, diiodide (YO-PRO-1, 629 Daltons for the di-iodide salt; 375 Daltons for free base). YO-PRO-1 is a cell membrane-impermeant cation whose fluorescence increases upon binding nucleic acids and thus represents an excellent probe for detecting permeability changes in P2X7 receptor (Fig. 2).

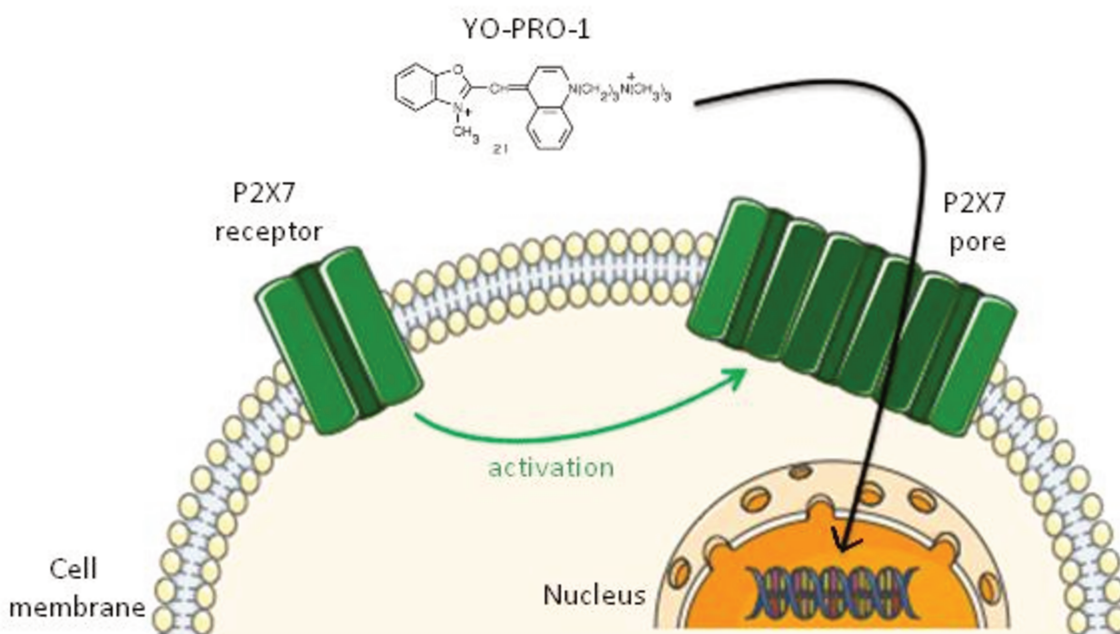


Figure 2. Schematic representation of YO-PRO-1 uptake after P2X7 receptor activation.

Originally, YO-PRO-1 signal was observed under fluorescence microscopy [4,23] then quantified using microplate cytometry [24,25] or flow cytometry [26]. The first studies looking at P2X7 activation through YO-PRO-1 uptake used fluorescence microplate reader with filter detection systems; we were among the first to use a monochromator-based system [27-35]. Excitation and emission wavelengths for YO-PRO-1 are very close, 491 nm and 509 nm, respectively (Fig. 3).

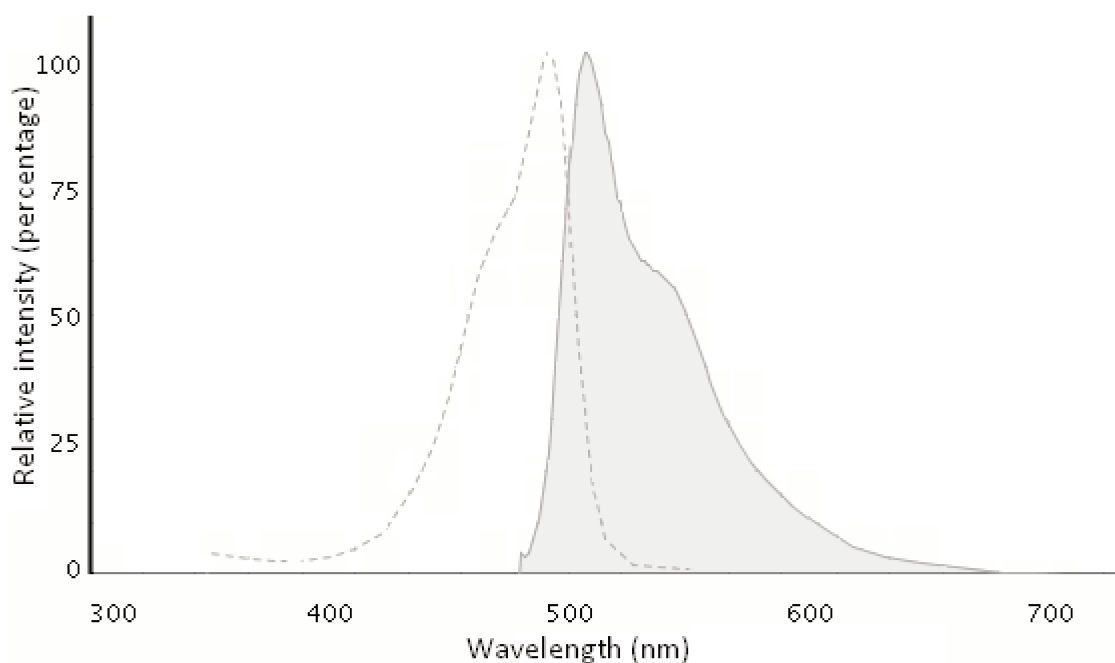


Figure 3. Fluorescence spectra of YO-PRO-1. Dashed line: excitation spectrum, solid line: emission spectrum.

With monochromator-based readers, the wavelengths to be measured are generally available in 1-nm increments. This is very useful with fluorescent tags that have close excitation and emission wavelengths to avoid wavelengths overlap and then reduce background fluorescence and increase sensitivity and specificity of the tag.

Our 96-well plate-based method for the evaluation of P2X7 receptor activation using YO-PRO-1 fluorescent dye was developed for adherent living cells so the whole assay, from the incubation with the compounds being evaluated to the quantification of YO-PRO-1 signal, can be performed in the same 96-well plate. Minimizing sample handling procedures such as centrifugation and pipetting steps limits the risk to affect the levels of apoptotic body formation. This microtiter plate-based assay offers a simple, reproducible, fast, relatively inexpensive, accurate cell-based method for high throughput screening of numerous compounds (such as drugs, chemicals, pollutants, xenobiotics...) in their ability to activate P2X7 receptor and therefore cell death [28,29,36,37]. It can also be used to study physiopathologic mechanisms implicated in degenerative diseases [38,39].

Comparison with other techniques

Flow cytometry is not widely used as a screening tool due to the limitations in handling large numbers of samples and may not be as adapted as microplate cytometry for high throughput screening. The use of microplates provides opportunities to screen large numbers of samples and to detect changes in cell number or activities in response to biological effectors.

Experimental design

This protocol provides instructions for performing a cell-based procedure that quantifies the activation of P2X7 receptor directly in 96-well microplate. The procedure can be divided into three main parts: preparation of samples (Steps 1-15), preparation of stains and sample staining (Steps 16-17); and data acquisition by microplate cytometry and data analysis (Steps 18-19).

Preparation of samples. Disruption of cell membrane integrity, a feature of necrosis, can lead to YO-PRO-1 entry in cells through necrotic pores. In that case, increase in YO-PRO-1 uptake is not due to P2X7 receptor activation but to altered membrane integrity occurring during necrosis. To avoid misinterpretation of the results, YO-PRO-1 fluorescence signal has to be monitored on cells with preserved membrane integrity wherein YO-PRO-1 can only enter through activated P2X7 receptor. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability through measurement of membrane integrity is highly recommended [40].

We developed the procedure for adherent cell lines (epithelial cells, macrophages, glial cells...) but it can be adapted to any primary cells, and also to suspension and non-adhesive cells (leukocytes, monocytes...) on condition that a centrifuge equipped with standard microplates holders is used. Cell lines obtained from various immortalization processes were tested: spontaneously immortalized cells, SV40 large T-antigen immortalized cells, and cancer cells. As YO-PRO-1 is light sensitive, clear bottom black 96-well microplates should be preferred. The cells are plated into 96-well microplates; it is worth noting that seeding densities are chosen to reach subconfluence in 24 h. The culture medium in which the cells are seeded is growth medium (generally supplemented with 10% fetal calf serum, FCS). The cells are incubated with the compounds suspected to activate P2X7 receptor directly in the microplate. The choice of the solution in which the compounds are diluted depends on the incubation time: for short incubation times (inferior to 1 hour), the compounds can be diluted in phosphate buffer saline but for longer incubation times (superior to 1 hour), the compounds have to be diluted in maintenance medium (no more than 5% FCS, 2.5% is a good option for most cases) to avoid cell proliferation and reduction in sensitivity of chemicals with high protein affinity in 10% FCS.

Positive controls should be included in the assay to check the ability of agonists to activate P2X7 receptor in the chosen cell model. ATP (millimolar concentration) and BzATP (micromolar concentration) are the agonists of choice for YO-PRO-1 uptake studies.

If the assay is used on nonadherent cells, the microplate has to be centrifuged before any removal of cell supernatants. It should be noted that centrifugation will introduce a stage of sample handling that could influence the cell viability. Therefore, high centrifugation speed should be avoided (maximum 1800 rpm).

Preparation of staining solution and sample staining. As divalent cations alter the affinity of ATP binding to the P2X7 receptor [30,41,42], it is of high importance to dilute YO-PRO-1 stock solution in phosphate buffer saline without calcium nor magnesium. After removal of the compound being evaluated, the cells are incubated with YO-PRO-1 dye directly in the microplate for only 10 minutes. It is noteworthy that neither prior fixation nor permeabilization is needed.

Data acquisition by microplate cytometry. In the data acquisition software of the microplate reader, YO-PRO-1 excitation and emission wavelengths have to be specifically selected (491 nm,

509 nm) with the narrowest bandwidths. To ensure optimal fluorescence signal recording, it is crucial during data acquisition to let the microplate reader determine the optimal gain setting by selecting an automatic gain adjustment option. YO-PRO-1 fluorescence signal is monitored directly in the microplate without any washing step.

After YO-PRO-1 fluorescence signal quantitation, the cells can be observed by live-cell fluorescence microscopy techniques and pictures can be taken to illustrate YO-PRO-1 uptake.

For peer review only

MATERIALS

The indicated suppliers listed below can be substituted with appropriate alternatives.

Reagents

- Cultured human corneal epithelial SV40 large T-antigen immortalized HCE cell line (Human Corneal Epithelial cells, Riken Cell Bank (RCB), cat. no. 1384)
- Cultured human retinal epithelial spontaneously immortalized ARPE-19 cell line (ATCC, cat. no. CRL2302)
- Cultured human cutaneous epithelial spontaneously immortalized HaCaT cell line (Cell Lines Service, Batch #300493–2417)
- Cultured human placental trophoblast-derived choriocarcinoma JEG-3 cell line (ATCC, cat. no. HTB-36)

We have also used this procedure on various primary cells and animal cell lines. ▲ **CRITICAL** The cell lines used in your research should be regularly checked to ensure that they are authentic and not infected with Mycoplasma. Mycoplasma contamination can affect the levels of YO-PRO-1 staining.

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Eurobio, cat. no. CM1DME6001)
- HAM F12 medium (Eurobio, cat. no. CM1H1200K)
- Minimum Essential Media (MEM, Eurobio, cat. no. CM1MEM1001)
- Penicillin-streptomycin mixture (Eurobio, cat. no. CABPES01-0U)
- Glutamin (Eurobio, cat. no. CSTGLU00-0U)
- FCS (Eurobio, cat. no. CVFSVF00-01)
- PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} (Eurobio, cat. no. CS1PBS01K)
- Trypsin-EDTA (Eurobio, cat. no. CEZTDA00-0U)
- YO-PRO-1 iodide (Thermofisher Scientific, cat. no. Y3603) ! **CAUTION** YO-PRO-1 may cause skin, eye and respiratory corrosion/irritation and exerts specific target organ systemic toxicity. Avoid contact with skin and eyes and always wear gloves when preparing and using YO-PRO-1.

Equipment

- Tissue culture incubator, humidified, 5% CO_2 /95% air, with temperature adjustable to the requirements of the cells (Binder C150)
- Microscope (DMIRB LEICA)
- Centrifuge tubes, 50 mL (Corning, cat. no. 430291)
- Centrifuge (Thermofisher Scientific-Jouan B4i) equipped with standard microplates holders if nonadherent cells are used
- Thoma cell counting chamber (or any cell counter)
- Black flat- and clear-bottomed 96-well tissue culture microplates (Corning, cat. no. 3603)
- 8-well multichannel electronic pipette 50-1200 μL (Picus, Sartorius) and tips
- Fluorescence microplate reader using dual monochromators (Safire, Tecan) with acquisition software (XFluor 4, Tecan)
- Optional : inverted fluorescence microscope

Reagent setup

Growth culture medium for HaCaT cells Supplement DMEM medium with 10% (v/v) FCS, 2 mM glutamin and 50 IU/mL penicillin-streptomycin mixture. This medium can be stored at 4°C for up to 2 months.

Growth culture medium for HCE and ARPE-19 cells Mix DMEM and HAM F12 mediums with 1:1 ratio. Supplement the mixture medium with 10% (v/v) FCS, 2 mM glutamin and 50 IU/mL penicillin-streptomycin mixture. This medium can be stored at 4°C for up to 2 months.

Growth culture medium for JEG-3 cells Supplement MEM medium with 10% (v/v) FCS, 2 mM glutamin and 50 IU/mL penicillin-streptomycin mixture. This medium can be stored at 4°C for up to 2 months.

Maintenance medium Supplement DMEM medium, DMEM/HAM F12 mixture, or MEM with 2.5% (v/v) FCS, 2 mM glutamin and 50 IU/mL penicillin-streptomycin mixture. This medium can be stored at 4°C for up to 2 months.

Test solutions Test solutions must be prepared immediately before use, unless stability data demonstrate the acceptability of storage. The compounds suspected to activate P2X7 receptor have to be diluted in maintenance medium (for long incubation time) or in PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} (for short incubation time).

YO-PRO-1 staining solution Dilute YO-PRO-1 iodide stock solution to 2 μM in PBS. ▲ **CRITICAL** The staining solution should be freshly made no more than 30 min before the cell staining step, and it should be kept in the dark at room temperature (20 °C).

Equipment setup

Using the fluorescence microplate reader software, select when possible the following measurement parameters:

- 96-well microplate (select the brand you have purchased, for example Corning)
- Excitation wavelength: 491 nm with the narrowest bandwidth (5 nm)
- Emission wavelength: 509 nm with the narrowest bandwidth (5 nm)
- Optimal gain
- Bottom reading
- Either reading with microplate cover or reading without microplate cover can be performed

PROCEDURE**Cell seeding • TIMING 45 min**

1| Discard the growth culture medium the cells are growing in and rinse the cells by gentle agitation in PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} to remove any remaining serum, which might inhibit the action of the trypsin. 10 mL is enough for a 75-cm² flask. Discard the PBS.

▲ **CRITICAL STEP** The procedures on the first day (steps 1–10) should be carried out under aseptic conditions and in the sterile environment of a laminar flow cabinet.

2| Add ≈3 mL trypsin–EDTA solution at the culture temperature to the monolayer and incubate the flask in the tissue culture incubator for 2–3 minutes.

3| Lightly tap the flask to detach the cells and add growth culture medium (twice that of the trypsin volume to neutralize trypsin).

4| Transfer the suspension to a cell culture-treated tube and centrifuge at 1800rpm for 3 minutes to eliminate the supernatant containing trypsin and resuspend the cells in fresh growth culture medium (≈ 10 mL).

5| Count a sample of the cell suspension using a Thoma cell counting chamber (or a cell counter).

6| Dilute the cells with growth culture medium, preparing at least 15 mL per microplate of the cell suspension of an adequate cell density according to the cell type and the design of the study. Approximately 6×10^4 cells/mL is adequate for most cell lines to obtain subconfluent cells in 24 h. ▲ **CRITICAL STEP** If nonadherent cells are used, a 5-min centrifugation step before each change of reagents is necessary.

7| Using a multichannel electronic pipette, dispense 200 µL of PBS only into the peripheral wells of a 96-well tissue culture microplate because evaporation mainly affects the peripheral wells of a plate (edge effect).

8| Agitate gently the cell suspension and place it in a sterile reservoir.

▲ **CRITICAL STEP** Ensure a uniform cell suspension by pipetting up and down several times

9| Dispense 200 µL of the cell suspension into the 60 remaining wells of the microplate.

10| Cover the plate and incubate the cells in the tissue culture incubator (37°C, 5% CO₂, humidified atmosphere) for 24 h. This incubation period allows for cell adherence and for exponential growth.

Cell incubation with the compounds being evaluated • TIMING 30 min

11| Check the correct growth of the cells under a microscope.

12| Prepare test solutions immediately before use to avoid problems of stability and precipitation of the compounds or medium proteins.

▲ **CRITICAL STEP** The procedures on the second day (steps 11–15) should be carried out under aseptic conditions and in the sterile environment of a laminar flow cabinet if the incubation time with the compounds being evaluated is long (above 24 h).

13| Discard the culture medium from the microplate and rinse the cells with PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+}

14| Add 200 µL of solutions in the wells where cells were seeded. There are several possible designs according to the study, but a very common format is: B2-G2 negative control with maintenance medium or PBS (depending on the solution being used for compounds dilution), B3-G3 positive control (ATP and/or BzATP), B4-G4 solvent control if needed, B5-G11 compounds

being evaluated at different concentrations (at least three wells per concentration, so maximum 14 samples).

▲ **CRITICAL STEP** For long incubation times (above 24 h), the culture medium used for the dilution of the compounds being evaluated should contain less FCS than the growth culture medium to both minimize cell proliferation and the binding of the compounds to proteins, but also to assure cell survival within the exposure period.

15| Incubate the microplate at appropriate conditions (room temperature or 37°C, short or long incubation times)

YO-PRO-1 uptake assay • TIMING 15 min

16| After incubation with the compounds being evaluated for P2X7 receptor activation, discard the supernatant and rinse the cells with PBS without Ca^{2+} and Mg^{2+} .

17| Add 200 μL of YO-PRO-1 staining solution to all cell-seeded wells and incubate at room temperature for 10 min in the dark.

▲ **CRITICAL STEP** It is important to keep the microplate in the dark during incubation with YO-PRO-1. Aluminum foil can be used to entirely recover the microplate.

Data acquisition by microplate cytometry • TIMING 1 min

18| Measure the fluorescence signal in a fluorescence microplate reader with YO-PRO-1 measurement parameters (see **Equipment setup**).

19| Analyse data using the software provided with the microplate reader to calculate mean fluorescence intensity, standard deviation and draw graphs.

? TROUBLESHOOTING

Troubleshooting advice can be found in Table 1.

TABLE 1 | Troubleshooting table.

Problem	Possible reason	Solution
Low YO-PRO-1 signal in positive control	Low cell density	Increase cell density
	YO-PRO-1 exposure to light	Use aluminum foils to protect the microplate and the recipient where YO-PRO-1 staining solution is prepared
	Alteration of YO-PRO-1 dye	Avoid freeze/thaw cycles by aliquoting stock solution
	Cell of interest may not express P2X7 receptor	Check P2X7 expression using immunolabelling
High YO-PRO-1 signal in negative control	Staining solution was prepared too much in advance	Prepare YO-PRO-1 staining solution immediately before cell staining
	Wide bandwidth	Reduce bandwidth

20| It is recommended to repeat the experiment at least three different times.

Optional: Observation by live-cell fluorescence microscopy • TIMING 30 min

21| Discard the YO-PRO-1 solution

22| Observe YO-PRO-1 fluorescence using live-cell fluorescence microscopy and take pictures to illustrate YO-PRO-1 uptake.

• TIMING

Steps 1-10, cell seeding: 45 min

Steps 11-15, cell incubation with the compounds being evaluated: 30 min for 14 samples

Step 16-17, YO-PRO-1 staining: 15 min

Steps 18-19, data acquisition by microplate cytometry: 1 min

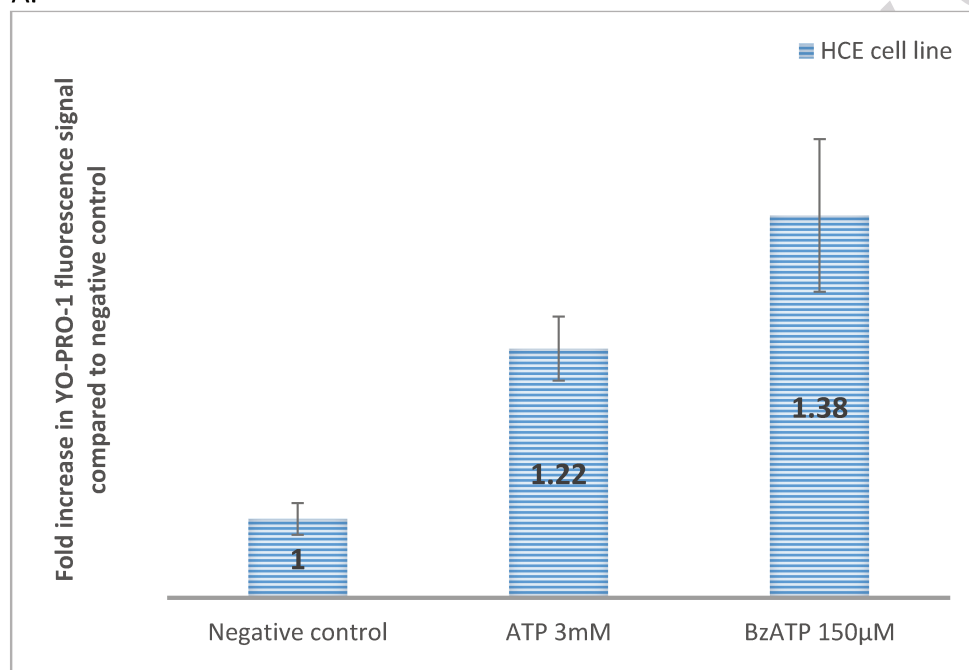
Steps 21-22, observation by live-cell fluorescence microscopy (optional): 30min

ANTICIPATED RESULTS

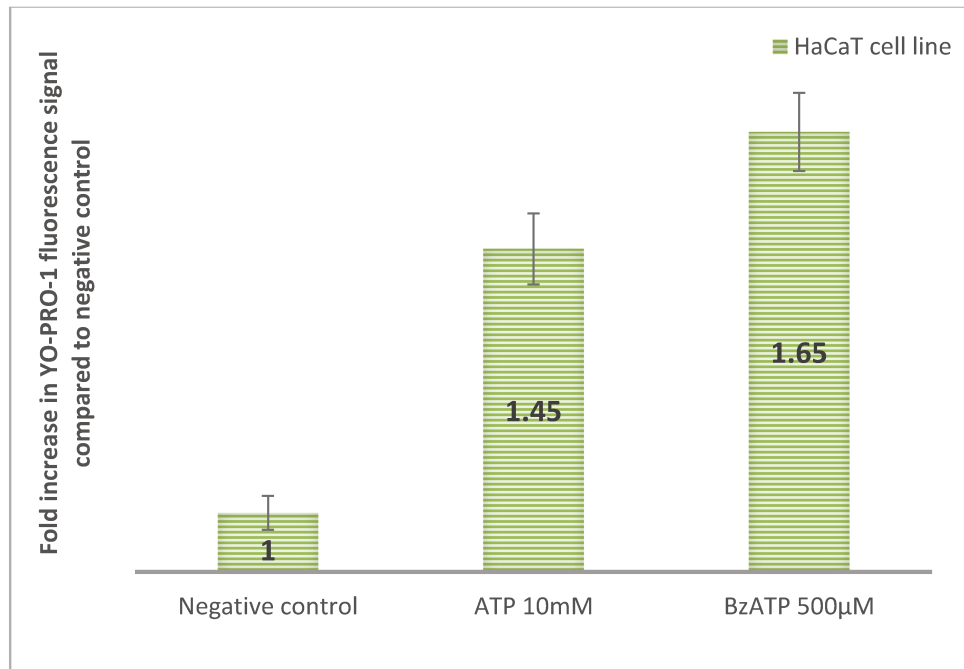
The procedure describes a model system using the human epithelial HCE, ARPE-19, HaCaT, JEG-3 cells, and P2X7 receptor agonists, ATP and BzATP, to exemplify this approach to evaluate P2X7 receptor activation. In the four cell lines, neither ATP nor BzATP caused decrease in cell viability. To analyse YO-PRO-1 fluorescence data, we suggest to calculate mean fluorescence intensity of negative control (n=6 for one experiment), then to normalize each fluorescence raw data (negative control, positive control, solvent, and compounds being evaluated) to the fluorescence mean of negative control (divide all individual value for each sample by the mean value of negative control). Then, means and standard errors of mean (SEM) of each sample are calculated from normalized data.

Figure 4 shows the results obtained with human corneal, cutaneous, retinal and placental cell lines. The cells were incubated with ATP or BzATP for 15 minutes and the assay was then carried out. An increase in YO-PRO-1 uptake is observed with both ATP and BzATP.

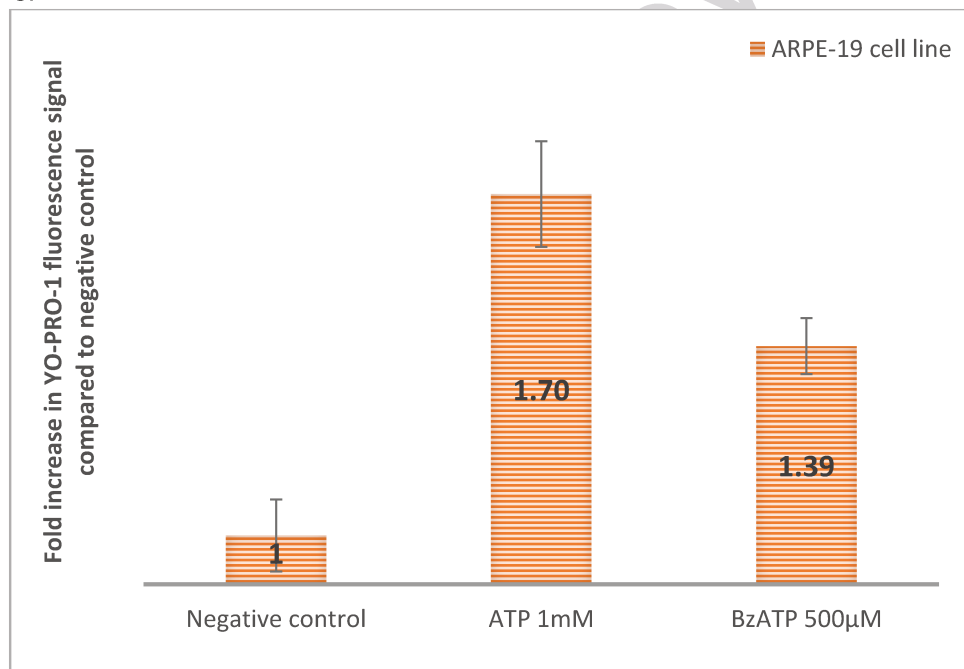
A.



B.



C.



D.

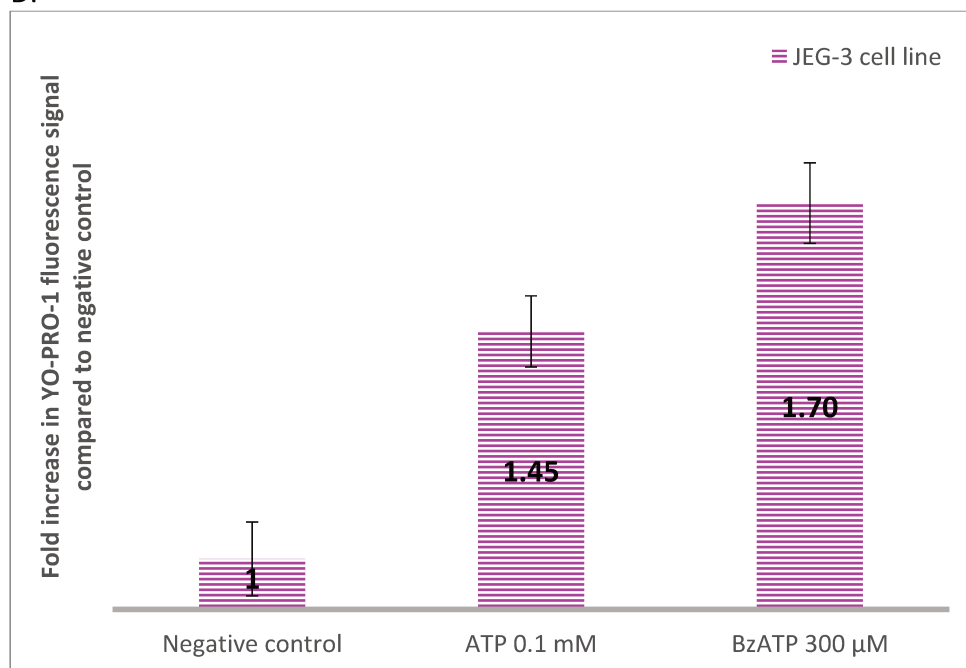


Figure 4. YO-PRO-1 uptake assay on human corneal cells (A, HCE), human cutaneous cells (B, HaCaT), human retinal cells (C, ARPE-19) and human placental cells (D, JEG-3). ATP and BzATP were incubated for 15 minutes then the assay was carried out.

In Figure 4A, when HCE cells are incubated with ATP 3 mM and BzATP 150 μM, we respectively observe 1.22-fold and 1.38-fold increases in YO-PRO-1 uptake, compared to negative control (arbitrary fixed to 1). In Figure 4B, ATP 10 mM and BzATP 500 μM respectively induce 1.45-fold and 1.65-fold increases in YO-PRO-1 uptake, compared to negative control, in HaCaT cells. In Figure 4C, a 1.45-fold increase in YO-PRO-1 uptake after ATP 10 mM and a 1.65-fold increase after BzATP 500 μM are observed in ARPE-19 cells. In Figure 4D, ATP 0.1 mM induced a 1.45-fold increase in YO-PRO-1 in JEG-3 cells compared to negative control, and BzATP 300 μM induced a 1.70-fold increase. It is important to know that some compounds may induce higher YO-PRO-1 intake than ATP and BzATP do [29,38].

The assay has to be performed on cells expressing P2X7 receptor; otherwise, negative results could be misinterpreted and the conclusions of YO-PRO-1 uptake assay would be false.

383 **Acknowledgements**

384 Authors would like to thank Adebiopharm ER67 for their financial support.

385

For peer review only

REFERENCES

1. Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240: 31-304.
2. Sperlagh B, Vizi ES, Wirkner K, Illes P (2006) P2X7 receptors in the nervous system. *Prog Neurobiol* 78: 327-346.
3. Wiley JS, Sluyter R, Gu BJ, Stokes L, Fuller SJ (2011) The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens* 78: 321-332.
4. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272: 735-738.
5. Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, et al. (1999) Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 376: 127-138.
6. Zhao H, Zhang X, Dai Z, Feng Y, Li Q, et al. (2016) P2X7 Receptor Suppression Preserves Blood-Brain Barrier through Inhibiting RhoA Activation after Experimental Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Sci Rep* 6: 23286.
7. Giannuzzo A, Pedersen SF, Novak I (2015) The P2X7 receptor regulates cell survival, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Mol Cancer* 14: 203.
8. Barros-Barbosa AR, Lobo MG, Ferreirinha F, Correia-de-Sa P, Cordeiro JM (2015) P2X7 receptor activation downmodulates Na(+)-dependent high-affinity GABA and glutamate transport into rat brain cortex synaptosomes. *Neuroscience* 306: 74-90.
9. Roger S, Pelegrin P, Surprenant A (2008) Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *J Neurosci* 28: 6393-6401.
10. Verhoef PA, Estacion M, Schilling W, Dubyak GR (2003) P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J Immunol* 170: 5728-5738.
11. Delarasse C, Gonnord P, Galante M, Auger R, Daniel H, et al. (2009) Neural progenitor cell death is induced by extracellular ATP via ligation of P2X7 receptor. *J Neurochem* 109: 846-857.
12. Sugiyama T, Oku H, Shibata M, Fukuhara M, Yoshida H, et al. (2010) Involvement of P2X7 receptors in the hypoxia-induced death of rat retinal neurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 3236-3243.
13. Zhang X, Zhang M, Laties AM, Mitchell CH (2005) Stimulation of P2X7 receptors elevates Ca²⁺ and kills retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 2183-2191.
14. North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013-1067.
15. Miller CM, Boulter NR, Fuller SJ, Zakrzewski AM, Lees MP, et al. (2011) The role of the P2X(7) receptor in infectious diseases. *PLoS Pathog* 7: e1002212.
16. Correa G, de ALC, Fernandes-Santos C, Gandini M, Petitinga Paiva F, et al. (2016) The purinergic receptor P2X7 role in control of Dengue virus-2 infection and cytokine/chemokine production in infected human monocytes. *Immunobiology*.
17. Mortaz E, Adcock IM, Shafei H, Masjedi MR, Folkerts G (2012) Role of P2X7 Receptors in Release of IL-1beta: A Possible Mediator of Pulmonary Inflammation. *Tanaffos* 11: 6-11.
18. Portales-Cervantes L, Nino-Moreno P, Doniz-Padilla L, Baranda-Candido L, Garcia-Hernandez M, et al. (2010) Expression and function of the P2X(7) purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 71: 818-825.
19. Sanz JM, Falzoni S, Rizzo R, Cipollone F, Zuliani G, et al. (2014) Possible protective role of the 489C>T P2X7R polymorphism in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 60: 117-119.
20. Sorge RE, Trang T, Dorfman R, Smith SB, Beggs S, et al. (2012) Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med* 18: 595-599.
21. Agrawal A, Gartland A (2015) P2X7 receptors: role in bone cell formation and function. *J Mol Endocrinol* 54: R75-88.

22. Liu Z, Liu Y, Xu L, An H, Chang Y, et al. (2015) P2X7 receptor predicts postoperative cancer-specific survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 106: 1224-1231.
23. Petrou S, Ugur M, Drummond RM, Singer JJ, Walsh JV, Jr. (1997) P2X7 purinoceptor expression in *Xenopus* oocytes is not sufficient to produce a pore-forming P2Z-like phenotype. *FEBS Lett* 411: 339-345.
24. Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA, et al. (1998) Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. *FEBS Lett* 439: 26-30.
25. Hibell AD, Kidd EJ, Chessell IP, Humphrey PP, Michel AD (2000) Apparent species differences in the kinetic properties of P2X(7) receptors. *Br J Pharmacol* 130: 167-173.
26. Aga M, Johnson CJ, Hart AP, Guadarrama AG, Suresh M, et al. (2002) Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7). *J Leukoc Biol* 72: 222-232.
27. Narcisse L, Scemes E, Zhao Y, Lee SC, Brosnan CF (2005) The cytokine IL-1beta transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 49: 245-258.
28. Dutot M, Pouzaud F, Larosche I, Brignole-Baudouin F, Warnet JM, et al. (2006) Fluoroquinolone eye drop-induced cytotoxicity: role of preservative in P2X7 cell death receptor activation and apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 2812-2819.
29. Dutot M, Warnet JM, Baudouin C, Rat P (2008) Cytotoxicity of contact lens multipurpose solutions: role of oxidative stress, mitochondrial activity and P2X7 cell death receptor activation. *Eur J Pharm Sci* 33: 138-145.
30. Dutot M, Liang H, Pauloin T, Brignole-Baudouin F, Baudouin C, et al. (2008) Effects of toxic cellular stresses and divalent cations on the human P2X7 cell death receptor. *Mol Vis* 14: 889-897.
31. Said T, Dutot M, Christon R, Beaudeau JL, Martin C, et al. (2007) Benefits and side effects of different vegetable oil vectors on apoptosis, oxidative stress, and P2X7 cell death receptor activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 5000-5006.
32. Dutot M, Paillet H, Chaumeil C, Warnet JM, Rat P (2009) Severe ocular infections with contact lens: role of multipurpose solutions. *Eye (Lond)* 23: 470-476.
33. Pauloin T, Dutot M, Warnet JM, Rat P (2008) In vitro modulation of preservative toxicity: high molecular weight hyaluronan decreases apoptosis and oxidative stress induced by benzalkonium chloride. *Eur J Pharm Sci* 34: 263-273.
34. Pauloin T, Dutot M, Liang H, Chavinier E, Warnet JM, et al. (2009) Corneal protection with high-molecular-weight hyaluronan against in vitro and in vivo sodium lauryl sulfate-induced toxic effects. *Cornea* 28: 1032-1041.
35. Sigward E, Mignet N, Rat P, Dutot M, Muhamed S, et al. (2013) Formulation and cytotoxicity evaluation of new self-emulsifying multiple W/O/W nanoemulsions. *Int J Nanomedicine* 8: 611-625.
36. Massicot F, Hache G, David L, Chen D, Leuxe C, et al. (2013) P2X7 Cell Death Receptor Activation and Mitochondrial Impairment in Oxaliplatin-Induced Apoptosis and Neuronal Injury: Cellular Mechanisms and Approach. *PLoS One* 8: e66830.
37. Wakx A, Regazzetti A, Dargere D, Auzeil N, Gil S, et al. (2016) New in vitro biomarkers to detect toxicity in human placental cells: The example of benzo[A]pyrene. *Toxicol In Vitro* 32: 76-85.
38. Wakx A, Dutot M, Massicot F, Mascarelli F, Limb GA, et al. (2015) Amyloid beta Peptide Induces Apoptosis Through P2X7 Cell Death Receptor in Retinal Cells: Modulation by Marine Omega-3 Fatty Acid DHA and EPA. *Appl Biochem Biotechnol*.
39. Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Leguillier T, Dargere D, et al. (2016) P2X7-Pannexin-1 and amyloid beta-induced oxysterol input in human retinal cell: Role in age-related macular degeneration? *Biochimie*.

- 480 40. Repetto G, del Peso A, Zurita JL (2008) Neutral red uptake assay for the estimation of cell
481 viability/cytotoxicity. Nat Protoc 3: 1125-1131.
- 482 41. Jiang LH (2009) Inhibition of P2X(7) receptors by divalent cations: old action and new insight. Eur
483 Biophys J 38: 339-346.
- 484 42. Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A (1997) Effects of divalent cations, protons and
485 calmidazolium at the rat P2X7 receptor. Neuropharmacology 36: 1285-1294.

486

487

For peer review only

Annexe B :

Article 5

Zeng N, Mignet N, Dumortier G, **Olivier E**, Seguin J, Maury M, Scherman D, Rat P, Boudy V.

Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line.

International journal of pharmaceutics Nov 30;495(2):1028-37



Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line



Ni Zeng^{a,b}, Nathalie Mignet^a, Gilles Dumortier^a, Elodie Olivier^c, Johanne Seguin^a, Marc Maury^b, Daniel Scherman^a, Patrice Rat^c, Vincent Boudy^{a,d,*}

^a CNRS UMR 8258—Inserm U1022, Paris Descartes University, Chimie-Paris Tech, 4, avenue de l'observatoire, F-75006 Paris, France

^b Unither Pharmaceuticals—Unither Développement Bordeaux, ZA Tech Espace, Av. Toussaint Catros, F-33185 Le Haillan, France

^c UMR 8638CNRS COMETE, Paris Descartes University, 4, avenue de l'observatoire, F-75006 Paris, France

^d Mise au point galénique, Agence Générale des Equipements et des Produits de Santé (AGEPS), AP-HP, 7, rue du fer à moulin, F-75005 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 August 2015

Received in revised form 18 September 2015

Accepted 19 September 2015

Available online 25 September 2015

Keywords:

Pluronic

Xanthan gum

Buccal tolerance

Necrosis

Apoptosis

Digital holographic microscopy

ABSTRACT

A salbutamol sulfate (SS)-Poloxamer bioadhesive hydrogel specially developed for buccal administration was investigated by studying interactions with TR146 human buccal epithelium cells (i.e. cellular toxicity (i) and trans-epithelial SS diffusion (ii)). The assessment of cell viability (MTT, Alamar Blue), membrane integrity (Neutral Red), and apoptosis assay (Hoechst 33342), were performed and associated to Digital Holographic Microscopy analysis. After the treatment of 2 h, SS solution induced drastic cellular alterations that were prevented by hydrogels in relation with the concentrations of poloxamer and xanthan gum. The formulation containing P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.1% showed the best tolerance after single and multiple administrations and significantly reduced the trans-epithelial permeability from $5.00 \pm 0.29 (\times 10^3)$ (SS solution) to 1.83 ± 0.22 cm/h. Digital Holographic Microscopy images in good agreement with the viability data confirmed the great interest of this direct technique. In conclusion, the proposed hydrogels represent a safe and efficient buccal drug delivery platform.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

By avoiding hepatic first pass metabolism and the possible enzymatic or acid degradation of drugs in the gastrointestinal tract, the buccal mucosa represents an attractive site for both systemic and local treatment. Accordingly, the delivery of drugs to the oral cavity has attracted particular attention, due to improved patient compliance as compared to parenteral administration by injection or to oral administration, especially in pediatric and geriatric applications (Campisi et al., 2010; Zhang et al., 2002). Besides, the formulations can be removed easily if therapy is required to be discontinued.

In our previous study (Zeng et al., 2014), a series of thermosensitive hydrogels have been developed for the buccal delivery of salbutamol sulfate (SS). As a short-acting *beta*-

2 adrenoceptor agonist, SS is widely used in the treatment of reactive airways diseases such as asthmatic disorders and chronic obstructive pulmonary diseases (COPD). The hydrogels are based on a mixture of poloxamer analogs and xanthan gum, which present a synergy of thermosensitive and mucoadhesive properties. Poloxamers, are triblock copolymers of PEO-PPO-PEO (poly-ethyleneoxy-polypropyleneoxy-polyethyleneoxy), which self-assemble as micelles in solution (Trong et al., 2008). The gelation is a result of inter-micellar entanglement and organized packing when temperature increases (Dumortier et al., 2006). In our previous study, two water soluble poloxamers of different PEO/PPO ratios: P407, P188 were used to prepare the thermosensitive base. Satiexane (xanthan gum) was added to obtain suitable mechanical and mucoadhesive properties. The previous results showed that the combination of P407, P188 and xanthan gum provided not only an optimal sol-gel transition temperature, but also an increased gel strength, which sustained drug release, thus providing potential useful clinic interests.

Although many physiological factors like saliva secretion, local and systemic immune systems can protect the buccal mucosa

* Corresponding author at: Mise au point galénique, Agence Générale des Equipements et des Produits de Santé (AGEPS), AP-HP, 7, rue du fer à moulin, F-75005 Paris, France. Fax: +33 146691487.

E-mail address: vincent.boudy@eps.aphp.fr (V. Boudy).

from infections and damage (Challacombe et al., 2015), an acidic substance may cause irritation effect (Bottenberg et al., 1991). As already mentioned in our precedent article (Zeng et al., 2014), the developed formulations are acidified to a pH value of 3.5 in order to maintain the chemical stability of the salbutamol molecule (Mälkki-Laine et al., 1995) and they are intended to contact the buccal epithelium for hours although with a small volume of 300 μ L. Consequently, the local toxicity and irritation evaluation of formulations become an unavoidable issue. Generally, epithelial cell line culture represents a valuable tool for fast and reproducible screening of drug permeability and toxicity, which is widely accepted in industrial pharmaceutical research, e.g., the cell line Caco-2 as a model for intestinal epithelium and the cell line MDCK as a model for kidney epithelial transport mechanisms. The use of human buccal epithelium cell line TR146 has been developed for almost 20 years (Jacobsen et al., 1995). This is a human buccal tumor cell line isolated from neck metastasis. Based on the TR146 cell model, five cytotoxicity assays have been carried out: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, Alamar Blue assay, Neutral Red, Hoechst 33342/Propidium Iodide stain and Digital Holographic Microscopy (DHM). The first four assays concern classical and widely used tests, which measure the cell viability or cell apoptosis (Hoechst 33342). The last technique, Digital Holographic Microscopy, is an emerging high resolution imaging technology that offers real time imaging and quantitative measurements of physiological parameters without any staining or labeling of cells, and recently Kühn et al. demonstrated its capability for cytotoxicity investigation (Kühn et al., 2013).

The main aim of our present study was to investigate the local tolerance of Poloxamer based hydrogels with and without acidic drug. In terms of assessment technique, depending on the assay's mechanism and the test compounds, some assays might be more suitable and sensible than others. In this context, another aim of this study was to assess the sensibility of the various assays mentioned above; this also allowed interpreting the results in a complete and reliable way. At the same time, the interest of DHM technique for cytotoxicity evaluation was also substantiated. Finally, the SS trans-epithelial diffusion assessment using filter-grown TR146 stratified cell layers was performed.

2. Methods

2.1. Materials

All the hydrogels were prepared using sterile water Versylene[®] purchased from Fresenius Kabi France (Sèvres, France). Salbutamol sulfate of European Pharmacopoeia grade (molecular weight 576.7) was purchased from Farmalabor SRL (Canosa di Puglia, Italy). Kolliphor[®] P407 and Kolliphor[®] P188 of pharmaceutical use grade were generously offered by BASF (Ludwigshafen, Germany). Satiexane[®] UCX930 (xanthan gum) was obtained for free from Cargill France (Saint-Germain-en-Laye, France). Sulfuric acid (H₂SO₄) of analytical grade was obtained from VWR International (Fontenay-sous-bois, France).

The cell culture medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose 4.5 g/L, GlutaMAX[™] supplement and pyruvate, was provided by Life Technologies (Saint Aubin, France). Fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, Trypsin-EDTA 0.25%, Hank's balanced salt solution (HBSS) and the PBS (phosphate buffered saline) Gibco[®] tablets were also obtained from Life Technologies (Saint Aubin, France). The reagents MTT, Alamar Blue, Triton[®] X100 and DMSO were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Neutral Red dye was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Hoechst 33342 was provided by Life Technologies (Saint Aubin, France), and Propidium Iodide by

Interchim (Montluçon, France). Isopropanol and HCl 1N were obtained from Carlo-ERBA Reagents (Val de Reuil, France).

2.2. Preparation of the poloxamer based hydrogels

Four optimal formulations based on P407, P188 and Satiexane have been preselected because of their thermogelation, mechanical and sustained drug release properties (Zeng et al., 2014) (Table 1). The indicated formulation codes were the same in the previous publication. Concentrations of all the components reported here are expressed as weight/volume percentage (% w/v). The Satiexane (0.05–0.1%) solution was first prepared by dispersing the required amount in a certain volume of sterile water, stirring continuously until complete dissolution. Then the required amount of P407 and P188 were added to the already swollen Satiexane solution. The preparations were left at 4 °C until clear solutions were obtained. Then they were gently homogenized with magnetic stirrers. Sterile water was added to adjust the volume to the total amount when necessary. For the preparations containing active ingredient, SS was added and dissolved last at a concentration of 0.2% (w/v), then the clear and homogeneous preparations were adjusted to a pH value between 3.0 and 3.5 by 0.4M sulfate acid (Mälkki-Laine et al., 1995). Solution of SS at the same concentration was also prepared and acidified, it served as a control sample to be compared to the hydrogel formulations. All the samples were stored in a refrigerator at 4 °C for further study.

2.3. Human buccal epithelium cell line culture

TR146 cells were used as testing model in cytotoxicity and trans-epithelial evaluations, because they form undifferentiated, non-keratinized stratified epithelium, sharing many morphological and functional characteristics of normal human buccal mucosa. Previous investigations indicated specific differentiation markers in TR146 cells, in particular, the expression of K4, K10, K13, K16, and K19 keratins, plasma membrane-associated transglutaminase, involucrin and epidermal growth factor receptor, which demonstrated similarities to normal human buccal epithelium (Jacobsen et al., 1999). Besides, activity of aminopeptidase, carboxypeptidase and esterase has also been studied and shown to be comparable with that of human buccal epithelium (Mørck Nielsen and Rømer Rassing, 2000). The cell line is therefore not only a useful model for absorption studies, but also for metabolic studies with enzymatically labile drugs. Furthermore, various toxicity assays (MTS/PMS, Neutral Red, ATP quantitation, LDH and extracellular protein) have been carried out using proliferating TR146 cells and stratified TR146 epithelium (Eirheim et al., 2004).

TR146 cell line was purchased from Cancer Research Technology (London, UK). Since the information on the passage number was not available from the supplier, the obtained passage was designated number one. The culture medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose 4.5 g/L, GlutaMAX[™] supplement and pyruvate. 10% (V/V) fetal bovine serum (FBS) and 1% (V/V) penicillin and streptomycin were

Table 1
Composition of 0.2% salbutamol sulfate formulations (pH 3.0–3.5).

Formulation Code	P407 (%, w/v)	P188 (%, w/v)	Satiexane [®] (%, w/v)
F8	18	1	0.05
F9	18	1	0.1
F15	19	1	0.05
F16	19	1	0.1

P407: Kolliphor[®] P407; P188: Kolliphor[®] P188; Satiexane[®]: Xanthan gum.

also supplemented. The TR146 cells were maintained in 75 cm² T-flasks and incubated at 37 °C in a 98% relative humidity atmosphere of 5% CO₂/95% air. The culture medium was changed twice a week. At approx. 70–80% confluence, cells were detached from culture flasks (75 cm²) by Trypsin-EDTA 0.25% Gibco[®] purchased from Life Technologies (Saint Aubin, France). Then the cell dilutions were prepared and seeded in the culture plates and inserts regarding the objectives of the study. The flasks (75 cm²) for cell culture, 6-well and 96-well culture plates were purchased from TPP (Trasadingen, Switzerland).

2.4. Cytotoxicity study

The cytotoxicity study was carried out on the proliferating cells. After detachment from the culture flask with trypsin, the cells were suspended and seeded in the 96-well plates with a concentration of 100,000 cells/mL, 200 µL/well. The same cell concentration was adopted in the 6-well plates but with 2 mL per well. After 22–24 h culture, the cell layer was well formed and ready to be used.

2.4.1. Single treatment

In the single treatment, the same cells were exposed to the sample for one single time and the exposure took 2 h at 37 °C. In the 96-well plates, five formulations containing SS with a pH value around 3.5 were applied on the cells at seven different volumes (20–100 µL), they are: SS solution, F8 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F9 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.1%), F15 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F16 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.1%). The “vehicle” formulations without SS having a pH around 6.8 were also tested. After the sample placement, the preheated culture medium (100 µL) at 37 °C was carefully added at the surface of sample in order to create a biological environment. Then the 2 h-incubation began. For each sample, at least three different wells were used for each volume. The culture medium was used as negative control, while Triton X100 0.1% was used as a positive control which could cause cell necrosis. In order to investigate the effect of P407 concentration (17–21%), the same protocol was applied for Poloxamer 407 alone, and three volumes were tested: 25, 50, 100 µL. In the case of 6-well plate in DHM assay, the tested volume of each formulation was set to 1 mL considering the well's surface, and without culture medium at the gel's surface. After exposure to the samples, cells were washed twice with HBSS for further measurements, which are described in the following texts.

2.4.1.1. Cell mitochondrial activity assessment: MTT. The MTT assay which depends on cell mitochondrial activity is an index of intrinsic cytotoxicity (Hamid et al., 2004). For viable cells, mitochondrial succinic dehydrogenase is able to transform the tetrazolium salt to an insoluble purple formazan (Fotakis and Timbrell, 2006). After the hydrogel treatment in the 96-well plates, 100 µL of the MTT reagent (0.5 mg/mL prepared in culture medium) was added in each well and the plates were incubated for 3 h. Then the reagent was carefully removed. A volume of 100 µL lysis buffer (10 g Triton X100, 10 mL HCl 1N, qsp 100 mL isopropanol) were added in each well to dissolve the formazan. After 10–15 min agitation on an orbital shaker, the absorbance at 562 nm was read on a Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter microplate reader provide by Perkin Elmer/Wallac (Massachusetts, US). Cell viability (%), $n=3-6$ different and independent wells for the same experiment) is the ratio of the values of the cells treated with formulations and the values of the control.

2.4.1.2. Cell metabolic activity assessment: Alamar Blue. Alamar Blue assay is well known as an indicator of cell metabolic state

and cell viability in cytotoxicity assessment (Rampersad, 2012). In viable cells, the Alamar Blue reagent (resazurin), blue, non-fluorescent, is believed to be reduced to a pink fluorescent dye by many reductases such as NADPH, FADH, FMNH, NADH, as well as the cytochromes located not only in mitochondria, but also in cytoplasm, however the site where the reaction occurs exactly remains unknown (O'Brien et al., 2000). The Alamar Blue solution at 0.1 mg/mL was previously diluted by 1:10 in culture medium. After the single treatment in the 96-well plates, each well was incubated with 200 µL Alamar Blue reagent for 6 h at 37 °C. The fluorescence ($\lambda_{ex}=535$ nm, $\lambda_{em}=600$ nm) was then measured directly with the micro-plate reader Safire (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) in accordance with the validated protocol (Dutot et al., 2008). Cell viability (%), $n=6-9$ different and independent wells for the same experiment) is the ratio between the values observed with the formulation-treated cells versus control cells.

2.4.1.3. Cell membrane integrity assessment: Neutral Red. Cell membrane integrity was evaluated using Neutral Red dye (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) (Weyermann et al., 2005). The concentrated Neutral Red of 0.4% was first diluted in cell culture medium with a ratio of 1:79, to give a final reagent concentration of 50 µg/mL. After a centrifugation of 10 min to eliminate the aggregate, Neutral Red was distributed by 200 µL/well in the plates for an incubation about 3 h at 37 °C. Then the reagent was removed and the cells were washed once with PBS. A volume of 100 µL lysis solution based on acetic acid and ethanol was then added in each well in order to extract the dye from the cells. The 96-well plates were agitated by a microplate shaker for 20 min to obtain a homogeneous dyeing solution in each well. The fluorescence ($\lambda_{ex}=540$ nm, $\lambda_{em}=600$ nm) was then measured with the micro-plate reader Safire (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) according to the validated protocol (Dutot et al., 2010). The membrane integrity (%), $n=3-6$ different and independent wells for the same experiment) is expressed as the ratio of the values of the cells treated with formulations and the values of the control.

2.4.1.4. Cell apoptosis assessment by chromatin condensation: Hoechst 33342. The probe Hoechst 33342 was used to distinguish condensed pycnotic nuclei in apoptotic cells, in combination with Propidium Iodide (Belloc et al., 1994) which penetrates faster in the dead cells resulting from necrotic process. Hoechst 33342 emits blue fluorescence when it fixes to dsDNA. A 10 µg/mL Hoechst 33342 solution was previously prepared in PBS with 0.05 mg/mL iodide propidium. After the treatment, 200 µL reagent solution was distributed in each well. The plates were kept in the dark for 30 min at room temperature (20 °C). Then the fluorescence ($\lambda_{ex}=360$ nm, $\lambda_{em}=450$ nm) was measured in the micro-plate reader Safire (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) according to the protocol (Dutot et al., 2006; Rat et al., 1994). The results ($n=6-9$ different and independent wells for the same experiment) were expressed as a ratio of Hoechst/Alamar Blue fluorescence absorbance.

2.4.1.5. Cell morphology assessment using digital holographic microscopy. The cell morphology observation was carried out with a label-free technique using the digital holographic microscopy (DHM) (HoloMonitor M3, Phase Holographic Imaging AB, PHIAB, Lund, Sweden) equipped with a 20× microscope objective (Olympus, Japan) and also a 10× optical objective (Nikon, Japan). The images were recorded in a six-well plate format.

2.4.2. Repeated treatment

For the repeated treatment, the cells were incubated with the four acidified formulations containing SS for 2 h in the morning and 2 h in the afternoon during two days. Between each treatment, the cells were washed twice with HBSS and immediately incubated with culture medium at 37 °C. In this study, MTT was chosen as the cytotoxicity assay. The formulations were tested in various volumes: 25, 50, 100 µL. Each volume was tested in six different wells.

2.5. Drug trans-epithelial diffusion study

The drug trans-epithelial permeation study was performed on the stratified epithelium formed by TR146 cells (Jacobsen et al., 1999). The SS solution and the four formulations were tested. The Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts (pore diameter 0.4 µm, growth area 1.12 cm²) which were purchased from Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), were used to culture TR146 cells for 28–30 days (Nielsen and Rassing, 1999). The apical side and basolateral side were filled with 0.5 and 1.5 mL culture medium. And the culture medium was changed twice a week. On the day of study, the culture medium was removed. A volume of 200 µL hydrogel was first placed in the insert, then supplemented with 200 µL preheated culture medium at surface. This was considered as the donor part. The receptor part consisted of 1.5 mL PBS. Six sampling of 100 µL from the receptor media were carried out at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 h. Before each sampling, the plate was shaken for about 1 min. After the sampling, 100 µL of fresh PBS were added in the receptor side. It has to be mentioned that the “sink” conditions were supposed to be achieved because of the high hydrosolubility of SS which is 261.6 mg/mL at pH 7.4 (Imboden and Imanidis, 1999), and the replacement of fresh medium after each sampling. The permeation experiments were carried out in triplicate. The amount of SS in each sample was calculated according to the standard curve established at 274 nm using a spectrophotometry. The flux (F) (µg/(cm² × h)) and apparent permeability coefficient (P_{app}) (cm/h) were also calculated.

$$F = \frac{dQ}{dt \times A} \quad (1)$$

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt \times A \times C_0} \quad (2)$$

where dQ/dt is the rate of drug permeation, A is the insert area, and C_0 is the initial drug concentration in the donor media.

At the end of this study, the inserts were washed twice with HBSS, the MTT viability assay was carried out in order to investigate the cell's functional state after the permeation assay (De Caro et al., 2008). The inserts incubated with culture medium for 4 h were used as negative control ($n=3$). The same protocol as described in Section 2.4.1.1 was applied.

2.6. Image and statistical analysis

The optical and DHM images were analysed ($n=30$ –50 cells) using Image J®. The significance between cell viability values was analyzed compared to the negative control using one way ANOVA approach and Dunnett's Test ($p < 0.05$) (Statview 5, SAS Institute, Cary, NC, USA). The relation between sample volume and cell viability was evaluated by Spearman test, the correlation coefficient ρ indicated the correlation strength (values between 0 and 1). When the absolute value of ρ was found between 0.5 and 1, correlation was considered strong; if between 0 and 0.5, the correlation was weak.

3. Results

3.1. Single treatment: cell viability and apoptosis

For the hydrogel formulations without SS which presented a pH value about 6.8, none of the assays showed that the hydrogels based on Poloxamer and Satiexane had an impact on the cell viability, which remained above 80%. In the MTT assay (Fig. 1A), it was demonstrated that increasing gel volume had not effect on cell viability. Especially for F15 and F16, the viability values were not significantly different from negative control ($p > 0.05$). For F8 and F9, except those of 20 and 30 µL, the viability values were not significantly impacted ($p > 0.05$).

However, in the Alamar Blue assays (Fig. 1B), the cell viability increased with the gel volume, reaching a significantly higher percentage as compared to the negative control, in particular for the high volumes (80 and 100 µL) ($p < 0.05$). A similar trend was observed with the Neutral Red assay (Fig. 1C). The cell viability presented a positive correlation to the gel volume, in particular for F16 ($\rho = 0.772$, $p = 0.0002$). It has to be mentioned that none of the test reagent showed a positive interaction with Poloxamer

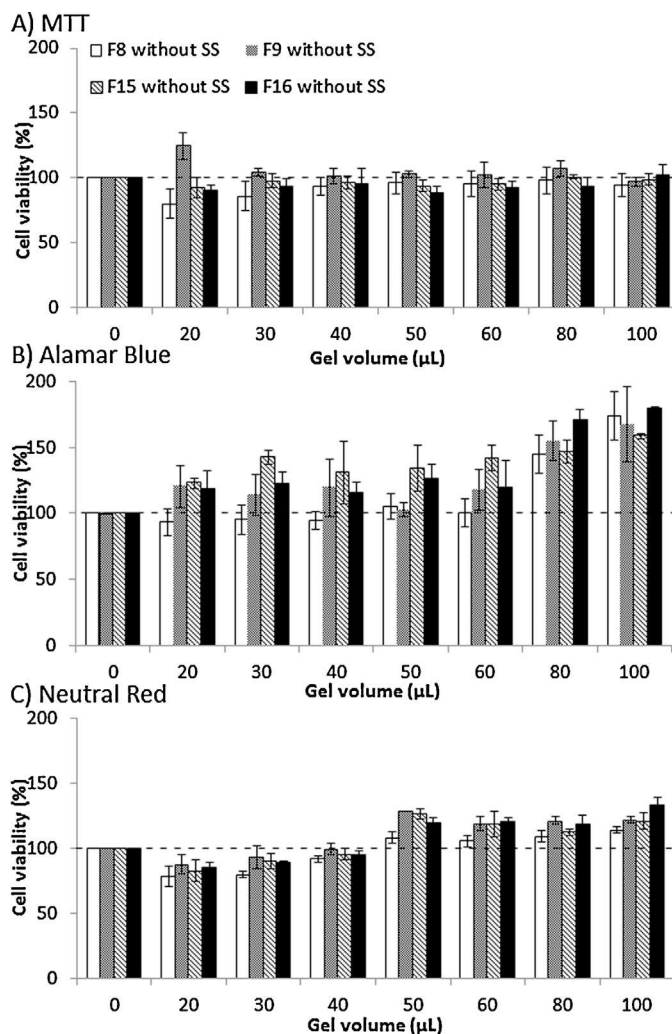


Fig. 1. Cell viability after exposure of “vehicle” formulations F8 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F9 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.1%), F15 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F16 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%) for 2 h, measured by different assays: (A) MTT assay ($n=3$ –6 different and independent wells). (B) Alamar Blue assay ($n=6$ –9 different and independent wells). (C) Neutral Red ($n=3$ –6 different and independent wells).

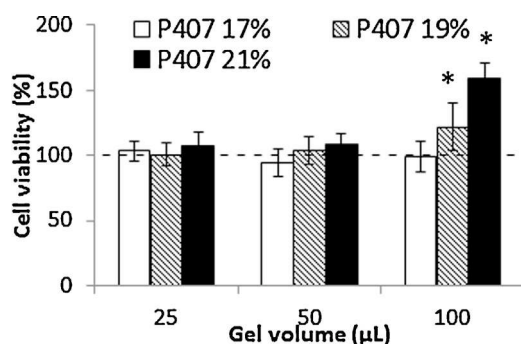


Fig. 2. Alamar Blue cell viability assessment ($n=6-9$ different and independent wells) after exposure of P407 alone hydrogels: concentration effect. * $p < 0.05$ versus negative control.

molecules which could potentially cause a false measurement, this was confirmed in our preliminary verification.

In order to verify or confirm the cell viability protecting effect of P407 which is the major content in the hydrogel, the influence of P407 concentration was evaluated at 17–21% by Alamar Blue assay (Fig. 2) because it seemed more sensitive to detect the cell viability enhancement effect. Using a volume of 100 μL , the percentages of viable cells at 19 and 21% significantly increased as compared to P407 17% and to the control ($p < 0.05$). These results demonstrated that P407 at the concentration range of 17–21% had not toxic effect. Besides, our results confirmed the viability enhancement owing to P407, which had been also observed in the work of Exner et al. (2005).

Concerning the acidified formulations, first, the SS solution at pH 3.5 induced a significant reduction of viability when its volume increased, which was in both MTT and Alamar Blue assays (Fig. 3), and there was a high correlation between the tested volume and cell viability ($\rho = -0.715$ for MTT, -0.906 for Alamar Blue, $p < 0.0001$). The lowest cell viability values were $37.6\% \pm 2.2\%$ in MTT, $35.2\% \pm 4.3\%$ in Alamar Blue for the volume 100 μL . While the positive control (Triton X100 treatment) gave a viability of $20.4 \pm 0.2\%$ in MTT assay and $7.4 \pm 0.2\%$ in Alamar Blue assay. This indicated that a necrosis phenomenon was involved when applying an SS acid solution on human buccal epithelium cells. Secondly, Fig. 4A and B showed that although acidified, the hydrogel formulations could more or less improve the cell viability as compared to the values observed with SS solution. As for the MTT results, F8 appeared most irritant with an IC_{50} between 30 and 40 μL and high volume impact ($\rho = -0.811$, $p < 0.0001$), while F16 containing more P407 and Satiexane had fewer effects on the

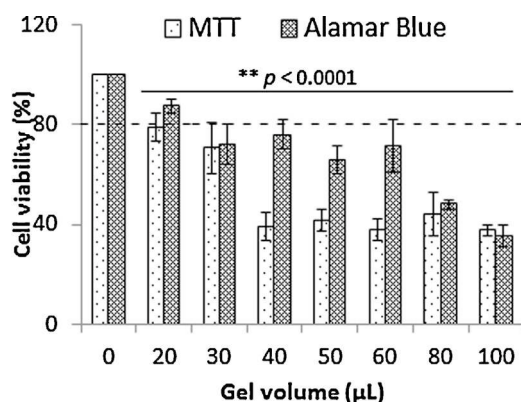


Fig. 3. Cell viability after exposure of Salbutamol sulfate solution at pH 3.5, measured by MTT assay ($n=3-6$ different and independent wells) and Alamar Blue assay ($n=6-9$ different and independent wells). ** $p < 0.0001$ versus negative control.

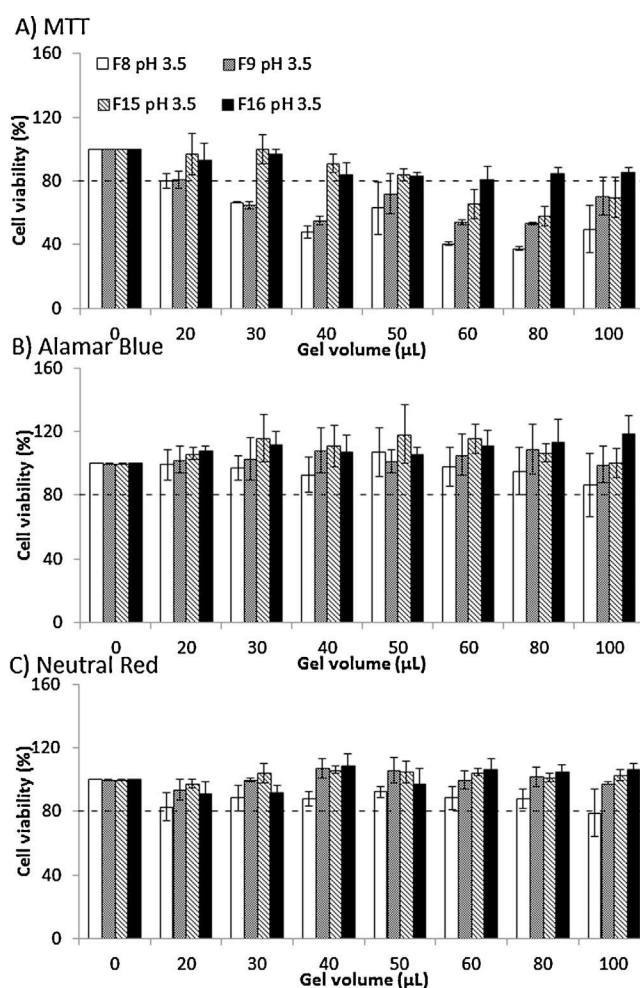


Fig. 4. Cell viability after exposure of acidified hydrogel formulations F8 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F9 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.1%), F15 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F16 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%) for 2 h, measured by different assays: (A) MTT assay ($n=3-6$ different and independent wells for each experiment). (B) Alamar Blue assay ($n=6-9$ different and independent wells). (C) Neutral Red ($n=3-6$ different and independent wells).

cell viability which was always around or above 80%, and with a lower correlation with the volume ($\rho = -0.499$, $p < 0.0001$). The Alamar Blue assay indicated no significant difference between formulations and negative control ($p < 0.05$). The viability and membrane integrity results showed that the hydrogels based on Poloxamer and Satiexane could limit the acid irritant effect and moderate buccal epithelial cell necrosis.

As to the apoptosis chromatin condensation assessment using Hoechst 33342 (Fig. 5), we found that SS solution exhibited high apoptosis ratios (Hoechst 33342/Alamar Blue) for all the tested volumes ($p < 0.0001$). The ratio values of acidified SS formulations were not significantly different from that of negative control, except the volume 100 μL of F8 and F9. Regarding formulations F15 and F16, no apoptosis was measured in spite of the increasing the gel volume ($p > 0.05$). If we consider all the results in the single treatment, formulations F15 and F16 containing more P407 could significantly decrease the necrosis and apoptosis of human buccal epithelial cells, which were induced by an SS acid solution.

3.2. Repeated treatment

Since there was no apparent cytotoxicity of the hydrogel formulations, the repeated exposure was carried out for the formulations containing SS. The MTT assay was chosen in this

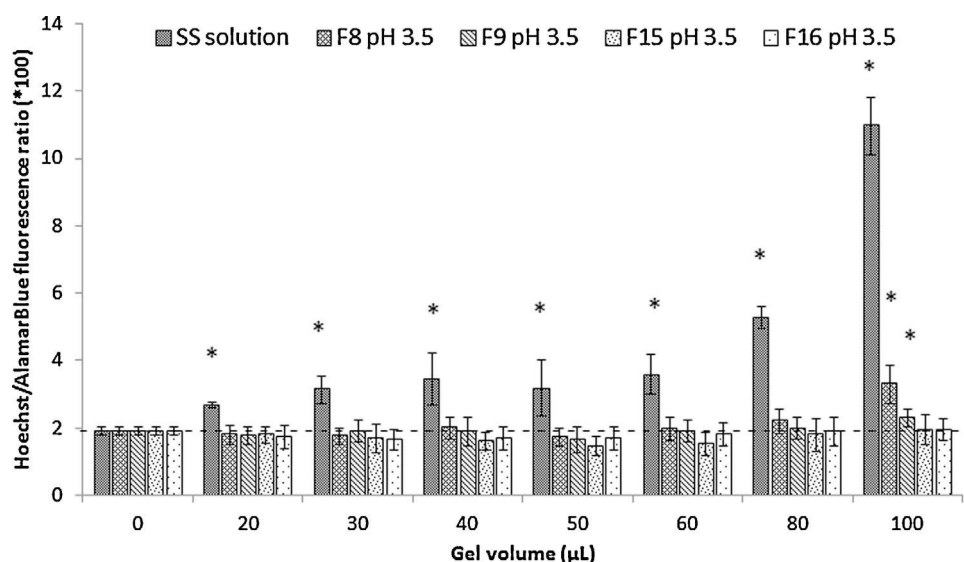


Fig. 5. Hoechst 33342/Propidium iodide apoptosis evaluation after exposure of SS solution and acidified hydrogel formulations F8 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F9 (P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.1%), F15 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%), F16 (P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%) for 2 h ($n=6-9$ different and independent wells).

study because of its sensibility to acidified formulations. The results of repeated treatment presented a good agreement with those of single treatment (Fig. 6). Furthermore, the advantage of F16 was here highlighted again. In particular for the lower volumes, F16 with more P407 and Satiexane showed the highest cell viability, while F8 led to the lowest viability.

3.3. Cell morphology assessment by DHM

The images (Fig. 7) obtained from optical microscopy and DHM acquisition suggested that this label-free technique, already used to analyse neurons and Hela cells (Kühn et al., 2013; Pavillon et al., 2012), also provides an interesting alternative to analyse TR146 human epithelial cells morphology. First, the optical images of negative control cells agreed with the images provided by HPA culture collection (<http://www.phe-culturecollections.org.uk/>, 2013), which shared many morphological similarities with normal human epithelial cell. In DHM images, living cells (negative control with cell culture medium) showed an enhanced signal, the contrast appeared higher, and the cell boundaries were neat and clear. While in the Triton treatment (positive toxicity control), the cells became smaller and less intense in the optical and also in the DHM images when compared to the negative control (Fig. 7 and Table 2). The area pixel values reduced from $3.53 \pm 1.48 (\times 10^3)$ to $0.68 \pm 0.17 (\times 10^3)$ and the intensity values reduced from $3.66 \pm 1.56 (\times 10^5)$ to $0.64 \pm 0.17 (\times 10^5)$ in optical images' analysis. While in the DHM images, the area values decreased from $1.42 \pm 0.82 (\times 10^3)$ to $0.50 \pm 0.12 (\times 10^3)$ ($p < 0.05$), the intensity values from $1.24 \pm 0.11 (\times 10^5)$ to $0.23 \pm 0.07 (\times 10^5)$ ($p < 0.05$). The latter suggested a significant change in cell thickness.

Concerning the SS solution pH 3.5, the cells changed form and lost area when compared to the negative control, and the boundary between cells was hard to be found, especially in the optical images, a cell morphological analysis seemed impossible. It has to be mentioned that the sulphuric acid solution gave the same observation (data not shown). As to the formulation treatment, F16 seemed to have the lowest effect on the cell's morphology, with the similar optical images and the comparable DHM signal intensity to those of living cells, $1.32 \pm 0.61 (\times 10^5)$ to $1.24 \pm 0.11 (\times 10^5)$ ($p > 0.05$). While F8 induced a significant difference on intensity values, $0.54 \pm 0.28 (\times 10^5)$ to $1.24 \pm 0.11 (\times 10^5)$ ($p < 0.05$). These microscopy morphology observations were in good agreement with the cell viability results.

3.4. Drug trans-epithelial permeation performance

The permeation profiles through Transwell® grown cells had a linear trend and no lag time for all the formulations

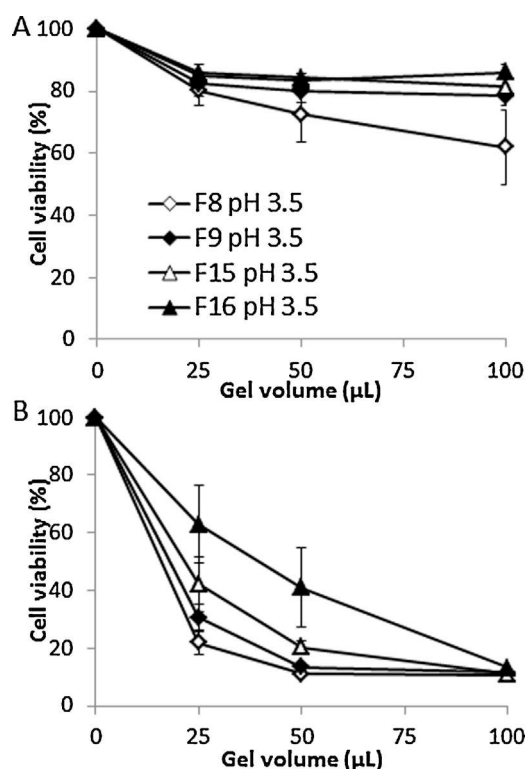


Fig. 6. Cell viability measured by MTT assay: (A) Single treatment of 2 h ($n=3-6$ different and independent wells). (B) Four repeated treatments ($n=3-6$ different and independent wells).

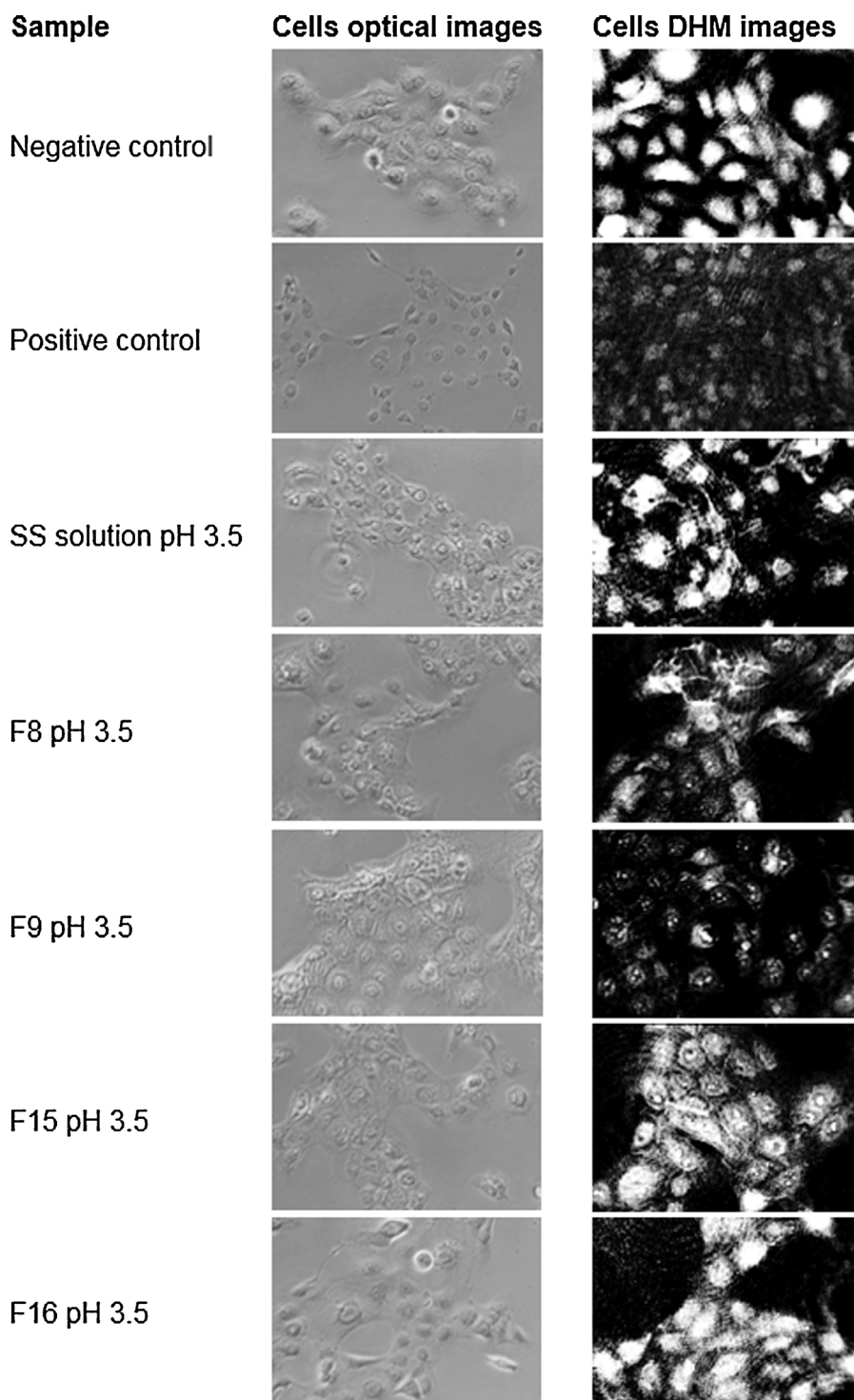


Fig. 7. Optical and DHM images of TR146 cell after different treatments. Negative control: cell culture medium; Positive control: Triton X100 0.1%; F8: P407 18%/P188 1% /Satiexane 0.05%; F9: P407 18%/P188 1% /Satiexane 0.1%; F15: P407 19%/P188 1% /Satiexane 0.05%; F16: P407 19%/P188 1% /Satiexane 0.1%.

(Fig. 8). This showed a fast absorption of SS through the buccal epithelium layers. Then the hydrogel formulations could significantly sustain the penetration of SS through the stratified TR146 cell layers. The flux reduced from 10.00 ± 0.58 for SS solution to $3.67 \pm 0.44 \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{h})$ for F16 (Table 3). This observation was in agreement with our previous in vitro dissolution results (Zeng et al., 2014). After four hours, almost 50% of SS molecules penetrated across the cell layers in the case of SS solution while 20% for the hydrogels. Although the gap

between the four hydrogel formulations were less important than that observed in in vitro release study, a significant difference between F8 and F16 was still observed. Besides, at the end of each experiment, the residual drug content in the donor compartment was also analyzed, the sum corresponded to the initial drug amount. In order to make sure that there was no permeability change related to the loss of cell viability and to guarantee the accuracy of this study, MTT assay was carried out at the end of the study. The results (Fig. S1) showed that there was no significant

Table 2Morphology parameters obtained from image analyses by Image J[®] (mean $\pm$ SD, $n = 30$ –50).

Formulation	Optical images		DHM images	
	Area ($\times 10^3$ pixels)	Intensity ($\times 10^5$)	Area ($\times 10^3$ pixels)	Intensity ($\times 10^5$)
Negative control	3.53 $\pm$ 1.48	3.66 $\pm$ 1.56	1.42 $\pm$ 0.82	1.24 $\pm$ 0.11
Positive control	0.68 $\pm$ 0.17	0.64 $\pm$ 0.17	0.50 $\pm$ 0.12	0.23 $\pm$ 0.07
SS solution	Not available	Not available	0.73 $\pm$ 0.20	0.77 $\pm$ 0.26
F8	3.73 $\pm$ 1.42	4.18 $\pm$ 1.58	1.19 $\pm$ 0.30	0.54 $\pm$ 0.28
F9	3.87 $\pm$ 1.32	4.08 $\pm$ 1.35	1.12 $\pm$ 0.43	0.36 $\pm$ 0.30
F15	3.45 $\pm$ 0.91	3.53 $\pm$ 0.89	1.18 $\pm$ 0.34	0.87 $\pm$ 0.38
F16	3.11 $\pm$ 0.96	3.41 $\pm$ 1.06	1.27 $\pm$ 0.41	1.32 $\pm$ 0.61

Negative control: Cell culture medium; Positive control: Triton X100 0.1%.

difference between the formulations and the negative control ($p < 0.05$).

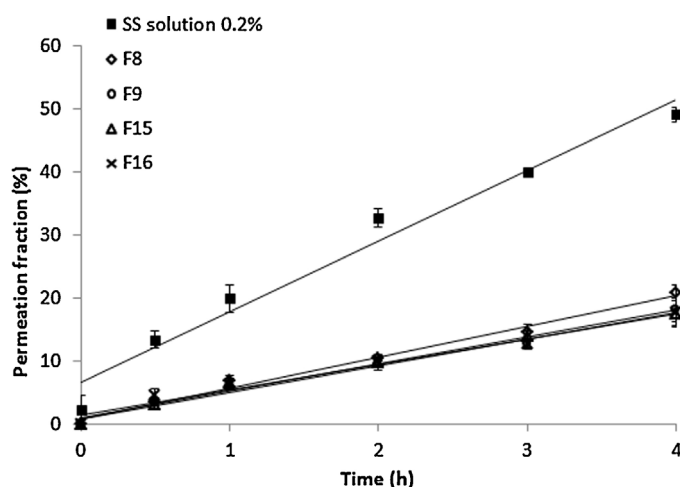


Fig. 8. Permeation of SS across Transwell[®] grown TR146 cell layers: Effect of hydrogel formulations ($n = 3$ different and independent inserts).

4. Discussion

The aim of this study was to investigate on an *in vitro* cellular model the buccal tolerance of our developed Poloxamer hydrogels, by using different methods in order to obtain a reliable and complete interpretation, and to evaluate the drug permeability through the cultured buccal epithelium cell stratified layers. As already discussed in many reviews and research works (Bernstein, 2008; Campisi et al., 2010; Hao and Heng, 2003; Madhav et al., 2009), buccal mucosa offers excellent opportunities for drug delivery system mainly owing to its avoidance of certain drug's degradations by oral route, and its patients' compliance. In order to facilitate the formulation administration and extend its local residence time, we have developed a synergy of *in situ* forming hydrogel and mucoadhesive polymer by mixing Poloxamer analogs P407 and P188, and Satiexane (xanthan gum). It is necessary to evaluate their local tolerance to buccal mucosa and also the drug

trans-epithelial permeation. This toxicological issue has to be assessed, especially for a dosage form which adheres to a biological surface. In the buccal drug delivery system, existing *in vitro* evaluation models include animal buccal tissues and cell cultures (Giannola et al., 2007; Kulkarni et al., 2010; Mashru et al., 2005; Oyama et al., 1999; Teubl et al., 2013). Difficulties in obtaining and conservation animal tissues led to use cell lines as an *in vitro* investigation model. In this context, TR146 cells, which share many biological properties similar to normal buccal epithelial cells, were applied in our study.

In terms of cytotoxicity method screening, the MTT assay seemed to be more sensitive in detecting loss of viability compared to the other tests. However, to evaluate of "vehicle" hydrogels, Alamar Blue and Neutral Red assays were more powerful to demonstrate the volume effect and formulation effect when it was supposed that Poloxamer hydrogels had a cell viability enhancement or protection effect. These observations confirmed the necessity to perform different assays to select the suitable methods. Depending on the cell death mechanism induced by a toxic compound, one method could be more or less sensitive (Fotakis and Timbrell, 2006; Weyermann et al., 2005). Even for MTT and Alamar Blue, the two assays which measured the cell metabolic activities, the results could be very different, because the responsible enzyme(s) are different in the two assays (Hamid et al., 2004; O'Brien et al., 2000). In order to prevent the false positive or negative results induced by enzyme activators or inhibitors, the Neutral Red assay, which estimated cell membrane integrity, provided an additional completing investigation tool. Regarding both Alamar Blue and Neutral Red results, we can confirm that the hydrogels based on Poloxamer 407 not only had no toxicity but even a protective effect. The same observation was discussed in the study of Exner et al. (2005). They suggested that the toxic effect of poloxamer is related to its value of hydrophilic-lipophilic balance (HLB). Generally, hydrophobic poloxamers which possess relatively longer PPO blocks, performed higher sensitization effect (Batrakova et al., 1999). The two Poloxamers used in our formulation P407 and P188 are hydrophilic poloxamers with relatively higher HLB values (22 for P407, 29 for P188). Furthermore, the study of Luo et al. (Luo et al., 2013) has shown that Poloxamer 188 could restore the mitochondrial and lysosomal membrane properties after an *in vitro* traumatic brain injury in cultured primary neurons. According to another study (Serbest et al., 2006), P188 significantly inhibits apoptosis and prevents necrosis. The level of concentration of Poloxamer is another factor which determines its toxic effect. Many studies have suggested that, due to their amphiphilic property, poloxamer copolymers incorporate into cell membranes and enhance drug cytotoxicity in MDR cells (Batrakova and Kabanov, 2008; Guo et al., 2007; Yan et al., 2010), but these effects seemed to be pronounced at a concentration below the critical micellization concentration (CMC), which suggests that the unimer molecules would be responsible for this "detergent-like" effect.

Table 3The flux and apparent permeability (P_{app}) of salbutamol across stratified TR146 cell layers (mean $\pm$ SD, $n = 3$).

Formulation	Flux ($\mu\text{g}/(\text{cm}^2 \times \text{h})$)	P_{app} ($\times 10^3$ cm/h)
SS solution 0.2%	10.00 $\pm$ 0.58	5.00 $\pm$ 0.29
F8 P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.05%	4.42 $\pm$ 0.27	2.21 $\pm$ 0.14
F9 P407 18%/P188 1%/Satiexane 0.1%	3.85 $\pm$ 0.46	1.92 $\pm$ 0.23
F15 P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.05%	3.82 $\pm$ 0.43	1.91 $\pm$ 0.22
F16 P407 19%/P188 1%/Satiexane 0.1%	3.67 $\pm$ 0.44	1.83 $\pm$ 0.22

In terms of formulation screening, none of the “vehicle” formulations showed any toxic effect, which suggested the developed hydrogels as a safe drug delivery platform for buccal applications. Besides, we observed that hydrogels could modulate cell necrosis and apoptosis induced by SS acidic solution. Both the single treatment and repeated treatment confirmed the advantage of F16, while F8 was shown less interesting because of its higher irritant effect. Additionally to the concentration effect of P407 as discussed above, another reason could be the different release behaviour of acid from the different hydrogel owing to the gel viscosity and mechanical properties enhanced by Satiaxane. We have previously shown that Salbutamol was released more slowly from F16 than from F8 (Zeng et al., 2014).

In our study, DHM examination of cell morphology was developed as a complementary technique to investigate cell viability, demonstrating its potential use in TR146 epithelial cell. To our knowledge, the DHM technique has been introduced in the biological field, in particular for cell morphological examinations, in the last decade (Marquet et al., 2005; Rappaz et al., 2005). According to the literature, this technique which does not require any labeling, staining or other cell treatment, can be used to identify and analyze cell death, which is related to cell volume changes (Kühn et al., 2013; Pavillon et al., 2012; Tóth et al., 2014). The DHM signal theoretically depends on both cell thickness and intracellular refractive index, the latter parameter being related to the intracellular content (Rappaz et al., 2005). Negative and positive controls provided extremely different morphology, and for some “toxic” formulations like F8 and F9, the cell signal and the image contrast were lower, while F16 showed the similar morphology to negative control both in optical and DHM images. The agreement with the cell viability results shows various advantages of the technique: less preparation time compared to cell staining assays, rapidity of detection, and robustness for formulation screening.

Concerning the permeability results, the linear-trend curves confirmed a passive diffusion process, which is considered as the main mechanism for buccal absorption (Rathbone and Tucker, 1993), and also the perfect sink conditions. Although stratified and integrated TR146 cell layers well formed after 28 days culture were supposed to be a significant barrier (Xue et al., 2012), the absence of any lag time phenomenon and the coherence of total drug calculation compared to the initial amount suggested two positive facts: (1) even administrated in viscous hydrogel forms, SS can be released from the formulations without delay: this rapid drug diffusion in the initial time was already observed in our previous *in vitro* release evaluations (Zeng et al., 2014); (2) after being released from hydrogel, SS molecules can rapidly penetrate across the buccal epithelial stratified cell layers without entrapment in the cells: this corresponded to a two-compartment model (Palumbo et al., 2008). These observations confirmed the rapid drug absorption via buccal mucosa owing to the optimal physicochemical properties of salbutamol sulfate. This allowed us to expect an optimal drug bioavailability and clinical interests with the mucoadhesive and sustained drug release formulations. Moreover, the flux and permeability results suggested that the drug absorption rate can be efficiently modulated by our hydrogel formulations, because the cell layer membrane seemed to have no limiting influence on SS permeability. Secondly, the absence of cytotoxicity detected at the end of the dual-chamber experiment confirmed that the drug and formulations caused no damage on buccal stratified epithelium and the results in this study were reliable owing to the maintenance of cell properties. It should be noted that the evaluation conditions were still derived from those *in vivo*, a pharmacokinetics study has been initiated in rabbits and the results are being treated.

5. Conclusion

The use of TR146 cell line is thought to be a good tool to evaluate both the buccal tolerance of our developed Poloxamers/Satiaxane hydrogels and the drug permeability. The absence of toxicity of “vehicle” Poloxamers hydrogel to buccal cell led us to recommend them as a buccal drug delivery platform. The acidified formulations for SS with more concentrated Poloxamer 407 (19%) and Satiaxane (0.1%) demonstrated a good tolerance, which could significantly modulate the necrosis and apoptosis of the human buccal epithelium cell induced by acidic solution. The cell viability enhancement effect of Poloxamer, which depends on its type and concentration, was also confirmed in our study. From a methodological point of view, the application of various cell viability assays (MTT, Alamar Blue), membrane integrity assay (Neutral Red), apoptosis assessment (Hoechst 33342) and morphology observation using DHM technique allowed a complete investigation and interpretation of the results. Besides, the drug trans-epithelial diffusion seemed to have no other limit than that of the formulation. SS is considered as a good candidate for buccal absorption. Mucoadhesive and sustained drug release properties of the developed formulation could be a promising approach to improve the bioavailability of salbutamol sulfate, which will be communicated in the future *in vivo* results.

Acknowledgements

The authors would like to thank Unither Pharmaceuticals for financial support, Kersti Alm, Phase Holographic Imaging PHI AB for technical support, helpful advice and data analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.09.045>.

References

- Batrakova, E., Lee, S., Li, S., Venne, A., Alakhov, V., Kabanov, A., 1999. Fundamental relationships between the composition of pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells. *Pharm. Res.* 16, 1373–1379.
- Batrakova, E.V., Kabanov, A.V., 2008. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J. Control. Release* 130, 98–106.
- Bello, F., Dumain, P., Boisseau, M.R., Jallouste, C., Reiffers, J., Bernard, P., Lacombe, F., 1994. A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 17, 59–65.
- Bernstein, G., 2008. Delivery of insulin to the buccal mucosa utilizing the RapidMist™ system. *Expert Opin. Drug Deliv.* 5, 1047–1055.
- Bottenberg, P., Cleymaet, R., de Muynck, C., Remon, J.P., Coomans, D., Michotte, Y., Slop, D., 1991. Development and testing of bioadhesive, fluoride-containing slow-release tablets for oral use. *J. Pharm. Pharmacol.* 43, 457–464.
- Campisi, G., Paderni, C., Saccone, R., Di Fede, O., Wolff, A., Giannola, L.L., 2010. Human buccal mucosa as an innovative site of drug delivery. *Curr. Pharm. Des.* 16, 641–652.
- Challacombe, S.J., Shirlaw, P.J., Thornhill, M.H., 2015. Immunology of diseases of the oral cavity. *Mucosal Immunology*. Elsevier, pp. 1943–1983.
- De Caro, V., Giandalia, G., Siragusa, M.G., Paderni, C., Campisi, G., Giannola, L.L., 2008. Evaluation of galantamine transbuccal absorption by reconstituted human oral epithelium and porcine tissue as buccal mucosa models: Part I. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 869–873.
- Dumortier, G., Grossiord, J.L., Agnely, F., Chaumeil, J.C., 2006. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm. Res.* 23, 2709–2728.
- Dutot, M., Pouzaud, F., Larosche, I., Brignole-Baudouin, F., Warnet, J.-M., Rat, P., 2006. Fluoroquinolone eye drop-induced cytotoxicity: role of preservative in P2X7 cell death receptor activation and apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 2812–2819.
- Dutot, M., Reveneau, E., Pauloin, T., Fagon, R., Tanter, C., Warnet, J.-M., Rat, P., 2010. Multipurpose solutions and contact lens: modulation of cytotoxicity and apoptosis on the ocular surface. *Cornea* 29, 541–549.

- Dutot, M., Warnet, J.-M., Baudouin, C., Rat, P., 2008. Cytotoxicity of contact lens multipurpose solutions: role of oxidative stress, mitochondrial activity and P2X7 cell death receptor activation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 33, 138–145.
- Eirheim, H.U., Bundgaard, C., Nielsen, H.M., 2004. Evaluation of different toxicity assays applied to proliferating cells and to stratified epithelium in relation to permeability enhancement with glycocholate. *Toxicol. Vitro* 18, 649–657.
- Exner, A.A., Krupka, T.M., Scherrer, K., Teets, J.M., 2005. Enhancement of carboplatin toxicity by Pluronic block copolymers. *J. Control. Release* 106, 188–197.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160, 171–177.
- Giannola, L.I., De Caro, V., Giandalia, G., Siragusa, M.G., Tripodo, C., Florena, A.M., Campisi, G., 2007. Release of naltrexone on buccal mucosa: permeation studies, histological aspects and matrix system design. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 425–433.
- Guo, D.-D., Moon, H.-S., Arrote, R., Seo, J.-H., Quan, J.-S., Choi, Y.-J., Cho, C.-S., 2007. Enhanced anticancer effect of conjugated linoleic acid by conjugation with pluronic F127 on MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett.* 254, 244–254.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P., 2004. Comparison of Alamar Blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol. Vitro* 18, 703–710.
- Hao, J., Heng, P.W.S., 2003. Buccal delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29, 821–832.
- General Cell Collection TR146 [WWW Document]. URL http://www.pheculturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=10032305&collection=ecacc_gc (accessed 22.4.14).
- Imboden, R., Imanidis, G., 1999. Effect of the amphoteric properties of salbutamol on its release rate through a polypropylene control membrane. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47, 161–167.
- Jacobsen, J., Nielsen, E.B., Brøndum-Nielsen, K., Christensen, M.E., Olin, H.B., Tommerup, N., Rassing, M.R., 1999. Filter-grown TR146 cells as an in vitro model of human buccal epithelial permeability. *Eur. J. Oral Sci.* 107, 138–146.
- Jacobsen, J., van Deurs, B., Pedersen, M., Rassing, M.R., 1995. TR146 cells grown on filters as a model for human buccal epithelium: I. Morphology, growth, barrier properties, and permeability. *Int. J. Pharm.* 125, 165–184.
- Kühn, J., Shaffer, E., Mena, J., Breton, B., Parent, J., Rappaz, B., Chambon, M., Emery, Y., Magistretti, P., Depeursinge, C., Marquet, P., Turcatti, G., 2013. Label-free cytotoxicity screening assay by digital holographic microscopy. *Assay Drug Dev. Technol.* 11, 101–107.
- Kulkarni, U., Mahalingam, R., Pather, I., Li, X., Jasti, B., 2010. Porcine buccal mucosa as in vitro model: effect of biological and experimental variables. *J. Pharm. Sci.* 99, 1265–1277.
- Luo, C.-L., Chen, X.-P., Li, L.-L., Li, Q.-Q., Li, B.-X., Xue, A.-M., Xu, H.-F., Dai, D.-K., Shen, Y.-W., Tao, L.-Y., Zhao, Z.-Q., 2013. Poloxamer 188 attenuates in vitro traumatic brain injury-induced mitochondrial and lysosomal membrane permeabilization damage in cultured primary neurons. *J. Neurotrauma* 30, 597–607.
- Madhav, N.V.S., Shakya, A.K., Shakya, P., Singh, K., 2009. Orotransmucosal drug delivery systems: a review. *J. Control. Release* 140, 2–11.
- Mälikki-Laine, L., Purra, K., Kähkönen, K., Tammilehto, S., 1995. Decomposition of salbutamol in aqueous solutions. II. The effect of buffer species, pH, buffer concentration and antioxidants. *Int. J. Pharm.* 117, 189–195.
- Marquet, P., Rappaz, B., Magistretti, P.J., Cuhe, E., Emery, Y., Colomb, T., Depeursinge, C., 2005. Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Opt. Lett.* 30, 468–470.
- Mashru, R., Sutariya, V., Sankalia, M., Sankalia, J., 2005. Transbuccal delivery of lamotrigine across porcine buccal mucosa: in vitro determination of routes of buccal transport. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 8, 54–62.
- Mørck Nielsen, H., Rømer Rassing, M., 2000. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: V. Enzyme activity of the TR146 cell culture model, human buccal epithelium and porcine buccal epithelium, and permeability of leu-enkephalin. *Int. J. Pharm.* 200, 261–270.
- Nielsen, H.M., Rassing, M.R., 1999. TR146 cells grown on filters as a model of human buccal epithelium: III. Permeability enhancement by different pH values, different osmolality values, and bile salts. *Int. J. Pharm.* 185, 215–225.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–5426.
- Oyama, Y., Yamano, H., Ohkuma, A., Ogawara, K., Higaki, K., Kimura, T., 1999. Carrier-mediated transport systems for glucose in mucosal cells of the human oral cavity. *J. Pharm. Sci.* 88, 830–834.
- Palumbo, P., Picchini, U., Beck, B., van Gelder, J., Delbar, N., DeGaetano, A., 2008. A general approach to the apparent permeability index. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 35, 235–248.
- Pavillon, N., Kühn, J., Moratal, C., Jourdain, P., Depeursinge, C., Magistretti, P.J., Marquet, P., 2012. Early cell death detection with digital holographic microscopy. *PLoS One* 7, e30912.
- Rampersad, S.N., 2012. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors* 12, 12347–12360.
- Rappaz, B., Marquet, P., Cuhe, E., Emery, Y., Depeursinge, C., Magistretti, P., 2005. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy. *Opt. Express* 13, 9361–9373.
- Rat, P., Korwin-Zmijowska, C., Warnet, J.M., Adolphe, M., 1994. New in vitro fluorimetric microtitration assays for toxicological screening of drugs. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 329–337.
- Rathbone, M.J., Tucker, I.G., 1993. Mechanisms, barriers and pathways of oral mucosal drug permeation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 12, 41–60.
- Serbest, G., Horwitz, J., Jost, M., Barbee, K., 2006. Mechanisms of cell death and neuroprotection by poloxamer 188 after mechanical trauma. *FASEB J.* 20, 308–310.
- Teubl, B.J., Absenger, M., Fröhlich, E., Leitinger, G., Zimmer, A., Roblegg, E., 2013. The oral cavity as a biological barrier system: design of an advanced buccal in vitro permeability model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84, 386–393.
- Tóth, A.E., Walter, F.R., Bocsik, A., Sántha, P., Veszelska, S., Nagy, L., Puskás, L.G., Couraud, P.-O., Takata, F., Dohgu, S., Kataoka, Y., Deli, M.A., 2014. Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. *PLoS One* 9, e100152.
- Trong, L.C.P., Djabourov, M., Ponton, A., 2008. Mechanisms of micellization and rheology of PEO-PPO-PEO triblock copolymers with various architectures. *J. Colloid Interface Sci.* 328, 278–287.
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* 288, 369–376.
- Xue, X., Zhou, Y., Chen, Y., Meng, J., Jia, M., Hou, Z., Bai, H., Mao, X., Luo, X., 2012. Promoting effects of chemical permeation enhancers on insulin permeation across TR146 cell model of buccal epithelium in vitro. *Drug Chem. Toxicol.* 35, 199–207.
- Yan, F., Zhang, C., Zheng, Y., Mei, L., Tang, L., Song, C., Sun, H., Huang, L., 2010. The effect of poloxamer 188 on nanoparticle morphology, size, cancer cell uptake, and cytotoxicity. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 6, 170–178.
- Zeng, N., Dumortier, G., Maury, M., Mignet, N., Boudy, V., 2014. Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: relation between micellization, gelation, mechanic and release properties. *Int. J. Pharm.* 467, 70–83.
- Zhang, H., Zhang, J., Streisand, J.B., 2002. Oral mucosal drug delivery: clinical pharmacokinetics and therapeutic applications. *Clin. Pharmacokinet.* 41, 661–680.

Annexe C

Tableaux présentant l'identification des lipides en utilisant les valeurs du temps de rétention t_R et de m/z values ainsi que leur pourcentage de variation après irradiation UV.

Lipids	t_R (δt_R %)	m/z (δppm)	% of UR or DR after 2.5 J/cm ²
Ceramides			
Cer(34:0)	6.74 (2)	538.5187 (3)	55 (UR)
Cer(34:1)	6.57 (8)	596.5248 (1)	66 (UR)
Cer(35:1)	6.57 (3)	582.5092 (1)	87 (UR)
Cer(36:1)	7.07 (6)	564.5355 (1)	235 (UR)
Cer(40:1)	7.91 (2)	656.5729 (1)	111 (UR)
Cer(40:2)	7.5 (0.6)	642.5801 (0)	74 (UR)
Cer(41:1)	8.09 (1)	634.6135 (1)	67 (UR)
Cer(42:1)	8.25 (0)	648.6292 (1)	35 (UR)
GlcCer(40:1)	7.53 (1)	806.646 (2)	127 (UR)
GlcCer(42:1)	7.89 (1)	834.6786 (0)	29 (UR)
GlcCer(42:2)	7.5 (1)	832.6634 (0)	53 (UR)
GlcCer(44:1)	8.22 (0)	838.7129 (1)	46 (UR)
GlcCer(44:2)	7.85 (2)	860.6949 (0)	17 (UR)
GlcCer-2OH(32:2)	6.86 (0)	703.547 (0)	19 (UR)
LacCer(42:1)	7.73 (0)	996.7328 (0)	23 (UR)
LacCer(42:2)	7.32 (0)	972.7342 (0)	40 (UR)
Cer(d42:0)	8.35 (0)	674.6399 (3)	36 (DR)
GlcCer(34:0)	6.28 (0)	702.5883 (0)	35 (DR)
GlcCer(42:1)	7.63 (0)	810.6819 (1)	42 (DR)

Lipids	t_R (δt_R %)	m/z (δppm)	% of UR or DR after 2.5 J/cm ²
Phosphatidylcholines			
PC(16:0)	2.04 (6)	496.3397 (0)	84 (UR)
PC(18:1)	2.15 (11)	522.3558 (0)	52 (UR)
PC(30:0)	5.91 (3)	706.5383 (0)	28 (UR)
PC(32:2)	6.41 (15)	730.5414 (4)	23 (UR)
PC(34:1)	6.49 (2)	760.5863 (1)	21 (UR)
PC(40:0)	5.28 (4)	678.5067 (0)	37 (UR)
PC(42:2)	7.78 (0)	928.7017 (0)	29 (UR)
PC(44:1)	8.11 (0)	956.731 (1)	74 (UR)
PC(46:2)	8.41 (14)	926.7578 (0)	102 (UR)
PC(46:5)	8.1 (3)	920.7073 (3)	69 (UR)
PC-P(34:3)	6.76 (0)	742.5727 (2)	24 (UR)
PC-P(34:4)	6.32 (0)	740.5573 (2)	17 (UR)
PC-P(34:1)	6.35 (13)	744.5902 (0)	29 (DR)
PC-P(36:1)	6.39 (0)	816.585 (3)	43 (DR)
PC-P(36:3)	6.37 (0)	768.5879 (2)	36 (DR)
PC-P(40:6)	6.27 (1)	818.606 (0)	52 (DR)
PC-P(40:7)	6.2 (12)	816.5919 (2)	38 (DR)
Phosphatidylethanolamines			
PE(32:0)	5.9 (8)	690.5069 (1)	49 (UR)
PE(34:0)	6.18 (7)	720.5543 (0)	40 (UR)
PE(34:1)	5.97 (7)	776.5433 (1)	25 (UR)
PE(34:2)	6.16 (14)	738.5042 (0)	27 (UR)
PE(35:2)	6.42 (5)	728.525 (0)	25 (UR)
PE(36:0)	6.6 (10)	748.5856 (0)	44 (UR)
PE(36:1)	6.25 (11)	804.5757 (0)	38 (UR)
PE(38:1)	6.72 (8)	774.6015 (1)	30 (UR)
PE(40:1)	7.87 (2)	800.6172 (0)	51 (UR)
PE(42:1)	8.19 (4)	830.6633 (0)	65 (UR)
PE(42:2)	7.84 (1)	828.6474 (0)	45 (UR)

Annexes

Lipids	t_R (δt_R %)	m/z (δppm)	% of UR or DR after 2.5 J/cm²
PE(44:2)	8.17 (5)	854.6642 (0)	75 (UR)
PE-P(32:0)	6.83 (13)	676.5281 (0)	44 (UR)
PE-P(33:1)	6.64 (8)	686.5114 (2)	29 (UR)
PE-P(34:0)	7.28 (5)	702.5435 (1)	35 (UR)
PE-P(34:1)	6.86 (13)	702.5435 (0)	17 (UR)
PE-P(36:0)	7.27 (0)	726.5409 (3)	69 (UR)
PE-P(40:4)	6.87 (7)	782.5307 (4)	33 (UR)
PE-P(40:7)	4.92 (3)	808.506 (0)	84 (UR)
PE(46:5)	6.85 (10)	912.6297 (4)	34 (DR)
PE-P(40:2)	7.31 (1)	756.5894 (1)	34 (DR)
PE-P(40:6)	6.49 (1)	776.5598 (1)	28(DR)
Sphingomyelins			
SM(32:0)	5.49 (3)	735.5625 (4)	46 (DR)
SM(32:1)	5.25 (1)	733.5491 (1)	16 (DR)
SM(33:0)	6.1 (4)	749.5793 (2)	30 (DR)
SM(33:1)	5.88 (7)	687.5438 (1)	14 (DR)
SM(34:0)	6.1 (1)	763.596 (1)	41 (DR)
SM(40:0)	6.64 (0)	733.6205 (1)	26 (DR)
SM(40:1)	7.11 (4)	845.6728 (2)	55 (DR)
SM(40:2)	6.94 (7)	785.6523 (1)	22 (DR)
SM(41:1)	7.52 (7)	799.6671 (3)	58 (DR)
SM(42:1)	7.52 (5)	873.705 (1)	53 (DR)
SM(44:2)	7.76 (7)	899.7219 (0)	27 (DR)

t_R: temps de retention exprimé en minutes; δt_R: difference relative entre les temps de retention attendus et obtenus, δppm: écart entre la mase mesurée et la masse théorique

Annexe D

Article 3

Olivier E, Dutot M, Regazzetti A, Dargère D, Auzeil N, Laprèvote O, Rat
25-hydroxycholesterol induces degenerative pathways in human skin cells
involving P2X7 cell death receptor and granzyme B.

En cours de soumission dans *Chemistry and Physics of Lipids*

1. Introduction

Oxysterols, derived from cholesterol oxidation, have been associated to several degenerative diseases in the brain, the eye and the blood circulation: Alzheimer disease, Parkinson disease, age-related macular degeneration, atherosclerosis (Björkhem et al., 2009, 2013; Brown and Jessup, 1999; Lordan et al., 2009; Olivier et al., 2016a; Rodríguez and Larrayoz, 2010; Zarrouk et al., 2014)... Skin can also be affected by degenerative disorders such as photoaging or vitiligo, and Bellei et al. demonstrated that 7-ketocholesterol and 7-betahydroxycholesterol are associated with vitiligo (Bellei et al., 2013). Moreover, we previously showed on a cell-based model that the level of 25-hydroxycholesterol is increased after UV irradiation (Olivier et al., 2016b). As a result, we concluded that oxysterols could be also implicated in skin degenerative disorders.

Degenerative diseases are due to inappropriate apoptotic processes (Elmore, 2007). Indeed, in degenerative diseases, cell loss involves apoptosis: neuronal cell apoptosis in neurodegenerative process (Mattson, 2000; Rohn, 2010), retinal pigmented epithelial cell apoptosis in age-related macular degeneration (Dunaief et al., 2002), endothelial cell apoptosis in atherosclerosis (Mitchinson et al., 1996) or melanocyte apoptosis in vitiligo (Ruiz-Argüelles et al., 2007). Apoptosis is known as one of the major cell death pathway (Duprez et al., 2009). Most of the time, apoptosis is characterized by caspase activation leading to chromatin condensation. Apoptosis mechanisms remain highly complex and can involve numerous proteases such as the serine protease granzyme B (Froelich et al., 2004). Apoptosis can be triggered by numerous receptors including P2X7 cell death receptor, which plays a pivotal role in degenerative disorders (Le Feuvre et al., 2002; Marcellino et al., 2010; Olivier et al., 2016a; Reichenbach and Bringmann, 2016; Wakx et al., 2015). P2X7 cell death receptor is linked to inflammation through the inflammasome (Di Virgilio, 2007), which plays a role in the pathogenesis of degenerative diseases like Alzheimer (Liu and Chan, 2014) and age-related macular degeneration (Celkova et al., 2015). Several cytokines such as IL-1alpha, IL-6, IL-8 and MIF have been associated to Alzheimer (Hüll et al., 1996; Li et al., 2015), age-related macular degeneration (Cascella et al., 2014; Nassar et al., 2015) and vitiligo (Yu et al., 1997) pathogenesis. Relationship between apoptosis and chronic inflammation could be mediated by IL-1alpha since this cytokine

maturation is mediated by granzyme B and this cytokine is released after P2X7 activation (Afonina et al., 2011; Ferrari et al., 2006).

The connection between degenerative skin cells and oxysterols has received little attention while oxysterols are closely related to degenerative diseases and cutaneous degenerative process can be very debilitating. Our aim was to study the skin/oxysterols relationship. To achieve our goal, we first assessed the changes in sterol levels in keratinocytes from young and elderly donors irradiated or not and second we evaluated the cellular effects of 25-OH oxysterol on apoptosis and inflammatory hallmarks on human keratinocytes.

2. Materials and Methods

2.1. Cell culture

2.1.1. Primary cell culture

Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) from young and elderly donors were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany) and Tebu bio (Le Perray en Yvelines, France). Primary keratinocytes were isolated from foreskin of two young donors (2 and 3 years old) and from back and face skin of three elderly donors (between 64 and 83 years old). Primary cells were cultured in Keratinocyte Growth Medium 2 (PromoCell) supplemented with 50 IU/ml of penicillin and 50 IU/ml of streptomycin (Eurobio, Courtaboeuf, France). NHEK cultures were maintained in a cell culture incubator (37°C, 95% humidity, 5% CO₂). When NHEK reached 70-80% confluency, they were dispersed using trypsin, counted and seeded at 200,000 cells/mL in flasks for sterol quantitation and incubated for a week. Every three days, culture medium was changed. Primary cultures were used at passages <6.

2.1.2. HaCaT cell culture

HaCaT cells, spontaneously transformed human keratinocytes, were obtained from Cell lines service (Cell lines service-CLS-Germany). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Eurobio) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM of glutamine, 50 IU/ml of penicillin and 50 IU/ml of streptomycin (Eurobio). HaCaT cultures were maintained in a cell culture incubator (37°C, 95% humidity, 5% CO₂). When the HaCaT cells reached confluency, they were dispersed using trypsin and counted. The cellular suspension was diluted and seeded in 48-well microplates at a cellular density of 50,000 cells/mL or in 96-well microplates at a cellular density of 80,000 cells/mL and incubated for 24 hours.

2.2. UV irradiation experiments

UV irradiation was performed on primary keratinocytes (NHEK) with a solar light simulator Suntest CPS+ (Atlas, Mount Prospect, IL, USA). This simulator equipped with a xenon arc lamp and special glass filters restricting transmission of light below 290 nm provides irradiance that approximates sunlight. NHEK were seeded in flasks and irradiated at a dose of 2.5 J/cm² as we previously described

(Olivier et al., 2016b). The cells were subsequently rinsed and incubated for 24 hours in culture medium. Non-irradiated cells were used as control.

2.3. Sterols quantitation

Quantitation of sterols in human primary keratinocytes (NHEK) was performed according to the method developed by Ayciriex et al. (Ayciriex et al., 2012) using ultra-performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry analysis (UPLC-HRMS). After cell dispersion using trypsin and centrifugation, cell pellets were dissolved in 600 µL double-distilled water, vortexed for 30 seconds and sonicated for 5 minutes. Sterols were extracted with a hexane/methanol mixture (7:1, v/v) under agitation for 40 minutes and dried under reduce pressure. Sterols were derivatized into carbamate using a solution of 4-(dimethylamino)phenyl isocyanate in dichloromethane. Dichloromethane was evaporated under reduced pressure, derivatized sterols were resuspended in an acetonitrile/isopropanol mixture (1:1, v/v) and analyzed using UPLC-ESI-HRMS on a Synapt™ G2 HDMS™ mass spectrometer (Waters MS Technologies, Manchester, UK). Oxysterol levels were normalized to protein content measured by BCA method.

2.4. Keratinocytes incubation with 25-hydroxycholesterol

HaCaT cells were incubated with 25-hydroxycholesterol (25-OH, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) for 48 hours. 25-OH was dissolved in absolute ethanol to obtain a 40 mM stock solution. The stock solution was sonicated to solubilize oxysterol. 25-OH was diluted in culture medium to obtain targeted concentrations ranging from 5 to 40 µM. These concentrations were chosen according to our previous results (Olivier et al., 2016b).

2.5. Apoptosis

2.5.1. Chromatin condensation

Chromatin condensation was evaluated using the Hoechst 33342 assay (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Hoechst 33342 UV fluorescent probe enters and intercalates into DNA in living and apoptotic cells. The fluorescent signal is proportional to chromatin condensation. A 10 µg/mL Hoechst

33342 solution was distributed into the wells of the microplate and the fluorescence signal was read after a 30-minute incubation time at room temperature ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$) using Safire cytofluorometer (Tecan, Männedorf, Switzerland).

2.5.2. Caspases 3 and 8 activity

Caspases 3 and 8 activities were respectively determined using CASP3F and CASP8F fluorimetric assay kits (Sigma-Aldrich). According to manufacturer's instructions, the cells were incubated with lysis buffer on ice for 20 minutes. Then, Ac-DEVD-AMC Substrate for caspase 3 detection or Ac-IETD-AMC Substrate for caspase 8 detection was added in each well. After a 1-hour incubation at room temperature, fluorescence was read ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) using Safire cytofluorometer (Tecan).

2.5.3. P2X7 receptor activation

P2X7 cell death receptor activation was evaluated using the YO-PRO-1 assay. YO-PRO-1 probe only enters into cells after P2X7 receptor activation-induced pore opening, and binds to DNA, emitting fluorescence. A 1 mM YO-PRO-1 (ThermoFisher Scientific) stock solution was diluted at 1/500 in PBS just before use and distributed into the wells of the microplate. After a 10-minute incubation time at room temperature, fluorescence signal was read ($\lambda_{\text{ex}} = 491 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$) using Safire cytofluorometer (Tecan).

2.5.4. Granzyme B release

Granzyme B release in cell supernatants was quantified using an enzyme-linked immunoassay (Human Granzyme B ELISA kit, Abcam, Cambridge, United Kingdom). Manufacturer's instructions were followed to perform the assay. Absorbance was scanned ($\lambda_{\text{abs}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ref}} = 620 \text{ nm}$) using Safire cytometer (Tecan).

2.6. Inflammation evaluation through MIF, IL-1alpha, IL-6 and IL-8 release

MIF, IL-1alpha, IL-6 and IL-8 release were quantified in cell supernatants using enzyme-linked immunoassays (Quantikine ELISA human MIF immunoassay, Quantikine ELISA human IL-1alpha immunoassay, Quantikine ELISA IL-6 immunoassay, Quantikine ELISA IL-8 immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The assays were performed according to manufacturer's instructions. Absorbance was scanned ($\lambda_{\text{abs}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ref}} = 560 \text{ nm}$) using Safire cytometer (Tecan).

2.7. Statistical analysis

In all experiments, no difference was observed between negative control (culture medium) and absolute ethanol used to solubilize 25-OH (data not shown).

Means of at least three independent experiments were calculated and normalized to control cells. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6 software. A one-way ANOVA followed by Dunnett's test with a risk α at 5% were run. Thresholds of significance were *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ compared to culture medium.

3. Results

3.1. Sterols quantitation in primary keratinocytes

We previously observed an increase in 25-OH level after UV irradiation in HaCaT cell line (Olivier et al., 2016b), this time we studied the changes in sterol levels in human keratinocytes isolated from skin biopsies of young and elderly donors that we irradiated with UV or not (figure 1).

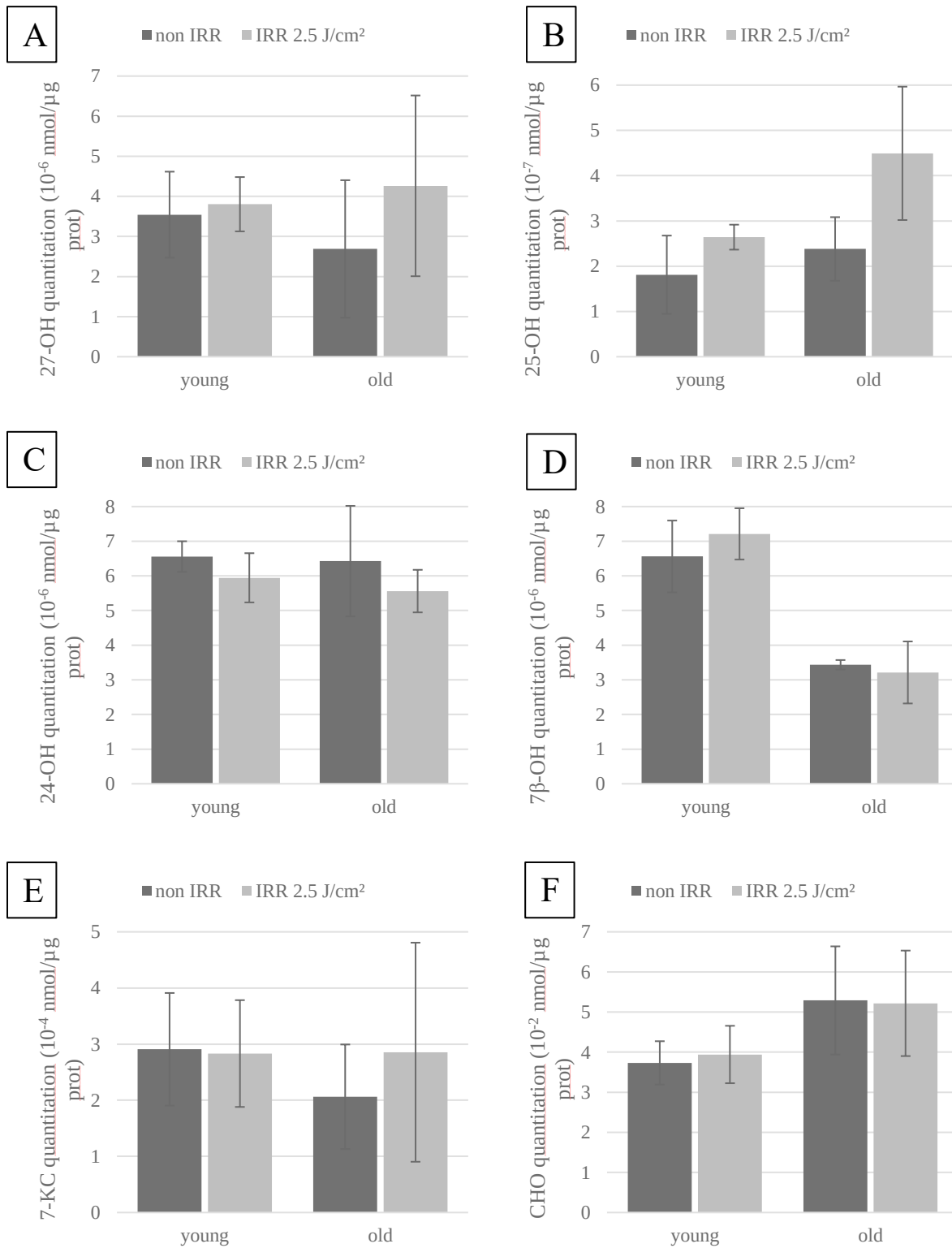


Figure 1: Sterols quantitation in primary keratinocytes from young and elderly donors and after UV irradiation or not: 27-OH (A), 25-OH (B), 24-OH (C), 7 β -OH (D), 7-KC (E), and CHO (F). 27OH: 27-hydroxycholesterol, 25OH: 25-hydroxycholesterol, 24OH: 24-hydroxycholesterol, 7 β -OH: 7- β hydroxycholesterol, 7KC: 7-ketocholesterol, CHO: cholesterol. Values are the mean $\pm$ SEM (n=3).

The analysis of sterol quantitation is limited by the high variability in primary keratinocytes. Consequently, we observed rather trends than statistically significant differences. Concerning the effects of age, we mainly observed a decreasing trend of a factor 0.5 in 7- β OH (figure 1D) and an increasing trend of a factor 1.4 in cholesterol level (figure 1F). Concerning the level of sterols after UV-irradiation, among the studied oxysterols, an increasing trend was observed for 25-OH level after a 2.5 J/cm² irradiation dose (figure 1B). This increase was higher for elderly donors (x1.3 for young donors and x1.7 for elderly donors). Neither change in the other studied oxysterols nor in cholesterol were observed after UV irradiation (figure 1A, C, D, E and F).

3.2. 25-OH effects on HaCaT cell apoptosis

We studied 25-OH effects on apoptosis through chromatin condensation, caspase 3, and caspase 8 activity, P2X7 cell death receptor activation and granzyme B release assessment.

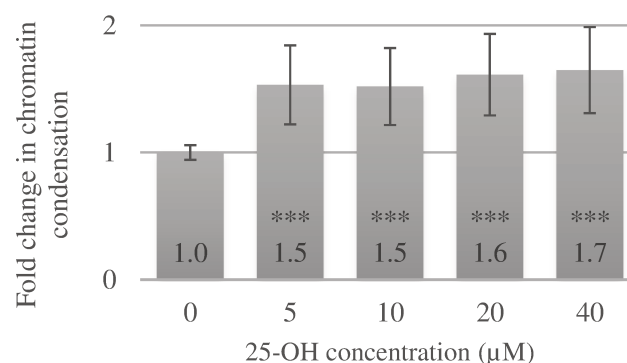


Figure 2: 25-OH effects on chromatin condensation. Values are the mean $\pm$ standard deviation (n=5).

***p<0.001 compared to culture medium

A statistically significant increase in chromatin condensation was observed at the lowest 25-OH studied concentration (x1.5 compared to control cells, figure 2), and this increase was constant throughout the concentration range.

Then, an initiator caspase activity: caspase 8, and an executioner caspase activity: caspase 3 were studied (figure 3).

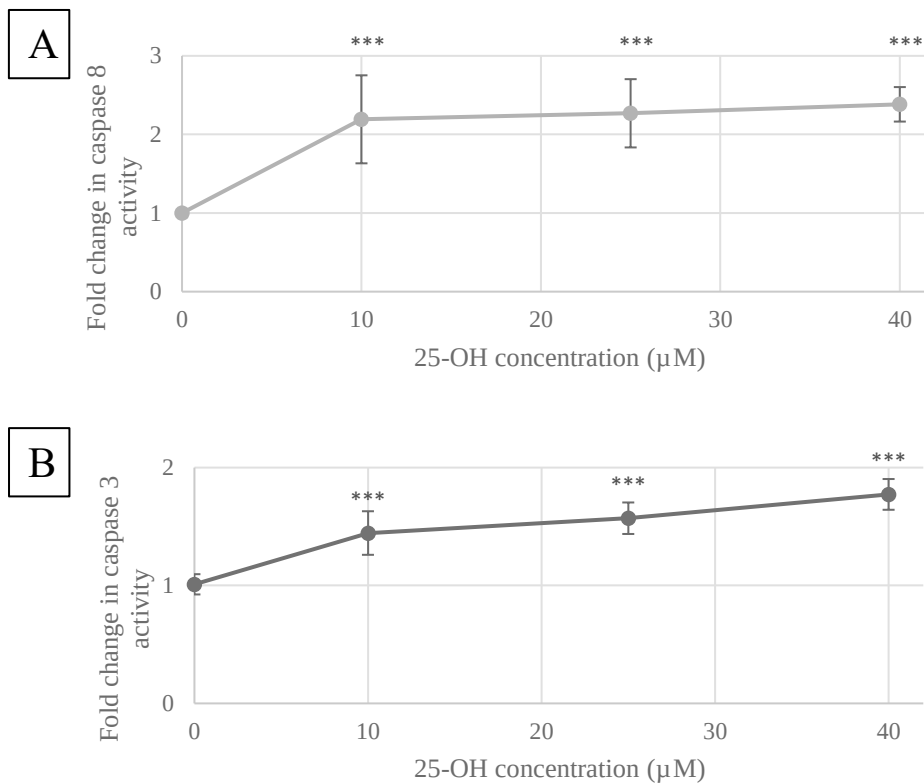


Figure 3: 25-OH effects on caspases activity. A. Caspase 8 activity evaluation after a 48-hour incubation time with 25-OH. B. Caspase 3 activity evaluation after a 48-hour incubation time with 25-OH. Values are the mean $\pm$ standard deviation (n=3) ***p<0.001 compared to control cells.

A statistically significant increase in caspase 8 activation was observed after 25-OH incubation (x2.2 for 25-OH 10 μ M compared to culture medium, figure 3A) and this increase was constant throughout the concentration range. Caspase 3 activation was also significantly increased after 25-OH incubation (figure 3B). This caspase 3 activation slowly increased from 25-OH 10 μ M (x1.5 compared to control cells) till 25-OH 40 μ M (x1.8).

Caspase 8- and caspase 3-dependent apoptosis can be related to a cell death receptor activation (Ferrari et al., 1999). That is why, we further focused on the cell death receptor P2X7 activation (figure 4).

Annexes

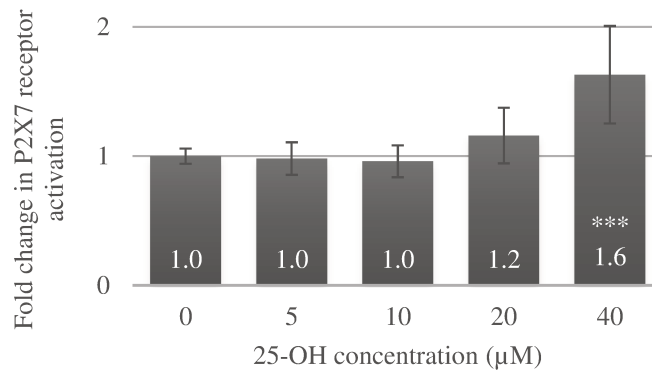


Figure 4: 25-OH effects on P2X7 receptor activation. Values are the mean $\pm$ standard deviation (n=5).

***p< 0.001 compared to culture medium

P2X7 cell death receptor was not activated after 25-OH incubation except at 40 μ M. At this concentration, a statistically significant increase in P2X7 receptor activation was observed (x1.6 compared to control cells).

Then, we focused on the serine protease granzyme B as this protease catalyze some caspases activation like caspase-3 activation (Zapata et al., 1998).

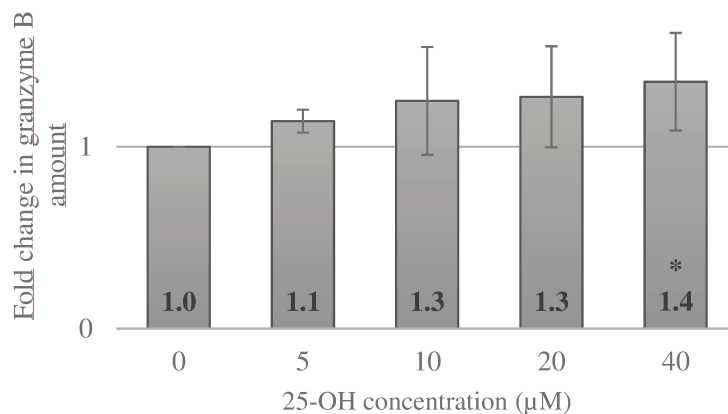


Figure 5: 25-OH effects on granzyme B release. Values are the mean $\pm$ standard deviation (n=5).

*p<0.05 compared to control cells.

Granzyme B release was increased after a 48-hour incubation time with 25-OH (figure 5). This increase is statistically significant only for 25-OH 40 μ M (x1.4 compared to control cells).

3.3. Proinflammatory cytokines release after 25-OH incubation

The release of proinflammatory cytokines was evaluated after a 48-hour incubation time with 25-OH (figure 6).

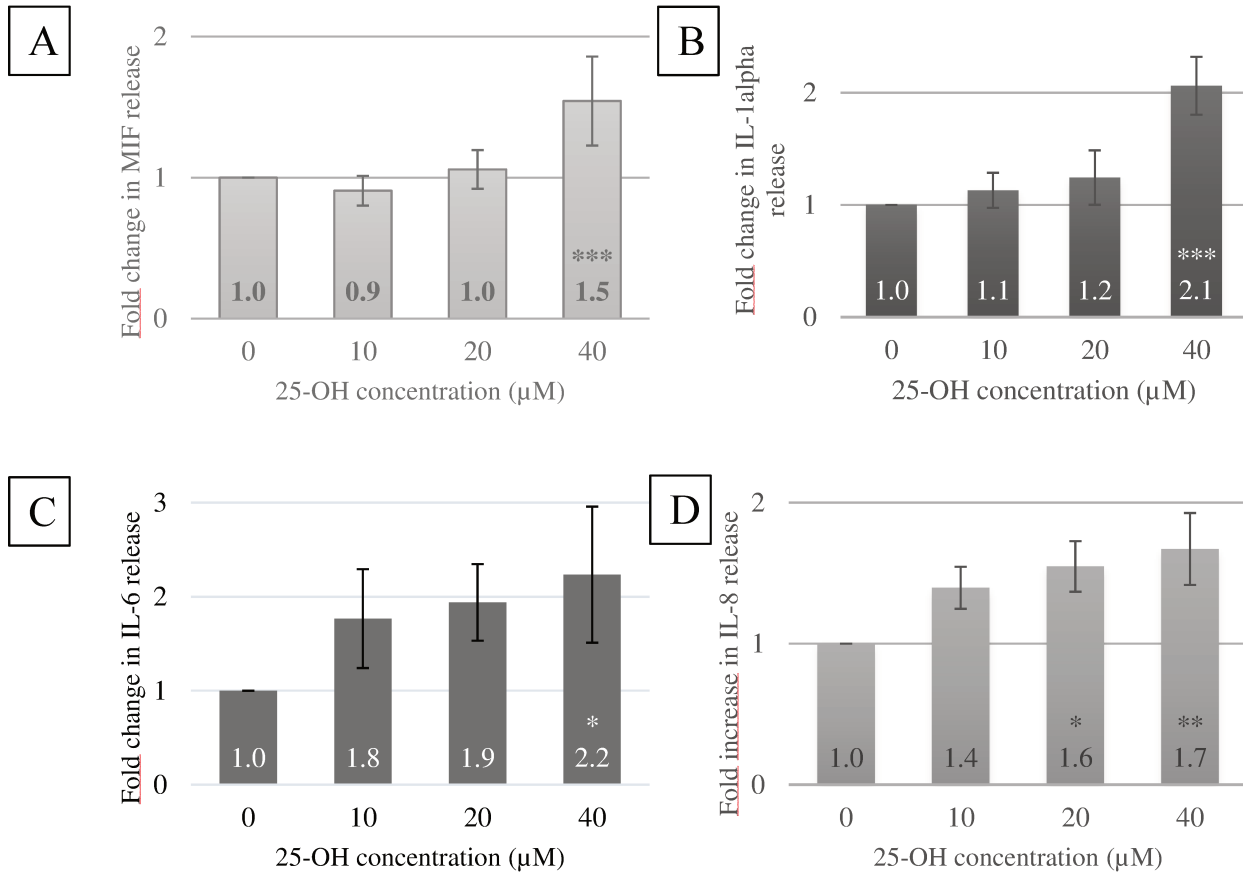


Figure 6: 25-OH effects on the release of proinflammatory cytokines: MIF (A), IL-1alpha (B), IL-6 (C) and IL-8 (D) by HaCaT cells. Values are the mean $\pm$ standard deviation (n=3) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 compared to control cells.

MIF release in cell supernatants was significantly increased after 25-OH 40 μM incubation (x1.5 compared to control cells, figure 6A). A significant increase in IL-1alpha release was also observed at the same concentration (x2.1 compared to control cells, figure 6B). Increase in IL-6 release was observed after 25-OH incubation (figure 6C). This increase was statistically significant only for 25-OH 40 μM (x2.2 compared to control cells). Statistically significant increases in IL-8 release were observed at 25-OH 20 μM and 40 μM (respectively x1.6 and x1.7 compared to control cells).

4. Discussion

In this work, we studied sterol levels in young and elderly primary keratinocytes. We confirmed what happens in other organs, i.e. cholesterol tends to increase in skin keratinocytes with age. Besides, we studied the effects of UV irradiation. We observed that 25-OH was increased in primary keratinocytes which confirms our previous results in HaCaT cells (Olivier et al., 2016b). This increase is higher in keratinocytes from elderly donors. This higher level could be related to the higher cholesterol level in keratinocytes from elderly donors, as UV is known to induce oxidative stress and oxysterols are oxidized derivatives of cholesterol. These results confirm that 25-OH appears as a key oxysterol during photoaging which is considered as a skin degenerative process.

However important variabilities on primary keratinocytes were observed. These variabilities can be explained by the interindividual skin differences due to individual genetic background and to the individual environment exposure as age, stress conditions, pollution which modifies keratinocytes. In the literature this interindividual difference has been previously reported (Chazal et al., 2004; Zorn-Kruppa et al., 2016). That is why we decided to pursue our study on HaCaT cells.

Oxysterols, particularly 25-hydroxycholesterol, are involved in degenerative process, including photoaging (Lordan et al., 2009; Olivier et al., 2016a, 2016b; Zarrouk et al., 2014). Degenerative disorders are linked to apoptosis process. That is why we investigated the role of 25-OH in different apoptosis hallmarks. In the literature, 25-OH is involved in apoptosis in several cell models such as human smooth muscle cells, human monocytes, and rat male reproductive system cells (Ares et al., 1997; Le Goff et al., 2006; Lee and Chau, 2001; Lim et al., 2003; Lordan et al., 2009; Travert et al., 2006). In our human keratinocyte model, 25-OH increased chromatin condensation and extrinsic apoptosis pathway through activation of caspases 8 and 3. Several studies demonstrated that P2X7 receptor stimulation induces apoptosis through several caspases activation such as caspase 8 and caspase 3 (Ferrari et al., 1999; Kong et al., 2005). For the first time, our study demonstrated that P2X7 cell death receptor activation is induced by the highest studied concentration of 25-OH in keratinocytes. For lowest concentration, P2X7 cell death receptor can be no longer activated and be returned to basal level or caspase activation could be mediated by another cell death receptor.

Granzyme B, a serine protease, is a key actor of apoptosis through several pathways which can be either caspase-dependent or caspase-independent (Boivin et al., 2009). Granzyme B was initially considered as specific of activated immune cells. However it is now established that granzyme B is also detected in non-immune cells such as keratinocytes especially under stress conditions. Indeed, some studies demonstrated that UVA and UVB induce granzyme B release by human keratinocytes (Hernandez-Pigeon et al., 2006, 2007). 25-OH and granzyme B have never been associated, in our study, we observed an increase in granzyme B release after a 25-OH incubation in keratinocytes.

Interestingly we observed that 25-OH induced not only the release of granzyme B but also the release of proinflammatory cytokines MIF and IL-1alpha. Indeed, Hernandez-Pigeon et al. observed that an increase in MIF (macrophage migration inhibitory factor) induces granzyme B release after a UVA exposition (Hernandez-Pigeon et al., 2007). MIF, originally thought as a lymphokine involved in delayed hypersensitivity (Bernhagen et al., 1996; Bloom and Bennett, 1966; Nishihira, 2000), is now considered as an inflammatory cytokine, in particular in cutaneous inflammatory response (Shimizu, 2005). The upregulation of MIF can be triggered by IL-1alpha (Watanabe et al., 2004) and granzyme B mediates the maturation of IL-1alpha (Afonina et al., 2011). Besides, P2X7 also stimulates IL-1alpha release (Ferrari et al., 2006; Pelegrin et al., 2008).

Taken together our results demonstrated that 25-OH induced an amplification loop through granzyme B and proinflammatory cytokines MIF and IL-1alpha (figure 8). Furthermore 25-OH activated P2X7 receptor which also leads to this amplification loop. This loop worsened apoptosis induced by other pathways and is responsible of a state of chronic inflammation.

As it is recognized that inflammation is closely related to degenerative processes (Baumann, 2005; Favaloro et al., 2012; Sadek, 2014), we also evaluated the release of two others proinflammatory cytokines: IL-6 and IL-8 and concluded to a 25-OH induced increase in these two cytokines. These results are in accordance with a previous study in airway epithelial cells demonstrating the release of the two same pro-inflammatory cytokines (Koarai et al., 2012).

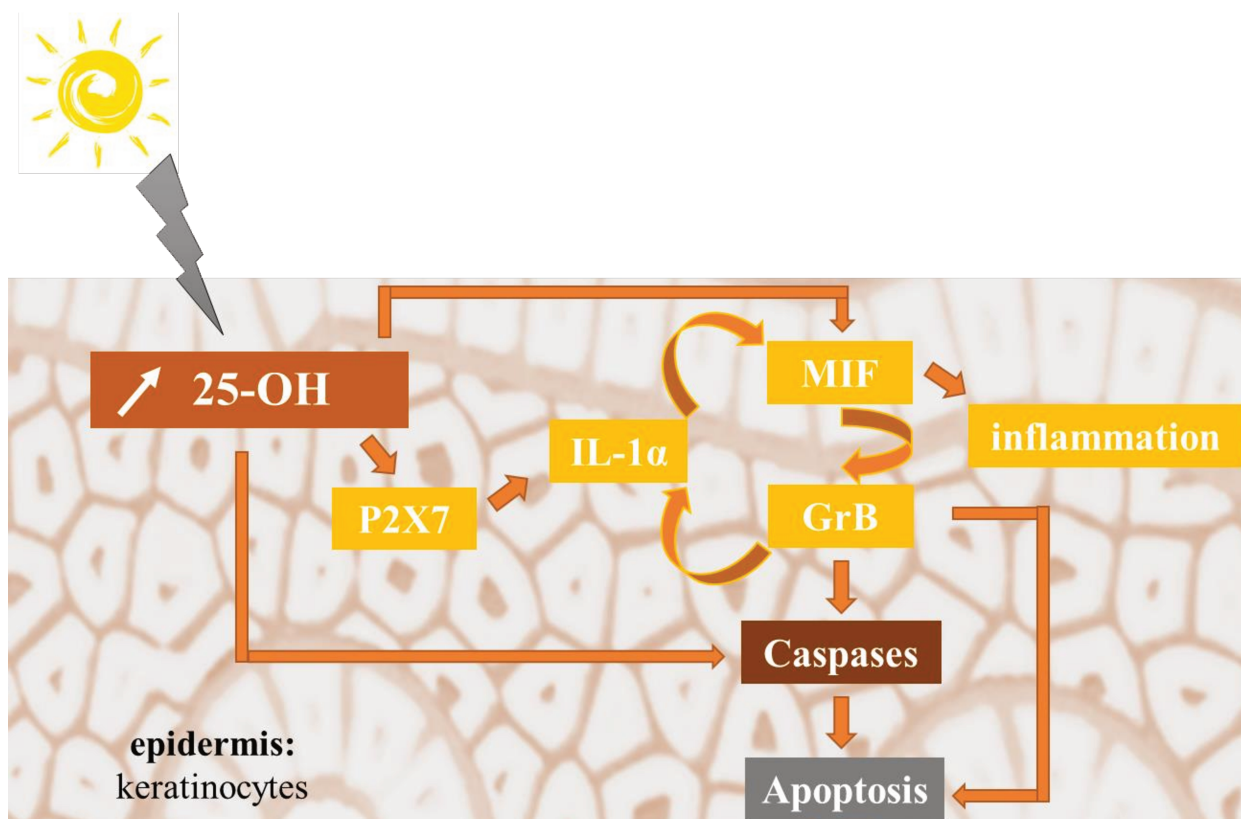


Figure 8: Representative schema of sun-induced apoptosis and inflammation mediated by 25-OH.

To conclude, 25-OH already associated to skin aging and degenerative processes plays a key role in sun-induced inflammation and apoptosis. This oxysterol appears more and more as a key factor in skin degenerative disorders.

REFERENCES

- Afonina, I.S., Tynan, G.A., Logue, S.E., Cullen, S.P., Bots, M., Lüthi, A.U., Reeves, E.P., McElvaney, N.G., Medema, J.P., Lavelle, E.C., et al. (2011). Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1 α . *Mol. Cell* 44, 265–278.
- Ares, M.P., Pörn-Ares, M.I., Thyberg, J., Juntti-Berggren, L., Berggren, P.O., Diczfalusy, U., Kallin, B., Björkhem, I., Orrenius, S., and Nilsson, J. (1997). Ca²⁺ channel blockers verapamil and nifedipine inhibit apoptosis induced by 25-hydroxycholesterol in human aortic smooth muscle cells. *J. Lipid Res.* 38, 2049–2061.
- Ayciriex, S., Regazzetti, A., Gaudin, M., Prost, E., Dargère, D., Massicot, F., Auzeil, N., and Laprêvote, O. (2012). Development of a novel method for quantification of sterols and oxysterols by UPLC-ESI-HRMS: application to a neuroinflammation rat model. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 3049–3059.
- Baumann, L. (2005). How to Prevent Photoaging? *J. Invest. Dermatol.* 125, xii–xiii.
- Bellei, B., Pitisci, A., Ottaviani, M., Ludovici, M., Cota, C., Luzi, F., Dell’Anna, M.L., and Picardo, M. (2013). Vitiligo: A Possible Model of Degenerative Diseases. *PLOS ONE* 8, e59782.
- Bernhagen, J., Bacher, M., Calandra, T., Metz, C.N., Doty, S.B., Donnelly, T., and Bucala, R. (1996). An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J. Exp. Med.* 183, 277–282.
- Björkhem, I., Cedazo-Minguez, A., Leoni, V., and Meaney, S. (2009). Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol. Aspects Med.* 30, 171–179.
- Björkhem, I., Lövgren-Sandblom, A., Leoni, V., Meaney, S., Brodin, L., Salvesson, L., Winge, K., Pålhagen, S., and Svenningsson, P. (2013). Oxysterols and Parkinson’s disease: evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neurosci. Lett.* 555, 102–105.
- Bloom, B.R., and Bennett, B. (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153, 80–82.
- Boivin, W.A., Cooper, D.M., Hiebert, P.R., and Granville, D.J. (2009). Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Lab. Invest.* 89, 1195–1220.
- Brown, A.J., and Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142, 1–28.
- Cascella, R., Ragazzo, M., Strafella, C., Missiroli, F., Borgiani, P., Angelucci, F., Marsella, L.T., Cusumano, A., Novelli, G., Ricci, F., et al. (2014). Age-related macular degeneration: insights into inflammatory genes. *J. Ophthalmol.* 2014, 582842.
- Celkova, L., Doyle, S.L., and Campbell, M. (2015). NLRP3 Inflammasome and Pathobiology in AMD. *J. Clin. Med.* 4, 172–192.
- Chazal, M., Roux, E., Alapetite, C., Roulin, C., Moustacchi, E., Douki, T., Baudouin, C., Charveron, M., and Basset-Séguin, N. (2004). Interexperimental and Interindividual Variations of DNA Repair Capacities After UV-B and UV-C Irradiations of Human Keratinocytes and Fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* 79, 286–290.
- Di Virgilio, F. (2007). Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 465–472.

- Dunaief, J.L., Dentchev, T., Ying, G.-S., and Milam, A.H. (2002). The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 120, 1435–1442.
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., and Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 11, 1050–1062.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging* 4, 330–349.
- Ferrari, D., Los, M., Bauer, M.K.A., Vandenabeele, P., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1999). P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett.* 447, 71–75.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Virgilio, F.D. (2006). The P2X7 Receptor: A Key Player in IL-1 Processing and Release. *J. Immunol.* 176, 3877–3883.
- Froelich, C.J., Metkar, S.S., and Raja, S.M. (2004). Granzyme B-mediated apoptosis – the elephant and the blind men? *Cell Death Differ.* 11, 369–371.
- Hernandez-Pigeon, H., Jean, C., Charruyer, A., Haure, M.-J., Titeux, M., Tonasso, L., Quillet-Mary, A., Baudouin, C., Charveron, M., and Laurent, G. (2006). Human Keratinocytes Acquire Cellular Cytotoxicity under UV-B Irradiation IMPLICATION OF GRANZYME B AND PERFORIN. *J. Biol. Chem.* 281, 13525–13532.
- Hernandez-Pigeon, H., Jean, C., Charruyer, A., Haure, M.-J., Baudouin, C., Charveron, M., Quillet-Mary, A., and Laurent, G. (2007). UVA Induces Granzyme B in Human Keratinocytes through MIF IMPLICATION IN EXTRACELLULAR MATRIX REMODELING. *J. Biol. Chem.* 282, 8157–8164.
- Hüll, M., Fiebich, B.L., Lieb, K., Strauss, S., Berger, M., Volk, B., and Bauer, J. (1996). Interleukin-6-associated inflammatory processes in Alzheimer's disease: New therapeutic options. *Neurobiol. Aging* 17, 795–800.
- Koarai, A., Yanagisawa, S., Sugiura, H., Ichikawa, T., Kikuchi, T., Furukawa, K., Akamatsu, K., Hirano, T., Nakanishi, M., Matsunaga, K., et al. (2012). 25-Hydroxycholesterol enhances cytokine release and Toll-like receptor 3 response in airway epithelial cells. *Respir. Res.* 13, 63.
- Kong, Q., Wang, M., Liao, Z., Camden, J.M., Yu, S., Simonyi, A., Sun, G.Y., Gonzalez, F.A., Erb, L., Seye, C.I., et al. (2005). P2X7 nucleotide receptors mediate caspase-8/9/3-dependent apoptosis in rat primary cortical neurons. *Purinergic Signal.* 1, 337–347.
- Le Feuvre, R., Brough, D., and Rothwell, N. (2002). Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 261–269.
- Le Goff, D., Viville, C., and Carreau, S. (2006). Apoptotic effects of 25-hydroxycholesterol in immature rat Sertoli cells: prevention by 17 β -estradiol. *Reprod. Toxicol.* 21, 329–334.
- Lee, T., and Chau, L. (2001). Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C709–718.
- Li, S.-Q., Yu, Y., Han, J.-Z., Wang, D., Liu, J., Qian, F., Fan, G.-H., Bucala, R., and Ye, R.D. (2015). Deficiency of macrophage migration inhibitory factor attenuates tau hyperphosphorylation in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 12, 177.

- Lim, H.-K., Kang, H.-K., Yoo, E.-S., Kim, B.-J., Kim, Y.-W., Cho, M., Lee, J.-H., Lee, Y.-S., Chung, M.-H., and Hyun, J.-W. (2003). Oxysterols induce apoptosis and accumulation of cell cycle at G(2)/M phase in the human monocytic THP-1 cell line. *Life Sci.* 72, 1389–1399.
- Liu, L., and Chan, C. (2014). The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* 15, 6–15.
- Lordan, S., Mackrill, J.J., and O'Brien, N.M. (2009). Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J. Nutr. Biochem.* 20, 321–336.
- Marcellino, D., Suárez-Boomgaard, D., Sánchez-Reina, M.D., Aguirre, J.A., Yoshitake, T., Yoshitake, S., Hagman, B., Kehr, J., Agnati, L.F., Fuxe, K., et al. (2010). On the role of P2X7. *J. Neural Transm.* 117, 681–687.
- Mattson, M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 120–130.
- Mitchinson, M.J., Hardwick, S.J., and Bennett, M.R. (1996). Cell death in atherosclerotic plaques. *Curr. Opin. Lipidol.* 7, 324–329.
- Nassar, K., Grisanti, S., Elfar, E., Lüke, J., Lüke, M., and Grisanti, S. (2015). Serum cytokines as biomarkers for age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol. 253, 699–704.
- Nishihira, J. (2000). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 20, 751–762.
- Olivier, E., Dutot, M., Regazzetti, A., Leguillier, T., Dargere, D., Auzeil, N., Laprevote, O., and Rat, P. (2016a). P2X7-Pannexin-1 and amyloid β -induced oxysterol input in human retinal cell: Role in age-related macular degeneration? *Biochimie.*
- Olivier, E., Dutot, M., Regazzetti, A., Dargère, D., Auzeil, N., Laprèvote, O., and Rat, P. (2016b). Lipid deregulation in UV irradiated skin cells: Role of 25-hydroxycholesterol in keratinocyte differentiation during photoaging. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*
- Pelegri, P., Barroso-Gutierrez, C., and Surprenant, A. (2008). P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1 β in mouse macrophage. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 7147–7157.
- Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2016). Purinergic signaling in retinal degeneration and regeneration. *Neuropharmacology* 104, 194–211.
- Rodríguez, I.R., and Larrayoz, I.M. (2010). Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration. *J. Lipid Res.* 51, 2847–2862.
- Rohn, T.T. (2010). The role of caspases in Alzheimer's disease; potential novel therapeutic opportunities. *Apoptosis* 15, 1403–1409.
- Ruiz-Argüelles, A., Brito, G.J., Reyes-Izquierdo, P., Pérez-Romano, B., and Sánchez-Sosa, S. (2007). Apoptosis of melanocytes in vitiligo results from antibody penetration. *J. Autoimmun.* 29, 281–286.
- Sadek, H.L. (2014). The Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *J. Alzheimers Dis. Park.* 4.

- Shimizu, T. (2005). Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. *J. Dermatol. Sci.* 37, 65–73.
- Travert, C., Carreau, S., and Le Goff, D. (2006). Induction of apoptosis by 25-hydroxycholesterol in adult rat Leydig cells: protective effect of 17 β -estradiol. *Reprod. Toxicol.* Elmsford N 22, 564–570.
- Wakx, A., Dutot, M., Massicot, F., Mascarelli, F., Limb, G.A., and Rat, P. (2015). Amyloid β Peptide Induces Apoptosis Through P2X7 Cell Death Receptor in Retinal Cells: Modulation by Marine Omega-3 Fatty Acid DHA and EPA. *Appl. Biochem. Biotechnol.*
- Watanabe, H., Shimizu, T., Nishihira, J., Abe, R., Nakayama, T., Taniguchi, M., Sabe, H., Ishibashi, T., and Shimizu, H. (2004). Ultraviolet A-induced Production of Matrix Metalloproteinase-1 Is Mediated by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Human Dermal Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279, 1676–1683.
- Yu, H.-S., Chang, K.-L., Yu, C.-L., Li, H.-F., Wu, M.-T., Wu, C.-S., and Wu, C.-S. (1997). Alterations in IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α , and IFN- γ Release by Peripheral Mononuclear Cells in Patients with Active Vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 108, 527–529.
- Zapata, J.M., Takahashi, R., Salvesen, G.S. and, and Reed, J.C. (1998). Granzyme release and caspase activation in activated human T-lymphocytes. *J Biol Chem* 273, 6916–6920.
- Zarrouk, A., Vejux, A., Mackrill, J., O’Callaghan, Y., Hammami, M., O’Brien, N., and Lizard, G. (2014). Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res. Rev.* 18, 148–162.
- Zorn-Kruppa, M., Volksdorf, T., Ueck, C., Zöller, E., Reinshagen, K., Ridderbusch, I., Bruning, G., Houdek, P., Moll, I., and Brandner, J.M. (2016). Major cell biological parameters of keratinocytes are predetermined by culture medium and donor source. *Exp. Dermatol.* 25, 242–244.