



HAL
open science

Rôle du canal TRPV3 dans le défaut de thermorégulation vasculaire cutanée au cours du vieillissement

Lisa S Martin

► **To cite this version:**

Lisa S Martin. Rôle du canal TRPV3 dans le défaut de thermorégulation vasculaire cutanée au cours du vieillissement. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard Lyon 1, 2023. Français. NNT: . tel-04590623

HAL Id: tel-04590623

<https://theses.hal.science/tel-04590623>

Submitted on 28 May 2024

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.



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé (EDISS)

Discipline :
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutenue publiquement le 26/09/2023, par :
Lisa MARTIN

Rôle du canal TRPV3 dans le défaut de thermorégulation vasculaire cutanée au cours du vieillissement

Devant le jury composé de :

DUCRET Thomas - PU
FERAL Chloé - DR INSERM
VINET-JULLIAN Agnès - PU
VAN COPPENOLLE Fabien - PU

Université de Bordeaux
U1081 IRCAN
Université Avignon
Université Claude Bernard Lyon 1

Rapporteur
Rapporteuse
Rapporteuse
Examineur

FROMY Bérengère - DR CNRS
CHEVALIER Fabien - MCU

UMR5305 LBTI
Université Claude Bernard Lyon 1

Directrice de thèse
Co-encadrant

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

- | | |
|---|-------------------------|
| - Président de l'Université | M. Frédéric FLEURY |
| - Président du Conseil Académique | M. Hamda BEN HADID |
| - Vice-Président du Conseil d'Administration | M. Didier REVEL |
| - Vice-Présidente de la Commission de formation | Mme Céline BROCHIER |
| - Directeur Général des Services | M. Pierre ROLLAND |
| - Vice-Président Numérique, pilotage, modernisation et performance | M. Philippe MALBOS |
| - Vice-Président Relation hospitalo-universitaires | M. Jean-François MORNEX |
| - Vice-Présidente Relations internationales et affaires européennes | Mme Hélène COURTOIS |
| - Vice-Président Moyens financiers | M. Christophe VITON |
| - Vice-Président Patrimoine immobilier et développement des campus | M. David AMANS |
| - Vice-Président Affaires sociales, culturelles et sportives | M. Marc BARBAIRE |
| - Vice-Président personnels BIATSS | M. Frédéric FERRAND |

COMPOSANTES SANTE

- | | |
|--|---------------------------|
| - Comité de Coordination des Etudes Médicales | Mme Carole BURILLON |
| - Faculté d'Odontologie | M. Jean-Christophe MAURIN |
| - Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux | M. Philippe PAPAREL |
| - Faculté de Médecine Lyon-Est Doyen : | M. Gilles RODE |
| - Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation | M. Jacques LUAUTE |
| - Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques | M. Claude DUSSART |

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

- | | |
|---|--------------------------|
| - Département Génie Electrique et des Procédés Directrice | Mme Rosaria FERRIGNO |
| - Département Informatique | M. Saida BOUAKAZ BRONDEL |
| - Département Mécanique Directeur | M. Marc BUFFAT |
| - Institut de Science Financière et d'Assurances Directeur | M. Nicolas LEBOISNE |
| - Institut National du Professorat et de l'Education Directeur | M. Pierre CHAREYRON |
| - Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 Directeur | M. Michel MASSENZIO |
| - Observatoire de Lyon Directrice | M. Bruno GUIDERDONI |
| - Polytechnique Lyon Directeur | M. Emmanuel PERRIN |
| - UFR Biosciences | Mme Kathrine GIESELER |
| - UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS) Directeur | M. Guillaume BODET |
| - UFR Faculté des Sciences Directeur | M. Bruno ANDRIOLETTI |

Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier temps l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour l'intérêt porté à ce travail. Je souhaite remercier le Docteur **Chloé Féral**, le Professeure **Agnès Vinet-Jullian** et le Professeur **Thomas Ducret** d'avoir accepté sans hésiter d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également au Professeur **Fabien Van Coppenolle** qui siège dans mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse **Bérengère Fromy** et mon co-encadrant de thèse **Fabien Chevalier**, de m'avoir accompagnée et donnée tous les moyens pour réaliser cette thèse. Je vous remercie de votre confiance, de votre disponibilité, de tous vos conseils pertinents, et surtout du temps passé sur ce manuscrit de thèse. Je vous remercie de m'avoir transmis vos expertises et de m'avoir donné autant d'autonomie. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir challengée, et d'avoir su me recentrer lorsque mon stress était à son maximum. La complémentarité de votre duo a vraiment été un atout pour moi, aussi bien du côté professionnel qu'amical. Je vous remercie de vous êtres autant investis dans ma thèse, et je vous souhaite de très belles poursuites de projets.

Merci **Bérengère** de m'avoir incluse dans tes divers projets. Je n'oublierais pas notre petit « Fast and Furious » des Pays-Bas, et toutes nos péripéties lors de ce déplacement professionnel, qui sont maintenant de très bons souvenirs ! Je te remercie de m'avoir transmis ta rigueur et ta passion pour la science. Merci de t'être toujours rendue disponible quand j'étais bloquée, et d'avoir tout mis en œuvre pour que cette thèse se déroule dans les meilleures conditions.

Merci **Fabien** d'avoir eu la foi de supporter mon cerveau qui débordait d'informations, mon caractère, et mes moments de paniques (assez fréquents je l'admets). Je te remercie de m'avoir écouté et essayé de me redonner la motivation quand rien n'allait dans le droit chemin. Merci pour ta patience, tous tes conseils, ta bienveillance, et pour ces moments de rigolade qui m'ont permis de sortir du contexte scientifique l'histoire de quelques minutes. Enfin, je te remercie de m'avoir accompagnée lors de nos sorties running et compétitions de trail. Et bien évidemment, merci pour ces mojitos plus que mérités !

Je remercie mes deux membres de comité de suivi de thèse, Docteur **Nicolas Lebonvallet** et Professeur **Fabien Van Coppenolle**, pour leur bienveillance, leurs conseils et les discussions scientifiques autour de mon projet de thèse. Je vous remercie également pour l'intérêt porté à mon projet et de votre grande disponibilité.

Je remercie le Docteur **Dominique Sigaud-Roussel** de m'avoir accueillie au sein du « Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutiques », et le **Professeur Jérôme Lamartine** (en co-direction avec Bérengère Fromy) de m'avoir accueillie dans l'équipe SKIN.

Je remercie tous mes collègues de travail qui ont su me supporter pendant ces trois formidables années de thèse. Je suis ravie d'avoir eu un groupe d'amis aussi soudés, à l'écoute et drôle.

Je remercie **Théo Barthélémy**, pour m'avoir soutenue et aidé lors de cette thèse aussi bien techniquement que mentalement. Tes mimiques, tes bruitages farfelus (AFWIHAN, CHB et j'en passe), ta répartie et tes blagues (que je ne comprends pas) m'auront bien fait rire. Tes mini-bombes de carboglace ont failli me coûter une chirurgie faciale et un écran d'ordinateur. Cependant, au-delà de ton côté comique, tu es une personne talentueuse et intelligente (trop même...) ! Il ne fait nul doute que tu seras un excellent scientifique. Je te souhaite du courage (oui il en faut finalement) pour finir ta thèse en beauté !! Et je finirai par un petit « Okayy let's go ».

Je remercie **Emma Fraillon**, d'avoir accepté d'être ma stagiaire et de son aide précieuse en culture. Je m'excuse de t'avoir généré autant de stress pendant ton stage, qui devait surement être la cause des petites coquilles techniques. Néanmoins, je suis fière de ta réussite à l'école doctorale, et que tu sois autant investie dans ton projet ! Tu es une personne pétillante (sauf quand tu pleures), pleine de joie de vivre et toujours en train de rire. J'ai été ravie de partager mon bureau avec toi, merci d'avoir ouvert une mini-épicerie dans le bureau (tes gâteaux m'ont réconfortée), et d'avoir su me remonter le moral. Je te souhaite une très bonne continuation avec notre fidèle TRPV3 !

Je remercie **Lucile Guillot**, la lul, pour son soutien et sa délicatesse qui viennent contraster son franc parler. Tes actions et ta gestuelle ont animé mes journées ! Tes répliques et vidéos de Britney ont su me faire rire, et j'espère sincèrement que tu me dédiceras une chorégraphie ! J'ai été ravie de partager mon bureau avec toi quelques mois, même si on papotait plus qu'on ne travaillait. Je me réjouis que ton projet avance et que tu retrouves enfin ta motivation de départ ! Ne lâche rien !

Je remercie **Justine Dugrain**, pour sa bienveillance et compassion. Tu es une personne douce et attentionnée qui se soucie des autres (peut-être trop !), et toujours de très bonne humeur. Je te souhaite une belle continuation de thèse.

Je remercie **Thomas El Jammal**, pour ses corrections et les analyses statistiques. Ton écran d'ordinateur et tes lignes de codes m'ont terrorisé. Je te remercie pour ton aide sur R, pour l'analyse du sécrétome qui a été assez compliquée, et dont je m'excuse pour le temps que je t'ai fait perdre ! Je n'ai jamais compris vos blagues avec Théo, mais elles devaient sûrement être drôles... Je te souhaite un bon retour en France, et une très belle fin de thèse.

Merci à **Julie Rorteau**, ex-doctorante de l'équipe SKIN, qui m'a plus que soutenue lors de mes deux premières années de thèse. Tu as été un repère lors de mes premiers mois en tant que doctorante. Tu m'as redonné confiance en moi et en la culture cellulaire. Je te remercie pour tous ces fous rires, les vidéos drôles, et d'avoir accepté de subir mes fractionnés qui t'ont quand même permis de faire une belle performance à la Marseille-Cassis.

Merci à **Audrey Josset-Lamaugarny** pour sa précieuse aide en expérimentation animale. Je te remercie pour ces 5 mois de manipulation intense, mais qui ont donné un vrai sens à ma thèse. Je ne sais pas si je dois te remercier pour cette fameuse course à pied où tu m'as mis un KO technique, mais au moins ça m'aura aérée ! Merci pour tout le temps que tu as consacré à mon projet aussi bien techniquement qu'informatiquement.

Je remercie **Géraldine Aimond**, mon encadrante de M2, pour l'aide technique apportée lors de cette thèse. J'espère que ta découpe d'étiquettes va bientôt se terminer ! Je te remercie pour ton aide concernant la récolte d'échantillons et les ELISA, et pour tous ces petits ragots qui nous ont fait tomber des nues ! Je te souhaite une excellente poursuite en Guyane et n'oublie pas ta crème solaire !

Je remercie **Shérine Montillet**, ma copilote, pour ces longues réflexions et discussions scientifiques lors de nos embouteillages. Merci pour ta motivation et ta joie de vivre matinale qui m'ont permis d'arriver de bonne humeur au labo. Je m'excuse de t'avoir initié à l'insertion au niveau des zebras, ... mais tu t'en sors pas mal. Même si tu as du mal à l'admettre, tu as fait un travail incroyable pour ta thèse, et je suis persuadée que ta soutenance sera géniale. Bon courage la shéshé pour ces derniers mois de thèse, mais je suis sûre que tu y arriveras.

Merci à **Sandra Couturier**, pour son aide polyvalente tel un vrai doobby. Merci d'avoir toujours été à l'écoute et d'avoir essayé de trouver les bons mots. Je te remercie d'avoir été franche, et de m'avoir proposé ton aide à plusieurs reprises. J'ai honte de dire que nos talents de chanteuses ont fait trembler les murs de toute l'équipe SKIN tellement c'était faux. Je suis

ravie que tu sois de retour au LGBTI, et j'espère que ta poursuite professionnelle sera aussi géniale que tu ne l'es.

Merci à **Lara Jobeili**, de m'avoir aidée et soutenue lors de cette thèse. Tu m'as appris à maîtriser mon stress, à me poser, et à toujours voir le côté positif. J'espère que tes jum's seront aussi aimables que toi, et je suis persuadée que tu seras une super maman !!

Je remercie également **Nicolas Picard**, **Christelle Bonod**, **Jocelyne Vial**, **Jean-Edouard Margotin**, **Kiaoling Liu**, **Ming Lo**, **Axel Couturier**, **Violaine See** et **Elise Belaidi** pour votre sympathie et vos conseils.

Merci aux Brestois, Docteur **Nicolas Lebonvallet** et Docteur **Ophélie Pierre**, de m'avoir accueillie si gentiment, et de m'avoir permis d'obtenir mes premières analyses d'imagerie calcique. Ce séjour aura été intense, mais plein de bons souvenirs. Merci à Nicolas de m'avoir hébergée, guidée, conduite au laboratoire pratiquement tous les jours, et de m'avoir fait découvrir votre ville. Merci à Ophélie pour son soutien, ses conseils et pour cette soirée pizza.

Merci au Docteur **Sylvie Ducreux**, de m'avoir permis d'accéder à la plateforme d'imagerie calcique du CarMeN pour finaliser mes analyses.

Merci à **Cindy Dieryckx**, pour m'avoir formé à la préparation d'échantillons pour la spectrométrie de masse. Merci pour tout le temps que tu as consacré à mon projet et à l'analyse des données. Je remercie également **Adeline Page** et **Frédéric Delorme** de la plateforme PSF pour le traitement et l'analyse des résultats de spectrométrie de masse.

J'adresse également un immense merci à mes parents. Merci de m'avoir toujours suivie et soutenue dans mes études. Vous n'avez jamais cessé de croire en moi, de m'encourager et de me reconforter. Vous m'avez toujours guidée dans mes choix personnels et scolaires, et je vous en remercie. Si j'en suis là aujourd'hui c'est en grande partie grâce à vous. Merci ! Je remercie aussi mon frère qui, même s'il ne le montre pas, se soucie de mes projets personnels et professionnels.

Je remercie profondément la personne qui partage ma vie, **Tanguy**, pour son aide et sa présence quotidienne. Tu es un pilier, mon confident et je te remercie d'avoir (en partie) écouté tous mes problèmes et anecdotes. Je te remercie pour tes petits plats (sans crème ça m'arrangerait encore mieux), tous ces voyages à l'autre bout du monde, toutes ces randonnées

(oui des fois j'en ai eu marre), toutes ces courses et entraînements. Tu as toujours cru en moi et en ma réussite, même quand j'étais au plus bas. Tu m'as toujours remotivée que ce soit après un entraînement raté, une manipulation ou une journée foireuse. Tu as su me sortir (non sans mal) la tête de mes manipulations et de mes réflexions scientifiques, et maintenant je réalise que c'était pour mon bien. Merci, de m'avoir offert (avec mes parents que je remercie encore) ma meilleure amie, Taïga, qui s'assure de mon oxygénation quotidienne ! Je te remercie pour tout.

Table des matières

– Liste des abréviations.....	1
– Liste des tableaux	3
– Liste des figures	4
Avant-propos.....	7
Introduction.....	9
I. La peau	10
– Le tissu adipeux sous-cutané.....	12
– Le derme.....	13
1) La matrice extracellulaire (MEC)	14
2) Les cellules dermiques	14
3) La jonction dermo-épidermique (JDE).....	16
– L'épiderme.....	17
1) Couche basale :	19
2) Couche épineuse	21
3) Couche granuleuse.....	22
4) Couche cornée.....	22
– Annexes cutanées	22
1) Le poil	22
2) La glande sébacée	24
3) Les glandes sudoripares	24
– Fonctions de la peau	25
1) Fonction barrière.....	25
2) Régulation hydrique	26
3) Synthèse de vitamine D.....	26
4) Fonction antioxydante	27
5) Fonction sensorielle	27
6) Thermorégulation	29
II. La microcirculation cutanée et les mécanismes de vasodilatation	32
– La microcirculation cutanée	33
1) Structure des vaisseaux sanguins.....	33
2) Organisation de la microcirculation cutanée	34
– Mécanismes de vasodilatation à la chaleur.....	35
1) Régulation par l'endothélium.....	35
2) Régulation par le système nerveux autonome	36
3) Régulation par le système nerveux sensoriel.....	36

4)	Régulation novatrice par les kératinocytes épidermiques	37
5)	Analyse fonctionnelle de la réponse vasculaire	38
III.	Les thermo-senseurs cutanés.....	42
–	Les canaux TRP.....	43
1)	Les Thermo-TRP.....	44
2)	Le canal TRPV3	45
IV.	Le vieillissement cutané et les modifications vasculaires	49
–	L’effet du vieillissement extrinsèque sur la peau	50
1)	L’hygiène de vie.....	51
2)	Les polluants.....	51
3)	Les radiations solaires	51
4)	Effet de la température.....	52
–	Le vieillissement intrinsèque à l’échelle de la peau	52
1)	Modification de l’épiderme.....	53
2)	Altérations du derme	57
3)	Altération de la fonction vasculaire	58
4)	Altération de la thermorégulation	61
	Objectifs de la thèse.....	63
	Matériels et Méthodes.....	66
I.	Techniques de biologie cellulaire	67
–	Culture cellulaire.....	67
1)	Type cellulaire	67
2)	Isolement des kératinocytes	67
3)	Culture de kératinocyte.....	68
–	Différenciation 2D des kératinocytes	69
–	Transfection de siRNA sur kératinocytes primaires humains.....	70
1)	Préparation des cellules	70
2)	Réactifs	70
3)	Transfection	70
–	Transduction de shRNA sur kératinocytes primaires humains.....	71
1)	Ensemencement des cellules	71
2)	Préparation des réactifs	71
3)	Traitement.....	71
–	Etude de l’activation et inhibition du canal TRPV3	71
1)	Activation pharmacologique et thermique de TRPV3	72
2)	Inhibition pharmacologique de TRPV3	73

3) Etude de l'activité du canal TRPV3 par imagerie calcique (Fura2 -AM)	74
II. Techniques de biochimie	77
– Caractérisation des médiateurs dépendent de TRPV3	77
1) Mesure de l'ATP extracellulaire	77
2) Quantification de cytokines : Luminex multiplex	78
3) Analyse du sécrétome par spectrométrie de masse (MS/MS)	79
III. Techniques de biologies moléculaires	83
– Analyse de l'expression génique	83
1) Extraction des ARN messagers sur cellules	83
2) Extraction d'ARN sur tissu	83
3) Dosage ARN	85
4) RT-qPCR	85
IV. Techniques d'histologie	87
– Immunofluorescence sur tissu	87
1) Fixation des tissus	87
– Immunofluorescence sur cellule	88
1) Fixation des cellules	88
2) Perméabilisation	88
3) Blocage et immunomarquage	88
– Hybridation in-situ à transcrit unique (RNAscope®)	89
V. Expérimentation animale	91
– Les animaux	91
– Tests comportementaux	91
1) Le Tail-Flick	91
2) Le Hot plate	92
– Mesure de la perte en eau trans-épidermique (TEWL)	92
– Mesure de la réponse vasculaire	92
1) Iontophorèse ACh et SNP	92
2) Chauffage local	93
3) Chauffage globale	93
Résultats de thèse	95
I. Article scientifique	96
– Résumé	96
– Article scientifique	98
II. Résultats complémentaires	124

–	Effet du vieillissement sur les fonctions de la peau dans un modèle murin	124
1)	Effet du vieillissement sur les capacités d’adaptation au chauffage global chez la souris.....	124
2)	Modifications épidermiques et caractéristiques du vieillissement cutané	128
3)	Discussion.....	130
–	Evaluation de l’expression et de l’activité de TRPV3 au cours du vieillissement chronologique .	132
1)	Expression de TRPV3 au cours du vieillissement.....	132
2)	Evaluation de l’activation et activité de TRPV3	135
3)	Discussion.....	145
–	Identification et évolution des médiateurs dépendants de TRPV3 avec l’âge.....	147
1)	Sécrétome des kératinocytes (Analyse 16plex MS/MS)	147
2)	ELISA Multiplex.....	149
3)	RT-qPCR des gènes pro-inflammatoires	150
4)	Discussion.....	152
	<i>Discussion</i>.....	154
–	La thermorégulation vasculaire cutanée au cours du vieillissement.....	155
–	Mécanismes de régulation de l’expression de TRPV3 dans les kératinocytes	159
–	Communication TRPV3 dépendante entre kératinocytes et micro-vaisseaux dermiques	162
	<i>Conclusion</i>	165
	<i>Production scientifique</i>	168
	<i>Références</i>.....	170
	<i>Annexes</i>.....	192

– Liste des abréviations

°C : Degré Celsius	FLG : Filaggrine
2-APB : 2-Aminoethoxydiphenyl borate	GFP : Protéine à fluorescence verte
3'UTR : Région 3' non traduite	GFR α 3 : Récepteur de l'artémicine
ACh : Acétylcholine	GIEC : Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
ADN : Acide désoxyribonucléique	GR30 : Récepteur couplé à la protéine G30
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	HEK : Lignée embryonnaire de rein humain
AP-1 : Protéine activatrice 1	HPRT : Hypoxanthine phosphoribosyltransférase
APO : Centre antérieur préoptique hypothalamique	IAB : Acide iso-chlorogénique B
ARD : Domaine de répétition d'ankyrine	IB4- : Isolectine B4 négative
ARN : Acide ribonucléique	IGS15 : Protéine de type ubiquitine ISG15
ATP : Adénosine triphosphate	IL : Interleukine
AUC : Aire sous la courbe	iNOS : NO-synthase inductible
BNIP3L : BCL2 interacting protein 3 like	IR : Infrarouges
BP1 : Antigène 1 de la pemphigoïde bulleuse	IVL : Involucrine
BP2 : Antigène 2 de la pemphigoïde bulleuse	JAK : Janus kinases
Ca ²⁺ : Ion calcium	JAKi : Inhibiteurs des Janus kinases
CaMKII : kinase II dépendante de la calmoduline	JDE : Jonction dermo-épidermique
CAT : Cellule d'amplification transitoire	KLK : Kallistéine
CDKN1A : Inhibiteur de kinase dépendante de la cycline 1	KRT : Kératine
CDSN : Cornéodesmosine	LDF : Débitmètre laser à effet Doppler
CGRP : Peptide lié au gène de la calcitonine	LGALS1 : Galectine-1
CO ₂ : Dioxyde de carbone	L-NMMA : Inhibiteur de la NO-synthase, N(G)-monométhyl L-arginine
COX : Cyclooxygénase	LOR : Loricrine
Cre : Recombinase	LPA : Acide Alpha-Lipoïde
CSE : Cellules souches épidermiques	m/s : mètre par seconde
DETC : Cellules T dendritiques épidermiques	mA : Milliampère
DIEP : Lambeau perforant d'artère épigastrique inférieure profonde	MEC : Matrice extracellulaire
DRG : Ganglion de la racine dorsale	miARN : micro-ARN
EDHF : Facteur hyperpolarisant endothélial	MMP : Métalloprotéinase
EGFR : Récepteur aux facteurs de croissances épidermiques	MOI : multiplicité de l'infection
eNOS : NO-synthase endothéliale	NaCl : Chlorure de sodium
EROs : Espèces réactives de l'oxygène	Nav1.8 : Canal sodique
F340 : Intensité de fluorescence à 340nm	NF κ B : Facteur nucléaire kappa B
F380 : Intensité de fluorescence à 380nm	NGF : Facteur de croissance des nerfs
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes	nm : Nanomètre
	nNOS: NO-synthase neuronal

NO : Monoxide d'azote
 NP63 : Protéine tumeur 63
 O^{2-} : Anion superoxyde
 ONOO⁻ : Peroxynitrite
 p16^{INK4a} : Inhibiteur de kinase cycline-dépendante 2A
 P2X : Récepteur ionotropique purinergique de type 2
 P2Y : Récepteur métabotropique purinergique de type 2
 PACAP : Peptide activateur de l'adénylate cyclase hypophysaire
 PCNA : Antigène nucléaire de cellule proliférante
 PGE₂ : Prostaglandine E2
 PGH₂ : Prostaglandine H2
 PGI₂ : Prostaglandine I2
 PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
 PIV : Vasodilatation induites par la pression
 PKA : Protéine kinase A
 PKC : Protéine kinase C
 PLC : Phospholipase C
 RPL13A : Protéine ribosomique 60S L13a
 SA-β-gal : Bêta-galactosidase associée à la sénescence
 shRNA : Petits ARN en épingle à cheveux
 siRNA : Petits ARN interférents
 SIRT1 : Sirtuine 1
 SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
 SNP : Nitroprussiate de sodium
 SNX11 : Sorting nexin 11
 SOD : Superoxyde dismutase
 TAX₂ : Thromboxane A2
 TBP : Protéine de liaison TATA
 TEWL : Perte d'eau trans-épidermique
 TGF : Facteur de croissance transformant
 TIMP : Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
 TLR : Récepteur de type Toll
 TNF : Facteurs de nécrose tumorale
 TrkA : Récepteur kinase A de la tropomyosine
 TrkAC-KI : Remplacement du TrkA par TrkC
 TRP : Transient Receptor Potential channel
 Trpv3-KO : Invalidation du gène TRPV3
 UV : Ultraviolets
 VEGF : Facteur de croissance vasculaire
 VIP : Peptide intestinal vasoactif
 WT : Sourie contrôle

– **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Liste des antagonistes et concentrations testés..... 73
Tableau 2 : Comparaison de la localisation de TRPV3 dans l'abdomen humain selon les anticorps 134

– Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure de la peau poilue et des principales annexes cutanées ..	11
Figure 2 : Comparaison histologique d'une peau humaine et murine	12
Figure 3 : Le tissu adipeux sous-cutané	13
Figure 4 : Distinction entre le derme papillaire et réticulaire	14
Figure 5 : Représentation schématique de la composition et organisation du derme	15
Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation structurale de la jonction dermo-épidermique	16
Figure 7 : Représentation schématique des différentes cellules et couches de l'épiderme	18
Figure 8 : Comparaison histologique entre peau poilue et peau glabre	19
Figure 9 : Le complexe de différenciation épidermique	21
Figure 10 : Représentation schématique d'une unité pilosébacée	24
Figure 11 : Représentation schématique des terminaisons nerveuses sensorielles cutanées	28
Figure 12 : Représentation schématique de l'organisation de la microcirculation cutanée et des mécanismes cutanés de thermorégulation	31
Figure 13 : Les vaisseaux sanguins de la microcirculation cutanée	34
Figure 14 : Représentation schématique des mécanismes de régulation de la vasodilatation cutanée	37
Figure 15 : Représentation schématique du fonctionnement du laser Doppler	39
Figure 16 : Tracé typique d'une réponse vasculaire cutanée au chauffage local chez l'être humain	40
Figure 17: Principe de la iontophorèse -exemple de l'acétylcholine	41
Figure 18: La super famille des TRP	43
Figure 19 : Gamme d'activation des thermo-TRP	45
Figure 20 : Structure et régulateurs du canal TRPV3	46
Figure 21: Rôle de TRPV3 dans la réponse vasculaire cutanée à un chauffage local	48
Figure 22 : Facteurs impliqués dans le vieillissement extrinsèque- exposome	50
Figure 23 : Les marqueurs du vieillissement chronologique	53
Figure 24 : Comparaison histologique d'une peau humaine jeune et âgée	57
Figure 25 : Comparaison histologique d'un coussinet de souris jeune et âgée	57
Figure 26 : Effet du vieillissement sur la réponse vasculaire endothélium dépendante	60
Figure 27 : Chauffage global	126
Figure 28 : Suivi hebdomadaire de la température corporelle des souris âgées	127
Figure 29 : Suivi hebdomadaire du poids des souris âgées	128
Figure 30: Perte d'eau trans-épidermique sur la peau de souris (TEWL)	129
Figure 31 : Expression de marqueurs du vieillissement dans les coussinets de souris	129
Figure 32 : Immunofluorescence de TRPV3 sur peau d'abdomen de 30 ans	133
Figure 33: Immunofluorescence de TRPV3 sur peau d'abdomen de 60 ans	133
Figure 34 : Expression relative des TRPV dans les kératinocytes primaires en culture	134

<i>Figure 35 : Différenciation de kératinocytes primaires humains en culture 2D</i>	<i>135</i>
<i>Figure 36 : Effet d'une double stimulation de TRPV3 par le carvacrol et la chaleur</i>	<i>136</i>
<i>Figure 37 : Double stimulation de TRPV3 par le 2-APB et le carvacrol.....</i>	<i>137</i>
<i>Figure 38 : Stimulation de TRPV3 au 2-APB 50µM et carvacrol 300µM.....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 39 : Analyse de la répression de TRPV3 par transfection de siRNA</i>	<i>139</i>
<i>Figure 40 : Effet du siTRPV3 après stimulation TRPV3</i>	<i>139</i>
<i>Figure 41 : Transduction shTRPV3 à différentes MOI dans des kératinocytes primaires</i>	<i>141</i>
<i>Figure 42 : Transduction shTRPV3 à 100MOI dans des kératinocytes primaires</i>	<i>141</i>
<i>Figure 43 : Effet de l'IAB sur l'expression des TRPV après stimulation de TRPV3.....</i>	<i>142</i>
<i>Figure 44 : Expression de médiateurs après stimulation ou inhibition de TRPV3.....</i>	<i>143</i>
<i>Figure 45 : Analyse du flux calcique intracellulaire après stimulation des kératinocytes primaires humains jeunes et âgés au carvacrol 100µM.....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 46 : Protéines différenciellement sécrétées par les kératinocytes jeunes et âgés</i>	<i>148</i>
<i>Figure 47 : Protéines différenciellement sécrétées après stimulation du canal TRPV3 par les kératinocytes jeunes et âgés.....</i>	<i>149</i>
<i>Figure 48 : Médiateurs libérés après stimulation du canal TRPV3 dans les kératinocytes jeunes ou âgés</i>	<i>150</i>
<i>Figure 49 : Gènes exprimés après stimulation thermique et pharmacologique du canal TRPV3 dans les kératinocytes jeunes et âgés</i>	<i>151</i>
<i>Figure 50 : Expression de TRPV3 après stimulation pharmacologique et/ou thermique</i>	<i>152</i>
<i>Figure 51 : Vasodilatation induite par une chaleur local.....</i>	<i>164</i>

Avant-propos

Contexte général

Ce travail de thèse a débuté le 01 Octobre 2020 dans le Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie thérapeutique (CNRS, LBTI UMR5305) de Lyon Gerland, sous la direction du Docteur **Béregère Fromy** en co-encadrement avec le Docteur **Fabien Chevalier**.

Cette thèse a été réalisée dans l'équipe SKIN (**SK**in functional **IN**tegrity ou Intégrité Fonctionnelle du Tissu Cutané), co-dirigée par le Professeur Jérôme Lamartine et le Docteur Béregère Fromy. Les travaux de recherche menés dans l'équipe portent sur les mécanismes assurant la fonctionnalité de la peau saine ou fragilisée par des agressions externes ou internes. Les projets sont organisés en quatre axes : 1) le maintien de la fonctionnalité de la peau ; 2) les mécanismes de fragilisation de la peau ; 3) l'identification d'indicateurs de fragilité cutanée, 4) les stratégies thérapeutiques pour améliorer la fonctionnalité de la peau fragilisée.

Mon projet de thèse s'inscrit dans le premier axe de recherche de l'équipe SKIN, et fait suite aux travaux du Docteur Béregère Fromy. Les données publiées en 2018 (*Journal of Investigative Dermatology*) ont mis en évidence le rôle clé du canal TRPV3, un thermorécepteur kératinocytaire, dans la thermorégulation vasculaire cutanée. Cependant, comment les cellules épidermiques exprimant TRPV3 communiquent avec les micro-vaisseaux cutanés reste une question à résoudre. De plus, une altération de ce dialogue avec l'âge pourrait être associée aux défauts de thermorégulation face à la chaleur chez les personnes âgées.

Ce projet se décline donc en trois parties : 1) l'analyse fonctionnelle de la réponse vasculaire cutanée à un chauffage local ou global sur modèle murin jeune, âgé et *Trpv3*-KO ; 2) la caractérisation de l'expression et de l'activité du canal TRPV3 avec l'âge (modèle *ex vivo* et *in vitro*) ; 3) l'identification des médiateurs impliqués dans la communication entre les kératinocytes et les micro-vaisseaux dermiques après activation de TRPV3, et leurs devenir avec l'âge (*in vitro*).

Ce projet, exposant le kératinocyte en tant que senseur et transducteur de son environnement, permettra d'apporter de nouvelles connaissances dans les mécanismes de thermorégulation vasculaire cutanée dans une peau saine et vieillissante.

Manuscrit de thèse

Ce mémoire de thèse s'organise en huit parties :

- Une **introduction** bibliographique faisant un état de l'art des connaissances sur le tissu cutané, la microcirculation cutanée et mécanismes de vasodilatation, les thermo-senseurs cutanés, et enfin, le vieillissement du tissu cutané et les modifications vasculaires.

- Une partie **matériels et méthodes** décrivant précisément les techniques et outils utilisés lors de cette thèse.

- Une partie **résultats** qui se décline en 2 sections : 1) un résumé détaillé ainsi que l'article scientifique en révision dans le journal *Geroscience* (Juin 2023) qui traite de l'effet du vieillissement sur l'initiation de la vasodilatation cutanée médiée par TRPV3 en réponse à une chaleur locale ; 2) Une section « résultats complémentaires » qui renforce les données de l'article scientifique.

- Une **discussion** générale des résultats de thèse.

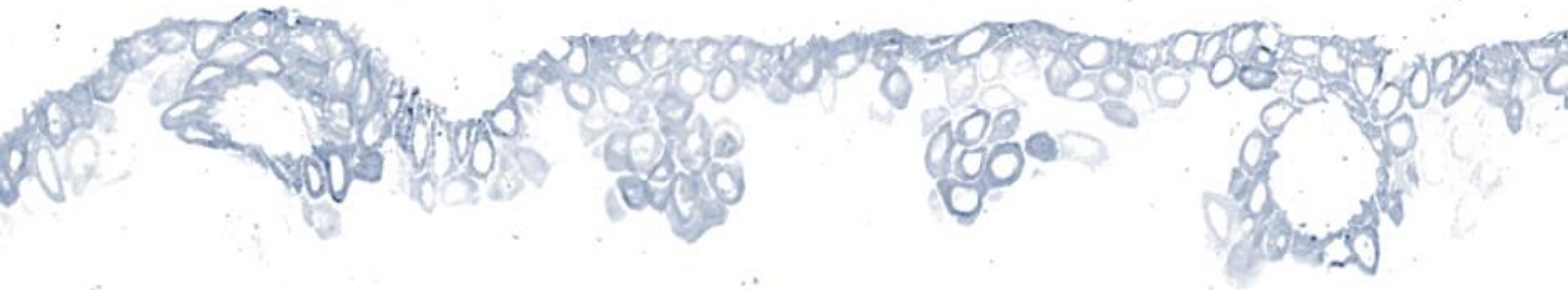
- Une partie **conclusions et perspectives**

- Les **productions scientifiques** incluant les articles et congrès auxquels j'ai participé, ainsi que les encadrements de stagiaires réalisés au cours de cette thèse.

- Les **références bibliographiques**

- Les **annexes** contenant les articles scientifiques que je signe en co-auteur (biomedicines 2022, Microsurgery 2023) et une revue scientifique publiée en première auteur (IntechOpen 2022).

Introduction



I. La peau



Introduction Chapitre I « La peau »

La peau est l'organe le plus large de notre corps (2m²) et représente 18% du poids à l'âge adulte. Cette enveloppe recouvrant l'intégralité de notre corps assure une protection physique, chimique et immunologique face à l'environnement extérieur. La peau permet également de donner de nombreuses informations sur l'identité de la personne : l'état de santé (fatigue, rougeurs...), l'origine ethnique (phototype clair ou foncé) ou encore l'âge (rides, tâches pigmentées...). De plus, la peau est un organe sensoriel capable de détecter de subtiles variations environnementales telles que les faibles pressions, le froid ou encore le chaud.

Cette enveloppe, en contact permanent avec l'environnement, se divise chez l'être humain en 3 couches majeures : une couche profonde, le tissu adipeux sous-cutané (hypoderme) ; puis une couche intermédiaire, le derme ; et enfin, une couche superficielle, l'épiderme [1,2] (**Figure 1**). La peau des rongeurs présente une couche musculaire supplémentaire située sous l'hypoderme, le *panniculus carnosus*. Ce muscle strié participe à la contraction et élasticité de la peau [3] (**Figure 2**). L'organisation cellulaire, matricielle et structurale de chaque couche est indispensable au maintien de l'intégrité de la peau. Un défaut de fonctionnalité d'une de ces couches conduit au développement de diverses pathologies cutanées [4,5].

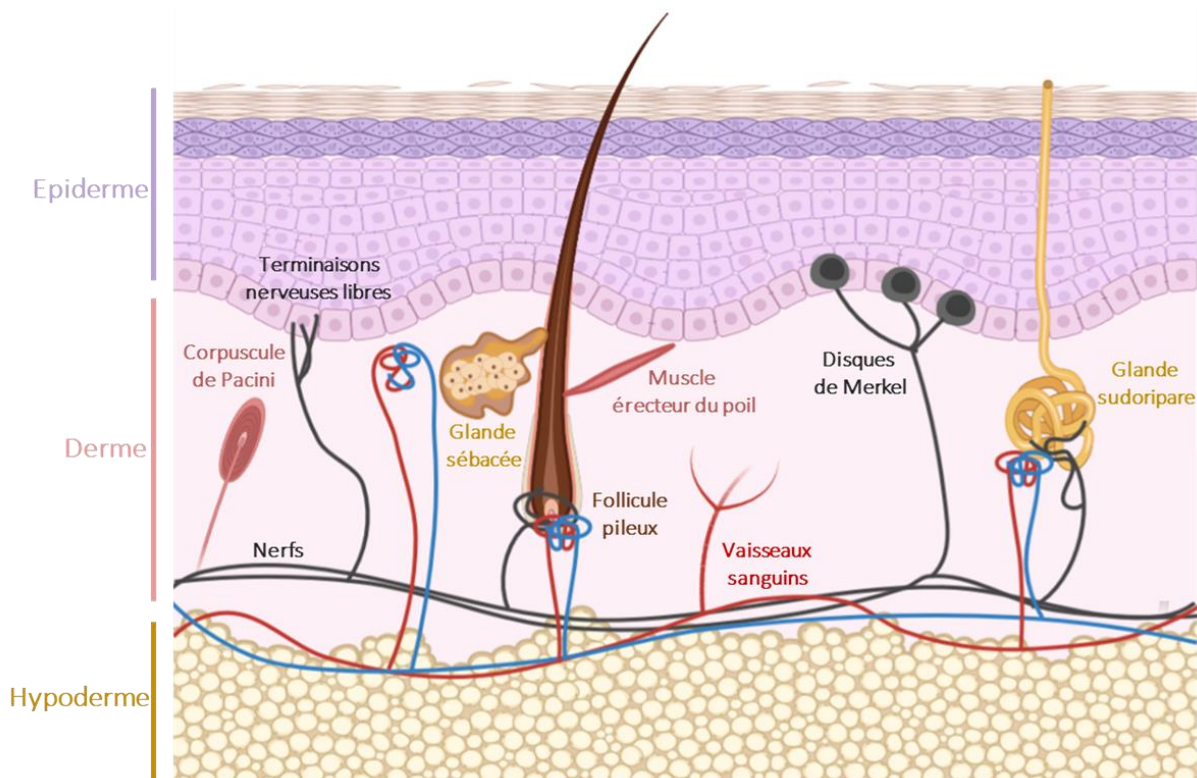


Figure 1 : Représentation schématique de la structure de la peau poilue et des principales annexes cutanées

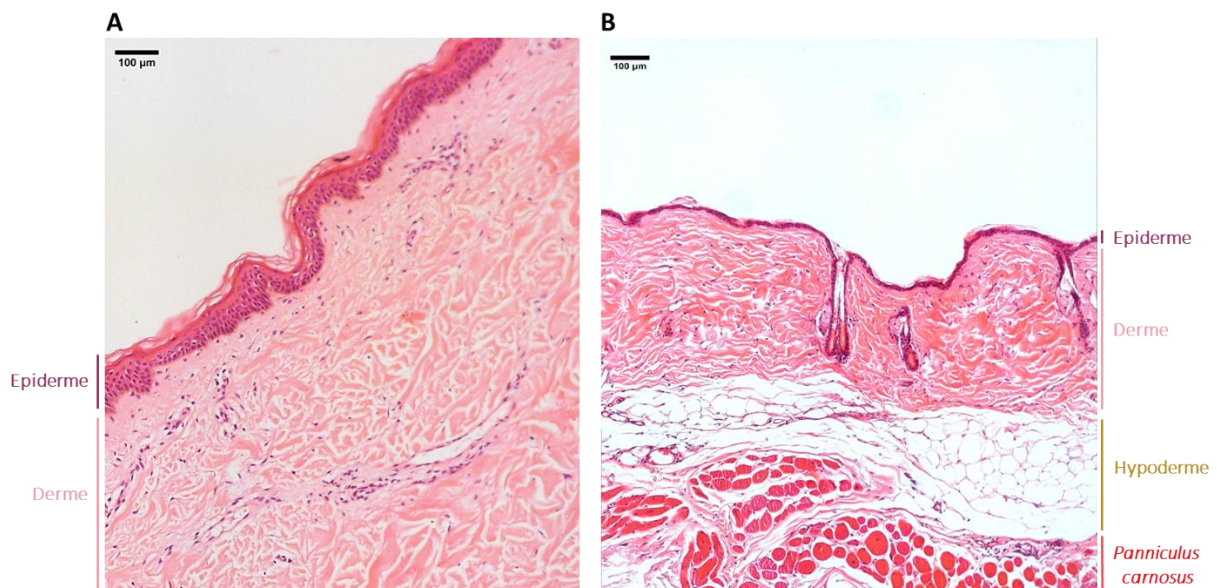


Figure 2 : Comparaison histologique d’une peau humaine et murine

Coupes histologiques d’une peau d’abdomen humain (A) et d’une peau de dos souris (C57BL6) (B) colorées à l’hématoxyline-éosine. La peau humaine est divisée en 3 couches : l’épiderme, le derme et le tissu adipeux sous-cutané (hypoderme) (non représenté sur l’image ci-dessus). La peau de souris contient une couche supplémentaire, le *panniculus carnosus*, situé sous le tissu adipeux sous-cutané. (Image : Lisa MARTIN).

– Le tissu adipeux sous-cutané

Le tissu adipeux sous-cutané ou hypoderme, d’origine mésodermique, correspond à la couche la plus profonde de la peau. Il est constitué de tissu conjonctif lâche et d’adipocytes organisés en lobules (**Figure 3**). Ce tissu fonctionne comme un réservoir énergétique. Les adipocytes stockent les nutriments en excès sous forme de lipides (triglycérides), qui peuvent être clivés en adénosine triphosphate (ATP), source majeure d’énergie cellulaire. L’hypoderme a également un rôle d’amortisseur vis-à-vis des chocs mécaniques, et thermorégulateur en modulant la balance lipogénèse/lipolyse selon l’environnement extérieur [6–8].

L’hypoderme est traversé par les réseaux sanguins, lymphatiques et nerveux. Il est irrigué par des artères de calibre moyen ($>50\mu\text{m}$), dont le prolongement permet d’apporter des nutriments aux tissus hypodermique et dermique. L’architecture de la microcirculation cutanée sera développée plus tard dans le manuscrit (« Partie II -La microcirculation cutanée et mécanismes de vasodilatation »).

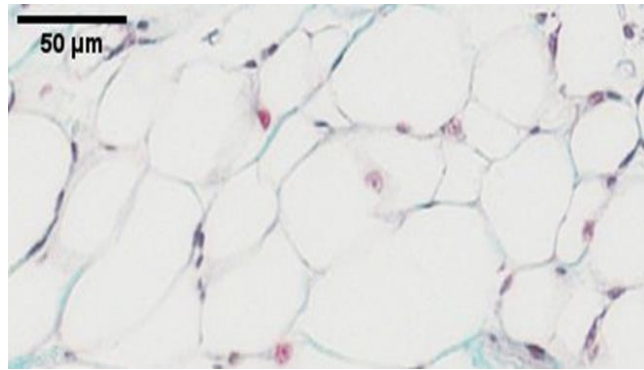


Figure 3 : Le tissu adipeux sous-cutané

Coupe histologique du tissu adipeux sous-cutané de souris (C57BL6) colorée au Trichrome de Masson. Les adipocytes sont organisés en lobules et sont connectés entre eux par du tissu conjonctif lâche. (Image : Lisa MARTIN)

– Le derme

Le derme, également d'origine mésodermique, forme la couche intermédiaire de la peau (environ 4mm), et assure la structure, la résistance et la flexibilité de celle-ci [4,9]. Ce tissu est principalement constitué de matrice extracellulaire (MEC) qui est entièrement sécrétée par les cellules majoritaires du derme, les fibroblastes. Le derme est divisé en deux parties. La partie supérieure, le derme papillaire, est en contact direct avec la jonction dermo-épidermique (JDE). Il forme des papilles dermiques qui s'imbriquent dans l'épiderme, favorisant les échanges et la cohésion avec l'épiderme. Cette partie du derme est riche en fibroblastes, et est composée de petites fibres de collagènes et d'élastines. A l'inverse, la couche profonde, le derme réticulaire, est plus épaisse et se compose principalement de grosses fibres de collagènes et élastiques. On note également une plus faible concentration de fibroblastes dans le derme réticulaire comparé au derme papillaire [10,11] (**Figure 4**).

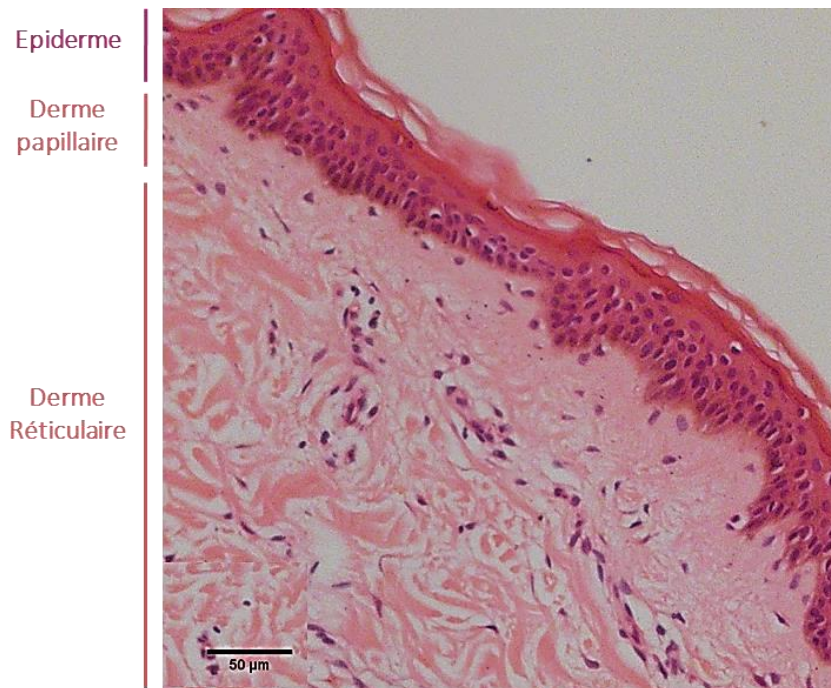


Figure 4 : Distinction entre le derme papillaire et réticulaire

Coupe histologique de peau humaine colorée à l'hématoxyline-éosine. Le derme papillaire est composé de petites fibrilles de collagènes, et est logé sous l'épiderme au contact de la JDE. Le derme réticulaire se situe sous le derme papillaire et est riche en grosses fibres de collagènes. (Image : Lisa MARTIN)

1) La matrice extracellulaire (MEC)

La MEC joue un rôle clé dans l'homéostasie et la réparation tissulaire. Elle forme un support physique aux différents types cellulaires du derme, tels que les fibroblastes, les cellules vasculaires et immunitaires. La MEC est composée de fibres protéiques, de glycoprotéines et de substance fondamentale. Parmi les composants fibreux du derme, on retrouve les fibres de collagènes (I, III et V) et les fibres élastiques assurant la résistance et l'élasticité de la peau. Les glycoprotéines, principalement fibronectines, sont des points d'ancrage assurant la fixation des cellules à la matrice. Enfin, la substance fondamentale contient des protéoglycanes et de l'acide hyaluronique qui assurent la rétention hydrique [12,13] (**Figure 5**).

2) Les cellules dermiques

Le derme est composé de nombreux types cellulaires, avec comme acteur principal le fibroblaste, une cellule mésenchymateuse fusiforme dont la morphologie varie en fonction de sa localisation (papillaire ou réticulaire) [11]. Outre la production de la MEC, les fibroblastes sont impliqués dans de nombreux processus, dont le remodelage de la MEC via la sécrétion de métalloprotéinases (MMP), la différenciation de cellules de type mésenchymateuses lors du

développement embryonnaire ou encore la cicatrisation en adoptant un phénotype de myofibroblaste [9,14].

La protection du derme est assurée par la présence de diverses cellules immunitaires comme les macrophages, les cellules dendritiques dermiques, les mastocytes, des lymphocytes T résidents mémoires et des lymphocytes T régulateurs [15](**Figure 5**).

Le derme est également très vascularisé, il comporte des cellules endothéliales, éléments majeurs des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les vaisseaux sanguins situés entre le derme et l'hypoderme se ramifient pour former le plexus profond, puis le plexus superficiel, et les capillaires situés dans le derme papillaire [16]. Le système lymphatique cutané, comme les vaisseaux sanguins, s'organise en deux plexus. Ils participent à l'élimination des excès de liquides dans les tissus, à la nutrition des cellules et à la réponse immunitaire en présence d'agents pathogènes [17].

Enfin le derme comporte toutes les annexes cutanées telles que le poil, les glandes sébacées et les glandes sudoripares. Des terminaisons nerveuses sensorielles sont également présentes dans le derme, dont certaines sont capables de passer la JDE pour innover l'épiderme.

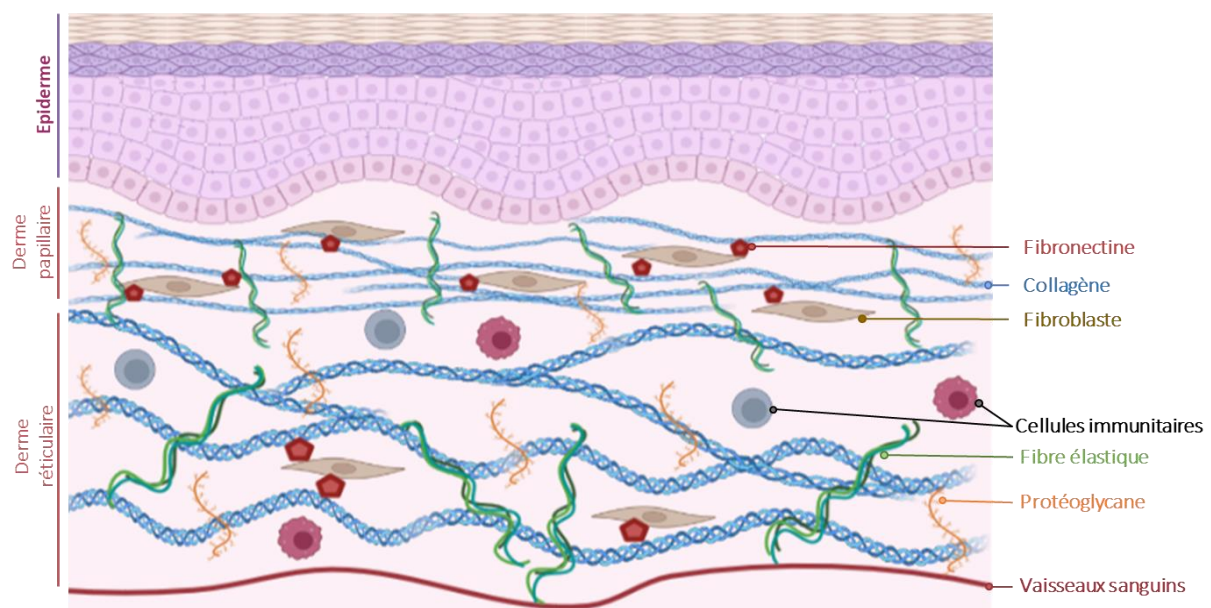


Figure 5 : Représentation schématique de la composition et organisation du derme

Le derme contient les fibroblastes qui sécrètent l'ensemble des composants de la matrice extracellulaire : les collagènes, les fibres élastiques, les protéoglycanes, et glycoprotéines comme la fibronectine. On retrouve également des cellules immunitaires et vaisseaux sanguins.

3) La jonction dermo-épidermique (JDE)

La JDE correspond à la lame basale située entre l'épiderme et le derme. Sa composition protéique et structurale assure l'adhérence des cellules épidermiques, et favorise les échanges entre l'épiderme et le derme. Les kératinocytes, principales cellules épidermiques, et les fibroblastes du derme papillaire contribuent à la création de la JDE qui se découpe en 3 sous-parties : la *lamina lucida*, la *lamina densa* et la zone fibrillaire (**Figure 6**).

Les hémidesmosomes sont composés de plectine, antigène 1 et 2 de la pemphigoïde bulleuse et d'intégrine $\alpha 6\beta 4$ et permettent l'ancrage des kératinocytes à la lame basale en se liant aux kératines 14 et 5 (KRT14 KRT5) [18,19].

La *lamina lucida* est une zone claire aux électrons. Elle contient des laminines, principalement laminine 332, qui se lient à l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ des hémidesmosomes, renforçant l'adhérence des kératinocytes.

La *lamina densa* est une zone dense aux électrons qui se compose de collagène IV, de glycoprotéines (nidogène) et protéoglycanes (perlécan) qui permettent de relier les laminines à la zone fibrillaire.

La zone fibrillaire, est composée de collagène de type VII qui forme des fibres d'ancrages avec les collagènes du derme papillaire (collagènes I et III) [18–20].

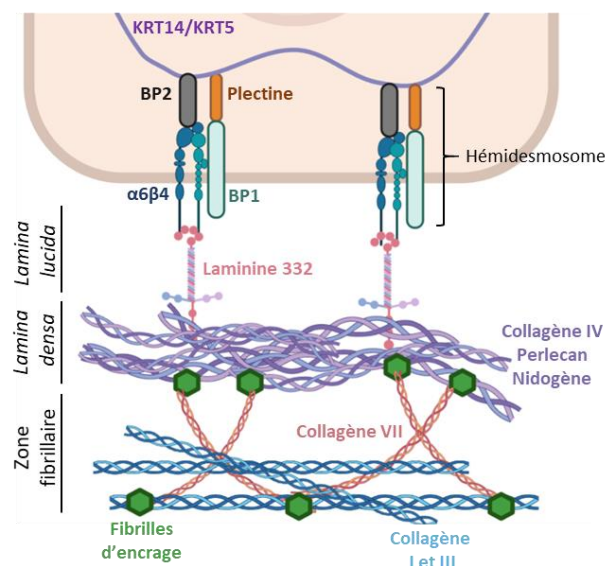


Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation structurale de la jonction dermo-épidermique

$\alpha 6\beta 4$ (intégrine $\alpha 6\beta 4$) ; BP1 (antigène 1 de la pemphigoïde bulleuse) ; BP2 (antigène 2 de la pemphigoïde bulleuse) ; KRT5 (kératine 5) et KRT14 (kératine 14).

– L'épiderme

L'épiderme, d'origine ectodermique, est la couche la plus superficielle de la peau (~100µm chez l'être humain contre ~25µm chez la souris) [21]. C'est un épithélium pluristratifié, non vascularisé, qui forme la première barrière physique et chimique entre l'environnement et notre corps. Pour maintenir cette fonction, les kératinocytes, cellules majoritaires de l'épiderme (90%), s'engagent continuellement dans un processus de différenciation vertical en plusieurs étapes, de la lame basale vers la couche externe, formant ainsi les quatre strates de l'épiderme. Les progéniteurs kératinocytaires en contact direct avec la lame basale, très prolifératifs, renouvellent la couche basale (*stratum basale*) par expansion horizontale. Lors de leur engagement en différenciation, ils vont migrer verticalement vers l'extérieur pour former la couche épineuse (*stratum spinosum*), puis la couche granuleuse (*stratum granulosum*) et finalement devenir des cornéocytes, retrouvés dans la couche cornée (*stratum corneum*). Ces cornéocytes seront par la suite éliminés par desquamation, permettant le renouvellement de l'épiderme (**Figure 7**). La durée de vie d'un kératinocyte est en moyenne de 28 jours, comprenant 14 jours de différenciation et 14 jours en tant que cornéocyte [2,4,5]. Chez le rongeur ce renouvellement est plus rapide de par la faible épaisseur de l'épiderme (~10 jours) [22]. Il est important de noter que les peaux glabres (dépourvues de poils), soit la paume des mains et les pieds chez l'être humain ou les coussinets et la queue chez la souris, présentent un épiderme et une couche cornée d'épaisseur plus importante [23] (**Figure 8**).

Bien que le kératinocyte soit la cellule principale de l'épiderme, il existe d'autres populations cellulaires dont les cellules immunitaires (cellules de Langherans), les mélanocytes, les cellules de Merkel et quelques terminaisons nerveuses sensorielles [5].

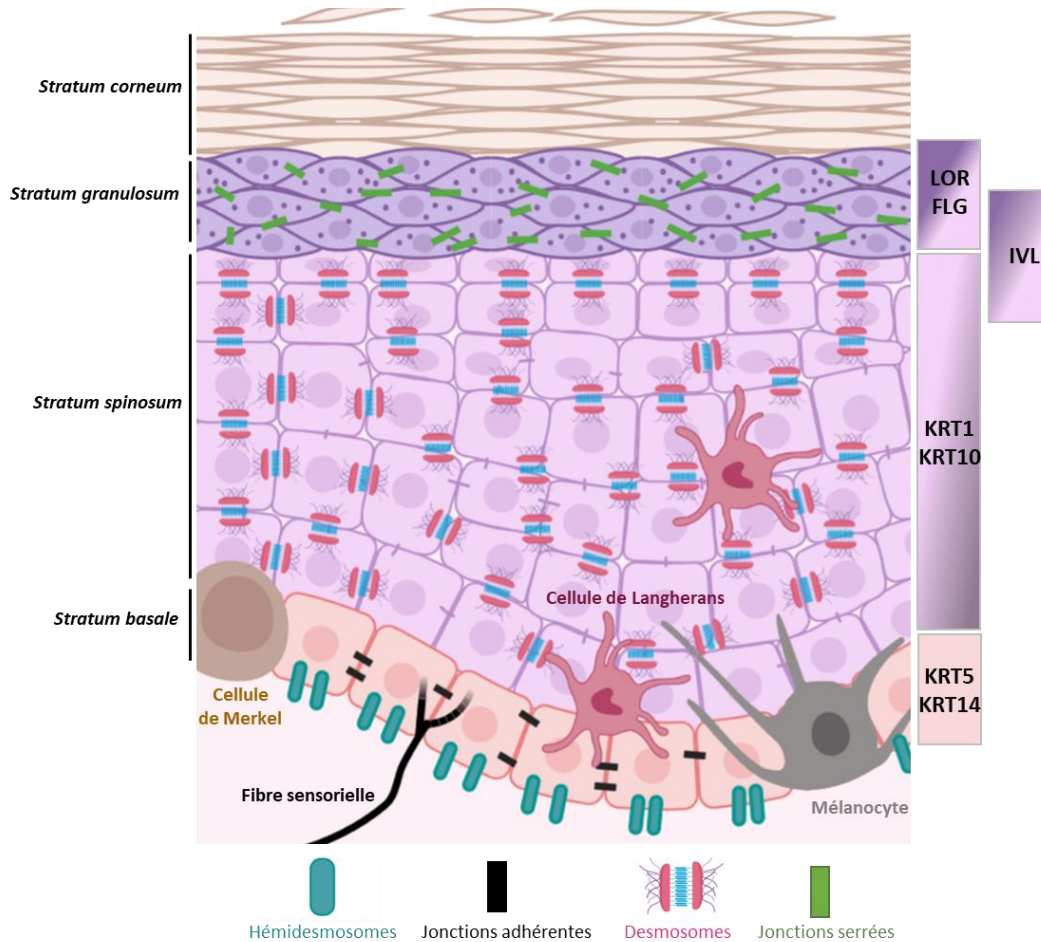


Figure 7 : Représentation schématique des différentes cellules et couches de l'épiderme

La couche basale (*stratum basale*) est principalement composée de kératinocytes (rose pâle) exprimant les kératines 5 et 14, liés entre eux par des jonctions d'adhérences et ancrés à la lame basale par des hémidesmosomes. On retrouve également des cellules de Merkel (marron), des mélanocytes (noir) et quelques cellules de Langerhans (rose). La couche épineuse (*stratum spinosum*) contient des kératinocytes différenciés exprimant de nouvelles kératines, KRT1/KRT10, et sont liés par des desmosomes. Au cours de leur différenciation les kératinocytes vont également exprimer l'involutrine (IVL). Les kératinocytes de la couche granuleuse (*stratum granulosum*) contiennent des granules de kératohyalines riches en lorricrine (LOR) et filaggrine (FLG). La différenciation terminale des kératinocytes forme la couche cornée composée de cornéocytes (*stratum corneum*).

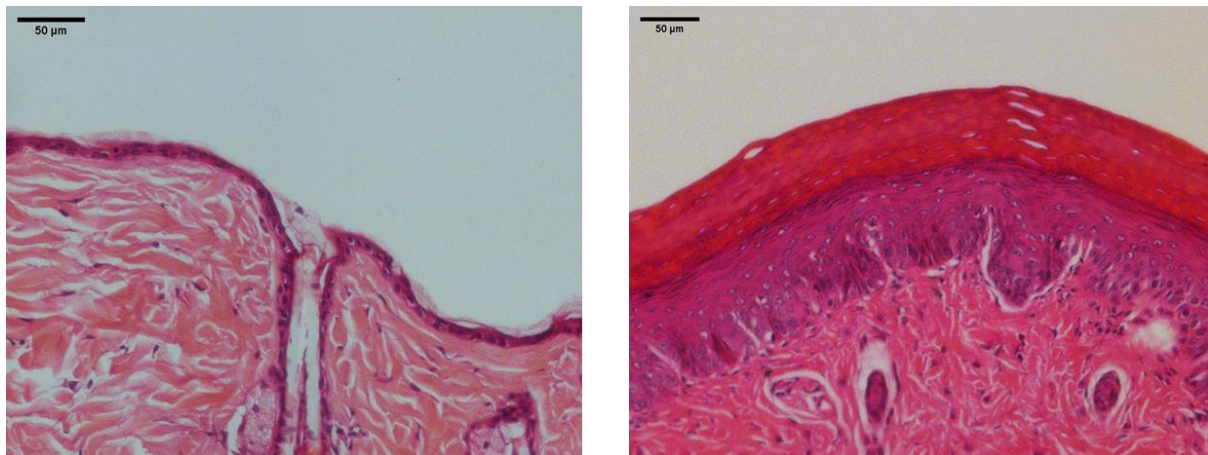


Figure 8 : Comparaison histologique entre peau poilue et peau glabre

Coupes histologiques de peaux de souris (C57BL6) colorées à l'hématoxyline-éosine. La peau du dos de souris présente un épiderme très fin, avec une couche cornée peu développée (A). On observe également la présence de follicules pileux et glandes sébacées. La peau de coussinet de souris (B) est une peau glabre. L'épiderme est très épais avec une couche cornée plus importante. (Image : Lisa MARTIN)

1) Couche basale :

La couche basale est composée d'une monocouche de kératinocytes de forme cubique qui reposent sur la lame basale (via les hémidesmosomes) [2]. Ces derniers produisent et sécrètent des composants de la JDE afin de favoriser leur ancrage. Les kératinocytes sont également liés entre eux par des desmosomes (liant KRT14/KRT5) et des jonctions adhérentes, elles-mêmes reliées au cytosquelette d'actine [18,19].

Les kératinocytes de la couche basale sont des cellules proliférantes exprimant divers marqueurs de prolifération tels que Ki67, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ou encore TP63 (Tumor Protein 63), un régulateur central de la balance prolifération/différenciation. Par ailleurs, la capacité de renouvellement de l'épiderme souligne l'existence de cellules souches épidermiques.

a) L'auto-renouvellement de l'épiderme : les cellules souches épidermiques

Le renouvellement épidermique a été décrit chez la souris dans deux modèles. Premièrement, Potten a initié dans les années 70 un modèle hiérarchique selon lequel les cellules à fort potentiel prolifératif se divisent de manière asymétrique, générant alors une cellule souche et une cellule d'amplification transitoire (CAT). Ces CAT seraient capables de se diviser une quinzaine de fois avant de sortir du cycle cellulaire et d'entrer dans le processus de différenciation [24]. Dans les années 2000, Clayton et ses collaborateurs ont proposé un modèle stochastique du renouvellement épidermique. Dans ce modèle, les cellules progénitrices

aux capacités de prolifération élevées se diviseraient pour générer dans 84% des cas une cellule progénitrice et une cellule post-mitotique qui s'engagerait dans la différenciation, et dans 16% des cas la cellule progénitrice se diviserait de manière symétrique donnant deux cellules progénitrices (8%) ou deux cellules post-mitotiques (8%) [25]. Toutefois, le modèle hiérarchique semble être le plus probable chez l'être humain [26].

b) Engagement dans la différenciation

La balance prolifération/différenciation des kératinocytes est en grande partie régie par le facteur TP63. Ce dernier appartient à la famille TP53 et est fortement exprimé par les cellules de la couche basale de l'épiderme. TP63 est composé de deux isoformes, Δ Np63 et TAp63, dont les fonctions s'opposent. La forme Δ Np63 maintiendrait l'état cellule souche des kératinocytes par inhibition de la protéine CDKN1A/P21 (régulateur du cycle cellulaire) et de la forme TAp63. A l'inverse, la forme tronquée TAp63 activerait la voie P21, NOTCH et NF κ B, bloquant ainsi le cycle cellulaire et induisant la différenciation [27,28].

Chez l'être humain, il existe une région sur le chromosome 1, le complexe de différenciation épidermique, qui contient tous les gènes de la différenciation comme l'involucrine (*IVL*), la loricrine (*LOR*), la filaggrine (*FLG*), des gènes associés à la voie calcique et des gènes codants pour des protéines de la couche cornée [29] (**Figure 9**). Le facteur AP-1 (protéine activatrice 1) assure, après dimérisation, la transcription de gènes spécifiques de la différenciation kératinocytaire comme la kératine 1 (*KRT1*), l'*IVL*, la *LOR* et la pro-*FLG* [30–32].

Enfin, l'augmentation graduelle de la concentration calcique de la couche basale à la couche cornée participe également à la différenciation des kératinocytes et à l'expression de gènes de la différenciation. L'élévation de la concentration de calcium extracellulaire (de 0.05mM à 0.1mM) induit la libération de calcium par les stores intracellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi). Le calcium intracellulaire va alors modifier les jonctions cellule-cellule, remodeler le cytosquelette d'actine et stimuler le facteur AP-1 pour la transcription des gènes de la différenciation [33–35].

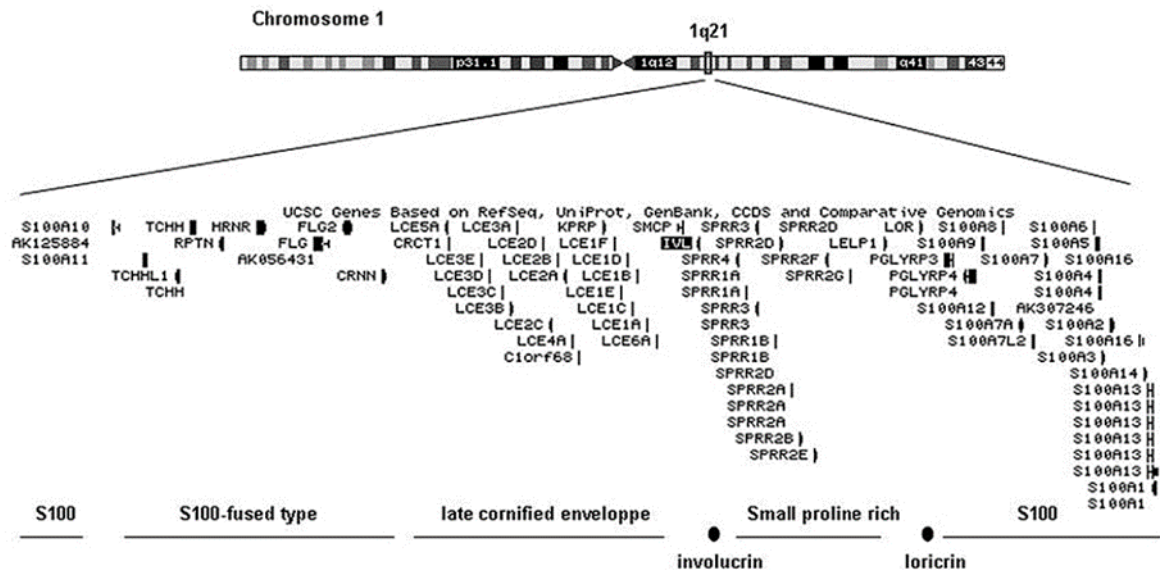


Figure 9 : Le complexe de différenciation épidermique

Le complexe de différenciation épidermique est situé sur le chromosome 1 humain. Il code pour de nombreuses protéines exprimées au cours du processus de différenciation épidermique. (Henry et al [29])

c) Les autres types cellulaires de la couche basale

L'immunité de l'épiderme est en partie garantie par les cellules de Langerhans, une cellule dendritique qui contribue à l'immunité innée et adaptative. Dans la peau des rongeurs il existe une population de lymphocytes $T\gamma\delta$ avec une morphologie dendritique, absente chez l'être humain, et nommée cellules T épidermiques dendritiques (DETC: dendritic epidermal T cells) [4,5,15]. Les cellules de la couche basale sont également en contact avec des terminaisons nerveuses libres (fibres C et $A\delta$) capables de passer la JDE. Ces terminaisons sensorielles détectent des stimuli externes tels que la chaleur ou la douleur et sont également impliquées dans les démangeaisons. En revanche, la mécano-sensation est principalement assurée par les cellules de Merkel uniquement présentes au niveau de la couche basale [4,36]. Enfin, l'épiderme contient également des mélanocytes (1 pour 4 à 10 kératinocytes basaux), qui constituent une protection contre les ultraviolets (UV) grâce à leur capacité à produire et à transmettre aux kératinocytes un pigment photo-protecteur, la mélanine [4,37].

2) Couche épineuse

La couche épineuse est composée de 8 à 10 assises de cellules qui résultent de la migration et différenciation des cellules de la couche basale. La forme des cellules va varier tout au cours de leur migration passant d'une forme polygonale (supra-basale) à une forme très

aplatie (cellules les plus différenciées). Ces cellules vont être liées entre elles par de nombreux desmosomes, reliant de nouvelles cytokératines comme KRT1 et KRT10. Au cours de la différenciation, les cellules vont exprimer et sécréter l'IVL. On retrouve également la présence de cellules de Langherans et lymphocytes T résidents mémoires [4,5,15,38].

3) Couche granuleuse

La couche granuleuse se compose de 3-4 couches de cellules plates dont le noyau commence à dégénérer, notamment par nucléophagie [39]. Ces cellules contiennent des grains de kératohyalines comportant des granules L pour la lorricrine et granules F pour la pro-filaggrine (forme immature de la filaggrine). On observe également la présence de corps lamellaires (kératosomes) contenant des lipides, des enzymes et protéases qui vont participer à la formation de la couche cornée et à l'imperméabilité de la peau [4,5,40].

4) Couche cornée

La couche cornée est la couche la plus superficielle de l'épiderme et correspond à la différenciation terminale des kératinocytes. Elle est formée de cellules mortes, dépourvues de noyau et d'organelles, nommées cornéocytes. Ces derniers peuvent former entre 10 et 30 couches selon la localisation anatomique. Ces cellules sont liées entre elles par des cornéodesmosomes entourés de lipides intercellulaires assurant une barrière perméable et antimicrobienne. Les cornéocytes forment une barrière mécanique et participent également au maintien de l'hydratation de l'épiderme. La protéolyse progressive des cornéodesmosomes induit le détachement des cornéocytes conduisant à la desquamation [4,5,23,40].

– Annexes cutanées

Divers « mini organes » sont hébergés au sein de la peau et participent donc au maintien des fonctions cutanées : les poils, les glandes sébacées et les glandes sudoripares (**Figure 1**).

1) Le poil

Le poil résulte de l'interaction entre le mésoderme et l'ectoderme. Il appartient à l'unité pilosébacée comportant le poil, le follicule pileux, le muscle érecteur du poil, la glande sébacée et les glandes sudoripares apocrines (dans certaines zones anatomiques). Le poil se divise en trois parties : une partie profonde, le bulbe pileux comportant des kératinocytes et des

mélanocytes ; une partie intermédiaire, l'isthme ; et une partie haute formant l'ouverture folliculaire, l'infundibulum (**Figure 10**).

Le poil est impliqué dans de nombreux processus, comme la protection aux UV, l'évacuation des sécrétions (sueurs et sébum) et dans la thermorégulation. Pour assurer ses fonctions le poil suit un processus de régénération en 3 phases : une phase anagène, qui correspond à la croissance du poil assurée par les cellules souches du follicule pileux (3 à 6 ans), une phase catagène de régression et involution (quelques semaines), et une phase de repos dite télogène qui aboutit à la chute du poil lors de la repousse (2 à 6 mois). Chez les rongeurs le cycle pileux se réduit à 3 semaines environ, et contrairement à l'être humain les follicules pileux ont un cycle synchrone [41–44]. Le follicule pileux contient une niche de cellules souches, le bulge, situé sous le muscle érecteur du poil. Les cellules souches du bulge participent au maintien et à la régénération du poil, mais également à la formation de la glande sébacée et de l'épiderme interfolliculaire [42,45].

L'unité pilosébacée joue un rôle primordial dans la protection face aux UV et dans les réponses thermiques notamment face au froid. En effet, l'unité pilosébacée participe au maintien de la température interne par le phénomène de frisson. Ce mécanisme correspond à la contraction du muscle érecteur du poil (dépendant du système nerveux sympathique) qui se traduit par une tension du poil, créant alors une fine couche d'air isolante. On parle de thermogénèse localisée. A l'inverse en environnement chaud, le muscle érecteur du poil se relâche pour limiter la quantité d'air entre la peau et le poil, favorisant alors la perte la chaleur et la diminution de la température corporelle [46–48]. Chez la souris, la thermogénèse par frisson n'a lieu que lors d'une exposition brutale au froid, cependant elle reste inefficace au vu de la faible masse musculaire des souris [49]. Ces dernières régulent alors leur température corporelle essentiellement grâce à la microcirculation cutanée au niveau des structures dépourvues de poils (coussinets et queue) et grâce au tissu adipeux brun [47,49].

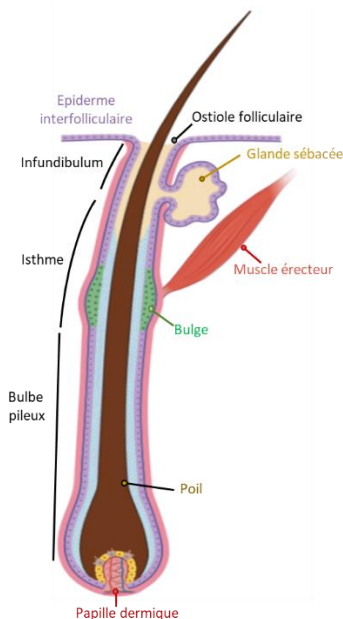


Figure 10 : Représentation schématique d'une unité pilosébacée

L'unité pilosébacée est composée du poil, du follicule pileux, de la glande sébacée et du muscle érecteur du poil. Le poil est divisé en 3 parties : l'infundibulum, l'isthme (contenant le bulge riche en cellules souches), et le bulbe pileux. (Illustration inspirée de bioRender).

2) La glande sébacée

La glande sébacée est une glande multilobée associée au follicule pileux. Elle est présente sur l'intégralité du corps à l'exception des peaux glabres (paume des mains et voute plantaire). La glande sébacée est constituée de sébocytes, à l'origine de la production de sébum. Au cours de leur maturation, les sébocytes vont produire divers lipides tels que des triglycérides, du cholestérol, des acides gras et du squalène, sous forme de gouttelettes lipidiques. La différenciation terminale de ces cellules correspond à leur désintégration et permet la sécrétion holocrine des lipides dans le canal pileux. Le sébum produit remonte le long du poil et permet de protéger l'épiderme du dessèchement et des infections bactériennes. La sécrétion de sébum est principalement régulée par les hormones de type androgènes [50,51].

3) Les glandes sudoripares

Il existe trois types de glandes sudoripares (ou sudorales) présentes sur notre corps : les glandes éccrines, apocrines et apoéccrines. Les glandes éccrines sont les plus abondantes et sont responsables de la libération de sueur. On les retrouve principalement dans les peaux glabres. A l'inverse, les glandes apocrines, liées au poil, sont retrouvées au niveau des aisselles, de la poitrine, du visage et du cuir chevelu. Elles sont impliquées dans la sécrétion de liquides visqueux, riches en lipides, donnant une odeur au corps. Les glandes apoéccrines sont

uniquement situées aux aisselles (région axillaire) et partagent aussi bien les propriétés des glandes écrines que apocrines.

Les glandes sudoripares sont constituées d'un canal sécrétoire enroulé, formé de cellules myoépithéliales et d'un conduit composé de cellules basales et lumineales. La stimulation par le système nerveux sympathique cholinergique des cellules myoépithéliales induit la sécrétion de la première sueur. Le passage dans le conduit permet la réabsorption de certains ions formant ainsi la sueur finale, composée d'eau et de sels (NaCl).

Les glandes sudoripares jouent un rôle central dans la thermorégulation. Suite à un stress thermique (augmentation de la température corporelle, de la température de la peau et du flux sanguin cutané), le système sympathique cholinergique active les glandes écrines pour la production de sueur. Ce mécanisme permet de dissiper la chaleur vers l'extérieur et contribue à maintenir la température interne stable [52–54].

En conclusion, la peau est un organe complexe, composée de diverses couches et structures qui contribuent ensemble à l'homéostasie et à la survie de notre organisme.

– Fonctions de la peau

1) Fonction barrière

La peau a pour rôle principal d'assurer une protection face au monde extérieur. Elle assure donc la fonction de protection physique, chimique, immunitaire, et également photoprotectrice.

a) Protection physique et chimique

La couche cornée, de par sa composition en cornéocytes et lipides, forme une barrière hydrophobe, limitant l'entrée de pathogènes et toutes autres molécules chimiques. Elle confère également une protection mécanique grâce aux cornéodesmosomes. Les fibres dermiques, collagènes et fibres élastiques, participent à la rigidité et flexibilité de la peau. Enfin, le tissu adipeux sous-cutané est un amortisseur vis-à-vis des chocs mécaniques [40,55].

b) Protection immunitaire

Comme nous l'avons détaillé précédemment, l'épiderme et le derme sont composés de diverses cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée ou adaptative lors de la

pénétration de corps étrangers. En plus des cellules immunitaires cutanées, les cellules majoritaires du derme et de l'épiderme, fibroblastes et kératinocytes, participent également à l'initiation de la réponse immunitaire via l'expression de récepteurs membranaires TLR (Toll-like receptor), impliqués dans la reconnaissance des pathogènes [56,57]. Les kératinocytes sont capables de libérer des peptides antimicrobiens (β -défensines, cathéliciline) affectant les bactéries pathogènes [58,59]. C'est également le cas du sébum qui est riche en lipides antimicrobiens [60]. Enfin, les bactéries commensales de la peau contribuent à l'élimination de certaines bactéries pathogènes de type Staphylocoque [61].

c) Photoprotection

L'épiderme contient une population de cellules impliquées dans la protection aux UV, les mélanocytes. Ces cellules produisent de la mélanine, un pigment capable d'absorber les UV, dans un organelle nommé mélanosome. Ce dernier est transporté le long de dendrites du mélanocyte, puis est délivré par mécanisme d'exocytose puis d'endocytose aux kératinocytes, protégeant ainsi les kératinocytes des UV [37]. Les mélanocytes limitent donc le développement de cancers photo-induits [4,38]. Il existe d'autres molécules épidermiques capables d'absorber les UV telles que l'acide trans-urocanique ou les vitamines C et D [55].

2) Régulation hydrique

L'eau est un facteur essentiel pour le maintien de l'intégrité de l'organisme. La peau, en contact permanent avec l'extérieur, se doit de limiter les pertes en eau. Cette fonction est principalement régie par les cornéocytes, les lipides qui les entourent et les jonctions serrées entre la couche granuleuse et la couche cornée [62]. Ils forment ensemble un mur hydrophobe limitant l'entrée et la perte d'eau. De plus, au sein de la couche cornée, la dégradation de la filaggrine génère des petites molécules, dont le facteur naturel d'hydratation. Ce dernier assure la rétention d'eau dans la couche cornée et donc le maintien de l'hydratation au sein de la peau [40,62]. Cependant, l'épiderme n'est pas totalement imperméable due à une diffusion passive de l'eau. Cette perte d'eau trans-épidermique (trans-epidermal water loss ou TEWL) peut être mesurée à l'aide d'une sonde et reflète l'intégrité de la fonction barrière cutanée (Matériels et Méthodes p92). Enfin, l'acide hyaluronique et les protéoglycanes issus du derme sont des molécules hydrophiles qui participent à l'hydratation de la peau [62].

3) Synthèse de vitamine D

Dans l'organisme, la vitamine D provient de deux sources : la nourriture et l'exposition de la peau au soleil. En effet, les kératinocytes produisent un précurseur de la vitamine D, la

pro-vitamine D ou 7-déhydrocholestérol, capable d'absorber les UVB et de générer la pré-vitamine D. Cette dernière sera alors convertie en 1,25-dihydroxyvitamine D, correspondant au produit actif de la vitamine D. La vitamine D régule la balance prolifération/différenciation des kératinocytes et limite le développement de nombreuses pathologies cutanées (psoriasis, dermatite atopique, vitiligo ...) [63].

4) Fonction antioxydante

L'exposition chronique aux rayonnements solaires et aux polluants environnementaux entraîne la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Ces molécules conduisent à l'oxydation des protéines et des lipides et à l'altération de l'ADN, induisant un vieillissement prématuré et favorisant la survenue de cancers et d'inflammation. Ainsi, pour contrer ces altérations, l'épiderme est capable de produire des molécules dites antioxydantes comme les vitamines C et E. Par ailleurs, les kératinocytes possèdent des enzymes qui catalysent les EROs et les rendent moins toxiques, c'est le cas de la catalase, de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase [64,65].

5) Fonction sensorielle

La peau est un organe sensoriel capable de détecter de subtiles variations environnementales. Elle comporte de nombreuses terminaisons nerveuses sensorielles qui réagissent à différents stimuli. Ces fibres nerveuses sensorielles sont issues des ganglions de la racine dorsale (DRG), et leurs prolongements innervent le derme. Certaines terminaisons nerveuses libres peuvent également pénétrer dans l'épiderme (**Figure 11**). Il existe trois groupes de fibres sensorielles. Les fibres A β sont fortement myélinisées et transmettent des signaux mécaniques tels que la pression (disques de Merkel, corpuscules de Ruffini), les vibrations et le toucher (corpuscules de Meissner et corpuscules de Pacini). Les fibres A δ perdent leur myélinisation lorsqu'elles pénètrent dans l'épiderme, et sont impliquées dans la détection de température plutôt froides, effleurements et douleurs aiguës. Enfin, les fibres C sont non-myélinisées et peuvent également traverser la JDE. Elle répondent à la douleur, aux températures froides, aux chaleurs intenses, ainsi qu'aux démangeaisons [66–68].

Par ailleurs, les kératinocytes expriment aussi des senseurs capables de détecter des stimuli thermiques, comme les thermo-senseurs de la famille des TRP (Transient Receptor Potential channel) [69], et mécaniques via l'expression du mécano-senseur PIEZO1 [70]. Ces données placent le kératinocyte comme senseur de son environnement. De plus, l'existence de connexions de types synaptiques entre les kératinocytes et les fibres nerveuses sensorielles

suggère fortement que le kératinocyte pourrait transmettre l'information thermique et mécanique aux fibres nerveuses [36,71].

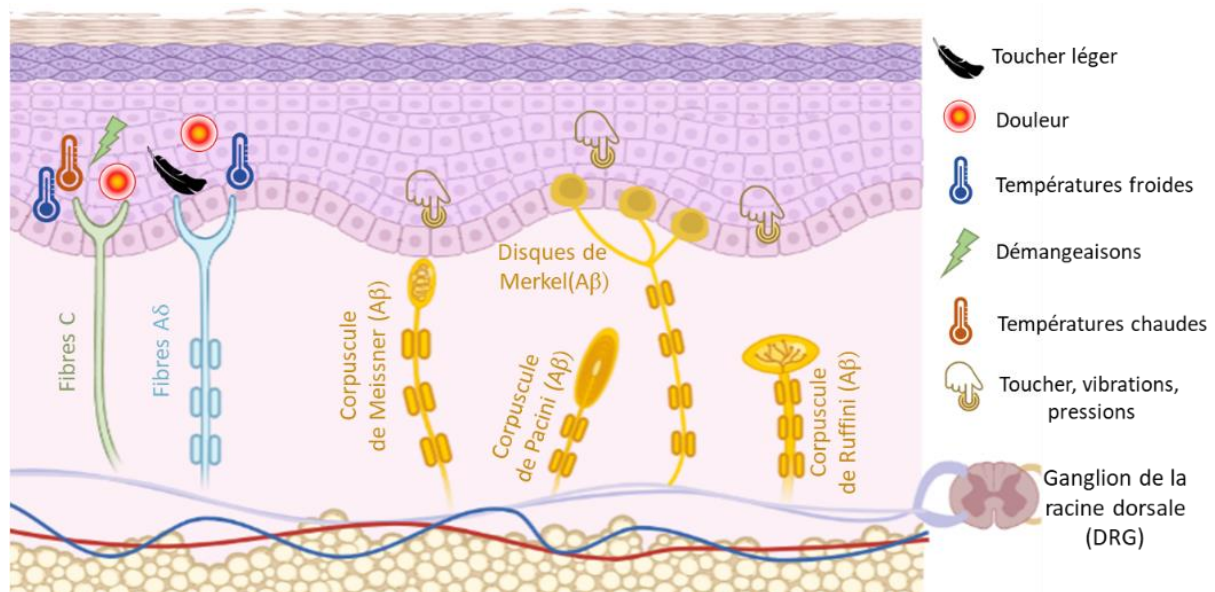


Figure 11 : Représentation schématique des terminaisons nerveuses sensorielles cutanées

Les terminaisons nerveuses sensorielles sont divisées en 3 groupes et contribuent à la détection et la transduction de différents stimuli. Les fibres Aβ (jaunes) (disques de Merkel, corpuscules de Ruffini, les corpuscules de Meissner et corpuscules de Pacini), les fibres Aδ (bleues) et les fibres C (vertes).

a) Analyse de l'intégrité sensorielle de la peau

Il est possible de réaliser des tests sensoriels afin de déterminer les seuils de sensibilité mécanique, thermique et vibratoire, et ainsi détecter de potentiels troubles de sensorialité périphérique. Chez l'être humain, comme chez la souris, il existe une batterie de tests sensoriels mécaniques (tactiles) et thermiques.

i. Sensibilité tactile

Les monofilaments de Von Frey permettent d'évaluer la sensibilité au toucher. Cette technique consiste à appliquer une pression sur la peau grâce à des filaments de nylon. La surface de contact des filaments Von Frey étant arrondie, les mécanorécepteurs à bas seuil sont préférentiellement activés, ce qui transmet l'information via les fibres Aβ. Il existe différents calibres et forces de filaments allant de 0.008g à 300g. En présence d'une neuropathie périphérique sensorielle, le patient n'est plus en mesure de détecter la pression appliquée par des monofilaments de faibles calibres. Les filaments de 10g et 75g sont considérés comme les meilleurs indicateurs de détection de la perte de la fonctionnalité sensorielle [72] et sont

largement utilisés chez les patients diabétiques ou âgés. Chez la souris, un test similaire peut être réalisé.

ii. Sensibilité thermique

L'évaluation sensorielle thermique examine la fonctionnalité des fibres A δ et C. De nombreux tests existent pour déterminer les seuils de détection du froid et de la chaleur, et de la détection de douleur au froid et au chaud. Cette approche est donc souvent utilisée pour le diagnostic des neuropathies à petites fibres.

Chez la souris, deux tests thermiques à la chaleur peuvent être réalisés, le "Tail Flick" et le "Hot plate". Le Tail Flick consiste à placer la queue de l'animal sous une lampe halogène jusqu'à ce que la chaleur générée soit trop importante et que l'animal retire sa queue par réflexe. On mesure alors le temps de latence qui nous informe sur le seuil de douleur à la chaleur. La rapidité de la réponse (vélocité), nous permet de définir quel type de fibres est impliqué. Les fibres A δ ont une vélocité comprise entre 4-30 m/s alors que les fibres C ont une vélocité inférieur à 2m/s [73]. Le Hot Plate consiste à placer l'animal sur une plaque chauffante et mesurer le temps de latence entre le moment où l'on place l'animal sur la plaque et le moment où l'animal se protège de la douleur thermique (léchage ou un saut) (Matériels et Méthodes p91-92).

6) Thermorégulation

La température corporelle centrale chez la souris et chez l'être humain doit être située aux alentours de 37°C. La zone de thermoneutralité correspond à la plage de températures ambiantes à laquelle il y a un équilibre entre perte et production de chaleur. Chez la souris la zone de thermoneutralité se situe entre 29 et 32°C et dépend du cycle diurnal [74,75], alors que chez l'être humain cette zone se situe entre 23 et 32°C [75]. Des variations anormales de la température corporelle de quelques degrés, suite à un changement de température ambiante, activent les systèmes de thermorégulation. En revanche si la température interne diminue (<27°C) ou augmente (42°C) de manière extrême, les mécanismes de thermorégulation ne sont plus efficaces et cette situation peut être fatale (hypothermie ou hyperthermie sévère) [48].

Le maintien d'une température corporelle stable, dépend de la température interne du corps (organes profonds), et de la température superficielle de notre corps, la peau. La température de cette enveloppe corporelle est influencée par les micro-vaisseaux cutanées, dont le flux est augmenté ou diminué lors de températures externes et internes trop excessives [48,76]. Pour s'adapter aux variations thermiques, l'implication de thermo-senseurs

périphériques mais également centraux [48,77,78], est indispensable. Les thermo-senseurs cutanés, comme les TRP, sont exprimés par de nombreux types cellulaires (cellules nerveuses, cellules endothéliales et kératinocytes) [79] et permettent à la peau de détecter diverses gammes de chaleurs (<17°C et >42°C). L'activation de thermo-senseurs cutanés permet une première réponse adaptative et rapide du flux sanguin cutané [77,78]. Lorsque la régulation cutanée n'est plus suffisante, autrement dit, lorsque la réponse vasculaire cutanée n'est pas en mesure de répondre à l'homéostasie thermique, un stimulus afférent est envoyé au centre antérieur pré-optique hypothalamique (APO) (centre d'intégration). Ce dernier induit réponse effectrice de type somatique et sympathique permettant de restaurer une température corporelle stable [48,76,80]

La peau participe donc aux échanges de la chaleur avec le milieu ambiant [48]. Le sens et l'intensité de ces transferts dépendent de la température interne et externe. Ces échanges de chaleur sont permis grâce à la radiation (émission d'infrarouge par le corps), la convection (transfert de chaleur par déplacement de matière), la conduction (transfert de chaleur par contact), et l'évaporation [48]. Comme précisé précédemment, le tissu adipeux sous-cutané participe à la thermorégulation en modulant la balance lipolyse/lipogenèse en fonction de l'environnement extérieur [7]. De plus, la peau présente également de nombreuses structures impliquées dans la détection thermique et dans la régulation de la température corporelle. Dans un environnement froid, la tension du muscle érecteur du poil et les frissons vont augmenter la production de chaleur. Simultanément, le flux sanguin des vaisseaux dermiques va diminuer par mécanisme de vasoconstriction, afin de maintenir la température interne. À l'inverse, la chaleur stimule les glandes sudoripares pour la production de sueur, et conduit à la vasodilatation des vaisseaux sanguins dermiques afin de dissiper la chaleur interne vers l'environnement extérieur. Cet équilibre entre le gain de chaleur et la perte de chaleur contribue au maintien d'une température interne stable, appelée homéothermie [77,78] (**Figure 12**).

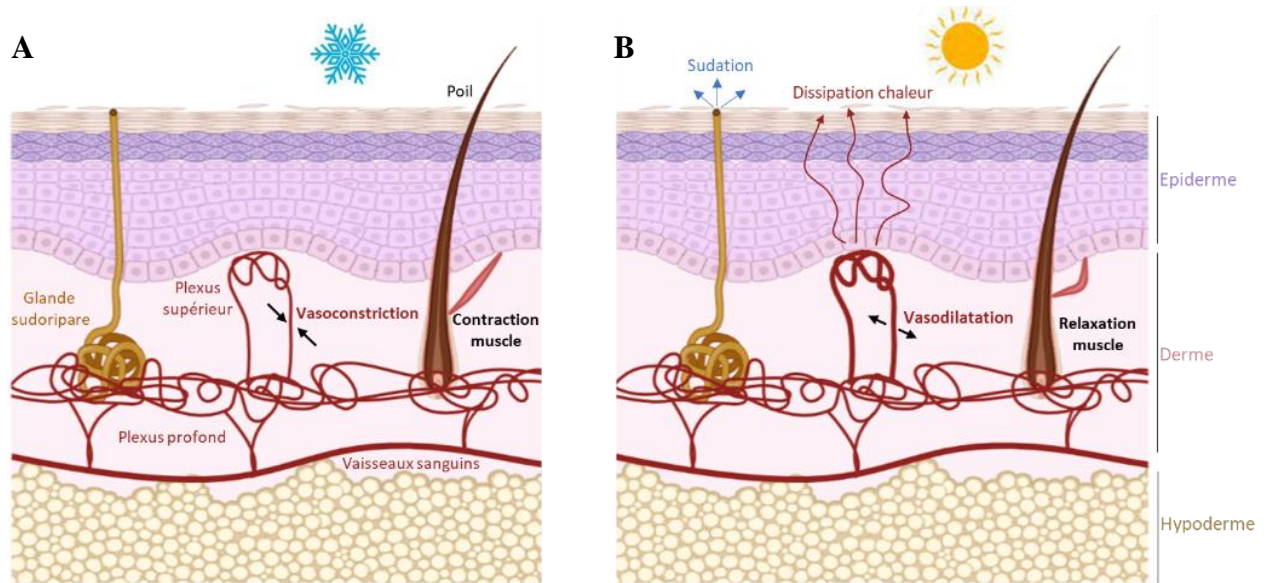
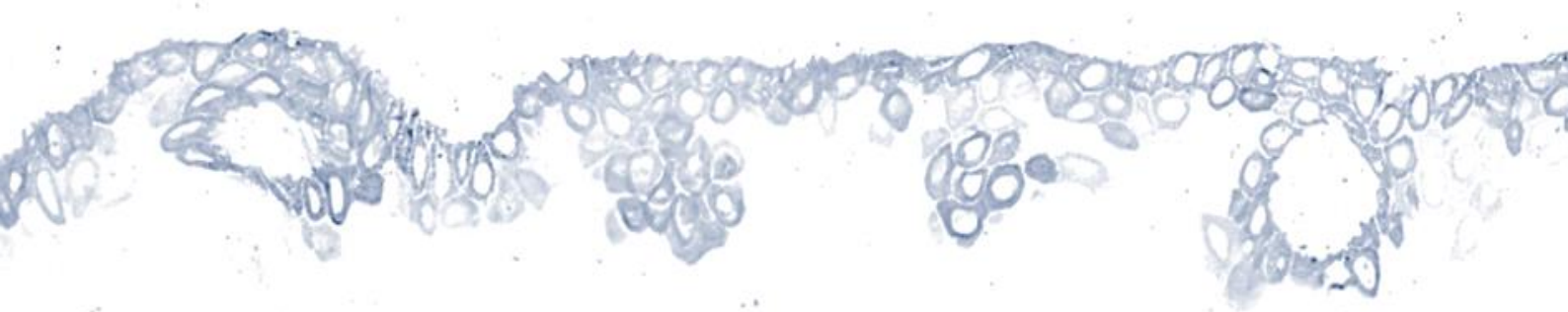


Figure 12 : Représentation schématique de l'organisation de la microcirculation cutanée et des mécanismes cutanés de thermorégulation

Le réseau vasculaire cutané, situé entre le derme et l'hypoderme, se ramifie pour former le plexus profond. Ce dernier irrigue le poil et la glande sudoripare et forme le plexus supérieur. A) En environnement froid, on observe une contraction du muscle érecteur du poil et des micro-vaisseaux dermiques. B) En environnement chaud, le muscle érecteur du poil se relâche, la glande sudoripare assure la sudation et les micro-vaisseaux se relaxent.



II. La microcirculation cutanée et les mécanismes de vasodilatation



– La microcirculation cutanée

Un système vasculaire fonctionnel est crucial pour la survie de tout être vivant. Le développement des premiers vaisseaux sanguins et lymphatiques débute par vasculogénèse. La génération, l'assemblage et la migration des angioblastes (progéniteurs endothéliaux) permet la formation d'un réseau vasculaire primitif [81]. Ce réseau va être par la suite remodelé puis complexifié pour former des vaisseaux de différents calibres, et les angioblastes vont se différencier en cellules endothéliales spécifiques de la voie veineuse ou artérielle [81]. Les artères et les veines vont se ramifier en artérioles et veinules, puis générer des capillaires uniquement composés de cellules endothéliales. Le système vasculaire assure le transport de diverses substances (l'oxygène, les nutriments et le CO₂), participe au système de défense (transport de cellules immunitaires et facteurs cytokiniques) et de régulation thermique (vasoconstriction et vasodilatation) [81,82].

1) Structure des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins, sauf les capillaires, sont composés de 3 tuniques (de l'extérieur vers l'intérieur) : l'adventice, la média et l'intima.

La couche la plus externe du vaisseau, l'adventice, est composée de collagènes, de fibres élastiques, de fibroblastes et de cellules immunitaires (mastocytes et macrophages). Elle apporte le soutien structural et confère sa forme au vaisseau. Cette tunique est richement innervée par les systèmes nerveux sympathique, parasympathique et sensoriel.

La média est formée de tissus élastiques et tissus musculaires lisses qui permettent de réguler le calibre des vaisseaux. Les cellules musculaires peuvent se contracter (vasoconstriction) ou se relâcher (vasodilatation) suite à la stimulation par des facteurs endothéliaux ou neuromédiateurs relargués par les fibres nerveuses afférentes. La fixation de ces facteurs à la membrane des cellules musculaires lisses va modifier la concentration de calcium intracellulaire, conduisant à la contraction ou relaxation des cellules. Par ailleurs, les fibres nerveuses sensorielles de l'adventice peuvent également réguler le tonus vasculaire.

Enfin, l'intima est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales semi-perméables qui reposent sur une membrane basale et qui participent activement à la régulation du tonus vasculaire [83,84].

L'épaisseur du tissu musculaire et du collagène dépendent du vaisseau et de sa localisation. La microcirculation cutanée est composée d'artérioles formées d'un endothélium et de tissu musculaire lisse, nécessaire à la régulation du flux sanguin. La ramification de ces

artérioles forme des capillaires exclusivement composés de cellules endothéliales, qui participent aux échanges de nutriments et d'oxygène. Le sang des capillaires repart dans les veinules, composées d'un endothélium et de fibres de collagènes [84] (**Figure 13**).

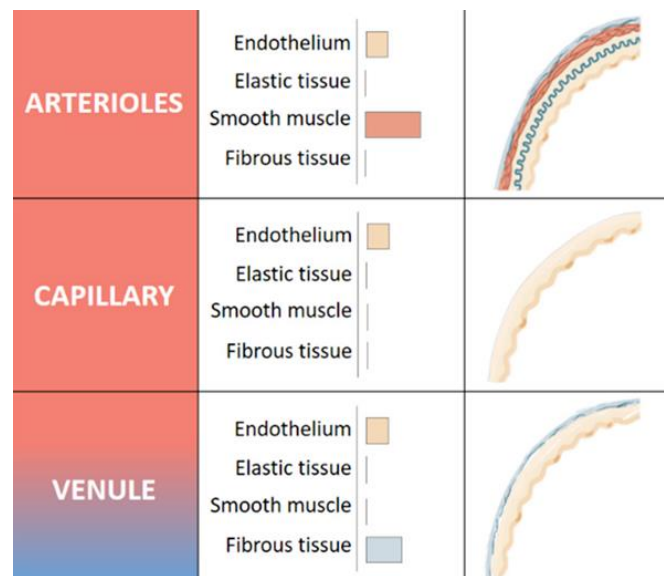


Figure 13 : Les vaisseaux sanguins de la microcirculation cutanée

Figure adaptée de Martínez-Martínez et al [84]

2) Organisation de la microcirculation cutanée

L'épiderme étant avasculaire, son apport en nutriments est assuré par les vaisseaux dermiques [16,83]. Ce réseau vasculaire est organisé en deux plexus : un plexus profond et un plexus superficiel. Le plexus profond (40-50 μ m de diamètre), qui est situé entre le derme et l'hypoderme, est formé d'artérioles et de veinules provenant du réseau sanguin des muscles et du tissu adipeux. Le prolongement horizontal de ce plexus profond permet d'une part, d'approvisionner les bulbes pileux et les glandes sudoripares, et d'autre part, d'assurer la formation du plexus superficiel au contact de la JDE (**Figure 12**). Cette proximité entre le plexus superficiel et les kératinocytes de la couche basale assure le transport des nutriments à l'épiderme. Le plexus superficiel est formé d'artérioles et veinules de petit diamètre (15-20 μ m), et de boucles de capillaires (5-10 μ m) qui s'étendent de manière perpendiculaire à la surface de la peau [16]. En plus de sa fonction nutritive, le plexus supérieur contribue principalement à la thermorégulation. Dans les peaux glabres dépourvues de poil (paume des mains, voute des pieds...) des anastomoses artérioveineuses, connexions directes entre les artérioles et veinules, contribuent également à la thermorégulation [66,83,85].

– **Mécanismes de vasodilatation à la chaleur**

1) Régulation par l'endothélium

De nombreuses études conduites chez l'être humain ont montré l'implication des facteurs endothéliaux vasodilatateurs dans la réponse vasculaire à la chaleur [66,83,86]. L'activation de deux types d'enzymes clés produites par les cellules endothéliales, la NO-synthase (eNOS) et les cyclooxygénases (COX), vont respectivement assurer la production de monoxyde d'azote (NO) et de prostaglandine I₂ (PGI₂) qui sont de puissants facteurs vasodilatateurs [73,87]. Dans les cellules endothéliales, la L-arginine est convertie en NO et L-citrulline via la eNOS. Le NO produit va alors diffuser jusqu'aux cellules musculaires lisses et induire leur relaxation [66,83,88,89]. En parallèle, l'acide arachidonique présent dans les cellules endothéliales va être converti en prostaglandine H₂ (PGH₂), puis former la PGI₂ sous l'action des COX. La PGI₂ va induire une relaxation des cellules musculaires lisses par action sur le récepteur IP [83,89]. La PGI₂ peut parallèlement agir sur le récepteur IP des cellules endothéliales, et renforcer l'activité de la eNOS. Cependant, la PGH₂ peut également être convertie en thromboxane A₂ (TXA₂), un vasoconstricteur qui agit sur les récepteurs TP des cellules musculaires lisses [89]. Il existe donc une fine balance entre PGI₂ et TXA₂ permettant de réguler le tonus vasculaire.

L'action du NO et de PGI₂ sur les cellules musculaires lisses vasculaire induit une hyperpolarisation, conduisant ainsi à une fermeture des canaux voltage-dépendants, une diminution de calcium intracellulaire, et donc à une relaxation du muscle lisse [66,88] (**Figure 14**).

Les cellules endothéliales sont également capables de produire le facteur hyperpolarisant endothélial (EDHF pour endothelium-derived hyperpolarizing factor), qui contribue à la vasodilatation principalement au cours du vieillissement. En effet, les précédents travaux de notre équipe menés par Bérengère Fromy ont montré que la vasodilatation cutanée induite par l'administration iontophorétique d'acétylcholine était principalement dépendante du NO et des prostaglandines chez des souris jeunes (6-7 mois), alors qu'elle était dépendante de l'EDHF chez des souris âgées (22-25 mois) [88]. L'EDHF viendrait partiellement compenser la dysfonction endothéliale engendrée par la diminution NO/PGs observée chez les souris âgées [88].

2) Régulation par le système nerveux autonome

L'activation du système sympathique, et plus particulièrement du système sympathique cholinergique, contribue à la dissipation de la chaleur vers la périphérie via la vasodilatation des vaisseaux sanguins cutanés et la production de sueur par les glandes sudoripares [52,66,90]. Lors d'une augmentation de la température corporelle, la stimulation du système sympathique assure la production de médiateurs tels que l'acétylcholine (ACh), VIP (vasoactive intestinal peptide) ou encore PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), qui activent les eNOS et COX conduisant à la vasodilatation [90]. Parallèlement, la production de sueur est induite sous l'action de l'ACh libérée par les fibres sympathiques postganglionnaires de type C, qui se lie aux récepteurs muscariniques (sous-type 3) de la glande sudoripare. L'abondance de sueur dépend donc de la concentration et de la vitesse d'hydrolyse de l'ACh par les acétylcholinestérases [52,90] (**Figure 14**). Bien que le système cholinergique soit prédominant dans les mécanismes de sudation, le système adrénérique pourrait également participer à la production de sueur. En effet, la stimulation des récepteurs α -adrénérique et β -adrénérique semble légèrement augmenter le taux de sueur [90].

3) Régulation par le système nerveux sensoriel

Les fibres nerveuses sensorielles cutanées participent également aux réponses vasculaires, notamment lors d'une augmentation de la température cutanée [66,67]. Les fibres C sont principalement impliquées dans la détection de la chaleur et sont classées en deux sous-groupes : les fibres peptidergiques (isolectine B4 négatives, IB4-) capables de libérer des neuropeptides vasodilatateurs tels que la substance P ou le CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide), et les fibres non-peptidergiques (IB4 positives qui n'expriment pas le CGRP et la substance P) [66–68]. Les fibres nerveuses sensorielles intra-épidermiques peuvent transduire la douleur et la chaleur grâce à des senseurs/capteurs exprimés aux terminaisons nerveuses libres. Par exemple, le canal TRPV1 (pour Transient Receptor Potential Vanilloid 1) découvert en 1997 par Caterina *et al* [91], est un thermo-senseur fortement exprimé par les fibres C peptidergiques, capable de détecter des chaleurs douloureuses ($>41^{\circ}\text{C}$). L'activation de TRPV1 dans ces fibres sensorielles induit une libération de substance P et de CGRP conduisant à une vasodilatation [92] (**Figure 14**).

Il est admis aujourd'hui que les canaux TRP sont des senseurs transmembranaires impliqués dans divers mécanismes comme la chemosensation, la nociception, la mécanosensation ou encore la thermosensation. Ces derniers sont donc des acteurs clés de

l'intégration/transmission des informations de l'environnement extérieur et seront détaillés dans la « partie III : Les thermo-senseurs cutanés ».

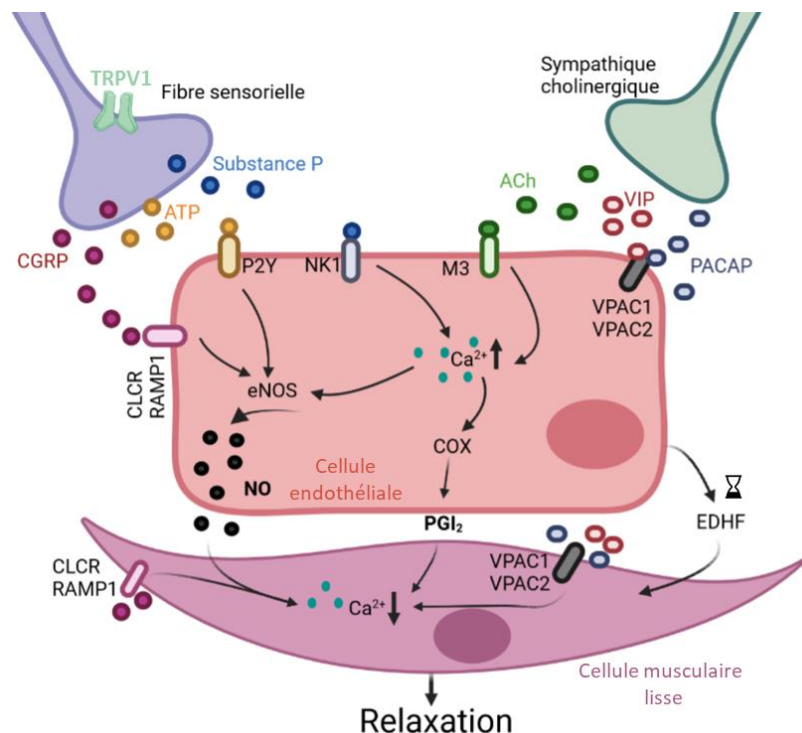


Figure 14 : Représentation schématique des mécanismes de régulation de la vasodilatation cutanée

Les cellules endothéliales peuvent être stimulées par de nombreux médiateurs libérés par le système sympathique cholinergique (ACh, VIP, PACAP) ou par le système nerveux sensoriel peptidergique (CGRP, substance P, ATP), qui vont agir sur leurs récepteurs spécifiques présents au niveau des cellules endothéliales. En cascade, les cellules endothéliales vont synthétiser et principalement libérer du NO et PGI₂ (via la voie eNOS et COX respectivement). Ces facteurs endothéliaux vasodilatateurs vont provoquer une diminution de calcium intracellulaire dans les cellules musculaires lisses vasculaires se manifestant par une relaxation. La relaxation de ces cellules musculaires peut également être endothélium-indépendant via la présence de récepteurs au CGRP, PACAP et VIP. Au cours du vieillissement, les cellules endothéliales libèrent de l'EDHF, un facteur vasodilatateur, qui compense partiellement la diminution de NO et PG. (Figure adaptée de Cracowski et al, 2020 [83])

4) Régulation novatrice par les kératinocytes épidermiques

Les kératinocytes épidermiques sont capables de répondre à divers stress environnementaux (mécaniques et thermiques) grâce à l'expression de senseurs. Cette réponse se manifeste par la libération de médiateurs dans le milieu extracellulaire, qui pourraient moduler la réponse vasculaire. En effet, la stimulation thermique des kératinocytes induit la libération d'ATP [93]. Ce dernier pourrait agir sur les récepteurs P2Y (récepteur métabotropique purinergique de type 2) exprimés à la surface des cellules endothéliales et

induire une réponse de type vasodilatatrice endothélium-dépendante. De plus, des études ont révélé que le kératinocyte peut produire des médiateurs comme le NO [94] et des prostaglandines (PGI₂) [95], qui induisent la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires. Enfin, les kératinocytes participent à la sécrétion de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, NGF) pouvant réguler le tonus vasculaire par action sur les cellules endothéliales [96,97]. Cependant, il est également possible que le kératinocyte, *via* les médiateurs et la présence de connexions de type synaptiques [71], agisse indirectement sur les vaisseaux sanguins au travers des fibres nerveuses sensorielles.

5) Analyse fonctionnelle de la réponse vasculaire

La réponse vasculaire cutanée (vasodilatation/vasoconstriction) peut être évaluée grâce à l'utilisation de divers outils non invasifs.

a) Le laser Doppler

Le laser Doppler permet de mesurer les variations de flux sanguin. Il est composé d'une sonde qui émet un faisceau hélium-néon monochromatique de longueur d'onde défini (780nm) et de faible puissance. Ce faisceau traverse la peau et est réfléchi lorsqu'il rencontre des cellules en mouvement (cellules sanguines), entraînant alors un décalage de fréquence proportionnel à la vitesse et concentration des cellules sanguines. Le signal réfléchi est capté par un photorécepteur et est nommé Laser Doppler Flowmetry (LDF) (exprimé en unité arbitraire) (**Figure 15**). Ce laser permet de mesurer jusqu'à 1mm³ sous la surface de la peau avec une très bonne sensibilité temporelle. Il peut être couplé à une sonde thermique ou iontophorétique permettant de mesurer la réponse vasculaire au chauffage local ou à une diffusion locale d'une substance pharmacologique, respectivement. Ceci permet d'étudier spécifiquement l'activité fonctionnelle des cellules endothéliales et/ou musculaires

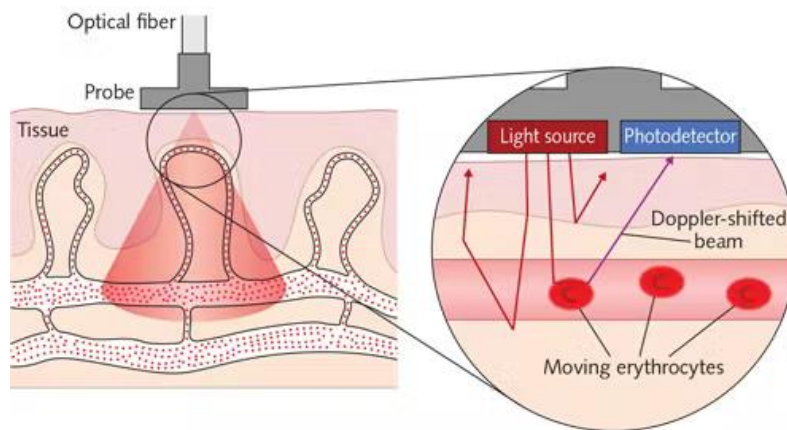


Figure 15 : Représentation schématique du fonctionnement du laser Doppler

Le laser Doppler est placé sur la peau et émet un faisceau monochromatique de longueur d'onde définie (rouge). Lorsque le faisceau rencontre des cellules en mouvement, le faisceau est réfléchi et détecté par un photodétecteur (violet).

b) Chaleur locale

L'augmentation de la température environnementale conduit à une vasodilatation cutanée, favorisant la dissipation de chaleur vers l'extérieur afin de limiter l'élévation de la température corporelle interne. On parle de réponse à la chaleur globale. À l'inverse, la chaleur locale ne dépend pas de la chaleur interne, et se caractérise par une réponse vasculaire biphasique (chez l'être humain), avec un premier pic de vasodilatation suivi d'un plateau. La première phase est induite par la libération de neuropeptides (CGRP et substance P) par les fibres afférentes primaires, tandis que la seconde phase est NO-dépendante [90] (**Figure 16**). Cette réponse peut être mesurée par laser Doppler.

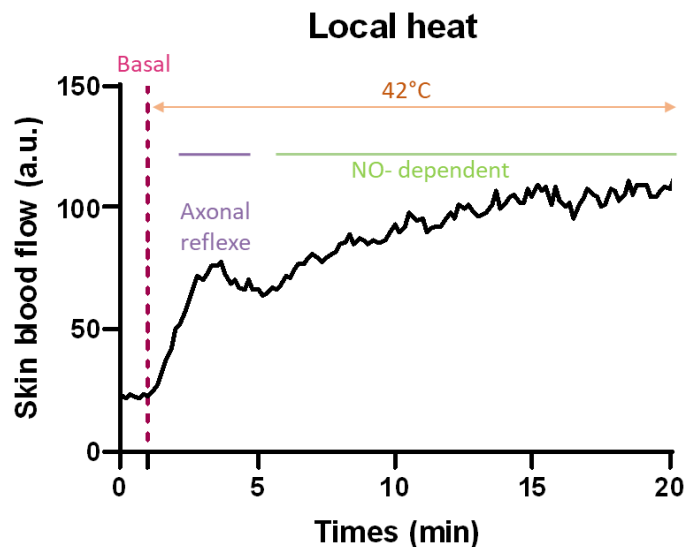


Figure 16 : Tracé typique d’une réponse vasculaire cutanée au chauffage local chez l’être humain

Exemple d’une réponse vasculaire biphasique observée lors d’un chauffage local de 42°C au niveau du sein de femme. Ce résultat est issu d’une collaboration avec le Department of Plastic, Reconstructive and Hand Surgery, GROW – School for Oncology and Developmental Biology du Centre Médical Universitaire de Maastricht (Van-Gogh Grant-Campus France) (*article en révision dans Microsurgery*)

c) Diffusion iontophorétique de substances vasoactives

La iontophorèse permet la pénétration de drogues vasoactives à travers la peau grâce à un courant électrique de faible intensité (0.1 mA). L’absorption de la drogue est proportionnelle à la charge (courant électrique) qui lui est appliquée, et est dépendante de la charge globale de la molécule elle-même (anionique/cationique). La iontophorèse est composée d’une électrode de stimulation qui contient la drogue de même polarité, et une électrode de polarité opposée qui ferme le circuit électrique. Un générateur permet de réguler l’intensité et la durée du courant (**Figure 17**).

Grâce à cette technique il est possible d’analyser la vasodilatation endothélium-dépendante ou endothélium-indépendante selon la molécule administrée. L’administration de l’ACh par iontophorèse permet d’observer une vasodilatation endothélium-dépendante par stimulation de la eNOS et production de NO. Le NO, comme précisé précédemment, assurera la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires par hyperpolarisation. La réponse du flux sanguin cutané à l’ACh permet donc d’étudier la fonctionnalité des cellules endothéliales. Le SNP (Nitroprussiate de sodium) est un donneur exogène de NO. Sa pénétration dans la peau permet une action directe sur les cellules musculaires lisses vasculaires, en s’affranchissant de

la synthèse de facteurs endothéliaux. Le SNP permet d'évaluer les propriétés de relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (Matériels et Méthode p92) [98].

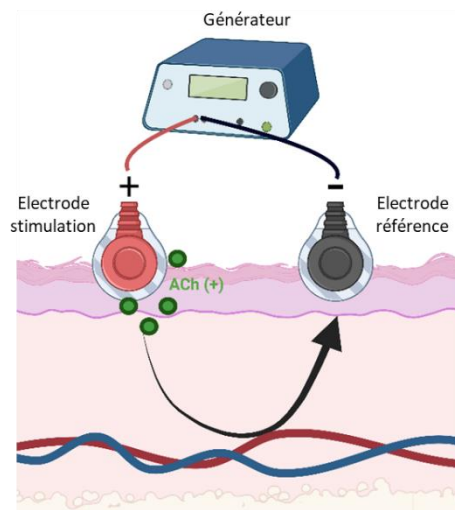
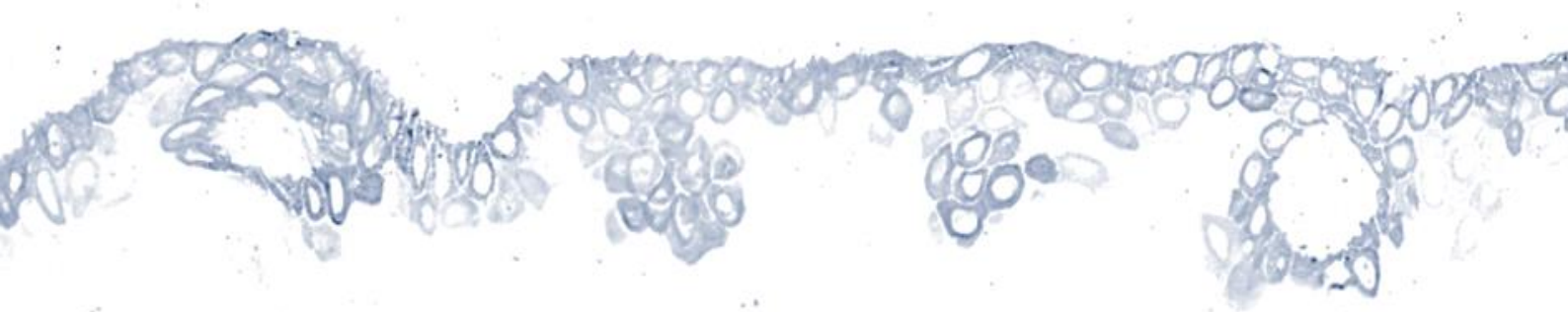


Figure 17: Principe de la iontophorèse -exemple de l'acétylcholine

L'acétylcholine (ACh) chargée positivement va être placée sur l'électrode de stimulation (dans ce cas, l'anode). L'application d'un courant anodal va favoriser la pénétration de l'ACh dans la peau et induire une vasodilatation endothélium-dépendante.



III. Les thermo-senseurs cutanés



– Les canaux TRP

Les canaux TRP (Transient Receptor Potential) sont divisés en six sous-familles : TRPA (ankyrine), TRPC (canonique), TRPM (melastatine), TRPML (mucolipine), TRPP (polycystine) et TRPV (vanilloïde) [99,100] (**Figure 18**). La superfamille TRP est la deuxième plus grande classe de canaux ioniques avec un mécanisme d'activation dépendant du voltage. Cependant, les membres de la famille TRP ne répondent pas seulement à un signal électrique mais sont également capables de détecter plusieurs stimuli environnementaux. Ce sont donc des capteurs polymodaux de l'environnement. Ces canaux partagent une architecture protéique hautement conservée et nécessitent un assemblage tétramérique pour générer un pore central fonctionnel perméable aux cations. Chaque sous-unité du complexe tétramérique est composée de six segments transmembranaires (S1-S6), le pore perméable aux cations étant formé par une boucle ré-entrante située entre S5-S6.

La partie N-terminale cytoplasmique d'un monomère comprend six domaines composés de répétitions d'ankyrine (ARD) hautement conservés. La partie C-terminale est également une grande région intracellulaire contenant un domaine TRP, une autre caractéristique distinctive et fondamentale hautement conservée des canaux TRP avec une séquence peptidique conservée IWKLQR, appelée la boîte TRP [101,102].

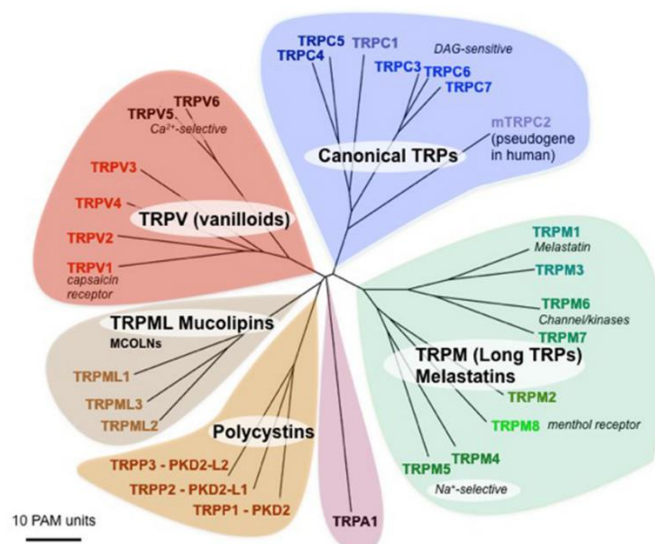


Figure 18: La super famille des TRP

Les TRP sont divisés en 6 sous-familles : TRPC, TRPM, TRPA, TRPP, TRPML et TRPV.

Blair et al, 2019 [100].

Les canaux TRP peuvent être impliqués dans la chemo-sensation (goût, odorat, stimuli chimiques), la mécano-sensation (osmo-sensation, transduction du son) , la nociception et la thermosensation [99].

1) Les Thermo-TRP

Chez les organismes homéothermes, il existe six thermo-senseurs capables de détecter différentes gammes de température. Les canaux TRPA1 et TRPM8 sont activés par le froid (<17°C et 20°C respectivement). Les chaleurs non douloureuses 25°C et 33°C sont perçues par les canaux TRPV4 et TRPV3. Enfin, les chaleurs douloureuses sont détectées par les canaux TRPV1 (>42°C) et TRPV2 (52°C) [99,103] (**Figure 19**). Il existe également un autre groupe de thermo-TRP moins étudié qui comprend le TRPM2 (>35°C), TRPM3 (>40°C), TRPM4 (>15°C) et TRPM5 (>15°C). Cependant ces derniers ne semblent pas être exprimés par les neurones sensoriels et les cellules cutanées, et n'ont donc pas été considérés comme des canaux impliqués dans la thermosensation de la peau [104].

Les fibres nerveuses sensorielles (principalement les fibres C et A δ) expriment la majorité des thermo-TRP cités plus haut [104], et le TRPV1 a été de loin le plus étudié [91,105–107]. En revanche, la présence de TRPV3 sur ces fibres est controversée. En effet, l'expression génique de TRPV3 semble être détectée dans des neurones (DRG) de singe [108], alors qu'un autre groupe a suggéré que le TRPV3 n'était pas exprimé par les DRG de souris suite à une absence d'activité du canal [109].

Au niveau de la peau, outre les terminaisons nerveuses libres, les kératinocytes épidermiques expriment des thermo-senseurs, tels que le TRPV1, TRPV3 et TRPV4 [110,111]. Ceci suggère que le kératinocyte perçoit et transmet des signaux extérieurs. En effet, Mandadi *et al* ont montré que dans une co-culture de kératinocytes et neurones (DRG), les kératinocytes répondaient plus rapidement que les neurones à un stimulus thermique (39°C) [93]. Par ailleurs, cette stimulation thermique des kératinocytes entrainerait une libération d'ATP de manière dépendante de TRPV3, et pourrait intervenir dans la communication entre kératinocytes et neurones. Ainsi, bien que les terminaisons nerveuses sensorielles aient longtemps été considérées comme les transducteurs exclusifs des variations de température extérieure, les kératinocytes, via l'expression de thermo-senseurs comme TRPV3, sont également des acteurs clés de la détection et de la transmission thermique dans la peau.

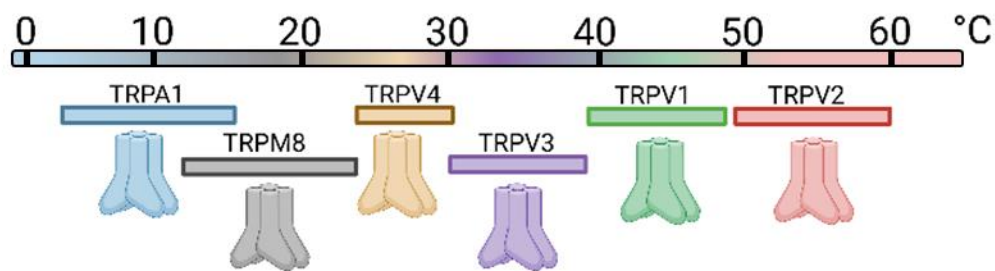


Figure 19 : Gamme d'activation des thermo-TRP

Les Thermo-TRP sont capables de détecter différentes gammes de températures allant du froid (<17°C) aux chaleurs nocives (>52°C).

2) Le canal TRPV3

Découvert en 2002 dans la peau de rat, TRPV3 est un canal transmembranaire perméable au calcium, fortement exprimé par les kératinocytes épidermiques [111]. Comme tous les TRP, TRPV3 nécessite un assemblage tétramérique pour générer un pore central fonctionnel perméable aux cations [79,112].

a) Ligands et régulateur de TRPV3

En plus des chaleurs non douloureuses (33°C), le canal TRPV3 peut être activé par divers agonistes (**Figure 20**), tels que des composés extraits de plantes (carvacrol, camphre, ...), des substances endogènes (acide arachidonique) et des composés synthétiques (diphénylboronic anhydride, 2-Aminoethoxydiphényl borate : 2-APB ...) [113,114].

TRPV3 est le seul membre parmi les canaux TRP qui se sensibilise lors de l'application répétée de stimuli. Cette sensibilisation de TRPV3 est indépendante de l'origine du stimulus, il peut donc se sensibiliser aussi bien par des ligands chimiques que thermiques. TRPV3 présente également une sensibilisation croisée à des stimuli de nature différente, par exemple la stimulation par le 2-APB entraîne une sensibilisation à la chaleur ou au camphre [109].

Ce mécanisme de sensibilisation n'est pas encore très bien élucidé, cependant il serait fortement lié au calcium. En effet, il semblerait que le canal TRPV3 (naïf) soit dans un premier temps inhibé par le complexe calcium-calmoduline fixé en N-terminal (**Figure 20**), et par la fixation de calcium (haute affinité) au niveau de la boucle du pore (Asp641). La sensibilisation par le 2-APB s'accompagnerait d'une diminution de cette inhibition dépendante du calcium, modifiant ainsi la structure du canal en faveur de son ouverture [115–120]. Au même titre que

le calcium, l'ATP pourrait réguler/contrôler l'état de sensibilisation de TRPV3 par interaction avec la calmoduline [121]. D'autres régulateurs intracellulaires de TRPV3 ont également été identifiés comme le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), la phospholipase C (PLC), la protéine kinase C (PKC) et l'acide arachidonique [120].

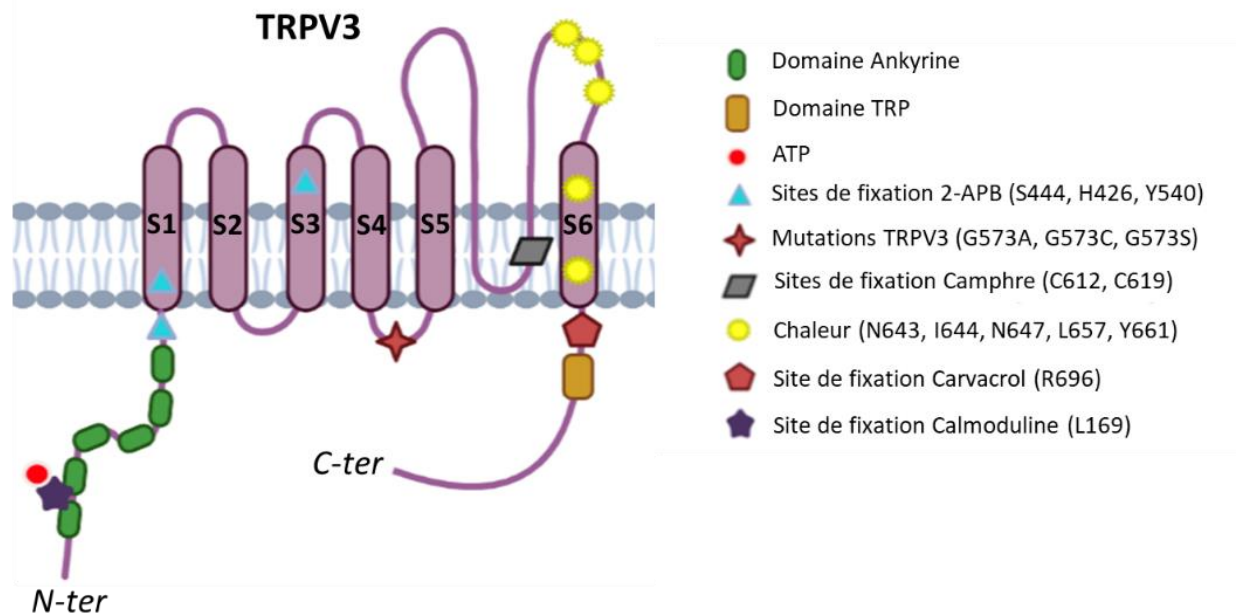


Figure 20 : Structure et régulateurs du canal TRPV3

Le canal TRPV3 comporte six domaines transmembranaires qui s'organisent en tétramère, avec S5 et S6 formant le pore. Ce canal possède des structures conservées entre TRP (domaines de répétition de l'ankyrine et domaine TRP), des sites de fixation de divers activateurs de TRPV3 (2-APB, carvacrol, camphre, chaleur) et des domaines d'interactions protéiques (calmoduline). Certaines mutations de TRPV3 (G573A, G573C, G573S) sont responsables d'une hyperactivité du canal associé au syndrome d'Olmsted [122].

b) Signalisations et médiateurs dépendants de TRPV3

TRPV3 a initialement été décrit comme un capteur de chaleur pour les températures inoffensives (environ 33°C) dans différentes études *in vitro* [108,111,123]. Il n'est donc pas surprenant qu'un profond déficit dans la détection des températures externes chaudes ait été décrit chez les souris dépourvues de TRPV3 [109]. Par ailleurs, comme précisé plus haut, le TRPV3 exprimé par les kératinocytes joue un rôle dans la thermosensibilité, notamment via la libération d'ATP [93], mais d'autres molécules ont également été signalées. En effet, la surexpression de TRPV3 dans les kératinocytes induit la libération de prostaglandine E2 (PGE2), une substance algogène [95].

De manière intéressante, chez des souris surexprimant les canaux TRPV3 sélectivement dans les kératinocytes, une hyperalgésie a été observée [95]. Ces données soutiennent que les canaux TRPV3 participent à la transduction thermique et à la douleur par le biais de ces médiateurs.

Le canal TRPV3 est également impliqué dans d'autres processus comme le maintien de la barrière cutanée (axe TRPV3/EGFR/TGF α) [124,125], ou encore dans des processus inflammatoires via la libération de cytokines type IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , NGF [96,126]. Ces médiateurs dépendant de TRPV3 pourraient donc contribuer à la transmission de l'information thermique. En revanche, leur action sur le tonus vasculaire, soit en agissant directement sur les micro-vaisseaux dermiques, soit indirectement via les terminaisons nerveuses sensorielles de la peau, n'a pas été clairement étudié.

c) TRPV3 dans l'homéostasie thermique cutanée

Des tests comportementaux de Hot plate et Tail Flick réalisés sur des souris déficientes pour TRPV3 (*TRPV3-KO*), ont révélé que ces souris présentaient un défaut de perception aux températures chaudes (35°C) et avaient une préférence pour les températures plus froides de 25°C [109,127]. Ceci suggère que le canal TRPV3 joue un rôle dans les préférences/choix thermiques.

A l'inverse, les patients présentant des mutations « gain de fonction » de TRPV3 (Syndrome d'Olmsted) présentent des sensations de brûlure au niveau des jambes et des extrémités (pieds, mains et oreilles) qui sont associées à une importante vasodilatation. Ces patients présentent également des poussées aiguës d'hyperalgésie (exacerbation de la douleur) et des démangeaisons sévères [128].

Bien que plusieurs études aient mis en évidence le rôle potentiel des canaux TRPV3 dans la thermo-sensation, le rôle du TRPV3 dans la vasodilatation cutanée induite par la chaleur reste à préciser. Dans un modèle murin *Trpv3-KO*, nous avons précédemment montré que TRPV3 est impliqué dans le contrôle local du flux sanguin cutané en initiant la libération du CGRP et du NO en réponse à un chauffage local [129]. La vasodilatation induite par une chaleur locale (33-44°C) est réduite chez les souris *Trpv3-KO*, en comparaison des souris témoins ou des *Trpv1-KO*. Les souris *Trpv3-KO* présentent également un défaut local de dissipation de la chaleur (**Figure 21**). En plus de leur contribution à la vasodilatation provoquée par la chaleur locale, TRPV3, CGRP et NO contribuent à la stabilité interne de la température corporelle lors du chauffage passif du corps entier. En effet, les souris *TRPV3-KO* exposées à une chaleur

environnementale graduelle de 33°C à 44°C, présentent une température interne plus élevée que des souris témoins. Ces mêmes résultats ont été observés après injection d'inhibiteurs de NO et CGRP aux souris témoins (WT). Bien que TRPV4 soit également exprimé par les kératinocytes, il ne contribue pas à la régulation de la vasodilatation cutanée lors d'une hyperémie thermique [130].

TRPV3 n'étant pas exprimé sur les terminaisons nerveuses chez la souris au niveau cutané [109], notre étude a fourni la première démonstration *in vivo* du rôle des kératinocytes via TRPV3 comme un puissant modulateur des mécanismes thermorégulateurs vasculaires cutanés chez la souris. Par ailleurs, les réponses au chauffage local et globale des souris *Trpv3*-KO présentent un profil très similaire avec les réponses vasculaires d'individus âgés [131,132]. Ces derniers, même en absence de neuropathie sensorielle périphérique, présentent une diminution des capacités vasodilatatrices en réponse au chauffage local [131], et une accumulation de chaleur interne par défaut de vasodilatation lors d'un chauffage global [132]. Ce défaut pourrait suggérer une atteinte de TRPV3 survenant avec le vieillissement, et nécessite d'être davantage exploré.

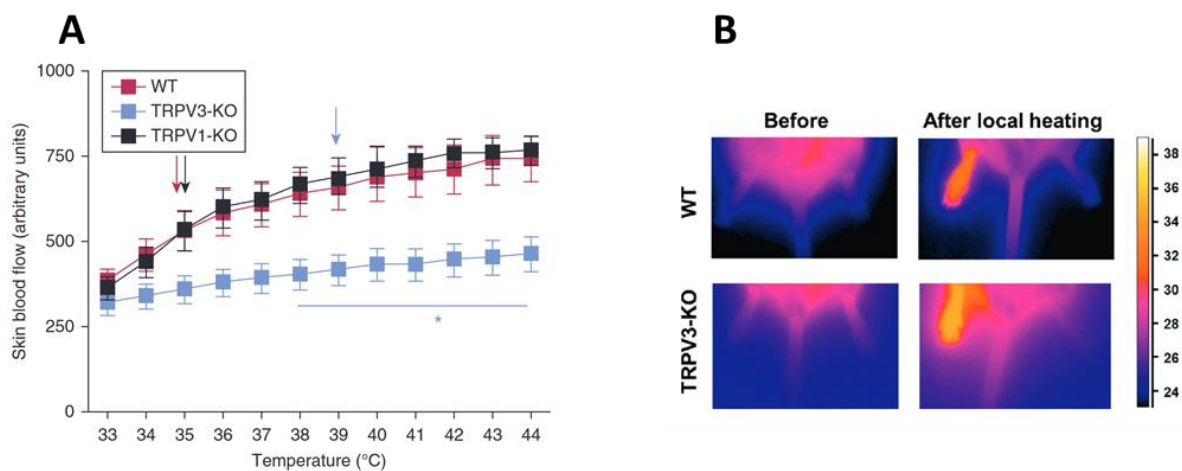
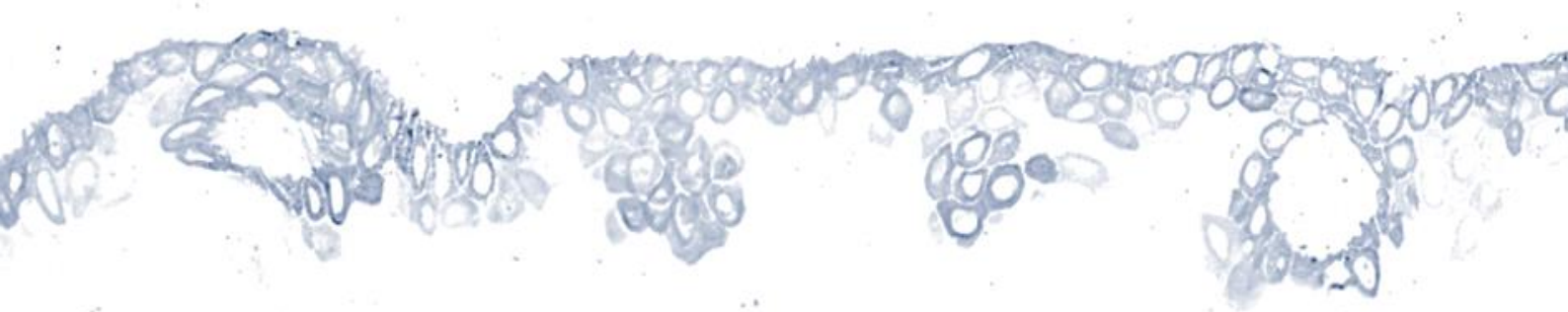


Figure 21: Rôle de TRPV3 dans la réponse vasculaire cutanée à un chauffage local

(A) Réponse vasculaire cutanée au chauffage local de souris WT, *TRPV1*-KO et *TRPV3*-KO. (B) Analyse de la température cutanée par caméra thermique chez des souris WT versus *TRPV3*-KO avant et après l'application locale d'une chaleur. Les souris *TRPV3*-KO présentent un défaut de vasodilatation induite par la chaleur (A) conduisant à une accumulation de chaleur au niveau de la patte chauffée (B). (Fromy et al, 2018 [129])



IV. Le vieillissement cutané et les modifications vasculaires



Le vieillissement correspond à un déclin progressif et irréversible de la fonctionnalité des différents organes, augmentant donc le risque de maladies. Le vieillissement peut dépendre de facteurs environnementaux (extrinsèques) et de paramètres génétiquement programmés (intrinsèques). Comme tous les organes, la peau est touchée par le vieillissement et se caractérise par des modifications visibles. On peut observer l'apparition de rides, de taches pigmentées, une perte d'élasticité et d'épaisseur ou encore un dessèchement de la peau.

– L'effet du vieillissement extrinsèque sur la peau

Tous nos organes sont soumis au vieillissement intrinsèque, alors que le vieillissement extrinsèque affecte plus particulièrement la peau. En effet, les agressions environnementales, rassemblées sous le terme générique d'exposome, vont perturber l'homéostasie et accélérer le vieillissement. Ces agressions environnementales peuvent être regroupées en quatre catégories : les éléments relatifs à l'hygiène de vie (nutrition, qualité du sommeil, niveau de stress), les éléments polluants (pollution atmosphérique, consommation de substances toxiques), la température environnementale et enfin les radiations solaires (**Figure 22**).



Figure 22 : Facteurs impliqués dans le vieillissement extrinsèque- exposome

Plusieurs facteurs d'expositions ont été identifiés comme potentialisant le vieillissement de la peau. Il est désormais bien connu que l'exposition au soleil, à la pollution et au tabac déclenche des processus moléculaires endommageant la structure de la peau, ce qui conduit à l'aspect vieilli de la peau. D'autres facteurs (température, alimentation, stress, sommeil), moins bien étudiés, sont reconnus comme potentialisateurs du vieillissement cutané. Il a été démontré que ces facteurs agissaient soit séparément, soit en interagissant les uns avec les autres. (Krutmann et al, 2017 [133])

1) L'hygiène de vie

Une bonne hygiène de vie réduit l'apparition du vieillissement et de maladies chroniques. La consommation de tabac, d'alcool et une mauvaise alimentation (peu d'antioxydants et forte consommation de sucres) favorisent l'apparition de rides suite à une altération de l'agencement du derme [134–136]. Le stress est également associé au vieillissement prématuré. Il augmente la production d'EROs, de dommages à l'ADN et est impliqué dans certaines inflammations chroniques. Enfin, le manque de sommeil à long terme augmente le risque de maladies chroniques (hypertension, obésité, ...) et est responsable de modifications de l'apparence de la peau (couleurs, rides) [133].

2) Les polluants

Les polluants comme les particules fines seraient à l'origine de l'apparition de taches brunes hyper-pigmentées, qui résulteraient d'une augmentation de la production de mélanine. Ce mécanisme dépendrait des kératinocytes soumis au stress oxydatif [133,137]. Des études *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* ont révélé que l'ozone était responsable de l'altération de la couche cornée en déplaçant les antioxydants [138,139], et favoriserait donc la peroxydation des lipides et oxydation des protéines [140,141]. Par ailleurs, l'ozone entraînerait des modifications du métabolisme des collagènes du derme et renforcerait donc l'apparition des rides [142].

3) Les radiations solaires

L'exposition aux UV à petite dose a un effet bénéfique sur la peau et sur l'organisme (production vitamine D, immunosuppresseur, antioxydant). Cependant l'exposition à long terme est responsable à 80% du vieillissement facial et du développement de cancers cutanés [133,143]. Il existe 3 types d'UV : les UVC (100-280nm) qui sont stoppés par la couche d'ozone ; les UVB (280-315nm) qui pénètrent jusqu'à l'épiderme ; et les UVA (315-400nm) traversant la peau jusqu'au derme [133,137,143]. Les UV sont responsables de dommages à l'ADN de type dimères de thymidines (UVB) et 8-oxoguanine (UVA) favorisant le photo-vieillissement et l'apparition de cancers (carcinomes et mélanomes) [144].

Au niveau de l'épiderme, les UVB vont perturber la dégradation des cornéocytes, augmenter les marqueurs de différenciation (IVL) et diminuer la prolifération des cellules de la couche basale (principalement cellules souches). Les UVA induisent des dommages au niveau des cellules cutanées en générant une réponse inflammatoire et un stress oxydatif [144]. Par ailleurs,

une surexposition aux UV augmente la formation d'EROs qui, à forte concentration, altèrent la production des collagènes et composants de la MEC, favorisant ainsi l'apparition des rides [144,145].

En plus des UV, les infrarouges (IR, 770nm-1mm), capables de pénétrer jusqu'au tissu sous-cutané, participent également au vieillissement. En effet, l'application répétée d'IR sur peau humaine favorise l'activation de MMP1 et donc la dégradation des collagènes [146]. Par ailleurs, une irradiation chronique aux IR conduit à la formation de rides et à une perte de poil sur modèle murin [146].

4) Effet de la température

La température de la peau humaine est généralement de 33°C [48], mais peut augmenter jusqu'à 40°C sous l'effet des IR [146]. L'application d'une chaleur de 43°C sur peau humaine conduit à des dommages au niveau de l'ADN, notamment à la formation de 8-oxoguanine [146]. De plus, cette chaleur induit la production de TGF- β et de cytokines au niveau de la peau, qui vont réguler le métabolisme des protéines du derme en faveur des MMP. *In vitro*, l'application d'un choc thermique sur des fibroblastes primaires humains conduit à la formation d'EROs qui renforcent l'activité de nombreuses MMP [147], en particulier MMP12 connue pour dégrader les fibres élastiques préformées [148]. Par ailleurs, l'activation *in vitro* de TRPV1 par des gammes de chaleurs proches de 42°C conduit à la production de MMP1 par les kératinocytes [149]. La chaleur est un facteur environnemental qui contribue donc au vieillissement prématuré de la peau via la dégradation des composants du derme et des dommages à l'ADN.

– Le vieillissement intrinsèque à l'échelle de la peau

Le vieillissement intrinsèque résulte de l'altération de voies de signalisations et régulations génétique, biochimique et cellulaire. En 2013, neuf dysfonctionnements cellulaires et moléculaires interconnectés contribuant au vieillissement ont été catégorisés [150]. Récemment, cinq nouveaux marqueurs ayant un rôle causal dans le vieillissement ont été ajoutés [151] (**Figure 23**). Le vieillissement intrinsèque est le résultat d'une accumulation de divers dysfonctionnements dont l'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères, les modifications épigénétiques et d'épissage, la perte de l'homéostasie et système de dégradation protéique, la dysfonction mitochondriale, l'altération de la communication cellulaire, la sénescence cellulaire et la diminution du pool de cellules souches, l'inflammation...

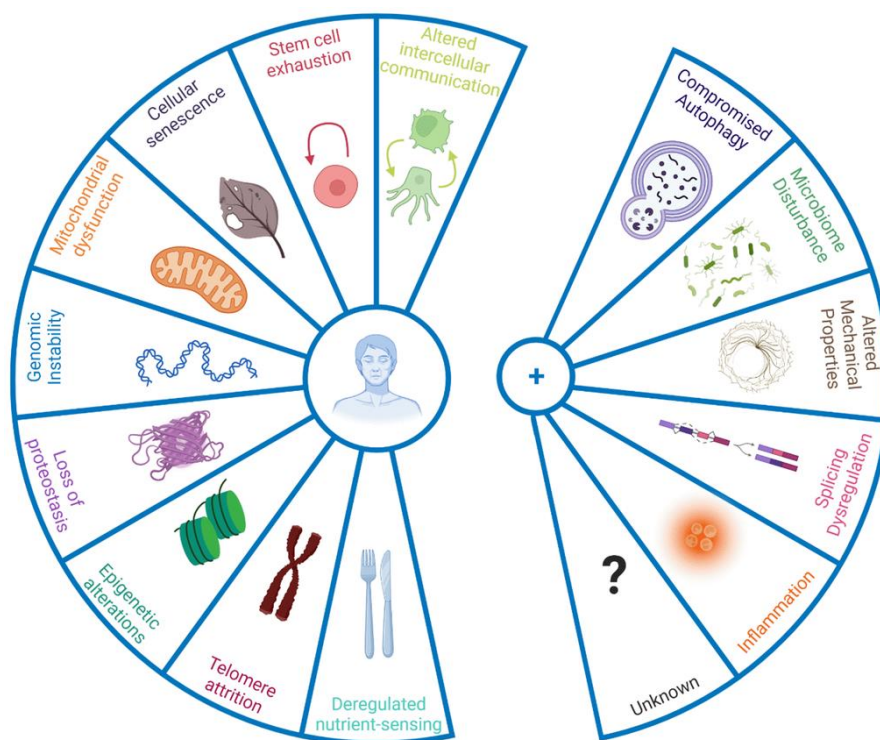


Figure 23 : Les marqueurs du vieillissement chronologique

La figure énumère les 14 caractéristiques du vieillissement. Ces dernières évoluent avec l'âge biologique et ont un rôle causal dans le vieillissement (Schmauck-Medina et al, 2022) [151].

La peau est l'un des organes les plus affecté par le vieillissement chronologique et environnemental. On retrouve des atteintes au niveau de l'épiderme, du derme, des annexes cutanées, des terminaisons nerveuses et au niveau de la microcirculation. La peau est le modèle par excellence pour étudier le vieillissement. Elle nous permet d'étudier les mécanismes du vieillissement, mais est également un outil pour le développement de potentielles stratégies anti-âges.

1) Modification de l'épiderme

Au cours du vieillissement l'épaisseur de l'épiderme, l'hydratation et la fonction barrière diminuent, et la JDE s'aplatie (**Figure 24 et Figure 25**).

a) Altération de la niche de cellules souches

Le cellules souches ont un rôle fondamental dans le maintien et la régénération des tissus. Le nombre de cellules souches diminue de manière drastique avec l'âge dans certains tissus (muscle, os, cerveaux, et le sang) [150]. Les raisons de ce déclin sont multifactorielles,

telles que les dommages à l'ADN, l'augmentation de l'expression de P16 ou encore le raccourcissement des télomères [150,152].

Contrairement à d'autres tissus, la fonctionnalité et le nombre de cellules souches épidermiques ne semblent pas être affectés par le vieillissement [153]. Les cellules souches épidermiques (CSE) issues de souris âgées de 22-24 mois maintiendraient leurs capacités prolifératives et leur potentiel de multipotence de manière identique aux cellules de souris jeunes (2 mois). Les télomères des CSE de souris âgées semblent légèrement diminués, mais de manière non significative, par rapport aux cellules de souris jeunes. De plus, l'expression de gènes et la capacité de réponse à divers stimuli comme le calcium ne semblent pas être altérées au cours du vieillissement [153,154]. Les CSE ont la capacité de se protéger du stress oxydatif via une forte expression d'enzymes antioxydantes telles que SOD (superoxyde dismutase). Le niveau de base de SOD dans les cellules souches âgées semble être similaire aux cellules jeunes, suggérant un maintien des capacités de résistance au stress oxydatif avec l'âge [153]. Cependant l'installation du microenvironnement inflammatoire de bas grade au cours du vieillissement [151] semble modifier la niche de cellules souches et leurs réponses [155]. En effet, dans l'épiderme de souris âgées (18 mois), le nombre de cytokines inflammatoires apparaît largement augmenté comparé à l'épiderme de souris de 3 mois. L'application *in vitro* de certaines de ces cytokines sur les CSE conduit à un arrêt de leur prolifération, suggérant un effet négatif du microenvironnement inflammatoire sur les cellules souches. Par ailleurs, Doles *et al* ont révélé que la voie de signalisation JAK-STAT était en partie responsable de l'altération des fonctions des cellules souches [155]. L'application *in vitro* et *in vivo* de l'inhibiteur de JAK (JAKi) permettrait de restaurer la prolifération des cellules souches. Chez les souris âgées l'application topique de JAKi augmente le nombre de follicules pileux et l'expression de Ki67 et d'autres protéines impliquées dans le cycle pileux [155]. Ainsi l'environnement inflammatoire et la modification de la signalisation cellulaire des cellules souches épidermiques favorisent le vieillissement de l'épiderme.

b) Modification de l'épaisseur de l'épiderme

L'amincissement de l'épiderme résulte également de l'altération de la différenciation épidermique. Le calcium est un facteur indispensable à la différenciation des kératinocytes. Chez des individus jeunes (~30 ans), le gradient de calcium est bien établi avec une concentration très importante dans les couches différenciées notamment dans la couche cornée. A l'inverse dans la peau d'individus âgés (~70 ans), on observe une perte de ce gradient calcique, avec une présence du calcium dans tout l'épiderme [156]. Ce défaut de gradient a pour

conséquence une perturbation de la différenciation des kératinocytes, qui inclut principalement une altération des protéines structurales impliquées dans la fonction barrière. L'épiderme des peaux âgées présente une diminution des composants principaux de la couche cornée tels que la lorricrine et la filaggrine qui corrèle avec la diminution de la concentration calcique dans la couche granuleuse [157]. La filaggrine étant le précurseur du facteur naturel d'hydratation, la diminution de son expression a donc un impact direct sur la sécheresse de la peau au cours du vieillissement [158]. Par ailleurs, pour certaines zones anatomiques comme le visage, on observe chez les individus âgés une perte d'eau trans-épidermique plus importante ainsi qu'une couche cornée moins épaisse liée à une diminution des composants lipidiques [159]. Ainsi l'altération de la barrière cutanée est responsable de la sécheresse de la peau et favorise la pénétration de pathogènes.

c) Altération de la différenciation des kératinocytes

Les modifications épigénétiques impliquent des méthylations de l'ADN, des modifications post-transcriptionnelles des gènes et post-traductionnelles des histones, et le remodelage de la chromatine. Des changements épigénétiques anormaux impactent l'expression des gènes et des processus cellulaires favorisant l'apparition de pathologies et du vieillissement. Les modifications post-traductionnelles des histones sont modulées par différentes enzymes. Le site et le niveau de méthylation des histones peut aboutir au vieillissement prématuré [160]. A l'inverse, certaines enzymes comme histones déacétylases de la famille des Sirtuines sont impliquées dans la longévité (compaction de l'ADN, stabilité du génome), mais leur expression et activité diminuent avec l'âge [150,161,162]. Les microARN régulent l'expression de plus d'un tiers des gènes au niveau post-transcriptionnel et peuvent donc influencer le devenir de la cellule.

Dans le cadre de la thèse de Charlotte Muther (2015-2017) au laboratoire, nous avons précédemment mis en évidence l'implication d'un microARN dans le processus de différenciation au cours du vieillissement. En effet, l'expression de miR-30a s'est avérée largement augmentée dans les kératinocytes épidermiques de patients âgés [163]. La surexpression de miR-30a dans un modèle d'épiderme reconstruit conduit à une altération drastique de la différenciation des kératinocytes, marquée par une diminution de KRT1/KRT10 et de l'involucrine, et une perte de la lorricrine. Par ailleurs, nous avons récemment mis en évidence que le miR-30a-5p ciblait directement BNIP3L (BCL2 interacting protein 3 like), un récepteur de la mitophagie. La mitophagie, permet l'élimination des mitochondries et limite donc l'accumulation de mitochondries défectueuses et toxiques pour la cellule. Ainsi,

l'augmentation de l'expression de miR-30a au cours du vieillissement conduirait à un défaut de la mitophagie, notamment au niveau de la couche granuleuse, et participe à l'altération de la différenciation terminale de l'épiderme [164].

d) Modification structurale de la JDE

Le vieillissement cutané est également caractérisé par un aplatissement de la JDE (**Figure 26**). Cette modification structurale est essentiellement liée à une altération de la composition protéique de la JDE. Langton *et al* ont mis en évidence une diminution de l'expression génique et protéique de l'intégrine $\beta 4$, la laminine 332, le collagène VII alpha 1, et le collagène XVII alpha 1 au niveau de la JDE de patients âgés [165]. Ces modifications quantitatives sont également accentuées au niveau des zones photo-exposées [166].

e) Perte de la sensorialité

Des études réalisées sur des patients âgés sains révèlent que la densité de fibres nerveuses intra-épidermiques ne varie pas de manière significative avec l'âge [167,168]. A l'inverse, des patients âgés présentant des neuropathies (périphériques ou centrales) ont un nombre de fibres nerveuses intra-épidermiques diminué, et une modification de l'architecture de ces fibres (ramifications complexes). Par ailleurs, la réduction de la détection aux chaleurs nocives chez les souris âgées (33 mois) est corrélée avec la diminution des canaux ioniques TRPV1 et Nav1.8 (canal sodique), et au changement d'expression des récepteurs aux facteurs de croissance (GFR $\alpha 3$ - artemin Growth Factor Receptor $\alpha 3$), qui modifieraient ensemble la fonction des terminaisons nerveuses sensorielles [169].

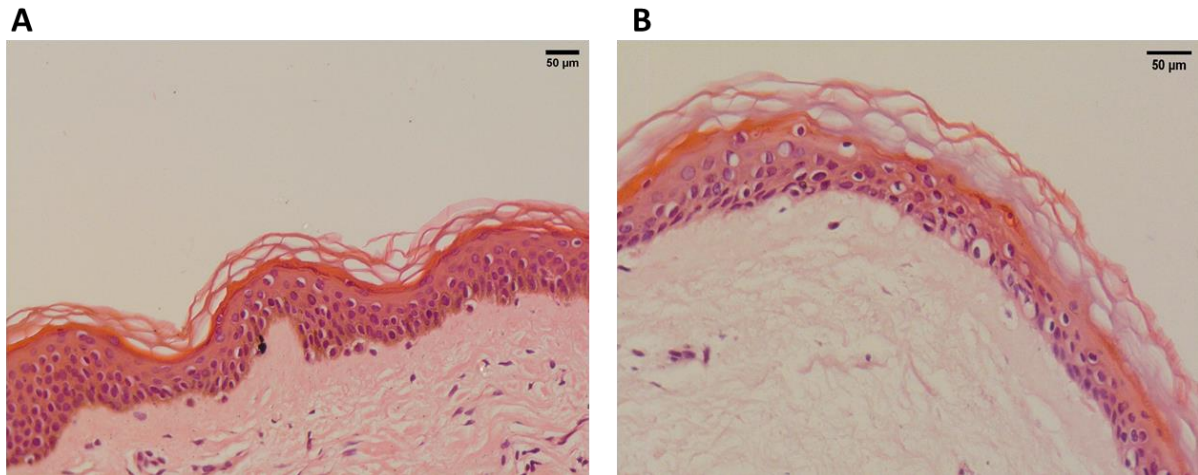


Figure 24 : Comparaison histologique d'une peau humaine jeune et âgée

Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine d'une peau de femme jeune (30ans) (A), et âgée (65 ans) (B). Le vieillissement est caractérisé par une diminution de l'épaisseur de l'épiderme et un aplatissement de la jonction dermo-épidermique. (Images : Lisa MARTIN)

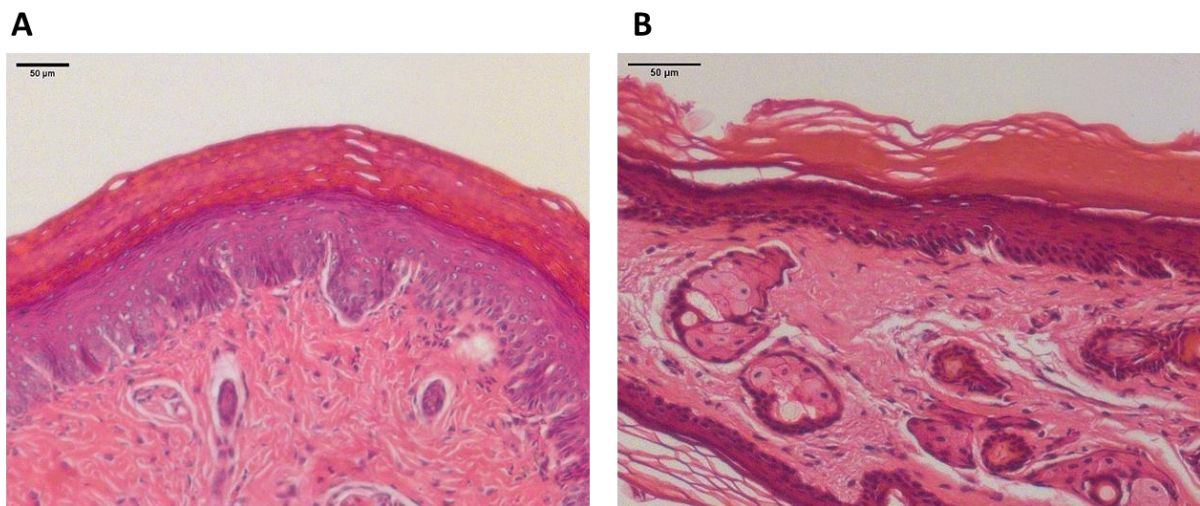


Figure 25 : Comparaison histologique d'un coussinet de souris jeune et âgée

Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine d'un coussinet de souris jeune (5mois) (A), et d'un coussinet de souris âgée (22mois) (B). L'épiderme des coussinets de souris âgées est moins développé, et les papilles dermiques semblent moins prononcées. (Images : Lisa MARTIN)

2) Altérations du derme

L'apparition des rides avec l'âge résulte de la désorganisation des composants de la MEC du derme ainsi que l'altération des fonctions des fibroblastes [170].

Au cours du vieillissement, les fibres de collagènes sont fragmentées à cause de l'augmentation de leur dégradation et de la diminution de leur biogénèse. La régulation de la

dégradation des fibres de collagène dépend de la balance MMP/TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase). Cependant avec l'âge cette balance est perturbée et favorise l'activité des MMP, augmentant donc la dégradation excessive des collagènes [171]. L'activité et l'expression des MMP est augmentée en présence d'EROs. Ces stress vont stimuler le facteur AP-1 pour la transcription des MMP [170,172]. De plus, les EROs et les UV activent la voie NFκB, qui elle aussi contribue à l'augmentation de l'expression des MMP. Le TGF-β (Transforming Growth Factor β) est également impliqué dans la régulation de la dégradation/production des fibres de collagènes. Il régule positivement l'expression des gènes de la MEC par la voie des SMAD. L'activation de AP-1 par les EROs inhibe la voie du TGF-β, et donc impacte la synthèse de collagène. La perte progressive des fibres de la MEC a des conséquences physiques, comme l'apparition de rides, mais également intrinsèques en affectant l'adhérence des fibroblastes à la MEC [170,172]. La perte d'ancrage des fibroblastes à la MEC conduit une modification morphologique des cellules, et à un phénotype de sénescence [173]. La sénescence correspond à un arrêt du cycle cellulaire irréversible, associé à une modification morphologique (augmentation du cytoplasme, l'apparition de vacuoles et modification du pH) de la cellule. L'entrée en sénescence des cellules peut être multifactorielle (raccourcissement des télomères, signalisation oncogénique, stress oxydatif, dommages mitochondriaux, infections virales ou bactériennes, UV et radiations...). Les lésions générées par ces divers acteurs conduisent à l'activation de la voie P53/P21 et la voie P16 marquant un arrêt du cycle cellulaire [152]. Les fibroblastes sénescents vont alors stopper la production d'éléments matriciels et libérer des EROs, amplifiant donc l'action des MMP. L'induction de MMP12 sous l'effet des UV est responsable de l'élastose solaire caractérisée par une accumulation de fibres élastiques désorganisées [170]. D'un point de vue intrinsèque, on observe une diminution des enzymes impliquées dans l'assemblage des fibres élastiques, comme la lysyl oxydase [174].

3) Altération de la fonction vasculaire

Le vieillissement correspond au déclin de la fonctionnalité des organes, incluant des modifications de la microcirculation cutanée. Comme précisé précédemment, la microcirculation cutanée assure entre autres l'apport en oxygène et en nutriments, le contrôle de la température et de la réponse inflammatoire. Cependant, ces mécanismes se dégradent avec l'âge et sont marqués par une diminution de la densité des vaisseaux, de la perfusion sanguine et de la vasodilatation induite par l'ACh [88,175]. Ce défaut de réponse à l'ACh peut s'expliquer par la dysfonction de la eNOS et la baisse de biodisponibilité de NO au cours du vieillissement. La diminution de la concentration en L-arginine, substrat de la eNOS, à un

impact négatif sur l'activité de l'enzyme [176]. De plus, la production d'EROs par les cellules endothéliales et l'environnement inflammatoire perturbe les voies de signalisation impliquées dans la vasodilatation. Kang *et al* [177] ont révélé que les œstrogènes avaient un rôle protecteur vis-à-vis des EROs en favorisant la voie du NO et la eNOS. Cependant, avec la ménopause le taux d'œstrogènes diminue, et participe donc à l'altération de la voie NO [177,178]. Les EROs, notamment l'anion superoxyde (O_2^-), se lient au NO et forment le peroxyde d'azote, $ONOO^-$, diminuant alors la biodisponibilité de NO, ce qui participe à la dysfonction endothéliale [179]. Il existe trois types de NO-synthase : la eNOS (endothelial-NO synthase), dont l'activité est diminuée au cours du vieillissement ; la iNOS (inducible-NO synthase) principalement retrouvée dans les vaisseaux âgés ; la nNOS (neuronal-NO synthase) impliquée dans la régulation locale du tonus vasculaire. Contrairement à la eNOS, l'activité de la iNOS est augmentée avec l'âge. La stimulation de la iNOS par la voie NF κ B favorise la production de NO qui se lie à O_2^- et perturbe ainsi la fonction endothéliale [178] (Figure 26).

A l'inverse de l'ACh, la vasodilatation induite par la bradykinine ou la substance P n'est pas modifiée au cours du vieillissement, suggérant ainsi que la réponse endothéliale aux agonistes n'est pas affectée de manière universelle avec l'âge [180]. L'ACh stimule les récepteurs muscariniques M_3 et M_2 présents à la surface des cellules endothéliales, alors que la bradykinine et la substance P activent les récepteurs kinergiques- B_2 et tachykinine respectivement. DeSouza *et al* ont alors suggéré qu'il s'agissait d'un défaut spécifique à l'ACh et non d'une anomalie endothéliale [180]. L'utilisation d'un inhibiteur de la eNOS, L-NMMA (NO synthase inhibitor N(G)-monomethyl L-arginine), diminue la réponse à la bradykinine et à la substance P, informant de leur dépendance à la voie du NO. Les auteurs suggèrent également que la bradykinine et la substance P pourraient favoriser avec l'âge la production d'agents vasoactifs non NO-dépendant (prostanoïdes, EDHF...).

En parallèle de la voie du NO, la voie des prostacyclines est également impactée par le vieillissement. Les COX participent à la régulation du tonus vasculaire par la production d'agents vasodilatateurs (PGI_2) ou vasoconstricteurs (TXA_2). Avec l'âge, la balance entre vasodilatation et vasoconstriction est modifiée en faveur de la vasoconstriction [176].

Gaubert *et al* ont montré chez des souris âgées (24 mois) que la vasodilatation induite par l'ACh était résistante à l'inhibition NOS/COX mais diminuée en présence d'inhibiteurs de l'EDHF [88]. Ces résultats montrent que la perte de NO et de PGI_2 au cours du vieillissement peut être partiellement compensée par l'EDHF, qui ne joue aucun rôle dans la réponse à l'ACh des souris jeunes (6 mois).

Enfin l'atteinte de la réponse vasculaire dépend de chaque individu. Elle peut être liée à l'alimentation et à la consommation de tabac qui favorisent les EROs, le manque d'activité physique ou encore les facteurs génétiques. J'ai participé à la rédaction d'un article scientifique publié dans *biomedecines* en 2022, « Alpha-Lipoic Acid Supplementation Restores Early Age-Related Sensory and Endothelial Dysfunction in the Skin » [181], présentant deux souches de rat dont le vieillissement n'évolue pas de la même manière : la souche Brown Norway, caractérisée par un vieillissement sain et sans développement de pathologie, et la souche Wistar qui est davantage sujette à l'apparition de maladies avec l'âge. Nous avons montré que le flux sanguin basal des rats Wistar de 12 et 24 mois était diminué par rapport aux rats Wistar de 6 mois, mais que ce défaut n'était pas présent chez les rats Brown Norway. Par ailleurs, la vasodilatation induite par l'ACh tendait vers une diminution chez les rats Wistar de 12 et 24 mois, contrairement aux rats Brown Norway qui conservent la même amplitude de réponse à l'ACh jusqu'au moins 24 mois. De plus, l'utilisation d'antioxydant comme l'acide alpha-lipoïque permettait de restaurer la fonction endothéliale de plus de 83% chez les rats Wistar de 12 mois. Ainsi ces données suggèrent que chaque individu ne vieillit pas de la même manière et au même rythme.

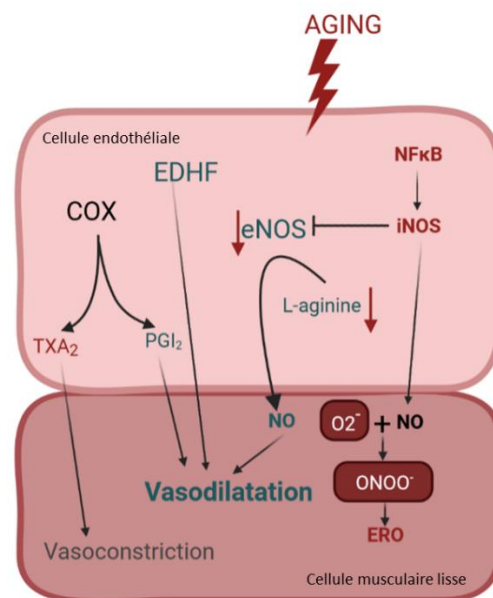


Figure 26 : Effet du vieillissement sur la réponse vasculaire endothélium dépendante

L'altération de la voie du NO, des COX et la production de EROs diminuent les capacités vasculaires au cours du vieillissement, malgré la contribution de l'EDHF.

4) Altération de la thermorégulation

Avec le changement climatique, les pics de chaleurs sont de plus en plus importants et la surmortalité associée a largement augmenté ces dernières années dans le monde. En effet, en 1980, 1 300 décès supplémentaires liés à la canicule avaient été enregistrés dans le monde, contre plus de 72 500 en 2003 et 56 000 en 2015 [182]. En France, la canicule de 2003 a conduit au décès de plus de 15 000 individus, soit une surmortalité de plus de 55%, parmi lesquels 12 000 personnes étaient âgés de plus de 75 ans [183]. Malgré la mise en place de systèmes de prévention, l'été 2022 a également été marqué par un nombre de décès accru face aux trois vagues de chaleurs, avec 2 272 décès en excès enregistrés pour les 75 ans et plus, soit 20% de mortalité en excès chez les septuagénaires. L'augmentation de la mortalité en période de forte chaleur est très largement associée à l'altération de la thermorégulation chez les individus âgés [179,184]. Le maintien de la température corporelle stable, c'est-à-dire l'homéothermie, repose sur différents mécanismes dont la thermorégulation vasculaire assurée par les micro-vaisseaux cutanés. La peau est capable de détecter les premières variations thermiques environnementale. Cette détection conduit à une rapide réponse adaptative du flux sanguin cutané, notamment via le système sensoriel [185–187]. Lorsque les mécanismes locaux sont inefficaces, un réflexe afférent est mis en place de la périphérie (la peau) au système nerveux central, plus précisément à l'hypothalamus et l'air pré-optique, qui renvoie des signaux effecteurs aux organes en vue d'accentuer la sudation et le flux sanguin cutané [48,188]. Cependant, ces mécanismes de thermorégulation sont altérés chez les individus âgés, ce qui conduit à une élévation du risque hyperthermie et des atteintes cardiaques [184,188].

Le défaut vasculaire lors d'un stress thermique a lieu même chez des individus en bonne santé, bien hydratés et acclimatés. Lors d'un chauffage global, le flux sanguin cutané est diminué de 25 à 50% chez des individus âgés comparé à des individus jeunes. Ce défaut est d'une part associé à la dysfonction de l'endothélium (eNOS et NO) et à la réduction de la densité des boucles de capillaire [175,176,178], et d'autre part à une baisse du débit cardiaque (5.8 L/min chez des individus de 19-28 ans, et 2.7L/min chez des individus de 64-81 ans), diminuant alors la redistribution du flux sanguin dans les tissus [184,188]. Par ailleurs, on observe une réduction des capacités de sudation avec l'âge. Ce défaut est associé à une atrophie des glandes sudoripares et donc à une diminution de la production de sueur [188]. Ainsi le déclin de la vasodilatation cutanée et de la production de sueur, est responsable d'une augmentation de chaleur interne par défaut de dissipation de la chaleur.

En conclusion, la peau est un organe sensoriel à l'interface entre notre corps et l'environnement. Elle est donc capable de percevoir et transmettre des informations permettant d'adapter notre organisme aux contraintes extérieures, en particulier face à la chaleur. La régulation des réponses vasculaires cutanées est un mécanisme important pour la survie, notamment en condition extrême. Le déclin des fonctionnalités de la peau, dont le système vasculaire cutané, avec l'âge augmente le risque d'hyperthermie et donc le nombre de décès. Avec le réchauffement climatique, +1.5 °C prévus en 2030 (GIEC rapport 2023), et le défaut de réponse vasculaire chez les individus âgés, la surmortalité va probablement continuer à fortement augmenter dans les années à venir.

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

Le vieillissement a un impact majeur sur notre société. Les populations âgées, même en bonne santé, sont particulièrement sensibles aux changements climatiques. Ceci en particulier dû à un affaiblissement des mécanismes de défense face à la chaleur. A cause du dérèglement climatique, l'intensité, la durée et la sévérité des vagues de chaleurs sont amenées à augmenter dans les années à venir, conduisant donc à un accroissement du risque de mortalité. Il est donc crucial d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de thermorégulation et l'effet de l'âge, afin de réduire ou de prévenir les risques sanitaires en cas de canicules chez les individus âgés.

Bien que la thermorégulation implique divers mécanismes physiologiques, la détection thermique, notamment cutanée, est primordiale. En effet, la peau est la première à percevoir les variations de températures extérieures, et assure donc la mise en place d'une réponse adaptée (vasodilatation) pour minimiser l'effet de la chaleur sur les tissus proches. Historiquement, les terminaisons nerveuses sensorielles traversant l'épiderme étaient considérées comme les transducteurs exclusifs de la détection de la température. Cependant, les kératinocytes épidermiques peuvent également agir comme des capteurs sensoriels cutanés, capable de détecter les changements thermiques.

Nous avons récemment montré que des souris mutées pour le canal TRPV3, fortement exprimé par les kératinocytes, présentaient un défaut de vasodilatation induite par la chaleur. De manière intéressante la réponse vasculaire de ces souris semble similaire à la réponse vasculaire d'individus âgés. De ce constat, nous avons émis l'hypothèse que le canal TRPV3 localisé sur les kératinocytes pourrait jouer un rôle important dans les défauts de détection de températures modérées chez les personnes âgées, et aurait pour conséquence une altération de la vasodilatation induite par la chaleur. Par ailleurs, la capacité des kératinocytes épidermiques à communiquer, au travers de récepteurs thermosensibles comme TRPV3, avec les vaisseaux cutanés situés dans les couches profondes du derme reste à résoudre.

Le premier objectif de cette thèse consistait à analyser la réponse vasculaire de souris jeunes, âgées et *Trpv3*-KO, suite à un chauffage. Parallèlement nous avons évalué la fonctionnalité des cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires par iontophorèse. La réponse sensorielle a également été étudiée par Tail Flick et Hot plate. Enfin des mesures de TEWL ont été réalisées pour évaluer l'intégrité de la barrière cutanée des souris.

Le second objectif de cette thèse visait à caractériser l'expression du canal TRPV3 dans des peaux humaines et murines de divers âges. Au début de ma thèse, les études sur le canal TRPV3 étaient très minces et aucune étude n'a été réalisée sur le lien entre le niveau d'expression de TRPV3 et le vieillissement. Par ailleurs, nous avons évalué l'activité du canal

Objectifs de la thèse

TRPV3 sur des kératinocytes primaires humains issus de donneurs jeunes et âgés. Ces manipulations ont pu être réalisées grâce à des collaborations avec le Laboratoire Interactions Epithéliums Neurons de Brest (Nicolas Lebonvallet et Ophélie Pierre), et le Laboratoire de recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, diabétologie et Nutrition de Lyon (Sylvie Ducreux), qui nous ont permis d'accéder à des plateformes d'imagerie calcique.

Enfin le troisième objectif avait pour but d'identifier les médiateurs dépendants de TRPV3 lors d'une stimulation de kératinocytes primaires humains issus d'individus jeunes et âgés. Des analyses géniques et protéiques ont été réalisées, et le sécrétome des kératinocytes a également été étudié par spectrométrie de masse grâce à la plateforme Protein Science Facility hébergée par l'IBCP.

Le prix Nobel de physiologie ou médecine de 2021 attribué à David Julius et Ardem Patapoutian pour leurs découvertes des récepteurs de la température et du toucher, a renforcé notre intérêt dans l'étude des canaux TRP, notamment TRPV3.

Les résultats générés au cours de cette thèse ont permis de rédiger un article scientifique qui a été soumis au journal *Geroscience*.

Matériels et Méthodes

I. Techniques de biologie cellulaire

– Culture cellulaire

1) Type cellulaire

La partie *in vitro* de cette thèse a été réalisée à partir de kératinocytes primaires humains, isolés de biopsies de peau. Deux groupes d'âges ont été définis en fonction des donneurs : jeune (26 à 42 ans) et âgé (75 à 93 ans). Les optimisations de protocoles ont été réalisées sur des kératinocytes de donneurs jeunes. Afin de s'affranchir de certains biais, les biopsies ont été sélectionnées en fonction de leur localisation et des antécédents pathologiques du donneur. Nous avons priorisé dans la mesure du possible les patients sans pathologies cardiovasculaires (diabète, hypertension...), et des zones anatomiques non photo-exposées. La difficulté d'accès aux biopsies de patients âgés, nous a contraint à utiliser des cellules commerciales (Lonza). Nous avons également souhaité mélanger les sexes des donneurs afin d'avoir une population plus hétérogène.

2) Isolement des kératinocytes

Transférer la biopsie dans un falcon 50ml

- Recouvrir de bétadine et incuber 15min à RT
- Préparer le mix suivant :
 - 2,4ml de dispase 20U/ml (Dispase II ; Roche Diagnostics, #4942078001)
 - 5ml de pénicilline (10 000U/ml) / Steptomycine (10 000µg/ml) (P/S ; Gibco)
 - 5ml de trypsine « blanche » 0,02mg/ml (Trypsine 1 :250, Gibco, #27250018)
 - 7,6ml de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco)
- Transférer la biopsie dans une boîte de pétri et la rincer avec du Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS ; Sigma)
- Placer la biopsie côté épiderme vers le haut
- A l'aide d'une pince et d'une paire de ciseaux, pincer et couper l'épiderme le plus finement possible (éviter de couper trop en profondeur pour s'affranchir de l'hypoderme)
- Placer les morceaux de biopsie dans une nouvelle boîte de pétri (épiderme vers le haut) et ajouter la solution de dispase/trypsine en prenant garde à ne pas retourner les morceaux
- Laisser incuber à 4°C toute la nuit ou 2 heures à 37°C et 5%CO₂.

Matériels et méthodes

Il est important de noter que tout au long de la manipulation de la biopsie, il ne faut pas hésiter à la tremper dans du DPBS pour éviter son dessèchement sinon elle devient élastique et difficile à manipuler.

Etapas :

- Le lendemain (ou après incubation 37°C), à l'aide d'une pince et d'un scalpel, prélever les épidermes et les placer dans un Falcon 50ml contenant 20ml de trypsine EDTA 1X (Trypsine-Ethylène Diamine Tétracétique ; Gibco)
- Incuber le tube 20min à 37°C
- Durant l'incubation, vortexer régulièrement pour favoriser l'isolement des kératinocytes
- Après incubation, homogénéiser la solution en aspirant/refoulant avec un cône de p1000 coupé au bout
- Placer sur un tube Falcon 50ml neuf un tamis cellulaire de 70µm (BD Falcon) stérile et le mouiller avec du DMEM + 10% sérum de veau fœtal (SVF ; Gibco) + 1% de P/S
- Filtrer la solution afin d'éliminer les cellules de la couche cornée et les agrégats cellulaires
- Laver le filtre et le tube avec du DMEM + 10% SVF + 1% P/S et compléter jusqu'à 50ml
- Centrifuger 15min à 1800rpm
- Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 10 à 15ml de milieu Keratinocyte Basal Medium -Gold supplémenté (KBM-Gold ; Lonza, #00192060) selon la taille du culot cellulaire obtenu
- Compter les cellules à l'aide de bleu de trypan (Sigma-Aldrich) et d'une cellule de Malassez
- Ensemencer les HKP dans une flasque à raison de 50 000 cellules/cm² dans du KBM-Gold supplémenté et incuber à 37°C, 5% CO₂.
- Le lendemain, changer le milieu
- Changer le milieu tous les 2 jours jusqu'à une confluence de 70% environ

3) Culture de kératinocyte

a) Décongélation des kératinocytes

- Préparer un Falcon 15 mL contenant 5 mL de KBM-Gold à température ambiante
- Récupérer les cellules cryoconservées et reprendre le culot de cellule congelée (1mL) avec 1 mL de milieu KMB-gold à RT jusqu'à décongélation.
- Transférer les 2mL de cellules dans le Falcon 15 mL préalablement préparé

Matériels et méthodes

- Culoter les cellules 5min à 1 500 rpm (RT)
- Eliminer le surnageant, puis reprendre le culot avec 1 mL de milieu
- Compter les cellules à l'aide de bleu de trypan (Sigma-Aldrich) et d'une cellule de Malassez
- Ensemencer les kératinocytes à une densité de 10 000 cellules/cm² en KBM-Gold (37°C, 5% CO₂)
- Changer le milieu le lendemain, puis tous les deux jours.

b) Entretien des cellules

Lorsque les cellules ont atteint une confluence d'environ 70%, les cellules sont trypsinées puis réensemencées ou congelées selon le protocole suivant :

- Eliminer le milieu de culture
- Rincer les cellules au PBS 1X DPBS (Sigma)
- Incuber les cellules entre 5- 7 min à 37°C en présence de Trypsine 1X
- Une fois les cellules détachées du support (vérification au microscope), inhiber l'action de la trypsine avec du DMEM + 10% SVF + 1% P/S (2 fois le volume de trypsine).
- Centrifuger les cellules 5min à 1 500 rpm (RT)
- Eliminer le surnageant, puis reprendre le culot avec 1 mL de milieu
- Compter les cellules à l'aide de bleu de trypan (Sigma-Aldrich) et d'une cellule de Malassez
- Ensemencer les kératinocytes à une densité de 10 000 cellules/cm² en KBM-Gold (37°C, 5% CO₂) ou congeler les cellules (45% milieu, 45% sérum pure, 10% DMSO).

Les manipulations ont été réalisées sur des kératinocytes à passage compris entre P1 et P3 maximum.

– Différenciation 2D des kératinocytes

L'induction de la différenciation 2D des kératinocytes en monocouche nous a permis d'évaluer l'expression de TRPV3 au cours du processus de différenciation. Des marqueurs des différentes couches de l'épiderme ont été utilisés pour valider les étapes de la différenciation.

- Ensemencer les cellules en plaques 6 puits (10 000 cellules/cm²) en KBM-Gold – 2 puits/point de différenciation
- Changer le milieu tous les deux jours

Matériels et méthodes

- Lorsque les cellules ont atteint une confluence de 100%, arrêter le point J0. La différenciation est induite de manière spontanée sans ajout d'autres substances dans le KBM-Gold.
- Arrêter les points à J2 post-confluence, J4, J6 et J9.

– Transfection de siRNA sur kératinocytes primaires humains

Les kératinocytes primaires humains ont été transfectés avec des siRNA TRPV3 (IDT, siTRPV3) afin de valider la réponse TRPV3 dépendante des kératinocytes.

1) Préparation des cellules

- Ensemencer les kératinocytes afin qu'ils soient à environ 50% confluence le jour de la transfection.

2) Réactifs

- Préparer deux mix dans différents tubes de 1.5 mL :

<i>Pour 1 réaction dans 1 puit de plaque 6 puits</i>	Tube 1	Tube 2
Opti-MEM	92.5 µL	97.8 µL
RNAiMax	7.5 µL	
siRNA (20 µM)		2.2 µL

- Ajouter les siRNA dilués dans le mix de Lipofectamine® RNAiMAX au ratio 1 :1, homogénéiser et incubé, 5-10 min at RT.

3) Transfection

- Changer le milieu des cellules par 1.8 mL de milieu frais
- Traiter les cellules par ajout de 200µL du complexe siRNA-Lipide goutte à goutte
- Changer le milieu au bout de 6H de transfection
- Après 48H de traitement, récupérer les cellules et analyser l'efficacité de la transfection par RT-qPCR

Matériels et méthodes

– Transduction de shRNA sur kératinocytes primaires humains

La transduction de shRNA TRPV3 (Cliniscience, #TL300805) par lentivirus permet l'intégration du plasmide au génome et donc une expression stable du shRNA. L'extinction de l'expression de TRPV3 (d'au moins 70%) dans les kératinocytes permet de valider l'activation dépendante de TRPV3.

1) Ensemencement des cellules

- Ensemencer les cellules en plaque 6 puits entre 10 000 et 12 500 cellules/cm²
- Le lendemain, à environ 50% confluence, transduire les cellules avec le lentivirus shTRPV3.

2) Préparation des réactifs

- Préparer 2mL de milieu de culture avec 6µg/µL de polybrène (Millipore, #1003-G).
- Calculer la MOI (multiplicity of infection) ou le ratio nombre de cellules/ nombre de particules virales par µL soit :
 - $MOI * \text{nombre de cellule} = \text{Nombre de particules}$
 - $\text{Nombre de particules} / \text{concentration de particules (UI/mL)} / 1000 = \text{Volume de particules par puit (µL)}$

3) Traitement

- Changer le milieu des cellules avec du milieu+ polybrène (6µg/mL)
- Décongeler rapidement le lentivirus et ajouter directement au puit le volume de particules calculé.
- Incuber les cellules au moins 16H à 37°C 5% CO₂
- Le lendemain changer le milieu de culture
- Observer la fluorescence 72H après transduction puis récupérer les cellules pour l'analyser l'extinction de TRPV3.

– Etude de l'activation et inhibition du canal TRPV3

Pour évaluer l'activité du canal TRPV3 nous avons dû définir des agonistes « spécifiques » de TRPV3, ainsi que les modalités d'activation (concentrations, simple ou double stimulations).

Matériels et méthodes

Par ailleurs, pour contrôler la réponse spécifique du canal TRPV3 nous avons évalué l'efficacité de plusieurs antagonistes décrits dans la littérature.

1) Activation pharmacologique et thermique de TRPV3

- ensemencer des kératinocytes à 10 000cellules/cm² en plaques 6 ou 12 puits.
- A 70% confluence, traiter des cellules avec les agonistes :

Carvacrol (Sigma Aldrich, #W224511) (Stock 6.5M)

- Préparer une dilution au 1/10ème dans du DMSO 100%

- Simple stimulation :

- Diluer le carvacrol dans le milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 300µM ou 500µM

- Incuber les cellules à 37°C 5% CO₂ jusqu'à récolte des cellules (6H post-traitement pour ARN)

- Double stimulation carvacrol :

- Diluer le carvacrol dans le milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 300µM ou 500µM

- Incuber les cellules 5 min les cellules à 37°C 5% CO₂

- Ajouter x µL de solution de carvacrol 1000x/puit pour obtenir 300µM ou 500µM final (2µL en 6 puits ou 1µL en 12 puits)

- Incuber les cellules à 37°C 5% CO₂ jusqu'à récolte des cellules (6H post-traitement pour ARN)

2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) (Sigma Aldrich, #100065) (Stock 40mM)

- Diluer la poudre (100mg) dans du DMSO 100% pour obtenir une concentration stock à 40mM

- Simple stimulation :

- Diluer l'échantillons dans le milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 50µM

- Incuber les cellules à 37°C 5% CO₂ jusqu'à récolte des cellules (6H post-traitement pour ARN)

- Double stimulation 2-APB 50 µM et carvacrol :

- Diluer l'échantillons dans le milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 2-APB à 50µM et de carvacrol 300µM ou 500µM.

Matériels et méthodes

- Incuber les cellules à 37°C 5% CO₂ jusqu'à récolte des cellules (6H post-traitement pour ARN)

Incubation à 33°C

- **Simple stimulation :**

- Incuber les cellules à 33°C 5% CO₂ jusqu'à récolte des cellules (6H post-traitement pour ARN)

- **Double stimulation carvacrol et 32°C :**

- Diluer le carvacrol dans le milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 300µM ou 500µM

- Incuber les cellules les cellules à 33°C 5% CO₂ jusqu'à récolte des cellules (6H post-traitement pour ARN)

2) Inhibition pharmacologique de TRPV3

- Ensemencement des kératinocytes 10 000cellules/cm² en plaques 6 ou 12 puits.
- A 70% confluence, traitement des cellules avec les antagonistes pendant 10 min à 37°C 5% CO₂, puis traiter avec les agonistes (cf p71-72)
- Récolte des cellules 6H post-traitement pour ARN

Tableau 1 : Liste des antagonistes et concentrations testés

<i>Antagonistes</i>	<i>Références</i>	<i>Concentration stock</i>	<i>Concentrations testées</i>	<i>Références bibliographiques</i>
Forsythoside B	HY-N0029	10mM	10-20-50µM	[189]
17R-Resolvin D1	SC-358747	380µM	0.3-1-3µM	[190]
Osthole	HY-N0054	10mM	20-50µM	[191]
Dyclonine	HY-B0364A	10mM	5-30-50µM	[192]
74a	Tocris 6831	50mM	50-100-150µM	[193]
3,4-Dicaffeoylquinic Acid (IAB)	HY-N0057	20mM	50-100µM	[194]

Matériels et méthodes

3) Etude de l'activité du canal TRPV3 par imagerie calcique (Fura2-AM)

TRPV3 est canal perméable au calcium. Il est donc possible d'évaluer l'activité du canal TRPV3 par mesure du flux calcique intracellulaire à l'aide de sondes radiométriques comme le Fura-2-acetoxymethyl ester (Fura2-AM) (Thermo Fischer Scientific, #F1221). Cette sonde pénètre de manière non invasive dans la cellule et peut être activée par une excitation de 340 nm, correspondant au calcium lié à la sonde, et 380nm correspondant au calcium non lié.

Les premières optimisations de la manipulation (conditions de culture (prolifération ou différenciation), la présence de calcium extracellulaire ou non, et la durée d'incubation de la sonde) ont été réalisées lors d'un séjour dans le Laboratoire Interactions Epithéliums Neuronnes-EA 4685- BREST sous l'encadrement du Docteur Nicolas Lebonvallet et du Docteur Ophélie Pierre. Dans un second temps, j'ai pu réaliser de nouvelles analyses d'imageries calciques sur un nombre de donneurs plus importants, avec des concentrations d'agonistes et d'antagonistes validés, au sein du Laboratoire de recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, diabétologie et Nutrition -U1060 INSERM – Lyon sous l'encadrement du Docteur Sylvie Ducreux.

a) Optimisation imagerie calcique (Laboratoire de Brest)

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles en plaque 24 puits. Deux conditions de culture ont été évaluées : la prolifération et la différenciation

i. Ensemencement des cellules

Pour chaque puits, déposer au centre une lamelle ronde :

- Déposer 320µL de Poly-L-lysine à 0,01% (P4707, sigma) -bien faire un ménisque (donc déposer lentement)
- Incuber 5-10 min sous la PSM.
- Récupérer la Poly-L-lysine dans un tube (peut être réutiliser plusieurs fois)
- Ensemencer 20 000 cellules/puits (310µl/lamelles) – déposer très lentement
- Incuber 1H à RT sous le PSM
- Incuber les cellules 24H à 37°C 5% CO₂ (Prolifération), ou 24H à 37°C 5% CO₂ puis mise en contact avec du DMEM Lonza (BE12-604F/U1) sans sérum (différenciation) pendant 16H.

ii. Préparation des solutions

Tampon de charge

Matériels et méthodes

- Préparer 50mL de tampon de charge avec calcium : 35 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose. Ajuster le pH à 7.45 avec du NaOH
- Tampon de charge sans calcium: 35 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0 mM CaCl₂, EGTA, 10 mM HEPES, 10 mM glucose and pH adjusted at 7.45 with NaOH

Agoniste

- Préparation du Carvacrol 10X (Test sur **100μM**) :

Carvacrol à 6,5M : 30μL Car +270μL DMSO -> 650mM

40μL Car 650mM + 360μL medium lonza -> 65mM

1000μM: 30μL Car 65mM + 1935μL medium lonza

Fura 2-AM (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France)

- Ajouter 50μL de DMSO au Fura 2-AM (-20°C)

iii. Test calcique

1. Allumer l'ordinateur, le lambda, le générateur, la caméra et le Joystick (1/4 H avant)
2. Incuber 2μL de Fura-2AM (4μM) sur le côté du puit (pas au centre) 45min à 37°C.
3. Incuber chaque lamelle à 15 min d'intervalles.
4. Récupérer et rincer la lamelle avec du tampon de charge avec ou sans Ca²⁺, puis placer dans 320μL de tampon de charge avec ou sans Ca²⁺
5. Analyser les signaux calciques (Ratio 340/380) (340 : Calcium lié ; 380 : Calcium libre) avec le microscope IX71 Olympus équipé du monochromator illumination system (Polychrome V, TILL Photonics). L'émission est capturée au travers d'un miroir dichroïque 415 DCLP, et visualisée par une caméra 14-bit CCD (EXiBlue, Qimaging). L'acquisition et l'analyse sont réalisées via le logiciel Metafluor 6.3 (Universal Imaging, West Chester, PA, USA) à température ambiante (RT).
6. Logiciel :
 - *Start focusing* : choisir un champ avec au moins 20 cellules. Les cellules sont représentées avec un gradient de couleur (bleu au rouge). Attention à ne pas choisir une cellule avec une coloration noir (la cellule n'est plus viable)
 - *Stop focusing*
 - *AquOne*
 - *Region (cercle)* : permet de délimiter les cellules. Le 1^{er} sert à définir le bruit de fond, puis les autres sont ajoutés à toutes les cellules.
 - *Done* : regarder que l'écart entre le background et les cellules diffère de 2 en intensité
 - *AquOne* : vérifie que la plaque n'a pas bougé

Matériels et méthodes

- *Reference- subtract the background*
 - *AquOne*
 - *Log Data & Save data*
 - *Set Timelaps : 3s*
 - *Zero clock*
 - *Aquire : Les courbes basales des intensités et des ratios vont s'afficher. Regarder, pour les intensités, que les lignes en pointillés(380nm) soient en dessous des lignes pleine (340nm). Regarder que les ratios soient compris entre 1-2 (on peut descendre à 0,8). Lorsque tout semble valide la stimulation peut commencer*
7. L'agoniste est ajouté après réglage des paramètres (35µL 1000X)

b) Imagerie calcique Laboratoire CarMeN

Les cellules sont ensemencées sur des µ-Dish 35mm High (Ibidi GmbH, #81156).

i. Ensemencement des cellules

- Ensemencer 10000 cellules/cm² au centre de la µ-Dish (3.2cm²) (400µL)
- Incuber 1H à RT sous le PSM
- Compléter le milieu à 1mL et incuber les cellules 24H à 37°C 5% CO₂.

ii. Préparation des solutions

Agoniste

- Préparation du 2-APB 200µM (4X) (**50µM final** dans la µ-Dish)
- Préparation du carvacrol 1200µM (4X) (**300µM final** dans la µ-Dish) dans le milieu de culture

Antagoniste IAB

- Préparation de l'IAB (stock 20mM) à **100µM** dans le milieu de culture

Fura 2-AM (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France)

- Ajouter 50µL de DMSO au Fura 2-AM (-20°C)

iii. Test calcique

1. Incuber 2µL de Fura-2AM (2µM) 45min à 37°C. Incuber chaque Dish à 15 min d'intervalles.

Matériels et méthodes

2. Récupérer et rincer la lamelle avec du tampon HBSS Ca^{2+} et Mg^{2+} (Gibco, UK, #14025-050)
3. Ajouter 750 μL de HBSS 1X ou 750 μL d'antagoniste IAB
4. Analyser les signaux calciques (Ratio 340/380) avec le DMI6000 Leica microsystem. L'acquisition des images est réalisée avec la caméra Orca-Flash 4.0 Scientific CMOS (Hamamatsu) au 40X en présence d'huile à immersion. L'utilisation du filtre Lambda DG-4+ (Sutter instruments) permet l'excitation 340 et 380 de la sonde Fura-2 AM avec un intervalle de 3sec, et le signal émit est mesuré à 510nm. L'acquisition et l'analyse sont réalisées via le logiciel Metafluor 6.3 (Universal Imaging, West Chester, PA, USA) à température ambiante (RT).
5. Les agonistes sont ajoutés après réglage des paramètre (250 μL 4X) ou après 10 min d'incubation à RT avec l'antagoniste.
6. Lors de la double stimulation, le 2-APB est appliqué pendant 2 min, puis le carvacrol est ajouté.

II. Techniques de biochimie

– Caractérisation des médiateurs dépendent de TRPV3

L'identification des médiateurs dépendant de l'activation de TRPV3 a été réalisée au travers de différentes techniques sur des kératinocytes primaires humains issus d'individus jeunes et âgés.

1) Mesure de l'ATP extracellulaire

RealTime-Glo™ Extracellular ATP assay (Promega, #GA5010)

a) Ensemencement des cellules et réactifs

- Ensemencer les cellules à 14 000 cellules/cm² en plaque 96 puits opaque
- Le lendemain, changer le milieu de culture et préparer les réactifs suivants :
 - Préparer une solution 4X de RealTime-Glo™ Extracellular ATP dans le milieu de culture (peut être stocké à -20°C)
 - Préparer le 2-APB et carvacrol au 4X (50 μM et 300 μM final respectivement), l'IAB au 2X (100 μM final) et la Doxorubicin 4X (50nM final) (Sigma-Aldrich #D1515)

b) Traitement des cellules

- Ajouter 150 μL de milieu de culture dans les puits contrôles "-" et le blanc
- Ajouter 100 μL d'IAB 2X dans les puits antagonistes (laisser agir au moins 5min)

Matériels et méthodes

- Ajouter 100µL de milieu de culture dans les puits agonistes et contrôle "+"
- Ajouter 50µL de 2-APB et carvacrol 4X dans les puits agonistes et antagonistes, et 50µL de Doxorubicine 4X dans le puits contrôle "+"
- Ajouter 50µL de RealTime-Glo™ Extracellular ATP 4X par puits
- Lire immédiatement la luminescence (5min) au Tecan- Infinite M1000

2) Quantification de cytokines : Luminex multiplex

Afin d'identifier et de quantifier diverses cytokines, nous avons désigné un Elisa 17plex Procartel (Life Technologies, France, #PPX-17) : EGF, FGF-2, FGF-21, INF α , IFN β , INF γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-23, IL-29, NGF- β , TGF- α , VEGF-A and VEGF-D.

a) Ensemencement des cellules et traitements

- Ensemencer les cellules à 10 000 cellules/cm² en plaque 6 puits
- A 70% de confluence, laver les cellules 3 fois avec du PBS 1X, puis traiter les cellules avec le 2-APB50µM + carvacrol 300µM +/- IAB 100µM en KBM-gold sans rouge phénol, BPE et EGF pendant 16H à 37°C, 5% CO₂
- Le lendemain, récupérer les surnageants, centrifuger 1400rpm 10 min 4°C et stocker à -80°C

b) Procédure Multiplex à technologie Luminex

- Vortexer les *Capture beads* 30sec. Ajouter 50µL de capture beads dans chaque puits de la plaque
- Placer la plaque sur un aimant, et retirer le liquide
- Ajouter 50µL de *Standards*, 50µL de milieu KBM-gold sans rouge phénol, sans BPE et sans EGF, ou 50µL d'échantillons (1/2)
- Incuber la plaque à température ambiante 2h sous agitation.
- Placer la plaque sur un aimant, et laver 2 fois la plaque avec du *Wash Buffer* 1X
- Ajouter 25µL de *Detection Antibody*
- Incuber la plaque à température ambiante 30min sous agitation
- Placer la plaque sur un aimant, et laver 2 fois la plaque avec du *Wash Buffer* 1X
- Ajouter 50µL de *Streptavidine-PE*
- Incuber la plaque à température ambiante 30min sous agitation
- Placer la plaque sur un aimant, et laver 2 fois la plaque avec du *Wash Buffer* 1X
- Ajouter 120µL de *Reading Buffer*

Matériels et méthodes

- Incuber la plaque à température ambiante 5 min
- L'acquisition et l'analyse sont réalisées via le logiciel MAGPIX®

3) Analyse du sécrétome par spectrométrie de masse (MS/MS)

a) Ensemencement des cellules et traitements

- Ensemencer les cellules à 15 000 cellules/cm² en plaque flask 75cm²
- A 70% de confluence, laver les cellules 3 fois avec du PBS 1X, puis traiter les cellules avec le 2-APB50µM + carvacrol 300µM en KBM-gold sans rouge phénol, BPE et EGF pendant 24H à 37°C, 5% CO₂
- Le lendemain, récupérer les surnageants, centrifuger 1000rpm 10 min 4°C
- Ajouter des inhibiteurs de protéase (Thermo Fischer Scientific #A32955)

b) Concentration des échantillons

- Humidifier la membrane des centricons (Amicon Ultra 15 10KD #UFC911024) avec le milieu de culture seul
- Centrifuger 10 min 3000g 10-12°C
- Eliminer le liquide et transférer les 10mL de surnageant
- Centrifuger 20-25 min 3000g 10-12°C (centrifuger jusqu'à ce qu'il ne reste que 1mL dans la colonne)
- Récupérer le milieu (1mL) de la colonne en le repassant sur les filtres une ou deux fois (utiliser des low bind tips).

c) Préparation des protéines

- Préchauffer le ThermoMixer à 60°
- Incuber 50-200µg (ou 400µL) de protéines dans le ThermoMixer à 60°C, 30min, 1.000rpm
- Enlever le tube et laisser refroidir à température ambiante
- Réduire les disulfures par ajout de 10mM de TCEP (stock 500mM, TMT kit) (adapter au volume de l'échantillon) 30min 60°C, 300rpm.
- Arrêter la réaction d'alkylation en ajoutant 25mM de Iodoacetamide (250mM, PW 184.96g/mol) au tube de protéines, puis incuber à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 min.

d) Nettoyage des protéines (SP3) et digestion

- Refroidir le ThermoMixer à 24 °C
- Préparation des billes SP3 :

Matériels et méthodes

Mélanger dans un même tube 1*750 µg (15µl, solution stock billes 50 µg/ µl) beads SpeedBeads™ magnetic carboxylate modified particles GE45152105050250 (lot 17146701) et 1*750 µg (15 µl) beads 65152105050250 (lot17063877).

- Laver les billes avec 200µL H₂O (utiliser le support magnétique pour effectuer les lavages)
- Répéter le lavage deux fois
- Reprendre les billes avec de l'H₂O (volume à déterminer en fonction des échantillons)
- Ajouter 0.5µg/µl (1/100) de billes SP3 à l'échantillon
- Ajouter de l'éthanol 100% à l'échantillon pour obtenir de l'éthanol 50% final (volume à adapter à chaque échantillon)
- Incuber le mélange échantillon+ billes+ EtOH 50% dans le ThermoMixer à 24 °C pour 5 min à 1,000 rpm.
- Une fois la liaison terminée, placer le tube dans un support magnétique et incuber jusqu'à ce que les billes aient migré vers la paroi du tube.
- Retirer et jeter le surnageant non lié dans un conteneur à déchets approprié
- Retirer le tube du rack magnétique et ajouter 180 µL l'éthanol à 80 % et mélangez à la pipette pour reconstituer et rincer les billes
- Placer le tube sur le support magnétique et incuber jusqu'à ce que les billes aient migré vers la paroi du tube.
- Retirer le surnageant, en veillant à ne pas perturber les billes
- Répéter l'étape de lavage deux fois de plus pour rincer complètement les protéines liées aux billes SP3.
- Préparer 1µg/µL de Trypsine (stock 20µg, Promega #V511A) dans du bicarbonate d'ammonium 100mM (PW : 79.06g/mol)
- Retirez le tube du support magnétique et ajoutez 100 µL d'Hépès (180mM pH8) et 2µg de Trypsine à 1µg/µL
- Mélangez à la pipette pour assurer une reconstitution correcte des billes, et incubez pendant 18 heures à 37 °C dans un ThermoMixer à 1 000 rpm.
- Après la digestion, placer les tubes sur le portoir magnétique et récupérer le surnageant

Matériels et méthodes

- Centrifuger les tubes 14 000g 24 °C for 1 min.
- Doser les échantillons à l'aide du kit Pierce™ Quantitative Peptide Assays & Standards (Thermo Fisher Scientific, #23290)

e) Marquage TMT (Thermo Fisher Scientific TMTpro 16plex 1x0.5mg #A44521)

- Reprendre chaque TMT dans 40µL d'Acétonitrile
- Déposer 20µL de TMT /25µg de protéines et incuber à 37°C 1H
- Vérifier le pH
- Pooler 5µg de chaque échantillon

f) Dessalage (C18 Pierce – #89870)

- Préparer les Tampons :

A : H₂O/Acetonitrile (50 :50)

B : H₂O/Acetonitrile (95 :5) +0.5% TFA

C : H₂O/MeOH (95 :5) +0.1% TFA

D : H₂O/Acetonitrile (30 :70)

- Conditionnement de la colonne :

- Placer la colonne sur un tube de 2mL
- Charger 200µL de solution A sur la colonne
- Centrifuger 1min 1500g 20°C
- Eliminer le liquide du tube
- Répéter l'étape

- Equilibration

- Charger 200µL de solution B
- Centrifuger 1min 1500g 20°C
- Eliminer le liquide du tube
- Répéter l'étape

- Chargement de l'échantillon

- Ajouter 1µL de de TFA100% (environ 1% final), et mesurer le pH avec un papier pH (ajouter 1 goutte sur le papier) : l'échantillon doit être acide = couleur rouge

Matériels et méthodes

- Charger l'échantillon sur la colonne
- Centrifuger 1min 1500g 20°C
- Récupérer le liquide et le refaire passer sur la colonne
- Centrifuger 1min 1500g 20°C
- Eliminer le liquide du tube

- Lavage

- Charger 200µL de solution B
- Centrifuger 1min 1500g 20°C
- Eliminer le liquide du tube
- Répéter l'étape encore 2 fois (3 au total)
- Charger 200µL de solution C
- Centrifuger 1min 1500g 20°C
- Eliminer le liquide du tube
- Répéter l'étape encore 2 fois (3 au total)

- Elution (20µL final)

- Elution avec 10µL de solution D
- Centrifuger 1min 1500g 20°C (eq centri paillasse)
- Rajouter 10µL de solution C sur la colonne
- Centrifuger 1min 1500g 20°C (eq centri paillasse)
- Sécher les échantillons au speedVac environ 3h à 35°C

Les échantillons ont été analysés sur un spectromètre de masse Q-orbitrap haute résolution en mode TOP15 HCD (Resolution MS =120000, Resolution MS2 = 45000). Les données ont été retraitées avec le logiciel PD2.5 avec le moteur de recherche Sequest HT.

III. Techniques de biologies moléculaires

– Analyse de l'expression génique

1) Extraction des ARN messagers sur cellules

Les ARN messagers des kératinocytes jeunes et âgés ont été extraits 6H après traitement en utilisant le kit NucleoSpin RNA Plus (Macherey-Nagel) selon le protocole suivant :

- Rincer 2 fois les cellules au PBS 1X
- Ajouter 150µL de LBP
- A l'aide d'un cône, gratter le fond des puits et observer la formation d'un lysat visqueux
- Homogénéiser le lysat et le déposer sur la colonne (jaune) retenant les ADN
- Centrifuger 30 sec 11 000g
- Ajouter 43µL de BS et homogénéiser
- Déposer la solution sur la seconde colonne (bleue) retenant les ARN
- Centrifuger 15 sec 11 000g
- Rincer la colonne avec 200µL WB1
- Centrifuger 15 sec 11 000g
- Rincer la colonne avec 600µL WB2
- Centrifuger 15 sec 11 000g
- Rincer la colonne avec 250µL WB2
- Centrifuger 2 min 11 000g
- Placer la colonne sur un nouveau tube et éluer les ARN avec 30µL d'H₂O
- Centrifuger 1 min 11 000g

2) Extraction d'ARN sur tissu

Les ARN messagers coussinets et dos de souris ont été extraits avec le Kit Qiagen RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, #74704) selon le protocole suivant :

a) Prélèvement et préparation des échantillons

- Préparer des tubes Eppendorf contenant ~500µL RNAlater/ tube, et les placer à 4°C

Matériels et méthodes

- Raser la souris avec rasoir électrique + crème Veet
- Rincer la peau avec eau savonneuse puis eau
- Arroser la peau d'éthanol et essuyer le surplus avec une compresse stérile
- Avec des pinces et ciseaux préalablement nettoyés avec éthanol et RNase Away, découper le morceau de peau, et le mettre tout de suite dans l'Eppendorf contenant le RNAlater
- Placer les tubes à 4°C pendant 24h (voire jusqu'à 72h), puis les conserver à -80°C jusqu'à extraction

b) Extraction des ARN

- Décongeler à TA les tubes contenant RNAlater et peau
- Préparer le tampon de lyse : RLT Buffer + 1% β -mercapto-éthanol (prévoir 300 μ L/tube)
- Tissue Lyser, en chambre froide : 25Hz 3x3 min avec des billes (2) de 5mm
- Retirer les billes
- Ajouter 590 μ L d'eau RNase free dans le tube bleu, puis 10 μ L de Protéinase K
- Inverser 2-3 fois le tube pour homogénéiser
- Incuber 10min à 55°C
- Centrifuger 4min / 10 000g / TA
- Centrifuger 4min/ 16 000g/TA
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube Eppendorf. Attention à ne pas prendre le culot contenant les débris, cela boucherait ensuite la colonne et empêcherait la bonne extraction de l'ARN
- Ajouter 450 μ L d'éthanol 96-100%
- Transférer 700 μ L sur la colonne
- Centrifuger 30sec / 10 000g / TA
- Transférer le reste de l'échantillon sur la colonne
- Centrifuger 30sec / 10 000g / TA, vider la poubelle
- Ajouter 350 μ L RW1 sur la colonne
- Centrifuger 30sec / 10 000g / TA, vider la poubelle
- Mixer 10 μ L DNase (aliquot à -20°C) + 70 μ L RDD (à +4°C), et ajouter à la colonne
- Incuber à TA 15min
- Ajouter 350 μ L RW1 sur la colonne

Matériels et méthodes

- Centrifuger 30sec / 10 000g / TA, vider la poubelle
- Ajouter 500µL RPE sur la colonne
- Centrifuger 30sec / 10 000g / TA, vider la poubelle
- Ajouter 500µL RPE sur la colonne
- Centrifuger 2 min 30 / 10 000g / TA, vider la poubelle
- Placer la colonne sur une nouvelle poubelle
- Centrifuger 2min / 16 000g / TA
- Placer la colonne sur un Eppendorf 1,5ml avec le nom de l'échantillon
- Ajouter 30µL d'eau RNase Free sur la colonne pour éluer l'ARN et attendre 2min (pour que l'eau imprègne bien la colonne)
- Centrifuger 1min30sec / 10 000g / TA
- Tester la qualité de l'ARN extrait sur gel et par NanoDrop et conserver à -20°C

3) Dosage ARN

La concentration ainsi que la pureté des ARN ont été déterminées par spectrométrie à l'aide du NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, #ND-2000). Le ratio A^{260}/A^{280} permet d'évaluer la pureté des ARN. Le Ratio A^{230}/A^{260} permet d'évaluer l'absence de contaminants organiques. Ces deux ratios doivent être compris entre 1.8 et 2 pour pouvoir utiliser les ARN.

4) RT-qPCR

a) Rétrotranscription

200 ou 500ng d'ARN ont été rétro-transcrits à l'aide du kit PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (TAKARA, #RR036A) :

- Pour chaque échantillon, ajouter le volume d'ARN nécessaire et compléter à 8µL avec de l'H₂O RNase free
- Ajouter 2µL de 5X PrimerScript buffer
- Lancer le programme :

Durée	Température
15min	37°C
5 sec	85°C
Hold	4°C

Matériels et méthodes

- Congeler les ADNc à -20°C jusqu'à utilisation

b) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel

La réaction de qPCR a été réalisée à l'aide du kit TB Green® Premix ex Taq II (TAKARA, #RR820A) selon le protocole suivant :

- Diviser les 10µL de RT en deux :
 - Diluer 5µL ADNc dans 45µL l'H₂O RNAse free
 - Pooler les 5µL restant de chaque échantillon pour former le tube « total », nécessaire pour réaliser une gamme. Réaliser une dilution en cascade (facteur 5) pour valider l'efficacité des amorces.
- Préparer le mix suivant :

Réactifs (1 échantillon)	Volume(µL)
Mix Takara	5
Amorce (3µM)	1
H ₂ O RNA free	2
ADNc dilués	2

- Déposer le mix qPCR en duplicata en plaque 96 puits (eurogentec). Ajouter un contrôle négatif en remplaçant l'ADNc par de l'H₂O RNA free.
- Lancer le programme de qPCR sur la machine AriaMX Agilent :

Étape	Durée	Température	Nombre de cycle
Dénaturation	30 sec	95°C	1
Amplification	5 sec	95°C	40
	30 sec	60°C	
	30 sec	72°C	
Melting curve	1 min	95°C	1
	30 sec	60°C	
	30 sec	95°C	

-Analyser les résultats à l'aide du logiciel AriaMX Agilent version 1.71.

Matériels et méthodes

Vérifier l'unicité du pic de dissociation des produits doubles brins obtenus après la melting curve. Vérifier l'absence de contamination grâce au contrôle négatif (aucune amplification ne doit être détectée). L'efficacité théorique de la réaction de qPCR correspond à un doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle. Cette efficacité doit être vérifiée pour chaque couple d'amorce grâce à la gamme de dilution réalisée avec le tube « total ». On obtient alors une droite $Ct = f(\log \text{concentration})$, où Ct correspond au nombre de cycle nécessaire pour l'obtention d'un signal fluorescent. L'efficacité E d'un couple d'amorce vaut $E = 10(-\frac{1}{\text{pente}})$.

Dans cette thèse, les résultats sont interprétés en quantification relative. Les gènes de références utilisés pour la normalisation sont *TBP* et *RPL13A* chez l'humain et *Rpl13a* et *Eif4h* chez la souris. L'expression du gène d'intérêt est définie par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dont l'équation est présentée ci-dessous (si efficacité =100%) :

$$\text{Expression} = \frac{Ct \text{ échantillon intérêt} - Ct \text{ échantillon control (gène d'intérêt)}}{2^{(Ct \text{ échantillon intérêt} - Ct \text{ échantillon control (Gène référence))}}$$

IV. Techniques d'histologie

– Immunofluorescence sur tissu

1) Fixation des tissus

- Immerger la biopsie humaine ou murine dans du PFA 4% à 4°C toute la nuit, puis amener les échantillons à la plateforme PrimaTiss (hébergée par le LBTI) pour l'inclusion en paraffine et les sections d'échantillons.

a) Déparaffinage et réhydratation

Étape	Solvant	Durée
1	Methylcyclohexane	5 min
2	Methylcyclohexane	5 min
3	Methylcyclohexane	5 min
4	Methylcyclohexane/EtOH (1/1)	10 min
5	EtOH 100%	5 min
6	EtOH 96%	5 min

Matériels et méthodes

7	EtOH 70%	5 min
8	EtOH 70%	5 min
9	EtOH 50%	5 min
10	PBS 1X	5 min
11	PBS 1X	5 min

b) Blocage et immunomarquage

- Incuber les échantillons avec 5 % de sérum de chèvre, 2 % de BSA, 0,1 % de Tween 20 pendant au moins 60 minutes.
- Incuber les échantillons dans l'anticorps primaire dilué (50 µl pour une section) dans 2,5 % de sérum, 1 % de BSA, 0,05 % de Tween 20 (solution de blocage diluée dans du PBS 1 :1) dans une chambre humidifiée pendant une nuit à 4 °C.
- Laver les échantillons 5 min avec du PBS 1X et répéter l'étape 3 fois.
- Incuber les échantillons avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS 1X pendant 45 minutes à 1 heure à température ambiante dans une chambre humidifiée et dans l'obscurité.
- Réaliser 3 lavages PBS 1X
- Monter les lames avec du milieu de montage ProLong™ Glass Antifade Mountant with NucBlue™ (Thermo Fischer Scientific, #P36981)
- Lutter les lames et les conserver à 4°C à l'abri de la lumière

– Immunofluorescence sur cellule

1) Fixation des cellules

- Laver les lamelles contenant les cellules 3 fois au PBS 1X, puis incuber 10min à RT avec du PFA 4%.
- Rincer les cellules 3 fois au PBS 1X

2) Perméabilisation

- Incuber les cellules 10 min avec une solution de PBS 1X, 0.1% Tritton X-100, 0.1M glycine.
- Laver les cellules 2 fois 5min

3) Blocage et immunomarquage

- Incuber les échantillons avec 5 % de sérum de chèvre, 2 % de BSA, 0,1 % de Tween 20 pendant au moins 60 minutes.

Matériels et méthodes

- Incuber les échantillons dans l'anticorps primaire dilué (50 µl pour une section) dans 2,5 % de sérum, 1 % de BSA, 0,05 % de Tween 20 (solution de blocage diluée dans du PBS 1 :1) dans une chambre humidifiée pendant une nuit à 4 °C.
- Laver les échantillons 5 min avec du PBS 1X et répéter l'étape 3 fois.
- Incuber les échantillons avec l'anticorps secondaire dilué dans du PBS 1X pendant 45 minutes à 1 heure à température ambiante dans une chambre humidifiée et dans l'obscurité.
- Réaliser 3 lavages PBS 1X
- Monter les lames avec du milieu de montage ProLong™ Glass Antifade Mountant with NucBlue™ (Thermo Fischer Scientific, #P36981)
- Lutter les lames et les conserver à 4°C à l'abri de la lumière

– Hybridation in-situ à transcrit unique (RNAscope®)

L'hybridation *in-situ* de TRPV3 à été réalisée à l'aide du kit RNAscope® Multiplex Fluorescence Reagent Kit v2 Assay (ACD, # 323100-USM) selon le protocole suivant :

- Placer les lames 1H à 60°C pour déparaffiner
- Préparer 700mL de Target Retrieval Reagents 1X (RNAscope® 10X Target Retrieval Reagents) et placer la solution sur une plaque chauffante à 95°C (la solution ne doit pas bouillir plus de 15 min)
- Incuber les lames 2x 5min avec du Xylene à RT
- Allumer le four à hybridation HybEZ™ à 40°C 30 min avant le traitement.
- Incuber les lames 2x 1min dans de EtOH 100%
- Créer une barrière hydrophobe et incuber les sections 10 min à RT avec le RNAscope® Hydrogen Peroxide.
- Eliminer le peroxyde d'hydrogène et laver deux fois les lames avec de l'H₂O
- Incuber les lames 15 min dans le Target Retrieval Reagent 1X bouillant (attention aux bulles qui pourraient décoller les sections. En parallèle, préparer les sondes 10 min à 40°C et laisser refroidir à RT. Les sonde C2 et C3 doivent être diluées au 1 :50 dans la sonde C1 ou dans le diluant probe.
- Laver les lames 2x 1min avec de l'H₂O
- Incuber 10 sec dans l'EtOH 100%

Matériels et méthodes

- Incuber les sections avec RNAscope® Protease Plus pendant 5min à 40°C dans le four à hybridation HybEZ™. En parallèle, préparer 3L de Wash Buffer 1X (RNAscope® 50X Wash Buffer)

- Rincer les lames 2x 1min avec de l'H₂O, et éliminer le surplus de liquide
- Ajouter une goutte de sonde par section (~50µL), et incuber 2H à 40°C dans le HybEZ™
- Laver les lames 3x 5min avec le Wash Buffer 1X
- Stocker les lames dans du 5X SSC toute la nuit à RT
- Le lendemain, placer Amp1-3, HRP-C et HRP-Blocker à RT
- Laver les lames 2x 2min à RT avec du Wash Buffer
- Éliminer le surplus de liquide et incuber les lames **30 min à 40°C** dans le HybEZ™ avec une goutte de **Amp1-FL**. Parallèlement, diluer le TSA Plus Fluorophore-Opal 570 au 1 :1500 dans le RNAscope® TSA Buffer.

- Laver les lames 3x 5min avec le Wash Buffer sous agitation
- Éliminer le surplus de liquide et incuber les lames **30 min à 40°C** dans le HybEZ™ avec une goutte de **Amp2-FL**

- Laver les lames 3x 5min avec le Wash Buffer sous agitation
- Éliminer le surplus de liquide et incuber les lames **15 min à 40°C** dans le HybEZ™ avec une goutte de **Amp3-FL**

- Laver les lames 3x 5min avec le Wash Buffer sous agitation
- Éliminer le surplus de liquide et incuber les lames **15 min à 40°C** dans le HybEZ™ avec une goutte de **HRP-C1 ou HRP-C2 ou HRP-C3** selon la sonde utilisée

- Laver les lames 3x 5min avec le Wash Buffer sous agitation
- Éliminer le surplus de liquide et incuber les lames **30 min à 40°C** dans le HybEZ™ avec une goutte de **TSA Plus Fluorophore-Opal 570 1 :1500**

- Laver les lames 3x 5min avec le Wash Buffer sous agitation
- Éliminer le surplus de liquide et incuber les lames **15 min à 40°C** dans le HybEZ™ avec une goutte de **HRP-Blocker**

- Laver les lames 3x 5min avec le Wash Buffer sous agitation
- Développer HRP-2 et HRP-C3 si nécessaire
- Laver les lames et continuer le protocole « immunofluorescence sur tissu » à partir de l'étape du blocage en 5 % de sérum de de chèvre, 2 % de BSA, 0,1 % de Tween 20

Les images d'hybridation *in-situ* ont été réalisées à l'aide du microscope High Content Screening Yokogawa CQ1 (Yokogawa, Tokyo, Japan) et de la caméra sCMOS (Olympus,

Matériels et méthodes

Hamburg, Germany). L'analyse a été réalisée à partir du logiciel QuPath software (version 0.2.3).

V. Expérimentation animale

Toutes les expérimentations ont été réalisées en accord avec les recommandations de l'Union Européenne pour l'expérimentation animale. Le projet a été approuvé par le comité d'éthique et scientifique (agrément# 33946 Rhône-Alpes). Les manipulations ont été réalisées sur des souris mâles et femelles.

– Les animaux

Pour ce projet des souris C57BL6 (mâles et femelles) jeunes de 2 mois et âgées de 18 mois ont été achetées chez Janvier Labs (St Berthevin, France). Les souris âgées ont été préservées jusqu'à leur 22 mois. Un suivi hebdomadaire du poids et de la température interne (sonde rectal) a été réalisé selon les recommandations du comité d'éthique. Les souris *Trpv3*-KO (de fond génétique C57BL6) sont issues de spermatozoïdes cryoconservés. La reviviscence de la lignée *Trpv3*-KO a été réalisée par la plateforme AniRA - PBES - SFR BioSciences (UAR3444/US8). Les souris ont été hébergées avec un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau, dans une pièce à température contrôlée (environ 23°C) avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures. Les souris WT jeunes et *Trpv3*-KO ont été manipulées à 2 mois, et les souris WT âgées à 22 mois.

– Tests comportementaux

1) Le Tail-Flick

- Maintenir la souris (vigile) dans un dispositif de contention, et couvrir sa tête avec un tissu.
- Placer la queue (à environ 1,5 cm de l'extrémité) sous une source de chaleur radiante produite par une lampe halogène (2TC séries 8 Model, ITT Inc. Life science, CA, USA) préalablement étalonnée pendant 30 s pour délivrer une chaleur de 25 W (vitesse de chauffage de 1,3 °C/s).
- Mesurer le délai de retrait de la queue. Un temps limite de 10 s a été imposé pour éviter toute lésion tissulaire.

Matériels et méthodes

- Réaliser cinq mesures de latence de retrait de la queue, puis moyenner les valeurs pour chaque souris afin de déterminer le seuil thermique nociceptif de l'animal.

2) *Le Hot plate*

- Placer la souris consciente sur une plaque chauffante (Bioseb, USA, #BIO-CHP) calibrée à 55°C.
- Mesurer manuellement à l'aide d'un chronomètre le délai dans le changement de comportement de la souris (saut ou léchage de patte). Un temps limite de 10s a été imposé pour éviter tout dommage aux tissus.
- Réaliser trois mesures de latence puis moyenner les valeurs pour chaque souris afin de déterminer le seuil thermique nociceptif de l'animal

– Mesure de la perte en eau trans-épidermique (TEWL)

- Dépiler les souris 2 jours avant la manipulation.
- Anesthésier les souris avec du thiopental (i.p. 75 mg kg⁻¹ de poids corporel).
- Placer la sonde AquaFlux™ (BioX, Model AF200 TEWL, UK) sur le dos des souris et mesurer la TEWL.
- Réaliser deux mesures de TEWL par souris. Les résultats obtenus avec le AquaFlux™ software ont été moyennés puis exprimés en g/(m2h).

– Mesure de la réponse vasculaire

La mesure de la réponse vasculaire a été réalisé sous l'effet d'un chauffage local ou global sur des souris faiblement anesthésiées (thiopental i.p. 75 mg.kg⁻¹ de poids corporel). En parallèle du chauffage local, une iontophorèse ACh ou SNP a été réalisée pour évaluer la réactivité fonctionnelle des vaisseaux.

1) *Iontophorèse ACh et SNP*

- Dépiler les souris deux jours avant la manipulation.
- Anesthésier les souris au thiopental (75mg.kg⁻¹ de poids corporel).
- Pour mesurer la réponse vasculaire cutanée indépendante de l'endothélium, préparer la sonde laser Doppler (481-1, Perimed Sweden) pour iontophorèse transcutanée avec du nitroprussiate de sodium (SNP) (2 %). Placer la sonde laser Doppler sur le dos des souris et appliquer un courant cathodique de 100 mA pendant 20s.

Matériels et méthodes

- Pour une réponse dépendante de l'endothélium, préparer la sonde laser Doppler (481-1, Perimed Sweden) pour iontophorèse transcutanée avec de l'acétylcholine (ACh) (2 %). Placer la sonde laser Doppler sur le dos des souris et appliquer un courant anodique de 100 mA pendant 20s
- Enregistrer les données à l'aide du système d'acquisition de données (Biopac) et analyser les données avec le logiciel Acknowledge Biopac.
- Exprimer les données relatives au débit sanguin en augmentation maximale en % du débit sanguin par rapport à la ligne de base sur toute la période d'enregistrement (20 min) suivant l'administration iontophorétique.

2) Chauffage local

- Placer la sonde laser Doppler (457, Perimed, Suède) sur la zone plantaire de la patte arrière de souris légèrement anesthésiées.
- Enregistrer le débit sanguin de base pendant 1 minute pour s'assurer que les réponses vasculaires hémodynamiques sont bien stabilisées après l'anesthésie, comme cela a été décrit précédemment [129].
- Exposer la patte arrière à un chauffage local, à une vitesse de 1°C/min pendant 10 minutes (de 33 à 40°C) à l'aide d'une unité de Temp (PF 5020, Perimed, Suède).
- Observer une augmentation du flux sanguin cutané (vasodilatation).

Les résultats sont exprimés en (1) unités de flux arbitraires relatif pendant toute la période d'enregistrement ou (2) unités de flux arbitraires (x 103 unités de flux) mesurées comme surface sous le flux enregistré en fonction du temps pendant toute la période d'enregistrement pour une exposition à la température de 10 minutes ou (3) une mesure de l'augmentation maximale en % du flux sanguin depuis la ligne de base avant le chauffage jusqu'à la fin de l'exposition à la chaleur (vasodilatation maximale observée à 40 °C).

3) Chauffage globale

- Mesurer la température interne des souris faiblement anesthésiées au thiopental (75mg.kg⁻¹ de poids corporel) à l'aide d'une sonde rectal (Physitemp, # RET-3) reliée à un BAT-12 (Physitemp, BAT-12 Microprobe Thermometer).
- Enregistrer la température rectale en continu grâce au système d'acquisition de données Biopac.
- Placer les souris dans une enceinte chauffante à 33°C pendant 15 minutes.
- Augmenter la température de l'enceinte chauffante de 1°C/min jusqu'à 40°C.

Matériels et méthodes

- Analyser les résultats avec le logiciel Acknowledge Biopac. Les résultats sont représentés par (1) l'augmentation de la température interne en fonction de la température de l'enceinte, (2) l'aire sous la courbe.

Résultats de thèse

Rôle du canal TRPV3 dans l'initiation de la vasodilatation cutanée au cours du vieillissement

I. Article scientifique

Nos résultats sont en révision dans le journal *Geroscience* (Juin 2023) sous la forme d'un article scientifique que je signe en premier auteur. L'intégralité du manuscrit est présentée pages 98-123.

– Résumé

La peau, en plus de sa fonction barrière, assure diverses fonctions dont la thermorégulation. Pour cela, la peau présente de nombreux capteurs/senseurs capables de détecter les variations de température (même minimes) afin de déclencher les processus de thermorégulation. On parle de thermo-senseurs cutanés. Cependant, au cours du vieillissement, certaines fonctions de la peau sont altérées, d'une part à cause des modifications structurales de la peau, et d'autre part à cause d'un affaiblissement des nombreux mécanismes cellulaires, biochimiques et géniques. Chez les individus âgés les capacités sensorielles, dont la détection des températures (modérées en particulier), sont altérées. Ces défauts sensoriels s'accompagnent d'un défaut des mécanismes de thermorégulation, conduisant à une accumulation de la chaleur au niveau de la peau. Comprendre les mécanismes sous-jacents à ce défaut de thermorégulation vasculaire est d'une importance primordiale compte tenu de la population vieillissante.

Nous avons précédemment mis en évidence un défaut de thermorégulation vasculaire cutanée chez les souris *Trpv3*-KO (mâles uniquement) en réponse à l'application locale d'un stress thermique ou une exposition globale à la chaleur. L'absence de défauts neuro-vasculaires cutanés chez les souris *Trpv3*-KO souligne l'importance de TRPV3 dans la détection et la régulation microvasculaire de la peau face à la chaleur. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'inactivation ou la perte de ce thermo-senseur épidermique avec l'âge, pourrait perturber la détection des températures modérées et retarder ou limiter la réponse vasculaire cutanée associée face à une exposition thermique (chaleur).

L'article issu des travaux menés au cours de cette thèse définit le rôle du canal TRPV3 dans le défaut de thermorégulation cutanée au cours du vieillissement via des approches *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*.

Nous avons étudié les capacités de vasodilatation cutanée en réponse au chauffage chez des souris témoins jeunes (2 mois) et âgées (22 mois) et des souris jeunes *Trpv3*-KO (2 mois). Chez

les souris âgées mâles et femelles, la réponse vasculaire cutanée induit par un chauffage local est diminuée. De manière intéressante, le profil de réponse à la chaleur locale est identique entre les souris âgées et les souris *Trpv3*-KO. En absence de dysfonctions endothéliale et sensorielle chez les souris âgées, ces données suggèrent une défaillance de la détection initiale de la chaleur *via* TRPV3. L'expression de TRPV3 dans la peau était diminuée au cours du vieillissement chronologique chez l'être humain et dans une zone de thermorégulation des souris (coussinet). Par ailleurs, l'activité intrinsèque de TRPV3 était moins marquée dans les kératinocytes âgés. Enfin, la libération d'ATP après stimulation de TRPV3 observée dans les kératinocytes jeunes était absente dans les kératinocytes âgés. Ceci laisse supposer une altération de la transduction de stimuli (thermique ou pharmacologique) par TRPV3.

L'ensemble de nos résultats montre une forte baisse de l'expression et de l'activité de TRPV3 au cours du vieillissement, ce qui pourrait contribuer à l'altération de la thermorégulation vasculaire de la peau âgée. Cette étude réalisée sur modèles murins et humains apporte de nouvelles connaissances sur les mécanismes de transduction du signal thermique par le canal TRPV3 kératinocytaire. Elle ouvre également de nouvelles perspectives sur la communication entre les kératinocytes et les terminaisons nerveuses libres.

– Article scientifique

Aging is associated with impaired triggering of TRPV3-mediated cutaneous vasodilation: a crucial process for local heat exposure

Authors:

Lisa S. Martin; CNRS UMR 5305, Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory (LBTI), 69007 Lyon, France; Claude Bernard University Lyon 1, 69100 Villeurbanne, France. (ORCID 0009-0003-9509-0001)

Audrey Josset-Lamaugarny; CNRS UMR 5305, Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory (LBTI), 69007 Lyon, France; Claude Bernard University Lyon 1, 69100 Villeurbanne, France.

Thomas El Jammal; CNRS UMR 5305, Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory (LBTI), 69007 Lyon, France; Claude Bernard University Lyon 1, 69100 Villeurbanne, France; Department of Internal Medicine, University Hospital Lyon Croix-Rousse, Claude Bernard University Lyon 1, Lyon, France. (ORCID 0000-0002-5085-8342)

Sylvie Ducreux; CarMeN Laboratory, INSERM, INRA, INSA Lyon, Claude Bernard University Lyon 1, 69500 Bron, France. (ORCID 0000-0003-3207-9537)

Fabien P. Chevalier*; CNRS UMR 5305, Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory (LBTI), 69007 Lyon, France; Claude Bernard University Lyon 1, 69100 Villeurbanne, France. (ORCID 0000-0001-8034-8661)

Bérengère Fromy#*; CNRS UMR 5305, Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory (LBTI), 69007 Lyon, France; Claude Bernard University Lyon 1, 69100 Villeurbanne, France. (ORCID 0000-0003-2457-0334)

#Corresponding authors: berengere.fromy@univ-lyon1.fr

*These authors contributed equally to this work

Author Contributions: Conceptualization, L.S.M., F.P.C. and B.F.; methodology, L.S.M., A.J-M., S.D., F.P.C. and B.F. validation, L.S.M., T.E.J., F.P.C. and B.F; formal analysis, L.S.M., A.J-M., S.D., T.E.J., F.P.C. and B.F; investigation, L.S.M., A.J-M., S.D., F.P.C. and B.F.; resources, L.S.M., S.D., F.P.C. and B.F.; writing—original draft preparation L.S.M., F.P.C. and B.F.; writing—review and editing, L.S.M., F.P.C. and B.F.; visualization, L.S.M., F.P.C., B.F.; S.D., T.E.J.; supervision, F.P.C. and B.F; project administration, F.P.C. and B.F; funding acquisition, F.P.C. and B.F.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Abstract

Sensing temperature is vitally important to adapt our body to environmental changes. Local warm detection is required to initiate regulation of cutaneous blood flow, which is part of the peripheral thermoregulatory mechanisms, and thus avoid damage to surrounding tissues. The mechanisms mediating cutaneous vasodilation during local heat stress are impaired with aging. However, the impact of aging on the ability of the skin to detect subtle thermal changes is unknown. Among heat-activated cation channels, transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) is a thermosensor predominantly expressed on keratinocytes and involved in local vascular thermoregulatory mechanisms of the skin in young mice. In the present study, using a murine *in vivo* model of local heat exposure of the skin, we showed that heat-induced vasodilation was reduced in old mice associated with reduced expression of TRPV3 channels. We also found a decrease in expression and activity of TRPV3 channel, as well as reduced TRPV3-dependent adenosine tri-phosphate release in human primary keratinocytes from old donors. This study shows that aging alters the epidermal TRPV3 channels, which might delay the detection of changes in skin temperature, thereby limiting the mechanisms triggered for local vascular thermoregulation in the old skin.

Key words: TRPV3, keratinocytes, heat-induced vasodilation, aging

Introduction

The skin is the largest organ of our body. This envelop is involved in various functions, including temperature detection required to initiate regulation of cutaneous blood flow [1,2]. During environmental thermal stress, changes in skin temperature occurs prior to changes in core temperature, and allow a rapid and appropriate response to heat (vasodilation) or cold (vasoconstriction) [3]. Adaptation of the skin blood flow thus plays an essential role in thermoregulation, and therefore prevents damages to nearby tissues. The physiological regulation of the skin blood flow relies on the activation of the autonomic and sensory nervous system through the release of vasoactive neuropeptides [4], but also on the release of vasoactive factors by the endothelial cells [5,6]. The mechanisms underpinning the cutaneous vasodilation during local heat stress have been extensively studied [3,6–8], and include an initial increase of skin blood flow (axonal reflex), followed by a plateau predominantly dependent of the nitric oxide (NO) pathway. The effects of aging are also well characterized with a reduction in the ability to raise skin blood flow during local heat stress, due to a decrease of sympathetic transduction and endothelial dysfunction [9–15], including decrease of endothelium NO synthase (eNOS) activity and NO bioavailability. Although sensing environmental temperature changes is vitally important for the body to properly adapt its vascular thermoregulatory responses to local heat stress, temperature detection process remains poorly studied. It is therefore crucial to further improve our understanding of the impact of age progression on the physiological mechanisms of thermoregulation and in particular on the trigger mechanisms (local detection of moderate skin temperature changes).

Historically, sensory nerve endings passing through the epidermis were thought to be the exclusive transducers for temperature detection and consequently, thermoregulation [3,16,17]. Since the discovery of thermo-sensors of Transient Potential Vanilloid Channels (TRPV) family [18–20], substantial advances have been made on thermal sensors biology. Interestingly, keratinocytes, the major cell population of the epidermis, also expressed several thermo-sensors such as TRPV1, TRPV3, TRPV4 [21]. Our knowledge on the relationship between the thermo-TRP channels and the heat-evoked cutaneous vasodilation response is just emerging and has yet mainly focused on TRPV1 [22,23]. Being able to accurately detect subtle 1°C temperature deviations from our thermoneutral skin temperature of around 33°C, TRPV3 and TRPV4 channels localized on the epidermal keratinocytes [19,24,25] are likely to be first activated by local warming of the skin, ultimately triggering cutaneous vasodilation. However, it has recently been shown that TRPV4 channels did not contribute to the regulation of cutaneous vasodilation in human skin during local thermal hyperemia [26]. In contrast, using a murine model we previously demonstrated that epidermal TRPV3 acts as a crucial cutaneous thermo-sensor for the local thermoregulatory control of skin blood flow. Indeed, the local heat-evoked vasodilation was impaired in *Trpv3*-KO mice associated with local heat loss disruption, but not in *Trpv1*-KO mice [27]. This phenomenon requires mainly peptidergic nerve endings through calcitonin gene-related peptide (CGRP) release and NO produced by endothelial cells. Moreover, TRPV3 can answer to a heat stimulus by releasing various mediators such as adenosine tri-phosphate (ATP), NO, prostaglandin E₂

(PGE₂), nerve growth factor (NGF) [28–31]. Deprivation of cutaneous heat-induced vasodilation in *Trpv3*-KO mice was associated with a faster increase of internal temperature in passive whole-body heating, exhibiting an attenuated physiological ability to dissipate heat due to a reduced cutaneous vasodilation [27]. *Trpv3*-KO mice also present a profound deficit in sensing warm external temperature and have a preference for cooler temperature (25°C) [32]. Such deficit in response to thermal change was also observed in elderly people [12,33,34]. We thus hypothesized that a decrease of TRPV3 expression or activity in keratinocytes could be involved in the deficit of warm detection and thus cutaneous vascular thermoregulation during aging.

In the present study, we firstly compared the vascular response of the skin in young and old control mice, as well as young *Trpv3*-KO mice upon a local heat exposure. To explore the impact of aging on epidermal TRPV3 channels, we analyzed the expression of TRPV3 channel in biopsies from young and old humans, as well as in mouse skin. We also measured TRPV3 activity from young and old human primary keratinocytes using calcium imaging. To identify the impact of aging on the soluble mediators released by epidermal keratinocytes following TRPV3 activation, we evaluated cytokines and other factors such as ATP, a cell communication mediator, following TRPV3 activation in 2D culture of young and old human primary keratinocytes. Our data showed a deficit of heat-induced vasodilation in old mice, also observed in *Trpv3*-KO mice. Moreover, our results demonstrated a strong decline of both expression and activity of TRPV3 in old human primary keratinocytes, which could contribute to the impaired initial thermal detection (>33°C) and consequently thermoregulation in the elderly population.

Materials and Methods

Animals

Young (2 months) and old (22 months) C57BL6 mice and young (2 months) *Trpv3*-KO mice (raised on a C57BL6 background) were used in all experiments. Mice were housed with *ad libitum* access to food and water, in a temperature-controlled room (about 23°C) with a 12-hours light/dark cycle. All experiments were conducted in accordance with European Union recommendations for animal experimentation and approved by scientific and ethics committees (agreement, #33946 Rhone-Alpes ethics). Special effort was made to minimize the number as well as the stress and suffering of mice used in this study. As they age, mice can lose weight and lower their internal temperature. These two parameters were monitored at least once a week for aged mice (>15 months old).

Assessment of skin blood flow

For the skin blood flow experiments, mice were anesthetized with thiopental (i.p. injection at 75 mg.kg⁻¹ of body weight). Anesthesia was monitored to ensure an appropriate anesthetic depth to avoid the confounding effects of movement artifacts on laser Doppler flowmetry. Anesthetized mice were placed in an incubator maintained at 30 °C in order to better control cutaneous temperature throughout the experiment (35.5±0.1°C) and avoid anesthesia-mediated hypothermia. Cutaneous blood

Résultats de thèse– Article scientifique

flow and cutaneous temperature were continuously recorded by a data acquisition system (Biopac) and subsequently analyzed (Acknowledge Biopac). In addition, systolic arterial blood pressure was monitored using a tail cuff system (IITC INC Life Science Inc.) before and after the experiments. At the end of each experiment, animals were killed and whole (epidermis and dermis) skin samples were taken in the plantar hindpaw and hairless back.

Heat-evoked response in the plantar hindpaw by laser Doppler flowmeter

Cutaneous blood flow was measured in the plantar hindpaw area using a laser Doppler probe (457, Perimed, Sweden) in lightly anesthetized mice. The heating model consisted of recording 1-min baseline blood flow to ensure that the haemodynamic vascular responses had stabilized following anesthesia, as previously described [27]. Briefly, the hindpaw was exposed to local heating at a rate of 1°C/min for 10 min (from 33 to 40°C) using Temp Unit (PF 5020, Perimed, Sweden). The response to local heating consisted of an increase in cutaneous blood flow (vasodilation). Results are expressed as (1) arbitrary flux units during the entire recording period or (2) arbitrary flux units ($\times 10^3$ flux units) measured as area under the recorded flux versus time for the entire recording period for 10-min temperature exposure or (3) a measure of maximum % increase in blood flow from preheating baseline to the end of the heat exposure (maximum vasodilation observed at 40 °C).

Endothelium-independent and -dependent responses on the dorsal skin by laser Doppler flowmeter coupled to iontophoresis

Skin blood flow was measured on a hairless area of the back of mice anesthetized with thiopental (75mg.kg⁻¹ body weight) using a laser Doppler probe (481-1, Perimed Sweden) for transcutaneous iontophoresis (probe area \approx 1.08 cm²). Hair was removed using depilatory lotion two days prior to iontophoresis. Cutaneous blood flow was recorded during 1-min baseline period prior to iontophoresis. The endothelium-independent response was assessed by using iontophoretic delivery of sodium nitroprusside (SNP) (2%) with a cathodal current application of 100 mA for 20 s, while the endothelium-dependent responses were assessed by using iontophoretic delivery of acetylcholine (ACh) (2%) with an anodal current application of 100 mA for 20 s. The iontophoresis technique was chosen to assess *in vivo* skin microvascular function to avoid any systemic effects. Blood flow data were expressed as a measure of maximum % increase in blood flow from baseline over the entire recording period (20 min) following iontophoretic delivery.

Assessment of thermal function of skin sensory nerve endings

Tail-flick

The conscious mouse was maintained in a restrainer and a cloth was used to cover their head. The tail (about 1.5 cm from the tip) was placed under a radiant heat source produced by a halogen lamp of a device (2TC series 8 Model, ITT Inc. Life science, CA, USA) previously calibrated for 30 s to deliver

Résultats de thèse– Article scientifique

25 W of heat. The heating rate was 1.3 °C/s, and the delay in tail removal was measured. A cutoff time of 10 s was imposed to prevent tissue damage. Five measurements of the tail withdrawal latency were taken and averaged for each mouse to determine the nociceptive thermal threshold for the animal.

Hot plate

The conscious mouse was placed on a Bioseb hot plate (Bioseb, USA, #BIO-CHP) calibrated at 55 °C. The delay in mouse behavioral change (jump or paw licking) was manually measured using a chronometer. A cutoff time of 10 s was imposed to prevent tissue damage. Three measurements of latency were taken and averaged for each mouse to determine the nociceptive thermal threshold for the animal.

In situ hybridization

Human paraffin embedded tissue microarray (TMA: #SK244A and #SKN1001), were purchased from US Biomax (Derwood, MD, USA). Details on skin sample are presented on Supplementary Table 1. *In situ* hybridization of *TRPV3* was performed using RNAscope® Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 (bio-technique, France, 323100) according to the manufacturer's instructions. *TRPV3* probe were labeled with Opal 570 (1:1500) supplied with the kit. At the end of the amplification and signal development, tissue sections were washed 3 times with PBS and blocked with PBS containing 5 % goat serum, 2 % BSA and 0.1 % Tween20 for at least 1 h at RT. After washing steps, primary antibodies targeting KRT14 (Abcam, ab181595, 1:400) were incubated overnight at 4°C. Sections were washed and incubated with secondary antibodies (Thermo Fischer Scientific, #A-21245, 1:1000) 45 min at RT and nuclear staining was performed using ProLong™ Glass Antifade Mountant with NucBlue™ (Thermo Fischer Scientific, #P36981). Negative controls were performed using probe diluent supplied with RNAscope kit. Images were visualized using High Content Screening Yokogawa CQ1 microscope (Yokogawa, Tokyo, Japan), digitalized using sCMOS camera (Olympus, Hamburg, Germany) and analyzed using QuPath software (version 0.2.3).

Cell Culture

Human primary keratinocytes (HPK) were isolated in-house from skin biopsies as previously described [6], or purchased from Lonza (Basel, Switzerland, #00192627). Skin biopsies were obtained from the DermoBioTec tissue bank at Lyon (Tissue Transfer Agreement n°214854) with the informed consent of adult donors (non-pathological tissues from abdomen or breast), in accordance with the ethical guidelines (French Bioethics law of 2021). Donor specifications are indicated in Supplementary Table 2. HPK were cultured in KBM Gold medium (Lonza, #00192060) at 37 °C and 5 % CO₂. The culture medium was renewed three times a week and cells were maintained to no more than passage 4.

RNA extraction and Real-Time PCR

For tissue RNA extraction, plantar hindpaw were immersed in RNA-later for 24 h at 4 °C and further stored at -80 °C. Total RNA was isolated using RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, France, #74704), according to the manufacturer's instructions. For cell RNA extraction, 6 h after treatment, cells were washed 3 times with PBS and RNA were extracted using NucleoSpin® RNA Plus (Macherey-Nagel, 740984.250). Quantity and purity of RNA were evaluated using NanoDrop™ 2000. cDNA synthesis was performed from at least 200 ng of RNA using PrimeScript™ RT reagent kit (Takara Bio Europe, #RR037A) and analyzed in real-time qPCR using SYBR® Premix ExTaqII (Takara Bio Europe, # RR820A) on an AriaMx Realtime PCR system (Agilent Genomics, Santa Clara, CA, USA). Results were normalized to *TBP* and *RPL13A* (human) or *Rpl13a* and *Eif4h* (mouse) housekeeping genes expression levels, using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ quantification method. RT-qPCR program and primers were listed in Supplementary Table 3.

Chemical compounds

The TRPV3 agonists carvacrol (Sigma-Aldrich, France, # W224511) and 2-Aminoethoxydiphenyl borate (Sigma-Aldrich, France, #100065-100MG) and the TRPV3 antagonist isochlorogenic acid B (MedChemExpress, Sweden, #HY-N0057) were sequentially diluted in DMSO (stock solutions) and further diluted in KGM-gold just before use. All chemical treatments were performed when cells reached 70 % confluence, with, depending on the conditions, 50 μ M 2-APB, 300 μ M Carvacrol, 100 μ M IAB or an equivalent volume of DMSO diluted in medium.

Ca²⁺ measurement

Cells were cultivated in μ -Dish 35mm High (Ibidi GmbH, #81156). After 45 min incubation at 37 °C with 2 μ M of fura-2-acetoxymethyl ester (Fura2-AM) (Thermo Fischer Scientific, #F1221) in culture medium, cells were washed twice for 5 min with a Hank's Balanced Salt Solution (HBSS 1X) with 1,26mM Ca²⁺ and 0,49 mM Mg²⁺ (Gibco, UK, #14025-050), and placed at RT on a DMI6000 inverted wide-field microscope (Leica microsystem). Images were acquired with an Orca-Flash 4.0 Scientific CMOS camera (Hamamatsu) using a 40X oil-immersion objective. Using a Lambda DG-4+ filter (Sutter instruments), Fura-2 AM was excited at 340 and 380 nm and the fluorescent signal emitted measured at 510 nm. Images (1024 \times 1024 pixels) were taken with a 3 s interval. Fluorescence ratios (F340 nm/F380 nm) were analyzed with MetaFluor 6.3 (Universal Imaging) after removing background fluorescence[34]. After 1 min of baseline, cells were treated with or without IAB (100 μ M) for 10 min and then with Carvacrol (300 μ M) for 5 min, or 2-APB (50 μ M) 2 min and Carvacrol (300 μ M) 5 min. Results are expressed as ratio 340/380 for each cell (~30/field) of each donor.

Luminex multiplex assay

Procartaplex 17 Plex (Life Technologies, France, #PPX-17) were designed in order to identify cytokines in cell supernatant 16 hours after treatment: EGF, FGF-2, FGF-21, INF α , INF β , INF γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-23, IL-29, NGF- β , TGF- α , VEGF-A and VEGF-D. Measurement of cytokines were done according to the manufacturer's instruction with MAGPIX®. Cell culture supernatants were collected 16h after treatment.

Extracellular ATP assay

RealTime-Glo™ Extracellular ATP Assay (Promega, France, #GA5010) was used to measure ATP released after 10 min following TRPV3 activation. Doxorubicin (Sigma-Aldrich #D1515) 50 nM was used as positive control.

Statistics

Data are expressed as mean \pm SD or mean \pm SEM or median (IQR). According to the normality (Shapiro-Wilk test), statistical significance was calculated by student t.test or Mann-Withey, One-way analysis of variance (ANOVA1) or Kruskal-Wallis, Two-way analysis of variance (ANOVA2), and Pearson correlation using Prism software (version 7.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Mean differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Results

Cutaneous heat-induced vasodilation is reduced in a similar fashion in young *Trpv3*-KO and old mice

Using the murine in vivo model as previously [27], we measured cutaneous blood flow on hindpaw of young wild-type (WT; 2 months), old wild-type (22 months) and young *Trpv3*-KO (2 months) mice in response to a local heat exposure (from 33 to 40 °C) (Figure 1A-B). Young WT mice displayed a blood flow increase immediately after the onset of local heating. With exception of *Trpv3*-KO female mice (max temperature achieved: 36 °C), the cutaneous blood flow of old and *Trpv3*-KO mice did not increase significantly from baseline compared to young WT mice (34.2°C for both male and female) (Figure 1A-B). As expected, the heat-induced vasodilation was significantly lower in old mice compared to young WT mice (Figure 1C-D). In contrast, heat-induced vascular response was not different between young *Trpv3*-KO mice and old WT mice (Figure 1C-D). The cutaneous vascular function (on back skin) assessed with acetylcholine and sodium nitroprusside, the systolic arterial blood pressure and skin temperature at baseline were not different between all groups, strengthening that neither aging nor TRPV3 inactivation impaired endothelium or vascular smooth muscle integrity (Supplementary Figure 1 A-D). Thus, the delay of local heat-induced vasodilation in old WT mice was not due to a vascular defect. Using sensory tests (tail flick and hot plate) we showed that the nociceptive

responses were well-preserved in old WT and *Trpv3*-KO mice compared to young WT mice (Supplementary Figure 1E-F). These data suggest that the default of local heat-induced vasodilation in old mice was due to a failure of the initial heat detection (likely via warm-sensitive TRPV3) and/or consequent triggering neurovascular mechanisms, rather than peripheral sensory nerve impairments.

Altogether, these results highly suggested that impairment of heat-induced vasodilation in old WT mice is related to a decreased ability to sense heat ($\geq 33^{\circ}\text{C}$), likely due to an altered TRPV3 function.

TRPV3 expression is decreased with aging in both mouse and human epidermis

As *Trpv3*-KO and old WT mice displayed a similar deficit in response to local heat, we explored the epidermal expression of *Trpv3* in young and old WT mice. Using RT-qPCR, we found a ~ 47% decrease of *Trpv3* transcripts in old mice as compared to young animals in hindpaw skin, the major skin area involved in thermoregulation with the tail (Figure 2A). In contrast, this decrease in *Trpv3* expression was not observed in the back skin, which is not involved as a thermoregulatory area (Supplementary Figure 2A). It is noteworthy to note that the expression of *Trpv3* is significantly higher in hindpaw skin than in back skin regardless of both age and sex (Supplementary Figure 2A). These results demonstrate a specific decrease of epidermal *Trpv3* expression with aging in a thermoregulatory area, which could contribute to the impaired vasodilation on exposure to local heat in old mice.

To further confirm the negative effect of aging on epidermal TRPV3, we looked at TRPV3 expression in human skin sections from both gender of several ages (Figure 2B-E). As TRPV3 localization is still controversial in the literature [36–38], we used fluorescent RNA in-situ hybridization of *TRPV3* in combination with cytokeratin-14 (KRT14) immunostaining (Figure 2B-E). We showed that the percentage of *TRPV3*-positive cells (Figure 2F), as well as the number of *TRPV3* transcripts per keratinocyte (Figure 2G) gradually decrease with aging in men and women (see Supplementary Table 1 for more details). Accordingly, a strong negative correlation was determined between *TRPV3*-positive cells ($r=0.7603$) or estimated *TRPV3* transcripts per cell ($r=0.7799$) and the age. In addition, the KRT14 immunostaining allowed to discriminate basal cells (KRT14+) and suprabasal cells (KRT14-) (Figure 2H). Remarkably, when we compared the expression of *TRPV3* in old human biopsies (mean age 71.25 years) with young ones (mean age 33.5 years), we only observed a decrease in basal cells, but not in differentiated keratinocytes. These results strongly suggest that aging negatively affects the expression of *TRPV3* in the proliferating basal layer of human epidermis.

TRPV3 activity is reduced with aging in human primary keratinocytes

Since we already demonstrated that primary skin cells retain some features of aging when they are cultured in vitro [39–41], we took advantage of this 2D model to measure the TRPV3 channel intrinsic activity. To do so, we used a cytosolic Ca^{2+} radiometric dye (Fura-2AM) to follow intracellular Ca^{2+} flux at the single cell level in human primary keratinocytes from young (mean age 32.6 years) and old (mean age 81.8 years) individuals (Figure 3). We first confirmed the decrease of *TRPV3* expression

in “old” keratinocytes (Supplementary Figure 3A). We next validated the specific activation of TRPV3 channel by its agonist carvacrol [42,43], which effectively induced the intracellular Ca^{2+} entry in keratinocytes from young skin (Supplementary Figure 3B-C). This effect was totally abolished by the co-treatment with the TRPV3 antagonist isochlorogenic acid B (IAB) [44], which confirm the specificity of TRPV3 activation (Supplementary Figure 3B-C). In addition, TRPV3 can be sensitized and increases its response upon repetitive stimuli [45,46]. Indeed, the sensitization with 2-APB followed by stimulation with carvacrol significantly increased the Ca^{2+} flux in keratinocytes compared to carvacrol only (Supplementary Figure 3D). Therefore, we used this dual treatment (2-APB sensitization + carvacrol activation) to get the maximal stimulation of TRPV3. With this treatment, we observed an increase of intracellular Ca^{2+} flux in both young and old primary keratinocytes (Figure 3). However, the maximal response of TRPV3 channel was ~31 % lower in old keratinocytes (Figure 3B). In addition, the TRPV3 antagonist IAB strongly reduced the intracellular Ca^{2+} flux in young keratinocytes but completely abolished the response in old ones (Figure 3A-B). These results indicate that the intrinsic activity of the TRPV3 channels is less effective in old keratinocytes, likely due to a decrease of its expression with aging.

TRPV3-dependent ATP release is altered with aging in human primary keratinocytes

After exploring the expression and the activity of the TRPV3 channel, we aimed at characterizing the effect of aging on the release of TRPV3-dependent mediators. We first decided to focus on a well-known downstream pathway of TRPV3, the EGFR/TGF- α /NF κ B pathway [36,47,48]. Using Luminex bead-based multiplex immunoassay, we found that TRPV3 stimulation (2-APB+carvacrol) induced an equivalent release of TGF α in young and old keratinocytes (Figure 4A). This TRPV3-dependent release of TGF α was blocked by the TRPV3 antagonist IAB (Figure 4A). The same tendency was observed by RT-qPCR for the following cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, and NGF- β 6h (Figure 4B-E), suggesting that the TRPV3/EGFR/TGF- α /NF κ B pathway was not affected with aging in human primary keratinocytes.

ATP is a key messenger involved in cell communication and various biological processes [49–52], including in temperature transmission from keratinocytes to sensory nerve endings [28]. In order to evaluate the impact of aging on the ability of keratinocytes to release ATP in response to TRPV3 stimulation, we quantified extracellular ATP released by young and old keratinocytes using luminescence ATP assay. We found that ATP release after TRPV3 activation was strongly reduced in old compared to young keratinocytes (Figure 4F). Moreover, IAB significantly decreased ATP release only in young cells. These results indicate that aging impairs TRPV3-induced ATP release in human primary keratinocytes.

Discussion

In this study, we provide the first evidence that aging alters epidermal TRPV3, which is necessary for temperature detection by the keratinocytes to trigger heat-evoked cutaneous vasodilation. The major findings are as follows: (i) aging is associated to a decrease of *TRPV3* expression in mouse and human skin regardless of sex, (ii) the cutaneous vascular response upon local heat (from 33 to 40°C) is almost abolished in old mice, as previously reported in young *Trpv3*-KO mice (iii) TRPV3 activity and ATP release in human primary keratinocytes are greatly diminished with aging.

We previously demonstrated that vasodilation in response to local heating was reduced in non-neuropathic old subjects (60-75 years old) compared to young subjects (25-30 years old) [34], suggesting that aging alters ability of cutaneous microvessels to adapt to local heat. In the present study, we showed that 22-month-old mice presented a lack of vasodilation upon local heat exposure on paw skin (from 33 to 40°C), regardless of sex. This defect was similar to that observed in young male and female *Trpv3*-KO mice (2 months), as previously reported in males [27]. Although endothelial dysfunction has been described in very old mice (22-25 months) [10,53,54] and old individuals (~70 years old) [34,55,56], the old mice we used in the present study (22 months) displayed intact vasodilator function of the endothelium and smooth muscle in cutaneous microvessels, as assessed by the iontophoresis experiments using acetylcholine and sodium nitroprusside, respectively. As previously reported [27], we confirmed the intact vasodilator function of the endothelium and smooth muscle in cutaneous microvessels in *Trpv3*-KO mice. We also showed that old WT mice displayed intact sensory nerve integrity using tail flick and hot plate experiments. In a previous study, we already showed that motor and sensory nerve conduction velocities were not different between young adult C57BL6/J mice (6–7 months) and old mice (22–25 months) [53]. These data suggest that the impaired vasodilation on exposure to local heat in old mice is specifically due to a failure of the initial heat detection and/or consequent triggered neural mechanisms, rather than to downstream mechanisms required for heat-evoked vasodilation.

TRPV3 is an essential cutaneous sensor of warming, playing a primary role in the vascular response to heat exposure in young mice [27]. Accordingly, our findings demonstrated that *Trpv3* expression was significantly reduced in the hindpaw skin of old mice compared to young mice. In addition, the higher expression of *Trpv3* in hindpaw compared to the back skin, regardless of the age, underlines the importance of thermo-sensors in thermoregulatory areas [57–59]. We thus suggest that the reduced *Trpv3* expression in the mouse epidermis alters the detection of moderate temperature in old mice and, in turn, triggers mechanisms necessary for the vascular response to local heat exposure. We also showed this decrease of *TRPV3* expression in elderly subjects, further strengthening the critical role of TRPV3 to adapt to local heat in mammalian homeotherms. Here, we showed a strong negative correlation between *TRPV3* expression and age for both women and men using in situ hybridization. We also observed that *TRPV3* expression was quite identical in photo-exposed (groin, scalp, face) and photo-protected skin areas (back humeral, chest), suggesting that TRPV3 is homogeneously expressed in human skin regardless sun exposure. In contrast to TRPV3, TRPV1 channel expression has been

shown to increase with aging especially in photo-exposed skin [60,61], implying that TRPV1 expression is sensitive to sun-exposure. The temperature activation of TRPV1 being $> 42^{\circ}\text{C}$, this may suggest that elderly are more able to detect painful/burning temperature, related to UV exposure, than moderate temperature of $33\text{--}39^{\circ}\text{C}$ (TRPV3 range) [62–64]. In addition to the decrease of *TRPV3* expression in aged keratinocytes, we also point out for the first time an impaired intrinsic activity of the TRPV3 channel. Alongside the decreased expression of TRPV3, others alterations may occur with aging. For example, it has been shown that some post-translational modifications, such as hydroxylation of TRPV3 on N242, altered TRPV3 current in HEK cells [65,66]. Indeed, hydroxylation at this site could destabilize TRPV3 multimer assembly or interactions with other protein partners that can modulate channel gating or addressing to the plasma membrane. However, changes in TRPV3 structure and post-translational modifications with aging remain unknown and would constitute a promising further study. Activation of TRPV3 is associated with the release of various diffusible molecules, that act on neighboring cells. Stimulation of the channel is well known to trigger a proinflammatory response [36], but the signaling cascade associated with local heat-mediated vasodilation is still not fully depicted. It has been already described that keratinocyte can convey heat [28] and touch [67] stimuli through release of ATP. In this study, we confirmed that TRPV3 stimulation induced an extracellular ATP release from young keratinocytes, but to a less extent from old keratinocytes. As expected, the level of pro-inflammatory cytokines was not changed in the same context. In addition to its function of an energetic molecule, ATP plays various biological roles including sensory transduction via its neuroactive property [67] or regulation of blood vessels via its vasoactive property [49,68–70]. Since the discovery of synaptic-like contacts between keratinocytes and sensory neurons, it has been strongly suggested that keratinocytes could directly communicate with sensory nerve endings in the skin [71,72]. Thus, the ATP release from keratinocytes after TRPV3 activation could act on purinergic receptors from sensory nerves [49] and might regulate vascular tone in response to heat. Thus, the loss of ATP release with aging may compromise communication between sensory nerve endings and keratinocytes in the elderly. In addition, skin blood vessel also expressed purinergic receptor [50]. We cannot thus exclude that the TRPV3-dependent release of ATP by keratinocytes will directly act on skin blood vessel to regulate vascular tone. Finally, keratinocytes can release other neuroactive and/or vasoactive substances than ATP, such as CGRP, NO, PGI₂ [29,31,73], which could also contribute to local heat-evoked vasodilation either by acting on sensory nerve endings or dermal blood vessels. However, how keratinocytes can inform and modulate the vascular tone needs further exploration.

In conclusion, our study confirms that the initial detection of moderate temperature, through the warm-sensitive epidermal sensor TRPV3, is crucial for the skin to adapt to thermal stress such as heat. This offers a new function of the keratinocyte as a fundamental thermo-sensor and transducer of its thermal environment. With aging, decreased expression and activity of TRPV3 could reduce or delay the detection of changes in skin temperature, thereby limiting the mechanisms triggered for thermoregulation, including cutaneous vasodilation. Thus, TRPV3 may be a reliable target to counteract

the thermoregulatory defect in the elderly. Aside TRPV3, decline of cold TRP channels with aging has been reported to influence temperature detection and may compromise vascular response to environmental cold in old individuals [74]. TRP channels are thus key actors in regulating the cutaneous vascular response to environmental temperature during aging, and need to be further considered.

Acknowledgments: We acknowledge Jocelyne Vial and Geraldine Aimond for technical support and animal care facilities (AnexPeau facility, Lyon). We thank Theo Barthélemy and Emma Fraillon for their precious help for some experiments. We also thanks Nicolas Lebonvallet, Ophelie Pierre and Laurent Misery for their support and access to the calcium imaging platform of Laboratoire Interactions Epitheliums Neurons (LIEN/EA 4685/Brest. We thank Fabien Van Coppennolle (CarMeN/ INSERM, U1060/Lyon) for his help in calcium imaging analysis and discussion. We thank PLATIM and especially Elodie Chatre for the microscopy. We thank Jerome Lamartine for critical reading of the manuscript.

Statements and Declarations

Funding: This research project was supported by internal funds from CNRS and University Lyon 1. This work was supported by the French National Research Agency (KAST-ANR-23-CE14).

Informed Consent Statement: Skin biopsies were obtained from the DermoBioTec tissue bank at Lyon (Tissue Transfer Agreement n_214854) with the informed consent of adult donors undergoing surgical discard (non-pathological tissues from breast, face, or abdomen), in accordance with the ethical guidelines (French Bioethics law of 2021).

Institutional Review Broad Statement: The animal study protocol was approved by the Animal Experimentation Committee of the University Claude Bernard Lyon I (protocol agreement #33946 approved on 25 November 2021).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

References

1. Kolarsick, P.A.J.; Kolarsick, M.A.; Goodwin, C. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* **2011**, *3*, 203, doi:10.1097/JDN.0b013e3182274a98.
2. Yousef, H.; Alhaji, M.; Sharma, S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
3. Johnson, J.M.; Minson, C.T.; Kellogg, D.L. Cutaneous Vasodilator and Vasoconstrictor Mechanisms in Temperature Regulation. *Compr Physiol* **2014**, *4*, 33–89, doi:10.1002/cphy.c130015.
4. Roosterman, D.; Goerge, T.; Schneider, S.W.; Bunnett, N.W.; Steinhoff, M. Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. *Physiological Reviews* **2006**, *86*, 1309–1379, doi:10.1152/physrev.00026.2005.
5. Mitchell, J.A.; Ali, F.; Bailey, L.; Moreno, L.; Harrington, L.S. Role of Nitric Oxide and Prostacyclin as Vasoactive Hormones Released by the Endothelium. *Experimental Physiology* **2008**, *93*, 141–147, doi:10.1113/expphysiol.2007.038588.
6. Cracowski, J.-L.; Roustit, M. Human Skin Microcirculation. In *Comprehensive Physiology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2020; pp. 1105–1154 ISBN 978-0-470-65071-4.
7. Wong, B.J.; Hollowed, C.G. Current Concepts of Active Vasodilation in Human Skin. *Temperature (Austin)* **2016**, *4*, 41–59, doi:10.1080/23328940.2016.1200203.
8. Smith, C.J.; Johnson, J.M. Responses to Hyperthermia. Optimizing Heat Dissipation by Convection and Evaporation: Neural Control of Skin Blood Flow and Sweating in Humans. *Auton Neurosci* **2016**, *196*, 25–36, doi:10.1016/j.autneu.2016.01.002.
9. Bentov, I.; Reed, M.J. The Effect of Aging on the Cutaneous Microvasculature. *Microvasc Res* **2015**, *100*, 25–31, doi:10.1016/j.mvr.2015.04.004.
10. El Assar, M.; Angulo, J.; Vallejo, S.; Peiró, C.; Sánchez-Ferrer, C.F.; Rodríguez-Mañas, L. Mechanisms Involved in the Aging-Induced Vascular Dysfunction. *Front Physiol* **2012**, *3*, 132, doi:10.3389/fphys.2012.00132.
11. Cau, S.B.A.; Carneiro, F.S.; Tostes, R.C. Differential Modulation of Nitric Oxide Synthases in Aging: Therapeutic Opportunities. *Front Physiol* **2012**, *3*, 218, doi:10.3389/fphys.2012.00218.
12. Holowatz, L.A.; Thompson-Torgerson, C.; Kenney, W.L. Aging and the Control of Human Skin Blood Flow. *Front Biosci* **2010**, *15*, 718–739.
13. Balmain, B.N.; Sabapathy, S.; Louis, M.; Morris, N.R. Aging and Thermoregulatory Control: The Clinical Implications of Exercising under Heat Stress in Older Individuals. *Biomed Res Int* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/8306154.
14. Greaney, J.L.; Stanhewicz, A.E.; Wolf, S.T.; Kenney, W.L. Thermoregulatory Reflex Control of Cutaneous Vasodilation in Healthy Aging. *Temperature (Austin)* **8**, 176–187, doi:10.1080/23328940.2020.1832950.
15. Minson, C.T.; Holowatz, L.A.; Wong, B.J.; Kenney, W.L.; Wilkins, B.W. Decreased Nitric Oxide- and Axon Reflex-Mediated Cutaneous Vasodilation with Age during Local Heating. *J Appl Physiol (1985)* **2002**, *93*, 1644–1649, doi:10.1152/jappphysiol.00229.2002.
16. Glatte, P.; Buchmann, S.J.; Hijazi, M.M.; Illigens, B.M.-W.; Siepmann, T. Architecture of the Cutaneous Autonomic Nervous System. *Front. Neurol.* **2019**, *0*, doi:10.3389/fneur.2019.00970.
17. Stucky, C.L.; Lewin, G.R. Isolectin B4-Positive and -Negative Nociceptors Are Functionally Distinct. *J Neurosci* **1999**, *19*, 6497–6505, doi:10.1523/JNEUROSCI.19-15-06497.1999.
18. Venkatachalam, K.; Montell, C. TRP Channels. *Annu Rev Biochem* **2007**, *76*, 387–417, doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
19. Kashio, M. Thermosensation Involving Thermo-TRPs. *Mol Cell Endocrinol* **2021**, *520*, 111089, doi:10.1016/j.mce.2020.111089.
20. Voets, T. TRP Channels and Thermosensation. In *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume II*; Nilius, B., Flockerzi, V., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer International Publishing: Cham, 2014; pp. 729–741 ISBN 978-3-319-05161-1.
21. Caterina, M.J.; Pang, Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharmaceuticals (Basel)* **2016**, *9*, doi:10.3390/ph9040077.
22. Yang, D.; Luo, Z.; Ma, S.; Wong, W.T.; Ma, L.; Zhong, J.; He, H.; Zhao, Z.; Cao, T.; Yan, Z.; et al. Activation of TRPV1 by Dietary Capsaicin Improves Endothelium-Dependent Vasorelaxation and Prevents Hypertension. *Cell Metab* **2010**, *12*, 130–141, doi:10.1016/j.cmet.2010.05.015.
23. Garami, A.; Pakai, E.; Oliveira, D.L.; Steiner, A.A.; Wanner, S.P.; Almeida, M.C.; Lesnikov, V.A.; Gavva, N.R.; Romanovsky, A.A. Thermoregulatory Phenotype of the Trpv1 Knockout Mouse: Thermo-effector Dysbalance with Hyperkinesia. *J Neurosci* **2011**, *31*, 1721–1733, doi:10.1523/JNEUROSCI.4671-10.2011.

24. Peier, A.M. A Heat-Sensitive TRP Channel Expressed in Keratinocytes. *Science* **2002**, *296*, 2046–2049, doi:10.1126/science.1073140.
25. Chung, M.-K.; Lee, H.; Caterina, M.J. Warm Temperatures Activate TRPV4 in Mouse 308 Keratinocytes. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 32037–32046, doi:10.1074/jbc.M303251200.
26. Fujii, N.; Kenny, G.P.; McGarr, G.W.; Amano, T.; Honda, Y.; Kondo, N.; Nishiyasu, T. TRPV4 Channel Blockade Does Not Modulate Skin Vasodilation and Sweating during Hyperthermia or Cutaneous Postocclusive Reactive and Thermal Hyperemia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **2021**, *320*, R563–R573, doi:10.1152/ajpregu.00123.2020.
27. Fromy, B.; Josset-Lamaugarny, A.; Aimond, G.; Pagnon-Minot, A.; Marics, I.; Tattersall, G.J.; Moqrich, A.; Sigauco-Roussel, D. Disruption of TRPV3 Impairs Heat-Evoked Vasodilation and Thermoregulation: A Critical Role of CGRP. *Journal of Investigative Dermatology* **2018**, *138*, 688–696, doi:10.1016/j.jid.2017.10.006.
28. Mandadi, S.; Sokabe, T.; Shibasaki, K.; Katanosaka, K.; Mizuno, A.; Moqrich, A.; Patapoutian, A.; Fukumi-Tominaga, T.; Mizumura, K.; Tominaga, M. TRPV3 in Keratinocytes Transmits Temperature Information to Sensory Neurons via ATP. *Pflugers Arch* **2009**, *458*, 1093–1102, doi:10.1007/s00424-009-0703-x.
29. Huang, S.M.; Lee, H.; Chung, M.-K.; Park, U.; Yu, Y.Y.; Bradshaw, H.B.; Coulombe, P.A.; Walker, J.M.; Caterina, M.J. Overexpressed Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Ion Channels in Skin Keratinocytes Modulate Pain Sensitivity via Prostaglandin E2. *J Neurosci* **2008**, *28*, 13727–13737, doi:10.1523/JNEUROSCI.5741-07.2008.
30. Seo, S.H.; Kim, S.; Kim, S.-E.; Chung, S.; Lee, S.E. Enhanced Thermal Sensitivity of TRPV3 in Keratinocytes Underlies Heat-Induced Pruritogen Release and Pruritus in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* **2020**, *140*, 2199–2209.e6, doi:10.1016/j.jid.2020.02.028.
31. Miyamoto, T.; Petrus, M.J.; Dubin, A.E.; Patapoutian, A. TRPV3 Regulates NOS-Independent Nitric Oxide Synthesis in the Skin. *Nat Commun* **2011**, *2*, 369, doi:10.1038/ncomms1371.
32. Moqrich, A. Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin. *Science* **2005**, *307*, 1468–1472, doi:10.1126/science.1108609.
33. Holowatz, L.A.; Kenney, W.L. Peripheral Mechanisms of Thermoregulatory Control of Skin Blood Flow in Aged Humans. *J Appl Physiol (1985)* **2010**, *109*, 1538–1544, doi:10.1152/jappphysiol.00338.2010.
34. Fromy, B.; Sigauco-Roussel, D.; Gaubert-Dahan, M.-L.; Rousseau, P.; Abraham, P.; Benzoni, D.; Berrut, G.; Saumet, J.L. Aging-Associated Sensory Neuropathy Alters Pressure-Induced Vasodilation in Humans. *J Invest Dermatol* **2010**, *130*, 849–855, doi:10.1038/jid.2009.279.
35. Raynard, C.; Ma, X.; Huna, A.; Tessier, N.; Massemin, A.; Zhu, K.; Flaman, J.-M.; Moulin, F.; Goehrig, D.; Medard, J.-J.; et al. NF-KB-Dependent Secretome of Senescent Cells Can Trigger Neuroendocrine Transdifferentiation of Breast Cancer Cells. *Aging Cell* **2022**, *21*, e13632, doi:10.1111/ace1.13632.
36. Szöllősi, A.G.; Vasas, N.; Angyal, Á.; Kistamás, K.; Nánási, P.P.; Mihály, J.; Béke, G.; Herczeg-Lisztes, E.; Szegedi, A.; Kawada, N.; et al. Activation of TRPV3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **2018**, *138*, 365–374, doi:10.1016/j.jid.2017.07.852.
37. Facer, P.; Casula, M.A.; Smith, G.D.; Benham, C.D.; Chessell, I.P.; Bountra, C.; Sinisi, M.; Birch, R.; Anand, P. Differential Expression of the Capsaicin Receptor TRPV1 and Related Novel Receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in Normal Human Tissues and Changes in Traumatic and Diabetic Neuropathy. *BMC Neurol* **2007**, *7*, 11, doi:10.1186/1471-2377-7-11.
38. Park, C.W.; Kim, H.J.; Choi, Y.W.; Chung, B.Y.; Woo, S.-Y.; Song, D.-K.; Kim, H.O. TRPV3 Channel in Keratinocytes in Scars with Post-Burn Pruritus. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, 2425, doi:10.3390/ijms18112425.
39. Muther, C.; Jobeili, L.; Garion, M.; Heraud, S.; Thepot, A.; Damour, O.; Lamartine, J. An Expression Screen for Aged-Dependent MicroRNAs Identifies MiR-30a as a Key Regulator of Aging Features in Human Epidermis. *Aging (Albany NY)* **2017**, *9*, 2376–2396, doi:10.18632/aging.101326.
40. Chevalier, F.P.; Rorteau, J.; Ferraro, S.; Martin, L.S.; Gonzalez-Torres, A.; Berthier, A.; El Kholi, N.; Lamartine, J. MiR-30a-5p Alters Epidermal Terminal Differentiation during Aging by Regulating BNIP3L/NIX-Dependent Mitophagy. *Cells* **2022**, *11*, 836, doi:10.3390/cells11050836.
41. Rorteau, J.; Chevalier, F.P.; Bonnet, S.; Barthélemy, T.; Lopez-Gaydon, A.; Martin, L.S.; Bechetoille, N.; Lamartine, J. Maintenance of Chronological Aging Features in Culture of Normal Human Dermal Fibroblasts from Old Donors. *Cells* **2022**, *11*, 858, doi:10.3390/cells11050858.
42. Broad, L.M.; Mogg, A.J.; Eberle, E.; Tolley, M.; Li, D.L.; Knopp, K.L. TRPV3 in Drug Development. *Pharmaceuticals (Basel)* **2016**, *9*, doi:10.3390/ph9030055.
43. Vogt-Eisele, A.K.; Weber, K.; Sherkheli, M.A.; Vielhaber, G.; Panten, J.; Gisselmann, G.; Hatt, H. Monoterpenoid Agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol* **2007**, *151*, 530–540, doi:10.1038/sj.bjp.0707245.

44. Qi, H.; Shi, Y.; Wu, H.; Niu, C.; Sun, X.; Wang, K. Inhibition of Temperature-Sensitive TRPV3 Channel by Two Natural Isochlorogenic Acid Isomers for Alleviation of Dermatitis and Chronic Pruritus. *Acta Pharm Sin B* **2022**, *12*, 723–734, doi:10.1016/j.apsb.2021.08.002.
45. Chung, M.-K.; Lee, H.; Mizuno, A.; Suzuki, M.; Caterina, M. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Activates and Sensitizes the Heat-Gated Ion Channel TRPV3. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2004**, *24*, 5177–5182, doi:10.1523/JNEUROSCI.0934-04.2004.
46. Liu, B.; Yao, J.; Zhu, M.X.; Qin, F. Hysteresis of Gating Underlines Sensitization of TRPV3 Channels. *J Gen Physiol* **2011**, *138*, 509–520, doi:10.1085/jgp.201110689.
47. Cheng, X.; Jin, J.; Hu, L.; Shen, D.; Dong, X.; Samie, M.A.; Knoff, J.; Eisinger, B.; Liu, M.; Huang, S.M.; et al. TRP Channel Regulates EGFR Signaling in Hair Morphogenesis and Skin Barrier Formation. *Cell* **2010**, *141*, 331–343, doi:10.1016/j.cell.2010.03.013.
48. Wang, Y.; Li, H.; Xue, C.; Chen, H.; Xue, Y.; Zhao, F.; Zhu, M.X.; Cao, Z. TRPV3 Enhances Skin Keratinocyte Proliferation through EGFR-Dependent Signaling Pathways. *Cell Biol Toxicol* **2020**, doi:10.1007/s10565-020-09536-2.
49. Burnstock, G.; Verkhatsky, A. Evolutionary Origins of the Purinergic Signalling System. *Acta Physiol (Oxf)* **2009**, *195*, 415–447, doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x.
50. Lohman, A.W.; Billaud, M.; Isakson, B.E. Mechanisms of ATP Release and Signalling in the Blood Vessel Wall. *Cardiovascular Research* **2012**, *95*, 269–280, doi:10.1093/cvr/cvs187.
51. Raqeeb, A.; Sheng, J.; Ao, N.; Braun, A.P. Purinergic P2Y2 Receptors Mediate Rapid Ca(2+) Mobilization, Membrane Hyperpolarization and Nitric Oxide Production in Human Vascular Endothelial Cells. *Cell Calcium* **2011**, *49*, 240–248, doi:10.1016/j.ceca.2011.02.008.
52. Burnstock, G. Purine and Purinergic Receptors. *Brain Neurosci Adv* **2018**, *2*, 2398212818817494, doi:10.1177/2398212818817494.
53. Gaubert, M.L.; Sigaudou-Roussel, D.; Tartas, M.; Berrut, G.; Saumet, J.L.; Fromy, B. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor as an in Vivo Back-up Mechanism in the Cutaneous Microcirculation in Old Mice. *J Physiol* **2007**, *585*, 617–626, doi:10.1113/jphysiol.2007.143750.
54. Matz, R.L.; de Sotomayor, M.A.; Schott, C.; Stoclet, J.-C.; Andriantsitohaina, R. Vascular Bed Heterogeneity in Age-Related Endothelial Dysfunction with Respect to NO and Eicosanoids. *Br J Pharmacol* **2000**, *131*, 303–311, doi:10.1038/sj.bjp.0703568.
55. DeSouza, C.A.; Clevenger, C.M.; Greiner, J.J.; Smith, D.T.; Hoetzer, G.L.; Shapiro, L.F.; Stauffer, B.L. Evidence for Agonist-Specific Endothelial Vasodilator Dysfunction with Ageing in Healthy Humans. *J Physiol* **2002**, *542*, 255–262, doi:10.1113/jphysiol.2002.019166.
56. Holowatz, L.A.; Houghton, B.L.; Wong, B.J.; Wilkins, B.W.; Harding, A.W.; Kenney, W.L.; Minson, C.T. Nitric Oxide and Attenuated Reflex Cutaneous Vasodilation in Aged Skin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **2003**, *284*, H1662–H1667, doi:10.1152/ajpheart.00871.2002.
57. Škop, V.; Liu, N.; Guo, J.; Gavrilo, O.; Reitman, M.L. The Contribution of the Mouse Tail to Thermoregulation Is Modest. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2020**, *319*, E438–E446, doi:10.1152/ajpendo.00133.2020.
58. Mota-Rojas, D.; Titto, C.G.; de Mira Geraldo, A.; Martínez-Burnes, J.; Gómez, J.; Hernández-Ávalos, I.; Casas, A.; Domínguez, A.; José, N.; Bertoni, A.; et al. Efficacy and Function of Feathers, Hair, and Glabrous Skin in the Thermoregulation Strategies of Domestic Animals. *Animals (Basel)* **2021**, *11*, 3472, doi:10.3390/ani11123472.
59. Hankenson, F.C.; Marx, J.O.; Gordon, C.J.; David, J.M. Effects of Rodent Thermoregulation on Animal Models in the Research Environment. *Comp Med* **2018**, *68*, 425–438, doi:10.30802/AALAS-CM-18-000049.
60. Lee, Y.M.; Kim, Y.K.; Chung, J.H. Increased Expression of TRPV1 Channel in Intrinsically Aged and Photoaged Human Skin in Vivo. *Experimental Dermatology* **2009**, *18*, 431–436, doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00806.x.
61. Lee, Y.M.; Kang, S.M.; Chung, J.H. The Role of TRPV1 Channel in Aged Human Skin. *Journal of Dermatological Science* **2012**, *65*, 81–85, doi:10.1016/j.jdermsci.2011.11.003.
62. Kashio, M.; Tominaga, M. TRP Channels in Thermosensation. *Current Opinion in Neurobiology* **2022**, *75*, 102591, doi:10.1016/j.conb.2022.102591.
63. Johnson, A.J.; Wilson, A.T.; Laffitte Nodarse, C.; Montesino-Goicolea, S.; Valdes-Hernandez, P.A.; Somerville, J.; Peraza, J.A.; Fillingim, R.B.; Bialosky, J.; Cruz-Almeida, Y. Age Differences in Multimodal Quantitative Sensory Testing and Associations With Brain Volume. *Innov Aging* **2021**, *5*, igab033, doi:10.1093/geroni/igab033.
64. Heft, M.W.; Robinson, M.E. Age Differences in Suprathreshold Sensory Function. *Age (Dordr)* **2014**, *36*, 1–8, doi:10.1007/s11357-013-9536-9.

65. Karttunen, S.; Duffield, M.; Scrimgeour, N.R.; Squires, L.; Lim, W.L.; Dallas, M.L.; Scragg, J.L.; Chicher, J.; Dave, K.A.; Whitelaw, M.L.; et al. Oxygen-Dependent Hydroxylation by FIH Regulates the TRPV3 Ion Channel. *J Cell Sci* **2015**, *128*, 225–231, doi:10.1242/jcs.158451.
66. Zhang, N.; Fu, Z.; Linke, S.; Chicher, J.; Gorman, J.J.; Visk, D.; Haddad, G.G.; Poellinger, L.; Peet, D.J.; Powell, F.; et al. The Asparaginyl Hydroxylase Factor Inhibiting HIF-1 α Is an Essential Regulator of Metabolism. *Cell Metabolism* **2010**, *11*, 364–378, doi:10.1016/j.cmet.2010.03.001.
67. Moehring, F.; Cowie, A.M.; Menzel, A.D.; Weyer, A.D.; Grzybowski, M.; Arzua, T.; Geurts, A.M.; Palygin, O.; Stucky, C.L. Keratinocytes Mediate Innocuous and Noxious Touch via ATP-P2X4 Signaling. *Elife* **2018**, *7*, e31684, doi:10.7554/eLife.31684.
68. Verkhatsky, A.; Burnstock, G. Biology of Purinergic Signalling: Its Ancient Evolutionary Roots, Its Omnipresence and Its Multiple Functional Significance. *Bioessays* **2014**, *36*, 697–705, doi:10.1002/bies.201400024.
69. Fujii, N.; McGinn, R.; Halili, L.; Singh, M.S.; Kondo, N.; Kenny, G.P. Cutaneous Vascular and Sweating Responses to Intradermal Administration of ATP: A Role for Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase? *The Journal of Physiology* **2015**, *593*, 2515–2525, doi:10.1113/JP270147.
70. Fujii, N.; Halili, L.; Singh, M.S.; Meade, R.D.; Kenny, G.P. Intradermal Administration of ATP Augments Methacholine-Induced Cutaneous Vasodilation but Not Sweating in Young Males and Females. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2015**, *309*, R912-919, doi:10.1152/ajpregu.00261.2015.
71. Talagas, M.; Lebonvallet, N.; Leschiera, R.; Marcorelles, P.; Misery, L. What about Physical Contacts between Epidermal Keratinocytes and Sensory Neurons? *Exp Dermatol* **2018**, *27*, 9–13, doi:10.1111/exd.13411.
72. Talagas, M.; Lebonvallet, N.; Leschiera, R.; Sinquin, G.; Elies, P.; Haftek, M.; Pennec, J.-P.; Ressenkoff, D.; La Padula, V.; Le Garrec, R.; et al. Keratinocytes Communicate with Sensory Neurons via Synaptic-like Contacts. *Ann Neurol* **2020**, *88*, 1205–1219, doi:10.1002/ana.25912.
73. Hou, Q.; Barr, T.; Gee, L.; Vickers, J.; Wymer, J.; Borsani, E.; Rodella, L.; Getsios, S.; Burdo, T.; Eisenberg, E.; et al. Keratinocyte Expression of Calcitonin Gene-Related Peptide β : Implications for Neuropathic and Inflammatory Pain Mechanisms. *Pain* **2011**, *152*, 2036–2051, doi:10.1016/j.pain.2011.04.033.
74. Thapa, D.; Valente, J. de S.; Barrett, B.; Smith, M.J.; Argunhan, F.; Lee, S.Y.; Nikitochkina, S.; Kodji, X.; Brain, S.D. Dysfunctional TRPM8 Signalling in the Vascular Response to Environmental Cold in Ageing. *eLife* **2021**, *10*, e70153, doi:10.7554/eLife.70153.

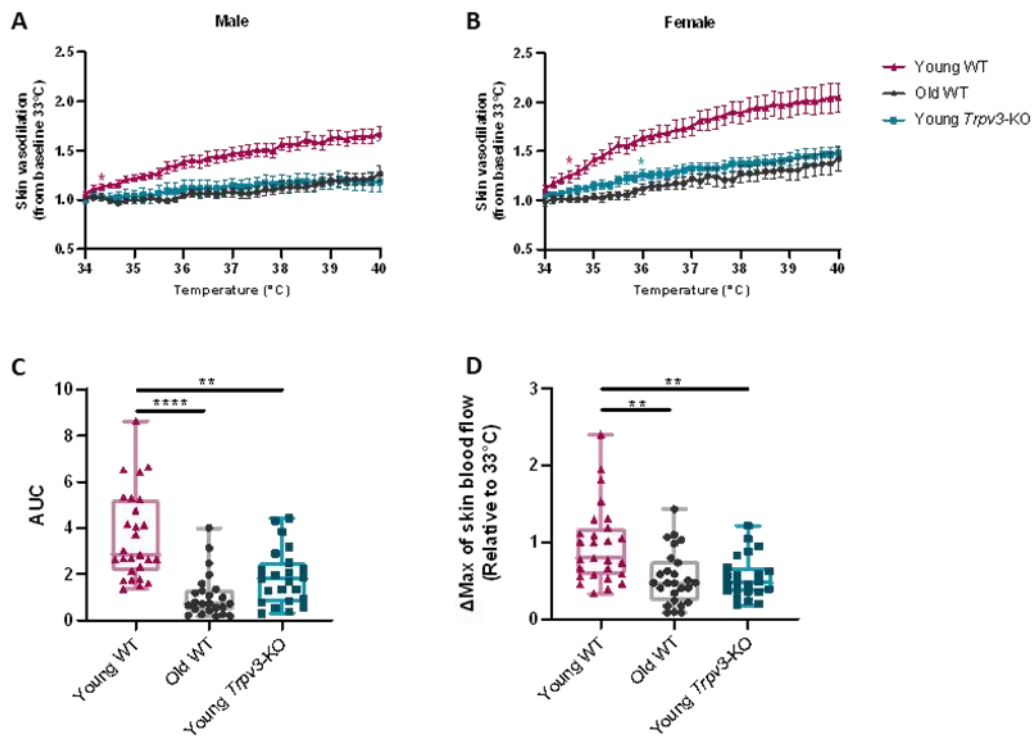


Figure 1: Cutaneous heat-induced vasodilation is reduced in a similar fashion in young *Trpv3*-KO and old WT mice

Relative paw blood flow in response to local heating in anesthetized male (A) or female (B) of 2 months (n=12 ♂ and n=15 ♀), 22 months (n=11 ♂ and n=13 ♀) and 2 months *Trpv3*-KO (n=12 ♂ and n=11 ♀). Results are expressed as mean ± SEM. (C) AUC and (D) maximal skin blood flow from baseline of young wild type, old wild type, and young *Trpv3*-KO mice (median (IQR)). A Kruskal-Wallis was used to compare mean of each group. Two-way ANOVA (mixed-model) with Sidak's multiple comparison was used to compared blood flow from the baseline

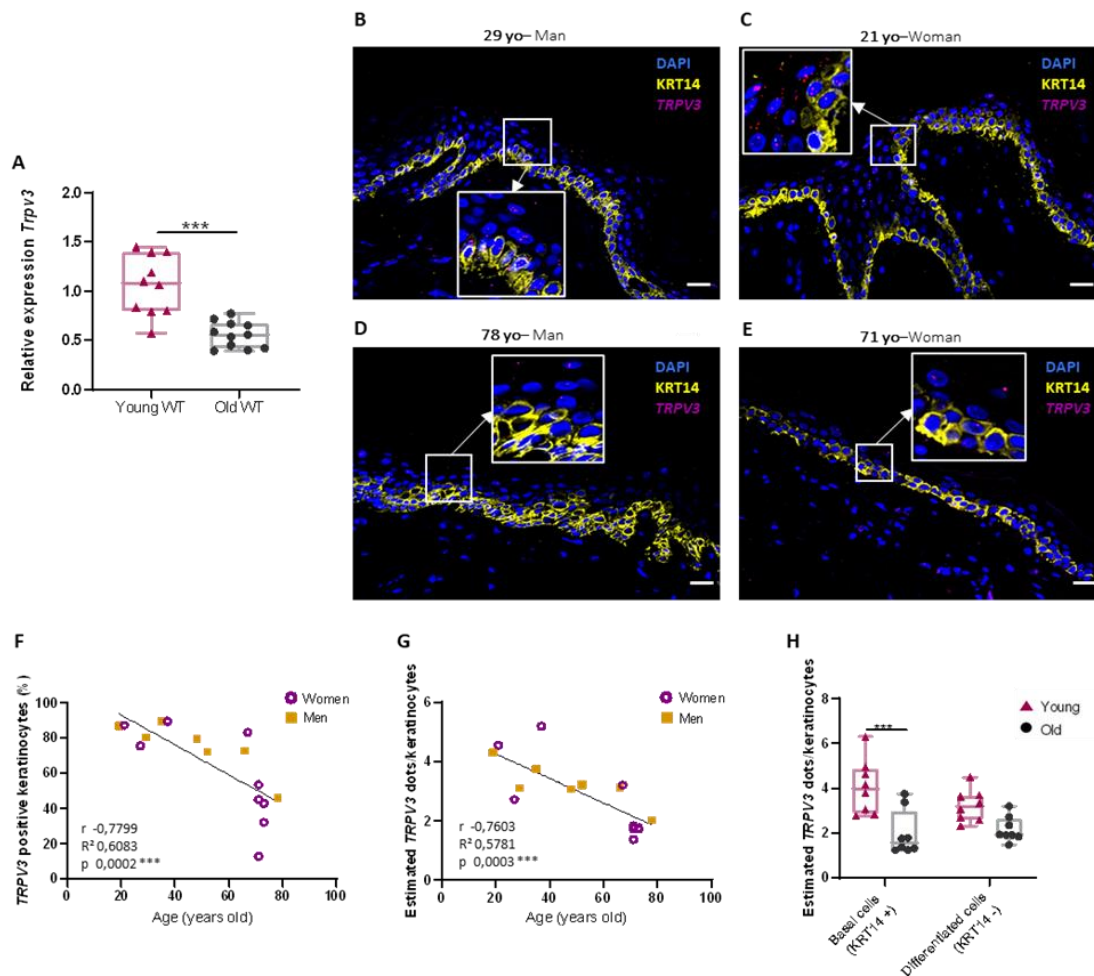


Figure 2: *TRPV3* expression is decreased with aging in both mouse and human skin

(A) Relative expression of *Trpv3* normalized with mean *Rpl13a* and *Eif4h* in paw skin from young (5 months) and old (22-24 months) mice. *In situ* hybridization of *TRPV3* (red dots) in a (B) 29-year-old man’s back humerus skin, (C) a 21-year-old woman’s breast skin, (D) a 78-year-old man’s back humerus skin and (E) a 71-year-old women’s scalp skin, combined with KRT14 immunostaining (yellow) (scale bar 20 μ m). (F) Percentage of *TRPV3*-positive cells and (G) number of *TRPV3* transcripts per keratinocyte according to the age in 9 woman (circles) and 7 man (squares) epidermis. (H) *TRPV3* transcripts in basal cells (KRT14+) or differentiated cells (KRT14-) in young (19-52 years old) and old (66-78 years old) human skin. Results are expressed as median (IQR). A Mann-Whitney test was used to compare *Trpv3* in young (n=6 ♂ and n=4 ♀) and old (n=4 ♂ and n=7 ♀) mouse hindpaws. Pearson correlation was performed to evaluate *TRPV3* expression with aging (n=16). A Two-way ANOVA with Tukey’s multiple comparison test was used to compared *TRPV3* transcripts in basal versus differentiated cells of young (n=8) and old (n=8) human epidermis.

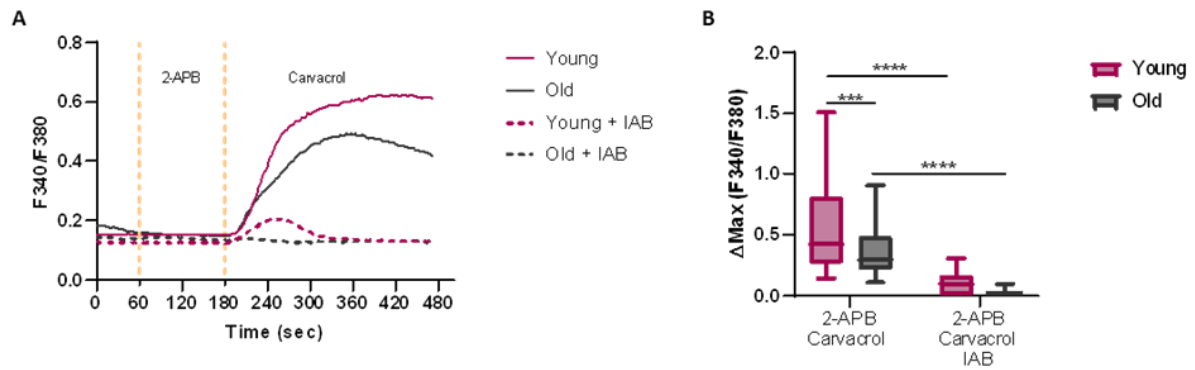


Figure 3: Aging reduces TRPV3 activity in human primary keratinocytes

(A) Changes in the intracellular Ca^{2+} concentration (mean curve), expressed as the fluorescence intensity ratio at 340 and 380 nm (F340/F380), were monitored in response to $50\mu\text{M}$ 2-APB (2 min) and then $300\mu\text{M}$ carvacrol (5 min) with (dotted line) or without (solid line) $100\mu\text{M}$ IAB, in young (mean age 32.6 years) and old (mean age 81.8 years) human primary keratinocytes. (B) Measurement of the maximal Ca^{2+} response of keratinocytes from baseline (median (IQR)). A Two-way ANOVA Tukey's multiple comparison test was performed to determine effect of aging and TRPV3 antagonist. (n=4/group with at least 40 cells recorded in each biological replicate).

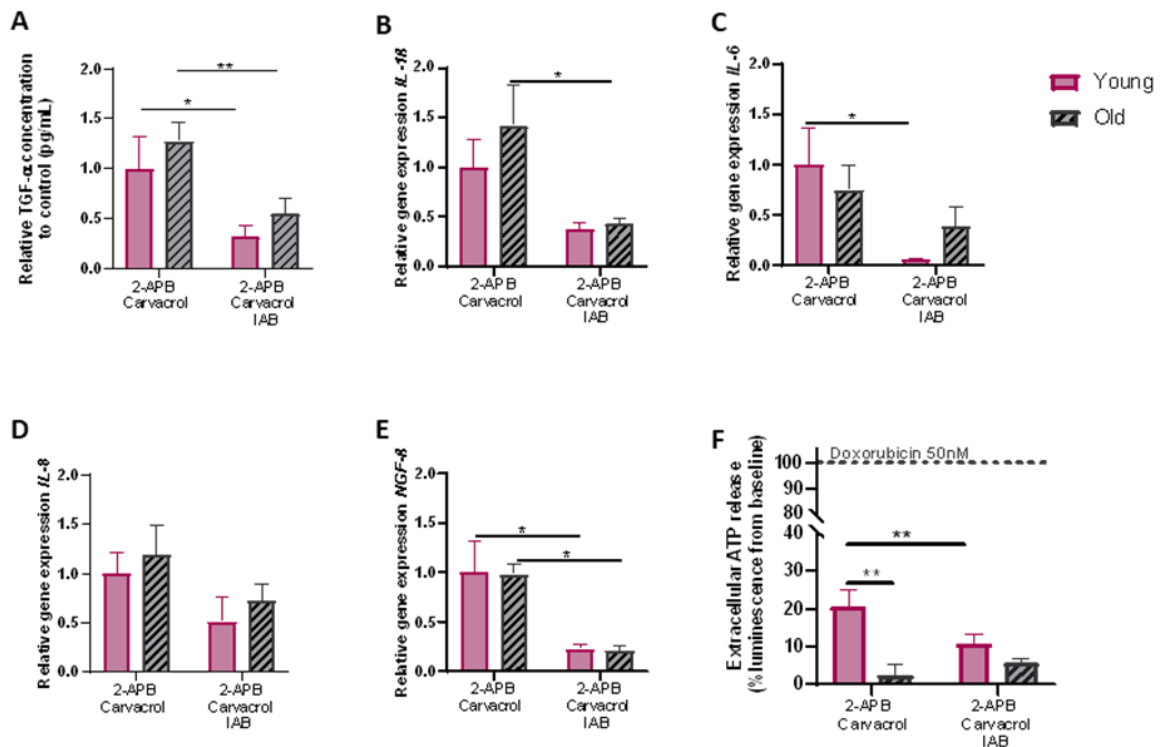


Figure 4: Aging reduces TRPV3-dependent release of ATP but not cytokines in human primary keratinocytes

(A) Relative TGF- α production following 16h TRPV3 stimulation using agonists (50 μ M 2-APB and 300 μ M carvacrol) with or without the TRPV3 antagonist 100 μ M IAB in young (n=4, mean of age 34.3 years) and old (n=5, mean of age 81.1 years) keratinocytes. Relative expression of *IL-1 β* (B), *IL-6* (C), *IL-8* (D) and *NGF- β* (E) normalized to the mean of *TBP* and *RPL13A* 6h following TRPV3 stimulation with or without TRPV3 blockade in young (n=5, mean of age 32.6 years) and old (n=5, mean of age 81.1 years) keratinocytes. (A-E) Results are expressed as a ratio treated/untreated. (F) Extracellular ATP release following TRPV3 stimulation with or without the TRPV3 antagonist IAB in young (n=5, mean age 32.6 years) and old (n=5, mean age 81.1 years) keratinocytes. Results are expressed as a ratio treated/untreated and then as percentage of variation from positive control (doxorubicin 50 mM) (n=5). A Two-way ANOVA (Mixed-model) with Sidak's multiple comparison was performed to determine effect of aging and TRPV3 antagonist groups. Results are expressed as mean \pm SEM.

Supplementary Tables

Supplementary Table 1: Specification of human skin sections used for *in situ* hybridization selected from SK224a and SKN1001 from US Biomax

Tissus Microarray	Sexe	Age	Anatomical localization	Group
SKN1001	Man	19	Groin	Young
SK224a	Woman	21	N/A	Young
	Woman	27	scalp	Young
SKN1001	Man	29	Back humeral	Young
	Man	35	Chest	Young
	Woman	37	Chest	Young
	Man	48	Face	Young
	Man	52	Face	Young
	Man	66	Groin	Old
	Woman	67	Chest	Old
	Woman	71	Chest	Old
	Woman	71	Chest	Old
	Woman	71	Hip	Old
	Woman	73	Chest	Old
	Woman	73	Chest	Old
Man	78	Back humeral	Old	

Supplementary Table 2: Specifications of human primary keratinocyte donors

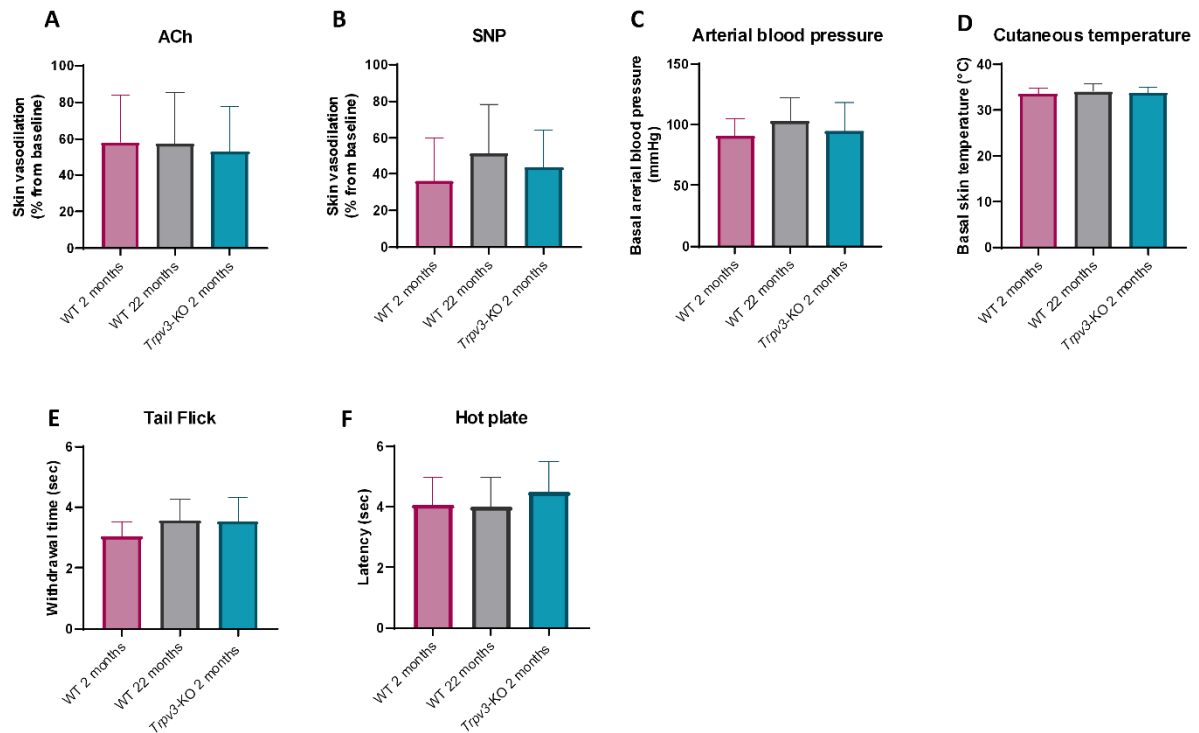
Donors n°	Anatomical Location	Sexe	Age (years old)	Group	Experiments
HPK11197	Breast	Woman	26	Young	Calcium imaging ,ATP, ,Rt-qPCR
HPK22045	Abdomen	Woman	29	Young	Calcium imaging ,ATP, Rt-qPCR, Luminex
HPK20060	Abdomen	Woman	30	Young	Calcium imaging ,ATP, Rt-qPCR, Luminex
HPK090317	Abdomen	Man	36	Young	Calcium imaging ,ATP, ,Rt-qPCR, Luminex
HPK20057	Abdomen	Woman	42	Young	Calcium imaging ,ATP, ,Rt-qPCR, Luminex
HPK18TL053546	Back	Woman	75	Old	Calcium imaging ,ATP, ,Rt-qPCR, Luminex
HPK12015	Face	Woman	80	Old	Calcium imaging ,ATP, ,Rt-qPCR, Luminex
HPK18TL150624	Abdomen	Man	80	Old	Calcium imaging ,ATP, ,Rt-qPCR, Luminex
HPK19TL150604	Abdomen	Man	82	Old	Calcium imaging ,ATP, Rt-qPCR, Luminex
HPK19TL149593	Buttock	Woman	92	Old	Calcium imaging ,ATP, ,Rt-qPCR, Luminex

Supplementary Table 3 : List of primers pairs used for qPCR analysis and RT-qPCR programm

Gene	Origin	Prime	Sequence (5'-3')
<i>TBP</i>	Human	Forward	TCA AAC CCA GAA TTG TTC TCC TTA T
		Reverse	CCT GAA TCC CTT TAG AAT AGG GTA GA
<i>RPL13A</i>	Human	Forward	CTC AAG GTC GTG CGT CTG AA
		Reverse	TGG CTG TCA CTG CCT GGT ACT
<i>TRPV3</i>	Human	Forward	GAC ATG CGG TGA TCT CAG GG
		Reverse	AGT GTG CAC TCT TCT TTG TGG G
<i>IL-1β</i>	Human	Forward	ACA-GAT-GAA-GTG-CTC-CTT-CCA
		Reverse	GTC-GGA-GAT-TCG-TAG-CTG-GAT
<i>IL-8</i>	Human	Forward	TCT GCA GCT CTG TGT GAA GG
		Reverse	ACT TCT CCA CAA CCC TCT GC
<i>IL-6</i>	Human	Forward	GAA CTC CTT CTC CAC AAG CGC CTT
		Reverse	CAA AAG ACC AGT GAT GAT TTT CAC CAG G
<i>NGF-β</i>	Human	Forward	ATA CAG GCG GAA CCA CAC TC
		Reverse	TGC TCC TGT GAG TCC TGTT G
<i>Rpl13a</i>	Mouse	Forward	AGA AGC TCT TGA GGT TAC GG
		Reverse	GGA GTC CGT TGG TCT TGA GG
<i>Eif4h</i>	Mouse	Forward	ATG ACT TCA ACT CTG GCT ACA GG
		Reverse	GAG GTC TCT GTG CTC GTT CC
<i>Trpv3</i>	Mouse	Forward	TCA CCA AGA CCT CTC CAC C
		Reverse	CGC GGT ACC ACC GAC GTT TCT GGG AAT TC

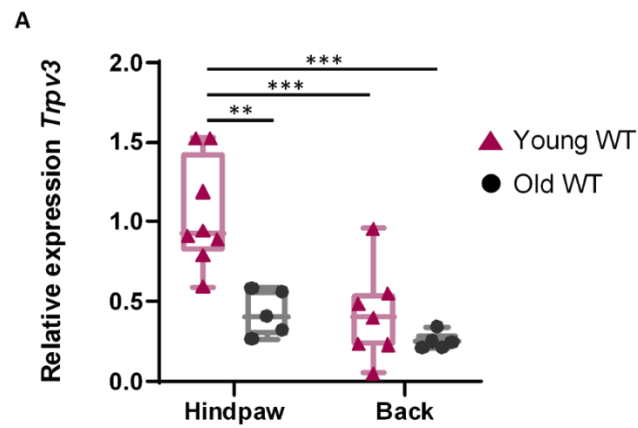
Reverse transcription	Time	Temperature°C	
	15 min	37	
	5 sec	95	
q-PCR			
Denaturation	30 sec	95	
	5 sec	95	
Amplification	30 sec	60	40 cycles
	30 sec	72	
Melting curve	1 min	95	
	30 sec	60	
	30 sec	95	

Supplementary Figures



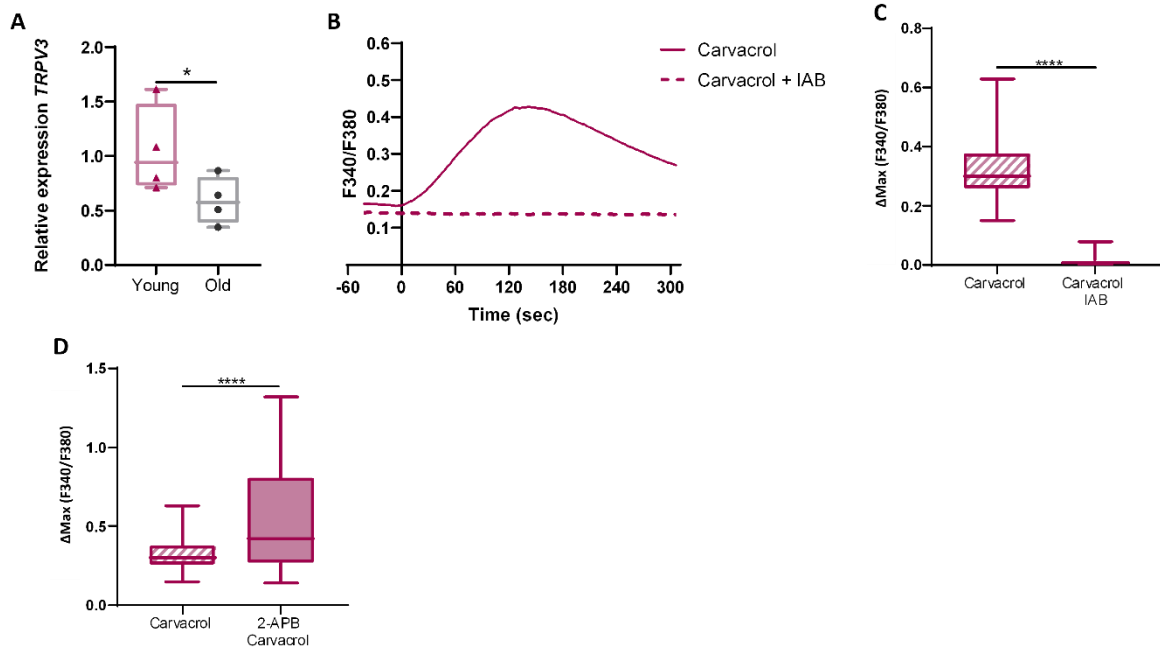
Supplementary Figure 1: Heat-induced vasodilation is reduced in a similar fashion in Trpv3-KO and old mice

Skin blood vessels integrity was analyzed using (A) acetylcholine (ACh) and (B) sodium nitroprusside (SNP) iontophoresis on mouse back skin of WT 2 months (ACh: n=8 ♂ and n=8 ♀; SNP: n=13 ♂ and n=10 ♀), WT 22 months (ACh: n=5 ♂ and n=7 ♀; SNP: n=7 ♂ and n=7 ♀), and Trpv3-KO 2 months (ACh: n=11 ♂ and n=6 ♀; SNP: n=14 ♂ and n=3 ♀). Data were expressed as percentage from baseline. Basal systolic arterial blood pressure (C) and basal cutaneous skin temperature (D) were measured on WT 2 months (n=12 ♂ and n=15 ♀), WT 22 months (n=11 ♂ and n=13 ♀); and Trpv3-KO 2 months (n=12 ♂ and n=11 ♀) mice. Sensory nerve integrity was assed using tail flick (E) and hot plate (F) test on WT 2 months (n=5 ♂ and n=12 ♀), WT 22 months (n=16 ♂ and n=12 ♀); and Trpv3-KO 2 months (TF: n=8 ♂ and n=10 ♀; HP: n=8 ♂ and n=8 ♀) mice. Data were expressed as time of latency (sec). A One-way ANOVA or Kruskal-Wallis was done to determine significance between mouse-dependent groups. Statistic tests were chosen according to the normality (Shapiro-Wilk’s test). Data are expressed as mean ± SD.



Supplementary Figure 2: TRPV3 expression is decreased with aging in both mouse and human skin

(A) Relative expression of *Trpv3* normalized with *Rpl13a* in young (5 months) and old (22-24 months) mouse hindpaw and back skin. A Two-way ANOVA with Tuckey's multiple comparison was used to compare *Trpv3* expression in the skin of young (n=8; ♂=4, ♀=4) and old (n=5; ♂=4, ♀=1) mice. Data are expressed as median (IQR).



Supplementary Figure 3: Aging is associated with lower TRPV3 activity in human primary keratinocytes

(A) Relative expression of *TRPV3* normalized with *TBP* and *RPL13A* in primary human keratinocytes from young (mean age 33.5 years) and old (mean age 81.8 years) individuals (n=4/group) (median (IQR)). (B) Changes in the intracellular Ca^{2+} concentration (mean curve) and (C) maximal Ca^{2+} response from baseline, expressed as fluorescence intensity ratio at 340 and 380 nm (F340/F380) in human primary keratinocytes (mean age 33,5 years) stimulated with 300 μ M carvacrol (5 min) in the absence (B: solid line; C: cross-hatched box) or presence (B: dotted line; C: empty box) of 100 μ M IAB (n=5) (median (IQR)). (D) Maximal Ca^{2+} response from baseline (F340/F380) of young keratinocytes after 300 μ M carvacrol (n=5, mean age 33.5 years) (cross-hatched box) or, 50 μ M 2-APB (2 min) and 300 μ M carvacrol (5 minutes) stimulation (n=4, mean of age 37 years) (full box) (median (IQR)). A t-test or Mann-Whitney was performed according to the Shapiro-Wilk's test. Activity of TRPV3 was assessed with at least 40 cells recorded in each biological replicate.

II. Résultats complémentaires

Pour mener à bien cette étude, plusieurs optimisations et manipulations supplémentaires ont été mises en œuvre. Cette section complémentaire est organisée en trois parties, et renforce les résultats présentés dans l'article scientifique en révision dans *Geroscience*.

– Effet du vieillissement sur les fonctions de la peau dans un modèle murin

1) Effet du vieillissement sur les capacités d'adaptation au chauffage global chez la souris

Outre l'exposition au chauffage local (résultats présentés dans l'article), nous avons également évalué les capacités de thermorégulation des souris jeunes, âgées et *Trpv3*-KO en réponse à un chauffage passif du corps entier de 33°C à 40°C (+1.0°C/min) (**Figure 27**).

A température ambiante, la température corporelle (mesure rectale) n'est pas différente entre les différents groupes de souris témoins : souris jeunes mâles (34.4°C) et femelles (34.3°C), souris âgées mâles (34.0°C) et femelles (34.7°C) (**Figure 27 A et C**). De manière surprenante, la température interne des souris jeunes *Trpv3*-KO est significativement plus élevée (36.0°C chez les mâles et 35.5°C chez les femelles) par rapport aux souris témoins jeunes (**Figure 27 A et C**). Il est intéressant de noter qu'une température externe de seulement 33°C (seuil d'activation de TRPV3) entraîne une augmentation de la température interne avec le vieillissement, plus marquée chez les souris mâles (+1.3°C) que chez les femelles (+0.6°C) (**Figure 27 A et C**).

L'exposition des souris au chauffage global (augmentation graduelle de la température environnementale de 33 à 40°C) augmente la température interne dans tous les groupes de souris (**Figure 27 A et C**). Chez les souris jeunes mâles et femelles (**Figure 27 B et D**), on retrouve le phénotype *Trpv3*-KO décrit précédemment chez des souris mâles uniquement [129]. La température interne des souris mâles âgés n'est pas différente de celle des souris jeunes sans stress thermique (à température ambiante), mais augmente fortement dès le début de l'exposition au chauffage (33°C) et reste globalement supérieure aux souris jeunes (**Figure 27 A**). Ceci conduit à une aire sous la courbe plus élevée (**Figure 27 B**), marquant un défaut de thermorégulation au cours du vieillissement chez les mâles (moins marqué que chez les souris KO). De la même manière que les mâles, la température interne des souris femelles âgées n'est pas différente de celle des souris jeunes sans stress thermique (à température ambiante). En

revanche la température interne augmente fortement dès le début de l'exposition au chauffage (33°C) chez les souris femelles jeunes et âgées (**Figure 27C**). Ceci conduit à une absence de défaut de thermorégulation significatif au cours du vieillissement chez les femelles (**Figure 27 D**).

Lors de l'exposition au chauffage global (33°C), la température interne des jeunes mâles *Trpv3*-KO est augmentée et reste supérieure aux souris âgées (**Figure 27 A**). Cela conduit donc à une aire sous la courbe beaucoup plus élevée (**Figure 27 B**), marquant un défaut de thermorégulation plus prononcé chez les souris jeunes *Trpv3*-KO comparé aux souris âgées. En revanche, chez les femelles *Trpv3*-KO l'exposition au chauffage conduit à une augmentation de la température interne de manière similaire aux souris âgées (**Figure 27 C**). Ceci se traduit par une absence de défaut de thermorégulation significatif entre les jeunes femelles *Trpv3*-KO et les femelles âgées (**Figure 27 D**).

Ces données confirment que la thermorégulation, en réponse à un chauffage global, dépend de TRPV3 chez les souris jeunes (mâles et femelles). Avec le vieillissement, le défaut de thermorégulation est moins drastique qu'après l'invalidation totale de *Trpv3* (souris KO) malgré l'absence de dysfonctions endothéliale et sensorielle dans les deux situations. Contrairement à l'effet du vieillissement sur les capacités de thermorégulation vasculaire au chauffage local qui était comparable entre les souris mâles et femelles, les mâles présentent un défaut de thermorégulation plus marqué que les femelles en réponse au chauffage global.

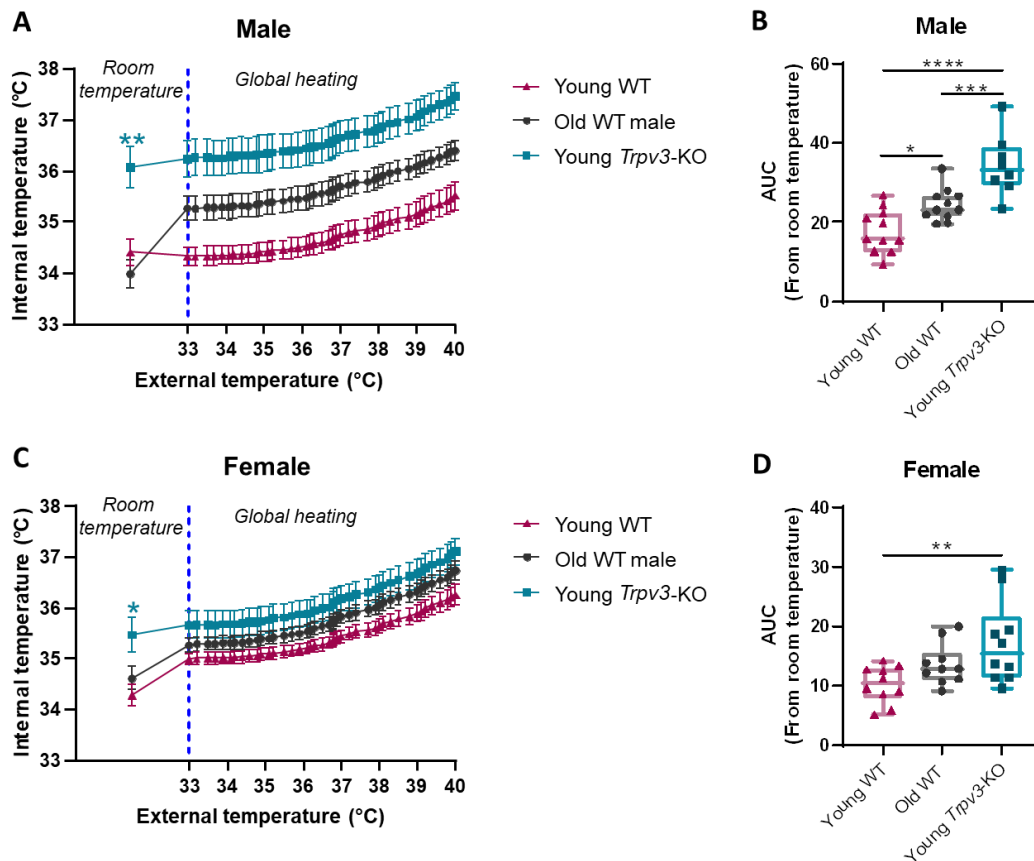


Figure 27 : Chauffage global

Température interne (mesure rectale) en conditions basales (room temperature) et lors d'un chauffage global (33°C-40°C) des souris mâles (A) et femelles (C), AUC mâles (B) et femelles (D). Jeunes souris de 2 mois (n=11 ♂ et n=10 ♀), souris âgées de 22 mois (n=11 ♂ et n=10 ♀) et *Trpv3*-KO de 2 mois (n=8 ♂ et n=10 ♀). Une Anova 1 a été réalisée pour comparer les trois groupes de souris. Les courbes sont exprimées en moyenne ± SEM. Les boîtes à moustaches représentent la médiane (IQR).

Le vieillissement entraîne une perte poids et une diminution de la température interne chez les souris [195]. Pour notre étude, un suivi hebdomadaire du poids et de la température interne (hors anesthésie) de toutes les souris âgées de plus de 18 mois a été mis en place. Ces paramètres ont été utilisés comme points limites : perte de poids supérieure à 20% du poids maximal atteint, et la température corporelle inférieure à 32°C (à température ambiante).

La température interne des souris âgées mâles et femelles (vigiles) a été mesurée à l'aide d'une sonde rectale (**Figure 28**) après un temps d'acclimatation de deux semaines. La température interne a fluctué tout au long de l'hébergement (4 mois), de manière indépendante de la température de la pièce d'expérimentation. Ces variations de températures peuvent être d'origines multiples : le stress de la manipulation, changement d'expérimentateur, cycle hormonal (femelles)... Néanmoins, la température interne n'a jamais baissé en dessous de 32°C. Le poids des souris a également évolué par rapport au poids d'arrivée (18 mois),

notamment chez les mâles lors de la dernière semaine de stabulation, sans atteindre une perte supérieure à 20% (**Figure 29**). Ainsi, pour l'ensemble des résultats *in vivo* obtenus sur des souris âgées de 22 mois, nous pouvons exclure un affaiblissement marqué des souris au moment des mesures.

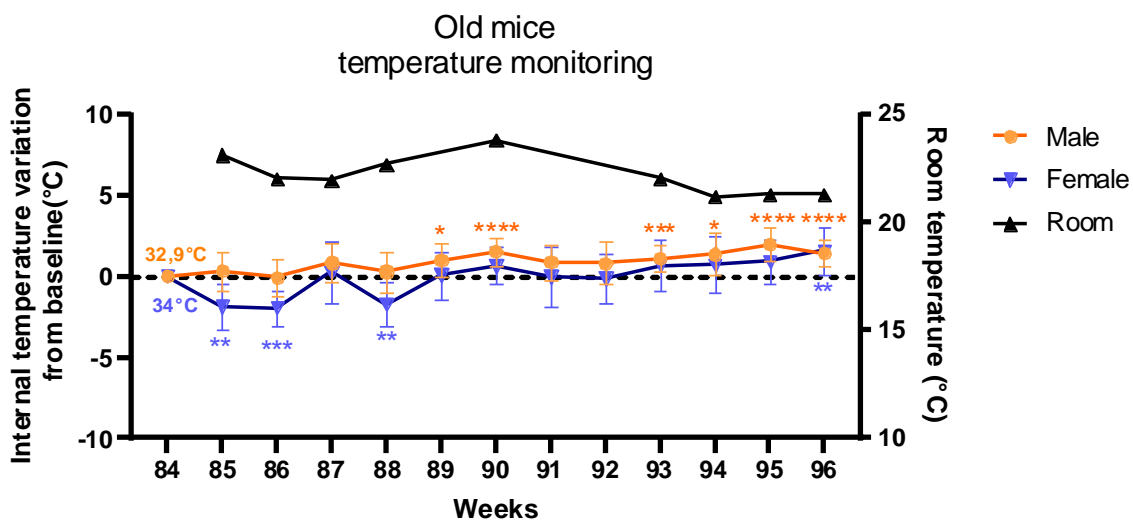


Figure 28 : Suivi hebdomadaire de la température corporelle des souris âgées

Variation de la température interne (hors anesthésie) des souris âgées mâles (rond orange) et femelles (triangle violet) par rapport à la température corporelle à leur arrivée à 84 semaines (32.9°C mâle et 34.0°C femelle). La température interne a été mesurée une fois par semaine à l'aide d'une sonde rectale, et la température de la pièce d'expérimentation a été relevée en parallèle (triangle noir). Une Anova 2 (Mixed-model) a été réalisée pour comparer la variation de température interne au cours du temps par rapport à la température d'arrivée pour chaque groupe de souris. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

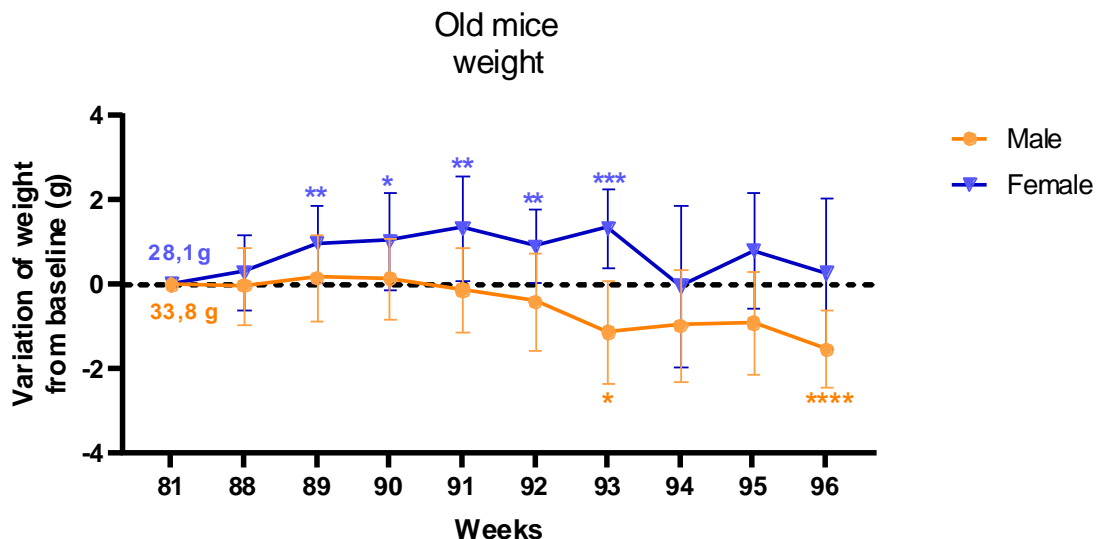


Figure 29 : Suivi hebdomadaire du poids des souris âgées

Variation du poids souris âgées mâles (rond orange) et femelles (triangle violet) par rapport au poids d'arrivée à 18 mois (33,8°C mâle et 28,1°C femelle). Une Anova2 (Mixed-model) a été réalisée pour comparer la variation de poids au cours du temps par rapport au poids d'arrivée pour chaque groupe de souris. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

2) Modifications épidermiques et caractéristiques du vieillissement cutané

En complément des réponses vasculaires induites par la chaleur, nous avons mesuré la perte insensible en eau (TEWL) de la peau des souris jeunes WT et *Trpv3*-KO, et des souris âgées. Nous avons observé une augmentation de la perte d'eau trans-épidermique chez les souris âgées par rapport aux souris jeunes (**Figure 30**), confirmant l'altération attendue de la fonction barrière de la peau avec le vieillissement, sans distinction entre les souris mâles et femelles. En effet, le vieillissement conduit à une perturbation du processus de différenciation épidermique [156–158], entraînant une diminution de l'épaisseur de l'épiderme et une augmentation de la sécheresse cutanée. Ainsi ces résultats permettent de renforcer le phénotype « âgé » des souris de 22 mois utilisées dans cette étude.

Le canal TRPV3 participe au processus de différenciation de l'épiderme, dont la formation de la couche cornée [124]. Il n'est donc pas surprenant que des souris mutées pour TRPV3, même jeunes, présentent un défaut de barrière cutanée (**Figure 30**).

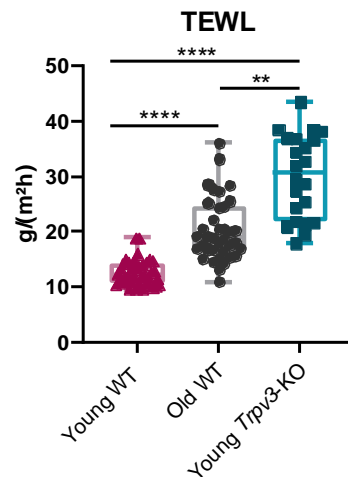


Figure 30: Perte d'eau trans-épidermique sur la peau de souris (TEWL)

Perte d'eau trans-épidermique sur la peau du dos des souris jeunes de 2 mois (n= 20♂ et n=20♀), des souris âgées de 22 mois (n= 18♂ et n=19♀) et des souris jeunes *Trpv3*-KO (n= 10♂ et n=12♀). Un Kruskal-Wallis a été réalisé pour comparer les trois groupes de souris. Les données sont représentées par la médiane (IQR).

Dans un second temps, nous avons analysé par RT-qPCR l'expression de *Sirt1* et $\Delta Np63$, deux marqueurs de vieillissement [161,196–198]. Nous avons observé une diminution significative de $\Delta Np63$ (**Figure 31 A**) et *Sirt1* (**Figure 31 B**) dans la peau murine (mâle et femelle) avec le vieillissement.

Ces résultats suggèrent que les souris témoins âgées (22-24 mois) présentent des propriétés connues du vieillissement, comme l'altération de la fonction barrière et la diminution des gènes (*Np63*) et (*Sirt1*) impliqués dans le déclin progressif des mécanismes de régulation de la prolifération des kératinocytes et du métabolisme cellulaire, respectivement.

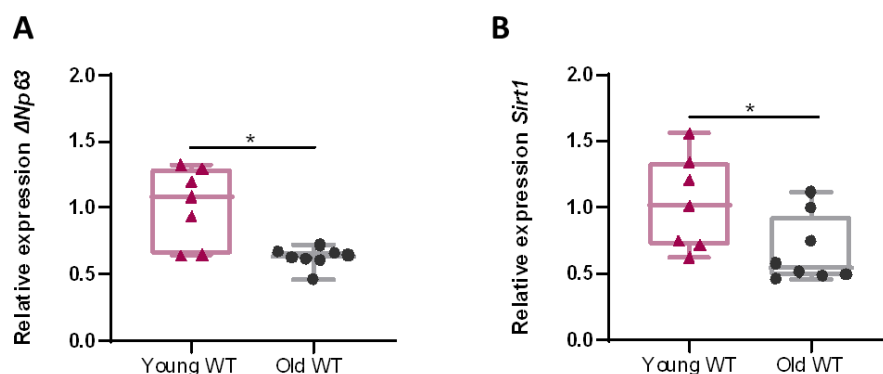


Figure 31 : Expression de marqueurs du vieillissement dans les coussinets de souris

Expression relative de $\Delta Np63$ (A) et *Sirt1* (B) par RT-qPCR dans les coussinets de souris jeunes (5 mois) et âgées (22-24 mois). Les gènes ont été normalisés avec la moyenne de *Rpl13a* et *Eif4h*. Souris jeunes n= 4♂ et n=3♀, et souris âgées n= 4♂ et n=4♀. Un test Mann-Whitney a été réalisé pour comparer l'expression entre les deux groupes. Les données sont représentées par la médiane (IQR).

3) Discussion

Le canal TRPV3 est un thermo-senseur fortement exprimé par les kératinocytes épidermiques [108,123,127]. Notre précédente étude réalisée chez des souris jeunes mâles a mis en évidence l'implication du canal TRPV3 dans la vasodilatation cutanée lors d'un chauffage local et dans les mécanismes de thermorégulation lors d'un chauffage global [129]. Les mécanismes de défense des souris *Trpv3*-KO face à la chaleur, présentent des défauts qui sont également observés chez l'être humain au cours du vieillissement (diminution de vasodilatation cutanée à la chaleur et défaut de dissipation de la chaleur) [129,131,184]. Nos résultats ont montré que la vasodilatation des micro-vaisseaux cutanés suite à un chauffage local était quasiment nulle chez les souris âgées mâles et femelles, et le profil de réponse était identique aux souris *Trpv3*-KO jeunes.

Contrairement au chauffage local, nous avons constaté un effet sexe lors d'un chauffage passif du corps entier. Nous avons montré que la température interne des jeunes mâles était stable entre la température ambiante et le début du chauffage global, contrairement aux femelles dont la température interne augmentait rapidement dès 33°C. Il semblerait donc que les systèmes de défense face à la chaleur environnementale soient différents entre les mâles et les femelles. La thermorégulation des femelles âgées, lors d'un chauffage global, semble être préservée contrairement aux mâles âgés. Ceci implique que le sexe influence les capacités de thermorégulation, via les hormones sexuelles en particulier (voir discussion générale).

La réponse au chauffage global ne semble pas être uniquement dépendante de *Trpv3* chez les souris âgées. En effet, l'augmentation de la température interne des jeunes souris *Trpv3*-KO lors d'un chauffage passif du corps entier, est plus importante que les souris âgées. Nous avons montré que le niveau de *Trpv3* était diminué de moitié dans les coussinets de souris âgées, ce qui pourrait alors conduire un défaut de thermorégulation moins drastique que les souris *Trpv3*-KO, totalement dépourvues de *Trpv3*. Il est également possible que des mécanismes de compensation se mettent en place avec l'âge, comme observé au niveau de l'endothélium avec une compensation de la voie du NO par l'EDHF [88]. On peut supposer une augmentation du seuil de détection de TRPV4 ou une diminution du seuil de détection de TRPV1 avec l'âge, ce qui reste à démontrer. Par ailleurs, on ne peut exclure l'implication d'autres thermo-senseurs au niveau du système nerveux central [76]. Cependant, l'ensemble de ces données suggère fortement que le défaut de thermorégulation vasculaire cutanée observé au cours du vieillissement est lié à une altération de la détection thermique, vraisemblablement associé à la diminution de *Trpv3* au niveau épidermique et des mécanismes en aval de cette détection

(communication entre les kératinocytes et les terminaisons nerveuses libres et/ou les micro-vaisseaux dermiques).

Le vieillissement conduit à l'atteinte de la fonctionnalité de différents organes dont la peau. Cette dernière est principalement marquée par une diminution de l'épaisseur et de la différenciation de l'épiderme [153,156,163,164], une perte sensorielle [169], et également des atteintes vasculaires (principalement liées à une dysfonction endothéliale) [88,175]. Nous avons montré que les souris âgées (mâles et femelles) présentaient un défaut de barrière cutanée (TEWL) [156–158] et des modifications moléculaires au niveau des coussinets (Np63 et Sirt1), qui sont des caractéristiques connues du vieillissement cutané [161,196–198]. La détection des températures élevées (>40°C) peut être altérée chez les souris âgées (2 ans), en particulier dû à une diminution de TRPV1 sur les fibres sensorielles cutanées [169,199]. Cependant, dans notre étude, les propriétés nerveuses sensorielles des souris âgées étaient conservées (Tail-Flick et Hot plate), suggérant la préservation de Trpv1 et de la fonctionnalité des terminaisons nerveuses sensorielles A δ et C dans la peau. Ainsi, le défaut de réponse à la chaleur que nous avons observé était probablement lié à un défaut de détection des températures modérées empêchant le déclenchement de la réponse vasculaire pour les températures les plus basses. Chez l'être humain, le seuil de détection à la chaleur modérée ou aigüe augmente (de 5.7°C chez individus âgés >65ans contre 2°C chez les jeunes), ce qui témoigne d'une anomalie fonctionnelle des petites fibres sensorielles cutanées [131,200], ou d'une baisse des Trpv3 sur la base de nos travaux.

Notre modèle de souris âgées présente des caractéristiques du vieillissement telles qu'une diminution de certains marqueurs comme Sirt1 et Np63, une perte de la fonction barrière cutanée (TEWL) [157] et une absence de vasodilatation à la chaleur, sans atteintes nerveuses sensorielles ou vasculaires de la peau. Ces résultats *in vivo* semblent confirmer notre hypothèse, où Trpv3 participerait à l'altération de la détection aux chaleurs modérées, et donc à l'initiation de la réponse vasculaire cutanée au cours du vieillissement chez la souris. Le canal TRPV3 étant majoritairement exprimé au niveau des kératinocytes, il serait intéressant d'utiliser un modèle d'inactivation conditionnel de TRPV3 spécifique de l'épiderme (TRPV3 K14-Cre) [124], afin de s'assurer que le défaut de réponse vasculaire observé chez les souris *Trpv3-KO* ne dépend bien que du canal TRPV3 épidermique.

Cependant, comment le canal TRPV3 kératinocytaire est capable de moduler le flux sanguin en réponse à la chaleur, reste à résoudre.

– Evaluation de l'expression et de l'activité de TRPV3 au cours du vieillissement chronologique

Nous avons précédemment montré que les souris âgées ont un niveau d'expression de *Trpv3* plus faible au niveau de la zone de thermorégulation (coussinet). Dans cette partie de la thèse, nous avons étudié l'expression (*ex vivo* et *in vitro*) et l'activité de TRPV3 sur des kératinocytes primaires humains issus d'individus jeunes et âgés.

1) Expression de TRPV3 au cours du vieillissement

Les résultats d'hybridation *in situ* de *TRPV3* (RNAscope™) soumis dans *Geroscience*, ont mis en évidence que le vieillissement affectait négativement l'expression de *TRPV3* dans la couche basale proliférante de l'épiderme humain. L'hybridation *in situ* est une technique très sensible et spécifique permettant la détection de transcrits. Cependant, à cause du défaut de spécificité des anticorps TRPV3, et des TRP de manière générale [201], nous n'avons pas pu analyser le devenir de TRPV3, d'un point de vue protéique, au sein de l'épiderme d'individus âgés.

En effet, nous avons réalisé des immunomarquages de TRPV3 sur des coupes en paraffine de peaux d'abdomens de 30 ans et 60 ans. Afin de valider la localisation de TRPV3 deux anticorps ont été utilisés : un anticorps vendu par GeneTex (GTX54763) qui cible la première boucle extracellulaire de TRPV3, et un anticorps vendu par Abcam (ab85022) ciblant la partie C-terminal du canal TRPV3. Les deux anticorps ont confirmé que le canal TRPV3 était exprimé exclusivement dans l'épiderme (**Figure 32**). En revanche, pour la peau d'un même donneur (abdomen d'un homme de 30 ans), la localisation de TRPV3 diffère entre les deux anticorps (**Tableau 2**). Avec l'anticorps GeneTex, le marquage de TRPV3 est très intense dans la couche basale et épineuse de l'épiderme, puis semble diminuer avec la différenciation (**Figure 32 A et Tableau 2**). A l'inverse avec l'anticorps Abcam, on observe un gradient de la couche basale à la couche granuleuse, avec un fort marquage dans les couches très différenciées (**Figure 32 B et Tableau 2**). Ces mêmes résultats ont été observés à plus fort grossissement dans une peau d'abdomen de 60 ans, suggérant ainsi qu'il n'y a pas de modification de la localisation de TRPV3 avec l'âge pour un anticorps donné (**Figure 33 et Tableau 2**). Diverses études réalisées sur des biopsies de peaux ont révélé que l'expression de TRPV3 variait en fonction de l'anticorps et de la technique de marquage utilisés. Facer et al (2007) [202] ont montré par immunohistochimie un marquage de TRPV3 exclusivement dans la couche basale de l'épiderme, alors que d'autres ont observé un marquage de TRPV3 dans la couche épineuse

[203], ou dans la totalité de l'épiderme [96]. Ainsi seule l'hybridation *in situ* nous a permis d'évaluer spécifiquement l'expression de TRPV3 avec l'âge.

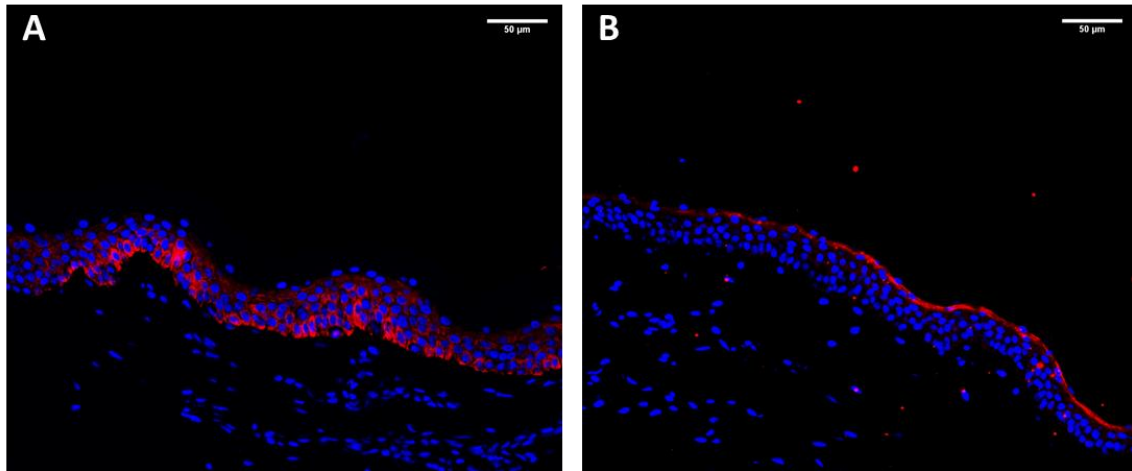


Figure 32 : Immunofluorescence de TRPV3 sur peau d'abdomen de 30 ans

Marquage de TRPV3 (rouge) avec l'anticorps (A) GeneTex (Rabbit) ou (B) l'anticorps Abcam (mouse) sur peau d'abdomen d'un homme de 30 ans.

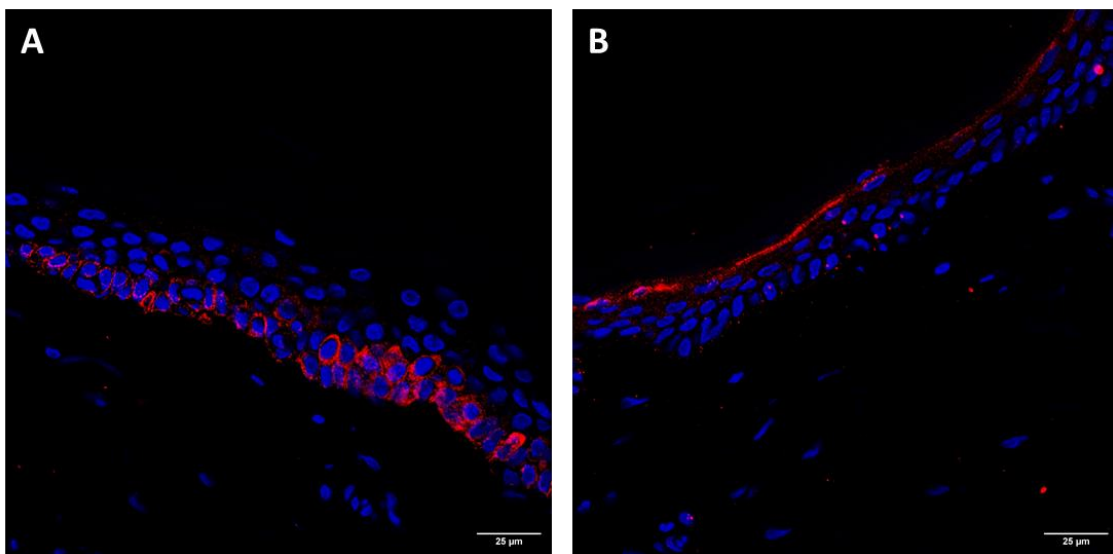


Figure 33: Immunofluorescence de TRPV3 sur peau d'abdomen de 60 ans

Marquage du noyau (DAPI-bleu) et de TRPV3 (rouge) avec l'anticorps (A) GeneTex (Rabbit) ou (B) l'anticorps abcam (mouse) sur peau d'abdomen de 60 ans.

Tableau 2 : Comparaison de la localisation de TRPV3 dans l'abdomen humain selon les anticorps

Anticorps	Abdomen 30 ans	Abdomen 60 ans
GeneTex (GTX54763)	Couche basale et couche épineuse	Couche basale et couche épineuse
Abcam (ab85022)	Couche granuleuse	Couche granuleuse

En culture 2D, nous avons montré par RT-qPCR que (i) le canal *TRPV3* était fortement exprimé par les kératinocytes primaires humains comparé à *TRPV1* et *TRPV4*, et (ii) l'expression de *TRPV3* est la seule à être impactée par le vieillissement (**Figure 34**). Dans un modèle de différenciation 2D, nous avons montré une augmentation de l'expression de *TRPV3* avec la différenciation, notamment au jour 6 (D6) dans le groupe jeune (**Figure 35 A**). En revanche cette augmentation était moindre dans le groupe âgé. L'analyse des différents marqueurs de différenciation tels que l'*IVL*, *LOR*, *CDSN*, et *KLK7* (**Figure 35**) a révélé une altération ou un retard du processus de différenciation chez les kératinocytes âgés comparé aux kératinocytes jeunes, en accord avec des données du laboratoire déjà publiées [164]. Ce modèle de différenciation nous permet de confirmer que (i) le phénotype « âgé » des kératinocytes est conservé en culture 2D [163,164], et (ii) le défaut de différenciation semble corrélé au délai d'expression de *TRPV3* par les kératinocytes âgés. Malgré tout, nous avons pu montrer une altération de l'expression de *TRPV3* avec l'âge dans des biopsies humaines et sur des kératinocytes primaires en culture (70% confluence) (Résultats présentés dans l'article).

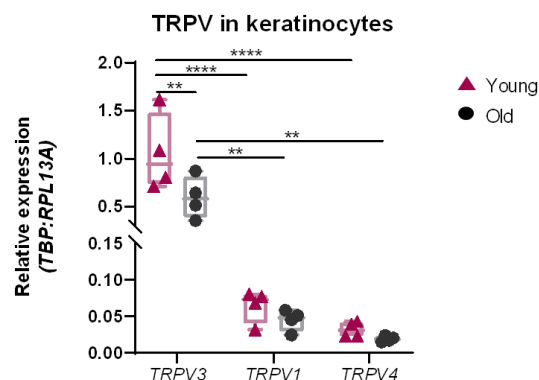


Figure 34 : Expression relative des TRPV dans les kératinocytes primaires en culture

Analyse par RT-qPCR de l'expression de *TRPV3*, *TRPV1* et *TRPV4* dans des kératinocytes primaires humains issus d'individus jeunes (moyenne d'âge 33,5 ans - rose) et d'individus âgés (moyenne d'âge 81,8 ans - noir) à 70% de confluence. L'expression des TRPV a été normalisée sur la moyenne des gènes de ménage *TBP* et *RPL13A*. Une Anova 2 a été réalisée pour comparer les différents groupes d'âge (n=4/groupe). Les données sont représentées par la médiane (IQR).

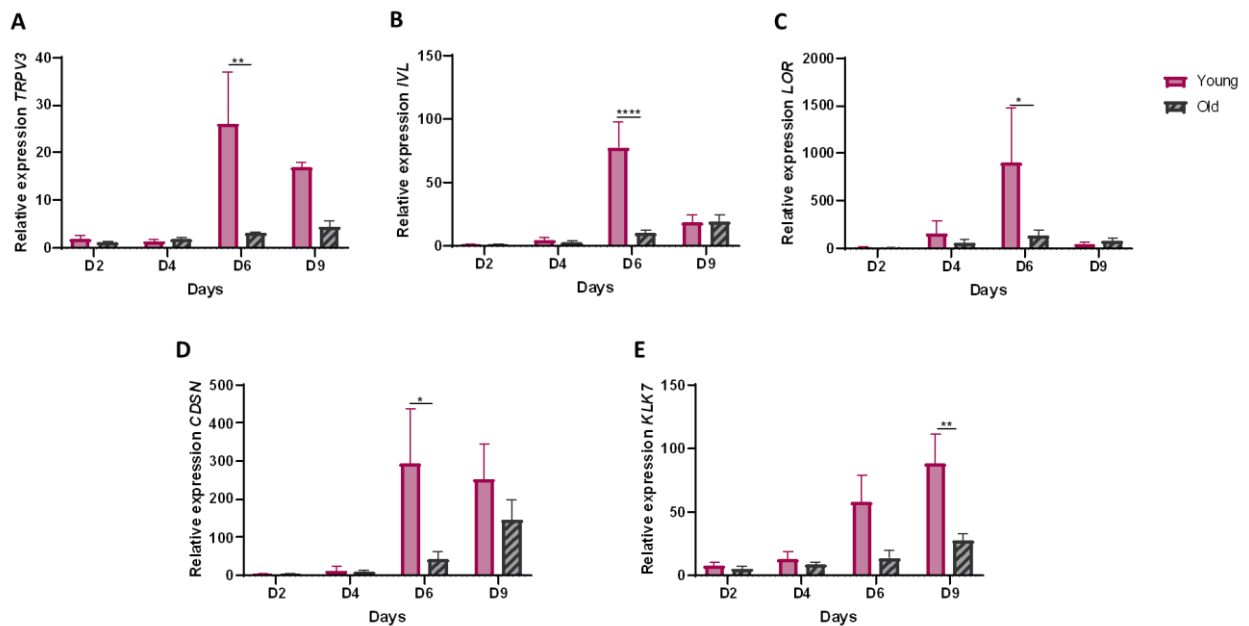


Figure 35 : Différenciation de kératinocytes primaires humains en culture 2D

Analyse par RT-qPCR de la différenciation en culture 2D de kératinocytes primaires humains issus d'individus jeunes (moyenne d'âge 36.5 ans - rose) et d'individus âgés (moyenne d'âge 79 ans - noir). L'expression de (A) *TRPV3*, (B) Involucrine (*IVL*), (C) Loricrine (*LOR*), (D) Cornéodesmosine (*CDSN*) et (E) de la Kallikrein Related Peptidase 7 (*KLK7*) a été normalisée sur la moyenne des gènes de ménage *TBP*, *RPL13A* et *OZA1* par rapport au point de différenciation D0 de chaque groupe. Une Anova 2 a été réalisée pour comparer les deux groupes d'âge à chaque point de cinétique (n=5/groupe). Les données sont représentées par la moyenne ± SEM.

2) Evaluation de l'activation et activité de TRPV3

Afin d'évaluer la fonctionnalité du canal TRPV3 avec l'âge, nous avons analysé l'activité du canal par imagerie calcique (culture 2D). En effet, le canal TRPV3 est perméable au calcium, il est donc possible de mesurer le flux calcique intracellulaire après stimulation. Les résultats présentés dans l'article xx, ont révélé une activité intrinsèque de TRPV3 plus faible dans les kératinocytes âgés. L'obtention de ces résultats a nécessité des étapes d'optimisation des conditions d'activation (agonistes, concentration) et d'inactivation (ARN interférence et approche pharmacologique) de TRPV3.

a) Activation de TRPV3

Dans un premier temps nous avons défini les conditions d'activation de TRPV3. Ce dernier peut être activé par la chaleur ou par divers ligands, dont des extraits de plantes et des composés synthétiques. Par ailleurs, le canal TRPV3 est le seul canal TRP à se sensibiliser après des stimulations répétées [204,205]. Nous avons analysé par RT-qPCR l'expression de gènes dépendants de TRPV3 (voie EGFR/TGF α /NF κ B) [96,124] après divers types de

stimulations (**Figure 36**). Contrairement à ce qui a été précédemment décrit [96,124,125], l'expression relative du *TGF- α* , d'*IL-1 α* et d'*IL-8* ne semble pas varier après stimulation des kératinocytes avec 300 μ M et 500 μ M carvacrol ou une température de 33°C. En revanche, l'effet d'une double stimulation (2x carvacrol 300 μ M ou 500 μ M ; 33°C + carvacrol 500 μ M) augmente l'expression de l'*IL-1 α* et de l'*IL-8* (**Figure 36 B et C**). De manière générale nous observons que la double stimulation a bien un effet de potentialisation vis-à-vis des gènes analysés, notamment avec la condition 2x carvacrol 500 μ M. Cependant, pour cette condition nous avons constaté que la morphologie des cellules était affectée.

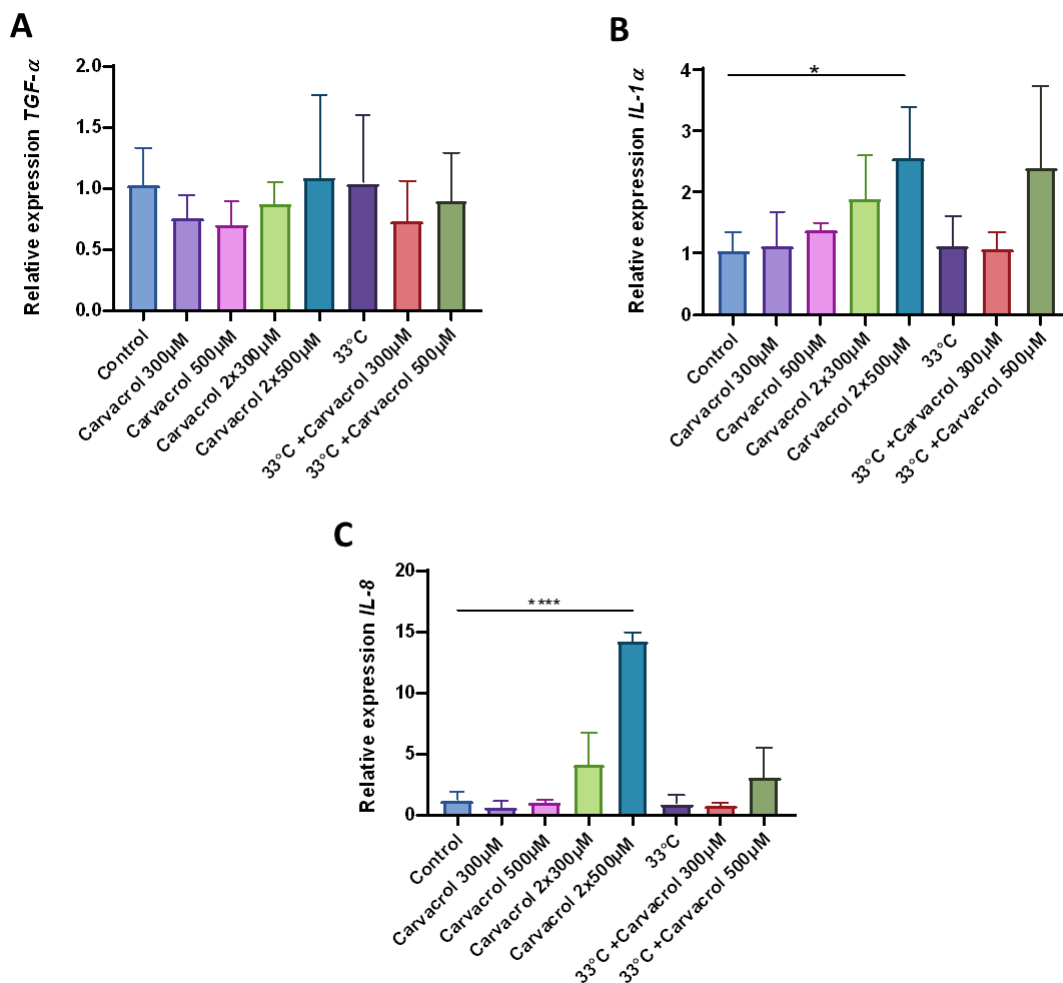


Figure 36 : Effet d'une double stimulation de TRPV3 par le carvacrol et la chaleur

Analyse par RT-qPCR de la stimulation de TRPV3 par le carvacrol 300 μ M +/- double stimulation, carvacrol 500 μ M +/- double stimulation, ou culture à 33°C +/- double stimulation carvacrol 300 μ M ou 500 μ M dans des kératinocytes primaires humains. Les ARN ont été extraits 6h post-traitement, et l'expression du (A) *TGF- α* , (B) *IL-1 α* et (C) *IL-8* ont été normalisées avec le gène de ménage *TBP*. La condition contrôle correspond à la condition de culture standard pour les kératinocytes (37°C). Une Anova 2 a été réalisée pour comparer les différentes stimulations entre elles (n=3). Les données représentent la moyenne \pm SD.

Au vu des premiers résultats obtenus, nous nous sommes concentrés sur une double stimulation de TRPV3 avec deux agonistes différents, le 2-APB et le carvacrol (**Figure 37**). Il est connu que le 2-APB sensibilise le canal TRPV3 à l'activation par la chaleur mais aussi par des agonistes tels que le camphre [109]. En accord, l'application simultanée des deux agonistes a révélé une nette augmentation de l'*IL-1 α* et de l'*IL-8* (**Figure 37**). Cependant, la viabilité et la morphologie des cellules suite à la stimulation 2-APB + Carvacrol 500 μ M semblaient être affectées. Nous avons donc choisi de conserver cette double stimulation mais en diminuant la concentration de carvacrol de 500 à 300 μ M (2-APB 50 μ M + Carvacrol 300 μ M). Nous avons parallèlement confirmé que le 2-APB 50 μ M n'induisait pas, à lui seul, une augmentation de l'expression des gènes dépendants de TRPV3 (**Figure 38**).

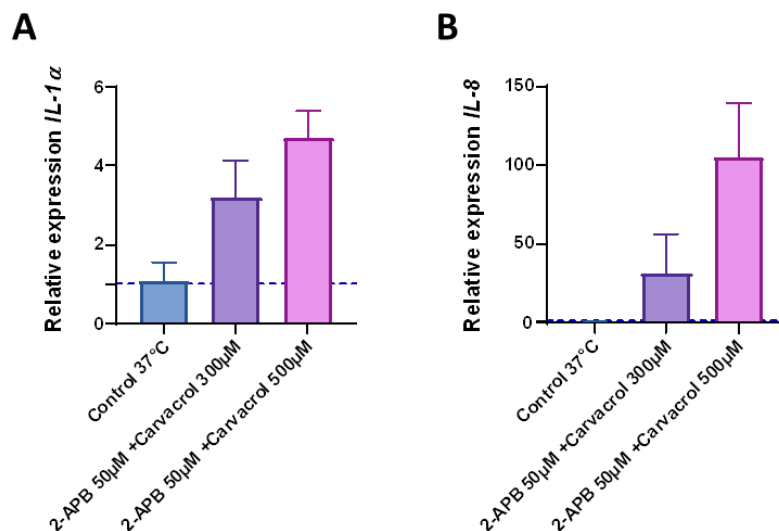


Figure 37 : Double stimulation de TRPV3 par le 2-APB et le carvacrol

Analyse par RT-qPCR de la stimulation de TRPV3 par le 2-APB 50 μ M et le carvacrol 300 μ M ou 500 μ M dans des kératinocytes primaires humains. Les ARN ont été extraits 6h post-traitement, et l'expression de (A) *IL-1 α* et (B) *IL-8* ont été normalisées avec le gène de ménage *TBP*. La condition contrôle correspond à la condition de culture standard pour les kératinocytes (37°C) (n=2). Les données représentent la moyenne \pm SD.

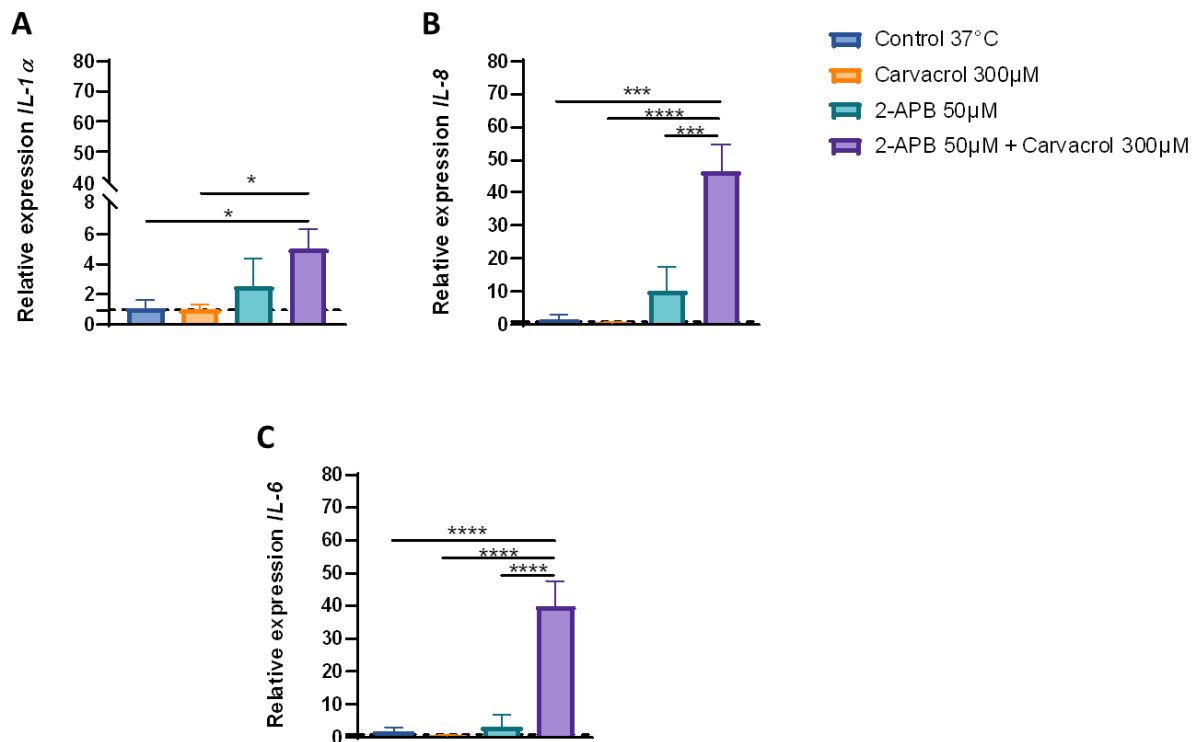


Figure 38 : Stimulation de TRPV3 au 2-APB 50µM et carvacrol 300µM

Analyse par RT-qPCR de la stimulation de TRPV3 par le 2-APB 50µM et le carvacrol 300µM sur kératinocytes primaires humains. Les ARN ont été extraits 6h post-traitement, et l'expression de (A) *IL-1α*, (B) *IL-8* et (C) *IL-6* ont été normalisées avec le gène *TBP*. La condition contrôle correspond à la condition de culture standard pour les kératinocytes (37°C). Une Anova1 a été réalisée pour comparer les différentes stimulations entre elles (n=3). Les données représentent la moyenne ± SD.

b) Blocage de TRPV3

Afin de valider la spécificité de la réponse TRPV3, nous avons testé différentes approches moléculaires et pharmacologiques pour bloquer l'activité du canal.

-ARN interférence transitoire (siRNA TRPV3)

Dans un premier temps, nous avons analysé par RT-qPCR l'effet de 3 siRNA (IDT-hs.Ri.TRPV3.13) sur l'expression de *TRPV3* dans des kératinocytes primaires humains (**Figure 39**). Seul le siTRPV3.2 à 40 nM était capable de réprimer l'expression de *TRPV3* avec une efficacité de 70% par rapport au contrôle (siRNA scramble) (**Figure 39 A**). L'efficacité et la faisabilité de la méthode de transfection ont été validées par une répression de 100% de *HPRT* (**Figure 39 B**). Dans les conditions avec un siTRPV3, la stimulation par le 2-APB et le carvacrol induit tout de même une augmentation de l'expression de l'*IL-1α*, *IL-8* et *IL-6*, à des niveaux similaires au siScramble (**Figure 40 A-C**). Nous avons donc vérifié l'expression de TRPV3 dans toutes les conditions et nous avons remarqué que la stimulation de TRPV3 semble induire

un rétro-contrôle positif sur sa propre expression (**Figure 40 D**). Ainsi, l'induction de l'expression de *TRPV3* sous stimulation semble masquer l'effet du siRNA.

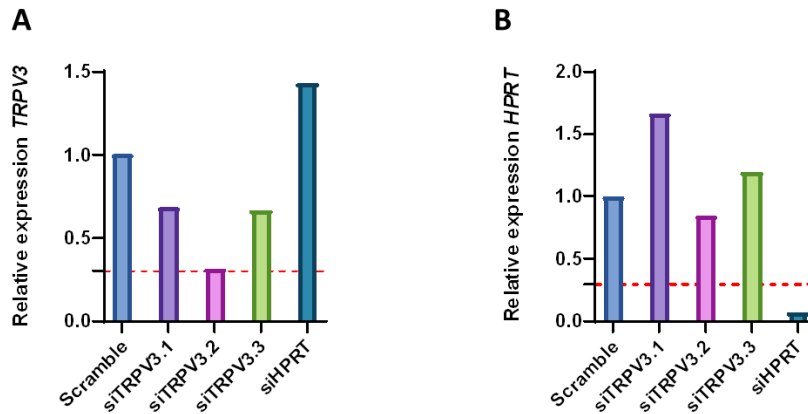


Figure 39 : Analyse de la répression de TRPV3 par transfection de siRNA

Analyse par RT-qPCR de (A) *TRPV3* et (B) *HPRT* 24h après transfection avec le siScramble, siTRPV3.1, siTRPV3.2, siTRPV3.3 et siHPRT sur kératinocytes primaires humains. L'expression de *TRPV3* et *HPRT* a été normalisée par le gène de ménage *TBP*. Les données représentent la moyenne.

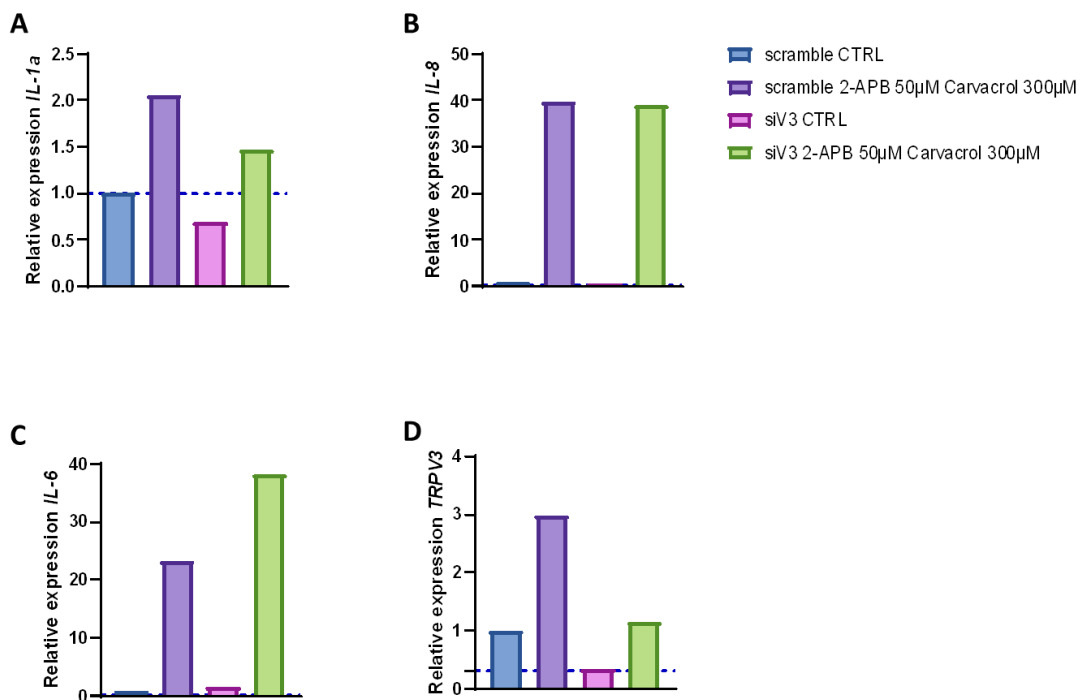


Figure 40 : Effet du siTRPV3 après stimulation TRPV3

Analyse par RT-qPCR de l'expression de (A) *IL-1α*, (B) *IL-8*, (C) *IL-6* et (D) *TRPV3* après stimulation 2-APB 50µM et Carvacrol 300µM (6h) sur kératinocytes primaires humains 24h après transfection avec le siScramble ou siTRPV3.2 (40nM). L'expression des gènes a été normalisée par le gène de ménage *TBP*. Les données représentent la moyenne.

- ARN interférence stable (shTRPV3)

Considérant l'effet transitoire des siRNA, nous avons envisagé d'utiliser des shRNA TRPV3 (shA et shD, Cliniscience, #TL300805) qui permettent une extinction stable des gènes par intégration du transgène. Nous avons testé plusieurs MOI (multiplicity of infection) : 50, 100 et 200. Le suivi de l'efficacité de transduction est rendu possible grâce à une cassette GFP associée à la séquence du shRNA. 48h après la transduction lentivirale à 50 MOI, très peu de signal GFP était détecté, à 100 MOI le marquage semblait homogène, et à 200 MOI le marquage était très prononcé mais la viabilité des cellules était impactée (**Figure 41**). Nous avons donc conservé la condition 100 MOI (**Figure 42**). L'analyse par RT-qPCR de l'expression de TRPV3 sur deux passages successifs (passage 2 et passage 3) des kératinocytes a révélé que (i) l'effet du shA et shD tendait à diminuer avec la prolifération cellulaire, (ii) la combinaison shA+shD (bleu) diminuait d'environ 50% l'expression de *TRPV3*, (iii) aucun des shTRPV3 ne permet une extinction préférentielle de 70%. L'utilisation de shA+D à des MOI supérieurs à 100 a un effet très délétère sur la viabilité des cellules. L'ensemble de ces résultats suggère que l'extinction de TRPV3 de manière stable à un effet néfaste sur les kératinocytes, favorisant la sélection/prolifération des cellules qui expriment le canal. Ceci suggère également que TRPV3 pourrait être indispensable à la survie des cellules en culture. Cependant, diverses études ont été réalisées sur kératinocytes issus de souris *Trpv3*-KO [93,109,124–126]. Il est probable que l'intégration du transgène ait un effet délétère sur les kératinocytes, ou que la présence de TRPV3 soit différentiellement nécessaire entre l'humain et la souris.

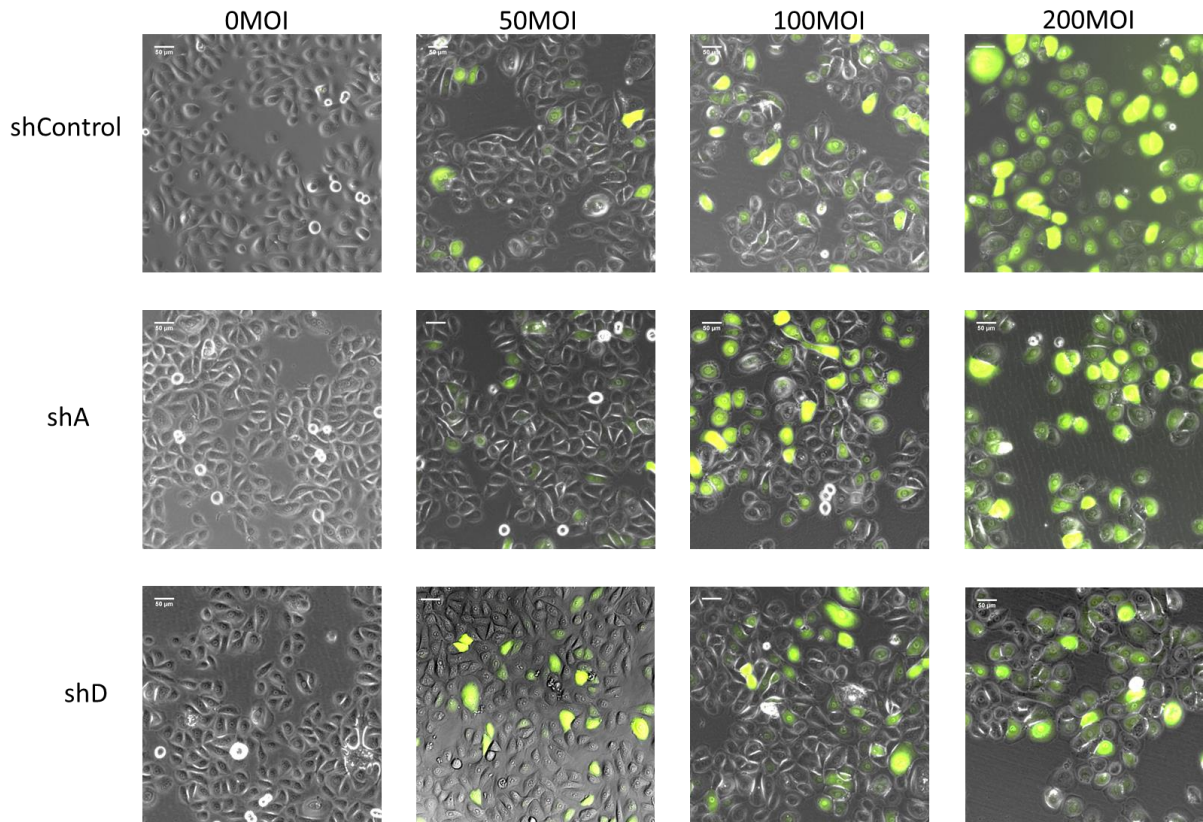


Figure 41 : Transduction shTRPV3 à différents MOI dans des kératinocytes primaires

Analyse par microscopie de la transduction des kératinocytes primaires humains par différents shRNA à 0, 50, 100 et 200 MOI. Le marquage GFP correspond aux cellules qui ont été transduites.

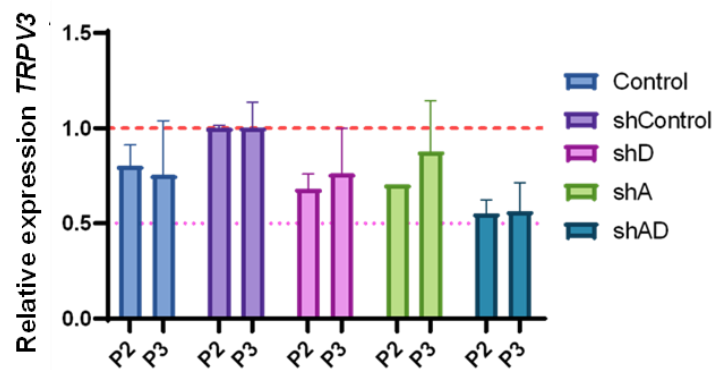


Figure 42 : Transduction shTRPV3 à 100MOI dans des kératinocytes primaires

Analyse par RT-qPCR de l'expression *TRPV3* après 48h de transduction avec le shContrôle, shTRPV3 D, shTRPV3 A à 100 MOI et shA+D à 50 MOI chacun dans des kératinocytes primaires humains. L'expression de *TRPV3* a été normalisée par le gène de ménage *TBP* et *RPL13A*. Les données représentent la moyenne ± SD

-Inhibition pharmacologique

Enfin, puisque les deux approches moléculaires n'étaient pas satisfaisantes, nous nous sommes intéressés à une approche d'inhibition pharmacologique, avec l'utilisation d'antagonistes. Six antagonistes ont été testés sur cellules après stimulation avec le canal TRPV3 (Matériel et Méthodes p73). Cependant, seul le 3,4-Dicaffeoylquinic Acid (Isochlorogenic acid B - IAB) à 100µM a montré un réel effet sur l'inhibition de TRPV3 (**Figure 43** et **Figure 44**). L'IAB n'est spécifique que de TRPV3, sa fixation entraîne un changement de conformation du canal TRPV3, de « opening state » à « close state » rendant le canal insensible à la stimulation au 2-APB ou au carvacrol [194]. Pour être efficace, l'IAB est donc appliqué avant la stimulation du canal. Comme observé précédemment, la stimulation de TRPV3 induit un rétro-contrôle positif sur son expression (**Figure 43 A**). L'inhibition de TRPV3 par l'IAB conduit à un blocage de la sur-expression de *TRPV3* induite par sa stimulation (**Figure 43 A**), sans modifier l'expression de *TRPV1* et *TRPV4* (**Figure 43 B-C**). Par ailleurs, une diminution de l'expression des gènes dépendants de TRPV3 (*IL-1α*, *IL-8*, *IL-6*, *NGF* et *TGF-α*) est également observée en présence de l'IAB (**Figure 44**). Ceci suggère que le traitement à l'IAB permet de bloquer spécifiquement l'activité du canal TRPV3.

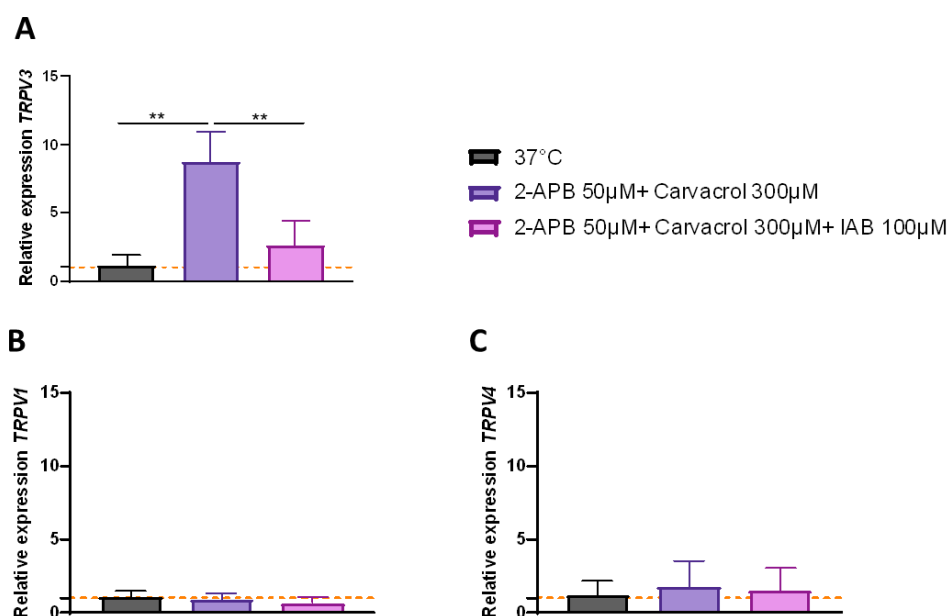


Figure 43 : Effet de l'IAB sur l'expression des TRPV après stimulation de TRPV3

Analyse par RT-qPCR de l'expression relative de (A) *TRPV3*, (B) *TRPV1* et (C) *TRPV4* après stimulation TRPV3 +/- IAB 100µM. L'expression des gènes a été normalisée avec le gène de ménage *TBP*. Une Anova 1 a été réalisée pour comparer les différentes conditions (n=3). Les données représentent la moyenne ± SD.

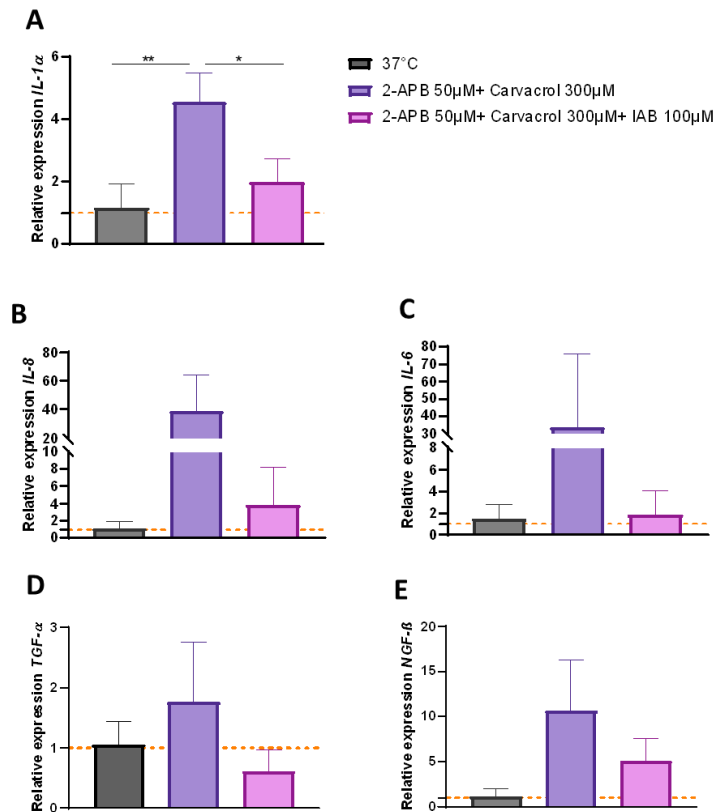


Figure 44 : Expression de médiateurs après stimulation ou inhibition de TRPV3

Analyse par RT-qPCR de l'expression relative de (A) *IL-1α*, (B) *IL-8*, (C) *IL-6*, (D) *TGF-α* et (E) *NGF-β* et après stimulation TRPV3 +/- IAB 100µM. L'expression des gènes a été normalisée avec *TBP*. Une Anova 1 a été réalisée pour comparer les différentes conditions (n=3). Les données représentent la moyenne ± SD.

c) Effet du vieillissement sur l'activité du canal TRPV3

En parallèle des différentes étapes de validation de l'activation de TRPV3, nous avons analysé par imagerie calcique l'activité du canal TRPV3. Dans un premier temps nous avons choisi d'évaluer la réponse de TRPV3 à une concentration suboptimale de carvacrol (100µM), afin d'éviter la saturation du canal, sur des kératinocytes primaires issus d'individus jeunes (moyenne d'âge 33 ans) et âgés (moyenne d'âge 76 ans) en prolifération ou différenciés (Matériels et Méthodes p73) en présence ou non de calcium extracellulaire (1.8mM) (**Figure 45**). La stimulation avec 100 µM de carvacrol (time=0) dans les cellules proliférantes induit une augmentation du flux calcique intracellulaire aussi bien dans les kératinocytes jeunes que âgés, mais uniquement en présence de calcium extracellulaire (1,8mM) (**Figure 45 A**). Ces données suggèrent que le signal calcique intracellulaire provient initialement du milieu extracellulaire, et doit passer la membrane plasmique. Bien que les anticorps TRPV3 ne semblent pas être spécifiques sur tissu humain, nous avons pu montrer en culture 2D, une

expression membranaire de TRPV3 sur des kératinocytes en prolifération (**Figure 45 B**). Ceci coïncide avec les données d'imagerie calcique (**Figure 45 A**). A l'inverse, dans les kératinocytes différenciés la stimulation au carvacrol 100 μ M induit une forte augmentation du flux calcique intracellulaire, notamment en absence de calcium extracellulaire (0mM) (**Figure 45 C**). Par ailleurs, nous avons observé une relocalisation de TRPV3 aux organelles lors de la différenciation (**Figure 45 D**). Ceci suggère que la localisation de TRPV3 aux organelles permet un relargage de calcium par les stores intracellulaires. Toutefois, il ne semble pas y avoir une différence majeure entre la réponse des kératinocytes jeunes et âgés en prolifération ou différenciation. Ces premières données indiquent que (i) la stimulation de TRPV3 par le carvacrol induit un flux calcique intracellulaire, (ii) la différenciation des kératinocytes conduit à une relocalisation de TRPV3 de la membrane plasmique aux organelles, (iii) une stimulation avec une dose suboptimale de carvacrol ne permet de déceler de différence entre kératinocytes jeunes et âgés. En revanche, en présence de 2-APB 50 μ M et carvacrol 300 μ M, nous avons pu montrer un flux calcique intracellulaire significativement plus faible dans les kératinocytes âgés que dans les kératinocytes jeunes (résultats présentés dans l'article). Ces données ont été réalisées sur kératinocytes en prolifération, puisqu'une diminution de *TRPV3* a été observée dans la couche basale de l'épiderme d'individus âgés (cellules progénitrices épidermiques KRT-14⁺) et dans les kératinocytes proliférants issus d'individus âgés (70% confluence) (résultats présentés dans l'article). Néanmoins, il serait intéressant d'analyser l'effet du 2-APB et carvacrol sur des kératinocytes en différenciation.

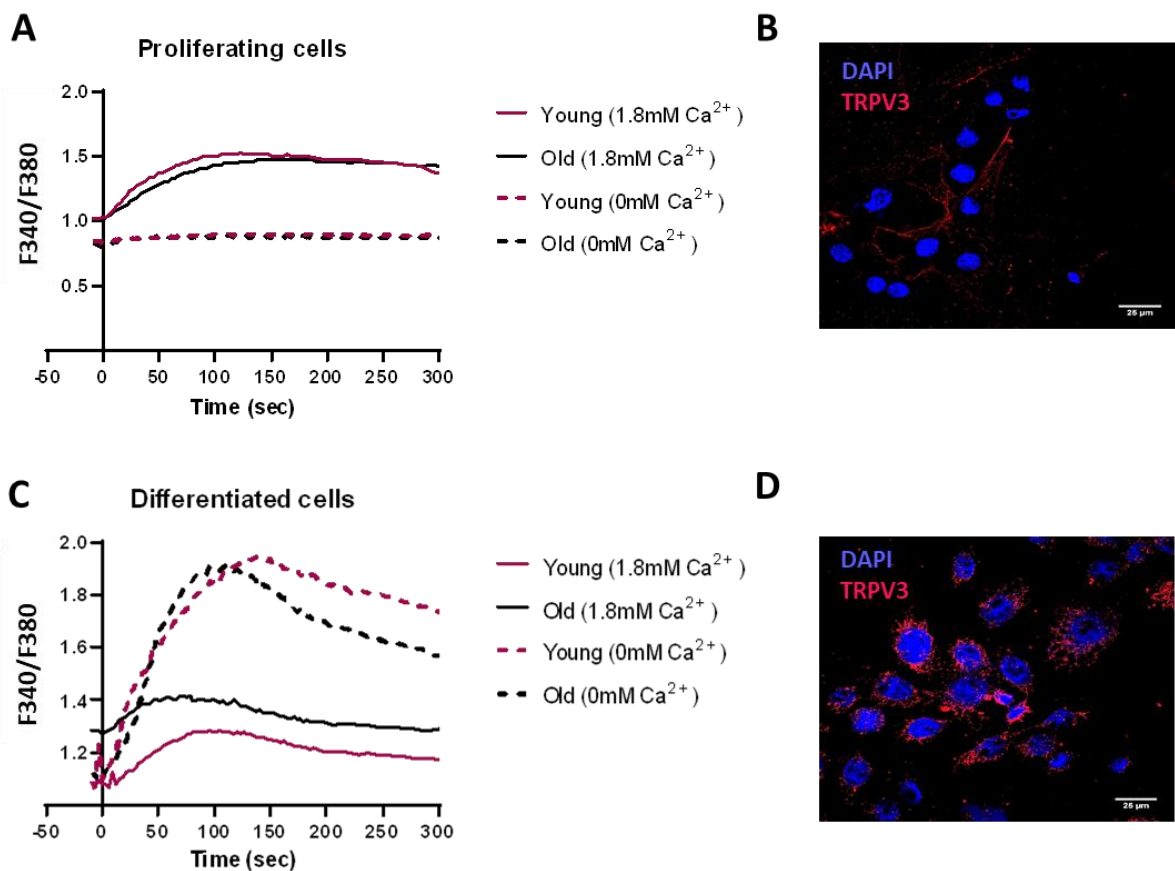


Figure 45 : Analyse du flux calcique intracellulaire après stimulation des kératinocytes primaires humains jeunes et âgés au carvacrol 100μM

Mesure du rapport d'intensité de fluorescence intracellulaire à 340nm (F340) et 380nm (F380) (Fura-2AM) dans les kératinocytes primaires humains jeunes (moyenne d'âge 33 ans) et âgés (moyenne d'âge 76 ans) en prolifération (A-B) ou différenciation (C-D). (A, C) Profil de réponse F340/F380 des kératinocytes stimulés avec du carvacrol 100μM (5 minutes) en présence (ligne pleine) ou non (ligne en pointillée) de 1.8 mM de calcium extracellulaire (courbe moyenne). (B, D) Immunofluorescence de TRPV3 (rouge) sur des kératinocytes proliférants (B) ou différenciés (D).

3) Discussion

Comme observé dans la peau (coussinets) de souris âgées, nous observons la diminution de l'expression de *TRPV3* chez l'être humain *ex vivo* et *in vitro*. Nous avons confirmé la notion de sensibilisation de TRPV3 par le 2-APB et l'activation par le carvacrol, et montré que l'amplitude de réponse des kératinocytes âgés aux agonistes était diminuée comparée aux kératinocytes issus d'individus jeunes. Ces données suggèrent un défaut d'expression et d'activité de TRPV3 au niveau des kératinocytes avec l'âge.

L'analyse génique par hybridation *in situ* et RT-qPCR a mis en évidence une diminution de *TRPV3* dans l'épiderme et dans les kératinocytes d'individus âgés (>70ans). Des mécanismes de régulation post-transcriptionnelles et post-traductionnelles pourraient être à l'origine de la diminution de *TRPV3* avec l'âge [206–208], mais ces derniers sont encore très peu connus et nécessitent d'être davantage étudiés.

Les données d'hybridation *in situ* ont été réalisées sur différents donneurs avec différentes zones anatomiques, dont des zones photo-exposées. La quantification des transcrits *TRPV3* ne semblait pas varier entre les différentes zones anatomiques pour des donneurs du même groupe d'âge. Par ailleurs, des données de RNAseq (The human protein atlas) [209] ont révélé que l'abondance des transcrits *TRPV3* entre peaux non-exposées (604 échantillons) et photo-exposées (701 échantillons) semblait identique, ce qui suggère que l'expression de *TRPV3* est homogène dans la peau de différentes zones anatomiques, et que les UV ne modifient pas le niveau de *TRPV3*. En revanche, nous avons noté que la diminution des transcrits *TRPV3* avec l'âge était significative uniquement dans les cellules exprimant KRT14, correspondant aux cellules proliférantes de la couche basale. Cette couche épidermique est principalement composée de cellules souches, dont l'activité décline avec l'âge [155,210]. Tracer l'expression de *TRPV3* dans les cellules souches épidermiques (CD34⁺, α 6 β 4) nous permettrait de définir si l'altération des cellules souches épidermiques avec l'âge est responsable de la diminution de *TRPV3*.

Le canal *TRPV3*, contrairement aux autres TRPs, est le seul à se sensibiliser après des répétitions de divers stimuli (chaleur ou agonistes) [95,109,115,118,211,212]. Le 2-APB est un agoniste de *TRPV3* qui joue un rôle clé dans le mécanisme de sensibilisation [95,109,211]. Nos données d'imagerie calcique confirment que le 2-APB n'induit pas à lui seul une augmentation de flux calcique intracellulaire, mais potentialise la réponse au carvacrol. L'ajout simultané du 2-APB et du carvacrol induit une augmentation de l'expression de médiateurs connus de *TRPV3* [96,124,125], dont un rétro-contrôle positif sur l'expression de *TRPV3* qui n'a jamais été décrit auparavant.

La capacité de réponse des kératinocytes âgés aux agonistes de *TRPV3* apparaît diminuée comparé aux kératinocytes jeunes. Ceci peut soulever diverses hypothèses dont la notion de sensibilisation affectée par l'âge, ou, plus probable, la diminution du nombre de canaux *TRPV3* qui a un impact direct sur la capacité des kératinocytes à répondre aux stimuli. La diminution de l'activité du canal *TRPV3* pourrait perturber les voies de signalisations et médiateurs, et donc à terme altérer la fonction de *TRPV3* en tant que thermo-senseur et régulateur du tonus vasculaire, notamment dans le contexte du vieillissement.

– Identification et évolution des médiateurs dépendants de TRPV3 avec l'âge

Nous avons précédemment montré que le vieillissement conduisait à une diminution des transcrits *TRPV3* (*ex vivo* et *in vitro*), ainsi qu'à une baisse de son activité. Nous avons donc supposé que le vieillissement pourrait également altérer la signalisation et la communication TRPV3-dépendante dans des kératinocytes âgés et donc perturber la réponse vasculaire face à la chaleur. Nous avons également montré par technique Luminex et RT-qPCR que la voie TRPV3/TGF α /EGFR/NF κ B n'était pas affectée par l'âge. Cependant, nos résultats ont indiqué que le vieillissement altère la libération directe d'ATP après stimulation de TRPV3, et pourrait perturber la communication ou signalisation cellulaire. Les résultats présentés dans cette partie 3 sont complémentaires à l'article scientifique.

1) Sécrétome des kératinocytes (Analyse 16plex MS/MS)

Afin d'obtenir une vue globale de l'effet du vieillissement sur le sécrétome des kératinocytes primaires humains en culture 2D, nous avons réalisé une analyse par spectrométrie de masse du surnageant des kératinocytes jeunes et âgés avec (stimulated) ou sans stimulation (unstimulated) pour le canal TRPV3 (**Figure 46 et 47**). Les kératinocytes primaires humains ont été traités ou non avec du 2-APB 50 μ M et du carvacrol 300 μ M pendant 24h à 37°C, puis le surnageant de culture a été analysé par spectrométrie de masse (MS/MS). Nous avons identifié 1040 protéines totales dans le surnageant des kératinocytes jeunes et âgés confondus (avec et sans stimulation de TRPV3). A l'état basal (70% confluence, non traité), le sécrétome des kératinocytes jeunes et âgés ne semble pas fondamentalement différent (**Figure 46 A**). Bien que peu de protéines soient différentiellement exprimées entre les deux groupes d'âge, la surexpression de IGS15 (Protéine de type ubiquitine ISG15) et LGALS1 (Galectine-1) (Log2 Fold change, P-value ajustée <0.05) avec l'âge semble être en accord avec la littérature concernant d'autres types cellulaires de la peau. En effet, IGS15 est retrouvé surexprimé dans les fibroblastes d'individus âgés, et il est notamment associé au raccourcissement des télomères [213]. L'augmentation de son expression contribue à l'inflammation chronique de bas grade observé chez les individus âgés [151,213]. LGALS1 est également surexprimé par les fibroblastes âgés, mais aussi dans divers tissus d'individus âgés (sang, cerveau, foie) [214,215]. L'augmentation de son expression avec l'âge est associée à la sénescence et au processus inflammatoire [214]. De manière intéressante, la stimulation de TRPV3 ne modifie pas les protéines différentiellement exprimées entre les deux groupes d'âge (**Figure 46 B**).

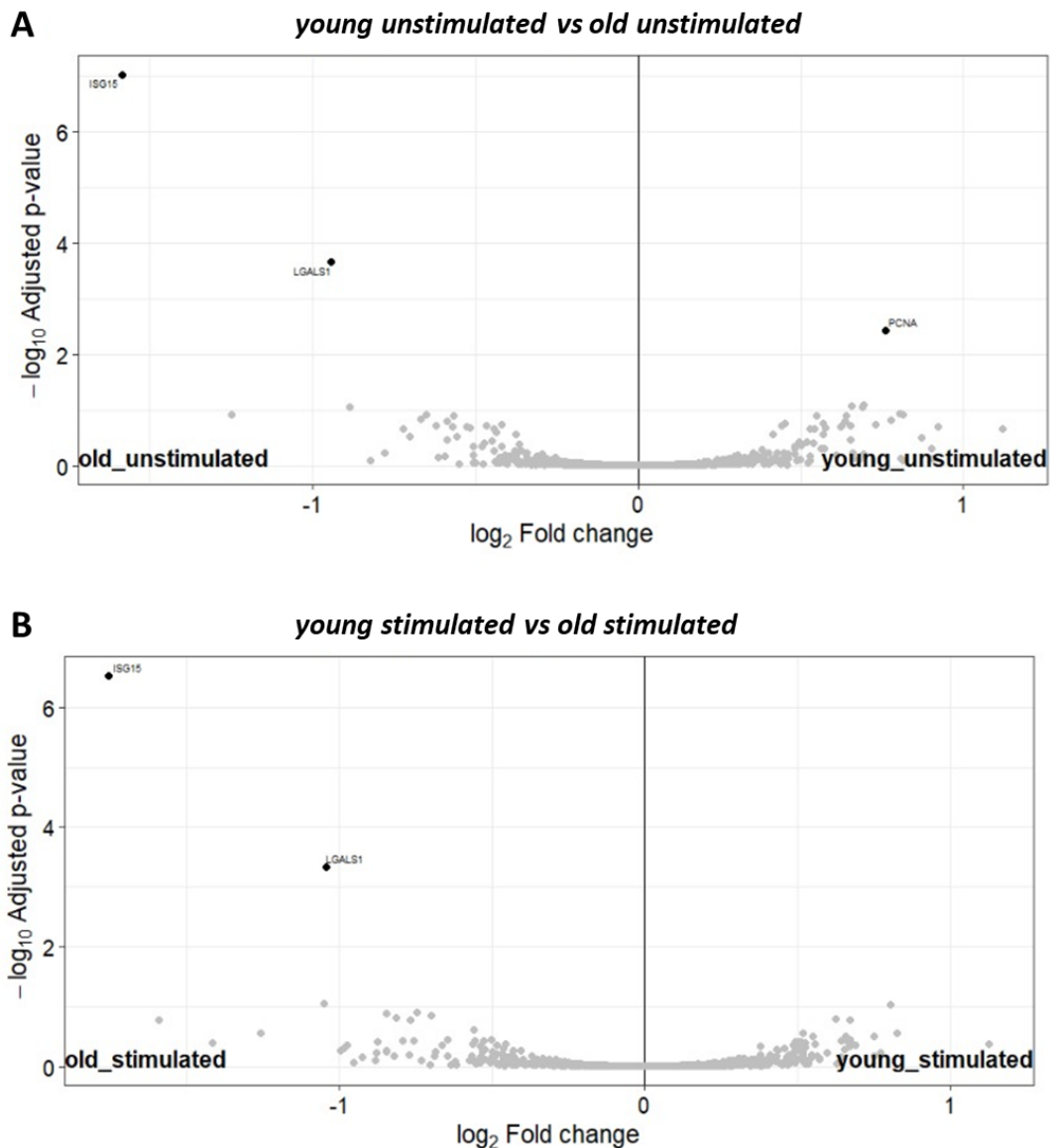


Figure 46 : Protéines différenciellement sécrétées par les kératinocytes jeunes et âgés

Protéines différenciellement sécrétées par les kératinocytes jeunes (young) et âgés (old) (A) non stimulés (unstimulated), ou (B) stimulés (stimulated) pour le canal TRPV3 pendant 24H. Log2 Fold change et p-value ajustée <0.05. Jeunes (n=4 ; moyenne d'âge 34,3 ans) et âgés (n=4 ; moyenne d'âge 81,8 ans)

La stimulation de TRPV3 semble sous-réguler 26 protéines dans les kératinocytes jeunes (**Figure 47 A**) et plus de 50 protéines dans les kératinocytes âgés (**Figure 47 B**) par rapport à leur condition non stimulée respective. Cependant la stimulation de TRPV3 ne semble pas conduire à une surexpression de protéines par rapport au contrôle non stimulé dans les deux groupes d'âge (**Figure 47 A et B**).

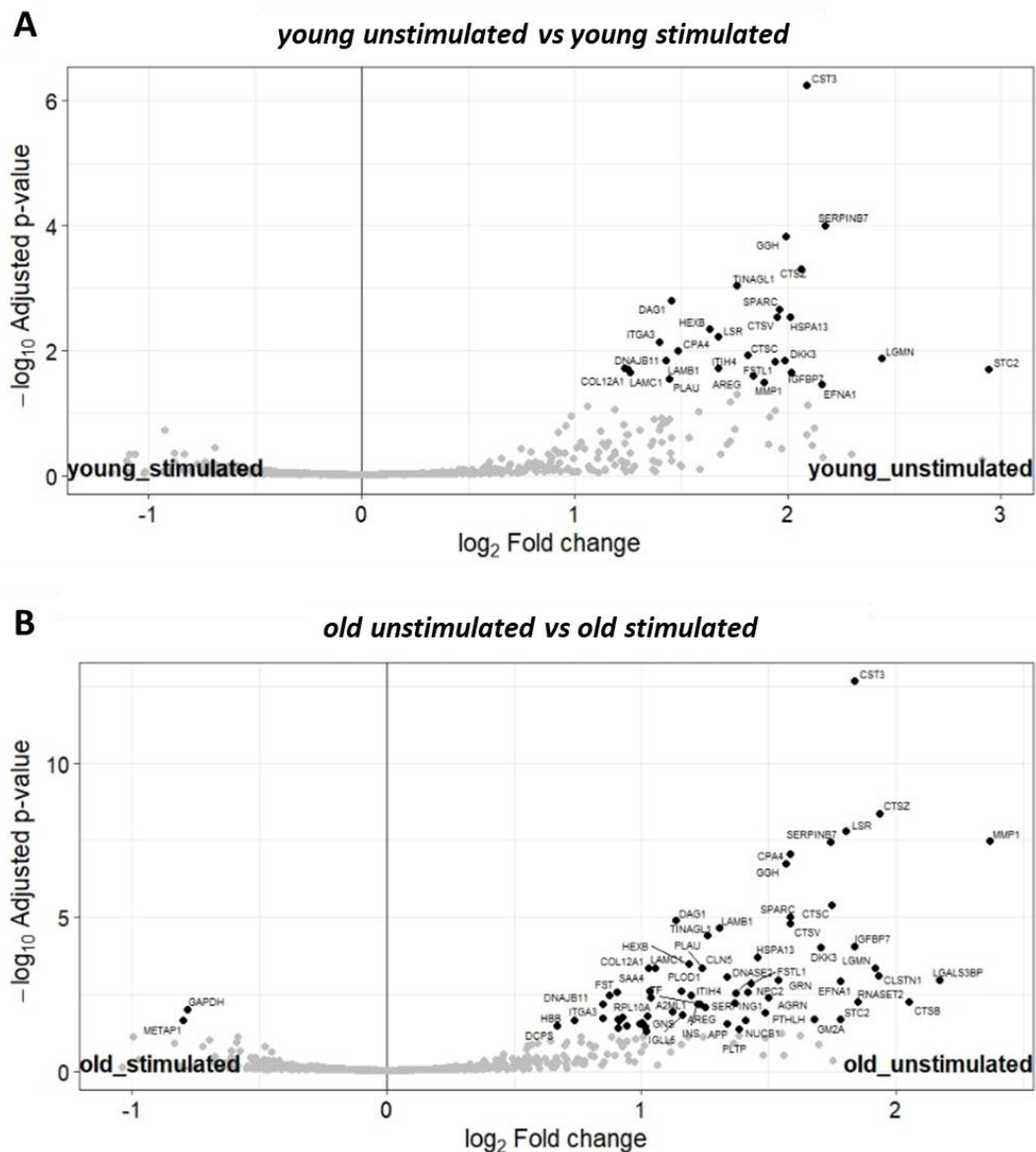


Figure 47 : Protéines différenciellement sécrétées après stimulation du canal TRPV3 par les kératinocytes jeunes et âgés

Protéines différenciellement sécrétées par les kératinocytes jeunes (young) (A) ou âgés (B) non stimulés (unstimulated) pour le canal TRPV3 par rapport à la condition stimulée (stimulated). Log₂ Fold change et p-value ajustée <0.05. Jeunes (n=4 ; moyenne d'âge 34,3 ans) et âgés (n=4 ; moyenne d'âge 81,8 ans)

2) ELISA Multiplex

Nous avons paramétré un test ELISA ciblant 17 protéines dont le EGF, FGF-2, FGF-21, INF α , INF β , INF γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-23, IL-29, NGF- β , TGF- α , VEGF-A et le VEGF-D. Après 16H de traitement (contrôle ; 2-APB 50 μ M + carvacrol 300 μ M +/- IAB 100 μ M), seulement 7 médiateurs ont pu être détectés dans le surnageant de kératinocytes jeunes et âgés (**Figure 48**). Nous avons observé une libération de TGF- α , FGF-2, IL-1 β , IL-1 α , 2, IL-

6 et IL-8 après stimulation de TRPV3 par rapport au contrôle dans les deux groupes d'âge. L'inhibition de TRPV3 par l'IAB diminue de manière significative la production de TGF- α et de FGF-2 (uniquement chez les kératinocytes jeunes). De manière générale, l'activation de TRPV3 induit la production de médiateurs pro-inflammatoires, et médiateurs impliqués dans la prolifération, l'angiogenèse et la cicatrisation tel que le FGF-2 [216]. Comme observé lors de l'analyse du sécrétome par spectrométrie de masse, l'âge ne semble pas modifier la quantité de médiateurs libérés.

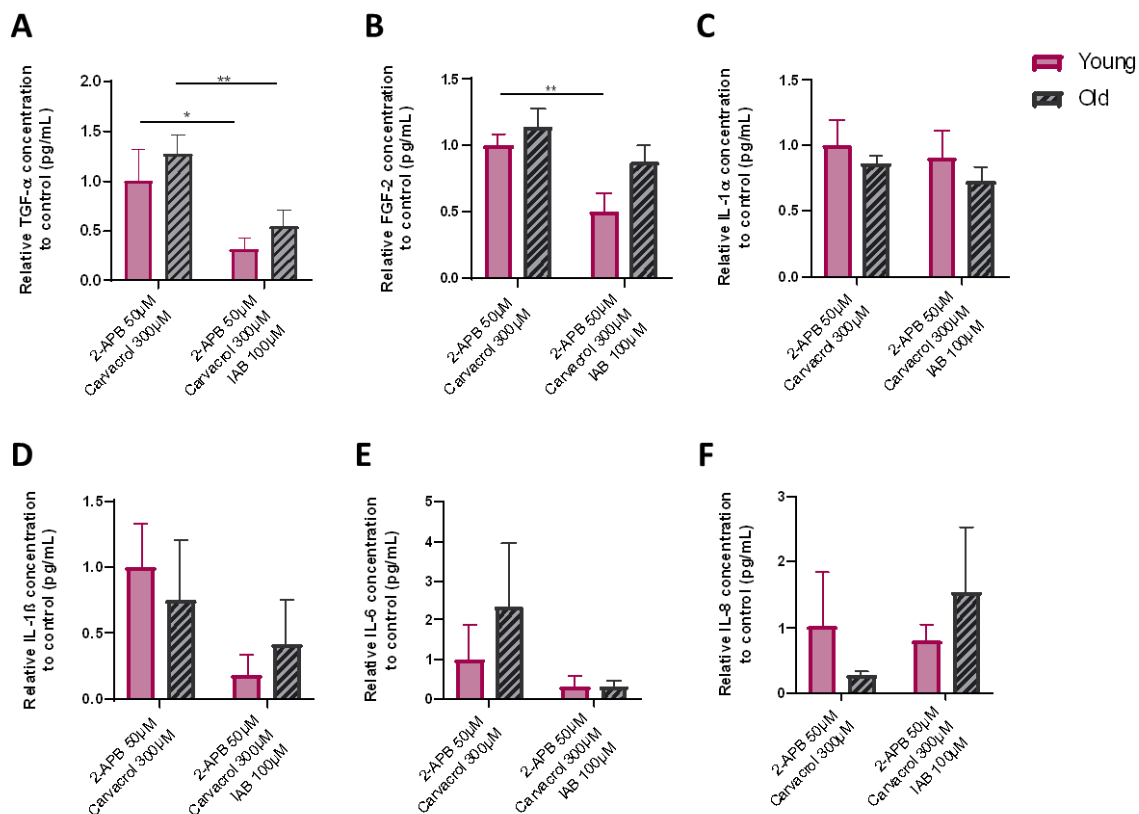


Figure 48 : Médiateurs libérés après stimulation du canal TRPV3 dans les kératinocytes jeunes ou âgés

Analyse par ELISA Multiplex, après 16H de stimulation de TRPV3 (2-APB 50 μ M + carvacrol 300 μ M +/- IAB 100 μ M), de la concentration relative de (A) TGF- α , (B) FGF-2, (C) IL-1 β , (D) IL-1 α , (E) IL-6 et (F) IL-8 par rapport au contrôle (37°C) dans les surnageants de kératinocytes jeunes (rose) et âgés (gris). Les résultats sont exprimés par rapport à la condition jeune stimulé (1). Une Anova 2 a été réalisée pour évaluer l'effet de l'âge et de la stimulation. n=5/groupe (moyenne d'âge groupe jeune : 32,6 ans ; moyenne d'âge groupe âgés : 82 ans). Les données représentent la moyenne \pm SEM.

3) RT-qPCR des gènes pro-inflammatoires

Dans l'article scientifique nous avons montré que la stimulation de TRPV3 promouvait l'induction de gènes pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8 et NGF- β) après 6H de

stimulation dans les deux groupes d'âge. En parallèle, nous avons également révélé qu'une stimulation thermique (33°C) couplée à une stimulation pharmacologique (2-APB 50µM) (Matériels et Méthodes p72) conduisait à une augmentation de gènes pro-inflammatoires (*IL-1α*, *IL-6*, *IL-8* et *NGF-β*), et une diminution de ces gènes en présence de l'IAB (**Figure 49**). Pour ces deux types de stimulations, nous n'avons, en revanche, pas observé d'effet de l'âge sur le niveau d'expression des gènes. De manière intéressante, la stimulation de TRPV3, notamment dans les kératinocytes âgés, induit un rétrocontrôle positif sur son expression par rapport au contrôle (**Figure 50**).

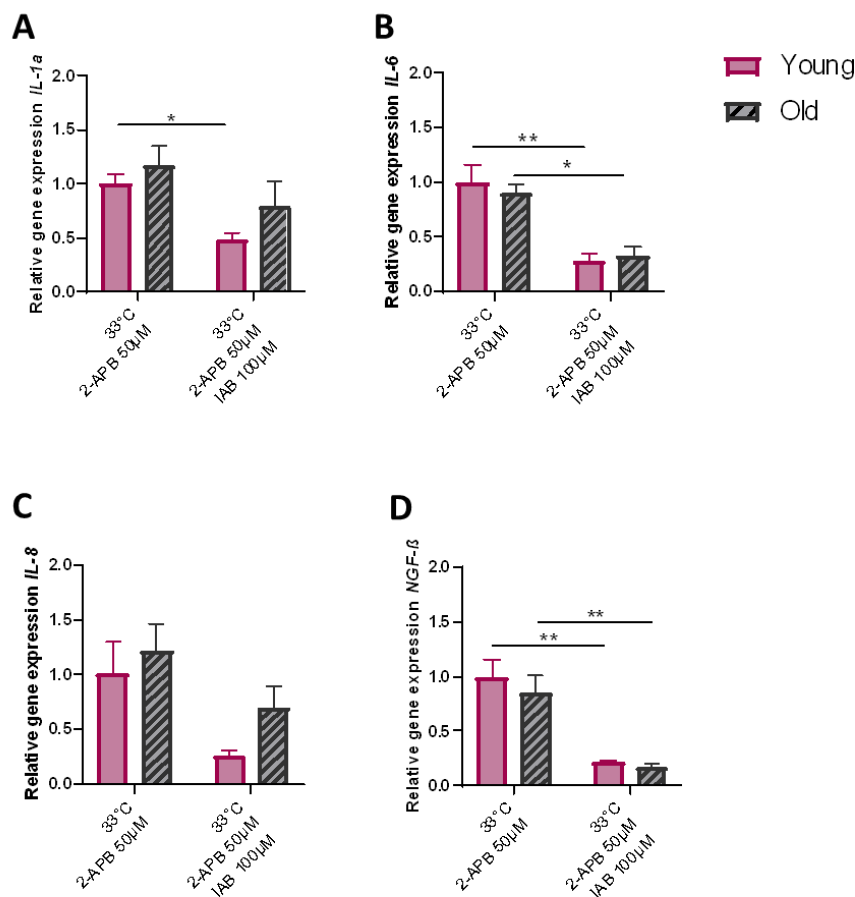


Figure 49 : Gènes exprimés après stimulation thermique et pharmacologique du canal TRPV3 dans les kératinocytes jeunes et âgés

Analyse par RT-qPCR, après 6H de stimulation (33°C + 2-APB50µM +/- IAB 100µM), de l'expression relative de (A) *IL-1α*, (B) *IL-6*, (C) *IL-8*, (D) *NGFβ* rapport au contrôle (37°C) dans les kératinocytes jeunes (rose) et âgés (gris). (A-D). Les résultats sont exprimés par rapport au contrôle jeune (1). Une Anova 2 a été réalisée pour évaluer l'effet de l'âge et de la stimulation. n=5/groupe (moyenne d'âge groupe jeunes : 32,6 ans ; moyenne d'âge groupe âgés : 82 ans). Les données représentent la moyenne ± SEM.

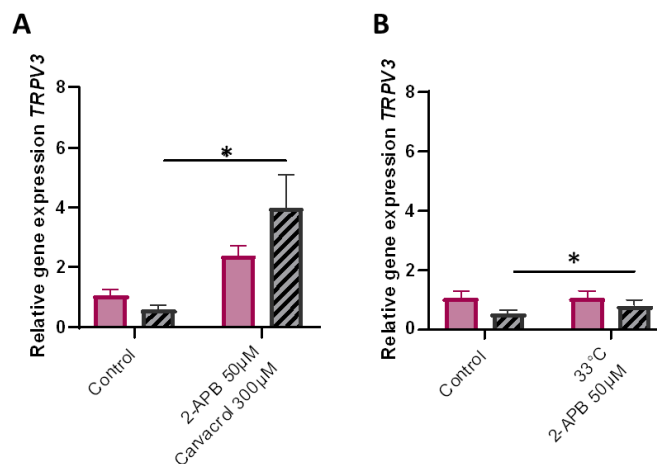


Figure 50 : Expression de TRPV3 après stimulation pharmacologique et/ou thermique

Analyse par RT-qPCR de l'expression de *TRPV3* après 6H de stimulation avec (A) le 2-APB50µM + carvacrol 300µM ou (B) 2-APB 50µM +33°C dans les kératinocytes jeunes (rose) et âgés (gris). Les résultats sont exprimés par rapport à la condition contrôle jeune (1). Une Anova 2 a été réalisée pour évaluer l'effet de l'âge et de la stimulation. n=5/groupe (moyenne d'âge groupe jeunes : 32,6 ans ; moyenne d'âge groupe âgés : 82 ans). Les données représentent la moyenne ± SEM.

4) Discussion

Par le biais de diverses approches, nous avons observé que le vieillissement n'avait pas d'effet sur la signalisation et médiateurs dépendants de l'activation de TRPV3, à l'exception de l'ATP dont la libération était altérée dans les kératinocytes âgés. Ces données suggèrent que le vieillissement pourrait impacter certaines voies de signalisations/communications cellulaires, et donc perturber des processus biologiques comme les mécanismes de thermorégulation vasculaire cutanée.

Notre analyse par spectrométrie de masse nous a permis d'obtenir le premier sécrétome de l'effet de l'âge sur les kératinocytes primaires humains en culture 2D, et l'effet de la stimulation TRPV3. Ces premières analyses réalisées sur 4 souches issues d'individus jeunes et 4 souches d'individus âgés suggèrent que le vieillissement ne modifie pas le sécrétome des kératinocytes en culture. Les résultats concernant ISG15 et LGALS1, dont l'expression était augmentée avec l'âge, nous permettent de valider que le phénotype « âgé » des kératinocytes issus de donneurs âgés était conservé [213–215]. De manière intéressante, les kératinocytes jeunes non traités secrètent de manière plus importante PCNA par rapport aux kératinocytes âgés non traités. PCNA est un marqueur de prolifération qui diminue lors de la différenciation des kératinocytes [217]. De plus, au cours du vieillissement l'expression de PCNA diminue, et est donc en accord avec nos données de spectrométrie de masse [218]. Cependant PCNA est un marqueur

intracellulaire, il est donc surprenant de retrouver cette protéine dans le surnageant de kératinocytes. Une récente étude a mis en évidence que les vésicules extracellulaires de cellules souches mésenchymateuses néonatales contenaient des facteurs anti-âges, en particulier PCNA, capables de limiter la dégénération de certains tissus (os et rein) avec l'âge [219]. De manière intéressante nous avons identifié des protéines associées aux vésicules extracellulaires dans le sécrétome des kératinocytes, telles que des tétraspanines (CD9, CD81), des protéines chaperonnes (HSP70), des protéines de la famille Rab (Rab 11), RAPB1, ALIX (PDCD6IP), l'annexine XI, et actinine 4 [220]. Ainsi, les kératinocytes pourraient communiquer avec d'autres cellules au travers de vésicules extracellulaires. Cependant, l'âge ne semble pas avoir d'effet sur les médiateurs sécrétés par la stimulation de TRPV3. Nos données d'ELISA et de RT-qPCR ont confirmé l'induction de la voie TGF α /EGFR/NF κ B [96,124,125] après stimulation de TRPV3 (pharmacologique et/ou thermique). La stimulation thermique étant réalisée à la température seuil d'activation de TRPV3 (33°C) [99,103], les médiateurs induits semblent donc bien dépendants de TRPV3. Cependant, comme précisé précédemment, l'âge ne semble pas modifier le niveau d'expression des médiateurs (protéines et gènes). Il serait intéressant d'analyser les protéines sécrétées sous l'effet de la stimulation thermique et pharmacologique, afin de se rapprocher du contexte de la thermo-détection.

D'après les résultats obtenus par ELISA multiplex, très peu de cytokines et facteurs étaient induits 16h après stimulation de TRPV3. Il est possible que l'induction de ces médiateurs soit plus précoce (30 min, 6h ou 12h) [96,124]. Il serait alors intéressant de réaliser une cinétique afin de définir de meilleures conditions de stimulation et de sécrétion des médiateurs.

Toutefois, de par la nature des médiateurs libérés, le kératinocyte pourrait transduire les stimuli environnementaux aux fibres nerveuses sensorielles intra-épidermiques, mais également directement aux micro-vaisseaux dermiques pour moduler le tonus vasculaire.

Approfondir notre étude sur les médiateurs relargués, et évaluer l'effet de ces derniers sur la communication kératinocytes/neurones ou kératinocytes/micro-vaisseaux dermiques permettrait de définir comment les kératinocytes via TRPV3 sont impliqués dans les mécanismes de thermorégulation vasculaire cutanée, et comment ce processus évolue avec l'âge. La précédente étude, menée par B. Fromy, a révélé que la réponse vasculaire cutanée médiée par TRPV3 nécessitait l'implication des terminaisons nerveuses peptidergiques (pour la libération de CGRP), et des cellules endothéliales (pour la libération de NO). Nos données suggèrent que l'ATP pourrait être également un acteur de la réponse au chauffage local. Ainsi, évaluer la place de l'ATP dans la cascade TRPV3/CGRP/NO, en réponse à la chaleur, nécessite d'être exploré.

Discussion

Discussion

– La thermorégulation vasculaire cutanée au cours du vieillissement

Sur le plan vasculaire, il est classiquement rapporté que le vieillissement est associé à l'installation d'une dysfonction endothéliale marquée par une baisse de l'activité de la eNOS et de la biodisponibilité du NO [175,176]. Ainsi, de nombreuses études montrent que la réponse vasculaire à l'ACh fortement dépendante du NO est significativement abaissée chez l'être humain (>50-70 ans) [180] et chez la souris très âgée (C57BL6 de 25 mois) [88]. Dans notre étude, les souris âgées de 22 mois ne présentaient pas de défaut de vasodilatation à l'ACh. En absence de défaut fonctionnel des cellules musculaires lisses vasculaires (réponse SNP préservée chez les souris âgées), ces résultats montrent une absence de dysfonction endothéliale. Par ailleurs, les pourcentages de réponse à l'ACh ne sont significativement pas différents entre les jeunes mâles et femelles (55% et 59% respectivement), ni entre les mâles et femelles âgés (51% et 60% respectivement), ce qui suggère qu'il n'y a pas d'effet sexe sur la réponse à l'ACh.

Avec l'âge, la diminution de la voie du NO et des PG est en partie compensée par l'EDHF [88], or nous n'avons pas utilisé d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques pour étudier la contribution des différents facteurs endothéliaux vasodilatateurs chez les souris jeunes et âgées. Ainsi, dans notre étude, nous n'avons pas connaissance de l'évolution et de la contribution de ces facteurs dans la réponse à l'ACh avec l'âge. Nous avons récemment montré que le rat Brown Norway, considéré comme un modèle « healthy aging » avec une activité physique naturellement soutenue, ne présentait pas non plus de défaut de réponse à l'ACh jusqu'à au moins 24 mois, et conservait la voie du NO à ce stade de vieillissement [181]. A l'inverse, le rat Wistar « poorly aging » présentait une dysfonction endothéliale dès 12 mois, associée à une altération de la voie du NO [181]. Chez l'être humain, DeSouza et al ont démontré que la pratique d'une activité physique régulière restaurait la vasodilatation induite par l'ACh chez des individus âgés (>60 ans) [222], ce qui est en accord avec nos résultats chez le rat Brown Norway.

La fonction endothéliale peut être évaluée avec d'autres substances pharmacologiques que l'ACh, comme la bradykinine, la substance P ou encore l'isoprotérénol. En effet, la bradykinine active la même voie des phospholipase C-phosphatidylinositol-Ca²⁺ que l'ACh mais utilise les récepteurs β_2 kininergiques couplés à une protéine G [223]. La substance P partage la même voie de signalisation de la protéine G que l'ACh mais agit par l'intermédiaire des récepteurs de la tachykinine à la surface des cellules endothéliales [224]. L'isoprotérénol,

Discussion

un agoniste des récepteurs β -adrénergiques, induit une vasorelaxation, en partie en activant la voie de l'adénylyl cyclase, ce qui entraîne l'activation de l'eNOS par l'AMPC (adénosine monophosphate cyclique) [225]. Comme les réponses à l'acétylcholine, les réponses vasodilatatrices à la bradykinine, à la substance P et à l'isoprotérénol ont été significativement atténuées par l'inhibiteur de la NG-monométhyl-L-arginine (L-NMMA), confirmant leur dépendance mutuelle vis-à-vis de la libération de NO [226–229]. Bien que la vasodilatation induite par l'acétylcholine soit altérée avec l'âge, la vasodilatation endothéliale (avant-bras) en réponse à la bradykinine, à la substance P et à l'isoprotérénol était préservée chez l'être humain [180]. Ces résultats suggèrent que la dysfonction endothéliale évaluée avec l'ACh (communément utilisée dans la littérature) peut s'expliquer par un défaut spécifique de la voie muscarinique plutôt qu'à une altération des cellules endothéliales. De plus, l'installation progressive du vieillissement participe à la dysfonction endothéliale qui est influencée par de nombreux autres facteurs (diminution de l'activité, augmentation des EROs ...), induisant une hétérogénéité dans l'âge d'apparition de la dysfonction endothéliale. Ainsi, la vasodilatation dépendante de l'endothélium n'est pas universellement altérée avec l'âge.

Nos données indiquent que les capacités de vasodilatation en réponse à un chauffage local sont diminuées chez les souris âgées de manière similaire entre les mâles et les femelles, et en accord avec la diminution de *Trpv3* dans les deux sexes. En revanche, contrairement au chauffage local, la diminution des capacités de thermorégulation en réponse à un chauffage global apparaît plus marquée chez les mâles âgés alors que la réponse à l'ACh et la diminution de *Trpv3* au niveau des coussinets semblent similaire entre les mâles et les femelles. Ceci suscite plusieurs hypothèses.

Les hormones féminines, notamment œstrogènes, ont montré un effet protecteur vis-à-vis des stress oxydants au niveau des artères coronaires, assurant donc le maintien du NO et de la fonction endothéliale [177,178]. Contrairement aux femmes, dont la ménopause conduit à une chute drastique d'œstrogènes, les souris maintiennent leur capacité de reproduction tout au long de leur vie et ne connaissent pas de ménopause naturelle [230]. Cependant, l'administration journalière d'œstrogènes à des souris âgées (22 mois) avec ovariectomie, restaure et améliore la réponse vasodilatatrice en réponse à une pression (cmH₂O) comparé aux souris sans ovariectomie [177], ce qui suggère un effet dose-dépendant des œstrogènes sur la vasodilatation chez les souris âgées. Les hormones féminines peuvent réguler le processus de dissipation de la chaleur, mais les mécanismes sous-jacents sont encore inconnus. L'augmentation des œstrogènes circulant favorise la dissipation de chaleur par vasodilatation, de manière endothélium-dépendant, et la sudation [231,232]. En phase lutéale, la progestérone

Discussion

augmenterait la température centrale (+0,2-0,5°C), déplaçant ainsi la zone thermoneutralité, ce qui par conséquence augmente la sensibilité à la chaleur chez les femmes et souris femelles [231,233]. Cette diminution du seuil de détection à la chaleur est fortement corrélée à la corpulence des femmes (taille et poids) [233,234] Ainsi, les femmes seraient capables de s'adapter aux chaleurs environnementales et de répondre plus rapidement que les hommes. Nos données révèlent que les mécanismes de dissipation de chaleur semblent différents entre les jeunes mâles et les jeunes femelles lors d'une exposition à 33°C. Cependant, dans notre modèle, l'âge ne semble pas modifier les capacités d'adaptation à la chaleur chez les femelles contrairement aux mâles. Ce qui peut être très probablement expliqué par un effet hormonal.

La dissipation de chaleur fait également intervenir les glandes sudoripares. Chez la souris, les glandes sudoripares sont présentes uniquement au niveau des coussinets [235–237]. L'activité et la densité de ces glandes diminuent avec l'âge aussi bien chez l'humain [188] que chez le rongeur [237]. Cependant, la sécrétion de sueur, chez la souris, n'a été montrée qu'après stimulation avec un agoniste des récepteurs muscariniques M3, la pilocarpine [235–238]. Nous ne savons donc pas si une augmentation de la température corporelle active les glandes sudoripares, et si tel est le cas, quel est le seuil d'activation de ces glandes chez les souris ? Existe-t-il une différence entre les mâles et les femelles ? De plus, lors de nos chauffages passifs du corps entier (33-40°C), les coussinets de souris jeunes, âgées et *Trpv3*-KO ne semblaient pas humides, suggérant que seuil d'activation de ces glandes n'était pas atteint, ou que les souris ne sécrètent pas de sueurs en réponse à la chaleur.

Contrairement aux vieux mâles, la température interne des femelles âgées, lors du chauffage global, n'est pas différente des souris jeunes, suggérant un effet limité du vieillissement sur les capacités de thermorégulation chez les femelles. La diminution des transcrits *Trpv3* a été observée dans les deux sexes. Bien que la fonction vasculaire et les tests sensoriels ne semblent pas varier entre les sexes chez la souris au cours du vieillissement, plusieurs hypothèses peuvent être soulevées : Est-ce que la contribution du canal TRPV3 dans les mécanismes de thermorégulation est moindre chez les femelles âgées, mais pas chez les mâles qui restent hautement dépendants de son activité ? Est-ce que les femelles exploitent d'autres thermo-senseurs internes ? Les thermorécepteurs périphériques cutanés (TRPV1), ou de la zone pré-optique hypothalamique (TRPM2) pourraient effectivement avoir une activité plus élevée chez les femelles, et maintenue avec l'âge [69,76,80]. Par exemple, le 17 β -œstradiol, une hormone féminine, augmente l'activité de TRPV1 dans les cellules HeLa [239]. Par ailleurs, la fixation des œstrogènes à la surface de DRG promeut l'expression de TRPV1 et augmente la sensibilité à la douleur. Cependant ce mécanisme semble dépendre du temps

Discussion

d'exposition aux œstrogènes, et des voies de signalisation impliquées [240]. La fixation des œstrogènes sur leur récepteurs ou sur le récepteur couplé à la protéine G30 (GR30) augmente l'expression ou potentialise l'activation de TRPV1 respectivement [240]. A l'inverse les œstrogènes inhibent le récepteur kinase A de la tropomyosine (TrkA) , un récepteur de haute affinité pour le NGF qui participe à la sensibilisation de TRPV1 [241], ce qui en conséquence diminue l'activité de TRPV1 [240].

La différence de dissipation de chaleur entre les mâles et les femelles avec l'âge semble être plus associée à un effet hormonal qui favorise la vasodilatation et augmente la sensibilité à la chaleur. Des études complémentaires nécessitent d'être réalisées en vue de caractériser l'effet du sexe et de l'âge sur de potentiels mécanismes de compensation de TRPV3 (par TRPV4 ou TRPV1) et sur les thermo-senseurs impliqués dans les mécanismes de thermorégulation centrale.

Discussion

– Mécanismes de régulation de l'expression de TRPV3 dans les kératinocytes

Au cours de notre étude nous avons montré que le vieillissement conduisait à une réduction des transcrits *TRPV3* au niveau des kératinocytes indépendamment du sexe (*in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*), ce qui peut donc sous-entendre la mise en place de mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de *TRPV3* avec l'âge [206–208,242]. La protéine Np63 est un régulateur transcriptionnel de la famille p53 [27], impliqué dans la balance prolifération/différenciation des kératinocytes [27,197,198]. Les souris déficientes pour Np63 présentent un défaut de stratification de l'épiderme, associé à une augmentation de marqueurs de sénescence (SA- β -gal, p16^{INK4a}) favorisant donc un vieillissement prématuré [27,198]. McDade et al, ont mis en évidence que l'application d'un stress génotoxique (cisplatine et adriamycine) sur des kératinocytes primaires humains conduisait à l'expression du gène *TRPV3* par fixation de p63 sur la région promotrice de *TRPV3* [206], ce qui souligne que Np63 peut activer la transcription de *TRPV3*. Or, puisqu'il a été décrit la perte progressive Np63 dans les cellules épidermiques avec l'âge [197,198], ceci pourrait expliquer, au moins en partie, la diminution des transcrits *TRPV3* que nous avons décrite dans cette thèse. Outre les facteurs de transcription, les miRNA agissent également au niveau post-transcriptionnel et sont impliqués dans les processus liés au vieillissement [163,164]. Divers miRNA tels que *mir-203*, *mir-181-5p*, *mir-128-3p*, *mir-101-3p* et *mir-27-3p* sont susceptibles de s'apparier à l'extrémité 3'UTR de *TRPV3* et pourraient donc participer à sa régulation au cours du vieillissement (https://www.targetscan.org/vert_80/, release 8.0, septembre 2021). De manière intéressante, une précédente étude menée au laboratoire a montré que l'expression du *mir-181* est augmentée dans les kératinocytes au cours du vieillissement [243]. Ainsi l'implication de *mir-181* dans la régulation post-transcriptionnelle de *TRPV3* nécessite d'être davantage étudiée.

Si la diminution de la réponse *TRPV3* avec l'âge peut être liée à l'altération de son expression génique, la modulation de son activité peut également être associée à des modifications post-traductionnelles. En effet, l'hydroxylation de *TRPV3* sur le résidu N242 altère le courant dépendant de *TRPV3* dans les cellules HEK (lignée embryonnaire de rein humain) [208,244]. Karttunen et al, ont suggéré que cette hydroxylation pourrait déstabiliser l'assemblage de l'hétérotétramère ou les interactions avec d'autres partenaires protéiques qui peuvent moduler l'ouverture du canal ou son adressage à la membrane plasmique [208]. A l'inverse, la phosphorylation peut être associée à une potentialisation de l'activité des canaux *TRPV*. Par exemple, il est connu que la phosphorylation de *TRPV1* par la protéine kinase C

Discussion

(PKC), la PKA, ou la kinase II dépendante de la calmoduline (CaMKII), potentialise l'activation du canal par la capsaïcine et la chaleur [241,245,246]. La phosphorylation de TRPV4 par la kinase c-Src, dans un contexte hypotonique, est nécessaire à l'ouverture du canal [247]. De manière intéressante la phosphorylation de TRPV3 en T264 par ERK favorise l'activation au 2-APB, et potentialise la réponse à l'EGF [248]. En effet, la stimulation de TRPV3 conduit à l'activation de la voie EGFR/TGF- α et la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positive TRPV3/EGFR/TGF- α [124,125]. Ainsi, une diminution de l'activité des certaines kinases, incluant ERK, au cours du vieillissement, pourrait également être une cause de la baisse d'activité de TRPV3. Néanmoins, la régulation de l'expression de TRPV3 et ses modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles restent peu connues, et constitueraient une étude complémentaire prometteuse.

Comme précisé précédemment, la stimulation de TRPV3 active la voie de l'EGFR/TGF- α [124], qui peut induire la libération de médiateurs pro-inflammatoires via NF κ B [96], promouvoir la prolifération des kératinocytes [125], et sensibiliser TRPV3. En effet, l'erlotinib, un antagoniste de l'EGFR, permet d'améliorer les symptômes (kératodermie palmoplantaire) de patients souffrants de mutations gain de fonction de TRPV3, retrouvées dans le syndrome d'Olmsted [249]. Ces patients présentent également une forte expression de ERK [249], qui renforcerait donc l'activation de TRPV3 par phosphorylation [248]. Ces données confirment l'importance de la communication entre l'EGFR et TRPV3. Nous avons montré, pour la première fois, que la stimulation de TRPV3 (notamment par des agonistes pharmacologiques) induisait un rétrocontrôle positif sur son expression (génique). Le canal TRPV3 étant le seul canal à se sensibiliser après des stimulations répétées [109], la boucle de rétrocontrôle positive sur l'activation de TRPV3 apparait nécessaire pour amplifier la réponse, mais l'augmentation de son expression reste encore peu comprise. Est-ce pour palier à une saturation ou recyclage de TRPV3 après stimulation ? Li et al ont révélé que l'expression membranaire de TRPV3 était régulée par SNX11, une protéine de la famille des Sorting Nexin [250]. Cette dernière assure le contrôle de la densité de TRPV3 à la membrane plasmique par voie endosomale. Cependant, dans quelles conditions ce mécanisme de transport/dégradation se met en place reste énigmatique et nécessite d'être d'avantage étudié.

Les kératinocytes issus de patients Olmsted présentent un influx calcique basal bien plus important que des kératinocytes issus d'individus sains (McGrath et al, présentation poster pour le congrès de la Société européenne de recherche dermatologique (ESDR) 2022). Par ailleurs, les mutations gain de fonction G573C et G573S conduisent à une activation constitutive de TRPV3 et une augmentation du flux calcique intracellulaire dans les kératinocytes [251].

Discussion

Contrairement aux patients sains, les kératinocytes de patients Olmsted présentent une expression de TRPV3 au niveau du réticulum endoplasmique ou de l'enveloppe nucléaire [252]. Nous avons montré que la différenciation des kératinocytes en culture 2D conduisait à une relocalisation de TRPV3 de la membrane plasmique aux organelles, probablement au niveau du réticulum endoplasmique. Or, puisque la différenciation des kératinocytes s'accompagne d'une augmentation des concentrations en calcium extracellulaire et intracellulaire [33], cela pourrait induire une relocalisation de TRPV3 au réticulum endoplasmique, comme observé chez des patient Omlsted où l'influx calcique est abondant. Cependant, par quels mécanismes cette relocalisation a-t-elle lieu, et quelle est la conséquence biologique restent à résoudre. Les SNX jouent -elles un rôle dans cette relocalisation au cours de la différenciation ?

D'après nos données l'activation de TRPV3 semble induire un flux calcique intracellulaire plus important lorsqu'il est présent au niveau des organelles qu'au niveau de la membrane plasmique. Le canal TRPV3 a été identifié au niveau d'organelles riches en calcium comme les endosomes et le lysosome (0,003mM- 2mM et 0,5mM respectivement) [250,253]. Il est donc possible que l'activation de TRPV3 induise une libération massive de calcium par ces derniers. Cependant on ne peut pas exclure sa présence sur d'autres organelles comme le réticulum endoplasmique où d'autres TRP dont TRPV1 ont déjà été identifiés [254].

Discussion

– Communication TRPV3 dépendante entre kératinocytes et micro-vaisseaux dermiques

Nous avons montré que la stimulation TRPV3 induisait une libération immédiate d'ATP dans le milieu extracellulaire des kératinocytes jeunes. En revanche, cette dernière était beaucoup plus faible chez les kératinocytes âgés. L'ATP est une molécule à double fonction. Elle est d'une part une source d'énergie, et d'autre part est considérée comme un second messenger impliqué dans de nombreux processus biologiques [255].

Lors de ma thèse j'ai également participé à un projet centré sur le rôle de miR-30a dans le défaut de différenciation épidermique au cours du vieillissement. Cette étude a mis en évidence que les kératinocytes d'individus âgés présentaient une altération du métabolisme mitochondriale, qui en conséquence réduisait la production d'ATP [164]. Ainsi, la diminution de la libération d'ATP par les kératinocytes âgés pourrait être liée à la réduction des canaux TRPV3 et à la diminution du stock d'ATP.

L'ATP agit sur les récepteurs purinergiques P2X (récepteur ionotropique purinergique de type 2) et P2Y exprimés dans de nombreux tissus et par différents types cellulaires [255–257]. L'ATP peut intervenir dans la neurotransmission, la réponse immunitaire, ou encore dans la régulation du tonus vasculaire [255]. De récentes études ont mis en évidence que des cellules non-neuronales, comme le kératinocyte, étaient capables d'informer les fibres nerveuses sensorielles par libération d'ATP lors d'un stress thermique [93] ou mécanique [258]. Ceci suggère donc que le kératinocyte est un senseur de son environnement, et participe à la transmission de l'information. De manière intéressante Talagas et al ont exposé la présence de contacts synaptiques « like » entre les kératinocytes et les terminaisons nerveuses sensorielles intra-épidermiques [36,71]. En effet, les kératinocytes, via le système d'exocytose impliquant le complexe SNARE, transmettraient l'information aux neurones sensoriels [71]. Ainsi, nous pouvons suggérer que l'ATP libéré par les kératinocytes, suite à la stimulation de TRPV3, pourrait agir sur les terminaisons nerveuses sensorielles à proximité (intra-épidermiques). L'utilisation d'un système de co-culture de kératinocytes et de neurones (DRG) nous permettrait d'évaluer l'effet de l'ATP libéré par les kératinocytes de manière TRPV3-dépendant sur les neurones sensoriels, en mesurant le courant électrique après stimulation de TRPV3. Par ailleurs, évaluer le devenir des contacts synaptiques « like » au cours du vieillissement dans la peau humaine pourrait être une bonne approche. Les vaisseaux sanguins de la peau expriment également des récepteurs purinergiques [259]. Le flux sanguin cutané étant régulé par les vaisseaux supérieurs de la peau [16,48], il est possible que la libération d'ATP par les

Discussion

kératinocytes, à la suite de l'activation du TRPV3, agisse directement sur les vaisseaux sanguins de la peau pour réguler le tonus vasculaire.

La stimulation (thermique ou pharmacologique) de TRPV3 conduit à la production de PGE2 [95] et de NO [94] par les kératinocytes, qui sont des médiateurs clés des processus de vasodilatation [83]. Par ailleurs, Hou et al ont rapporté que les kératinocytes étaient également capables de libérer des neuropeptides, comme le CGRP- β [260], qui pourrait conduire à une vasodilatation de manière endothélium-dépendant ou indépendant. Ainsi il serait intéressant d'évaluer et de quantifier la sécrétion de ces médiateurs après stimulation de TRPV3 (en culture 2D), et de définir leurs effets vasoactifs sur vaisseaux isolés par exemple. Définir comment les kératinocytes peuvent informer et moduler la réponse vasculaire (directement ou indirectement via les nerfs sensoriels), et l'effet du vieillissement et du sexe sur ce processus fait l'objet d'une perspective prometteuse.

Nos données préliminaires indiquent que les souris mutées pour TrkA (*TrkAC-KI*), présentent une vasodilatation induite par la chaleur similaire aux souris *Trpv3-KO* (**Figure 51**). Les souris *TrkAC-KI* sont caractérisées par une réduction des terminaisons nerveuses libres intra-épidermiques mais une innervation sensorielle centrale normale. Ceci suggère que la communication physique entre les kératinocytes (TRPV3) et les terminaisons nerveuses intra-épidermiques (TrkA) sensorielles pourrait être nécessaire à la réponse vasculaire face à la chaleur. Par ailleurs, la densité des fibres nerveuses intra-épidermiques diminue avec l'âge (>60 ans), et de manière plus prononcée chez les hommes que les femmes [261,262]. Ainsi, étudier l'implication et l'évolution avec l'âge des contacts synaptiques dans la communication entre les kératinocytes et les neurones sensoriels, permettrait de comprendre par quels mécanismes les kératinocytes, via TRPV3, module le tonus vasculaire.

Discussion

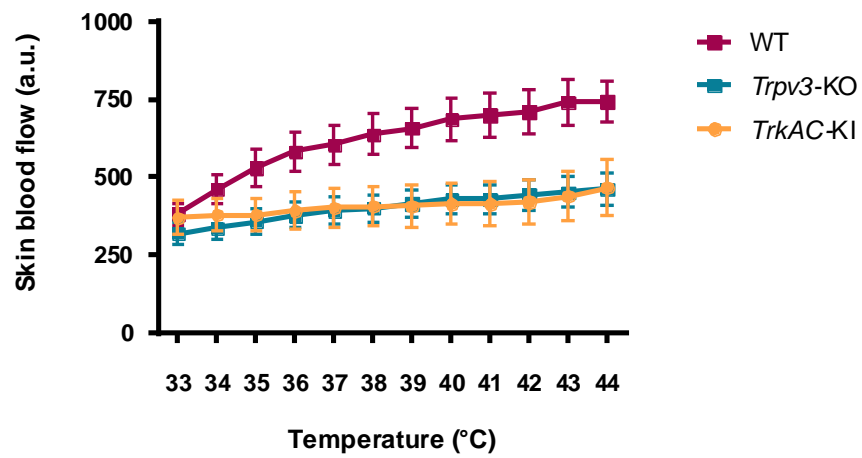


Figure 51 : Vasodilatation induite par une chaleur local

Flux sanguin du coussinet arrière (par laser Doppler) en réponse à un chauffage local chez des jeunes mâles témoins (WT n=8), *TRPV3*-KO (n=8) et *TrkAC*-KI (n=11). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

Conclusion

Conclusion

Ces trois années de thèse ont permis d'apporter et d'approfondir des connaissances sur une partie des mécanismes de thermorégulation, dont la détection de la chaleur modérée et l'initiation de la vasodilatation cutanée. Dans cette étude, nous avons placé le kératinocyte en tant que senseur et transducteur de son environnement. Cependant, plusieurs questions restent à résoudre, en particulier la communication entre les kératinocytes épidermiques et les micro-vaisseaux cutanés. Je pense qu'il faudrait explorer davantage l'interaction entre les kératinocytes et les fibres nerveux intra-épidermiques, puisque l'absence de terminaisons nerveuses sensorielles limite drastiquement la vasodilatation induite par une chaleur locale (souris *TrkAC-KI*). Néanmoins, je ne peux pas exclure une communication directe entre les kératinocytes et les micro-vaisseaux dermiques de par la nature des médiateurs kératinocytaires, qui peuvent avoir un rôle vasoactif. Par ailleurs, l'implication des kératinocytes dans la régulation centrale de la température corporelle nécessite d'être approfondie. Exposée de manière constante à divers facteurs externes, je pense que la peau, à travers ses différents types cellulaires et fonctions, peut être considérée comme notre 3^{ème} cerveau. Elle nous permet de nous adapter chaque jour à notre environnement qui évolue à vue d'œil, notamment dû au réchauffement climatique. L'âge affecte de manière irréversible tous les organes de notre corps, et modifie donc nos capacités d'adaptation au changement climatique. L'installation du vieillissement est modulée par divers processus incluant des facteurs internes, comme la génétique, mais également des facteurs externes que sont nos habitudes de vie et notre environnement. Ainsi, cela se traduit par une forte variabilité inter-individuelle, avec l'apparition de marqueurs caractéristiques du vieillissement et pathologies variables entre individus de même âge. J'ai montré que l'altération du canal TRPV3 avec l'âge participait au défaut de thermorégulation vasculaire cutanée. Avec le réchauffement climatique, l'intensité, la récurrence et la durée des vagues de chaleurs sont amenées à augmenter dans les prochaines années. Ainsi, le déclin des mécanismes de défenses face à la chaleur, dans lesquels TRPV3 et très probablement d'autres thermo-senseurs sont impliqués, augmente le risque d'hyperthermie chez les individus âgés. Le réchauffement climatique a donc un impact direct sur les populations fragilisées, marquées par un défaut de thermorégulation, mais a également un impact à plus large échelle et favorise l'apparition de diverses pathologies (allergies, pathologies pulmonaires, maladies infectieuses), qui touchent désormais toute la population quel que soit l'âge. C'est donc un phénomène qui a des conséquences majeures sur notre santé.

Ces trois années de thèse m'ont permis de me plonger dans le monde de la recherche avec ses avantages et inconvénients. J'ai été très inspirée par mon sujet de thèse et j'ai également apprécié de participer à divers projets qui m'ont apporté de nombreuses

Conclusion

connaissances au niveau du vieillissement, sur la reconstruction mammaire, et également sur des pathologies cutanées comme le psoriasis. Cette expérience m'a permis d'acquérir une certaine autonomie, et de laisser mon esprit critique et scientifique se développer et s'exprimer. Par ailleurs, j'ai pu découvrir la notion de gestion de projet, de la conception à sa publication. Ainsi, à l'issue de cette thèse, je pense rester dans le côté fondamental de la recherche, à la découverte de nouvelles connaissances et avancées scientifiques.

Production scientifique

Publications

- **Martin, L.**; Fraillon, E.; Chevalier, F.; Fromy, B. **Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis** | IntechOpen Available online: <https://www.intechopen.com/online-first/80967> (accessed on 26 August 2022).
- de Bengy, A.-F.; Decorps, J.; **Martin, L.S.**; Pagnon, A.; Chevalier, F.P.; Sigauco-Roussel, D.; Fromy, B. **Alpha-Lipoic Acid Supplementation Restores Early Age-Related Sensory and Endothelial Dysfunction in the Skin.** *Biomedicines* **2022**, *10*, 2887, doi:10.3390/biomedicines10112887.
- Rorteau, J.; Chevalier, F.P.; Bonnet, S.; Barthélemy, T.; Lopez-Gaydon, A.; **Martin, L.S.**; Bechetoille, N.; Lamartine, J. **Maintenance of Chronological Aging Features in Culture of Normal Human Dermal Fibroblasts from Old Donors.** *Cells* **2022**, *11*, 858, doi:10.3390/cells11050858.
- Chevalier, F.P.; Rorteau, J.; Ferraro, S.; **Martin, L.S.**; Gonzalez-Torres, A.; Berthier, A.; El Kholti, N.; Lamartine, J. **MiR-30a-5p Alters Epidermal Terminal Differentiation during Aging by Regulating BNIP3L/NIX-Dependent Mitophagy.** *Cells* **2022**, *11*, 836, doi:10.3390/cells11050836.

Communications orales

- **Symposium international de la Société Française de Cosmétologie « Peau et Récepteurs »**
- Paris 2022
- **Skin Ageing Challenges** - Lisbonne 2022
- **Skin Physiology International Meeting** - Vichy 2022
- **Congrès Annuel de Recherche en Dermatologie** - Namur 2022
- **Congrès de la Société de Physiologie et Biologie Intégrative** - Lyon 2022
- **Congrès Annuel de Recherche en Dermatologie** - Online 2021

Encadrements

- **2022**- Encadrement de **Emma Fraillon**, Université Claude Bernard Lyon1, **Master 2 Biologie de la Peau.** « Rôle de TRPV3 dans le psoriasis »
- **2021**- Encadrement de **Alison Sagnes**, Université Claude Bernard Lyon1, **Master 1 Biologie Moléculaire et Cellulaire.** Stage bibliographique « TRP channels in skin aging »

Références

Références

1. Lopez-Ojeda, W.; Pandey, A.; Alhadj, M.; Oakley, A.M. Anatomy, Skin (Integument). In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2021.
2. Kolarsick, P.A.J.; Kolarsick, M.A.; Goodwin, C. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* **2011**, *3*, 203, doi:10.1097/JDN.0b013e3182274a98.
3. Naldaiz-Gastesi, N.; Bahri, O.A.; López de Munain, A.; McCullagh, K.J.A.; Izeta, A. The Panniculus Carnosus Muscle: An Evolutionary Enigma at the Intersection of Distinct Research Fields. *J Anat* **2018**, *233*, 275–288, doi:10.1111/joa.12840.
4. Wong, R.; Geyer, S.; Weninger, W.; Guimberteau, J.-C.; Wong, J.K. The Dynamic Anatomy and Patterning of Skin. *Experimental Dermatology* **2016**, *25*, 92–98, doi:https://doi.org/10.1111/exd.12832.
5. Khavkin, J.; Ellis, D.A.F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* **2011**, *19*, 229–234, doi:10.1016/j.fsc.2011.04.003.
6. Driskell, R.R.; Jahoda, C.A.B.; Chuong, C.-M.; Watt, F.M.; Horsley, V. Defining Dermal Adipose Tissue. *Experimental Dermatology* **2014**, *23*, 629–631, doi:10.1111/exd.12450.
7. Choe, S.S.; Huh, J.Y.; Hwang, I.J.; Kim, J.I.; Kim, J.B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2016**, *7*, 30, doi:10.3389/fendo.2016.00030.
8. Kruglikov, I.L.; Scherer, P.E. DERMAL ADIPOCYTES: FROM IRRELEVANCE TO METABOLIC TARGETS? *Trends Endocrinol Metab* **2016**, *27*, 1–10, doi:10.1016/j.tem.2015.11.002.
9. Plikus, M.V.; Wang, X.; Sinha, S.; Forte, E.; Thompson, S.M.; Herzog, E.L.; Driskell, R.R.; Rosenthal, N.; Biernaskie, J.; Horsley, V. Fibroblasts: Origins, Definitions, and Functions in Health and Disease. *Cell* **2021**, *184*, 3852–3872, doi:10.1016/j.cell.2021.06.024.
10. Woodley, D.T. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. *Dermatologic Clinics* **2017**, *35*, 95–100, doi:10.1016/j.det.2016.07.004.
11. Driskell, R.R.; Lichtenberger, B.M.; Hoste, E.; Kretschmar, K.; Simons, B.D.; Charalambous, M.; Ferron, S.R.; Hérault, Y.; Pavlovic, G.; Ferguson-Smith, A.C.; et al. Distinct Fibroblast Lineages Determine Dermal Architecture in Skin Development and Repair. *Nature* **2013**, *504*, 277–281, doi:10.1038/nature12783.
12. Pfisterer, K.; Shaw, L.E.; Symmank, D.; Weninger, W. The Extracellular Matrix in Skin Inflammation and Infection. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2021**, *9*.
13. Krieg, T.; Aumailley, M. The Extracellular Matrix of the Dermis: Flexible Structures with Dynamic Functions. *Experimental Dermatology* **2011**, *20*, 689–695, doi:10.1111/j.1600-0625.2011.01313.x.
14. Rippa, A.L.; Kalabusheva, E.P.; Vorotelyak, E.A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. *Cells* **2019**, *8*, 607, doi:10.3390/cells8060607.

Références

15. Chambers, E.S.; Vukmanovic-Stejic, M. Skin Barrier Immunity and Ageing. *Immunology* **2020**, *160*, 116–125, doi:10.1111/imm.13152.
16. Braverman, I.M. The Cutaneous Microcirculation: Ultrastructure and Microanatomical Organization. *Microcirculation* **1997**, *4*, 329–340, doi:10.3109/10739689709146797.
17. Skobe, M.; Detmar, M. Structure, Function, and Molecular Control of the Skin Lymphatic System. *J Investig Dermatol Symp Proc* **2000**, *5*, 14–19, doi:10.1046/j.1087-0024.2000.00001.x.
18. Burgeson, R.E.; Christiano, A.M. The Dermal—Epidermal Junction. *Current Opinion in Cell Biology* **1997**, *9*, 651–658, doi:10.1016/S0955-0674(97)80118-4.
19. Goletz, S.; Zillikens, D.; Schmidt, E. Structural Proteins of the Dermal-Epidermal Junction Targeted by Autoantibodies in Pemphigoid Diseases. *Experimental Dermatology* **2017**, *26*, 1154–1162, doi:10.1111/exd.13446.
20. Eady, R.A.; McGrath, J.A.; McMillan, J.R. Ultrastructural Clues to Genetic Disorders of Skin: The Dermal-Epidermal Junction. *J Invest Dermatol* **1994**, *103*, 13S-18S, doi:10.1111/1523-1747.ep12398895.
21. Gerber, P.A.; Buhren, B.A.; Schrupf, H.; Homey, B.; Zlotnik, A.; Hevezi, P. The Top Skin-Associated Genes: A Comparative Analysis of Human and Mouse Skin Transcriptomes. *Biol Chem* **2014**, *395*, 577–591, doi:10.1515/hsz-2013-0279.
22. Koster, M.I. Making an Epidermis. *Ann N Y Acad Sci* **2009**, *1170*, 7–10, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04363.x.
23. Wiedemann, J.; Billi, A.C.; Bocci, F.; Kashgari, G.; Xing, E.; Tsoi, L.C.; Meller, L.; Swindell, W.R.; Wasikowski, R.; Xing, X.; et al. Differential Cell Composition and Split Epidermal Differentiation in Human Palm, Sole, and Hip Skin. *Cell Reports* **2023**, *42*, doi:10.1016/j.celrep.2023.111994.
24. Potten, C.S. The Epidermal Proliferative Unit: The Possible Role of the Central Basal Cell. *Cell Proliferation* **1974**, *7*, 77–88, doi:10.1111/j.1365-2184.1974.tb00401.x.
25. Clayton, E.; Doupé, D.P.; Klein, A.M.; Winton, D.J.; Simons, B.D.; Jones, P.H. A Single Type of Progenitor Cell Maintains Normal Epidermis. *Nature* **2007**, *446*, 185–189, doi:10.1038/nature05574.
26. Fortunel, N.O.; Martin, M.T. [Stem cells from human interfollicular epidermis: phenotypes and potentialities]. *J Soc Biol* **2008**, *202*, 55–65, doi:10.1051/jbio:2008007.
27. Truong, A.B.; Khavari, P.A. Control of Keratinocyte Proliferation and Differentiation by P63. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 295–299, doi:10.4161/cc.6.3.3753.
28. Mack, J.A.; Anand, S.; Maytin, E.V. Proliferation and cornification during development of the mammalian epidermis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* **2005**, *75*, 314–329, doi:10.1002/bdrc.20055.

Références

29. Henry, J.; Toulza, E.; Hsu, C.-Y.; Pellerin, L.; Balica, S.; Mazereeuw-Hautier, J.; Paul, C.; Serre, G.; Jonca, N.; Simon, M. Update on the Epidermal Differentiation Complex. *Front Biosci (Landmark Ed)* **2012**, *17*, 1517–1532, doi:10.2741/4001.
30. Lu, B.; Rothnagel, J.A.; Longley, M.A.; Tsai, S.Y.; Roop, D.R. Differentiation-Specific Expression of Human Keratin 1 Is Mediated by a Composite AP-1/Steroid Hormone Element. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 7443–7449, doi:10.1016/S0021-9258(17)37306-4.
31. Eckert, R.L.; Adhikary, G.; Young, C.A.; Jans, R.; Crish, J.F.; Xu, W.; Rorke, E.A. AP1 Transcription Factors in Epidermal Differentiation and Skin Cancer. *J Skin Cancer* **2013**, *2013*, 537028, doi:10.1155/2013/537028.
32. Rossi, A.; Jang, S.-I.; Ceci, R.; Steinert, P.M.; Markova, N.G. Effect of AP1 Transcription Factors on the Regulation of Transcription in Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **1998**, *110*, 34–40, doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00071.x.
33. Bikle, D.D.; Xie, Z.; Tu, C.-L. Calcium Regulation of Keratinocyte Differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab* **2012**, *7*, 461–472, doi:10.1586/eem.12.34.
34. Lee, S.E.; Lee, S.H. Skin Barrier and Calcium. *Ann Dermatol* **2018**, *30*, 265–275, doi:10.5021/ad.2018.30.3.265.
35. Hennings, H.; Michael, D.; Cheng, C.; Steinert, P.; Holbrook, K.; Yuspa, S.H. Calcium Regulation of Growth and Differentiation of Mouse Epidermal Cells in Culture. *Cell* **1980**, *19*, 245–254, doi:10.1016/0092-8674(80)90406-7.
36. Talagas, M.; Lebonvallet, N.; Leschiera, R.; Marcorelles, P.; Misery, L. What about Physical Contacts between Epidermal Keratinocytes and Sensory Neurons? *Exp Dermatol* **2018**, *27*, 9–13, doi:10.1111/exd.13411.
37. Tadokoro, R.; Murai, H.; Sakai, K.-I.; Okui, T.; Yokota, Y.; Takahashi, Y. Melanosome Transfer to Keratinocyte in the Chicken Embryonic Skin Is Mediated by Vesicle Release Associated with Rho-Regulated Membrane Blebbing. *Sci Rep* **2016**, *6*, 38277, doi:10.1038/srep38277.
38. Yousef, H.; Alhajj, M.; Sharma, S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
39. Akinduro, O.; Sully, K.; Patel, A.; Robinson, D.J.; Chikh, A.; McPhail, G.; Braun, K.M.; Philpott, M.P.; Harwood, C.A.; Byrne, C.; et al. Constitutive Autophagy and Nucleophagy during Epidermal Differentiation. *J Invest Dermatol* **2016**, *136*, 1460–1470, doi:10.1016/j.jid.2016.03.016.
40. Lee, S.H.; Jeong, S.K.; Ahn, S.K. An Update of the Defensive Barrier Function of Skin. *Yonsei Med J* **2006**, *47*, 293–306, doi:10.3349/ymj.2006.47.3.293.
41. Paus, R.; Ito, N.; Takigawa, M.; Ito, T. The Hair Follicle and Immune Privilege. *J Invest Dermatol Symp Proc* **2003**, *8*, 188–194, doi:10.1046/j.1087-0024.2003.00807.x.
42. Schneider, M.R.; Schmidt-Ullrich, R.; Paus, R. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Curr Biol* **2009**, *19*, R132-142, doi:10.1016/j.cub.2008.12.005.

Références

43. Joost, S.; Annusver, K.; Jacob, T.; Sun, X.; Dalessandri, T.; Sivan, U.; Sequeira, I.; Sandberg, R.; Kasper, M. The Molecular Anatomy of Mouse Skin during Hair Growth and Rest. *Cell Stem Cell* **2020**, *26*, 441–457.e7, doi:10.1016/j.stem.2020.01.012.
44. Plikus, M.V.; Chuong, C.-M. Complex Hair Cycle Domain Patterns and Regenerative Hair Waves in Living Rodents. *J Invest Dermatol* **2008**, *128*, 1071–1080, doi:10.1038/sj.jid.5701180.
45. Stenn, K.S.; Paus, R. Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiological Reviews* **2001**, *81*, 449–494, doi:10.1152/physrev.2001.81.1.449.
46. Murphrey, M.B.; Agarwal, S.; Zito, P.M. Anatomy, Hair. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
47. Mota-Rojas, D.; Titto, C.G.; de Mira Geraldo, A.; Martínez-Burnes, J.; Gómez, J.; Hernández-Ávalos, I.; Casas, A.; Domínguez, A.; José, N.; Bertoni, A.; et al. Efficacy and Function of Feathers, Hair, and Glabrous Skin in the Thermoregulation Strategies of Domestic Animals. *Animals (Basel)* **2021**, *11*, 3472, doi:10.3390/ani11123472.
48. Tansey, E.A.; Johnson, C.D. Recent Advances in Thermoregulation. *Adv Physiol Educ* **2015**, *39*, 139–148, doi:10.1152/advan.00126.2014.
49. Hankenson, F.C.; Marx, J.O.; Gordon, C.J.; David, J.M. Effects of Rodent Thermoregulation on Animal Models in the Research Environment. *Comp Med* **2018**, *68*, 425–438, doi:10.30802/AALAS-CM-18-000049.
50. Clayton, R.W.; Göbel, K.; Niessen, C.M.; Paus, R.; van Steensel, M.A.M.; Lim, X. Homeostasis of the Sebaceous Gland and Mechanisms of Acne Pathogenesis. *British Journal of Dermatology* **2019**, *181*, 677–690, doi:10.1111/bjd.17981.
51. Zouboulis, C.C.; Picardo, M.; Ju, Q.; Kurokawa, I.; Törőcsik, D.; Bíró, T.; Schneider, M.R. Beyond Acne: Current Aspects of Sebaceous Gland Biology and Function. *Rev Endocr Metab Disord* **2016**, *17*, 319–334, doi:10.1007/s11154-016-9389-5.
52. Baker, L.B. Physiology of Sweat Gland Function: The Roles of Sweating and Sweat Composition in Human Health. *Temperature (Austin)* **2019**, *6*, 211–259, doi:10.1080/23328940.2019.1632145.
53. Costill, D.L. Sweating: Its Composition and Effects on Body Fluids. *Ann N Y Acad Sci* **1977**, *301*, 160–174, doi:10.1111/j.1749-6632.1977.tb38195.x.
54. Sato, K.; Ohtsuyama, M.; Samman, G. Eccrine Sweat Gland Disorders. *J Am Acad Dermatol* **1991**, *24*, 1010–1014, doi:10.1016/s0190-9622(08)80117-x.
55. Proksch, E.; Brandner, J.M.; Jensen, J.-M. The Skin: An Indispensable Barrier. *Experimental Dermatology* **2008**, *17*, 1063–1072, doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
56. Köllisch, G.; Kalali, B.N.; Voelcker, V.; Wallich, R.; Behrendt, H.; Ring, J.; Bauer, S.; Jakob, T.; Mempel, M.; Ollert, M. Various Members of the Toll-like Receptor Family Contribute to the Innate Immune Response of Human Epidermal Keratinocytes. *Immunology* **2005**, *114*, 531–541, doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02122.x.

Références

57. Wang, J.; Hori, K.; Ding, J.; Huang, Y.; Kwan, P.; Ladak, A.; Tredget, E.E. Toll-like Receptors Expressed by Dermal Fibroblasts Contribute to Hypertrophic Scarring. *J Cell Physiol* **2011**, *226*, 1265–1273, doi:10.1002/jcp.22454.
58. Liu, A.Y.; Destoumieux, D.; Wong, A.V.; Park, C.H.; Valore, E.V.; Liu, L.; Ganz, T. Human Beta-Defensin-2 Production in Keratinocytes Is Regulated by Interleukin-1, Bacteria, and the State of Differentiation. *J Invest Dermatol* **2002**, *118*, 275–281, doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01651.x.
59. Braff, M.H.; Di Nardo, A.; Gallo, R.L. Keratinocytes Store the Antimicrobial Peptide Cathelicidin in Lamellar Bodies. *J Invest Dermatol* **2005**, *124*, 394–400, doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23443.x.
60. Wertz, P.W. Lipids and the Permeability and Antimicrobial Barriers of the Skin. *J Lipids* **2018**, *2018*, 5954034, doi:10.1155/2018/5954034.
61. Chambers, E.S.; Vukmanovic-Stejcic, M. Skin Barrier Immunity and Ageing. *Immunology* **2020**, *160*, 116–125, doi:10.1111/imm.13152.
62. Verdier-Sévrain, S.; Bonté, F. Skin Hydration: A Review on Its Molecular Mechanisms. *J Cosmet Dermatol* **2007**, *6*, 75–82, doi:10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x.
63. Kechichian, E.; Ezzedine, K. Vitamin D and the Skin: An Update for Dermatologists. *Am J Clin Dermatol* **2018**, *19*, 223–235, doi:10.1007/s40257-017-0323-8.
64. Pullar, J.M.; Carr, A.C.; Vissers, M.C.M. The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients* **2017**, *9*, 866, doi:10.3390/nu9080866.
65. Michalak, M.; Pierzak, M.; Kręcisz, B.; Suliga, E. Bioactive Compounds for Skin Health: A Review. *Nutrients* **2021**, *13*, 203, doi:10.3390/nu13010203.
66. Johnson, J.M.; Minson, C.T.; Kellogg, D.L. Cutaneous Vasodilator and Vasoconstrictor Mechanisms in Temperature Regulation. *Compr Physiol* **2014**, *4*, 33–89, doi:10.1002/cphy.c130015.
67. Glatte, P.; Buchmann, S.J.; Hijazi, M.M.; Illigens, B.M.-W.; Siepmann, T. Architecture of the Cutaneous Autonomic Nervous System. *Front. Neurol.* **2019**, *0*, doi:10.3389/fneur.2019.00970.
68. Stucky, C.L.; Lewin, G.R. Isolectin B4-Positive and -Negative Nociceptors Are Functionally Distinct. *J Neurosci* **1999**, *19*, 6497–6505, doi:10.1523/JNEUROSCI.19-15-06497.1999.
69. Kashio, M. Thermosensation Involving Thermo-TRPs. *Mol Cell Endocrinol* **2021**, *520*, 111089, doi:10.1016/j.mce.2020.111089.
70. Mikesell, A.R.; Isaeva, O.; Moehring, F.; Sadler, K.E.; Menzel, A.D.; Stucky, C.L. Keratinocyte PIEZO1 Modulates Cutaneous Mechanosensation. *Elife* **2022**, *11*, e65987, doi:10.7554/eLife.65987.
71. Talagas, M.; Lebonvallet, N.; Leschiera, R.; Siquin, G.; Elies, P.; Haftek, M.; Pennec, J.-P.; Ressenkoff, D.; La Padula, V.; Le Garrec, R.; et al. Keratinocytes Communicate with Sensory Neurons via Synaptic-like Contacts. *Ann Neurol* **2020**, *88*, 1205–1219, doi:10.1002/ana.25912.

Références

72. Dros, J.; Wewerinke, A.; Bindels, P.J.; van Weert, H.C. Accuracy of Monofilament Testing to Diagnose Peripheral Neuropathy: A Systematic Review. *Ann Fam Med* **2009**, *7*, 555–558, doi:10.1370/afm.1016.
73. Roosterman, D.; Goerge, T.; Schneider, S.W.; Bunnett, N.W.; Steinhoff, M. Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. *Physiological Reviews* **2006**, *86*, 1309–1379, doi:10.1152/physrev.00026.2005.
74. Seeley, R.J.; MacDougald, O.A. Mice as Experimental Models for Human Physiology: When Several Degrees in Housing Temperature Matter. *Nat Metab* **2021**, *3*, 443–445, doi:10.1038/s42255-021-00372-0.
75. Škop, V.; Guo, J.; Liu, N.; Xiao, C.; Hall, K.D.; Gavrilova, O.; Reitman, M.L. Mouse Thermoregulation: Introducing the Concept of the Thermoneutral Point. *Cell Rep* **2020**, *31*, 107501, doi:10.1016/j.celrep.2020.03.065.
76. Morrison, S.F.; Nakamura, K. Central Mechanisms for Thermoregulation. *Annu Rev Physiol* **2019**, *81*, 285–308, doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114546.
77. Cranston, W.I. Thermoregulation and the Skin. In *Pharmacology of the Skin I: Pharmacology of Skin Systems Autocoids in Normal and Inflamed Skin*; Greaves, M.W., Shuster, S., Eds.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer: Berlin, Heidelberg, 1989; pp. 213–221 ISBN 978-3-642-73797-8.
78. Romanovsky, A.A. Skin Temperature: Its Role in Thermoregulation. *Acta Physiol (Oxf)* **2014**, *210*, 498–507, doi:10.1111/apha.12231.
79. Caterina, M.J.; Pang, Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharmaceuticals (Basel)* **2016**, *9*, doi:10.3390/ph9040077.
80. Montell, C.; Caterina, M.J. Thermoregulation: Channels That Are Cool to the Core. *Curr Biol* **2007**, *17*, R885–887, doi:10.1016/j.cub.2007.08.016.
81. Trimm, E.; Red-Horse, K. Vascular Endothelial Cell Development and Diversity. *Nat Rev Cardiol* **2023**, *20*, 197–210, doi:10.1038/s41569-022-00770-1.
82. Monahan-Earley, R.; Dvorak, A.M.; Aird, W.C. Evolutionary Origins of the Blood Vascular System and Endothelium. *J Thromb Haemost* **2013**, *11*, 46–66, doi:10.1111/jth.12253.
83. Cracowski, J.-L.; Roustit, M. Human Skin Microcirculation. *Compr Physiol* **2020**, *10*, 1105–1154, doi:10.1002/cphy.c190008.
84. Martínez-Martínez, E.; Souza-Neto, F.V.; Jiménez-González, S.; Cachofeiro, V. Oxidative Stress and Vascular Damage in the Context of Obesity: The Hidden Guest. *Antioxidants* **2021**, *10*, 406, doi:10.3390/antiox10030406.
85. Deegan, A.J.; Wang, R.K. Microvascular Imaging of the Skin. *Phys Med Biol* **2019**, *64*, 07TR01, doi:10.1088/1361-6560/ab03f1.
86. Wong, B.J.; Hollowed, C.G. Current Concepts of Active Vasodilation in Human Skin. *Temperature (Austin)* **2016**, *4*, 41–59, doi:10.1080/23328940.2016.1200203.

Références

87. Mitchell, J.A.; Ali, F.; Bailey, L.; Moreno, L.; Harrington, L.S. Role of Nitric Oxide and Prostacyclin as Vasoactive Hormones Released by the Endothelium. *Experimental Physiology* **2008**, *93*, 141–147, doi:10.1113/expphysiol.2007.038588.
88. Gaubert, M.L.; Sigaucho-Roussel, D.; Tartas, M.; Berrut, G.; Saumet, J.L.; Fromy, B. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor as an in Vivo Back-up Mechanism in the Cutaneous Microcirculation in Old Mice. *J Physiol* **2007**, *585*, 617–626, doi:10.1113/jphysiol.2007.143750.
89. Mangana, C.; Lorigo, M.; Cairrao, E. Implications of Endothelial Cell-Mediated Dysfunctions in Vasomotor Tone Regulation. *Biologics* **2021**, *1*, 231–251, doi:10.3390/biologics1020015.
90. Smith, C.J.; Johnson, J.M. Responses to Hyperthermia. Optimizing Heat Dissipation by Convection and Evaporation: Neural Control of Skin Blood Flow and Sweating in Humans. *Auton Neurosci* **2016**, *196*, 25–36, doi:10.1016/j.autneu.2016.01.002.
91. Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Rosen, T.A.; Levine, J.D.; Julius, D. The Capsaicin Receptor: A Heat-Activated Ion Channel in the Pain Pathway. *Nature* **1997**, *389*, 816–824, doi:10.1038/39807.
92. Benemei, S.; Nicoletti, P.; Capone, J.G.; Geppetti, P. CGRP Receptors in the Control of Pain and Inflammation. *Current Opinion in Pharmacology* **2009**, *9*, 9–14, doi:10.1016/j.coph.2008.12.007.
93. Mandadi, S.; Sokabe, T.; Shibasaki, K.; Katanosaka, K.; Mizuno, A.; Moqrich, A.; Patapoutian, A.; Fukumi-Tominaga, T.; Mizumura, K.; Tominaga, M. TRPV3 in Keratinocytes Transmits Temperature Information to Sensory Neurons via ATP. *Pflugers Arch* **2009**, *458*, 1093–1102, doi:10.1007/s00424-009-0703-x.
94. Miyamoto, T.; Petrus, M.J.; Dubin, A.E.; Patapoutian, A. TRPV3 Regulates NOS-Independent Nitric Oxide Synthesis in the Skin. *Nat Commun* **2011**, *2*, 369, doi:10.1038/ncomms1371.
95. Huang, S.M.; Lee, H.; Chung, M.-K.; Park, U.; Yu, Y.Y.; Bradshaw, H.B.; Coulombe, P.A.; Walker, J.M.; Caterina, M.J. Overexpressed Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Ion Channels in Skin Keratinocytes Modulate Pain Sensitivity via Prostaglandin E2. *J Neurosci* **2008**, *28*, 13727–13737, doi:10.1523/JNEUROSCI.5741-07.2008.
96. Szöllösi, A.G.; Vasas, N.; Angyal, Á.; Kistamás, K.; Nánási, P.P.; Mihály, J.; Béke, G.; Herczeg-Lisztes, E.; Szegedi, A.; Kawada, N.; et al. Activation of TRPV3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* **2018**, *138*, 365–374, doi:10.1016/j.jid.2017.07.852.
97. Marek-Jozefowicz, L.; Nedoszytko, B.; Grochocka, M.; Żmijewski, M.A.; Czajkowski, R.; Cubała, W.J.; Slominski, A.T. Molecular Mechanisms of Neurogenic Inflammation of the Skin. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, 5001, doi:10.3390/ijms24055001.

Références

98. Roustit, M.; Cracowski, J.-L. Non-Invasive Assessment of Skin Microvascular Function in Humans: An Insight Into Methods. *Microcirculation* **2012**, *19*, 47–64, doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00129.x.
99. Venkatachalam, K.; Montell, C. TRP Channels. *Annu Rev Biochem* **2007**, *76*, 387–417, doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
100. Blair, N.T.; Carvacho, I.; Chaudhuri, D.; Clapham, D.E.; DeCaen, P.; Delling, M.; Doerner, J.F.; Fan, L.; Ha, K.; Jordt, S.E.; et al. Transient Receptor Potential Channels (Version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE* **2019**, *2019*, doi:10.2218/gtopdb/F78/2019.4.
101. Cao, E. Structural Mechanisms of Transient Receptor Potential Ion Channels. *Journal of General Physiology* **2020**, *152*, e201811998, doi:10.1085/jgp.201811998.
102. Nilius, B.; Talavera, K.; Owsianik, G.; Prenen, J.; Droogmans, G.; Voets, T. Gating of TRP Channels: A Voltage Connection? *J Physiol* **2005**, *567*, 35–44, doi:10.1113/jphysiol.2005.088377.
103. Voets, T. TRP Channels and Thermosensation. *Handb Exp Pharmacol* **2014**, *223*, 729–741, doi:10.1007/978-3-319-05161-1_1.
104. Caterina, M.J. Transient Receptor Potential Ion Channels as Participants in Thermosensation and Thermoregulation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **2007**, *292*, R64–R76, doi:10.1152/ajpregu.00446.2006.
105. Caterina, M.J.; Leffler, A.; Malmberg, A.B.; Martin, W.J.; Trafton, J.; Petersen-Zeitz, K.R.; Koltzenburg, M.; Basbaum, A.I.; Julius, D. Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science* **2000**, *288*, 306–313, doi:10.1126/science.288.5464.306.
106. Davis, J.B.; Gray, J.; Gunthorpe, M.J.; Hatcher, J.P.; Davey, P.T.; Overend, P.; Harries, M.H.; Latcham, J.; Clapham, C.; Atkinson, K.; et al. Vanilloid Receptor-1 Is Essential for Inflammatory Thermal Hyperalgesia. *Nature* **2000**, *405*, 183–187, doi:10.1038/35012076.
107. Gouin, O.; L’Herondelle, K.; Lebonvallet, N.; Le Gall-Ianotto, C.; Sakka, M.; Buhé, V.; Plée-Gautier, E.; Carré, J.-L.; Lefeuvre, L.; Misery, L.; et al. TRPV1 and TRPA1 in Cutaneous Neurogenic and Chronic Inflammation: Pro-Inflammatory Response Induced by Their Activation and Their Sensitization. *Protein Cell* **2017**, *8*, 644–661, doi:10.1007/s13238-017-0395-5.
108. Xu, H.; Ramsey, I.S.; Kotecha, S.A.; Moran, M.M.; Chong, J.A.; Lawson, D.; Ge, P.; Lilly, J.; Silos-Santiago, I.; Xie, Y.; et al. TRPV3 Is a Calcium-Permeable Temperature-Sensitive Cation Channel. *Nature* **2002**, *418*, 181–186, doi:10.1038/nature00882.
109. Moqrich, A. Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin. *Science* **2005**, *307*, 1468–1472, doi:10.1126/science.1108609.
110. Talagas, M.; Misery, L. Role of Keratinocytes in Sensitive Skin. *Front Med (Lausanne)* **2019**, *6*, 108, doi:10.3389/fmed.2019.00108.

Références

111. Peier, A.M. A Heat-Sensitive TRP Channel Expressed in Keratinocytes. *Science* **2002**, *296*, 2046–2049, doi:10.1126/science.1073140.
112. Voets, T.; Droogmans, G.; Wissenbach, U.; Janssens, A.; Flockerzi, V.; Nilius, B. The Principle of Temperature-Dependent Gating in Cold- and Heat-Sensitive TRP Channels. *Nature* **2004**, *430*, 748–754, doi:10.1038/nature02732.
113. Broad, L.M.; Mogg, A.J.; Eberle, E.; Tolley, M.; Li, D.L.; Knopp, K.L. TRPV3 in Drug Development. *Pharmaceuticals (Basel)* **2016**, *9*, doi:10.3390/ph9030055.
114. Vogt-Eisele, A.K.; Weber, K.; Sherkheli, M.A.; Vielhaber, G.; Panten, J.; Gisselmann, G.; Hatt, H. Monoterpenoid Agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol* **2007**, *151*, 530–540, doi:10.1038/sj.bjp.0707245.
115. Xiao, R.; Tang, J.; Wang, C.; Colton, C.K.; Tian, J.; Zhu, M.X. CALCIUM PLAYS A CENTRAL ROLE IN THE SENSITIZATION OF TRPV3 CHANNEL TO REPETITIVE STIMULATIONS. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 6162–6174, doi:10.1074/jbc.M706535200.
116. Liu, B.; Yao, J.; Zhu, M.X.; Qin, F. Hysteresis of Gating Underlines Sensitization of TRPV3 Channels. *J Gen Physiol* **2011**, *138*, 509–520, doi:10.1085/jgp.201110689.
117. Singh, A.K.; McGoldrick, L.L.; Sobolevsky, A.I. Structure and Gating Mechanism of the Transient Receptor Potential Channel TRPV3. *Nat Struct Mol Biol* **2018**, *25*, 805–813, doi:10.1038/s41594-018-0108-7.
118. Zubcevic, L.; Herzik, M.A.; Wu, M.; Borschel, W.F.; Hirschi, M.; Song, A.S.; Lander, G.C.; Lee, S.-Y. Conformational Ensemble of the Human TRPV3 Ion Channel. *Nat Commun* **2018**, *9*, doi:10.1038/s41467-018-07117-w.
119. Zubcevic, L.; Borschel, W.F.; Hsu, A.L.; Borgnia, M.J.; Lee, S.-Y. Regulatory Switch at the Cytoplasmic Interface Controls TRPV Channel Gating. *eLife* **2019**, *8*, e47746, doi:10.7554/eLife.47746.
120. Luo, J.; Hu, H. Thermally Activated TRPV3 Channels. In *Current Topics in Membranes*; Elsevier, 2014; Vol. 74, pp. 325–364 ISBN 978-0-12-800181-3.
121. Phelps, C.B.; Wang, R.R.; Choo, S.S.; Gaudet, R. Differential Regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 Sensitivity through a Conserved Binding Site on the Ankyrin Repeat Domain*. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 731–740, doi:10.1074/jbc.M109.052548.
122. Martin, L.; Fraillon, E.; Chevalier, F.; Fromy, B. Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis | IntechOpen Available online: <https://www.intechopen.com/online-first/80967> (accessed on 26 August 2022).
123. Smith, G.D.; Gunthorpe, M.J.; Kelsell, R.E.; Hayes, P.D.; Reilly, P.; Facer, P.; Wright, J.E.; Jerman, J.C.; Walhin, J.-P.; Ooi, L.; et al. TRPV3 Is a Temperature-Sensitive Vanilloid Receptor-like Protein. *Nature* **2002**, *418*, 186–190, doi:10.1038/nature00894.

Références

124. Cheng, X.; Jin, J.; Hu, L.; Shen, D.; Dong, X.; Samie, M.A.; Knoff, J.; Eisinger, B.; Liu, M.; Huang, S.M.; et al. TRP Channel Regulates EGFR Signaling in Hair Morphogenesis and Skin Barrier Formation. *Cell* **2010**, *141*, 331–343, doi:10.1016/j.cell.2010.03.013.
125. Wang, Y.; Li, H.; Xue, C.; Chen, H.; Xue, Y.; Zhao, F.; Zhu, M.X.; Cao, Z. TRPV3 Enhances Skin Keratinocyte Proliferation through EGFR-Dependent Signaling Pathways. *Cell Biol Toxicol* **2020**, doi:10.1007/s10565-020-09536-2.
126. Zhao, J.; Munanairi, A.; Liu, X.-Y.; Zhang, J.; Hu, L.; Hu, M.; Bu, D.; Liu, L.; Xie, Z.; Kim, B.S.; et al. PAR2 Mediates Itch via TRPV3 Signaling in Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **2020**, doi:10.1016/j.jid.2020.01.012.
127. Marics, I.; Malapert, P.; Reynders, A.; Gaillard, S.; Moqrich, A. Acute Heat-Evoked Temperature Sensation Is Impaired but Not Abolished in Mice Lacking TRPV1 and TRPV3 Channels. *PLoS One* **2014**, *9*, e99828, doi:10.1371/journal.pone.0099828.
128. Duchatelet, S.; Hovnanian, A. Olmsted Syndrome: Clinical, Molecular and Therapeutic Aspects. *Orphanet J Rare Dis* **2015**, *10*, 33, doi:10.1186/s13023-015-0246-5.
129. Fromy, B.; Josset-Lamaugarny, A.; Aimond, G.; Pagnon-Minot, A.; Marics, I.; Tattersall, G.J.; Moqrich, A.; Sigauco-Roussel, D. Disruption of TRPV3 Impairs Heat-Evoked Vasodilation and Thermoregulation: A Critical Role of CGRP. *Journal of Investigative Dermatology* **2018**, *138*, 688–696, doi:10.1016/j.jid.2017.10.006.
130. Fujii, N.; Kenny, G.P.; McGarr, G.W.; Amano, T.; Honda, Y.; Kondo, N.; Nishiyasu, T. TRPV4 Channel Blockade Does Not Modulate Skin Vasodilation and Sweating during Hyperthermia or Cutaneous Postocclusive Reactive and Thermal Hyperemia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **2021**, *320*, R563–R573, doi:10.1152/ajpregu.00123.2020.
131. Fromy, B.; Sigauco-Roussel, D.; Gaubert-Dahan, M.-L.; Rousseau, P.; Abraham, P.; Benzoni, D.; Berrut, G.; Saumet, J.L. Aging-Associated Sensory Neuropathy Alters Pressure-Induced Vasodilation in Humans. *J Invest Dermatol* **2010**, *130*, 849–855, doi:10.1038/jid.2009.279.
132. Holowatz, L.A.; Houghton, B.L.; Wong, B.J.; Wilkins, B.W.; Harding, A.W.; Kenney, W.L.; Minson, C.T. Nitric Oxide and Attenuated Reflex Cutaneous Vasodilation in Aged Skin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2003**, *284*, H1662-1667, doi:10.1152/ajpheart.00871.2002.
133. Krutmann, J.; Schikowski, T.; Morita, A.; Berneburg, M. Environmentally-Induced (Extrinsic) Skin Aging: Exposomal Factors and Underlying Mechanisms. *J Invest Dermatol* **2021**, *141*, 1096–1103, doi:10.1016/j.jid.2020.12.011.
134. Nakamura, M.; Ueda, Y.; Hayashi, M.; Kato, H.; Furuhashi, T.; Morita, A. Tobacco Smoke-Induced Skin Pigmentation Is Mediated by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Exp Dermatol* **2013**, *22*, 556–558, doi:10.1111/exd.12170.

Références

135. Morita, A.; Torii, K.; Maeda, A.; Yamaguchi, Y. Molecular Basis of Tobacco Smoke-Induced Premature Skin Aging. *J Investig Dermatol Symp Proc* **2009**, *14*, 53–55, doi:10.1038/jidsymp.2009.13.
136. Nguyen, H.P.; Katta, R. Sugar Sag: Glycation and the Role of Diet in Aging Skin. *Skin Therapy Lett* **2015**, *20*, 1–5.
137. Krutmann, J.; Bouloc, A.; Sore, G.; Bernard, B.A.; Passeron, T. The Skin Aging Exposome. *Journal of Dermatological Science* **2017**, *85*, 152–161, doi:10.1016/j.jdermsci.2016.09.015.
138. Thiele, J.J.; Traber, M.G.; Polefka, T.G.; Cross, C.E.; Packer, L. Ozone-Exposure Depletes Vitamin E and Induces Lipid Peroxidation in Murine Stratum Corneum. *J Invest Dermatol* **1997**, *108*, 753–757, doi:10.1111/1523-1747.ep12292144.
139. Fuks, K.B.; Woodby, B.; Valacchi, G. [Skin damage by tropospheric ozone]. *Hautarzt* **2019**, *70*, 163–168, doi:10.1007/s00105-019-4361-4.
140. Lefebvre, M.-A.; Pham, D.-M.; Boussouira, B.; Qiu, H.; Ye, C.; Long, X.; Chen, R.; Gu, W.; Laurent, A.; Nguyen, Q.-L. Consequences of Urban Pollution upon Skin Status. A Controlled Study in Shanghai Area. *Int J Cosmet Sci* **2016**, *38*, 217–223, doi:10.1111/ics.12270.
141. Lefebvre, M.-A.; Pham, D.-M.; Boussouira, B.; Bernard, D.; Camus, C.; Nguyen, Q.-L. Evaluation of the impact of urban pollution on the quality of skin: a multicentre study in Mexico. *International Journal of Cosmetic Science* **2015**, *37*, 329–338, doi:10.1111/ics.12203.
142. Valacchi, G.; Fortino, V.; Bocci, V. The Dual Action of Ozone on the Skin. *British Journal of Dermatology* **2005**, *153*, 1096–1100, doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06939.x.
143. Puizina-Ivić, N. Skin Aging. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* **2008**, *17*, 47–54.
144. Gromkowska-Kępa, K.J.; Puścion-Jakubik, A.; Markiewicz-Żukowska, R.; Socha, K. The Impact of Ultraviolet Radiation on Skin Photoaging — Review of in Vitro Studies. *J Cosmet Dermatol* **2021**, *20*, 3427–3431, doi:10.1111/jocd.14033.
145. RYU, J.; PARK, S.-J.; KIM, I.-H.; CHOI, Y.H.; NAM, T.-J. Protective Effect of Porphyrin-334 on UVA-Induced Photoaging in Human Skin Fibroblasts. *Int J Mol Med* **2014**, *34*, 796–803, doi:10.3892/ijmm.2014.1815.
146. Cho, S.; Shin, M.H.; Kim, Y.K.; Seo, J.-E.; Lee, Y.M.; Park, C.-H.; Chung, J.H. Effects of Infrared Radiation and Heat on Human Skin Aging in Vivo. *J Investig Dermatol Symp Proc* **2009**, *14*, 15–19, doi:10.1038/jidsymp.2009.7.
147. Park, C.-H.; Lee, M.J.; Ahn, J.; Kim, S.; Kim, H.H.; Kim, K.H.; Eun, H.C.; Chung, J.H. Heat Shock-Induced Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 Are Mediated through ERK and JNK Activation and via an Autocrine Interleukin-6 Loop. *J Invest Dermatol* **2004**, *123*, 1012–1019, doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23487.x.
148. Chen, Z.; Seo, J.Y.; Kim, Y.K.; Lee, S.R.; Kim, K.H.; Cho, K.H.; Eun, H.C.; Chung, J.H. Heat Modulation of Tropoelastin, Fibrillin-1, and Matrix Metalloproteinase-12 in Human Skin In Vivo. *J Invest Dermatol* **2005**, *124*, 70–78, doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23550.x.

Références

149. Lee, Y.M.; Li, W.H.; Kim, Y.K.; Kim, K.H.; Chung, J.H. Heat-Induced MMP-1 Expression Is Mediated by TRPV1 through PKC α Signaling in HaCaT Cells. *Exp Dermatol* **2008**, *17*, 864–870, doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00738.x.
150. López-Otín, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **2013**, *153*, 1194–1217, doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.
151. Schmauck-Medina, T.; Molière, A.; Lautrup, S.; Zhang, J.; Chlopicki, S.; Madsen, H.B.; Cao, S.; Soendenbroe, C.; Mansell, E.; Vestergaard, M.B.; et al. New Hallmarks of Ageing: A 2022 Copenhagen Ageing Meeting Summary. *Aging (Albany NY)* **2022**, *14*, 6829–6839, doi:10.18632/aging.204248.
152. López-Otín, C.; Blasco, M.A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. Hallmarks of Aging: An Expanding Universe. *Cell* **2023**, *186*, 243–278, doi:10.1016/j.cell.2022.11.001.
153. Stern, M.M.; Bickenbach, J.R. Epidermal Stem Cells Are Resistant to Cellular Aging. *Aging Cell* **2007**, *6*, 439–452, doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00318.x.
154. Racila, D.; Bickenbach, J.R. Are Epidermal Stem Cells Unique with Respect to Aging? *Aging (Albany NY)* **2009**, *1*, 746–750.
155. Doles, J.; Storer, M.; Cozzuto, L.; Roma, G.; Keyes, W.M. Age-Associated Inflammation Inhibits Epidermal Stem Cell Function. *Genes Dev* **2012**, *26*, 2144–2153, doi:10.1101/gad.192294.112.
156. Tomitaka, A.; Akamatsu, H.; Matsunaga, K.; Denda, M. Altered Distribution of Calcium in Facial Epidermis of Aged Adults. *J Invest Dermatol* **2003**, *121*, 1557–1558, doi:10.1111/j.1523-1747.2003.12619.x.
157. Rinnerthaler, M.; Duschl, J.; Steinbacher, P.; Salzmann, M.; Bischof, J.; Schuller, M.; Wimmer, H.; Peer, T.; Bauer, J.W.; Richter, K. Age-Related Changes in the Composition of the Cornified Envelope in Human Skin. *Experimental Dermatology* **2013**, *22*, 329–335, doi:10.1111/exd.12135.
158. Takahashi, M.; Tezuka, T. The Content of Free Amino Acids in the Stratum Corneum Is Increased in Senile Xerosis. *Arch Dermatol Res* **2004**, *295*, 448–452, doi:10.1007/s00403-003-0448-x.
159. Boireau-Adamezyk, E.; Baillet-Guffroy, A.; Stamatas, G.N. Age-Dependent Changes in Stratum Corneum Barrier Function. *Skin Research and Technology* **2014**, *20*, 409–415, doi:10.1111/srt.12132.
160. Bejaoui, Y.; Razzaq, A.; Yousri, N.A.; Oshima, J.; Megarbane, A.; Qannan, A.; Potabattula, R.; Alam, T.; Martin, G.M.; Horn, H.F.; et al. DNA Methylation Signatures in Blood DNA of Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *Aging Cell* **2022**, *21*, e13555, doi:10.1111/accel.13555.
161. Lee, S.-H.; Lee, J.-H.; Lee, H.-Y.; Min, K.-J. Sirtuin Signaling in Cellular Senescence and Aging. *BMB Rep* **2019**, *52*, 24–34, doi:10.5483/BMBRep.2019.52.1.290.

Références

162. Watroba, M.; Szukiewicz, D. Sirtuins at the Service of Healthy Longevity. *Frontiers in Physiology* **2021**, *12*.
163. Muther, C.; Jobeili, L.; Garion, M.; Heraud, S.; Thepot, A.; Damour, O.; Lamartine, J. An Expression Screen for Aged-Dependent MicroRNAs Identifies MiR-30a as a Key Regulator of Aging Features in Human Epidermis. *Aging (Albany NY)* **2017**, *9*, 2376–2396, doi:10.18632/aging.101326.
164. Chevalier, F.P.; Rorteau, J.; Ferraro, S.; Martin, L.S.; Gonzalez-Torres, A.; Berthier, A.; El Kholti, N.; Lamartine, J. MiR-30a-5p Alters Epidermal Terminal Differentiation during Aging by Regulating BNIP3L/NIX-Dependent Mitophagy. *Cells* **2022**, *11*, 836, doi:10.3390/cells11050836.
165. Langton, A.K.; Halai, P.; Griffiths, C.E.M.; Sherratt, M.J.; Watson, R.E.B. The Impact of Intrinsic Ageing on the Protein Composition of the Dermal-Epidermal Junction. *Mechanisms of Ageing and Development* **2016**, *156*, 14–16, doi:10.1016/j.mad.2016.03.006.
166. Zhang, S.; Duan, E. Fighting against Skin Aging. *Cell Transplant* **2018**, *27*, 729–738, doi:10.1177/0963689717725755.
167. Lauria, G.; Holland, N.; Hauer, P.; Cornblath, D.R.; Griffin, J.W.; McArthur, J.C. Epidermal Innervation: Changes with Aging, Topographic Location, and in Sensory Neuropathy. *Journal of the Neurological Sciences* **1999**, *164*, 172–178, doi:10.1016/S0022-510X(99)00063-5.
168. McArthur, J.C.; Stocks, E.A.; Hauer, P.; Cornblath, D.R.; Griffin, J.W. Epidermal Nerve Fiber Density: Normative Reference Range and Diagnostic Efficiency. *Archives of Neurology* **1998**, *55*, 1513–1520, doi:10.1001/archneur.55.12.1513.
169. Wang, S.; Davis, B.M.; Zwick, M.; Waxman, S.G.; Albers, K.M. Reduced Thermal Sensitivity and Nav1.8 and TRPV1 Channel Expression in Sensory Neurons of Aged Mice. *Neurobiol Aging* **2006**, *27*, 895–903, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.04.009.
170. Shin, J.-W.; Kwon, S.-H.; Choi, J.-Y.; Na, J.-I.; Huh, C.-H.; Choi, H.-R.; Park, K.-C. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 2126, doi:10.3390/ijms20092126.
171. Quan, T.; Fisher, G.J. Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging. *Gerontology* **2015**, *61*, 427–434, doi:10.1159/000371708.
172. Pittayapruek, P.; Meephansan, J.; Prapapan, O.; Komine, M.; Ohtsuki, M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, 868, doi:10.3390/ijms17060868.
173. Varani, J.; Dame, M.K.; Rittie, L.; Fligiel, S.E.G.; Kang, S.; Fisher, G.J.; Voorhees, J.J. Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin. *Am J Pathol* **2006**, *168*, 1861–1868, doi:10.2353/ajpath.2006.051302.

Références

174. Cenizo, V.; André, V.; Reymermier, C.; Sommer, P.; Damour, O.; Perrier, E. LOXL as a Target to Increase the Elastin Content in Adult Skin: A Dill Extract Induces the LOXL Gene Expression. *Experimental Dermatology* **2006**, *15*, 574–581, doi:10.1111/j.1600-0625.2006.00442.x.
175. Bentov, I.; Reed, M.J. The Effect of Aging on the Cutaneous Microvasculature. *Microvasc Res* **2015**, *100*, 25–31, doi:10.1016/j.mvr.2015.04.004.
176. El Assar, M.; Angulo, J.; Vallejo, S.; Peiró, C.; Sánchez-Ferrer, C.F.; Rodríguez-Mañas, L. Mechanisms Involved in the Aging-Induced Vascular Dysfunction. *Front Physiol* **2012**, *3*, 132, doi:10.3389/fphys.2012.00132.
177. Kang, L.S.; Chen, B.; Reyes, R.A.; LeBlanc, A.J.; Teng, B.; Mustafa, S.J.; Muller-Delp, J.M. Aging and Estrogen Alter Endothelial Reactivity to Reactive Oxygen Species in Coronary Arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2011**, *300*, H2105–H2115, doi:10.1152/ajpheart.00349.2010.
178. Cau, S.B.A.; Carneiro, F.S.; Tostes, R.C. Differential Modulation of Nitric Oxide Synthases in Aging: Therapeutic Opportunities. *Front Physiol* **2012**, *3*, 218, doi:10.3389/fphys.2012.00218.
179. Holowatz, L.A.; Kenney, W.L. Peripheral Mechanisms of Thermoregulatory Control of Skin Blood Flow in Aged Humans. *J Appl Physiol (1985)* **2010**, *109*, 1538–1544, doi:10.1152/jappphysiol.00338.2010.
180. DeSouza, C.A.; Clevenger, C.M.; Greiner, J.J.; Smith, D.T.; Hoetzer, G.L.; Shapiro, L.F.; Stauffer, B.L. Evidence for Agonist-Specific Endothelial Vasodilator Dysfunction with Ageing in Healthy Humans. *J Physiol* **2002**, *542*, 255–262, doi:10.1113/jphysiol.2002.019166.
181. de Bengy, A.-F.; Decorps, J.; Martin, L.S.; Pagnon, A.; Chevalier, F.P.; Sigauco-Roussel, D.; Fromy, B. Alpha-Lipoic Acid Supplementation Restores Early Age-Related Sensory and Endothelial Dysfunction in the Skin. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2887, doi:10.3390/biomedicines10112887.
182. World Disasters Report 2020 | IFRC Available online: <https://www.ifrc.org/document/world-disasters-report-2020> (accessed on 7 April 2023).
183. Fouillet, A.; Rey, G.; Laurent, F.; Pavillon, G.; Bellec, S.; Ghihenneuc-Jouyaux, C.; Clavel, J.; Jouglu, E.; Hémon, D. Excess Mortality Related to the August 2003 Heat Wave in France. *Int Arch Occup Environ Health* **2006**, *80*, 16–24, doi:10.1007/s00420-006-0089-4.
184. Holowatz, L.A.; Thompson-Torgerson, C.; Kenney, W.L. Aging and the Control of Human Skin Blood Flow. *Front Biosci* **2010**, *15*, 718–739.
185. Vriens, J.; Nilius, B.; Voets, T. Peripheral Thermosensation in Mammals. *Nat Rev Neurosci* **2014**, *15*, 573–589, doi:10.1038/nrn3784.
186. Minson, C.T.; Berry, L.T.; Joyner, M.J. Nitric Oxide and Neurally Mediated Regulation of Skin Blood Flow during Local Heating. *Journal of Applied Physiology* **2001**, *91*, 1619–1626, doi:10.1152/jappl.2001.91.4.1619.

Références

187. Hodges, G.J.; Del Pozzi, A.T.; McGarr, G.W.; Mallette, M.M.; Cheung, S.S. The Contribution of Sensory Nerves to Cutaneous Vasodilatation of the Forearm and Leg to Local Skin Heating. *Eur J Appl Physiol* **2015**, *115*, 2091–2098, doi:10.1007/s00421-015-3188-7.
188. Balmain, B.N.; Sabapathy, S.; Louis, M.; Morris, N.R. Aging and Thermoregulatory Control: The Clinical Implications of Exercising under Heat Stress in Older Individuals. *Biomed Res Int* **2018**, *2018*, doi:10.1155/2018/8306154.
189. Zhang, H.; Sun, X.; Qi, H.; Ma, Q.; Zhou, Q.; Wang, W.; Wang, K. Pharmacological Inhibition of the Temperature-Sensitive and Ca²⁺-Permeable Transient Receptor Potential Vanilloid TRPV3 Channel by Natural Forsythoside B Attenuates Pruritus and Cytotoxicity of Keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **2019**, *368*, 21–31, doi:10.1124/jpet.118.254045.
190. Bang, S.; Yoo, S.; Yang, T.; Cho, H.; Hwang, S. 17(R)-Resolvin D1 Specifically Inhibits Transient Receptor Potential Ion Channel Vanilloid 3 Leading to Peripheral Antinociception. *Br J Pharmacol* **2012**, *165*, 683–692, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01568.x.
191. Sun, X.-Y.; Sun, L.-L.; Qi, H.; Gao, Q.; Wang, G.-X.; Wei, N.-N.; Wang, K. Antipruritic Effect of Natural Coumarin Osthole through Selective Inhibition of Thermosensitive TRPV3 Channel in the Skin. *Mol Pharmacol* **2018**, *94*, 1164–1173, doi:10.1124/mol.118.112466.
192. Liu, Q.; Wang, J.; Wei, X.; Hu, J.; Ping, C.; Gao, Y.; Xie, C.; Wang, P.; Cao, P.; Cao, Z.; et al. Therapeutic Inhibition of Keratinocyte TRPV3 Sensory Channel by Local Anesthetic Dyclonine. *eLife* *10*, e68128, doi:10.7554/eLife.68128.
193. Gomtsyan, A.; Schmidt, R.G.; Bayburt, E.K.; Gfesser, G.A.; Voight, E.A.; Daanen, J.F.; Schmidt, D.L.; Cowart, M.D.; Liu, H.; Altenbach, R.J.; et al. Synthesis and Pharmacology of (Pyridin-2-Yl)Methanol Derivatives as Novel and Selective Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Antagonists. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 4926–4947, doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00287.
194. Qi, H.; Shi, Y.; Wu, H.; Niu, C.; Sun, X.; Wang, K. Inhibition of Temperature-Sensitive TRPV3 Channel by Two Natural Isochlorogenic Acid Isomers for Alleviation of Dermatitis and Chronic Pruritus. *Acta Pharm Sin B* **2022**, *12*, 723–734, doi:10.1016/j.apsb.2021.08.002.
195. Toth, L.A. Identifying and Implementing Endpoints for Geriatric Mice. *Comp Med* **2018**, *68*, 439–451, doi:10.30802/AALAS-CM-18-000022.
196. Bielach-Bazyluk, A.; Zbroch, E.; Mysliwiec, H.; Rydzewska-Rosolowska, A.; Kakareko, K.; Flisiak, I.; Hryszko, T. Sirtuin 1 and Skin: Implications in Intrinsic and Extrinsic Aging-A Systematic Review. *Cells* **2021**, *10*, 813, doi:10.3390/cells10040813.
197. Keyes, W.M.; Mills, A.A. P63: A New Link Between Senescence and Aging. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 260–265, doi:10.4161/cc.5.3.2415.
198. Keyes, W.M.; Wu, Y.; Vogel, H.; Guo, X.; Lowe, S.W.; Mills, A.A. P63 Deficiency Activates a Program of Cellular Senescence and Leads to Accelerated Aging. *Genes Dev* **2005**, *19*, 1986–1999, doi:10.1101/gad.342305.

Références

199. Wang, S.; Albers, K.M. Behavioral and Cellular Level Changes in the Aging Somatosensory System. *Ann N Y Acad Sci* **2009**, *1170*, 745–749, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04011.x.
200. Johnson, A.J.; Wilson, A.T.; Laffitte Nodarse, C.; Montesino-Goicolea, S.; Valdes-Hernandez, P.A.; Somerville, J.; Peraza, J.A.; Fillingim, R.B.; Bialosky, J.; Cruz-Almeida, Y. Age Differences in Multimodal Quantitative Sensory Testing and Associations With Brain Volume. *Innov Aging* **2021**, *5*, igab033, doi:10.1093/geroni/igab033.
201. Meissner, M.; Obmann, V.C.; Hoschke, M.; Link, S.; Jung, M.; Held, G.; Philipp, S.E.; Zimmermann, R.; Flockerzi, V. Lessons of Studying TRP Channels with Antibodies. In *TRP Channels*; Zhu, M.X., Ed.; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton (FL), 2011 ISBN 978-1-4398-1860-2.
202. Facer, P.; Casula, M.A.; Smith, G.D.; Benham, C.D.; Chessell, I.P.; Bountra, C.; Sinisi, M.; Birch, R.; Anand, P. Differential Expression of the Capsaicin Receptor TRPV1 and Related Novel Receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in Normal Human Tissues and Changes in Traumatic and Diabetic Neuropathy. *BMC Neurol* **2007**, *7*, 11, doi:10.1186/1471-2377-7-11.
203. Park, C.W.; Kim, H.J.; Choi, Y.W.; Chung, B.Y.; Woo, S.-Y.; Song, D.-K.; Kim, H.O. TRPV3 Channel in Keratinocytes in Scars with Post-Burn Pruritus. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, 2425, doi:10.3390/ijms18112425.
204. Feng, Q. Temperature Sensing by Thermal TRP Channels: Thermodynamic Basis and Molecular Insights. *Curr Top Membr* **2014**, *74*, 19–50, doi:10.1016/B978-0-12-800181-3.00002-6.
205. Burns, D.; Venditti, V.; Potoyan, D.A. Temperature-Sensitive Contact Modes Allosterically Gate TRPV3 2023, 2023.01.02.522497.
206. McDade, S.S.; Patel, D.; Moran, M.; Campbell, J.; Fenwick, K.; Kozarewa, I.; Orr, N.J.; Lord, C.J.; Ashworth, A.A.; McCance, D.J. Genome-Wide Characterization Reveals Complex Interplay between TP53 and TP63 in Response to Genotoxic Stress. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, 6270–6285, doi:10.1093/nar/gku299.
207. Wang, X.; Li, G.; Zhang, Y.; Li, L.; Qiu, L.; Qian, Z.; Zhou, S.; Wang, X.; Li, Q.; Zhang, H. Pan-Cancer Analysis Reveals Genomic and Clinical Characteristics of TRPV Channel-Related Genes. *Frontiers in Oncology* **2022**, *12*.
208. Karttunen, S.; Duffield, M.; Scrimgeour, N.R.; Squires, L.; Lim, W.L.; Dallas, M.L.; Scragg, J.L.; Chicher, J.; Dave, K.A.; Whitelaw, M.L.; et al. Oxygen-Dependent Hydroxylation by FIH Regulates the TRPV3 Ion Channel. *J Cell Sci* **2015**, *128*, 225–231, doi:10.1242/jcs.158451.
209. Tissue Expression of TRPV3 - Summary - The Human Protein Atlas Available online: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000167723-TRPV3/tissue> (accessed on 26 April 2023).
210. Ansary, T.M.; Kamiya, K.; Ohtsuki, M.; Ansary, T.M.; Kamiya, K.; Ohtsuki, M. *Keratinocyte Stem Cells: Role in Aging*; IntechOpen, 2022; ISBN 978-1-80355-100-5.
211. Chung, M.-K.; Lee, H.; Mizuno, A.; Suzuki, M.; Caterina, M. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Activates and Sensitizes the Heat-Gated Ion Channel TRPV3. *The Journal of neuroscience : the*

Références

- official journal of the Society for Neuroscience* **2004**, *24*, 5177–5182, doi:10.1523/JNEUROSCI.0934-04.2004.
212. Chung, M.-K.; Güler, A.D.; Caterina, M.J. Biphasic Currents Evoked by Chemical or Thermal Activation of the Heat-Gated Ion Channel, TRPV3. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15928–15941, doi:10.1074/jbc.M500596200.
213. Lou, Z.; Wei, J.; Riethman, H.; Baur, J.A.; Voglauer, R.; Shay, J.W.; Wright, W.E. Telomere Length Regulates ISG15 Expression in Human Cells. *Aging (Albany NY)* **2009**, *1*, 608–621.
214. Barth, E.; Srivastava, A.; Stojiljkovic, M.; Frahm, C.; Axer, H.; Witte, O.W.; Marz, M. Conserved Aging-Related Signatures of Senescence and Inflammation in Different Tissues and Species. *Aging (Albany NY)* **2019**, *11*, 8556–8572, doi:10.18632/aging.102345.
215. Waldera Lupa, D.M.; Kalfalah, F.; Safferling, K.; Boukamp, P.; Poschmann, G.; Volpi, E.; Götz-Rösch, C.; Bernerd, F.; Haag, L.; Huebenthal, U.; et al. Characterization of Skin Aging-Associated Secreted Proteins (SAASP) Produced by Dermal Fibroblasts Isolated from Intrinsically Aged Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2015**, *135*, 1954–1968, doi:10.1038/jid.2015.120.
216. de Araújo, R.; Lôbo, M.; Trindade, K.; Silva, D.F.; Pereira, N. Fibroblast Growth Factors: A Controlling Mechanism of Skin Aging. *SPP* **2019**, *4*, 275–282, doi:10.1159/000501145.
217. Wang, S.; Drummond, M.L.; Guerrero-Juarez, C.F.; Tarapore, E.; MacLean, A.L.; Stabell, A.R.; Wu, S.C.; Gutierrez, G.; That, B.T.; Benavente, C.A.; et al. Single Cell Transcriptomics of Human Epidermis Identifies Basal Stem Cell Transition States. *Nat Commun* **2020**, *11*, 4239, doi:10.1038/s41467-020-18075-7.
218. Orioli, D.; Dellambra, E. Epigenetic Regulation of Skin Cells in Natural Aging and Premature Aging Diseases. *Cells* **2018**, *7*, 268, doi:10.3390/cells7120268.
219. Lei, Q.; Gao, F.; Liu, T.; Ren, W.; Chen, L.; Cao, Y.; Chen, W.; Guo, S.; Zhang, Q.; Chen, W.; et al. Extracellular Vesicles Deposit PCNA to Rejuvenate Aged Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Slow Age-Related Degeneration. *Sci Transl Med* **2021**, *13*, eaaz8697, doi:10.1126/scitranslmed.aaz8697.
220. Théry, C.; Ostrowski, M.; Segura, E. Membrane Vesicles as Conveyors of Immune Responses. *Nat Rev Immunol* **2009**, *9*, 581–593, doi:10.1038/nri2567.
221. Klasson, S.; Svensson, K.; Wollmer, P.; Velander, P.; Svensson, H. Blood Flow Dynamics and Sensitivity in Breasts after Reconstruction with DIEP-Flap. *J Plast Surg Hand Surg* **2014**, *48*, 407–411, doi:10.3109/2000656X.2014.903194.
222. DeSouza, C.A.; Shapiro, L.F.; Clevenger, C.M.; Dinunno, F.A.; Monahan, K.D.; Tanaka, H.; Seals, D.R. Regular Aerobic Exercise Prevents and Restores Age-Related Declines in Endothelium-Dependent Vasodilation in Healthy Men. *Circulation* **2000**, *102*, 1351–1357, doi:10.1161/01.CIR.102.12.1351.

Références

223. Rabelo, E.R.; Rohde, L.E.; Schaan, B.D.; Rubira, M.C.; Ruschel, K.B.; Plentz, R.D.M.; Consolim-Colombo, F.M.; Irigoyen, M.C.; Junior, H.M. Bradykinin or Acetylcholine as Vasodilators to Test Endothelial Venous Function in Healthy Subjects. *Clinics* **2008**, *63*, 677–682, doi:10.1590/S1807-59322008000500017.
224. Saito, R.; Nonaka, S.; Konishi, H.; Takano, Y.; Shimohigashi, Y.; Matsumoto, H.; Ohno, M.; Kamiya, H. Pharmacological Properties of the Tachykinin Receptor Subtype in the Endothelial Cell and Vasodilation. *Ann N Y Acad Sci* **1991**, *632*, 457–459, doi:10.1111/j.1749-6632.1991.tb33155.x.
225. Cardillo, C.; Kilcoyne, C.M.; Quyyumi, A.A.; Cannon, R.O.; Panza, J.A. Selective Defect in Nitric Oxide Synthesis May Explain the Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients with Essential Hypertension. *Circulation* **1998**, *97*, 851–856, doi:10.1161/01.cir.97.9.851.
226. Cardillo, C.; Kilcoyne, C.M.; Quyyumi, A.A.; Cannon, R.O.; Panza, J.A. Decreased Vasodilator Response to Isoproterenol during Nitric Oxide Inhibition in Humans. *Hypertension* **1997**, *30*, 918–921, doi:10.1161/01.hyp.30.4.918.
227. Newby, D.E.; Boon, N.A.; Webb, D.J. Comparison of Forearm Vasodilatation to Substance P and Acetylcholine: Contribution of Nitric Oxide. *Clin Sci (Lond)* **1997**, *92*, 133–138, doi:10.1042/cs0920133.
228. Gilligan, D.M.; Guetta, V.; Panza, J.A.; García, C.E.; Quyyumi, A.A.; Cannon, R.O. Selective Loss of Microvascular Endothelial Function in Human Hypercholesterolemia. *Circulation* **1994**, *90*, 35–41, doi:10.1161/01.cir.90.1.35.
229. Dawes, M.; Chowienzyk, P.J.; Ritter, J.M. Effects of Inhibition of the L-Arginine/Nitric Oxide Pathway on Vasodilation Caused by Beta-Adrenergic Agonists in Human Forearm. *Circulation* **1997**, *95*, 2293–2297, doi:10.1161/01.cir.95.9.2293.
230. Raafat, A.M.; Hofseth, L.J.; Li, S.; Bennett, J.M.; Haslam, S.Z. A Mouse Model to Study the Effects of Hormone Replacement Therapy on Normal Mammary Gland during Menopause: Enhanced Proliferative Response to Estrogen in Late Postmenopausal Mice*. *Endocrinology* **1999**, *140*, 2570–2580, doi:10.1210/endo.140.6.6634.
231. Fernández-Peña, C.; Reimúndez, A.; Viana, F.; Arce, V.M.; Señarís, R. Sex Differences in Thermoregulation in Mammals: Implications for Energy Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2023**, *14*, 1093376, doi:10.3389/fendo.2023.1093376.
232. Charkoudian, N.; Stachenfeld, N. Sex Hormone Effects on Autonomic Mechanisms of Thermoregulation in Humans. *Autonomic Neuroscience* **2016**, *196*, 75–80, doi:10.1016/j.autneu.2015.11.004.
233. Greenfield, A.M.; Alba, B.K.; Giersch, G.E.W.; Seeley, A.D. Sex Differences in Thermal Sensitivity and Perception: Implications for Behavioral and Autonomic Thermoregulation. *Physiol Behav* **2023**, *263*, 114126, doi:10.1016/j.physbeh.2023.114126.

Références

234. Lautenbacher, S.; Strian, F. Sex Differences in Pain and Thermal Sensitivity: The Role of Body Size. *Percept Psychophys* **1991**, *50*, 179–183, doi:10.3758/bf03212218.
235. Ban, C.; Kwoen, D.-H. Objective Quantitation of Focal Sweating Areas Using a Mouse Sweat-Assay Model. *Bio Protoc* **2021**, *11*, e4047, doi:10.21769/BioProtoc.4047.
236. Chen, Z.; Zhao, J.; Yan, Y.; Zhang, L.; Du, L.; Liu, X.; Cao, M.; Wang, C.; Tang, Y.; Li, H. Differential Distribution and Genetic Determination of Eccrine Sweat Glands and Hair Follicles in the Volar Skin of C57BL/6 Mice and SD Rats. *BMC Veterinary Research* **2022**, *18*, 316, doi:10.1186/s12917-022-03416-z.
237. Vilches, J.J.; Ceballos, D.; Verdú, E.; Navarro, X. Changes in Mouse Sudomotor Function and Sweat Gland Innervation with Ageing. *Autonomic Neuroscience* **2002**, *95*, 80–87, doi:10.1016/S1566-0702(01)00359-9.
238. Hu, Y.; Converse, C.; Lyons, M. c.; Hsu, W. h. Neural Control of Sweat Secretion: A Review. *British Journal of Dermatology* **2018**, *178*, 1246–1256, doi:10.1111/bjd.15808.
239. Ramírez-Barrantes, R.; Carvajal-Zamorano, K.; Rodriguez, B.; Cordova, C.; Lozano, C.; Simon, F.; Díaz, P.; Muñoz, P.; Marchant, I.; Latorre, R.; et al. TRPV1-Estradiol Stereospecific Relationship Underlies Cell Survival in Oxidative Cell Death. *Front Physiol* **2020**, *11*, 444, doi:10.3389/fphys.2020.00444.
240. Seol, S.-H.; Chung, G. Estrogen-Dependent Regulation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) and P2X Purinoceptor 3 (P2X3): Implication in Burning Mouth Syndrome. *J Dent Sci* **2022**, *17*, 8–13, doi:10.1016/j.jds.2021.06.007.
241. Zhang, X.; Huang, J.; McNaughton, P.A. NGF Rapidly Increases Membrane Expression of TRPV1 Heat-Gated Ion Channels. *EMBO J* **2005**, *24*, 4211–4223, doi:10.1038/sj.emboj.7600893.
242. Woolstra, O.; Huber, A. Post-Translational Modifications of TRP Channels. *Cells* **2014**, *3*, 258–287, doi:10.3390/cells3020258.
243. Chevalier, F.P.; Rorteau, J.; Lamartine, J. MicroRNAs in the Functional Defects of Skin Aging. *Non-Coding RNAs* **2019**, doi:10.5772/intechopen.89689.
244. Zhang, N.; Fu, Z.; Linke, S.; Chicher, J.; Gorman, J.J.; Visk, D.; Haddad, G.G.; Poellinger, L.; Peet, D.J.; Powell, F.; et al. The Asparaginyl Hydroxylase Factor Inhibiting HIF-1 α Is an Essential Regulator of Metabolism. *Cell Metabolism* **2010**, *11*, 364–378, doi:10.1016/j.cmet.2010.03.001.
245. Numazaki, M.; Tominaga, T.; Toyooka, H.; Tominaga, M. Direct Phosphorylation of Capsaicin Receptor VR1 by Protein Kinase Cepsilon and Identification of Two Target Serine Residues. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13375–13378, doi:10.1074/jbc.C200104200.
246. Jung, J.; Shin, J.S.; Lee, S.-Y.; Hwang, S.W.; Koo, J.; Cho, H.; Oh, U. Phosphorylation of Vanilloid Receptor 1 by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II Regulates Its Vanilloid Binding. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 7048–7054, doi:10.1074/jbc.M311448200.

Références

247. Xu, H.; Zhao, H.; Tian, W.; Yoshida, K.; Rouillet, J.-B.; Cohen, D.M. Regulation of a Transient Receptor Potential (TRP) Channel by Tyrosine Phosphorylation. SRC Family Kinase-Dependent Tyrosine Phosphorylation of TRPV4 on TYR-253 Mediates Its Response to Hypotonic Stress. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 11520–11527, doi:10.1074/jbc.M211061200.
248. Vyklicka, L.; Boukalova, S.; Macikova, L.; Chvojka, S.; Vlachova, V. The Human Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Channel Is Sensitized via the ERK Pathway. *J Biol Chem* **2017**, *292*, 21083–21091, doi:10.1074/jbc.M117.801167.
249. Greco, C.; Leclerc-Mercier, S.; Chaumon, S.; Doz, F.; Hadj-Rabia, S.; Molina, T.; Boucheix, C.; Bodemer, C. Use of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib to Treat Palmoplantar Keratoderma in Patients With Olmsted Syndrome Caused by TRPV3 Mutations. *JAMA Dermatol* **2020**, *156*, 191–195, doi:10.1001/jamadermatol.2019.4126.
250. Li, C.; Ma, W.; Yin, S.; Liang, X.; Shu, X.; Pei, D.; Egan, T.M.; Huang, J.; Pan, A.; Li, Z. Sorting Nexin 11 Regulates Lysosomal Degradation of Plasma Membrane TRPV3. *Traffic* **2016**, *17*, 500–514, doi:10.1111/tra.12379.
251. Xiao, R.; Tian, J.; Tang, J.; Zhu, M.X. The TRPV3 Mutation Associated with the Hairless Phenotype in Rodents Is Constitutively Active. *Cell Calcium* **2008**, *43*, 334–343, doi:10.1016/j.ceca.2007.06.004.
252. Yadav, M.; Goswami, C. TRPV3 Mutants Causing Olmsted Syndrome Induce Impaired Cell Adhesion and Nonfunctional Lysosomes. *Channels (Austin)* **2016**, *11*, 196–208, doi:10.1080/19336950.2016.1249076.
253. Dong, X.; Wang, X.; Xu, H. TRP Channels of Intracellular Membranes. *J Neurochem* **2010**, *113*, 313–328, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06626.x.
254. Zhang, X.; Hu, M.; Yang, Y.; Xu, H. Organellar TRP Channels. *Nat Struct Mol Biol* **2018**, *25*, 1009–1018, doi:10.1038/s41594-018-0148-z.
255. Burnstock, G.; Verkhratsky, A. Evolutionary Origins of the Purinergic Signalling System. *Acta Physiol (Oxf)* **2009**, *195*, 415–447, doi:10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x.
256. Burnstock, G. Purine and Purinergic Receptors. *Brain Neurosci Adv* **2018**, *2*, 2398212818817494, doi:10.1177/2398212818817494.
257. Verkhratsky, A.; Burnstock, G. Biology of Purinergic Signalling: Its Ancient Evolutionary Roots, Its Omnipresence and Its Multiple Functional Significance. *Bioessays* **2014**, *36*, 697–705, doi:10.1002/bies.201400024.
258. Moehring, F.; Cowie, A.M.; Menzel, A.D.; Weyer, A.D.; Grzybowski, M.; Arzua, T.; Geurts, A.M.; Palygin, O.; Stucky, C.L. Keratinocytes Mediate Innocuous and Noxious Touch via ATP-P2X4 Signaling. *Elife* **2018**, *7*, e31684, doi:10.7554/eLife.31684.
259. Lohman, A.W.; Billaud, M.; Isakson, B.E. Mechanisms of ATP Release and Signalling in the Blood Vessel Wall. *Cardiovascular Research* **2012**, *95*, 269–280, doi:10.1093/cvr/cvs187.

Références

260. Hou, Q.; Barr, T.; Gee, L.; Vickers, J.; Wymer, J.; Borsani, E.; Rodella, L.; Getsios, S.; Burdo, T.; Eisenberg, E.; et al. Keratinocyte Expression of Calcitonin Gene-Related Peptide β : Implications for Neuropathic and Inflammatory Pain Mechanisms. *Pain* **2011**, *152*, 2036–2051, doi:10.1016/j.pain.2011.04.033.
261. Chang, Y.-C.; Lin, W.-M.; Hsieh, S.-T. Effects of Aging on Human Skin Innervation. *NeuroReport* **2004**, *15*, 149.
262. Gøransson, L.G.; Mellgren, S.I.; Lindal, S.; Omdal, R. The Effect of Age and Gender on Epidermal Nerve Fiber Density. *Neurology* **2004**, *62*, 774–777, doi:10.1212/01.wnl.0000113732.41127.8f.

Annexes

Annexes 1

Annexe 1 : Effet d'un antioxydant sur la fonction vasculaire cutanée au cours du vieillissement - *biomedecine* (Novembre 2022)

Ces résultats ont été publiés dans le journal *biomedecine* en Novembre 2023 sous la forme d'un article scientifique que je signe en deuxième auteur. L'intégralité du manuscrit est présentée pages 195-213.

Résumé

L'application d'une faible pression au niveau de la peau conduit à la mise en place d'un système de défense caractérisé par une augmentation du flux sanguin cutané. On parle de vasodilatation induite par la pression (PIV). Ce mécanisme dépend d'une part des fibres nerveuses sensoriels cutanés (CGRP) et d'autre part des cellules endothéliales (NO, PGI₂) des micro-vaisseaux dermiques. Cependant, la fonctionnalité de ce système neurovasculaire sensoriel est diminué avec l'âge (chez l'être humain et la souris), et pourrait favoriser l'apparition de troubles cutanés tels que des ulcères de pression chez les individus âgés. La mise en place d'une stratégie permettant d'améliorer les propriétés neurovasculaires cutanées est cruciale compte-tenu de la population vieillissante.

Les antioxydants ont des vertus bénéfiques aussi bien à l'échelle microscopique que macroscopique. L'acide alpha-lipoïque (LPA) est un puissant anti-oxydant qui a déjà montré divers effets positifs sur la peau (prolifération/ différenciation des kératinocytes, cicatrisation, limite le photo-vieillessement). Par ailleurs, le LPA, en limitant le stress oxydatif, permet de contrer la diminution de la PIV cutanée chez les souris diabétiques à court terme en préservant la fonction endothéliale (autrement dit en préservant la production de NO et/ou en empêchant la destruction du NO). Cependant, l'effet du LPA sur l'homéostasie de la peau et le dysfonctionnement vasculaire au cours du vieillissement reste inexploré.

Cet article, auquel j'ai participé lors de ma thèse, définit l'effet de l'acide alpha-lipoïque (LPA) sur le maintien de la fonction vasculaire cutanée au cours du vieillissement *via* une approche *in vivo*.

Nous avons étudié les capacités de vasodilatation cutanée en réponse à une faible pression (PIV), ainsi que la fonction endothéliale et la sensibilité sensorielle chez deux souches de rats, Brown Norway « healthy aging » et Wistar « Poorly aging ». Ces mesures ont été réalisées sur des rats de divers âges (6 mois, 12 mois et 24 mois) avec un régime supplémenté, ou non, par 0.5% de LPA.

Annexes 1



Chez les rats Wistar, la vasodilatation induite par une faible pression locale est drastiquement diminuée dès 12 mois, en revanche ce défaut n'apparaît qu'à 24 mois pour la souche Brown Norway. De manière intéressante, le LPA semble augmenter les capacités de résistance de la peau des Brown Norway avec l'âge, mais pas chez les Wistar. Bien que les Wistar aient une diminution précoce (6 mois) de sensibilité sensorielle (Tail Flick et Von frey), le traitement LPA a permis de restaurer totalement ou partiellement les sensibilités nerveuses thermiques et mécaniques de la peau dans les deux souches à 12 et 24 mois. Dans un dernier temps, nous nous sommes intéressés à la fonction endothéliale avec l'âge. Nous avons montré que les rat Brown Norway ne présentent pas de défaut de perfusion cutanée au repos avec l'âge, contrairement aux rats Wistar où la diminution du flux sanguin observée à 12 mois a pu être minimisée par le traitement au LPA. Nous avons montré que la vasodilatation endothélium-dépendante induite par ACh ainsi que la voie du NO était maintenue avec l'âge dans la souche Brown Norway, et tendait à diminuer avec l'âge chez les Wistar. Enfin, le LPA, n'ayant pas d'effet sur les Brown Norway, semble augmenter la biodisponibilité de NO chez les Wistar et favorise donc la vasodilatation induite par l'ACh à 12 mois.

Bien que le vieillissement cutané ait affecté les deux souches, nos résultats montrent une apparition précoce de différents troubles liés à l'âge dans la souche Wistar par rapport à la souche Brown Norway (PIV, perfusion cutanée basale, la fonction endothéliale). Toutefois nos données mettent en évidence, pour la première fois, un effet bénéfique du traitement au LPA sur le déclin sensoriel cutané lié à l'âge, dans les deux souches de rats. Par ailleurs, le LPA a également permis de restaurer la voie du NO chez les rats Wistar d'âge moyen, améliorant ainsi la fonction endothéliale. Les modalités de traitement du LPA nécessitent d'être approfondies (seul ou en combinaison avec d'autres molécules) afin d'améliorer l'effet du LPA sur la résistance de la peau à la pression et, par conséquent, sur le développement des troubles cutanés tels que des lésions dues à la pression. Ainsi, la génétique mais également les habitudes de vie peuvent avoir un effet bénéfique sur le vieillissement, ce qui amène à une forte variabilité entre des individus de même âge. Par exemple, j'ai pu observer que l'expression de *TRPV3* pouvait être plus importante dans la peau d'un individu de 67 ans par rapport à un individu de 66 ans. De plus, en culture 2D, il existe une très grande variabilité entre les différentes souches de kératinocytes primaires, jeunes ou âgés, qui complique les analyses, notamment dans la tranche d'âge de 45 à 60 ans où l'on peut aussi bien avoir les caractéristiques d'individus « jeunes » que d'individus « âgés ».



Article

Alpha-Lipoic Acid Supplementation Restores Early Age-Related Sensory and Endothelial Dysfunction in the Skin

Anne-France de Bengy^{1,†}, Johanna Decorps^{2,†}, Lisa S. Martin², Aurélie Pagnon³, Fabien P. Chevalier² , Dominique Sigauco-Roussel² and Bérengère Fromy^{2,*} ¹ AF BioCell, 59 Avenue du Point du Jour, 69005 Lyon, France² CNRS, LBTI UMR5305, Univ. Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 7 Passage du Vercors, CEDEX 7, 69367 Lyon, France³ Novotec Labs, ZAC du Chêne, Europarc, 11 rue Edison, 69500 Bron, France

* Correspondence: berengere.fromy@ibcp.fr; Tel.: +33-472-722686

† These authors contributed equally to this work.



Citation: de Bengy, A.-F.; Decorps, J.; Martin, L.S.; Pagnon, A.; Chevalier, F.P.; Sigauco-Roussel, D.; Fromy, B. Alpha-Lipoic Acid Supplementation Restores Early Age-Related Sensory and Endothelial Dysfunction in the Skin. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2887. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112887>

Academic Editors: Manfredi Tesaro and Annalisa Noce

Received: 21 September 2022

Accepted: 8 November 2022

Published: 10 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Many changes characterize skin aging, and the resulting dysfunctions still constitute a real challenge for our society. The aim of this study was to compare the skin aging of two rat strains, Wistar and Brown Norway (BN), considered as “poorly aging” and “healthy aging” models, respectively, and to assess the effect of alpha-lipoic acid (LPA), especially on skin microcirculation. To this purpose, various skin characteristics were studied at 6, 12, and 24 months and compared to the results of LPA treatment performed at 12 or 24 months. Skin aging occurred in both strains, but we showed an early occurrence of different age-related disorders in the Wistar strain compared to BN strain, especially regarding weight gain, glycemia dysregulation, basal skin perfusion, endothelial function, and skin resistance to low pressure. LPA treatment tended to improve skin resistance to low pressure in BN but not in Wistar despite the improvement of basal skin perfusion, endothelial function, and skin sensory sensitivity. Overall, this study confirmed the healthier aging of BN compared to Wistar strain and the positive effect of LPA on both general state and skin microcirculation.

Keywords: skin aging; alpha lipoic acid; Brown Norway; Wistar; microcirculation; blood flow; pressure-induced vasodilation; skin resistance to pressure

1. Introduction

Many physiological changes are correlated with aging, including altered vascular signaling and concomitant endothelial dysfunction. In the skin, endothelial dysfunction has been well described in humans [1–3] and in rodents [4], with significant interindividual variation in the age of onset [5]. In addition to indicating cardiovascular pathogenesis [6], it also favors skin disorders such as pressure injury, whose prevalence remains too high in the aging population [7–9]. A decline in sensory nerve function and a disturbance in its modulation of microvascular blood flow (the sensory neurovascular system) were also reported with aging, worsening the risk for pressure injury [8] and delaying tissue repair [10].

In healthy skin, a local application of low pressure induces an increase in cutaneous blood flow, called pressure-induced vasodilation (PIV) [11]. This mechanism results from the interaction of sensory nerve endings and vascular endothelium of skin vessels. Some vasodilator peptides such as calcitonin gene-related peptide (CGRP) secreted by capsaicin-sensitive nerve fibers can stimulate endothelial cells and induce the secretion of paracrine factors such as nitric oxide (NO) or prostaglandins that stimulate the relaxation of the smooth muscle cells surrounding blood vessels and, thus, vasodilation [12]. Individuals without a normal PIV response show an early decrease of cutaneous blood flow to the application of very low pressures, reflecting a vascular fragility of the skin associated with higher risk of pressure ulcer formation [13]. With aging, PIV ability was found reduced in

60 year old human and 24 month old mouse skin compared to younger adults, and this reduction was associated with a dysfunction of endothelial cells and/or sensory perception [1,4]. The excess of reactive oxygen species (ROS) production related to endogenous antioxidant defenses is a primary mechanism contributing to reduced NO bioavailability, inducing vascular dysfunction with age [14–16].

Lipoic acid (LPA) has been shown to have many positive effects on fragile skin. A topical application for 12 weeks with a cream containing 5% LPA was reported to improve significantly clinical characteristics related to photoaging of human facial skin, especially skin roughness [17]. Effective epidermal thickening has been confirmed in human skin after a treatment containing LPA applied for 6 months [18]. These positive effects of LPA reported in humans were also demonstrated by several animal studies [19–21], thus highlighting the role of LPA in improving several skin pathological conditions. Moreover, LPA is known for his strong antioxidant effects [22]. In vivo and in vitro in monocyte/macrophage-like cells, LPA and dihydro-lipoic acid (DHLA) have been reported in mice to inhibit effectively NO and prostaglandin E2 formation induced by lipopolysaccharide (LPS) in correlation with NO synthase (NOS) and cyclooxygenase-2 (COX2) inhibition [23]. In addition, LPA treatment prevented the reduction of skin PIV in short-term diabetic mice by limiting oxidative stress and by preserving endothelial function (i.e. preserving NO production and/or preventing NO destruction) [24]. However, the ability of LPA to improve skin homeostasis and limit vascular dysfunction during aging remains unexplored.

Chronological aging is an inexorable process, but it can also be accelerated with the development of various pathologies depending on the individual. This led us to focus on the effect of LPA on cutaneous microcirculation during aging in two rat strains, particularly considering endothelial function and PIV abilities. The Brown Norway (BN) strain is considered as a “healthy aging model” since it is known to survive relatively disease-free until a very old age [25]. In contrast, the Wistar strain is reported as a “poorly aging model” since it develops more diseases with aging. To observe the progressive evolution during skin aging, we studied both strains at three different ages: young adult (6 months), middle-aged (12 months), and old rats (24 months) [26].

Age-related disorders (weight gain, glycemia dysregulation, cutaneous endothelial dysfunction, and inability of the skin to resist low pressures) were more pronounced or earlier in the Wistar strain than in the BN strain. Despite some beneficial effects on the general body characteristics, NO bioavailability, and cutaneous sensory thresholds, LPA treatment failed to restore skin resistance in the Wistar strain, even in middle-aged rats. In contrast, LPA tended to improve skin resistance to pressure in middle-aged BN rats, delaying the decrease in skin blood flow to higher pressures.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

2.1.1. Animal Experiments

The experiments were performed in Wistar and BN rat strains (Harlan, Gannat, France) aged 6, 12, and 24 months. To avoid inter-sex variability, only male rats were used. The animals were housed with ad libitum access to food and water, in a regulated environment with a constant temperature of 24 °C and a day/night cycle of 12 h/12 h. All experiments were conducted in accordance with European Union recommendations for animal experimentation and approved by the Animal Experimentation Committee of the University Claude Bernard Lyon 1 (protocol n° BH2011-38). Special effort was made to minimize the number, as well as the stress and suffering, of rats used in this study. Before experimentation, all animals were acclimatized for at least 1 week.

2.1.2. LPA Treatment

Separate groups of rats aged 12 or 24 months of both strains were fed a diet supplemented with 0.5% alpha-lipoic acid (LPA) for 4 weeks prior to the experiments to assessing

its effect on age-related changes compared to untreated young (6 month old) and untreated age-matched rats in all parameters described below.

2.2. General State

The animal weight and the systolic arterial blood pressure were assessed for each animal, and a glucose tolerance test was performed after a 12 h fast. Glucose (30%; 0.7 mL/100 g) was administered by gavage at time 0. Blood was collected from the tail vein at different times, including 2.5 h after feeding, and the blood glucose concentration was measured using a glucometer (Accu-Check® Active; Roche, Lyon, France).

2.3. Microvascular Experiments

Measurement of skin blood flow was performed using noninvasive laser Doppler techniques under well-calibrated conditions (skin temperature, depth of anesthesia, and animal stress) as in previous studies with rats [27–29].

2.3.1. Animal Preparation

First, 48 h before each experiment, the rats previously anesthetized using a volatile anesthetic (isoflurane) were shaved and depilated on the back and thighs using Veet® depilatory cream (Reckitt Benckiser, Massy, France).

On the day of the experiment, the animal was anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium thiopental at 65 mg/kg (Nesdonal; Merial, Lyon, France). After testing the ocular reflex and pinching the paw to control anesthesia depth, the animal was placed prone in an environmentally controlled incubator (MMS, Chelles, France) maintaining the skin temperature at 35.0 ± 0.5 °C. This cutaneous temperature was measured using a thermocouple (Physitemp BAT-12, Physitemp instruments, Clifton, NJ, USA). Systolic arterial blood pressure was recorded noninvasively at the tail (XBP-1000, Kent Scientific, Torrington, CT, USA) before and at the end of the experiment to check its stability regarding the skin blood flow recording.

At least 10 min of observation was implemented for the stabilization of arterial blood pressure and skin temperature before starting the cutaneous microvascular measurements.

2.3.2. Skin Resistance to Low-Pressure Application (PIV)

PIV was assessed using a weighbridge adapted to hold a laser Doppler probe (PF801, Periflux, Perimed AB, Järfälla, Sweden) as previously described [27]. After a 1 min control period, local and regularly increasing pressure was applied at $11.1 \text{ Pa} \cdot \text{s}^{-1}$ for 20 min on the hairless thigh skin of the anesthetized rat. The laser Doppler flow (LDF) signals were averaged every 30 s to reduce the instantaneous variability of the signals due to vasomotion.

In each condition, a significant increase in blood flow compared to the baseline value (calculated as the average over the 1 min control period prior to the onset of local pressure increase) was validated using statistical analysis (Kruskal–Wallis test). PIV was reported as the maximal percentage increase in skin blood flow from baseline in response to local pressure application. As pressure continues to increase, skin blood flow begins to decrease, reaching a level under the baseline value at a crushing pressure determined from the mean curve (Figure 1). From the curves representing the variations in skin blood flow in response to local application of increasing pressure, we determined the positive area under the curve from baseline (positive AUC from baseline) representing the whole excess of perfusion until the crushing pressure was reached (Figure 1). We also determined the negative AUC from baseline corresponding to the deficit of perfusion induced by pressures higher than the crushing pressure (Figure 1).

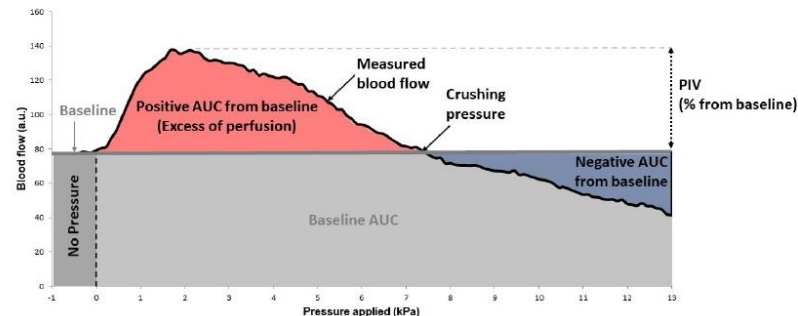


Figure 1. Evolution of the blood flow under pressure application and definition of PIV, along with crushing pressure, positive and negative AUC from baseline.

2.3.3. Endothelium Dependent or Independent Vasodilation

To assess the functional integrity of skin microcirculation, the endothelium-dependent and -independent vasodilator responses were used to evaluate vascular endothelium or smooth muscle function, respectively. The endothelium-independent vasodilation was induced in the cutaneous microcirculation by iontophoretic delivery of 67 mM sodium nitroprusside (SNP) using cathodal current (100 μ A) for 30 s, while the endothelium-dependent vasodilation was induced by iontophoretic delivery of 5.5 mM acetylcholine (ACh) using anodal current (100 μ A) for 20 s. The iontophoretic delivery was performed using a laser Doppler probe (481-1, Perimed AB, Järfälla, Sweden) positioned on the hairless back skin of the anesthetized rat. This probe also allowed for cutaneous blood flow recording.

Data collection began with a 1 min basal period prior to the onset of current application and was continuously recorded for 16 min. Preliminary studies were performed to verify that there was no effect of iontophoretic delivery of deionized water with the use of anodal and cathodal currents of 100 μ A for 20 s and 30 s, respectively.

2.3.4. Contribution of NOS and COX Pathways in ACh-Mediated Vasodilation

For each condition, ACh iontophoresis was performed 10 min following the cutaneous injection of a specific inhibitor of constitutive NOS (N ω -nitro-L-arginine, LNNA, 0.1 mL, 20 mg·kg⁻¹, Sigma, St Quentin Fallavier, France), either alone or in combination with a nonspecific inhibitor of COX (indomethacine, INDO, 0.1 mL, 5 mg·kg⁻¹, Sigma, St Quentin Fallavier, France). Control rats received saline injection.

2.4. Skin Sensory Nerve Fiber Sensitivity Analysis

Stimulus-evoked behavioral methods were used in conscious rats to elicit a withdrawal response in order to evaluate thermal and mechanical sensory sensitivities [30,31].

2.4.1. Tail Flick Test

The conscious rats were held manually, and a cloth was used to cover their head and keep them calm during the experiment. Their tail (about 1.5 cm from the tip) was placed under a radiant heat source produced by a halogen lamp of a device (2TC series 8 Model, ITT Inc. Life science, CA, USA) previously calibrated for 30 s to deliver 50 W of heat. The heating rate was 1.3 °C/s, and the delay in tail removal was measured. A cutoff time of 10 s was imposed to prevent tissue damage. Five measurements of the tail withdrawal latency were taken and averaged for each rat to determine the nociceptive thermal threshold for the animal.

2.4.2. Von Frey Test

The mechanical threshold for hind paw withdrawal was determined using an electronic Von Frey anesthesiometer (Almemo 2390-5 Ahlborn, 2TC Inc., Woodland Hill, CA, USA). Rats were placed in clear Plexiglass boxes on an elevated mesh screen. Mechanical pressure was applied to the plantar surface of the right and left hind paws in a series of ascending forces using a rigid blunt tip. Five measurements of the mechanical threshold were taken and averaged for each rat.

2.4.3. Randall–Selitto Test (Mechanical Noxious Stimuli)

The rat hind paw withdrawal reflex to nociceptive pressure stimulation was determined using the Randall–Selitto assay. When the rat vocalized or withdrew its paw to respond to uniformly increasing pressure, the sinking threshold of the animal was recorded in grams. Five measurements of the mechanical nociceptive threshold were taken and averaged for each rat.

2.5. Statistical Analyses

Data are expressed as means \pm SEM. A two-way ANOVA followed by a Sidak multiple-comparison test was used to determine the statistical difference between the two strains and the three stages of aging (6, 12, and 24 months). According to data normality, a one-way ANOVA or Kruskal–Wallis test followed by Tukey’s or Dunn’s multiple comparison test, respectively, were used to determine LPA effects within each strain. A *p*-value less than 0.05 was regarded as statistically significant.

3. Results

3.1. LPA Limited Weight Gain and Improved Glycemia Regulation of “Healthy Aging” BN strain and “Poorly Aging” Wistar Strain

As expected, all rats gained weight with aging, although BN rats were significantly lighter than Wistar rats regardless of age (Figure 2A). LPA treatment significantly reduced the weight gain at 12 months for BN and Wistar rats (Figure 2D,G). This effect was preserved at 24 months only for BN (Figure 2D).

Following glucose absorption, the blood glucose level of all 6 month old animals returned to basal value after 2.5 h, showing a similar ability to regulate glycemia at 6 months (Figure 2B). This ability was disturbed earlier in Wistar strain (Figure 2H) than in the BN strain (Figure 2E). Indeed, blood glucose level was higher 2.5 h post absorption in Wistar rats compared to BN rats at 12 months (Figure 2B), but no longer at 24 months. LPA treatment only improved this ability to regulate glycemia at 12 months in Wistar compared to age-matched untreated rats (Figure 2H).

The systemic arterial blood pressure was higher in the Wistar strain than BN at 6 and 12 months (Figure 2C). Although values remained in the normal range of systemic arterial blood pressure, aging slightly increased this parameter, especially in 24 month old BN rats (+14% vs. 6 months) (Figure 2F). LPA treatment only decreased this parameter in 24 month old Wistar rats (Figure 2I).

Overall, higher body weight and systolic arterial blood pressure, as well as earlier age-related effects on glycemia regulation, occurred in Wistar rats than in BN rats. These results are in line with previous studies suggesting that the BN strain survives relatively disease-free until very old age [25]. In the Wistar strain, our results highlight the ability of LPA to reduce the age-related weight gain and improve the ability to regulate glycemia only in middle-aged rats. In the BN strain, LPA was able to reduce the slight age-related weight gain at 12 and 24 months. In our models, aging induced only very limited effects on systolic arterial pressure, and LPA treatment only decreased this parameter in 24 month old Wistar rats. These results seem to indicate beneficial effects of LPA on moderate and/or short-term alterations during aging.

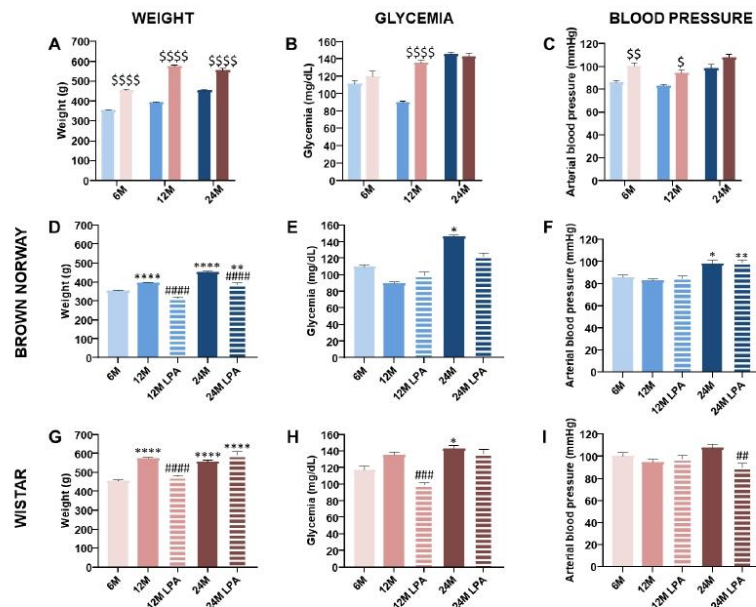


Figure 2. Evolution of the animal weight (A,D,G), glycemia 2.5 h after glucose absorption (B,E,H), and arterial blood pressure (C,F,I) over time with (hatched bars) or without (solid bars) LPA treatment. The results were obtained for both BN (in blue) and Wistar (in pink) strains for 6 month old (6 M), 12 month old (12 M), and 24 month old (24 M) rats previously fed a diet supplemented with α -lipoic acid (0.5%) for 4 weeks (LPA) or not. The results were compared between the two strains (A–C) or within the BN strain (D–F) or Wistar strain (G–I). Error bars represent the standard error of the mean. Statistical analyses were performed revealing significant differences between the two strains for each age group (\$ $p < 0.05$; \$\$ $p < 0.01$; \$\$\$ $p < 0.0001$ vs. BN strain) or within each strain during skin aging when compared to the 6 month condition (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$) and after LPA treatment compared to age-matched untreated condition (## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$).

3.2. LPA Tended to Improve the Age-Related Alterations of Skin Ability to Resist to Low Pressures in Old BN but Not in Wistar Strain

In humans and rodents, a local application of increasing pressure on healthy skin induces an increase in skin blood flow reported as PIV [13].

By applying a local and progressively increasing pressure on skin in 6 month old rats, we confirmed the presence of PIV in both strains (Figure 3), although PIV was about 30% lower in Wistar compared to BN rats (Figure 4A). Interestingly, not only the PIV amplitude (Figure 4A) but also the mean crushing pressure (Figure 3) were lower in the 6 month old Wistar (4.9 kPa) compared to BN rats (7.5 kPa), resulting in a significantly lower excess of perfusion (defined as positive AUC) for 6 month old Wistar rats (Figure 4B). For pressures higher than the crushing pressure, skin blood flow further decreased in both strains, resulting in a similar deficit of perfusion (negative AUC) for 6 month old BN and Wistar rats (Figure 4C,F,I). This highlights a distinct response for very low pressures, rather than for higher pressures leading to ischemia.

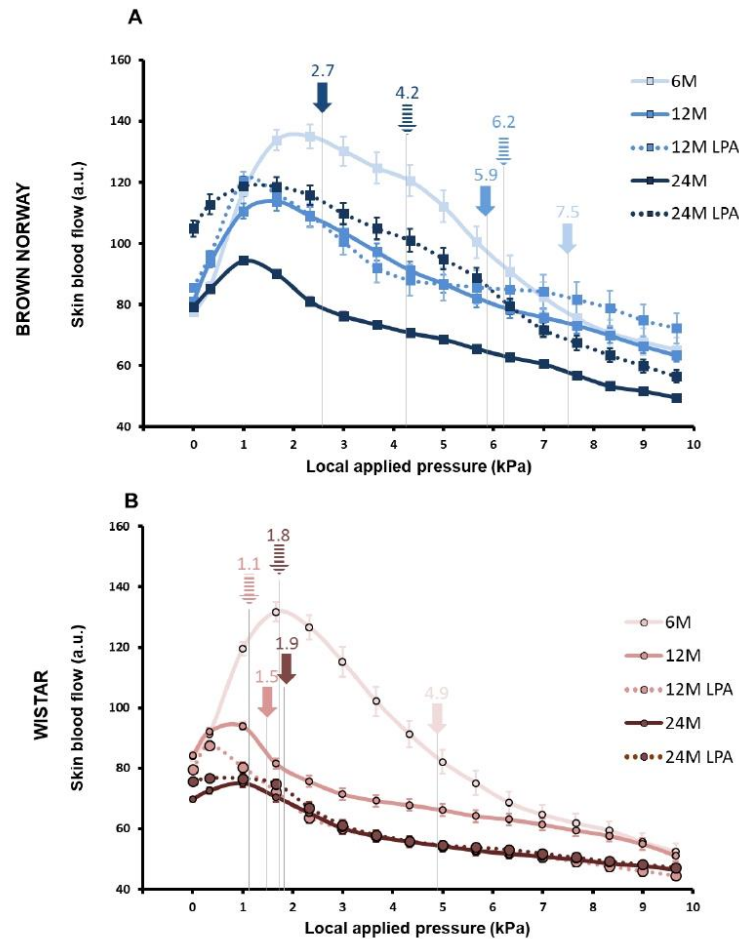


Figure 3. Skin blood flow changes in response to local external pressure application with (hatched lines) or without (solid lines) LPA treatment. The results were obtained for both BN (A) and Wistar (B) strains for 6 month old (6 M), 12 month old (12 M), and 24 month old (24 M) rats previously fed a diet supplemented with α -lipoic acid (0.5%) for 4 weeks (LPA) or not. In each case, the skin blood flow depending on the pressure applied was registered, and the crushing pressure means (numbers and arrows on the curve for each condition) were noted. Error bars represent the standard error of the mean.

As expected with aging [1,4], PIV was reduced in both strains (Figure 4A). However, we observed a gradual decrease in PIV in BN rats (-41% at 12 months and -72% at 24 months compared to 6 month old rats), while a drastic reduction occurred in Wistar from 12 months (-64% at 12 months and -77% at 24 months) (Figure 4D,G). Similar observations were made for positive AUC (Figure 4E,H). Consequently, the mean crushing pressure decreased progressively with aging in BN rats (5.9 kPa at 12 and 2.7 kPa at 24 months) (Figure 3A), while it decreased below 2 kPa from 12 months in Wistar rats (Figure 3B). Regardless of the age, PIV, positive AUC, and mean crushing pressure were lower in Wistar compared to BN rats, even if the difference disappeared at 24 months (Figure 4A,B). For

pressures higher than the crushing pressure, aging did not have any significant effect on the negative AUC for both strains (Figure 4C). Altogether, these results suggest that skin resistance to low pressure decreased with skin aging for both strains but remained higher and decreased later for BN. This is in line with a healthier skin aging for the BN strain compared to Wistar, as previously reported on other parameters [25]. Nevertheless, the results also highlight the occurrence of age-related alterations of skin ability to resist to low pressures even in a “healthy aging” model such as BN strain.

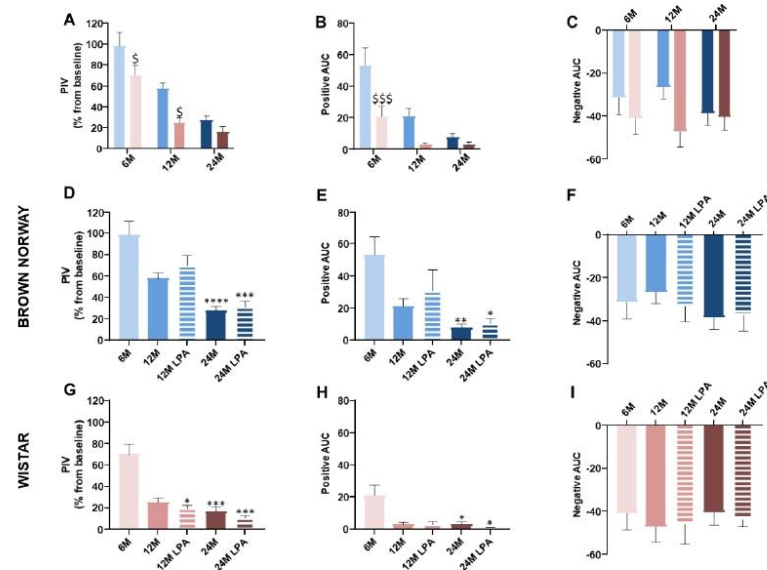


Figure 4. Skin ability to resist low pressure with (hatched lines/bars) or without (solid lines/bars) LPA treatment. The results were obtained for both BN (in blue) and Wistar (in pink) strains for 6 month old (6 M), 12 month old (12 M), and 24 month old (24 M) rats previously fed a diet supplemented with α -lipoic acid (0.5%) for 4 weeks (LPA) or not. The results were compared between the two strains (A–C) or within the BN strain (D–F) or Wistar strain (G–I). In addition to the skin blood flow changes in response to pressure application, the PIV (D,G), the positive AUC from baseline (E,H), and the negative AUC from baseline (F,I) were calculated for each strain in each condition and compared between the two strains (A–C). Error bars represent the standard error of the mean. Statistical analyses were performed revealing significant differences between the two strains for each age group (\$ $p < 0.05$; \$\$\$ $p < 0.001$ vs. BN strain) or within each strain during skin aging when compared to the 6 month condition (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

In BN rats, LPA treatment tended to improve PIV (+21%) and positive AUC (+44%) at 12 months compared to age-matched untreated batches, without reaching significance (Figure 4D,E). This positive effect was almost not observed at 24 months. However, the mean crushing pressure was increased by LPA treatment at 12 months (+5%) and 24 months (+56%) compared to age-matched untreated rats (Figure 3A). This suggests that LPA tended to improve age-related alterations in skin resistance to low pressures by delaying the decrease in skin blood flow from baseline for higher crushing pressure in BN strain.

In contrast, the results obtained in LPA-treated Wistar rats looked very similar compared to untreated populations of the same age (Figure 4G–H). LPA treatment even tended to slightly decrease PIV and positive AUC. In addition, the mean crushing pressure was further decreased at 12 months (−27%) and 24 months (−5%) compared to age-matched untreated Wistar rats (Figure 3B). These results indicate that LPA was not able to improve

skin resistance to pressure at all in Wistar strain, regardless of the age. For pressures higher than the crushing pressure, LPA treatment did not have any significant effect on both strains (Figure 4F,I).

The succession of steps leading to PIV involves (i) pressure stimulation of specialized sensory nerve fibers, (ii) release of vasodilator neuropeptides such as calcitonin gene-related peptide (CGRP) from afferent sensory nerve endings in response to local pressure application, and (iii) liberation of vasodilator endothelial factors leading to vascular smooth muscle relaxation [11–13,27,32]. Because PIV requires intact functional integrity of the sensory nervous system, further experiments were conducted to measure the skin thermal threshold using the tail flick test, as well as the skin mechanical threshold using the Von Frey and Randall–Sellitto tests [33–37].

3.3. LPA Improved Skin Sensory Nerve Sensitivity in Both Strains

At 6 months, the tail flick (+26%) and Von Frey (+67%) thresholds were higher in Wistar rats compared to BN rats, highlighting a lower sensory sensitivity (Figure 5A,B). In contrast, the Randall–Sellitto threshold was not different (around 320 g) between the two strains (Figure 5C).

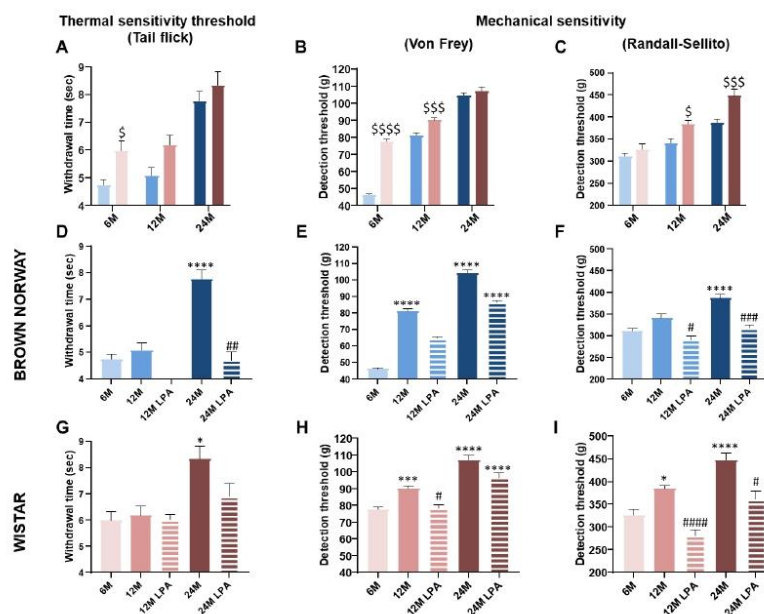


Figure 5. Evolution of the thermal and mechanical skin sensitivity over time with (hatched bars) or without (solid bars) LPA treatment. Thermal sensitivity was assessed using the tail flick test (A,D,G) and mechanical sensitivity with Von Frey (B,E,H) and Randall–Sellitto (C,F,I) tests. The results were obtained for both BN (in blue) and Wistar (in pink) strains for 6 month old (6 M), 12 month old (12 M), and 24 month old (24 M) rats previously fed a diet supplemented with α -lipoic acid (0.5%) for 4 weeks (LPA) or not. Error bars represent the standard error of the mean. Statistical analyses were performed revealing significant differences between the two strains for each age group (\$ $p < 0.05$; \$\$\$ $p < 0.001$; \$\$\$\$ $p < 0.0001$ vs. BN strain) or during skin aging when compared to the 6 month condition (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$) and after LPA treatment compared to age-matched untreated condition (# $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; #### $p < 0.0001$).

A great deal of evidence suggests that sensory thresholds increase with aging, indicating a decline in sensory capacities [38–40]. As expected, thermal and mechanical thresholds increased with aging in both strains (Figure 5A–C). However, the deficit in mechanical detection threshold was observed in both strains from 12 months, while the thermal sensitivity was reduced only at 24 months (Figure 5D–I). This growing sensory neuropathy could contribute, at least partially, to the age-related decrease in cutaneous ability to withstand low pressures. Despite some differences between assays, the Wistar strain overall had higher cutaneous thermal and mechanical thresholds compared to the BN strain (Figure 5A–C). This indicates lower skin sensitivity in the Wistar strain regardless of the age, which is consistent with its low resistance to low pressures (lower PIV and positive AUC compared to BN) (Figures 3 and 4). Interestingly, we observed almost similar values between the 12 month old BN and the 6 month old Wistar rats for the Von Frey threshold (Figure 5B) and Randall–Sellito threshold (Figure 5C), as well as for the PIV (Figure 4A) and the positive AUC (Figure 4B). This supports the potential link between skin mechanical sensitivity and skin ability to resist to low pressures.

LPA treatment systematically improved skin nerve sensitivity (Figure 5). In 12 and 24 month old BN rats, a full restoration of tail flick and Randall–Sellito thresholds was observed (Figure 5D,F), whereas the Von Frey test revealed only a partial restoration (Figure 5E). A technical problem occurred for the measurements of the tail flick threshold in LPA-treated BN rats at 12 months. Similar results were obtained in Wistar rats with a full restoration of tail flick threshold at 24 months and Randall–Sellito thresholds at 12 and 24 months (Figure 5G–I), leading to similar thresholds to 6 month old rats. Conversely, a full restoration of the Von Frey threshold was only observed at 12 months (Figure 5E). Overall, LPA treatment either fully or partially restored skin thermal and mechanical nerve sensitivities in both strains at 12 and 24 months.

The beneficial effects of LPA on cutaneous sensory function were insufficient to significantly improve skin resistance capacity (PIV and positive AUC) in 12 and 24 month old BN and Wistar rats.

In addition to the contribution of sensory nerve endings, PIV also requires intact endothelial function, the NO pathway in particular [27]. Thus, additional experiments were specifically conducted to explore endothelium-dependent and -independent vasodilator capacities of the skin.

3.4. LPA Restored the NO Pathway Involved in Endothelial Function in the Wistar Strain

3.4.1. Effect of Aging on Endothelium-Dependent and -Independent Vasodilation

Prior to iontophoretic application of Ach or SNP, blood flow value reflects skin perfusion in resting conditions. Basal skin blood flow was significantly higher in Wistar (+39%) compared to BN rats at 6 months, but not at 12 and 24 months (Figure 6A). Indeed, basal blood flow remained unchanged over time in BN rats (Figure 6D), while it significantly decreased at 12 (−38%) and 24 months (−32%) in Wistar rats compared to the 6 month old population (Figure 6G). Interestingly, LPA treatment partially reduced this decrease at 12 and 24 months in Wistar rats (Figure 6G). These results indicate the absence of aging effects on skin perfusion in resting conditions in BN strain. In contrast, an age-related reduction in basal skin perfusion occurred in the Wistar strain that may have been minimized by the LPA treatment.

In healthy skin, local iontophoretic delivery of Ach to the skin is known to induce an endothelium-dependent vasodilation. Indeed, Ach is the most commonly used pharmacological agent to interact with the endothelium and mediates its endothelium-dependent vasodilation via a muscarinic receptor on the endothelial surface. This leads to a rise in intracellular calcium concentration and increases the synthesis and release of endothelial factors via NOS and COX pathways. In contrast, iontophoresis of SNP, an exogenous NO donor, directly stimulates vascular smooth muscle cells inducing an endothelium-independent vasodilation [15,41,42].

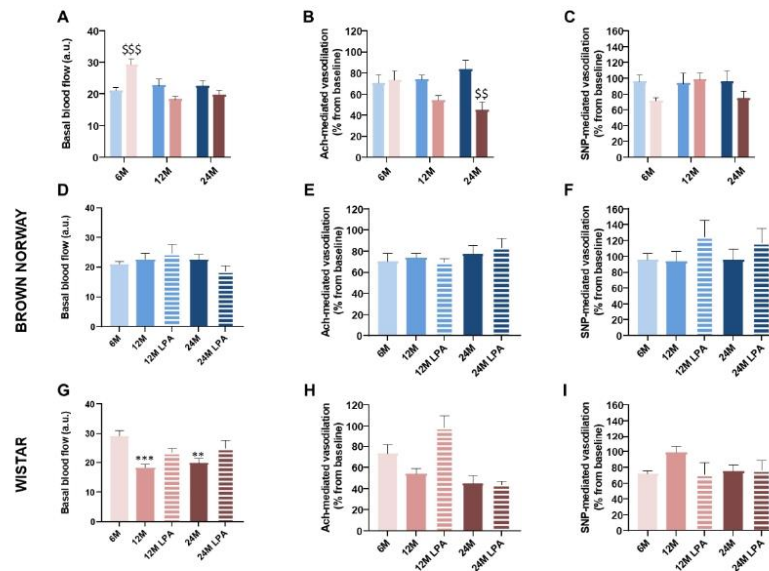


Figure 6. Evolution of the endothelial function over time with (hatched bars) or without (solid bars) LPA treatment. The effect of acetylcholine (Ach) and sodium nitroprusside (SNP) iontophoresis were analyzed in both BN (in blue) and Wistar (in pick) strains for 6 month old (6 M), 12 month old (12 M), and 24 month old (24 M) rats previously fed a diet supplemented with α -lipoic acid (0.5%) for 4 weeks (LPA) or not. A comparison between the two strains was also performed for each parameter (A–C). In each condition, basal blood flow was measured 1 min prior to Ach or SNP iontophoresis (A,D,G). From the skin blood flow changes, the vasodilation (percentage increase from baseline) was calculated in response to Ach iontophoresis (B,E,H) or to SNP iontophoresis (C,F,I). Error bars represent the standard error of the mean. Statistical analyses were performed revealing significant differences between the two strains for each age group (\$\$ $p < 0.01$; \$\$\$ $p < 0.001$ vs. BN strain) or during skin aging when compared to the 6 month condition (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

For both strains, Ach and SNP iontophoresis increased skin blood flow in all conditions, without any significant difference between the two strains at 6 months (Figure 6B,C).

In BN rats, the vascular responses to Ach and SNP remained unchanged regardless of the age (Figure 6E,F), suggesting that the endothelial function and vascular muscle relaxation are well preserved during skin aging in this strain. In contrast, Ach response tended to decrease progressively (−26% at 12 months and −39% at 24 months) in Wistar rats (Figure 6H), which was not observed for SNP-mediated vasodilation (Figure 6I).

As expected, LPA treatment changed neither the SNP responses in BN and Wistar rats (Figure 6F,I) nor the responses to Ach in BN rats that were not impacted by aging (Figure 6E). In contrast, LPA treatment strongly increased the Ach-mediated response in Wistar at 12 months (+83% vs. age-matched untreated rats) (Figure 6H), suggesting a complete restoration of the endothelial function that was not observed at 24 months.

3.4.2. Contribution of NOS and COX Pathways over Time

As previously observed in untreated rats, Ach-mediated vasodilation was preserved with aging in control BN rats and tended to decrease in control Wistar rats receiving saline (Figure 7A,B).

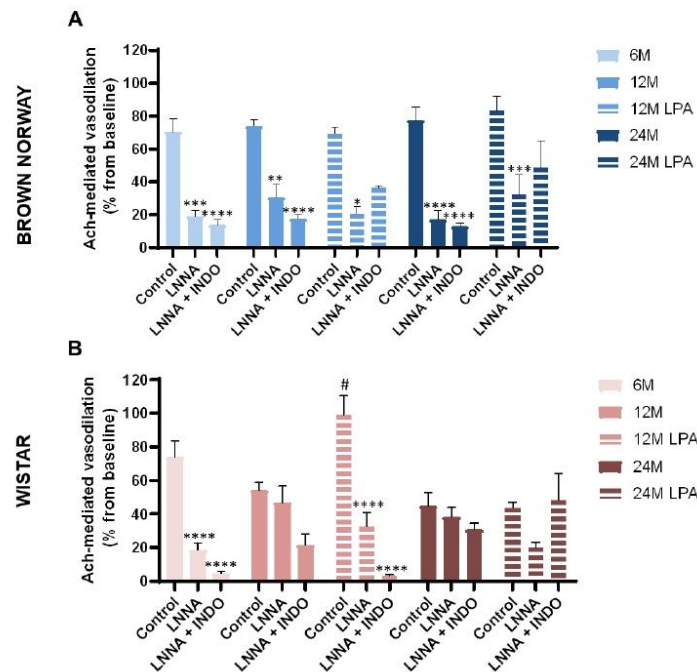


Figure 7. Evolution of the contribution of the NO synthase (NOS) and cyclooxygenase (COX) pathways in the Ach-mediated vasodilation over time with (hatched bars) or without (solid bars) LPA treatment. The effect of an NOS inhibitor (LNNA) in combination or not with a COX inhibitor (INDO) was analyzed on the vascular response to acetylcholine (Ach) iontophoresis in both BN (A) and Wistar strains (B) for 6 month old (6M), 12 month old (12M), and 24 month old (24M) rats previously fed a diet supplemented with α -lipoic acid (0.5%) for 4 weeks (LPA) or not. In each condition, the blood flow was measured 1 min before and 16 min after iontophoresis. This allowed determining the vasodilation in response to Ach iontophoresis following injection of saline (control) and LNNA alone or in combination with INDO. Results were obtained as a percentage increase from baseline. Error bars represent the standard error of the mean. Statistical analysis was performed revealing significant differences after LPA treatment compared to age-matched untreated condition ($\# p < 0.05$) and after LNNA or LNNA + INDO injection when compared to age-matched saline injection as control ($* p < 0.05$; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$; $**** p < 0.0001$).

In BN rats, Ach-mediated vasodilation was abolished by LNNA regardless of the age and not further reduced by LNNA + INDO (Figure 7A). These results suggest that the main pathway involved in this endothelium-dependent vasodilation is the NO pathway, which was well preserved during skin aging in the BN strain. As expected, LPA treatment did not significantly change the effects of the inhibitors.

In Wistar rats, LNNA abolished Ach-mediated vasodilation at 6, but not at 12 and 24 months, showing that the NO pathway was mainly involved at 6 months but strongly impaired by aging in this strain (Figure 7B). In LNNA + INDO conditions, Ach-mediated vasodilation was abolished at 6 months but only reduced at 12 months (−60%) and almost unchanged at 24 months (−32%) (Figure 7B). These results indicate a contribution of the COX pathway in the endothelium-dependent vasodilation in the Wistar strain, in contrast to the BN strain. As for the NO pathway, our results suggest that the COX pathway was also impaired by the aging process in the Wistar strain.

In control Wistar rats receiving saline, LPA treatment significantly increased Ach-mediated vasodilation at 12 months (+83%), but not at 24 months (−2%) (Figure 7B), as previously observed (Figure 6H). In LPA-treated Wistar rats, LNNA reduced Ach-mediated vasodilation (−67% vs. saline at 12 months and −54% at 24 months), showing the contribution of the NO pathway (Figure 7B) that was not involved without LPA at these ages (suggesting beneficial effects of LPA on the NO bioavailability). The combination of LNNA + INDO strongly reduced Ach-mediated vasodilation at 12 months (−97% vs. saline and −91% vs. LNNA only) confirming the contribution of the COX pathway, as previously observed with LPA at 12 months. At 24 months, LNNA + INDO did not reduce Ach-mediated vasodilation, as previously observed without LPA at 24 months, confirming loss of COX pathway at this age.

4. Discussion

The aim of this study was to assess the effect of the antioxidant LPA on skin microcirculation with aging in two different rat strains. We compared a 4 week LPA treatment in a healthy aging model, the BN strain, and in a poorly aging model, the Wistar strain, in middle-aged (12 months) and old (24 months) rats. Our study showed that the age-related reduction in skin ability to resist against low pressures occurred rapidly in Wistar rats, while it was more gradual in BN rats. At 12 months, pressure-induced vasodilation (PIV) was only slightly improved (not significantly) in BN rats and not at all in Wistar rats, when mechanical sensitivity and NO bioavailability were both restored by LPA treatment. In later aging (24 months), the worsening of sensory neuropathy—without aggravation of the endothelial dysfunction—led to the loss of PIV in both strains. At this stage of aging LPA did not improve PIV when sensory neuropathy was only partially restored, as demonstrated by LPA treatment in 24 month old rats.

Aging tended to reduce Ach-dependent vasodilation in Wistar rats without any defect in vascular smooth muscle relaxation. This demonstrates the establishment of an endothelial dysfunction, as already reported in humans [1,43–46] and animals [4,47–49]. More precisely, our results suggested an alteration of the NO pathway in aging Wistar rats. Indeed, Ach-mediated vasodilation became resistant to NOS inhibition in these rats. This reflects an age-related decrease of NO bioavailability in the Wistar strain, as previously reported in old C57BL6 mice [4]. In 12 month old Wistar rats, Ach-mediated vasodilation was abolished under LNNA + INDO, while it was not under LNNA only. This further reduction suggests that the COX pathway contributed to the Ach-dependent vasodilation when rats became resistant to NOS inhibition, as previously reported in aged dyslipidemia mice [49]. However, at 24 months in Wistar rats, Ach-mediated vasodilation was almost unchanged by LNNA + INDO. This suggests that the enhanced contribution of the COX pathway in middle-aged Wistar rats was transient and lost at 24 months. In contrast, BN rats remained sensitive to NOS inhibition regardless of the age, thus strengthening the idea that the NO pathway is mainly involved in this endothelium-dependent vasodilation and well-preserved during skin aging in the BN strain. As BN and Wistar strains are respectively considered “healthy” and “poorly” aging models, this suggests that the COX pathway contributes to endothelial function in a pathological context more than during healthy aging.

Because vascular function defines age-related end organ damage, it has a great potential to contain health at older age. A correlation between delayed aging and preservation of NO-dependent vasodilation has already been established [50]. Although in vitro study using carotid reported that longevity and endothelial function preservation does not correlate with maximal sensitivity to Ach [51], many studies on various organisms ranging from yeasts to mammals have shown that longevity is correlated to NO pathway preservation [14,52] and eNOS function [53,54]. In BN rats, the NO pathway preservation is, therefore, in accordance with their high longevity. In humans, strong interindividual variations exist during aging. In this context, both “healthy aging” and “poorly aging” models

are complementary to better understand the complexity of aging and to progress toward personalized medicine.

In the current study, LPA (a potent antioxidant with excellent free-radical scavenging capacity) was able to reverse cutaneous endothelial dysfunction in 12 month old Wistar rats. These findings are concordant with the age-related increase in vascular oxidative stress as a consequence of greater production of reactive oxygen species (such as superoxide radical (O_2^-), peroxynitrite ($ONOO^-$), or hydrogen peroxide (H_2O_2)) without a compensatory increase in antioxidant defenses [46,55–58]. It is largely admitted that the overproduction of reactive oxygen species (ROS) contributes to endothelial dysfunction in aging, both in animals [59] and in humans [56], although ROS may play a compensatory role in endothelial function of the aging microvasculature [47]. Reducing oxidative stress with LPA should subsequently limit NO scavenging and improve NO bioavailability. In 12 month old Wistar rats treated with LPA, the restored Ach-mediated vasodilation was greatly reduced with LNNA, strengthening that LPA effects was largely due to a beneficial effect on NO bioavailability. Similarly, we previously showed that LPA treatment significantly reduced the oxidative stress and was able to preserve endothelial NO availability in the cutaneous microcirculation in short-term diabetic mice [24]. In our previous study LPA treatment was also able to preserve PIV in non-neuropathic diabetic mice [24]. However, in the present study, beneficial effects on endothelial function were not sufficient to improve PIV. All these results indicate that PIV alteration cannot be explained by the sole endothelial alteration in this case. Moreover, BN exhibited reduced PIV with aging without alteration of the NO pathway.

Indeed, PIV relies not only on vascular function but also requires intact functional integrity of sensory nervous system, especially capsaicin-sensitive nerve endings [11,27] following the activation of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) [13], a mechanoreceptor residing in cutaneous sensory nerve endings. Interestingly, ASIC3 deletion (Asic3 knockout mice) and ASIC3 inhibitors in human and rat skin abolished PIV, without affecting Ach-mediated vasodilation [14], strengthening the crucial role of the sensory nerve endings in PIV. At 6 months, the Wistar strain has an overall lower skin sensitivity than the BN strain (excluding the Randall–Sellitto test) associated with lower PIV capacities but equivalent Ach-mediated vasodilation. This reinforces the link between PIV and the cutaneous sensory nerve endings.

With age, a gradual decline affects skin sensory function, with a reduced capacity for thermal and mechanical sensing [1,60–63] likely due to the widely described reduction in nerve fiber endings [63,64]. Evidence was provided in aged rats for changes in sensory nerve function at both pre- and post-terminal levels [10]. Our results were in concordance with these previous observations, with a progressive age-related decline in cutaneous sensory perception leading to a moderate sensory neuropathy in the middle-aged population and severe sensory neuropathy in the old population. The age-related decline in sensory capacities hardly differed between the two strains even if an early decrease of mechanical sensitivity was observed in Wistar rats according to the Randall–Sellitto results.

Interestingly, LPA succeeded in fully restoring nociceptive mechanical and thermal thresholds in the presence of moderate and/or severe sensory neuropathy in BN and Wistar rats. In contrast, LPA failed to restore tactile thresholds in old BN and Wistar rats. Taken together, our results support the efficiency of LPA in reversing (even partially) sensory neuropathy, as previously reported in diabetes [65,66]. It is admitted that large myelinated A β nerve fibers primarily transmit nonpainful sensations such as touch (corresponding to Von Frey test), whereas the A δ /C small nerve fibers are involved in the transduction of pain signals (corresponding to tail flick and Randall–Sellitto tests). We, thus, hypothesize that LPA was more efficient on small fibers than on large, myelinated nerve fibers. Moreover, our results confirm the role of oxidative stress into the etiology of cutaneous sensory decline marked by age-related mechanical and thermal hypoalgesia in rats, as largely reported in experimental diabetes and in diabetic subjects [67,68].

A moderate sensory neuropathy (without vascular dysfunction) was sufficient to impair the ability of the skin to adapt to localized pressure in BN rats at 12 months leading to the reduction in PIV (−41%), positive AUC (−60%), and crushing pressure (−21%) compared to 6 month old BN rats (although statistical significance was not reached). Associated with endothelial dysfunction, this moderate neuropathy worsened this impairment as observed in Wistar rats. Indeed, PIV (−64%), positive AUC (−85%), and crushing pressure (−69%) were all further reduced in Wistar rats at 12 months compared to 6 months. As a consequence, PIV was significantly lower in Wistar than in BN rats at 12 months. With similar moderate sensory dysfunction, the difference in PIV impairment at 12 months between BN and Wistar could be attributed to endothelial dysfunction (only observed in Wistar rats).

In the presence of severe neuropathy (at 24 months), PIV was almost abolished in the two strains regardless of the vascular capacities. It is worth noting that sensory neuropathy did not worsen the reduction in Ach-mediated vasodilation in Wistar rats, as previously reported in old humans [1]. Therefore, our results showed that the age-related inability of the skin to adapt to localized pressure was related to the severity of the decline of cutaneous sensory capacities rather than to aging-associated endothelial dysfunction. We previously showed that PIV exists in non-neuropathic older adults but is totally absent in old subjects with sensory peripheral neuropathy, while the endothelial dysfunction was comparable between the non-neuropathic and neuropathic older subjects (60–75 years old) [1]. Similar findings have been observed in diabetes. Indeed, PIV was reduced (−8%) in 1 week diabetic mice exhibiting only endothelial dysfunction [24], which was correlated with diabetic patients without neuropathy [69]. The endothelial dysfunction associated with severe neuropathy worsened PIV alteration (−33%) in 8 week diabetic mice [24]. Altogether, these results suggest that the degree of PIV alteration highly depends on the severity of cutaneous sensory decline. Individuals lacking a normal PIV response show an early decrease in cutaneous blood flow to the application of very low pressures [1,69], reflecting a vascular fragility of the skin that increases the risk of ulceration [70]. It is interesting to note that, in a cross-sectional study including 210 older hospitalized adults (mean age 85), Gaubert-Dahan et al. reported that the severity of sensory neuropathy was highly associated with the prevalence and severity of heel pressure ulcer [8]. Sensory neuropathy, thus, appears to be the most critical factor.

Despite obvious beneficial effects on sensory system, LPA failed to fully recover skin capacity to resist against pressures in BN rats at 12 months, even though the PIV (+21%), the positive AUC (+44%), and the crushing pressure (+5%) all increased (without reaching significance). This positive effect was not observed at 24 months, except for the crushing pressure (+56%). Delaying the significant decrease in skin blood flow from baseline for higher crushing pressure suggests a partial beneficial effect of LPA in the BN strain. In contrast, this tendency was not observed at all in middle-aged and old Wistar rats (regarding PIV, positive AUC, and crushing pressure), excluding any beneficial effect of the LPA treatment on the skin resistance to low pressures in the Wistar strain. The failure of LPA in having a benefit in the Wistar strain could have come from the development of the sensory neuropathy in addition to endothelial dysfunction. However, better adjusting LPA treatment modalities could help to improve its beneficial effect. Indeed, a recent study showed that LPA administration in adulthood combined with treatment later in life was more efficient to induce age-induced effects than LPA administration only at old age in male rats [71]. Optimizing doses, duration, and administration modalities (local transcutaneous administration instead of oral administration for example) may improve the effectiveness of LPA treatment, as well as the use of specific preparations favoring LPA stability such as ionic liquid strategy which has recently been reported [21].

5. Conclusions

To conclude, our results highlight for the first time an obvious beneficial effect of LPA treatment on age-related cutaneous sensory decline in both the healthy aging BN and the

poorly aging Wistar strains (Table 1). Interestingly, LPA treatment was also able to restore NO pathway in the middle-aged Wistar rats, thus improving endothelial function.

Table 1. Comparison of LPA effects on skin microcirculation and sensory nerve sensitivity in BN and Wistar rats.

	BN Rats	Wistar Rats
Skin sensory nerve fiber sensitivity	Alteration of mechanical sensitivity (at 12 and 24 months) and thermal sensitivity (at 24 months only) Partially or fully restored by LPA	Alteration of mechanical sensitivity (at 12 and 24 months) and thermal sensitivity (at 24 months only) Partially or fully restored by LPA
Endothelial function Endothelial factor contribution	Preservation over time NOS pathway over time LPA: no effect	Decrease from 12 months Fully restored by LPA at 12 months only NOS pathway at 6 months COX pathway at 12 months Beneficial effect on the NOS and COX pathways at 12 months
Skin resistance to low pressure	Gradual decrease over time Tended to be improved by LPA at 12 months only	Drastic reduction from 12 months Not improved by LPA

Endothelial factor contribution and effects of LPA are indicated in grey and orange, respectively. LPA, α -lipoic acid; BN, Brown Norway; NOS, nitric oxide synthase; COX, cyclooxygenase.

As PIV relies on both skin sensory and endothelial functions, we were expecting an improvement in PIV. However, the beneficial effects of LPA treatment on skin sensory and endothelial functions were only sufficient to partially restore skin resistance to low pressure in BN strain. Better adjusting LPA treatment modalities, alone or in combination with other molecules, may provide a way to improve its effect on skin resistance to pressure and, therefore, on the risk factor to develop skin disorders such as pressure injuries. However, further experiments are needed to define the medicinal doses to be used according to the age and state of health of the subjects, and to better understand the mechanisms by which LPA can improve skin functions.

Author Contributions: Conceptualization, B.F.; formal analysis, A.-F.d.B., J.D., L.S.M. and B.F.; funding acquisition, B.F.; investigation, A.-F.d.B. and J.D.; methodology, J.D., A.P., D.S.-R. and B.F.; project administration, A.-F.d.B., J.D., D.S.-R. and B.F.; resources, J.D., A.P., D.S.-R. and B.F.; supervision, B.F.; validation, A.-F.d.B., J.D., A.P. and B.F.; visualization, A.-F.d.B., J.D., L.S.M., F.P.C., D.S.-R. and B.F.; writing—original draft, A.-F.d.B., J.D. and B.F.; writing—review and editing, A.-F.d.B., J.D., L.S.M., F.P.C., D.S.-R. and B.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by ADR Cluster 11 (ARC2-11-012991-02 and 12-012820-01) Rhone Alpes Region and AAP action interdisciplinaire CNRS 2011.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Animal Experimentation Committee of the University Claude Bernard Lyon I (protocol n° BH2011-38 approved on 5 December 2011).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical restrictions.

Acknowledgments: We thank Jocelyne Vial and Audrey Josset-Lamaugarny for excellent technical support and animal care facilities (AnexPeau Facility, Lyon, France).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Fromy, B.; Sigauco-Roussel, D.; Gaubert-Dahan, M.-L.; Rousseau, P.; Abraham, P.; Benzoni, D.; Berrut, G.; Saumet, J.L. Aging-Associated Sensory Neuropathy Alters Pressure-Induced Vasodilation in Humans. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130*, 849–855. [CrossRef] [PubMed]
- Holowatz, L.A.; Houghton, B.L.; Wong, B.J.; Wilkins, B.W.; Harding, A.W.; Kenney, W.L.; Minson, C.T. Nitric Oxide and Attenuated Reflex Cutaneous Vasodilation in Aged Skin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2003**, *284*, H1662–H1667. [CrossRef] [PubMed]
- Holowatz, L.A.; Thompson-Torgerson, C.; Kenney, W.L. Aging and the Control of Human Skin Blood Flow. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2010**, *15*, 718–739. [CrossRef] [PubMed]
- Gaubert, M.L.; Sigauco-Roussel, D.; Tartas, M.; Berrut, G.; Saumet, J.L.; Fromy, B. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor as an in Vivo Back-up Mechanism in the Cutaneous Microcirculation in Old Mice. *J. Physiol.* **2007**, *585*, 617–626. [CrossRef] [PubMed]
- Bentov, I.; Reed, M.J. The Effect of Aging on the Cutaneous Microvasculature. *Microvasc. Res.* **2015**, *100*, 25–31. [CrossRef] [PubMed]
- Kenney, W.L.; Edward, F. Adolph Distinguished Lecture: Skin-Deep Insights into Vascular Aging. *J. Appl. Physiol.* **2017**, *123*, 1024–1038. [CrossRef] [PubMed]
- De Bengy, A.-F.; Lamartine, J.; Sigauco-Roussel, D.; Fromy, B. Newborn and Elderly Skin: Two Fragile Skins at Higher Risk of Pressure Injury. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2022**, *97*, 874–895. [CrossRef] [PubMed]
- Gaubert-Dahan, M.-L.; Castro-Lionard, K.; Blanchon, M.-A.; Fromy, B. Severe Sensory Neuropathy Increases Risk of Heel Pressure Ulcer in Older Adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2013**, *61*, 2050–2052. [CrossRef] [PubMed]
- Labeau, S.O.; Afonso, E.; Benbenishty, J.; Blackwood, B.; Boulanger, C.; Brett, S.J.; Calvino-Gunther, S.; Chaboyer, W.; Coyer, F.; Deschepper, M.; et al. Prevalence, Associated Factors and Outcomes of Pressure Injuries in Adult Intensive Care Unit Patients: The DecubiCUs Study. *Intensive Care Med.* **2021**, *47*, 160–169. [CrossRef] [PubMed]
- Khalil, Z.; Ralevic, V.; Bassirat, M.; Dusting, G.J.; Helme, R.D. Effects of Ageing on Sensory Nerve Function in Rat Skin. *Brain Res.* **1994**, *641*, 265–272. [CrossRef]
- Fromy, B.; Abraham, P.; Saumet, J.L. Non-Nociceptive Capsaicin-Sensitive Nerve Terminal Stimulation Allows for an Original Vasodilatory Reflex in the Human Skin. *Brain Res.* **1998**, *811*, 166–168. [CrossRef]
- Fouchar, M.; Misery, L.; Le Garrec, R.; Sigauco-Roussel, D.; Fromy, B. Alteration of Pressure-Induced Vasodilation in Aging and Diabetes, a Neuro-Vascular Damage. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 862. [CrossRef] [PubMed]
- Fromy, B.; Lingueglia, E.; Sigauco-Roussel, D.; Saumet, J.L.; Lazdunski, M. ASIC3 Is a Neuronal Mechanosensor for Pressure-Induced Vasodilation That Protects against Pressure Ulcers. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1205–1207. [CrossRef] [PubMed]
- Puca, A.A.; Carrizzo, A.; Ferrario, A.; Villa, F.; Vecchione, C. Endothelial Nitric Oxide Synthase, Vascular Integrity and Human Exceptional Longevity. *Immun. Ageing A* **2012**, *9*, 26. [CrossRef] [PubMed]
- Rossman, M.J.; LaRocca, T.J.; Martens, C.R.; Seals, D.R. Healthy Lifestyle-Based Approaches for Successful Vascular Aging. *J. Appl. Physiol.* **2018**, *125*, 1888–1900. [CrossRef] [PubMed]
- Seals, D.R.; Nagy, E.E.; Moreau, K.L. Aerobic Exercise Training and Vascular Function with Ageing in Healthy Men and Women. *J. Physiol.* **2019**, *597*, 4901–4914. [CrossRef]
- Beitner, H. Randomized, Placebo-Controlled, Double Blind Study on the Clinical Efficacy of a Cream Containing 5% Alpha-Lipoic Acid Related to Photoageing of Facial Skin. *Br. J. Dermatol.* **2003**, *149*, 841–849. [CrossRef]
- El-Komy, M.; Shalaby, S.; Hegazy, R.; Abdel Hay, R.; Sherif, S.; Bendas, E. Assessment of Cubosomal Alpha Lipoic Acid Gel Efficacy for the Aging Face: A Single-Blinded, Placebo-Controlled, Right-Left Comparative Clinical Study. *J. Cosmet. Dermatol.* **2017**, *16*, 358–363. [CrossRef]
- Kubota, Y.; Musashi, M.; Nagasawa, T.; Shimura, N.; Igarashi, R.; Yamaguchi, Y. Novel Nanocapsule of α -Lipoic Acid Reveals Pigmentation Improvement: α -Lipoic Acid Stimulates the Proliferation and Differentiation of Keratinocyte in Murine Skin by Topical Application. *Exp. Dermatol.* **2019**, *28* Suppl 1, 55–63. [CrossRef]
- Külkamp-Guerreiro, I.C.; Souza, M.N.; Bianchin, M.D.; Isoppo, M.; Freitas, J.S.; Alves, J.A.; Piovezan, A.P.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Evaluation of Lipoic Acid Topical Application on Rats Skin Wound Healing. *Acta Cir. Bras.* **2013**, *28*, 708–715. [CrossRef]
- Zhou, Z.; Liu, C.; Wan, X.; Fang, L. Development of a w/o Emulsion Using Ionic Liquid Strategy for Transdermal Delivery of Anti-Aging Component α -Lipoic Acid: Mechanism of Different Ionic Liquids on Skin Retention and Efficacy Evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **2020**, *141*, 105042. [CrossRef] [PubMed]
- Bilska, A.; Wlodek, L. Lipoic Acid—the Drug of the Future? *Pharmacol. Rep.* **2005**, *57*, 570–577. [PubMed]
- Ho, Y.-S.; Lai, C.-S.; Liu, H.-I.; Ho, S.-Y.; Tai, C.; Pan, M.-H.; Wang, Y.-J. Dihydrolipoic Acid Inhibits Skin Tumor Promotion through Anti-Inflammation and Anti-Oxidation. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1786–1795. [CrossRef] [PubMed]
- Demiot, C.; Fromy, B.; Saumet, J.L.; Sigauco-Roussel, D. Preservation of Pressure-Induced Cutaneous Vasodilation by Limiting Oxidative Stress in Short-Term Diabetic Mice. *Cardiovasc. Res.* **2006**, *69*, 245–252. [CrossRef]
- Lipman, R.D.; Chriss, C.E.; Hazzard, D.G.; Bronson, R.T. Pathologic Characterization of Brown Norway, Brown Norway x Fischer 344, and Fischer 344 x Brown Norway Rats with Relation to Age. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **1996**, *51*, B54–B59. [CrossRef] [PubMed]

26. Harraz, O.F.; Jensen, L.J. Aging, Calcium Channel Signaling and Vascular Tone. *Mech. Ageing Dev.* **2020**, *191*, 111336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Fromy, B.; Merzeau, S.; Abraham, P.; Saumet, J.-L. Mechanisms of the Cutaneous Vasodilator Response to Local External Pressure Application in Rats: Involvement of CGRP, Neurokinins, Prostaglandins and NO. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *131*, 1161–1171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fizanne, L.; Fromy, B.; Preckel, M.-P.; Sigauco-Roussel, D.; Saumet, J.L. Effect of Isoflurane on Skin-Pressure-Induced Vasodilation. *J. Vasc. Res.* **2003**, *40*, 416–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Garry, A.; Sigauco-Roussel, D.; Merzeau, S.; Dumont, O.; Saumet, J.L.; Fromy, B. Cellular Mechanisms Underlying Cutaneous Pressure-Induced Vasodilation: In Vivo Involvement of Potassium Channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**, *289*, H174–H180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Deuis, J.R.; Dvorakova, L.S.; Vetter, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 284. [[CrossRef](#)]
31. Yam, M.F.; Loh, Y.C.; Oo, C.W.; Basir, R. Overview of Neurological Mechanism of Pain Profile Used for Animal “Pain-Like” Behavioral Study with Proposed Analgesic Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sigauco-Roussel, D.; Demiot, C.; Fromy, B.; Koitka, A.; Lefthériot, G.; Abraham, P.; Saumet, J.L. Early Endothelial Dysfunction Severely Impairs Skin Blood Flow Response to Local Pressure Application in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Diabetes* **2004**, *53*, 1564–1569. [[CrossRef](#)]
33. Vivancos, G.G.; Verri, W.A.; Cunha, T.M.; Schivo, I.R.S.; Parada, C.A.; Cunha, F.Q.; Ferreira, S.H. An Electronic Pressure-Meter Nociception Paw Test for Rats. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* **2004**, *37*, 391–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yeomans, D.C.; Proudfit, H.K. Nociceptive Responses to High and Low Rates of Noxious Cutaneous Heating Are Mediated by Different Nociceptors in the Rat: Electrophysiological Evidence. *Pain* **1996**, *68*, 141–150. [[CrossRef](#)]
35. Nagy, J.L.; Vincent, S.R.; Staines, W.A.; Fibiger, H.C.; Reisine, T.D.; Yamamura, H.I. Neurotoxic Action of Capsaicin on Spinal Substance P Neurons. *Brain Res.* **1980**, *186*, 435–444. [[CrossRef](#)]
36. Nakamura, K.; Kuntzman, R.; Maggio, A.C.; Augulis, V.; Conney, A.H. Influence of 6-Hydroxydopamine on the Effect of Morphine on the Tail-Flick Latency. *Psychopharmacologia* **1973**, *31*, 177–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. Animal Models of Nociception. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 597–652. [[PubMed](#)]
38. Bowden, J.L.; McNulty, P.A. Age-Related Changes in Cutaneous Sensation in the Healthy Human Hand. *Age* **2013**, *35*, 1077–1089. [[CrossRef](#)]
39. Viseux, F.J.F. The Sensory Role of the Sole of the Foot: Review and Update on Clinical Perspectives. *Neurophysiol. Clin. Clin. Neurophysiol.* **2020**, *50*, 55–68. [[CrossRef](#)]
40. Taguchi, T.; Ota, H.; Matsuda, T.; Murase, S.; Mizumura, K. Cutaneous C-Fiber Nociceptor Responses and Nociceptive Behaviors in Aged Sprague-Dawley Rats. *Pain* **2010**, *151*, 771–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Morris, S.J.; Shore, A.C. Skin Blood Flow Responses to the Iontophoresis of Acetylcholine and Sodium Nitroprusside in Man: Possible Mechanisms. *J. Physiol.* **1996**, *496*, 531–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Melik, Z.; Zaletel, P.; Vrtic, T.; Cankar, K. L-Arginine as Dietary Supplement for Improving Microvascular Function. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2017**, *65*, 205–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Algotsson, A.; Nordberg, A.; Winblad, B. Influence of Age and Gender on Skin Vessel Reactivity to Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Vasodilators Tested with Iontophoresis and a Laser Doppler Perfusion Imager. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **1995**, *50*, M121–M127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Rossi, M.; Cupisti, A.; Mariani, S.; Santoro, G.; Pentimone, F. Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Skin Vasoreactivity in the Elderly. *Ageing Clin. Exp. Res.* **2002**, *14*, 343–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tao, J.; Jin, Y.; Yang, Z.; Wang, L.; Gao, X.; Lui, L.; Ma, H. Reduced Arterial Elasticity Is Associated with Endothelial Dysfunction in Persons of Advancing Age: Comparative Study of Noninvasive Pulse Wave Analysis and Laser Doppler Blood Flow Measurement. *Am. J. Hypertens.* **2004**, *17*, 654–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Seals, D.R.; Jablonski, K.L.; Donato, A.J. Aging and Vascular Endothelial Function in Humans. *Clin. Sci.* **2011**, *120*, 357–375. [[CrossRef](#)]
47. Muller-Delp, J.M.; Spier, S.A.; Ramsey, M.W.; Delp, M.D. Aging Impairs Endothelium-Dependent Vasodilation in Rat Skeletal Muscle Arterioles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, *283*, H1662–H1672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Woodman, C.R.; Price, E.M.; Laughlin, M.H. Selected Contribution: Aging Impairs Nitric Oxide and Prostacyclin Mediation of Endothelium-Dependent Dilation in Soleus Feed Arteries. *J. Appl. Physiol.* **2003**, *95*, 2164–2170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Gendron, M.-E.; Thorin-Trescases, N.; Villeneuve, L.; Thorin, E. Aging Associated with Mild Dyslipidemia Reveals That COX-2 Preserves Dilation despite Endothelial Dysfunction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *292*, H451–H458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. James, M.A.; Tullett, J.; Hemsley, A.G.; Shore, A.C. Effects of Aging and Hypertension on the Microcirculation. *Hypertension* **2006**, *47*, 968–974. [[CrossRef](#)]
51. Labinsky, N.; Csiszar, A.; Orosz, Z.; Smith, K.; Rivera, A.; Buffenstein, R.; Ungvari, Z. Comparison of Endothelial Function, O₂-* and H₂O₂ Production, and Vascular Oxidative Stress Resistance between the Longest-Living Rodent, the Naked Mole Rat, and Mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2006**, *291*, H2698–H2704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Nisoli, E.; Tonello, C.; Cardile, A.; Cozzi, V.; Bracale, R.; Tedesco, L.; Falcone, S.; Valerio, A.; Cantoni, O.; Clementi, E.; et al. Calorie Restriction Promotes Mitochondrial Biogenesis by Inducing the Expression of ENOS. *Science* **2005**, *310*, 314–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Rexhaj, E.; Paoloni-Giacobino, A.; Rimoldi, S.F.; Fuster, D.G.; Anderegg, M.; Somm, E.; Bouillet, E.; Allemann, Y.; Sartori, C.; Scherrer, U. Mice Generated by in Vitro Fertilization Exhibit Vascular Dysfunction and Shortened Life Span. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 5052–5060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Li, W.; Mital, S.; Ojaimi, C.; Csiszar, A.; Kaley, G.; Hintze, T.H. Premature Death and Age-Related Cardiac Dysfunction in Male ENOS-Knockout Mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2004**, *37*, 671–680. [[CrossRef](#)]
55. Muller-Delp, J.M.; Gurovich, A.N.; Christou, D.D.; Leeuwenburgh, C. Redox Balance in the Aging Microcirculation: New Friends, New Foes, and New Clinical Directions. *Microcirculation* **2012**, *19*, 19–28. [[CrossRef](#)]
56. Donato, A.J.; Machin, D.R.; Lesniewski, L.A. Mechanisms of Dysfunction in the Aging Vasculature and Role in Age-Related Disease. *Circ. Res.* **2018**, *123*, 825–848. [[CrossRef](#)]
57. Rodríguez-Mañás, L.; El-Assar, M.; Vallejo, S.; López-Dóriga, P.; Solís, J.; Petidier, R.; Montes, M.; Nevado, J.; Castro, M.; Gómez-Guerrero, C.; et al. Endothelial Dysfunction in Aged Humans Is Related with Oxidative Stress and Vascular Inflammation. *Ageing Cell* **2009**, *8*, 226–238. [[CrossRef](#)]
58. Ungvari, Z.; Kaley, G.; de Cabo, R.; Sonntag, W.E.; Csiszar, A. Mechanisms of Vascular Aging: New Perspectives. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2010**, *65*, 1028–1041. [[CrossRef](#)]
59. Van der Loo, B.; Labugger, R.; Skepper, J.N.; Bachschmid, M.; Kilo, J.; Powell, J.M.; Palacios-Callender, M.; Erusalimsky, J.D.; Quaschnig, T.; Malinski, T.; et al. Enhanced Peroxynitrite Formation Is Associated with Vascular Aging. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1731–1744. [[CrossRef](#)]
60. Decorps, J.; Saumet, J.L.; Sommer, P.; Sigaudou-Roussel, D.; Fromy, B. Effect of Ageing on Tactile Transduction Processes. *Ageing Res. Rev.* **2014**, *13*, 90–99. [[CrossRef](#)]
61. Skedung, L.; El Rawadi, C.; Arvidsson, M.; Farcet, C.; Luengo, G.S.; Breton, L.; Rutland, M.W. Mechanisms of Tactile Sensory Deterioration amongst the Elderly. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Guergova, S.; Dufour, A. Thermal Sensitivity in the Elderly: A Review. *Ageing Res. Rev.* **2011**, *10*, 80–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. McIntyre, S.; Nagi, S.S.; McGlone, F.; Olausson, H. The Effects of Ageing on Tactile Function in Humans. *Neuroscience* **2021**, *464*, 53–58. [[CrossRef](#)]
64. Namer, B. Age Related Changes in Human C-Fiber Function. *Neurosci. Lett.* **2010**, *470*, 185–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Vallianou, N.; Evangelopoulos, A.; Koutalas, P. Alpha-Lipoic Acid and Diabetic Neuropathy. *Rev. Diabet. Stud. RDS* **2009**, *6*, 230–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ziegler, D.; Hanefeld, M.; Ruhnau, K.J.; Meissner, H.P.; Lobisch, M.; Schütte, K.; Gries, F.A. Treatment of Symptomatic Diabetic Peripheral Neuropathy with the Anti-Oxidant Alpha-Lipoic Acid. A 3-Week Multicentre Randomized Controlled Trial (ALADIN Study). *Diabetologia* **1995**, *38*, 1425–1433. [[CrossRef](#)]
67. Garrett, N.E.; Malcangio, M.; Dewhurst, M.; Tomlinson, D.R. Alpha-Lipoic Acid Corrects Neuropeptide Deficits in Diabetic Rats via Induction of Trophic Support. *Neurosci. Lett.* **1997**, *222*, 191–194. [[CrossRef](#)]
68. Nickander, K.K.; McPhee, B.R.; Low, P.A.; Tritschler, H. Alpha-Lipoic Acid: Antioxidant Potency against Lipid Peroxidation of Neural Tissues in Vitro and Implications for Diabetic Neuropathy. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *21*, 631–639. [[CrossRef](#)]
69. Koitka, A.; Abraham, P.; Bouhanick, B.; Sigaudou-Roussel, D.; Demiot, C.; Saumet, J.L. Impaired Pressure-Induced Vasodilation at the Foot in Young Adults with Type 1 Diabetes. *Diabetes* **2004**, *53*, 721–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Fromy, B.; Josset-Lamaugarny, A.; Aimond, G.; Pagnon-Minot, A.; Marics, I.; Tattersall, G.J.; Moqrish, A.; Sigaudou-Roussel, D. Disruption of TRPV3 Impairs Heat-Evoked Vasodilation and Thermoregulation: A Critical Role of CGRP. *J. Invest. Dermatol.* **2018**, *138*, 688–696. [[CrossRef](#)]
71. Molz, P.; de Freitas, B.S.; Uberti, V.H.; da Costa, K.M.; Kist, L.W.; Bogo, M.R.; Schröder, N. Effects of Lipoic Acid Supplementation on Age- and Iron-Induced Memory Impairment, Mitochondrial DNA Damage and Antioxidant Responses. *Eur. J. Nutr.* **2021**, *60*, 3679–3690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Annexe 2 : Analyse de la réponse vasculaire au chauffage local après une reconstruction mammaire par lambeau libre (DIEP)- *Microsurgery* (Mai 2023)

Ces résultats sont en révision dans le journal *Microsurgery*, et sont présentés sous la forme d'une étude clinique que je signe en deuxième auteur. L'intégralité du manuscrit est présentée pages 216-241. Ce projet est issu d'une collaboration avec le Centre Médical Universitaire de Maastricht (Campus France- Projet Van-Gogh).

Résumé

Suite à une mastectomie, la reconstruction mammaire est souvent désirée par les femmes en vue de restaurer leur apparence physique et psychique. Il existe désormais plusieurs types de reconstructions mammaires, telle que la reconstruction par lambeau libre ou DIEP (Deep Inferior Epigastric Perforator) dont le résultat esthétique est très élevé. Le lambeau DIEP est constitué de peau et de tissus sous-cutanés prélevés entre le pubis et le nombril. L'irrigation sanguine (artère et veine épigastrique) de ce lambeau facilite la revascularisation lors de la reconstruction. Cependant, les patientes ont constaté une perte de sensibilité au toucher et à la chaleur au niveau du sein reconstruit, qui peuvent aboutir à des lésions cutanées telles que des brûlures.

Bien que la réponse vasculaire au chauffage global soit conservée dans le lambeau DIEP [221], la réponse à une chaleur locale n'avait pas encore été étudiée.

Cet article, auquel j'ai participé lors de ma thèse, évalue la réponse vasculaire au chauffage local après une reconstruction mammaire par DIEP. Cette étude transversale a été réalisée sur 21 patientes ayant subi une reconstruction par lambeau DIEP (sans complication et au moins deux ans post chirurgie), dont 10 patientes ayant eu recours à une réinnervation.

Nous avons montré que le chauffage local induit une réponse vasculaire biphasique (un pic suivi d'un plateau) au niveau du sein controlatéral mais également au niveau du lambeau DIEP. Bien que la vasodilatation induite par la chaleur soit plus faible dans le lambeau DIEP, la réinnervation ne semble pas améliorer la réponse vasculaire. Nous avons également observé un défaut de détection sensoriel à des stimuli mécaniques, thermiques et douloureux dans les lambeaux DIEP, avec un effet encore plus prononcé sans réinnervation. Enfin nous avons montré une perte de terminaisons nerveuses sensorielles dans le derme et l'épiderme de peau DIEP réinnervée, suggérant une absence de la régénération des fibres sensorielles C et A δ après

Annexes 2

réinnervation. Ceci peut expliquer l'absence d'effet bénéfique de la réinnervation sur la réponse au chauffage local.

Nos résultats suggèrent que la capacité à augmenter le flux sanguin cutané en réponse à un chauffage local reste altérée dans les lambeaux DIEP, même avec une réinnervation, ce qui pourrait favoriser l'apparition de lésions thermiques.

Article scientifique

Local heating-induced cutaneous vasodilation in deep inferior epigastric perforator flaps

Hansje P. Smeele, MD¹; Lisa Martin, MSc²; Sander M. J. van Kuijk, PhD³; Pieter R. Zwanenburg, MD⁴; René R.W.J.vander Hulst, MD PhD¹; Stefania M. H. Tuinder, MD PhD^{1*}; Bérengère Fromy, PhD^{2*}

1. Hansje P. Smeele, MD; René R. W. J. van der Hulst, MD PhD; Stefania M. H. Tuinder, MD PhD. Department of Plastic, Reconstructive and Hand Surgery, GROW – School for Oncology and Developmental Biology, Maastricht University Medical Center; Maastricht, the Netherlands.

2. Lisa Martin, MSc; Bérengère Fromy, PhD. Functional Integrity of the Skin Group, Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory (LBTI), CNRS UMR5305, Université Lyon 1; Lyon, France.

3. Sander M. J. van Kuijk, PhD. Department of Clinical Epidemiology and Medical Technology Assessment, Maastricht University Medical Center; Maastricht, the Netherlands.

4. Pieter R. Zwanenburg, MD. Department of Surgery, Amsterdam Gastroenterology and Metabolism, Amsterdam Infection & Immunity, Amsterdam UMC, University of Amsterdam; Amsterdam, the Netherlands.

* Authors have made an equal contribution to the work and are co-last authors.

Corresponding author

Bérengère Fromy, PhD

Functional Integrity of the Skin Group, Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory (LBTI)

CNRS UMR5305

Université Lyon 1

7 Passage du Vercors

69367 Lyon, France

berengere.fromy@univ-lyon1.fr

+33(0)472722686

Annexes 2

Funding statement

This study was financially supported by the Van Gogh Programme, which granted an exchange scholarship (VGP.20/00034) for joint data collection. The funding organization was not involved in design and conduct of the study.

Conflict of interest disclosure

The authors declare that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

Word count

- Abstract: 250
- Manuscript (Introduction, Methods, Results, Discussion): 3,000

Tables and figures

- Tables: 2
- Figures: 3

Supplemental Digital Content

- Tables: 3
- Figures: 1

Annexes 2

ABSTRACT (250 words)

Introduction Breast reconstruction flaps have been reported to sustain burns at lower temperatures than healthy skin. To understand this phenomenon, we examined local heating-induced cutaneous vasodilation in deep inferior epigastric perforator (DIEP) flaps. We also explored whether flap reinnervation improves the skin's ability to eliminate heat.

Methods We studied 21 female patients with an uncomplicated unilateral secondary DIEP breast reconstruction at least two years after surgery. Ten DIEP flaps were reinnervated at the time of reconstruction. DIEP flaps and contralateral breasts were subjected to direct local heating, and skin blood flow was assessed using laser-Doppler flowmetry. Cutaneous mechanical detection, warm detection, and heat pain thresholds were also assessed.

Results DIEP flaps exhibited significantly weaker cutaneous vasodilation in response to local heating than contralateral breasts. The magnitude of the response was similar between reinnervated and noninnervated flaps. Cutaneous mechanical detection, warm detection, and heat pain thresholds were elevated in reinnervated DIEP flaps and further elevated in noninnervated DIEP flaps. Participants with reinnervated DIEP flaps were significantly more likely to feel heat pain below the 50°C safety threshold than those with noninnervated flaps.

Discussion Our results suggest that free flap transfer causes longstanding impairment, yet not complete abolition, of both the sensory nerve-mediated and nitric oxide-dependent local heating-induced cutaneous vasodilatory systems. We found no statistical evidence that flap reinnervation improves the ability to raise skin blood flow in response to local heating. However, significantly lower sensory thresholds in reinnervated flaps suggest that flap reinnervation provides a meaningful degree of sensory nerve regeneration.

Keywords: local heating; skin blood flow; vasodilation; breast reconstruction; nerve coaptation

Annexes 2

INTRODUCTION (360 words)

The deep inferior epigastric perforator (DIEP) flap consists of skin and subcutaneous tissue harvested from the lower abdomen along with its blood supply. The DIEP flap is ideally suited for breast reconstruction after mastectomy, yielding high levels of patient-reported aesthetic outcomes.^{1,2} Nevertheless, sensory outcomes are often poor due to nerve disruption with flap harvest. Patients mourn reduced or absent sensation in their reconstructed breast whilst dressing, taking a shower, and in intimate settings.³ Protective sensation too is often lost, as is illustrated by reports of burns to breast reconstruction flaps induced by heat exposure (*e.g.*, sun, shower, and hot water bottles) up to five years after surgery.⁴⁻⁶ These burns might ensue from lost ability to register heat, but accounts of sparing of adjacent skin indicate that the flap struggles to actively protect itself against heat, too. Healthy human skin eliminates heat through vasodilation. Whole body passive heating elevates core temperature, which evokes an increase in skin blood flow mediated predominantly by sympathetic cholinergic nerves.⁷ Klasson and colleagues observed normal cutaneous vasodilation in response to whole body heating in DIEP flaps at a median of 1.3 years after surgery.⁸ Direct local heating of hairy skin elicits cutaneous vasodilation in the heated area only, a response largely dependent on sensory nerve endings and nitric oxide.⁹⁻¹¹ Whether DIEP flaps (or indeed any free flap) exhibit an adequate cutaneous vasodilator response to local heating has not been examined. Surgical coaptation of a sensory nerve supplying the DIEP flap to a sensory nerve at the mastectomy site is thought to help restore sensory supply by guiding axonal regeneration, a premise supported by enhanced sensory detection ability observed in reinnervated flaps.¹²⁻¹⁴ We hypothesized that as part of the cutaneous vasodilator response to local heating is sensory nerve-mediated, the response would be superior in reinnervated flaps, where neural continuity has been partially restored.

The study aims were to examine cutaneous vasodilation in response to local heating in DIEP flaps, and to evaluate whether flap reinnervation might enhance the response. We also explored which factors might explain variation in the magnitude of the response. We compared vasodilation results against sensory detection thresholds to infer cutaneous nerve fiber function.

Annexes 2

MATERIALS & METHODS (1019 words)

Participants

The protocol was approved by the institutional ethics committee. Participants gave informed consent.¹⁵ We included female patients with an uncomplicated unilateral secondary DIEP breast reconstruction at least two years after surgery to allow peripheral nerves within the flap time to regenerate.¹⁶ Exclusion criteria were a history of cancer in the contralateral breast, absence of a DIEP skin island, and conditions known to impair peripheral nerve regeneration (*i.e.*, post-reconstruction radiotherapy¹⁷, active smoking¹⁸, and diabetes mellitus¹⁹). Peripheral neuropathy, prevalent in the study population, was not an exclusion criterium but a covariable to ensure a large enough pool of eligible patients.

Variables

In healthy humans, local heating of hairy skin induces a biphasic response.¹¹ The rapid increase in skin blood flow within the first 3 to 5 minutes relies predominantly on local activity of sensory nerve endings and was our primary outcome. After a moderate decrease in skin blood flow, sustained local heating induces slower vasodilation that attains a plateau; this phase relies mainly on nitric oxide and was our secondary outcome.^{9,10} Additional outcomes were cutaneous mechanical detection, warm detection, and heat pain thresholds as surrogates of sensory nerve function. Owing to combinations of factors including patient preference, technical feasibility, and surgeon perseverance, not all DIEP flaps were reinnervated at the time of reconstruction.^{13,14} The independent variable of interest was measurement site (*i.e.*, contralateral breasts, reinnervated DIEP flaps, and noninnervated DIEP flaps). Observers were blinded to DIEP innervation status; participants were not. Data extracted from medical records comprised age, body mass index, menopausal status, history of smoking, peripheral neuropathy, hypertension, hypercholesterolemia, anti-cancer treatments, flap type, flap weight, ischemia time, follow-up time (*i.e.*, the interval between breast reconstruction and experiment), and contralateral breast symmetrization.

Local heating-induced cutaneous vasodilatation

Experiments were conducted in July 2021 and January 2022. Skin blood flow in response to direct local heating was monitored using laser-Doppler flowmetry (PeriFlux System 6000; Perimed, Stockholm, Sweden). Participants were tested bilaterally such that their contralateral breast served as an internal control to their DIEP flap. One site per flap or breast was tested; scars were avoided. After 10 minutes of supine acclimatization in a quiet, constant-temperature room, data collection started with a one-minute normothermic baseline followed by 20 minutes of local heating at 42°C (457-PI probe; Perimed, Stockholm, Sweden). Skin temperature was measured before onset

Annexes 2

of local heating; control skin blood flow was continuously recorded 3 to 5 cm away from the heated area (440 probe; Perimed, Stockholm, Sweden). Blood flow recordings were analyzed in arbitrary units (a.u.) and, to eliminate potential patient-level confounding, as ratio to the contralateral breast. Before the protocol, core temperature was measured with an infrared ear thermometer (ThermoScan Pro 6000; Braun, Meluncheon, Germany). Systolic and diastolic blood pressures were measured using a Gamma XXL LF sphygmomanometer (Heine, Germany) directly before and after the protocol.

Cutaneous quantitative sensory testing

Touch perception thresholds were assessed using a 20-piece Touch-test™ Sensory Evaluator (North Coast Medical, Inc., Gilroy, CA, USA). Monofilaments were applied three times in an ascending fashion.^{16,20} An affirmative response was recorded when participants felt the stimulus at least one out of three times and could accurately locate it. Scores were converted into target stress (g/mm²). Cutaneous warm detection and heat pain thresholds were measured using a TSA-II device (Medoc, Ramat-Yishai, Israel) with a 9.0 cm² Peltier-type thermode. Participants were asked to abort a thermal stimulus increasing from 32°C to 50°C at a rate of 1°C/s when perceived. Warm detection and heat pain thresholds were both tested three times; for each series, the mean was recorded as the final value. If a warm detection or heat pain threshold was not reached within the safety limit, 50°C was entered for analysis.

Nerve fiber integrity

We histologically examined dermal and epidermal small sensory nerve fibers in a DIEP skin island excised as a secondary, cosmetic procedure. Mechanical detection, warm detection, and heat pain thresholds were obtained before surgery; skin blood flow in response to local heating could not be assessed because the laser-Doppler device was unavailable. Immediately after excision, the skin island was fixed in 4% buffered formaldehyde solution and stored at 4°C for 24 hours. After rinsing in PBS RNase free solution, the sample was immersed in 10% sucrose for 24 hours at 4°C. The next day, the tissue was immersed in isopentane for ~30-60 seconds and stored at -80°C. Sections 30 µm thick were prepared using Leica CM3050 S Cryostat and stored at -80°C. After two hours of curing at room temperature, sections were saturated with 5% goat serum, 2% BSA, and 0.1% Tween-20 for one hour. Sections were incubated overnight with primary rabbit antibody (1:100) against human PGP9.5 (ab27053) at 4°C in a humidified chamber. They were then washed with 1X-PBS and incubated for 45 minutes with goat anti-rabbit Alexa-546 (1:1000; A-11035) at room temperature in a dark chamber. After washing, sections were mounted with Fluoroshield™ with DAPI medium (F6057), and examined using a Nikon Ti-E Fluorescence Motorized microscope under 40× magnification.

Annexes 2

Data analysis

Participants and DIEP flaps were characterized using counts and percentages for categorical variables, means and standard deviations for normally distributed variables (Shapiro-Wilk $p \geq 0.01$), and medians and 25th and 75th percentiles for other variables. The paired-samples Wilcoxon Signed Rank Test was used for comparisons between contralateral breasts and DIEP flaps. Normally distributed data were compared between reinnervated and noninnervated flaps using the independent samples t-test, and other data using the Mann-Whitney U test. Data were compared between contralateral breasts, reinnervated DIEP flaps, and noninnervated DIEP flaps using one-way analysis of variance for dependent samples followed by Tukey's multiple-comparison test. Factors that might explain variation in peak and plateau skin blood flow were identified using linear regression analyses. Candidate explanatory factors with at least marginal significance upon univariable analysis ($p \leq 0.10$) were retained in a multivariable model. Spearman correlation coefficients (r_s) were used to estimate associations between variables. All statistical analyses were performed using R version 4.0.5 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), with $\alpha = 0.05$ unless otherwise stated.

Reporting

Study methods and results are reported as recommended in the Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology (STROBE) Statement.²¹

Annexes 2

RESULTS (579 words)

Participants

Of 661 patients who underwent a DIEP breast reconstruction between January 2010 and July 2019, 101 were eligible for inclusion, 51 of whom had a reinnervated flap. Twenty-one patients agreed to participate, 10 of whom had a reinnervated flap with a single coapted nerve. We observed no statistically significant differences in baseline characteristics between outcome groups (table 1). All but one participant were postmenopausal; none took hormone replacement therapy.

Local heating-induced cutaneous vasodilation

In both contralateral breasts and DIEP flaps, local heating to 42°C evoked a biphasic increase in skin blood flow, characterized by an initial peak followed by slower vasodilatation attaining a plateau (figure 1A-C). Peak and plateau skin blood flow were significantly weaker in DIEP flaps than in contralateral breasts (table 2). Areas under the curve were significantly greater in contralateral breasts than in DIEP flaps (figure 1D). Peak and plateau skin blood flow did not differ between reinnervated and noninnervated DIEP flaps. When expressed as ratio to the contralateral breast, vasodilatation was stronger in reinnervated flaps than in noninnervated flaps (Figure, Supplemental Digital Content 1), but differences were not statistically significant (Table, Supplemental Digital Content 2).

Factors explaining variation in the magnitude of the vasodilatory response

Univariable linear regression analysis showed an inverse association between flap reinnervation and peak and plateau skin blood flow in contralateral breasts (Table, Supplemental Digital Content 3). Chemotherapy was inversely associated with peak and plateau skin blood flow in both contralateral breasts and DIEP flaps. Tamoxifen was omitted from multivariable modeling because of its moderate correlation with chemotherapy ($r_s = 0.55$, 95% CI = 0.31 – 0.82; $p = 0.01$) and weaker predictive value. A multivariable model comprising flap reinnervation, chemotherapy, and age explained 35% of the variation in peak skin blood flow in contralateral breasts ($p = 0.01$).

Cutaneous quantitative sensory testing

Compared with contralateral breasts, cutaneous mechanical detection, warm detection, and heat pain thresholds were elevated in reinnervated DIEP flaps and further elevated in noninnervated DIEP flaps (figure 2). Significantly more participants with reinnervated DIEP flaps felt heat pain below the 50°C safety limit (Table, Supplemental Digital Content 4). As heat pain threshold and peak skin blood flow both rely on functional small unmyelinated heat-sensitive C-fibers²², we expected an inverse correlation between these variables; however, this was neither

Annexes 2

the case in contralateral breasts ($r_s = 0.11$, 95% CI = -0.38 – 0.55; $p = 0.63$) nor in DIEP flaps ($r_s = 0.17$, 95% CI = -0.22 – 0.54; $p = 0.46$). Mechanical detection threshold and peak skin blood flow were uncorrelated in contralateral breasts ($r_s = 0.04$, 95% CI = -0.41 – 0.49; $p = 0.88$) and in DIEP flaps ($r_s = 0.20$, 95% CI = -0.27 – 0.60; $p = 0.39$).

Nerve fiber integrity

The examined skin island originated from a 39-year-old patient who had unilateral breast cancer. She was treated with neoadjuvant chemotherapy, trastuzumab, mastectomy, and tamoxifen. Sixteen months before skin island excision, she had an uncomplicated secondary bipediced DIEP breast reconstruction with dual nerve coaptation. The DIEP flap weighted 895 grams. The patient never smoked and was healthy apart from breast cancer. The mechanical detection threshold of the skin island was 68.2 g/mm²; neither warmth nor heat were perceived below the 50°C safety limit. In healthy abdominal control skin of a 40-year-old woman, we observed small sensory nerve fibers mainly in the dermis, but also in the epidermis (figure 3A); conversely, the reinnervated DIEP skin island showed a complete loss of dermal and epidermal small sensory nerve fibers (figure 3B).

Annexes 2

DISCUSSION (925 words)

DIEP flaps three to seven years after surgery exhibited classic biphasic cutaneous vasodilation in response to local heating. However, peak and plateau skin blood flow in DIEP flaps were significantly lower than in contralateral breasts. These findings indicate that free flap transfer causes longstanding impairment, yet not complete abolition, of both the sensory nerve-mediated and nitric oxide-dependent local heating-induced cutaneous vasodilatory systems.

In healthy human skin, small unmyelinated heat-sensitive C-fibers respond to local heating by releasing neurotransmitters that cause a rapid increase in skin blood flow.^{10,22} Above a certain threshold, the same C-fibers transmit an action potential to the brain, resulting in conscious heat pain perception. As such, the observed attenuated peak skin blood flow in response to local heating (figure 1B-C) and elevated heat pain threshold (figure 2C) both provide evidence for C-fiber dysfunction in DIEP flaps. Elevated mechanical and warm detection thresholds (figure 2A and 2B) indicate additional dysfunction of large myelinated A β -fibers and small thinly myelinated A δ -fibers, respectively.²³ These findings resonate with clinical manifestations of sensory dysfunction in DIEP flaps described in the introduction.

Nine participants (43%) had a history of small fiber neuropathy. This condition damages peripheral autonomic and somatic small sensory nerve fibers, and has been associated with diminished sensory nerve-mediated vasodilation in response to local heating.²⁴ Absence of an inverse association between small fiber neuropathy and peak skin blood flow in our sample might be due to heterogeneous neuropathy etiology and duration.

Not only peak but also plateau skin blood flow in response to local heating was significantly weaker in DIEP flaps than in contralateral breasts. This latter phase is primarily (though not exclusively) mediated by nitric oxide, meaning that free flap transfer might alter nitric oxide production, vascular responsiveness to nitric oxide, or both. Although still under debate, the plateau vasodilator phase probably requires intact sympathetic adrenergic function for its full expression.¹¹ The constrained plateau phase in DIEP flaps could therefore be a symptom of cutaneous sympathetic denervation. Prevailing theory indeed attributes pathological burns in breast reconstruction flaps to sympathetic dysfunction.⁴⁻⁶ Contrary to this theory, Klasson and colleagues found normal cutaneous sympathetic nerve-mediated vasodilation in response to whole body heating in DIEP flaps.⁸ Also, our experiments were conducted at unheated skin temperatures where adrenergic vasoconstrictor activity maintains resting cutaneous vascular tone (~32°C). Unaltered baseline skin blood flow in DIEP flaps (table 2) refutes attenuated vasoconstrictor tone and, by extension, sympathetic denervation.^{10,25} Which exact mechanisms impair the

Annexes 2

cutaneous plateau vasodilator response to local heating in DIEP flaps requires clarification by studying effects of pharmacologic inhibitors.

We observed equivalent peak and plateau skin blood flow in response to local heating in reinnervated and noninnervated DIEP flaps. Relative to contralateral breasts, reinnervated flaps showed a more pronounced vasodilatory peak than noninnervated flaps. Although this finding was not statistically significant, it parallels our observation that significantly more participants with reinnervated DIEP flaps were able to feel heat pain below the 50°C safety limit than participants with noninnervated flaps (90% vs. 36%; Table, Supplemental Digital Content 4). The fact that the histologically examined tissue showed no signs of C-fiber regeneration (*i.e.*, no small sensory nerve fibers identified upon histological examination [figure 3] and no heat pain perception below 50°C) despite dual nerve coaptation might lie with the relatively short follow-up time of 1.3 years.

Various confounding factors may have influenced the magnitude of the vasodilator response to local heating. Exploratory analyses showed an inverse association between chemotherapy and peak and plateau skin blood flow in contralateral breasts and DIEP flaps (Table, Supplemental Digital Content 3). This finding corresponds to impaired nitric oxide-related cutaneous vasodilation in response to acetylcholine iontophoresis reported in patients treated with various chemotherapy regimens.^{26,27} Because of the protective effect of endogenous estrogen on endothelial function²⁸, menopausal status, hormone replacement therapy, and endocrine anticancer therapy are potentially relevant parameters. The study sample showed little to no variation regarding menopausal status and hormone replacement therapy. However, 11 participants (52%) received endocrine therapy, which, depending on the mechanism of action, may either improve or reduce endothelial function. Tamoxifen and related compounds competitively antagonize estrogen receptors and can increase serum estrogen levels in postmenopausal women²⁹, with potential protective effects on endothelial function.^{30,31} By contrast, aromatase inhibitors inhibit estrogen production, reducing levels of endogenous estrogen and impairing endothelial function.^{32,33} In our study, chemotherapy likely confounded estimates of association between tamoxifen and the magnitude of the vasodilator response. Lastly, advanced age has been associated with significantly reduced peak and plateau skin blood flow in response to local heating.^{34,35} Absence of an inverse association between age and microvascular function in this study might be attributable to a lack of variation in age among participants.

Several study limitations should be considered. Contralateral breasts are flawed controls of abdomen-derived DIEP flaps. Although similar innervation densities have been reported for female breast and abdominal skin³⁶, they may exhibit functional and structural differences. For instance, a prior study reported significantly more pronounced nitric oxide-dependent cutaneous vasodilation in response to local heating in the abdomen than in the chest area.³⁷

Annexes 2

In addition, six study participants underwent surgical procedures on their contralateral breast, which may have affected nerve integrity and microvascular function. Another study limitation is that blood flow recordings were not normalized to maximal or baseline skin blood flow. Maximal values were not obtained, and baseline skin blood flow was variable meaning that correction would have distorted rather than rectified raw flux data. As site-to-site variability is perhaps the most important drawback of the laser-Doppler technique³⁸, skin blood flow results should be interpreted with caution and warrant follow-up study with adequate normalization.

CONCLUSION (117 words)

This study highlights that long-term consequences of nerve disruption inherent to free flap transfer may extend beyond loss of sensory detection ability: we found significant impairment of both the sensory nerve-mediated and nitric oxide-dependent local heating-induced cutaneous vasodilatory systems that protect the skin from local trauma. Further study is required to elicit the mechanisms by which free flap transfer impairs the ability to mount an adequate vasodilator response to local heating. Flap reinnervation was associated with a stronger vasodilatory response to local heating when adjusted for the contralateral side, although this finding was not statistically significant. However, significantly lower sensory thresholds in reinnervated DIEP flaps suggest that reinnervation may provide a meaningful degree of sensory nerve regeneration.

Annexes 2

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to our study participants for their considerable time and effort.

REFERENCES

1. Eltahir Y, Krabbe-Timmerman IS, Sadok N, Werker PMN, de Bock GH. Outcome of Quality of Life for Women Undergoing Autologous versus Alloplastic Breast Reconstruction following Mastectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plast Reconstr Surg*. May 2020;145(5):1109-1123. doi:10.1097/PRS.00000000000006720
2. Bennett KG, Qi J, Kim HM, Hamill JB, Pusic AL, Wilkins EG. Comparison of 2-Year Complication Rates Among Common Techniques for Postmastectomy Breast Reconstruction. *JAMA Surg*. Oct 1 2018;153(10):901-908. doi:10.1001/jamasurg.2018.1687
3. Shammass RL, Fish LJ, Sergesketter AR, et al. Dissatisfaction After Post-Mastectomy Breast Reconstruction: A Mixed-Methods Study. *Ann Surg Oncol*. Feb 2022;29(2):1109-1119. doi:10.1245/s10434-021-10720-9
4. Delfino S, Brunetti B, Toto V, Persichetti P. Burn after breast reconstruction. *Burns*. Sep 2008;34(6):873-7. doi:10.1016/j.burns.2007.11.004
5. Enajat M, Rozen WM, Audolfsson T, Acosta R. Thermal injuries in the insensate deep inferior epigastric artery perforator flap: case series and literature review on mechanisms of injury. *Microsurgery*. 2009;29(3):214-7. doi:10.1002/micr.20601
6. Mohanna PN, Raveendran SS, Ross DA, Roblin P. Thermal injuries to autologous breast reconstructions and their donor sites--literature review and report of six cases. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. Mar 2010;63(3):e255-60. doi:10.1016/j.bjps.2009.06.040
7. Kellogg DL, Jr., Pergola PE, Piest KL, et al. Cutaneous active vasodilation in humans is mediated by cholinergic nerve cotransmission. *Circ Res*. Dec 1995;77(6):1222-8. doi:10.1161/01.res.77.6.1222
8. Klasson S, Svensson K, Wollmer P, Velandar P, Svensson H. Blood flow dynamics and sensitivity in breasts after reconstruction with DIEP-flap. *J Plast Surg Hand Surg*. Dec 2014;48(6):407-11. doi:10.3109/2000656X.2014.903194
9. Kellogg DL, Jr., Liu Y, Kosiba IF, O'Donnell D. Role of nitric oxide in the vascular effects of local warming of the skin in humans. *J Appl Physiol (1985)*. Apr 1999;86(4):1185-90. doi:10.1152/jappl.1999.86.4.1185
10. Minson CT, Berry LT, Joyner MJ. Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *J Appl Physiol (1985)*. Oct 2001;91(4):1619-26. doi:10.1152/jappl.2001.91.4.1619
11. Smith CJ, Johnson JM. Responses to hyperthermia. Optimizing heat dissipation by convection and evaporation: Neural control of skin blood flow and sweating in humans. *Auton Neurosci*. Apr 2016;196:25-36. doi:10.1016/j.autneu.2016.01.002
12. Shiah E, Laikhter E, Comer CD, et al. Neurotization in Innervated Breast Reconstruction: A Systematic Review of Techniques and Outcomes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. Jun 17 2022;doi:10.1016/j.bjps.2022.06.006
13. Spiegel AJ, Menn ZK, Eldor L, Kaufman Y, Dellon AL. Breast Reinnervation: DIEP Neurotization Using the Third Anterior Intercostal Nerve. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. Nov 2013;1(8):e72. doi:10.1097/GOX.0000000000000008
14. Spiegel AJ, Salazar-Reyes H, Izaddoost S, Khan FN. A novel method for neurotization of deep inferior epigastric perforator and superficial inferior epigastric artery flaps. *Plast Reconstr Surg*. Jan 2009;123(1):29e-30e. doi:10.1097/PRS.0b013e3181905564
15. Rickham PP. Human Experimentation. Code of Ethics of the World Medical Association. Declaration of Helsinki. *Br Med J*. Jul 18 1964;2(5402):177. doi:10.1136/bmj.2.5402.177
16. Beugels J, Bijkerk E, Lataster A, Heuts EM, van der Hulst R, Tuinder SMH. Nerve Coaptation Improves the Sensory Recovery of the Breast in DIEP Flap Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. Aug 1 2021;148(2):273-284. doi:10.1097/PRS.00000000000008160

Annexes 2

17. Doll C, Durand R, Grulkey W, Sayer S, Olivotto I. Functional assessment of cutaneous microvasculature after radiation. *Radiother Oncol*. Apr 1999;51(1):67-70. doi:10.1016/s0167-8140(99)00022-5
18. Rodriguez-Fontan F, Reeves B, Tuano K, Colakoglu S, L DA, Banegas R. Tobacco use and neurogenesis: A theoretical review of pathophysiological mechanism affecting the outcome of peripheral nerve regeneration. *J Orthop*. Nov-Dec 2020;22:59-63. doi:10.1016/j.jor.2020.03.026
19. Kennedy JM, Zochodne DW. Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus. *J Peripher Nerv Syst*. Jun 2005;10(2):144-57. doi:10.1111/j.1085-9489.2005.0010205.x
20. Bell-Krotoski J, Weinstein S, Weinstein C. Testing sensibility, including touch-pressure, two-point discrimination, point localization, and vibration. *J Hand Ther*. Apr-Jun 1993;6(2):114-23. doi:10.1016/s0894-1130(12)80292-4
21. Vandembroucke JP, von Elm E, Altman DG, et al. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Epidemiology*. Nov 2007;18(6):805-35. doi:10.1097/EDE.0b013e3181577511
22. Magerl W, Treede RD. Heat-evoked vasodilatation in human hairy skin: axon reflexes due to low-level activity of nociceptive afferents. *J Physiol*. Dec 15 1996;497 (Pt 3):837-48. doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021814
23. Glatte P, Buchmann SJ, Hijazi MM, Illigens BM, Siepmann T. Architecture of the Cutaneous Autonomic Nervous System. *Front Neurol*. 2019;10:970. doi:10.3389/fneur.2019.00970
24. Caselli A, Rich J, Hanane T, Uccioli L, Veves A. Role of C-nociceptive fibers in the nerve axon reflex-related vasodilation in diabetes. *Neurology*. Jan 28 2003;60(2):297-300. doi:10.1212/01.wnl.0000040250.31755.f9
25. Pergola PE, Kellogg DL, Jr., Johnson JM, Kosiba WA, Solomon DE. Role of sympathetic nerves in the vascular effects of local temperature in human forearm skin. *Am J Physiol*. Sep 1993;265(3 Pt 2):H785-92. doi:10.1152/ajpheart.1993.265.3.H785
26. Fredslund SO, Buus NH, Hojgaard Skjold C, Laugesen E, Jensen AB, Laursen BE. Changes in vascular function during breast cancer treatment. *Br J Clin Pharmacol*. Nov 2021;87(11):4230-4240. doi:10.1111/bcp.14837
27. Sutterfield SL, Caldwell JT, Post HK, Lovoy GM, Banister HR, Ade CJ. Lower cutaneous microvascular reactivity in adult cancer patients receiving chemotherapy. *J Appl Physiol (1985)*. Oct 1 2018;125(4):1141-1149. doi:10.1152/jappphysiol.00394.2018
28. Ganz P. Vasomotor and vascular effects of hormone replacement therapy. *Am J Cardiol*. Jul 3 2002;90(1A):11F-16F. doi:10.1016/s0002-9149(01)02218-4
29. Lum SS, Woltering EA, Fletcher WS, Pommier RF. Changes in serum estrogen levels in women during tamoxifen therapy. *Am J Surg*. May 1997;173(5):399-402. doi:10.1016/S0002-9610(97)00072-X
30. Herrington DM, Pusser BE, Riley WA, et al. Cardiovascular effects of droloxifene, a new selective estrogen receptor modulator, in healthy postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jun 2000;20(6):1606-12. doi:10.1161/01.atv.20.6.1606
31. Sarrel PM, Nawaz H, Chan W, Fuchs M, Katz DL. Raloxifene and endothelial function in healthy postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*. Feb 2003;188(2):304-9. doi:10.1067/mob.2003.28
32. Blaes A, Beckwith H, Florea N, et al. Vascular function in breast cancer survivors on aromatase inhibitors: a pilot study. *Breast Cancer Res Treat*. Nov 2017;166(2):541-547. doi:10.1007/s10549-017-4447-6
33. Maor R, Sara JDS, Wanous AA, et al. Attenuated peripheral endothelial function among women treated with aromatase inhibitors for breast cancer. *Coron Artery Dis*. Dec 2018;29(8):687-693. doi:10.1097/MCA.0000000000000666
34. Minson CT, Holowatz LA, Wong BJ, Kenney WL, Wilkins BW. Decreased nitric oxide- and axon reflex-mediated cutaneous vasodilation with age during local heating. *J Appl Physiol (1985)*. Nov 2002;93(5):1644-9. doi:10.1152/jappphysiol.00229.2002
35. Fromy B, Sigaucho-Roussel D, Gaubert-Dahan ML, et al. Aging-associated sensory neuropathy alters pressure-induced vasodilation in humans. *J Invest Dermatol*. Mar 2010;130(3):849-55. doi:10.1038/jid.2009.279

Annexes 2

36. Besne I, Descombes C, Breton L. Effect of age and anatomical site on density of sensory innervation in human epidermis. *Arch Dermatol.* Nov 2002;138(11):1445-50. doi:10.1001/archderm.138.11.1445
37. McGarr GW, King KE, Saci S, et al. Regional variation in nitric oxide-dependent cutaneous vasodilatation during local heating in young adults. *Exp Physiol.* Aug 2021;106(8):1671-1678. doi:10.1113/EP089671
38. Chaseling GK, Crandall CG, Gagnon D. Skin blood flow measurements during heat stress: technical and analytical considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Jan 1 2020;318(1):R57-R69. doi:10.1152/ajpregu.00177.2019

Annexes 2

TABLES

Table 1. Participant characteristics, by outcome group

	Reinnervated DIEP flaps	Noninnervated DIEP flaps
No. of participants	10	11
Age at time of experiment, mean (SD), yr	55 (9)	60 (12)
Body mass index, mean (SD), kg/m ²	24 (2)	25 (4)
Menopausal status		
Premenopausal	0	1 (9)
Postmenopausal	10 (100)	11 (91)
Ex-smoker		
No	5 (50)	5 (45)
Yes	5 (50)	6 (55)
Small fiber neuropathy		
No	7 (70)	5 (45)
Yes ^a	3 (30)	6 (55)
Time since symptom onset, median (25 th –75 th percentile), yr	6 (5 – 7)	27 (18 – 35)
Hypertension		
No	8 (80)	8 (73)
Yes	2 (20)	3 (27)
Hypercholesterolemia		
No	10 (100)	11 (91)
Yes	0	1 (9)
Indication for mastectomy		
Invasive breast cancer	10 (100)	9 (82)
Ductal carcinoma in situ	0	2 (18)
Chemotherapy		
No	2 (20)	4 (36)
Yes ^b	8 (80)	7 (64)
Trastuzumab		
No	8 (80)	10 (91)
Yes	2 (20)	1 (9)
Endocrine therapy		
None	3 (30)	7 (64)
Tamoxifen	6 (60)	3 (27)
Anastrozole	1 (10)	1 (9)
Pre-reconstruction radiotherapy		
No	6 (60)	8 (73)
Yes	4 (40)	3 (27)
Flap type		
Unipedicled DIEP flap	5 (50)	8 (73)
Bipedicled or stacked DIEP flap	5 (50)	3 (27)
Flap weight, mean (SD), g ^c	610 (296)	613 (169)
Ischemia time, mean (SD), min	43 (8)	47 (13)
Follow-up time, mean (SD), yr	5 (1)	5 (1)
Contralateral breast symmetrization		
No	6 (60)	9 (82)
Yes ^d	4 (40)	2 (18)
Core temperature before experiment, °C	36.6 (0.2)	36.6 (0.2)
Systolic blood pressure, mean (SD), mmHg		
Before experiment	138 (25)	131 (17)
After experiment	143 (26)	137 (20)
Diastolic blood pressure, mean (SD), mmHg		
Before experiment	92 (17)	89 (12)
After experiment	94 (21)	93 (12)

Values are counts (%), unless otherwise stated. DIEP, deep inferior epigastric perforator.

^a Related to chemotherapy ($n = 5$), sarcoidosis, Crohn's disease, Lyme disease, or vitamin B6 intoxication.

^b *I.e.*, doxorubicin, cyclophosphamide, paclitaxel, and docetaxel, in various combinations.

Annexes 2

^c For breast reconstructions involving two stacked flaps, only the heaviest flap was considered.

^d *I.e.*, breast reduction ($n = 5$) and breast augmentation ($n = 1$).

Annexes 2

Table 2. Skin blood flow in response to local heating

	Contralateral breasts			DIEP flaps		
	Total	Of participants with reinnervated DIEP flaps	Of participants with noninnervated DIEP flaps	Total	Reinnervated DIEP flaps	Noninnervated DIEP flaps
No. of breasts/flaps	21	10	11	21	10	11
Skin temperature, mean (SD), °C	31.7 (1.4)	31.7 (1.5)	31.8 (1.3)	32.0 (0.9)	32.0 (0.8)	32.0 (1.0)
Baseline skin blood flow, median (25 th -75 th percentile), a.u.	23 (15 - 38)	21 (14 - 36)	25 (15 - 32)	20 (13 - 30)	20 (13 - 35)	22 (14 - 26)
Peak skin blood flow, median (25 th -75 th percentile), a.u.	94 (74 - 141)	76 (59 - 87)	134 (97 - 151) ^a	59 (36 - 71) ^b	55 (39 - 68)	66 (36 - 77)
Onset of peak skin blood flow, mean (SD), min	2.8 (0.7)	2.8 (0.8)	2.9 (0.7)	2.9 (0.5)	2.8 (0.5)	3.0 (0.5)
Plateau skin blood flow, median (25 th -75 th percentile), a.u.	145 (112 - 234)	126 (95 - 147)	209 (140 - 279) ^a	74 (60 - 125) ^b	71 (63 - 101)	86 (57 - 142)

Baseline skin blood flow was calculated as average skin blood flow over a one-minute normothermic period. DIEP, deep inferior epigastric perforator; a.u., arbitrary units.

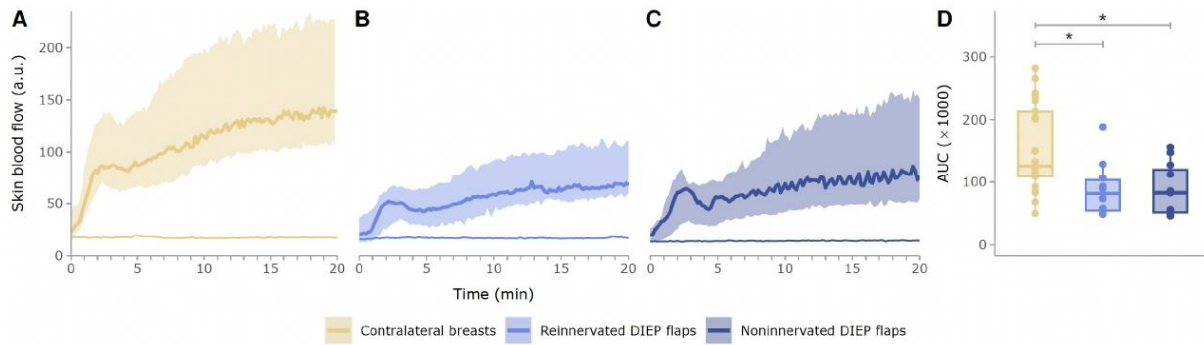
^a $p < 0.05$ compared with contralateral breasts of participants with reinnervated flaps.

^b $p < 0.05$ compared with total contralateral breasts.

Annexes 2

FIGURE LEGENDS

Figure 1

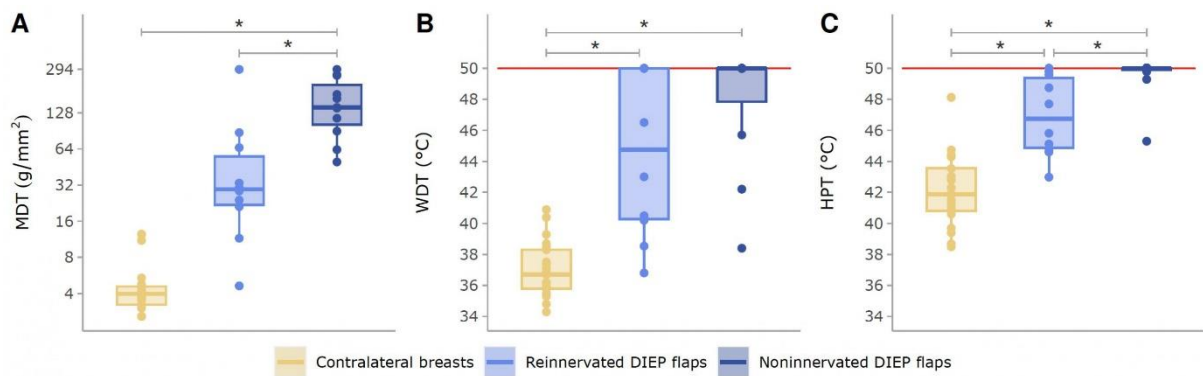


Title: (A-C) Skin blood flow in response to local heating, (D) area under the curve

Caption: (A-C) Thick colored lines represent median skin blood flow in response to local heating for 21 contralateral breasts (A), 10 reinnervated deep inferior epigastric perforator (DIEP) flaps (B), and 11 noninnervated DIEP flaps (C). Colored shaded areas represent interquartile spans. Thin colored lines represent mean control skin blood flow. (D) Horizontal lines inside the boxes represent median area under the curve (AUC). Shaded areas represent interquartile spans. a.u., arbitrary units. * $p < 0.05$.

Annexes 2

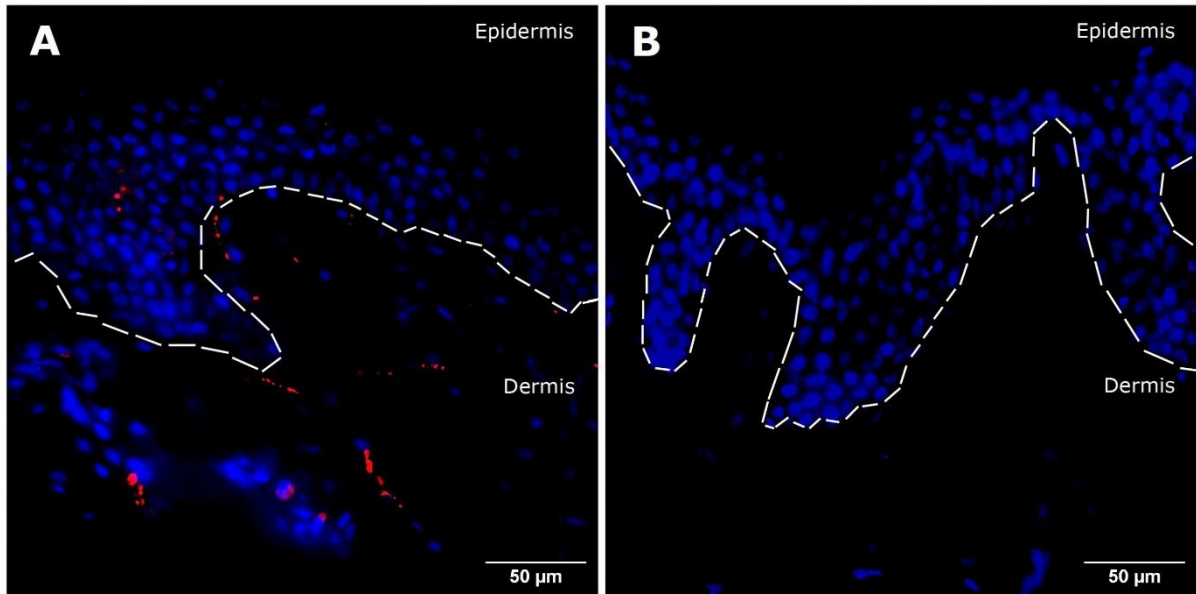
Figure 2



Title: (A) Mechanical detection, (B) warm detection, (C) and heat pain thresholds

Caption: Horizontal lines inside the boxes represent median mechanical detection thresholds (MDT; A), warm detection thresholds (WDT; B), and heat pain thresholds (HPT; C) for 21 contralateral breasts, 10 reinnervated deep inferior epigastric perforator (DIEP) flaps, and 11 noninnervated DIEP flaps. Shaded areas represent interquartile spans. Red lines represent the 50°C safety limit. * $p < 0.05$.

Figure 3



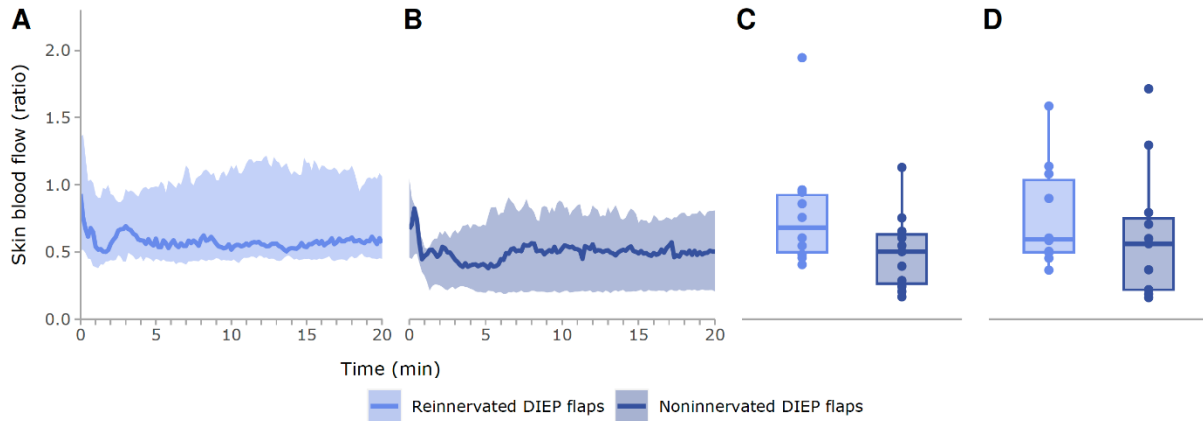
Title: Structural integrity of dermal and epidermal small sensory nerve fibers (A) in abdominal control skin, but not (B) in a reinnervated DIEP skin island

Caption: Dermal/epidermal small sensory nerves (PGP9.5; red) and cell nuclei (DAPI; blue) under 40× magnification. The white dashed lines indicate the dermal-epidermal junction.

Annexes 2

Figure, Supplemental Digital Content 1.

(A-B) Skin blood flow in response to local heating, (C) peak skin blood flow, (D) plateau skin blood flow, all expressed as ratio to contralateral



(A-B) Thick colored lines represent median skin blood flow in response to local heating expressed as ratio to the contralateral breast for 10 reinnervated deep inferior epigastric perforator (DIEP) flaps (A), and 11 noninnervated DIEP flaps (B). Colored shaded areas represent interquartile spans. (C-D) Horizontal lines inside the boxes represent median peak skin blood flow expressed as ratio to the contralateral breast (C), and median plateau skin blood flow expressed as ratio to the contralateral breast (D). Shaded areas represent interquartile spans.

Annexes 2

Table, Supplemental Digital Content 2.

Skin blood flow in response to local heating, expressed as ratio to contralateral

	Reinnervated DIEP flaps	Noninnervated DIEP flaps	<i>P</i>
No. of flaps	10	11	
Peak skin blood flow, median (25 th –75 th percentile), ratio	0.68 (0.50 – 0.92)	0.50 (0.27 – 0.63)	0.10
Plateau skin blood flow, median (25 th –75 th percentile), ratio	0.59 (0.50 – 1.04)	0.56 (0.22 – 0.75)	0.35

DIEP, deep inferior epigastric perforator

Annexes 2

Table, Supplemental Digital Content 3.

Linear regression analysis of factors associated with skin blood flow in response to local heating

	Contralateral breasts						DIEP flaps					
	Peak			Plateau			Peak			Plateau		
	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>	β	95% CI	<i>p</i>
Univariable analysis												
Flap reinnervation	-48	-84, -12	0.01	-80	-145, -16	0.02	4	-26, 35	0.77	-9	-56, 39	0.71
Chemotherapy	-40	-38, 3	0.07	-32	-114, 50	0.42	-14	-47, 20	0.40	-45	-93, 3	0.06
Tamoxifen	-37	-77, 2	0.06	-13	-89, 62	0.71	-5	-36, 26	0.74	-23	-70, 23	0.30
Hypertension	21	-28, 71	0.37	-13	-101, 75	0.76	-3	-40, 33	0.85	8	-47, 64	0.76
Ex-smoker	-13	-56, 29	0.52	-26	-100, 48	0.48	-2	-33, 29	0.90	6	-41, 54	0.78
Small fiber neuropathy	5	-38, 48	0.81	32	-42, 106	0.38	7	-24, 38	0.63	-1	-49, 46	0.95
Age at time of experiment, yr	2	-0, 4	0.07	-0	-4, 3	0.92	0	-1, 2	0.54	1	-1, 3	0.44
Contralateral breast symmetrization	-33	-78, 11	0.14	-26	-108, 57	0.52						
Follow-up time, yr							1	-12, 13	0.94	5	15, 24	0.62
Multivariable analysis												
Flap reinnervation	-39	-74, -4	0.03									
Chemotherapy	-27	-66, 11	0.15									
Age at time of experiment, yr	1	-1, 3	0.21									

DIEP, deep inferior epigastric perforator; CI, confidence interval. Unadjusted β -weights are reported for univariable analyses; adjusted β -weights are reported for multivariable analysis. Multivariable analysis of peak skin blood flow in contralateral breasts: adjusted $R^2 = 0.35$ ($p = 0.01$).

Annexes 2

Table, Supplemental Digital Content 4.

Warm detection and heat pain thresholds, by outcome group

	Reinnervated DIEP flaps	Noninnervated DIEP flaps
No. of participants	10	11
WDT, no. (%)		
≤ 50°C	6 (60)	3 (27)
> 50°C	4 (40)	8 (73)
HPT, no. (%) ^a		
≤ 50°C	9 (90)	4 (36)
> 50°C	1 (10)	7 (64)

DIEP, deep inferior epigastric perforator; WDT, warm detection threshold; HPT, heat pain threshold.

^a $p < 0.05$, by Fisher's exact test.

Chapter 3

Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis

Lisa S. Martin, Emma Fraillon, Fabien P. Chevalier and Bérengère Fromy

Abstract

Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) channels are expressed in various skin cells, including non-neuronal cell types such as epidermal keratinocytes. They are polymodal sensors of the environment, regulating physiological function in response to a wide variety of stimuli. Indeed, in addition to their significant role in thermal responses and thermoregulation, TRPV channels are also implicated in local skin inflammation processes. Thus, these calcium permeable channels are associated to multiples skin diseases with inflammation, such as atopic dermatitis or psoriasis. In this chapter, we will mainly focus on TRPV1 and TRPV3 channels, as emerging pivotal targets for maintaining skin homeostasis in psoriasis-related inflammation.

Keywords: skin, epidermis, TRPV1, TRPV3, calcium channel, inflammation, psoriasis

1. Introduction

Skin is the largest organ of human organism, approximately 2m². This envelop, in constant contact with the environment, can be divided into three layers: a deep layer, the hypodermis; then an intermediate layer, the dermis; and finally, a superficial layer, the epidermis. This top layer is mainly constituted of keratinocytes, which form the first physical and chemical barrier between the external environment and our body. To maintain this function, keratinocytes undergo a multistep process of differentiation, from proliferating cells of the *stratum basale* to *stratum spinosum* (mature basal cells linked by keratin filaments – desmosomes), *granulosum* (mature keratinocytes, which generate keratin and keratohyalin granules), and *lucidum* (dead and flattened cells), to finally generate dead cornified corneocytes found in *stratum corneum* [1, 2]. These highly differentiated cells, devoid of nucleus and organelles, form the cornified envelop and are essential for the skin barrier function.

Despite its major keratinocyte content, epidermis is also composed of other cell populations in order to ensure protection of our organisms [1, 2]. Its immunity is guaranteed by Langerhans cells, a dendritic cell that contributes to innate and

adaptative immunity [1, 2]. The sensory nerve endings passing through the epidermis (C-fibers and A δ -fibers) were thought to be the exclusive transducers for the detection of environmental factors such as heat and pain, but Merkel cells can also act as mechanosensors [3]. Free intra-epidermal sensory nerve endings are all unmyelinated: C-fibers are unmyelinated, while A δ -fibers lose their myelination when they enter the epidermis, allowing them to come into direct contact with the epidermal keratinocytes (**Figure 1A**) [4]. Therefore, in addition to the intra-epidermal sensory nerve endings, the epidermal keratinocytes also function as a sensory hub, able to detect environmental changes [5, 6]. Finally, the epidermis is constituted by another cell population: the melanocytes, located in the basal layer. With one for 4–10 keratinocytes, melanocytes provide a barrier from ultraviolet (UV) thanks to their ability to produce melanin, a photoprotector pigment [1, 2]. Opposite to the epidermis, the

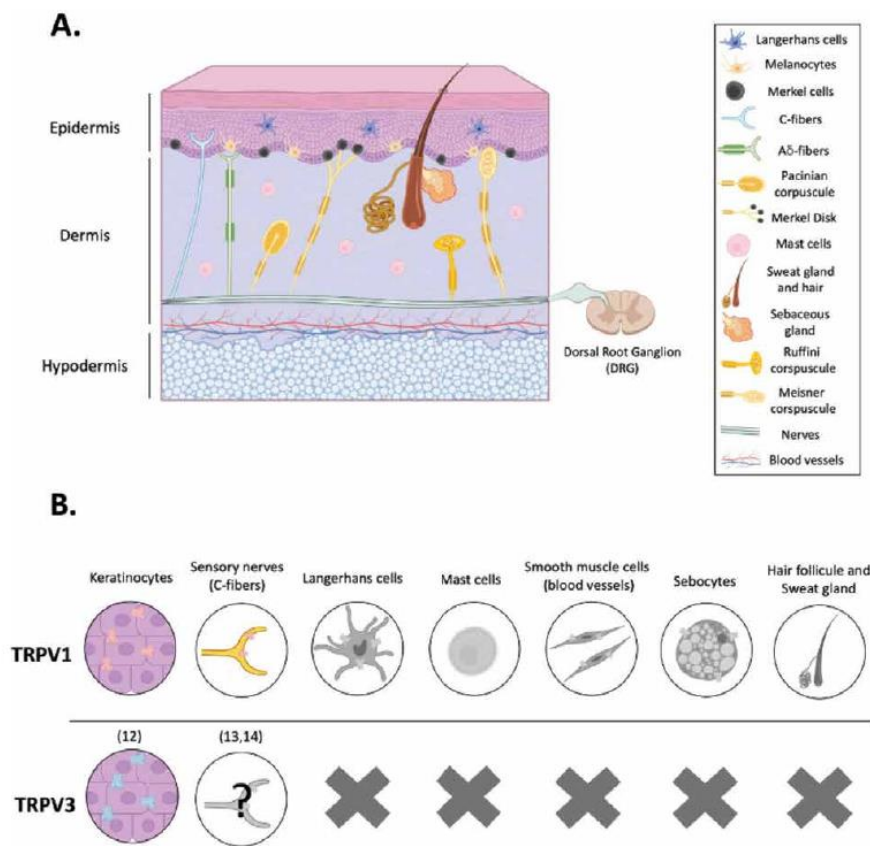


Figure 1. Schematic representation of skin and TRPV1/TRPV3 location. **A.** Skin structure. Skin and its three layers: epidermis, dermis, and hypodermis. Nerve fibers are present in the epidermis or in the dermis depending on their properties and their type. Two major groups of skin nerve fibers are represented: A δ fibers (green) poorly myelinated and able to pass through the dermo-epidermal junction, and A β fibers (yellow) strongly myelinated and not able to reach the epidermis. C-fibers are unmyelinated and able to pass through the dermo-epidermal junction. **B.** TRPV1 and TRPV3 location. TRPV1 is expressed in various cell types with a dominance in keratinocytes and sensory nerves (C fibers). TRPV3 expression is restricted to keratinocytes with a putative expres.

Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.103792>

dermis is mainly composed of extracellular matrix produced by dermal fibroblasts. This intermediate layer also supports dermal blood vessels, nerve fibers, and epidermal appendages (pilosebaceous unit and sweat glands). Finally, hypodermis is composed of adipocytes separated by connective tissue. This deep layer insulates and protects the skin from mechanical injuries [1, 2]. Thus, the skin allows a protection against external insults (ultraviolet, pathogens, mechanical pressure, etc....) but also contributes to the maintenance of homeostasis such as information transfer, vitamin and metabolites secretions, hydric and thermal regulation.

To cope with various external constraints, various cells of the skin express transmembrane sensors called Transient Receptor Potential (TRP) channels, which are involved in thermosensation, chemosensation, nociception, and mechanosensation [7]. TRP channels can be divided into six subfamilies: TRPA (ankyrin), TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPML (mucolipin), TRPP (polycystin), and TRPV (vanilloid). Although TRPV channels have a major role in thermosensation [8], they also contribute to keratinocyte differentiation, skin barrier formation, and permeability thanks to calcium regulation. However, it appears that an aberrant TRP channel expression and function might contribute to some skin inflammatory diseases. In this review, we will focus on TRPV1 and TRPV3 structures, activation mechanisms, and their physiological roles in skin. We will also provide a new approach to study TRPV1 and TRPV3 channels in a very common chronic inflammatory disease, such as psoriasis.

2. TRPV1 and TRPV3 structure and gating

2.1 Expression and genetics

Among the six members of TRPV channels, thermosensors TRPV1 and TRPV3 are calcium channel both highly expressed in the skin, with different cells types expression (**Figure 1B**). The TRPV1 channel was firstly described on nociceptive sensory nerves from Dorsal Root sensory Ganglia (DRG) by Caterina *et al* in 1997 [9]. TRPV1 was detected on a subset of skin sensory nerves, such as peptidergic and non-peptidergic C fibers. Different studies have also proposed TRPV1 channel to be expressed on non-neuronal skin cells population. Indeed TRPV1 is expressed in human and mouse skin as TRPV1 immunoreactivity has been observed on Langerhans cells, mast cells, endothelium, and smooth muscle cells from dermal blood vessels, differentiated sebocytes, sweat glands, hair follicles (inner root and infundibulum), and finally on keratinocytes [10–12].

Unlike TRPV1, TRPV3 channels tissue expression is more restricted. Peier *et al.* (2002) have demonstrated the expression of Trpv3 in the skin, with a strong immunodetection on keratinocytes from epidermis and hair of rat [13]. We also confirmed a higher TRPV3 expression in cultured human primary keratinocytes as compared with TRPV1 (5.5-fold change, unpublished data). In contrast, TRPV3 expression and activity on sensory nerves are still controversial. Indeed, TRPV3 mRNA was detected on sensory neuron in DRG and trigeminal ganglia of monkey [14], while others have reported an absence of Trpv3 activity on mouse DRG, and then suggested no expression on these cells [15]. Finally, another group has proposed a heterodimeric form TRPV1-TRPV3 on sensory neurons [16]. Even if TRPV3 expression on sensory nerves is not completely clear, it is believed that epidermal TRPV3 and sensory nerves are able to communicate via chemical mediators. Indeed, TRPV3 activation in keratinocytes causes the secretion of an array of signaling factors, such as Nerve Growth Factor (NGF), Nitric Oxide (NO), Prostaglandin E2 (PGE₂), and Adenosine-Triphosphate (ATP).

TRPV1 (chr17:3,565,446-3,609,411) and TRPV3 (chr17:3,513,190-3,557,805) genes exist in tandem on human chromosome 17, with the same transcriptional orientation and are distant from less than 7650 base pairs, indicative of an ancestral gene duplication. In humans, the TRPV1 gene spans 17 exons encoding an 839 amino acids (aa) protein. Alternative splicing may occur and give rise to a modified amino acids sequence in the first 150 residues. The TRPV3 gene spans 18 exons encoding a prevalent isoform of 790 amino acids. As for TRPV1, TRPV3 might be differentially spliced, yielding two additional isoforms of 791 (additional A in position 760) and 765 amino acids (peptide sequence at 760–765 modified from DFNKIQ to GTVAVR together with deletion of residues 766–790). The most prevalent forms of TRPV3 (790 aa) and TRPV1 (839 aa) share 43% sequence homology.

2.2 Common features

The TRP superfamily is the second largest class of ions channels with a voltage-dependent activation mechanism. However, TRP members not only respond to electric signal but are also able to sense several environmental stimuli, rendering them poly-modal sensors of the environment. These channels share a highly conserved protein architecture and require a tetrameric assembly to generate a functional central cation permeation pore. Apart from this ion channel pore, different subdomains of the TRPV proteins are responsible for their ability to be responsive to various environmental signals. Each subunit of the tetrameric complex is composed of six transmembrane

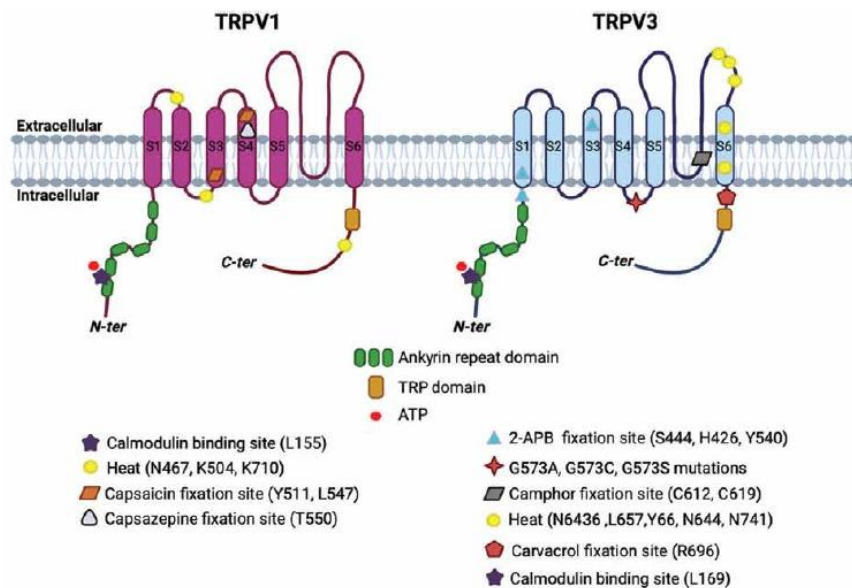


Figure 2. TRPV1 and TRPV3 structure. Left – Highlighting the fixation sites of TRPV1 activators (heat, capsaicin) and interacting protein (calmodulin). Right – Fixation sites of TRPV3 activators (2-APB, carvacrol, camphor, heat), interacting protein (calmodulin) and mutations involved in the establishment of the inflammatory response (G573A, G573C, G573S). Ankyrin repeat domain and TRP domain are conserved in TRPV1 and TRPV3 structures.

Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.103792>

segments (S1–S6), with the cation permeable pore formed by a reentrant loop located between S5 and S6 (**Figure 2**). The S1–S4 bundle likely forms the voltage sensor module, although TRPV1 and TRPV3 exhibit a weak voltage dependence for gating. This relatively low capacity of TRPV channels to respond to electric current may be due to the scarcity of positively charged amino acids in the S4 domain that contains a single arginine residue [17, 18]. The large cytoplasmic N-terminal part of a monomer comprises six ankyrin repeats, each consisting of a 33-residue motif forming two antiparallel alpha helices separated by loops linking the adjacent repeats. The ankyrin repeat domains (ARDs) are highly conserved in TRPV1 and TRPV3. The C-terminal part is also a large intracellular region containing a TRP-domain, another highly conserved distinctive and fundamental feature of TRP channels, consisting of a 25 amino acids α -helix structure with a conserved sequence IWKLQR called the TRP box. This TRP domain is running parallel to the inner plasma membrane and intimately lodged within the intracellular side of the S1–S4 module [19, 20]. A coiled-coil motif comprising residues of E684–R721 and overlapping with the TRP domain in the C-terminus of TRPV1 has been identified as an association domain and appears to be the molecular determinant of tetramerization [21]. In TRPV3, the C-terminal domain additionally forms a loop of 19 residues from V737 to V756, which has not been observed in other TRPV channels. This unique C-terminal loop domain extends along the TRPV3 intracellular skirt and forms an extensive network of interactions with ankyrin repeats 2–5 of the ARD [22]. Among all of these domains, several regions and specific residues have been mapped within TRPV1 and TRPV3 to regulate the channel gating. Indeed, heat, voltage, and ligand stimuli are sensed by TRPV channels by different structural domains.

2.3 Pore module

Both pores of TRPV1 and TRPV3 are prone to dilatation during stimulation, rendering them permeable for large cations [19, 23]. Thus, TRPV1 and TRPV3 are cation-selective channels exhibiting a notable preference for divalent cations, with the following permeability sequence: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na} + \approx \text{K}^+$. As for all TRPV channels, negatively charged amino acids in the pore play a central role in cation permeation, and furthermore, the opened pore is blocked by both extra- and intracellular cations. The S5–S6 segments are forming the central pore and the lower gate. This lower gate is formed by a hydrophobic seal, blocking permeation by hydrated ions when the channels are in their closed state. This hydrophobic seal is ensured by the critical residue I679 on S6 for TRPV1 and M677 on S6 for TRPV3 [20, 22]. An additional upper gate is formed by a short loop and helix between S5 and S6, called the pore helix (PH), and acts as a selectivity filter. TRPV1 displays a prolonged loop of 23 residues between S5 and the PH, named the pore turret. This pore turret is a mandatory structural domain for conformational rearrangements during heat activation of the TRPV1 channel, but is not part of the capsaicin agonist activation pathway [24, 25]. In TRPV3, the three key amino acids I644, N647, and Y661 located in the S6 are responsible for heat activation of the channel, since single-point mutants of these generate total loss of temperature activation, without affecting the overall TRPV3 structure [26]. Interestingly, the temperature sensitivity of the TRPV1 channel also implies the C-terminal domain [27].

2.4 Ligands

TRPV1 can be activated by numerous exogenous agonists including capsaicin, plant toxin resiniferatoxin (RTX), natural substances such as capsaicin-related

compounds from peppers, aromatic components, and animal vanillotoxins from the venom of the tarantula [28, 29]. For TRPV1, the three amino acids R491, Y511, and S512 in the S3 transmembrane segment are responsible for capsaicin sensitivity, while the region between S481 and T550 is responsible for binding of the antagonist capsaizepine, without affecting the temperature activation [30, 31]. Natural substances also activate TRPV3, including camphor (C612 and C619), carvacrol, thymol, and eugenol [32]. Moreover, TRPV3 can be activated by synthetic molecules such as the well-documented 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB).

2-APB is a common activator ligand of TRPV1 and TRPV3 channels [27]. In TRPV3, several transmembrane segments are implicated in the binding of the agonist 2-APB. In fact, there are three different sites of 2-APB fixation in TRPV3. A first site of fixation is involving S444 of S1, E501 and W493 of S2, and Y565, H523, and F526 of S3 that establish complementary interactions with different atoms of 2-APB [22]. A second site of 2-APB binding is mostly mediated by polar residues, such as H417 and T421 of the linker domain, H426 and H430 of the pre-S1 helix, and R693 and R696 of the TRP domain. Interestingly, the mutation H426A completely abolishes TRPV3 activation by 2-APB but not by camphor neither by carvacrol [22, 33, 34]. However, the residue R696 in the TRP domain appears critical in TRPV3 activation by external ligands since the mutation R696K abolishes 2-APB- and carvacrol-induced calcium influx [34]. The third site of 2-APB fixation is nested in a cavity formed by the extracellular portions of helices S1-S4 and is mediated through both hydrophobic and hydrophilic residues including V458, Y540, R487, and Q483 [22]. The binding of 2-APB on the first two sites described above does not induce gating-associated conformational changes. In opposite, dramatic structural rearrangements are observed when 2-APB binds the third site [22]. Thus, binding of 2-APB to the first two sites is likely a prerequisite for gating, by stabilizing the multiple domains during channel opening.

Endogenous ligands were also reported for TRPV1 and TRPV3: unsaturated N-acyldopamines, lipoxygenase products of arachidonic acid, linoleic acid, Phospholipase C metabolites, and the endocannabinoid anandamide [35].

2.5 Sensitization/desensitization

In both TRPV1 and TRPV3, the N-terminus module contains a domain able to bind calmodulin (CaM) in a Ca^{2+} -dependent manner [36]. This domain is located between the ankyrin repeats 2 and 3, which comprise a conserved site (K155 and K160 for TRPV1; K169 and K174 for TRPV3) involved in both CaM and ATP binding [37, 38]. In a resting cell, ATP is bound, and the channel is sensitized. Indeed, it has been shown that ATP binding to the TRPV1-ARD generates larger currents in response to capsaicin application [39, 40]. Hence, after channel opening, Ca^{2+} flows inward and chelates the ATP, which is released from TRPV1-ARD, thus freeing the binding site. In parallel, the Ca^{2+} influx activates CaM, and Ca^{2+} -CaM can replace the sensitizer and engages the ARD to close the channel [40]. Thus, CaM is involved in Ca^{2+} -dependent desensitization of TRPV1 [41].

The binding of ATP and Ca^{2+} -CaM to the N-terminal ARD observed in TRPV1 is conserved in TRPV3 [38], although differences exist. TRPV1 is desensitized after cumulative stimulations. In contrast, TRPV3 is the only member among the TRP channels that sensitizes upon repeated application of stimuli. In addition, the sensitization of TRPV3 is independent of the origin of the stimulus, it will sensitize regardless whether it is activated by heat or chemical ligands. TRPV3 also displays cross-sensitization to stimuli of a different nature, as camphor stimulation causes a

Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.103792>

sensitization to heat [42]. It is known that sensitization is due to the decrease of the inhibition by calcium from both sides of cells [43]. In the intracellular side, Ca^{2+} -CaM binds ARD and inhibits TRPV3, as described above for TRPV1. The TRPV3-ARD structure is very close to ARD from other members of TRPV channel family, except it exhibits a unique particular conformation of finger 3 loop. This linker region in between the ankyrin repeats 3 and 4 is greatly stabilized by a network of hydrogen bonds and an hydrophobic environment, instead of being flexible as seen in the other TRPV-ARD arrangements [44]. This stabilized finger 3 of TRPV3-ARD may cause steric hindrance, which impedes the binding of CaM. Therefore, CaM binding to ARD probably forces a conformational change of finger 3, thus resulting in an inhibition of TRPV3 function. Upon successive simulations, the finger 3 of TRPV3-ARD undergoes conformational change that decreases the binding of CaM, causing the channel to open more easily. Thus, the finger 3 of TRPV3-ARD functions as a switch in regulation of TRPV3 upon stimulation. Moreover, this distinctive finger 3 segment precedes a conserved threonine 264, which has been identified as a putative site for the ERK1-dependent modulation of TRPV3 [45]. Phosphorylation events could, therefore, alter the conformation of this important loop and powerfully influence the binding of regulatory factors [46]. In others contexts, the influence of phosphorylation events has been demonstrated especially for TRPV1, where phosphorylation of the channel induces sensitization, whereas dephosphorylation is associated to desensitization [47]. The TRPV1 C-terminus also contains modulatory domains able to be phosphorylated and to bind CaM through the 35 amino acids segment E767–T801 [41, 48].

In contrast to TRPV1, the naive TRPV3 channel does not show any intrinsic voltage-dependent activation. The voltage dependence only appears when the TRPV3 channel is primo-stimulated by chemicals or heat stimulus [43, 49]. This voltage dependence of TRPV3 is established by Ca^{2+} binding on N641 at the pore loop after opening. In addition, the voltage dependence is strongly influenced by Ca^{2+} -CaM binding at the cytoplasmic N terminus. Sensitization is accompanied by a decrease in the voltage dependence. Finally, the sensitized TRPV3 channels are less inhibited than the naive ones, showing faster activation at positive potentials and less deactivation at negative potentials. This gradual shift in Ca^{2+} -dependent regulation of TRPV3 activity is likely related to conformational changes after successive stimulations [43, 44, 46]. Considering the huge complexity in the structural arrangement and interactions of the multiple domains of the TRPV channels, it has been difficult to fully decipher the mechanisms of gating, and many questions remain open.

3. TRPV1 and TRPV3 channels in skin function

3.1 Epidermal barrier function

Ca^{2+} is well known to contribute to epidermal homeostasis and thus to the formation of an effective skin barrier [50, 51]. In order to maintain its barrier function, the epidermis needs to be renewed every 28 days depending on a calcium gradient. The increase in calcium concentration in the outer layer is essential for the terminal differentiation of keratinocytes, which will lead to the formation of the *stratum corneum* and ensure the skin's physical barrier role [51]. This supports the role of calcium-permeable channels in epidermal barrier function.

The role of TRPV3 in the epidermal differentiation process was highlighted after aberrant expression of early differentiation markers (i.e., KRT1/KRT10) in keratinocytes from

Trpv3-KO mice [52]. In addition, the decrease in transglutaminase activity contributed to an alteration in the *stratum corneum* formation. This regulation of keratinocyte differentiation process appears to be dependent on the TRPV3/TGF α /EGFR signaling axis [52, 53]. These data support the importance of TRPV3 channels as actors in the balance between proliferation and differentiation, thus giving them a crucial role in skin barrier formation. In contrast, the contribution of TRPV1 channels in the skin barrier remains unknown.

3.2 Sensory modalities in the healthy skin

TRPV1 is a major nonselective cation channel with polymodal mechanisms of activation [54]. Functional TRPV1 serves as a thermal sensor since it is gated by noxious heat greater than 42°C and also chili pepper [9, 55]. The heat nociception was almost abolished following ablation of TRPV1-expressing neurons in mice [56], but *Trpv1*-knockout mice display only a partial defect in the ability to sense and respond to acute noxious heat [57]. Partial explanation could be that three channels, including TRPV1, TRPM3, and TRAP1, act in concert to mediate behavioral responses to noxious heat [58]. Besides heat, TRPV1 channels can be directly activated by proton, such as extracellular acidification (pH less than ~6.0) [9, 59]. Consistently, an integrative study performed in healthy rats has shown that cutaneous vasodilation in response to cathodal stimulation was induced by TRPV1 channels, likely through local acidification and the PGIS/PGI2/IP pathway [60].

In contrast to TRPV1, TRPV3 was reported as a warm sensor for innocuous temperatures (approximately 33°C) in different *in vitro* studies [13, 14, 16]. Not surprisingly, a profound deficit in sensing warm external temperatures was described in mice lacking *Trpv3* [15]. Later it has been shown that *Trpv3*-KO mice displayed a preference toward cooler temperatures [61], showing that TRPV3 influences thermal information that is used to modulate thermal comfort or preference. TRPV3 on keratinocytes has been shown to play a role in thermosensation involving ATP signaling, but other molecules have also been reported [62]. The overexpression of TRPV3 in keratinocyte induces the release of PGE₂, an algogenic substance. Interestingly, in mice overexpressing *Trpv3* channels selectively in keratinocytes, an hyperalgesia was observed [63]. These data support that TRPV3 channels participate to the thermal and pain transduction through these mediators. More recently, *in vivo* demonstration was provided for the role of cutaneous *Trpv3* as a warm sensor of heating and a strong modulator of cutaneous vascular thermoregulatory mechanisms [64]. Since keratinocytes are representing the primary site of action of TRPV3 in mice (see the above section on TRPV3 expression), this study indicates that TRPV3 channels in the keratinocytes serve as heat detectors for warm temperatures to regulate cutaneous thermal homeostasis via initial changes in local blood flow. In contrast, TRPV1 channels are not involved in this process since *Trpv1*-KO mice displayed a normal heat-evoked vasodilation. It is interesting to note that *Trpv3*-KO mice showed a delay in behavioral response to noxious temperature over 50°C and 55°C, indicating that TRPV3 is also involved in response to acute painful heat stimuli [15]. This coincides with the ability to sensitize TRPV3 upon noxious heat stimuli [13]. Since *Trpv3*-KO mice and *Trpv1*-KO mice have an identical thermal nociceptive phenotype, this suggests that these two channels have overlapping thermal detection and functions.

4. TRPV1 and TRPV3 channels in psoriasis

Psoriasis is a chronic multifactorial inflammatory disease, resulting from the interaction between genetic predisposing factors and environmental triggers, with a

Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.103792>

global incidence ranging between 0.09% and 5.1% [65]. This dermatosis results from altered signaling between epidermal keratinocytes and the immune system leading to an uncontrolled keratinocyte proliferation (hyperplasia), impaired keratinocyte differentiation (hyperkeratosis), and chronic inflammation. The immune cells (i.e., dendritic and T cells) infiltrating skin lesions produce a wide variety of cytokines (IL-23, IL-17, IFN γ), which activate keratinocytes [66, 67]. Once activated, keratinocytes produce pro-inflammatory cytokines (i.e., IL-6, TNF α), chemokines (i.e., CXCL1, CCL2, CCL13), and antimicrobial peptides (cathelicidin, β -defensine) that further stimulate immune cells and thus maintain the disease in a chronic state. Therefore, keratinocytes not only respond to inflammation but also contribute to the recruitment and the activation of immune cells. Moreover, TRPV1 and TRPV3 channels have a predominant role in inflammation, pain, and pruritus and could be involved in the vicious cycle of the inflammation process in psoriasis.

Indeed, TRPV1 overexpression has been found in the skin of psoriatic patients and in the mouse model of “imiquimod-induced psoriasis” [68, 69]. Imiquimod (IMQ) is a potent immune activator stimulating the IL-23/IL-17 axis and thus mimicking psoriasis inflammation [70]. In 2014, Riol-Blanco *et al* have shown that ablation by RTX of TRPV1⁺/NaV1.8⁺ nociceptors reduces immune cells infiltration and psoriasis skin inflammation, by acting on IL-23 and IL17 release (**Figure 3**) [71]. Furthermore, this study revealed that TRPV1⁺/NaV1.8⁺ nociceptors can interact with dermal dendritic cells to regulate the IL-23/IL-17 axis during the initiation phase of psoriasis. Further data support a role for TRPV1 in this skin disease. In 2018, Zhou *et al.* also highlighted a significant decrease in epidermal hyperplasia, inflammatory cell infiltration, and cytokine production (IL-1, IL-6, IL-23) in IMQ-treated *Trpv1*-KO mice [69]. The NGF-TrkA-TRPV1 signaling pathway in nerve fibers has also been shown to play a role in psoriasis lesion formation [72]. Indeed, both nerve growth factor (NGF) and Tropomyosin receptor kinase A (TrkA) are highly expressed in psoriasis, and their interaction induces activation of TRPV1-mediated pain and pruritus [72–74]. Consistently, a TrkA kinase inhibitor (CT327) reduced pruritus of psoriatic patients (15). It is possible that NGF could sensitize TRPV1 channels on nerve fibers (NaV1.8⁺) during the initiation phase and then stimulate innate immune dermal dendritic cells for the induction of IL-23/IL-17 signaling, leading to the development of psoriasis. Together, these data confirm the involvement of TRPV1 in psoriasis, with a major role of sensory nerve fibers.

In contrast to TRPV1, TRPV3 channels seem to act on psoriasis from upper cell layers, such as keratinocytes. Indeed, TRPV3 channel expression is increased in psoriatic skin lesions, with significant labeling within the epidermis [68, 75]. Moreover, many studies have supported the role of TRPV3 on inflammation. Upon stimulation, TRPV3 can activate the EGFR/NF κ B pathway and induce the release of mediators, such as IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF α , ATP, and PGE2 [53, 76], which will in turn act on sensory nerves and provoke pain and itching [62, 63]. In addition, Zhao *et al.* recently proposed that protease-activated receptor (PAR2) sensitizes TRPV3 channels on keratinocytes, resulting in secretion of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), a potent pro-inflammatory cytokine. The latter then contributes to the production of IL-23 by dendritic cells and induces severe itching [77, 78]. Finally, the TRPV3 gain-of-function mutations G573S or G573C result in hyperkeratosis in mice, increased inflammatory cytokines in serum (IL-1 α , IL-6, IL-17), and high levels of pruritogenic substances, such as NGF (**Figure 3**) [79, 80]. To further endorse the role of TRPV3 in inflammation, the 17(R)-resolvin D1, an anti-inflammatory lipid, is able to suppress TRPV3-induced hypersensitivity/pain during the inflammatory response

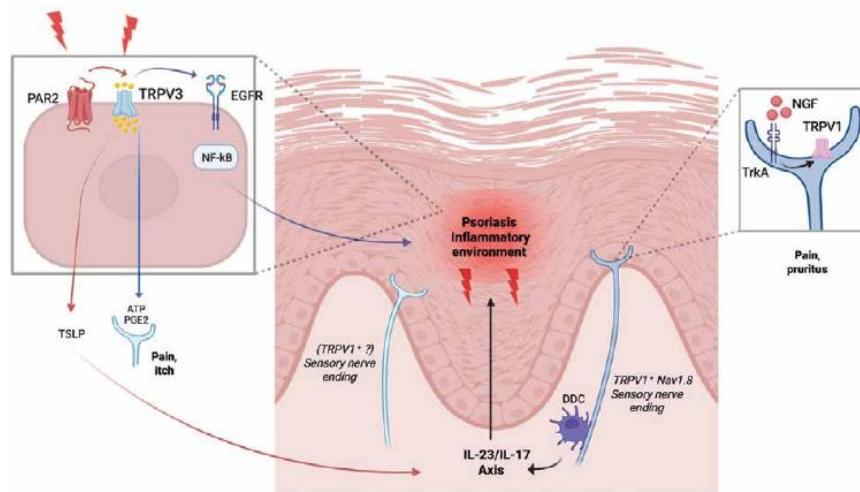


Figure 3. TRPV1 and TRPV3 in the pathophysiology of psoriasis. Left – Inflammatory environment in skin psoriasis stimulates PAR2 on keratinocytes. Activated PAR2 stimulates TRPV3, which leads to the production of TSLP, an activator of the IL-23/IL-17 axis (red arrows). Inflammation also directly activates TRPV3, which leads to the production and the fixation of ATP and PGE2 on C-fibers, leading to pain and itch (blue arrows). Activated TRPV3 also stimulates and activates EGFR. In this context, the EGFR activation induces the transcription of NF-κB, allowing the production of inflammatory cytokines that sustain the inflammatory process in the skin. Right – In a psoriasis skin, keratinocytes release NGF in the extracellular environment. NGF can interact with TrkA present on the TRPV1+/Nav1.8 nerve endings. This interaction activates TRPV1 and leads to pain and pruritus. The interaction of dermal dendritic cells (DDC) with TRPV1+/Nav1.8 nerve endings potentiates the activation of the IL-23/IL-17 axis.

in mice [81]. Moreover, injection of the TRPV3 antagonist 74a is able to attenuate pruritus and inflammatory response in mice with chronic inflammatory disease such as atopic dermatitis [77]. Thus, either through the activation of signaling pathways (EGFR/NFκB; PAR2) or the release of algogenic and pruritogenic mediators, TRPV3 channels appear to play a role in the initiation of psoriasis.

Altogether, these data support that TRPV1 and TRPV3 are actors of inflammation, either from sensory nerve fibers or from keratinocytes. Both channels seem to have fundamental role in the pathogenesis of psoriasis due to their ability to activate immune cells or to induce cytokine production. It could also be hypothesized that these two channels cooperate during the initiation process of psoriasis.

5. TRPV1 and TRPV3 channels in therapeutic perspectives of psoriasis

The well-known biological strategies to treat an inflammatory disease such as psoriasis consist of using a specific blocking antibody to freeze the interaction of a cytokine with its receptor and then blocking the underlying cytokine-specific biological response. As mentioned earlier, both TRPV1 and TRPV3 are involved in the inflammatory process of psoriasis and could also be potential therapeutic targets in this disease. Indeed, TrkA appears to be a potential target because its inhibition with CT327 blocks the overactivation of TRPV1 on sensory neurons. The discovery of this new molecule is promising since the decrease in pain and pruritus has been observed

Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.103792>

in psoriatic patients [72]. Interestingly, another study also demonstrated a decrease in skin hyperplasia and erythema in psoriasis murine models treated with the TRPV1 antagonist SB366791 [82]. Research on the inhibition of TRPV1 in psoriasis disease has already emerged and needs to be further explored.

As the TRPV3/TGF α /EGFR signaling complex seems to play a role in psoriasis, EGFR also becomes a potential therapeutic target. A recent clinical study showed that erlotinib, an EGFR inhibitor, significantly decreases hyperkeratosis and pain in Olmsted syndrome patients displaying a TRPV3 overactivation mutation [83]. This highlights that inhibition of EGFR could decrease keratinocytes hyperproliferation/differentiation and might also act on inflammation and pain. Since TRPV3 acts at the first line, directly targeting this channel could also be very promising. Indeed, we reported above some anti-inflammatory molecules, such as 17(R)-resolvin D1, which suppresses TRPV3-induced pain and inflammation. Another potential promising molecule is the TRPV3 antagonist called 74a, which has already proved its efficacy on another inflammatory skin disease [77].

It could be suggested that inflammatory environment activates TRPV3 from keratinocytes and TRPV1+ nerves for the induction of pain, itching, and inflammation. The cooperation of these two channels, with the potential activation of TRPV1 induced by downstream mediators of TRPV3, cannot be excluded. To increase further the complexity of the TRPV1 and TRPV3 relationship, it has been demonstrated that TRPV1 and TRPV3 could form interacting partners, therefore assembling heterochannels [84, 85]. The biological significance of these heterochannels is still not known, but this could be involved in a very fine-tuning of sensitivity. In addition, a recent study showed that the intergenic region between TRPV1 and TRPV3 coding sequences contained a human specific transposable element (SVA: SINE-VNTR-Alu retrotransposon) insertion, located upstream of the TRPV3 promoter and downstream of the 3' end of TRPV1 [86]. This SVA insertion acts as a cis-regulatory element allowing coexpression of TRPV1 and TRPV3 in multiple human tissues, which is not observed in mice. Thus, targeting these two channels simultaneously could be a very promising approach for the treatment of psoriasis in human.

6. Conclusion

TRPV1 and TRPV3 are important channels for maintaining the skin homeostasis and its function. A deregulation of their expression and/or activity is associated to the establishment of an inflammatory response. Several studies already demonstrated their contribution in psoriasis by highlighting their capacities to activate typical inflammatory pathways (IL-23/IL-17 axis, NF- κ B pathway) and/or to provoke the release of inflammatory mediators. It would therefore be interesting to explore the exact contribution of TRPV1 and TRPV3 in the psoriasis typical chronic skin inflammation: are they the trigger or are they one of the multiple factors involved in maintaining inflammation?

It would be interesting to explore the presence of TRPV1 and TRPV3 in other tissues of the body subjected to chronic inflammation, such as the intestinal epithelium. The future challenge will be to develop specific compounds that target the TRPV1/TRPV3 to limit chronic inflammation without affecting their physiological functions.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Notes

All of the artworks used were adapted from the illustration bank of Biorender (<https://biorender.com>).

Author details


Lisa S. Martin^{1,2}, Emma Fraillon^{1,2}, Fabien P. Chevalier^{1,2*} and Bérengère Fromy^{1,2*}

1 CNRS UMR 5305, Tissue Biology and Therapeutic Engineering Laboratory, Lyon, France

2 Claude Bernard University Lyon 1, Villeurbanne, France

*Address all correspondence to: fabien.chevalier@univ-lyon1.fr
and berengere.fromy@univ-lyon1.fr

IntechOpen

© 2022 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.103792>

References

- [1] Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau J-C, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*. 2016;**25**(2):92-98
- [2] Khavkin J, Ellis DAF. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 2011;**19**(2):229-234
- [3] Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. *Physiological Reviews*. 2006;**86**(4):1309-1379
- [4] Talagas M, Lebonvallet N, Leschiera R, Marcorelles P, Misery L. What about physical contacts between epidermal keratinocytes and sensory neurons? *Experimental Dermatology*. 2018;**27**(1):9-13
- [5] Denda M, Nakatani M, Ikeyama K, Tsutsumi M, Denda S. Epidermal keratinocytes as the forefront of the sensory system. *Experimental Dermatology*. 2007;**16**(3):157-161
- [6] Moehring F, Cowie AM, Menzel AD, Weyer AD, Grzybowski M, Arzua T, et al. Keratinocytes mediate innocuous and noxious touch via ATP-P2X4 signaling. *eLife*. 2018;**7**:e31684
- [7] Venkatachalam K, Montell C. TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*. 2007;**76**:387-417
- [8] Voets T. TRP channels and thermosensation. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2014;**223**:729-741
- [9] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;**389**(6653):816-824
- [10] Bodó E, Kovács I, Telek A, Varga A, Paus R, Kovács L, et al. Vanilloid Receptor-1 (VR1) is Widely Expressed on Various Epithelial and Mesenchymal Cell Types of Human Skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2004;**123**(2):410-413
- [11] Ständer S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, et al. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Experimental Dermatology*. 2004;**13**(3):129-139
- [12] Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, et al. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;**285**(5):1250-1252
- [13] Peier AM. A Heat-Sensitive TRP Channel Expressed in Keratinocytes. *Science*. 2002;**296**(5575):2046-2049
- [14] Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*. 2002;**418**(6894):181-186
- [15] Moqrich A. Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin. *Science*. 2005;**307**(5714):1468-1472
- [16] Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, et al. TRPV3 is a temperature-sensitive

- vanilloid receptor-like protein. *Nature*. 2002;**418**(6894):186-190
- [17] Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*. 2004;**430**(7001):748-754
- [18] Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T. Gating of TRP channels: a voltage connection? *The Journal of Physiology*. 2005;**567** (Pt 1):35-44
- [19] Cao E. Structural mechanisms of transient receptor potential ion channels. *Journal of General Physiology*. 2020;**152**(3):e201811998
- [20] Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*. 2013;**504**(7478):107-112
- [21] García-Sanz N, Fernández-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sánchez E, Fernández-Ballester G, et al. Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *The Journal of Neuroscience*. 2004;**24**(23):5307-5314
- [22] Singh AK, McGoldrick LL, Sobolevsky AI. Structure and gating mechanism of the transient receptor potential channel TRPV3. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2018;**25**(9):805-813
- [23] Chung M-K, Güler AD, Caterina MJ. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nature Neuroscience*. 2008;**11**(5):555-564
- [24] Cui Y, Yang F, Cao X, Yarov-Yarovoy V, Wang K, Zheng J. Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations. *Journal of General Physiology*. 2012;**139**(4):273-283
- [25] Yang F, Cui Y, Wang K, Zheng J. Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;**107**(15):7083-7088
- [26] Grandl J, Hu H, Bandell M, Bursulaya B, Schmidt M, Petrus M, et al. Pore region of TRPV3 ion channel is specifically required for heat activation. *Nature Neuroscience*. 2008;**11**(9):1007-1013
- [27] Colton CK, Zhu MX. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate as a Common Activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 Channels. In: Flockerzi V, Nilius B, éditeurs. *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 173-187. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 179).
- [28] Siemens J, Zhou S, Piskorowski R, Nikai T, Lumpkin EA, Basbaum AI, et al. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature*. 2006;**444**(7116):208-212
- [29] Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Molecular Pharmacology*. 2009;**75**(6):1262-1279
- [30] Jordt S-E, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to hot chili peppers. *Cell*. 2002;**108**(3):421-430
- [31] Marín-Burgin A, Reppenhagen S, Klusch A, Wendland JR, Petersen M. Low-threshold heat response antagonized by capsazepine in chick sensory neurons, which are capsaicin-insensitive. *The*

Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.103792>

European Journal of Neuroscience.
2000;**12**(10):3560-3566

[32] Broad LM, Mogg AJ, Eberle E, Tolley M, Li DL, Knopp KL. TRPV3 in Drug Development. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016;**9**(3):55

[33] Hu H, Grandl J, Bandell M, Petrus M, Patapoutian A. Two amino acid residues determine 2-APB sensitivity of the ion channels TRPV3 and TRPV4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;**106**(5):1626-1631

[34] Deering-Rice CE, Mitchell VK, Romero EG, Abdel Aziz MH, Ryskamp DA, Križaj D, et al. Drofenine: a 2-APB analog with improved selectivity for human TRPV3. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2014;**2**(5)

[35] Van Der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *European Journal of Biochemistry*. 2004;**271**(10):1827-1834

[36] Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, Gordon SE. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *The Journal of General Physiology*. 2004;**123**(1):53-62

[37] Nilius B, Bíró T, Owsianik G. TRPV3: time to decipher a poorly understood family member!: TRPV3. *The Journal of Physiology*. 2014;**592**(2):295-304

[38] Phelps CB, Wang RR, Choo SS, Gaudet R. Differential Regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 Sensitivity through a Conserved Binding Site on the Ankyrin Repeat Domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;**285**(1):731-740

[39] Lau S-Y, Procko E, Gaudet R. Distinct properties of Ca²⁺-calmodulin binding

to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel. *Journal of General Physiology*. 2012;**140**(5):541-555

[40] Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R. The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. *Neuron*. 2007;**54**(6):905-918

[41] Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;**100**(13):8002-8006

[42] Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KSR, et al. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*. 2005;**307**(5714):1468-1472

[43] Xiao R, Tang J, Wang C, Colton CK, Tian J, Zhu MX. Calcium Plays a Central Role in the Sensitization of TRPV3 Channel to Repetitive Stimulations. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;**283**(10):6162-6174

[44] Shi D-J, Ye S, Cao X, Zhang R, Wang K. Crystal structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of TRPV3 reveals unique conformation of finger 3 loop critical for channel function. *Protein & Cell*. 2013;**4**(12):942-950

[45] Vyklicka L, Boukalova S, Macikova L, Chvojka S, Vlachova V. The human transient receptor potential vanilloid 3 channel is sensitized via the ERK pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;**292**(51):21083-21091

[46] Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G. ThermoTRP channels as modular proteins with

- allosteric gating. *Cell Calcium*. 2007;**42**(4-5):427-438
- [47] Yao X, Kwan H-Y, Huang Y. Regulation of TRP Channels by Phosphorylation. *Neuro-Signals*. 2005;**14**(6):273-280
- [48] Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2006;**17**(6):638-645
- [49] Liu B, Yao J, Zhu MX, Qin F. Hysteresis of gating underlines sensitization of TRPV3 channels. *Journal of General Physiology*. 2011;**138**(5):509-520
- [50] Lee SE, Lee SH. Skin Barrier and Calcium. *Annals of Dermatology*. 2018;**30**(3):265-275
- [51] Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*. 2012;**30**(3):257-262
- [52] Cheng X, Jin J, Hu L, Shen D, Dong X, Samie MA, et al. TRP Channel regulates EGFR signaling in Hair Morphogenesis and Skin Barrier Formation. *Cell*. 2010;**141**(2):331-343
- [53] Wang Y, Li H, Xue C, Chen H, Xue Y, Zhao F, et al. TRPV3 enhances skin keratinocyte proliferation through EGFR-dependent signaling pathways. *Cell Biology and Toxicology*. 2020;**37**(2):313-330. DOI: 10.1007/s10565-020-09536-2
- [54] Bourinet E, Altier C, Hildebrand ME, Trang T, Salter MW, Zamponi GW. Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiological Reviews*. 2014;**94**(1):81-140
- [55] Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review of Neuroscience*. 2001;**24**:487-517
- [56] Binshtok AM, Bean BP, Woolf CJ. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature*. 2007;**449**(7162):607-610
- [57] Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000;**288**(5464):306-313
- [58] Vandewauw I, De Clercq K, Mulier M, Held K, Pinto S, Van Ranst N, et al. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature*. 2018;**555**(7698):662-666
- [59] Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;**97**(14):8134-8139
- [60] Gohin S, Decorps J, Sigaud-Roussel D, Fromy B. Sensory nerves contribute to cutaneous vasodilator response to cathodal stimulation in healthy rats. *Microvascular Research*. 2015;**101**:103-110
- [61] Marics I, Malapert P, Reynders A, Gaillard S, Moqrich A. Acute Heat-Evoked Temperature Sensation Is Impaired but Not Abolished in Mice Lacking TRPV1 and TRPV3 Channels. *PLoS One*. 2014;**9**(6):e99828
- [62] Mandadi S, Sokabe T, Shibasaki K, Katanosaka K, Mizuno A, Moqrich A, et al. TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflügers Archiv*. 2009;**458**(6):1093-1102

Hot on the Trail of Skin Inflammation: Focus on TRPV1/TRPV3 Channels in Psoriasis
DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.103792>

- [63] Huang SM, Lee H, Chung M-K, Park U, Yu YY, Bradshaw HB, et al. Overexpressed Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Ion Channels in Skin Keratinocytes Modulate Pain Sensitivity via Prostaglandin E2. *The Journal of Neuroscience*. 2008;**28**(51):13727-13737
- [64] Fromy B, Josset-Lamaugarny A, Aimond G, Pagnon-Minot A, Marics I, Tattersall GJ, et al. Disruption of TRPV3 Impairs Heat-Evoked Vasodilation and Thermoregulation: A Critical Role of CGRP. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018;**138**(3):688-696
- [65] Michalek IM, Loring B, John SM. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2017;**31**(2):205-212
- [66] Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of Psoriasis. *Annual Review of Immunology*. 2014;**32**:227-255
- [67] Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;**20**(6):1475
- [68] Nattkemper LA, Tey HL, Valdes-Rodriguez R, Lee H, Mollanazar NK, Albornoz C, et al. The Genetics of Chronic Itch: Gene Expression in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis with Severe Itch. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2018;**138**(6):1311-1317
- [69] Zhou Y, Follansbee T, Wu X, Han D, Yu S, Domocos DT, et al. TRPV1 mediates inflammation and hyperplasia in imiquimod (IMQ)-induced psoriasiform dermatitis (PsD) in mice. *Journal of Dermatological Science*. 2018;**92**(3):264-271
- [70] Fits L v d, Mourits S, JSA V, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *The Journal of Immunology*. 2009;**182**(9):5836-5845
- [71] Nociceptive Sensory Neurons Drive Interleukin-23 Mediated Psoriasiform Skin Inflammation. *Nature*. 2022;**510**(7503):157-161
- [72] Roblin D, Yosipovitch G, Boyce B, Robinson J, Sandy J, Mainero V, et al. Topical TrkA Kinase Inhibitor CT327 is an Effective, Novel Therapy for the Treatment of Pruritus due to Psoriasis: Results from Experimental Studies, and Efficacy and Safety of CT327 in a Phase 2b Clinical Trial in Patients with Psoriasis. *Acta Dermato-Venereologica*. 2015;**95**(5):542-548
- [73] Zhang X, Huang J, McNaughton PA. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *The EMBO Journal*. 2005;**24**(24):4211-4223
- [74] Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK. Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. *Progress in Brain Research*. 2004;**146**:433-437
- [75] Seo S, Kim S, Kim S-E, Chung S, Lee S. Enhanced Thermal Sensitivity of TRPV3 in Keratinocytes Underlies Heat-Induced Pruritogen Release and Pruritus in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2020;**140**(11):2199-2209.e6
- [76] Szöllősi AG, Vasas N, Angyal Á, Kistamás K, Nánási PP, Mihály J, et al. Activation of TRPV3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018;**138**(2):365-374
- [77] Zhao J, Munanairi A, Liu X-Y, Zhang J, Hu L, Hu M, et al. PAR2

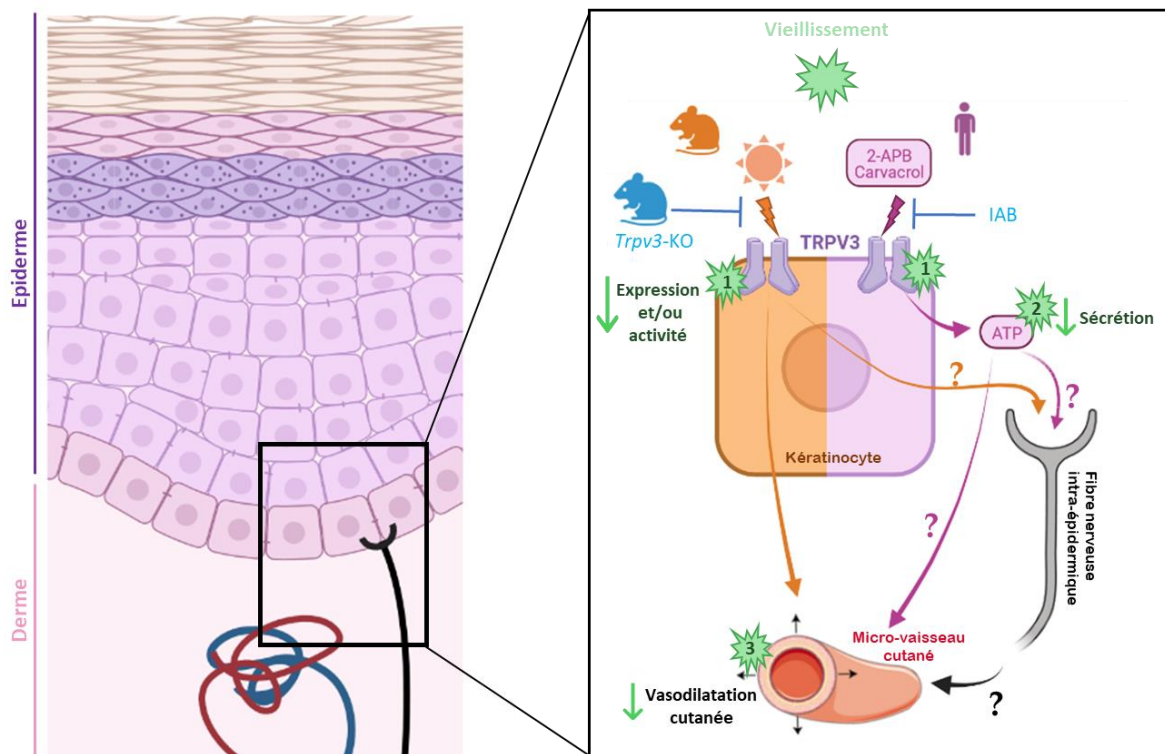
- Mediates Itch via TRPV3 Signaling in Keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2020;**140**(8):1524-1532
- [78] El-Ghareeb MI, Helmy A, Al Kazzaz S, Samir H. Serum TSLP is a potential biomarker of psoriasis vulgaris activity. *Psoriasis (Auckl)*. 2019;**9**:59-63
- [79] Yoshioka T, Imura K, Asakawa M, Suzuki M, Oshima I, Hirasawa T, et al. Impact of the Gly573Ser Substitution in TRPV3 on the Development of Allergic and Pruritic Dermatitis in Mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;**129**(3):714-722
- [80] Imura K, Yoshioka T, Hirasawa T, Sakata T. Role of TRPV3 in immune response to development of dermatitis. *Journal of Inflammation (Lond)*. 2009;**6**:17
- [81] Bang S, Yoo S, Yang T, Cho H, Hwang S. 17(R)-resolvin D1 specifically inhibits transient receptor potential ion channel vanilloid 3 leading to peripheral antinociception. *British Journal of Pharmacology*. 2012;**165**(3):683-692
- [82] Kemény Á, Kodji X, Horváth S, Komlódi R, Szőke É, Sándor Z, et al. TRPA1 Acts in a Protective Manner in Imiquimod-Induced Psoriasiform Dermatitis in Mice. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2018;**138**(8):1774-1784
- [83] Greco C, Leclerc-Mercier S, Chaumon S, Doz F, Hadj-Rabia S, Molina T, et al. Use of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Erlotinib to Treat Palmoplantar Keratoderma in Patients With Olmsted Syndrome Caused by TRPV3 Mutations. *JAMA Dermatology*. 2020;**156**(2):191-195
- [84] Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, et al. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*. 2002;**418**(6894):186-190
- [85] Cheng W, Yang F, Liu S, Colton CK, Wang C, Cui Y, et al. Heteromeric heat-sensitive transient receptor potential channels exhibit distinct temperature and chemical response. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;**287**(10):7279-7288
- [86] Price E, Gianfrancesco O, Harrison PT, Frank B, Bubb VJ, Quinn JP. CRISPR Deletion of a SVA Retrotransposon Demonstrates Function as a cis-Regulatory Element at the TRPV1/TRPV3 Intergenic Region. *IJMS*. 2021;**22**(4):1911.

Abstract

The skin is involved in a number of functions, including the maintenance of a stable body temperature. Indeed, the skin is the first to perceive external temperature variations, and therefore ensures an appropriate response. Historically, intra-epidermal nerve fibers were considered to be the exclusive transducers of temperature. However, recent studies have highlighted the involvement of keratinocytes, the main cells of the epidermis, in heat detection mechanisms. We have previously shown the role of a keratinocyte thermo-sensor, the TRPV3 (Transient Receptor Potential channel Vanilloid 3) channel, in the cutaneous vascular response to moderate heat. *Trpv3*-KO mice showed defects in vascular thermoregulation. These characteristics are also found in elderly populations which are highly sensitive to heat waves. In extreme conditions, this can lead to the development of hyperthermia, which can be fatal. With global warming, mortality rates, particularly among the elderly, are expected to raise in the coming years. It is therefore vital to increase our knowledge about heat dissipation mechanisms in order to reduce or prevent health risks. In this thesis, we characterized the role of the keratinocyte, via the TRPV3 channel, in the failure of cutaneous vascular thermoregulation with age. To do this, we exposed aged mice to local or global heating in order to assess their thermoregulatory capacities, in comparison with young mice. We showed that aged mice exhibited a defect in cutaneous vasodilation in response to local heat that was close to the defect observed in young *Trpv3*-KO mice. These results suggest that local heat-induced vasodilation in aged mice is associated with reduced heat sensing abilities ($\geq 33^{\circ}\text{C}$), probably due to impaired TRPV3 function. Conversely, we showed that thermoregulatory mechanisms in response to global heating did not appear to be solely dependent on TRPV3 with age, and were more pronounced in males. In addition, we showed that *TRPV3* gene expression was decreased with aging in mouse skin (hind paw) and in human epidermis, independently of ~~sex~~ the gender. This strengthens the hypothesis of a defect in the detection of moderate heat with age, preventing the initiation of cutaneous vasodilation. In parallel with TRPV3 expression, we also observed that aging reduced the activity of the TRPV3 channel and the ATP release by keratinocytes after TRPV3 stimulation. In conclusion, our study confirms that the initial detection of moderate temperature, via the TRPV3 heat-sensitive epidermal sensor, is crucial for the skin to trigger thermoregulatory mechanisms in response of thermal stress. This provides a new function for the keratinocyte as a fundamental thermo-sensor and transducer of its thermal environment. With aging, the decrease in TRPV3 expression and activity could reduce or delay the detection of temperature changes in the skin, thereby limiting the mechanisms triggered for thermoregulation, including cutaneous vasodilation.

Résumé

La peau est un organe qui assure diverses fonctions, dont le maintien d'une température corporelle stable. En effet, la peau est la première à percevoir les variations de température externe, et assure donc la mise en place d'une réponse adaptée. Historiquement, les fibres nerveuses intra-épidermique étaient considérées comme transducteurs exclusifs de la température. Cependant, de récentes études ont mises en évidence l'implication des kératinocytes, cellules majoritaires de l'épiderme, dans les mécanismes de détection de chaleur. Nous avons précédemment montré le rôle d'un thermo-senseur kératinocytaire, le canal TRPV3 (TRPV3 (Transient Receptor Potential channel Vanilloid 3), dans les mécanismes de réponse vasculaire cutanée à la chaleur modérée. En effet, les souris *Trpv3*-KO présentaient des défauts de thermorégulation vasculaire. Ces caractéristiques sont également retrouvées dans les populations âgées fortement sensibles aux vagues de chaleur. Dans des conditions extrêmes, ceci peut donc aboutir au développement d'hyperthermie, qui peut être fatale. Avec le réchauffement climatique, la mortalité notamment chez les personnes âgées est amenée à augmenter dans les prochaines années. Il est donc primordial d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes de dissipation de la chaleur, afin de réduire ou de prévenir le risque sanitaire. Lors de cette thèse nous avons caractérisé la place du kératinocyte, via le canal TRPV3, dans le défaut de thermorégulation vasculaire cutanée avec l'âge. Pour cela nous avons exposé des souris âgées à un chauffage local ou global afin d'évaluer leurs capacités de thermorégulation, en comparaison des souris jeunes. Nous avons montré que les souris âgées présentaient un défaut de vasodilatation cutanée en réponse à une chaleur locale qui était proche du défaut observé chez les jeunes souris *Trpv3*-KO. Ces résultats suggèrent que la vasodilatation induite par la chaleur locale chez les souris âgées est liée à une réduction des capacités de détection à la chaleur ($\geq 33^{\circ}\text{C}$), probablement en raison d'une altération de la fonction TRPV3. A l'inverse, nous avons montré que les mécanismes de thermorégulation en réponse à un chauffage global ne semblaient pas être uniquement dépendants de TRPV3 avec l'âge, et étaient plus prononcés chez les mâles. En complément, nous avons montré que l'expression génique de TRPV3 était diminuée avec l'âge dans la peau de souris (coussinet) et dans l'épiderme humain, indépendamment du sexe. Ceci renforce l'hypothèse d'un défaut de détection de chaleur modérée avec l'âge, empêchant d'initier la vasodilatation cutanée. En parallèle de l'expression de TRPV3, nous avons également observé que le vieillissement diminuait l'activité du canal ainsi que l'ATP libéré par les kératinocytes après une stimulation de TRPV3. En conclusion, notre étude confirme que la détection initiale d'une température modérée, par le biais du capteur épidermique sensible à la chaleur TRPV3, est cruciale pour que la peau déclenche les mécanismes de thermorégulation face à un stress thermique. Cela offre une nouvelle fonction au kératinocyte en tant que thermo-senseur fondamental et transducteur de son environnement thermique. Avec le vieillissement, la diminution de l'expression et de l'activité du TRPV3 pourrait réduire ou retarder la détection des changements de température de la peau, limitant ainsi les mécanismes déclenchés pour la thermorégulation, y compris la vasodilatation cutanée.



Résumé graphique des résultats de thèse

Chez la souris jeune, l'exposition à une chaleur modérée (33-40°C) stimule le canal *Trpv3* et conduit à une vasodilatation des micro-vaisseaux cutanés. Au cours du vieillissement, l'expression de *Trpv3* diminue dans les zones de thermorégulation (peau des coussinets) et est associée à une altération de la réponse vasculaire cutanée, de manière similaire aux souris jeunes *Trpv3*-KO. Chez l'être humain, la stimulation de TRPV3, sur des kératinocytes primaires, par des agonistes pharmacologiques (2-APB + carvacrol) induit la libération d'ATP, un second messenger susceptible d'agir sur les fibres nerveuses intra-épidermiques ou sur les micro-vaisseaux cutanés. Dans les kératinocytes primaires humains, le vieillissement est également corrélé à une chute de l'expression de *TRPV3* et de son activité. Ceci se traduit par une réduction de la sécrétion d'ATP dépendante de TRPV3, dont la spécificité d'action a été confirmée par l'antagoniste IAB.