



Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UFR Médecine
Ecole Doctorale Science Technologie Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Biochimie et Biologie Moléculaire

Par

Jézabel FERU

Le 9 décembre 2013

**Etude de la diminution du collagène IV au cours du
vieillessement cutané et des mécanismes impliqués**

Directeur de thèse

Sylvie BRASSART-PASCO

Membres du Jury

Président du jury: Monsieur le Professeur François-Xavier MAQUART

Rapporteurs : Madame le Docteur Patricia ROUSSELLE

Monsieur le Docteur Bernard COULOMB

Examineurs : Madame le Docteur Christine JEANMAIRE

Monsieur le Docteur Olivier PIOT

Directeur de thèse : Madame le Docteur Sylvie BRASSART-PASCO

N° attribué par la bibliothèque :

||R|E|I| | | | |

A la mémoire de mon père,

A ma mère,

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart, directeur du laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, FRE CNRS 3481, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Ensuite, je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Docteur Sylvie Brassart-Pasco pour avoir dirigé cette thèse et pour m'avoir formée depuis mon master 2. Merci pour tes conseils, ton encadrement et ton aide lors de la rédaction de ce manuscrit. Je n'aurais pu espérer meilleure directrice de thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux Dr. Patricia Rousselle et Dr Bernard Coulomb pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteurs, ainsi que les Dr Christine Jeanmaire, Dr Olivier Piot et Pr François-Xavier Maquart pour avoir accepté d'être examinateurs.

Je remercie le Docteur Christine Terryn pour son aide précieuse lors de mes analyses d'images et pour m'avoir formée et guidée sur le microscope confocale.

Je remercie également les Docteurs Olivier Piot et T.T Nguyen pour les études en spectroscopie Raman.

Un grand merci au Dr Sandrine KURDIKOWSKI pour m'avoir formée à travailler sur les explants de peau.

Je remercie toutes les personnes ayant partagé, de façon plus ou moins longue, mon bureau : Karine et Aïda, mes premiers repères au sein du labo et

qui m'ont énormément manqué après leur départ. Emilie avec qui j'adorais discuter de tout et de rien. Alexia et Melissa les Master 1 avec qui j'ai adoré avoir des discussions « girly » et mettre des fonds d'écran « Barbie ». Mélissa tu vas reprendre à la perfection mon rôle de « Miss boulettes » (Pauvre Bertrand).

Bertrand avec ses blagues, la bonne humeur qu'il instaure dans le bureau, ses magnums (humm) mais aussi ses conseils scientifiques et la relecture du manuscrit.

Je remercie les techniciennes Coco et Aurélie, pour leur grande patience face à toutes mes questions et surtout parce qu'elles participent grandement à la bonne ambiance qui règne au sein du laboratoire.

Une pensée pour les « disparues » : Claire, ma copine de « True blood » ainsi que Caro et Julia. J'ai bien rigolé avec vous !!

Plus généralement, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont partagé mon quotidien au laboratoire : Catherine, Isabelle, Christelle ... Marlène j'aurais aimé te connaître avant, j'aime beaucoup discuter avec toi. Laetitia bon courage pour ta dernière année mais je ne m'inquiètes pas pour toi tu assures trop. Kashia qui a démarré et terminé cette aventure avec moi : plein de bonnes choses pour la suite !

Karim, merci pour nos discussions ... ça me manquera !

Pour les remerciements plus personnels :

A ma famille en général, car c'est ce qui compte le plus dans la vie,

Puis plus particulièrement à ma maman, je n'ai pas de mots pour exprimer ce que je ressens pour toi et pour te remercier comme tu le mérites ! Pour tout ce que tu fais pour moi depuis toujours et pour être mon pilier le plus solide ! Cette thèse est aussi la tienne !

Toutes mes pensées vont vers mon père, mon ange gardien ... tu me manques encore plus cruellement en cette période ! J'ai démarré toute cette aventure pour toi ...JE L'AI FAIT PAPA !!

Je remercie Beau papa pour son rôle de second père et pour s'occuper si bien de moi depuis que je suis toute petite.

Merci à mes deux meilleures amies : Laetitia ma sœur de cœur avec qui j'ai passé une adolescence de rêve pleine de fou rires , et Lucie pour avoir été là dans des moments très durs et les avoir transformés en souvenirs mémorables ! je vous aime les filles !

Et puisque (presque) tout est permis dans cette partie de manuscrit, j'ai une tendre pensée pour mes 3 bébés : Pokito, Socrate et Titoune !! Mes bebettes d'amours qui m'apaisent et qui m'apportent leur amour inconditionnel.

Je finirais par toi Jordan et je ne dirais qu'une chose : tout commence maintenant ...

RESUME

Titre : Etude de la diminution du collagène IV au cours du vieillissement cutané et des mécanismes impliqués

Le vieillissement cutané s'accompagne d'altérations des composants de la matrice extracellulaire. Des études ont montré que le contenu en collagène IV diminuait dans la peau à partir de 35 ans. Le collagène IV, constituant majeur des membranes basales, est formé de l'association, en triple hélice, de 3 chaînes α parmi 6 possibles: $\alpha 1(IV)$ à $\alpha 6(IV)$. Au niveau de la membrane basale cutanée, encore appelée jonction dermo-épidermique, seulement deux isoformes de collagène IV ont été mises en évidence : [$\alpha 1(IV)_2$; $\alpha 2(IV)$], isoforme majoritaire, et [$\alpha 5(IV)_2$; $\alpha 6(IV)$], isoforme minoritaire, synthétisées par les fibroblastes et les kératinocytes. Nous avons vérifié, par western-blot sur des extraits de peaux, cette diminution de collagène IV. Nous avons ensuite analysé la répartition du collagène IV au niveau de la JDE sur des coupes transversales de peau et n'avons pu mettre en évidence de discontinuité dans le réseau de collagène IV avec l'âge, du fait des fortes variations inter-individuelles. Parallèlement, sur coupe de peau, nous avons tenté de mettre en évidence des différences spectrales du collagène IV avec l'âge par spectroscopie Raman mais la résolution s'est avérée insuffisante. Nous avons isolé des fibroblastes de patients d'âges différents et montré une diminution de l'expression génique de la chaîne $\alpha 1(IV)$ malgré de fortes variations inter-individuelles. Afin de s'affranchir de ces variations inter-individuelles pour étudier les mécanismes impliqués dans la diminution d'expression du collagène IV, nous avons mis au point un modèle de vieillissement accéléré de fibroblastes traités à l' H_2O_2 et vérifié le phénotype sénescence des cellules (morphologie modifiée, augmentation de l'activité SA- β -galactosidase, augmentation de p21^{WAF-1}...). Nous nous sommes intéressés à la voie du TGF- $\beta 1$. Nous avons montré que l'expression du récepteur au TGF- $\beta 1$, T β RII, diminuait dans le modèle de vieillissement accéléré. Nous avons également montré qu'un anticorps bloquant anti-TGF- $\beta 1$ reproduisait la diminution d'expression de collagène IV observée au cours de la sénescence. La détermination du mécanisme impliqué pourrait permettre, à terme, de proposer de nouvelles stratégies pour maintenir l'intégrité de la membrane basale lors du vieillissement cutané.

Mots clés : collagène de type IV, vieillissement cutané, fibroblastes dermiques, sénescence, TGF- $\beta 1$

ABSTRACT

Title: Study of type IV collagen decrease during skin aging and involves mechanisms

During aging skin there are extracellular matrix alterations. Preliminary studies showed that type IV collagen content decreased in skin with age after 35 years. Type IV collagen is a major component of basement membranes. It's constituted by the association of 3 alpha chains among 6 possible ($\alpha 1$ to $\alpha 6$). In the cutaneous basement membrane also called dermo-epidermal junction, only two isoform of type IV collagen were found: [$\alpha 1(IV)_2$; $\alpha 2(IV)$], which is majoritary isoform, and [$\alpha 5(IV)_2$; $\alpha 6(IV)$], which is minority, both synthesized by fibroblasts and keratinocytes. We checked the decrease in type IV collagen by western-blot on skin extracts. We then analyzed the distribution of this collagen in the DEJ on skin sections but we were not able to highlight a discontinuity in the network of type IV collagen during aging. At the same time, we tried to highlight spectral differences of the collagen IV with aging by Raman spectroscopy on skin sections but the resolution was insufficient. 35 years. We showed a decrease of type IV collagen expression by dermal fibroblasts in spite of strong variation between patients. In order to study the mechanism involved in type IV collagen variation during aging in dermal fibroblasts avoiding inter-individual variations, we develop an accelerated aging model of fibroblasts by treatment with H_2O_2 . We checked the senescent phenotype of the cells (modified morphology, increase of SA- β -galactosidase activity, increase of p21^{WAF-1} ...). We were interested on the TGF- β 1 pathway and we showed that TGF- β 1 receptor, called T β RII, was decreased in our accelerated aging model. We also showed that a blocking antibody against TGF- β 1 reproduced the decrease of type IV collagen expression observed during the senescence. The determination of the involved mechanism could lead to propose new strategies to maintain the integrity of the basal membrane during skin aging.

Keywords : IV collagen, skin aging, dermal fibroblasts, senescence, TGF- β 1

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ABBREVIATIONS	13
LISTE DES COMMUNICATIONS	17
LISTE DES PUBLICATIONS	18
<i>A. Introduction</i>	19
I Les collagènes	21
I-1 Généralités	21
I-2 Le collagène IV	23
I-2-1 Organisation génique et régulation	23
I-2-2 Structure du collagène IV	25
I-2-3 Mise en place du réseau de collagène IV	27
I-2-4 Distribution tissulaire des chaînes α (IV)	28
I-2-5 Collagène IV et pathologies	28
I-2-6 Collagène IV et vieillissement	28
I-3 Régulation de la synthèse de collagène IV par le TGF-β	29
I-3-1 Le TGF- β	29
I-3-1-1 Généralités	29
I-3-1-2 Synthèse et sécrétion	30
I-3-1-3 Activation du récepteur	30
I-3-1-4 Voies de signalisation impliquées	31
I-3-1-4-1 La voie des Smads	31
I-3-1-4-2 La voie des MAP kinases	32
I-3-1-4-3 La voie des PI3K/Akt	33
I-3-2 Rôle dans la synthèse de collagène	34
I-3-2-1 Collagène I	34
I-3-2-2 Collagène IV	36
II. La peau	37

II-1 Fonctions physiologiques de la peau	37
II-1-1 Protection	37
II-1-2 Détection des informations extérieures	38
II-1-3 Maintien de la température corporelle (thermorégulation)	38
II-2 Structure	39
II-2-1 L'épiderme	39
II-2-1-1 La couche cornée (stratum corneum)	40
II-2-1-2 La couche claire (stratum lucidum)	41
II-2-1-3 La couche granuleuse (stratum granulosum)	41
II-2-1-4 La couche épineuse (stratum spinosum)	41
II-2-1-5 La couche basale (stratum germinativum)	42
II-2-1-6 Principales cellules de l'épiderme	42
II-2-2 Le derme	42
II-2-2-1 Derme papillaire	43
II-2-2-2 Derme réticulaire	43
II-2-3 Hypoderme	44
II-3 Jonction dermo-épidermique	44
II-3-1-Généralités	44
II-3-2 Structure	45
II-3-3 Les principaux composants	47
III. Le vieillissement cutané	50
III-1 Vieillissement extrinsèque	50
III-1-1 Influence du tabac et de la nicotine	50
III-1-2 Influence de l'exposition solaire	50
III-1-3 Influence de la pollution de l'air	52
III-2 Vieillissement intrinsèque	52
III-2-1 Influence des facteurs génétiques	52
III-2-2 Influence des variations hormonales	52
III-2-3 Influence du stress oxydatif	53
IV. La sénescence	56
IV-1 Evolution du concept de sénescence	56
IV-2 la sénescence répllicative	57
IV-2-1 Phénotype sénescents	58
IV-2-2 Morphologie cellulaire	58
IV-2-3 La SA β -gal (senescence associated beta-galactosidase)	59
IV-2-4 Délétion de l'ADN mitochondrial	60
IV-2-5 Les gènes associés à la sénescence	60
IV-2-6 Raccourcissement des télomères	62

IV-2-7 Arrêt irréversible du cycle cellulaire	63
IV-2-8 Voies de signalisations impliquées	64
IV-2-9 Rôle de la sénescence dans le vieillissement	67
IV-3 La sénescence accélérée induite par le stress	68
IV-3-1 Stress aigu sublétal: sénescence accélérée induite par le stress oxydatif	68
IV-3-1-1 Voies de signalisation impliquées dans la sénescence accélérée induite par H ₂ O ₂	69
IV-3-1-2 Expression des gènes associés à la sénescence par les fibroblastes dermiques humains traités avec H ₂ O ₂	70
IV-3-2 Stress chronique sublétal: sénescence accélérée induite par le stress au NaCl	71
B. But de l'étude	73
C. Matériel et Méthodes	75
I. Matériels et réactifs utilisés	76
II. Méthodes	83
II-1 Isolement et culture cellulaire	82
II-2 Immunohistochimie	82
II-2-1 Coupes congelées	82
II-2-2 Coupes de peaux incluses en paraffine	83
II-3 Spectroscopie Raman sur coupes transversales de peau	84
II-3-1 Principe	84
II-3-2 Analyse	85
II-4 Obtention des différents modèles de vieillissement	85
II-4-1 Modèle murin	85
II-4-1-1 Vieillessement naturel	85
II-4-1-2 Vieillessement accéléré	85
II-4-2 Modèle humain	86
II-4-2-1 Vieillessement naturel	86
II-4-2-2 Vieillessement accéléré induit par passages successifs	86
II-4-2-3 Vieillessement accéléré induit par traitement au peroxyde d'hydrogène	86
II-4-2-4 Vieillessement accéléré induit par traitement au chlorure de sodium	86
II-5 Mesure de la viabilité cellulaire	87
II-6 Mesure de l'activité de la Senescence Associated-β-galactosidase	87
II-7 Analyse en PCR quantitative	87
II-7-1 Extraction d'ARN	87
II-7-2 Analyse qualitative et quantitative des ARN	88
II-7-3 Transcription inverse	89
II-7-4 PCR temps réel	89

II-7-4-1 Principe	89
II-7-4-2 Mise au point	90
II-7-4-3 Protocole	90
II-8 Analyse protéique	91
II-8-1 Obtention des protéines à partir des milieux conditionnés	91
II-8-2 Extraction des protéines à partir des couches cellulaires	91
II-8-3 Dosage protéique	91
II-8-4 Western-blot	91
II-8-4-1 Electrophorèse	91
II-8-4-2 Transfert	92
II-8-4-3 Immunodétection	92
II-8-5 Dosage E.L.I.S.A (enzyme-linked immunosorbant assay)	92
II-8-5-1 Collagène IV	92
II-8-5-2 TGF- β 1	93
II-8-6 Etude des protéines phosphorylées : voie du TGF- β 1	94
II-8-7 Immunoprécipitation des Smads phosphorylées	95
II-9 Analyses statistiques	91
D.Résultats	97
I.Etude de l'expression du collagène IV lors du vieillissement naturel	98
I-1 Analyses à partir de peaux totales	98
I-1-1 Analyse par western-blot sur peaux totales	98
I-1-2 Analyse immunohistochimique	99
I-1-2-1 Marquage fluorescent	99
I-1-2-1-1 Validation des coupes à étudier par mesure de la longueur de la JDE	99
I-1-2-1-2 Analyse du réseau de collagène IV au cours du vieillissement	101
I-1-2-2 Marquage révélé à la peroxydase	102
I-1-3 Etude du collagène IV de la JDE par microscopie RAMAN	104
I-2 Analyses à partir de fibroblastes dermiques	106
I-2-1 Fibroblastes issus de prépuces	108
I-2-2 Fibroblastes issus de seins	108
I-2-2-1 Niveau génique	108
I-2-2-2 Niveau protéique	109
II. Mise au point d'un modèle de vieillissement accéléré pour étudier la diminution de collagène IV	111
II-1 Modèle murin	111
II-1-1 Vieillessement naturel	111
II-1-2 Vieillessement accéléré : souris SAM	112

II-2 Modèle humain	113
II-2-1 Vieillessement par passages successifs	113
II-2-1-1 Mise en évidence du phénotype sénescents	114
II-2-1-1-1 Etude de la morphologie	114
II-2-1-1-2 Observation de l'activité de la SA β -Galactosidase	115
II-2-1-1-3 Etude de l'expression de collagène I	116
II-2-1-1-4 Etude de l'expression de MMP-1	116
II-2-1-1-5 Etude de l'expression de gènes associés à la sénescence	117
II-2-1-1-6 Etude de l'expression de gènes associés au cycle cellulaire	117
II-2-1-2 Etude de l'expression du collagène IV	118
II-2-1-2-1 Expression génique des chaînes α 1 et α 2(IV)	118
II-2-1-2-2 Expression protéique du collagène IV	119
II-2-1-2-2-1 Par western-blot	119
II-2-1-2-2-2 Par dosage ELISA	120
II-2-2 Sénescence prématurée induite par le stress	121
II-2-2-1 Test de viabilité au bleu trypan	122
II-2-2 Mise en évidence du phénotype sénescents	124
II-2-2-1 Etude de la morphologie	124
II-2-2-2 Observation de l'activité de la SA- β -Galactosidase	125
II-2-2-3 Etude de l'expression de collagène I	126
II-2-2-4 Etude de l'expression de la MMP-1	127
II-2-2-5 Gènes associés au cycle cellulaire	129
II-2-2-3 Etude de l'expression génique du collagène IV	130
II-2-2-3-1 Expression génique	130
II-2-2-3-1-1 La chaîne α 1(IV)	130
II-2-2-3-1-1 La chaîne α 2(IV)	131
II-2-2-3-2 Expression protéique	133
II-2-2-3-2-1 Par western-blot	133
II-2-2-3-2-1 Par dosage E.L.I.S.A	135
III. Effet du TGF-β1 sur l'expression du collagène IV par les fibroblastes dermiques humains contrôles et sénescents	136
III-1 Etude de l'effet dose du TGF-β1 sur les fibroblastes contrôles	136
III-2 Effet de l'anticorps bloquant anti-TGF-β1 sur la synthèse de collagène IV par les fibroblastes contrôles	137
III-3 Etude de l'effet du TGF-β1 sur les fibroblastes sénescents	138
IV. Etude du mécanisme impliqué dans la diminution du collagène IV au cours du vieillissement	140

IV-1 Etude des protéines phosphorylées : voie du TGF-β1	140
IV-2 Etude de l'expression du TGF-β1 et de son récepteur TGF-βRII par les fibroblastes vieilliss artificiellement	141
IV-2-1 TGF-β1	141
IV-2-1-1 Expression génique	141
IV-2-1-2 Expression protéique	142
IV-2-2 TβRII	143
IV-3 Etude de la voie des Smads	144
<i>E.Discussion</i>	146
<i>F.Conclusion et perspectives</i>	156
<i>G.Bibliographie</i>	160

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Classification des collagènes et organisation supramoléculaire	23
Figure 2: Vue schématique de la localisation, de l'organisation génique, du produit génique et de l'assemblage des 6 isoformes différents de collagène IV humain	24
Figure 3: Régulation de la transcription des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$	25
Figure 4: Représentation schématique de la formation du trimère de collagène IV	26
Figure 5: Représentation schématique de la mise en place du réseau de collagène IV	27
Figure 6: Epaisseur de la membrane basale et variation de collagène IV cutané	29
Figure 7: Activation de la forme latente du TGF- β	30
Figure 8: Activation du récepteur au TGF- β	31
Figure 9: Schéma simplifié de la voie des Smads par le TGF- β	32
Figure 10: Voies de signalisation de la famille des MAPK	33
Figure 11: Représentation schématique de la voie PI3K/Akt	34
Figure 12: Lien entre le photo-vieillessement, le TGF- β et la synthèse de collagène	35
Figure 13: Les 3 couches de la peau	39
Figure 14: Les couches de l'épiderme	40
Figure 15: Principaux composants et organisation des membranes basales	45
Figure 16: Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique	47
Figure 17: Origine des espèces réactives de l'oxygène	54
Figure 18: Evolution de la durée de vie des fibroblastes en culture	57
Figure 20: Action de la β -galactosidase sur un galactoside	60
Figure 21: Structure des télomères et apparence microscopique (adapté de Young, 2010)	63
Figure 22: Cycle cellulaire et implication des CDKI	64
Figure 23: Voie de signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN	65
Figure 24: Mécanisme à la base de l'arrêt permanent du cycle cellulaire à la base de la sénescence	66
Figure 25: Les 2 voies possibles par lesquelles les cellules sénescents pourraient contribuer au processus de vieillissement	67
Figure 26: Activation de la senescence par divers stimuli	69
Figure 27 : Schéma de diffusion de la lumière	84
Figure 28: Profil des ARN analysées sur puces Agilent	89

Figure 29: Principe du dosage ELISA anti TGF- β 1	94
Figure 30: Principe de l'antibody array	95
Figure 31: Etude, par western-blot, de l'expression du collagène IV natif à partir de prépuces	98
Figure 33: Détermination du degré d'invaginations de la JDE sur coupes transversales de peaux humaines	100
Figure 34 : Etude de l'invagination de la JDE au cours du vieillissement à partir des coupes marquées avec un anticorps anti-collagène IV	100
Figure 35: Visualisation, en microscopie confocale, de la distribution du collagène IV sur coupes transversales de peau au cours du vieillissement	101
Figure 36: Estimation de la continuité du réseau de collagène IV au cours du vieillissement.	102
Figure 37: Visualisation, en microscopie optique, de l'expression du collagène IV sur coupes transversales de peau au cours du vieillissement	103
Figure 38: Spectres RAMAN des collagènes I et IV purifiés	105
Figure 39: Spectre moyen et déviation standard de l'épiderme, du derme et de la jonction dermo-épidermique	106
Figure 40: Etude, par PCR en temps réel, de l'expression des chaînes α 1 et α 2(IV) par les fibroblastes dermiques humains issus de prépuces et de seins au cours du vieillissement	107
Figure 41: Etude, par PCR en temps réel, de l'expression de la chaîne α 1(IV) par les fibroblastes dermiques humains issus de prépuces au cours du vieillissement	108
Figure 42: Etude, par PCR en temps réel, de l'expression de la chaîne α 1(IV) par les fibroblastes dermiques humains issus de seins au cours du vieillissement	109
Figure 43: Etude, par dosage E.L.I.S.A, de la production de collagène IV par les fibroblastes dermiques humains	110
Figure 44: Etude, par PCR en temps réel, de l'expression des chaînes α 1, α 2, α 5 et α 6(IV) par des fibroblastes dermiques murins prélevés chez des souris âgées de 7 et 95 semaines	112
Figure 45: Etude, par PCR en temps réel, de l'expression des chaînes α 1 et α 2(IV) par des fibroblastes dermiques murins provenant de souris SAM	113
Figure 46: Observation morphologique, par microscopie optique, des fibroblastes dermiques cultivés aux passages 6 et 15 (objectif x40)	114
Figure 47: Observation, par microscopie optique, de l'activité de la SA- β galactosidase de fibroblastes dermiques cultivés à p7 et p15.	115
Figure 48: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne α 1(I) par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10.	116

Figure 49 : Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10. _____	116
Figure 50: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de gènes associés à la senescence par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10. _____	117
Figure 51: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de p21 ^{WAF-1} et de p53 par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10. _____	118
Figure 52: Etude, par PCR temps réel, de l'expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$ par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10. _____	119
Figure 53: Etude, par western-blot, de l'expression de la chaîne $\alpha 1(IV)$ par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10. _____	119
Figure 54: Etude, par western-blot, de l'expression de la chaîne $\alpha 1(IV)$ par les fibroblastes dermiques issus de patients âgés de 2 et 79 ans à différents passages _____	120
Figure 55: Etude, par dosage ELISA, de la production de collagène IV par fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10. _____	121
Figure 56: Récapitulatif du traitement des fibroblastes avec H ₂ O ₂ _____	122
Figure 57: Récapitulatif du traitement des fibroblastes avec NaCl _____	122
Figure 58: Mesure, par coloration au bleu trypan, de la viabilité des fibroblastes dermiques traités avec 0 à 200 μ M d'H ₂ O ₂ _____	123
Figure 59: Mesure, par coloration au bleu trypan, de la viabilité des fibroblastes dermiques traités avec 150 à 300 mM de NaCl _____	123
Figure 60: Observation morphologique, par microscopie optique, des fibroblastes dermiques humains traités avec des doses croissantes d'H ₂ O ₂ _____	124
Figure 61: Observation morphologique, par microscopie optique, des fibroblastes dermiques traités avec des doses croissantes de NaCl _____	125
Figure 62: Observation, par microscopie optique, de l'activité de la SA- β galactosidase de fibroblastes dermiques traités avec 100 μ M d'H ₂ O ₂ _____	125
Figure 63: Observation, par microscopie optique, de l'activité de la SA- β galactosidase de fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl _____	126
Figure 64: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne $\alpha 1(I)$ par les fibroblastes dermiques traités avec 100 μ M d'H ₂ O ₂ _____	127
Figure 65: étude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne $\alpha 1(I)$ par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl _____	127
Figure 66: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques traités avec 100 μ M d'H ₂ O ₂ _____	128

Figure 67: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl	128
Figure 68: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de p53 et p21 ^{WAF-1} par les fibroblastes dermiques traités avec 100 µM d'H ₂ O ₂	129
Figure 69: étude, par PCR temps réel, de l'expression de p53 et p21 par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl	130
Figure 70: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne α1(IV) par les fibroblastes dermiques traités avec 100 µM d'H ₂ O ₂	131
Figure 71: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne α1(IV) par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl	131
Figure 72: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne α2(IV) par les fibroblastes dermiques traités avec 100 µM d'H ₂ O ₂	132
Figure 73: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne α2(IV) par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl	132
Figure 74: Etude, par western-blot, de l'expression de la chaîne α1(IV) par les fibroblastes dermiques traités avec 100 µM d'H ₂ O ₂	133
Figure 75: Etude, par western-blot, de l'expression du collagène IV par les fibroblastes traités avec 225 mM de NaCl	134
Figure 76: Etude, par dosage E.L.I.S.A, de la production de collagène IV par les fibroblastes dermiques traités avec 100 µM d'H ₂ O ₂	135
Figure 77: Etude, par dosage E.L.I.S.A, de la production de collagène IV par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl	135
Figure 78: Effet dose du TGF-β1 sur l'expression du collagène de type IV dans des fibroblastes dermiques humains	137
Figure 79: Effet de l'anticorps bloquant du TGF-β sur la synthèse de collagène IV par les fibroblastes dermiques humains	138
Figure 80: Etude, par PCR temps réel, de l'expression du collagène IV par les fibroblastes sénescents	139
Figure 81: Etude, par PCR temps réel, de l'expression du TGF-β1 par les fibroblastes sénescents	142
Figure 82: Etude, par dosage E.L.I.S.A, de l'expression du TGF-β1 par les fibroblastes dermiques humains vieilliss artificiellement par traitement avec 100 µM d'H ₂ O ₂	143
Figure 83 : Etude, par PCR temps réel, de l'expression du TβRII par les fibroblastes sénescents	144

Figure 84: Etude, par western-blot, de l'expression de smad2 et 3 et de leur forme phosphorylée par les fibroblastes sénescents _____ 145

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison de la différence d'expression de gènes d'intérêts de fibroblastes jeunes et âgés	61
Tableau 2 : Modification de l'expression de gènes lors de la sénescence prématurée induite par H ₂ O ₂	71
Tableau 3: Variation de l'expression de protéines impliquées dans la voie du TGF- β lors d'un traitement avec 0 et 100 μ M d'H ₂ O ₂	141

LISTE DES ABBREVIATIONS

AC	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase-1</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia Related</i>
BET	Bromure d'éthidium
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CHK	<i>Check-point kinase</i>
CTCBF	<i>CTC-binding factor</i>
CTGF	Connective tissue growth factor
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DHAE	Déhydroépiandrostérone
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>

DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
dNTPs	Désoxyribonucléotides triphosphates
DP	Doublement de population
DTT	1,4-dithiothréitol
E2F1	E2F transcription factor 1
ECL	Electrochimiluminescence
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EHS	<i>Engelbreth-Holm-Swarm</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
FACIT	<i>Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helix</i>
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
GDF	<i>Growth and Differentiation Factors</i>
GPx	<i>glutathion-peroxidase</i>
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	<i>N2 HydroxyEthylPiperazine-N'-2-Ethano-Sulfonique acid</i>
HRP	HorseRadish Peroxidase
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-1 β	<i>Interleukin 1 beta</i>
JDE	Jonction Dermo-Epidermique
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinases</i>
kDa	Kilo Daltons
LAP	<i>Latency-Associated Peptide</i>
LTBP	<i>Latent TGF-β Binding Proteins</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>

MEC	Matrice ExtraCellulaire
MH1	<i>Mad-Homology-1</i>
MH2	<i>Mad-Homology-2</i>
MMP	<i>Matrix MetalloProteinase</i>
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
pb	Paire de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDK1	Phosphatidylinositol 3-Dependent Kinase 1
(PI3,4,5) P3	Phosphidylinositol-3,4,5-triPhosphate
PI3K	PhosphoInositide-3-Kinase
POT1	<i>Protection Of Telomere 1</i>
PVDF	Poly Vinylidène DiFluoride
RAP1	<i>Repressor Activator Protein 1</i>
Rb	Protéine de rétinoblastome
RIPA	<i>Radio-ImmunoPrecipitation Assay</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SAB	Sérum Albumine Bovine
SA β -gal	<i>Senescence Associated beta-galactosidase</i>
SAHF	<i>Senescence-Associated Heterochromatin Foci</i>
SAM	Senescence Accelerated Mice
SAP kinases	<i>Stress-Activated Protein kinases</i>
SIPS	<i>Stress-Induced Premature Senescence</i>
SLC	<i>Small Latent Complex</i>
SM22	Smooth Muscle protein of 22 kDa

SOD	SuperOxyde Dismutase
SVF	Sérum de Veau Fetal
t-BHP	tertiary-Butyl HydroPeroxide
TBS	Tris Buffered Saline
TAK1	<i>TGF-β-activated kinase-1</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline-tween</i>
TEMED	N N N'N'Tétraméthyl-éthylène-diamine
T β R	<i>Transforming Growth Factor β Receptor</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIN2	TRF1 Interacting factor 2
TPP1	<i>TriPeptidyl Peptidase 1</i>
TRF1	<i>Telomeric Repeat Binding Factor 1</i>
TRF2	<i>Telomeric Repeat Binding Factor 2</i>
t-PA	<i>Tissu-Plasminogen Activator</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of MétalloProtéases</i>
UV	UltraViolet
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications orales :

Journée des jeunes chercheurs 2012 (07 juin 2012) :

Etude de la diminution du collagène de type IV au cours du vieillissement cutané.

Communications par voie d'affiche :

Symposium international IFR 53 (7-9 juin 2010) :

Effect of aging on type IV collagen expression by dermal fibroblasts and kératinocytes

Scientific Meeting CRP santé Luxembourg-SFR CAP Santé REIMS (28 novembre 2011) :

Effect of aging on type IV collagen expression by dermal fibroblasts

50^{ème} anniversaire de la SFBMEc (29 et 30 mars 2012) :

Study of type IV collagen decrease during aging and involved mechanisms

Congrès annuel de la SFBMEc (21 au 23 mars 2013) :

Study of type IV collagen expression by human dermal fibroblasts during aging

Journée des jeunes chercheurs 2013 (mai 2013) :

Study of type IV collagen expression by human dermal fibroblasts during aging

LISTE DES PUBLICATIONS

- **Articles publiés**

NGUYEN T.T, HAPILLON T, FERU J, BRASSART-PASCO S, ANGIBOUST J.C, MANFAIT M, PIOT O.

Raman comparison of skin dermis of different ages: focus on spectral markers of collagen hydration

Journal of Raman Spectroscopy. 2013 Volume 44, Issue 9, pages 1230–1237.

NGUYEN T.T , GOBINET C , FERU J , BRASSART-PASCO S , MANFAIT M , PIOT O.

Characterization of Type I and IV Collagens by Raman Microspectroscopy: Identification of Spectral Markers of the Dermo-Epidermal Junction.

Spectroscopy: An International Journal. 2012 ; Issue 5-6, Pages 421-427

BRASSART—PASCO S, SENECHAL K, THEVENARD J, RAMONT L, DEVY J, DI STEFANO L, DUPONT-DESHOGUE A, BREZILLION S, FERU J, DIEBOLD M.D, RICARD-BLUM S, MAQUART F.X, MONBOISSE J.C.

Tetrastatin, the NC1 domain of the $\alpha 4(\text{IV})$ collagen chain: a novel potent anti-tumor matrikine.

PLoS One. 2012 ; 7(4) : e29587.

- **Articles en cours de rédaction**

FERU J, DELOBBE E , DUPONT-DESHORGUES A , MAQUART F.X , BRASSART-PASCO S.

Type IV collagen expression is decreased in dermal fibroblast upon exposure to non toxic H₂O₂ concentrations and restored by TGF- β 1 treatment.

A. Introduction

Le tissu conjonctif de la peau est composé de collagènes, d'élastine, d'acide hyaluronique, de protéoglycannes et de nombreuses glycoprotéines. Le collagène représente 70 à 80 % du poids sec de la peau et fournit au derme son intégrité mécanique et structurale. Le collagène de type IV est l'un des composants majeurs de la membrane basale de la jonction dermo-épidermique. Le vieillissement est généralement associé à un épaissement des membranes basales. Cependant, au niveau de la peau, le contenu en collagène IV semble diminuer avec l'âge (Vazquez et al., 1996) mais le mécanisme impliqué n'a pas été étudié à ce jour.

I Les collagènes

I-1 Généralités

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes du corps humain. Ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale de la plupart des tissus. Ils sont par ailleurs impliqués dans d'autres processus biologiques essentiels comme l'adhésion et la migration cellulaire. La superfamille des collagènes, qui comprend 28 membres, est particulièrement complexe et présente une remarquable diversité tant au niveau de l'organisation moléculaire et supra-moléculaire qu'à celui de la distribution tissulaire et des fonctions biologiques (Myllyharju et coll, 2004). Néanmoins, tous ses membres partagent une caractéristique structurale commune, la présence dans leur structure d'un domaine en triple hélice qui correspond à la répétition du triplet (Gly–X–Y) $_n$ (X étant fréquemment la proline et Y l'hydroxyproline) dans la séquence d'acides aminés. Les collagènes sont classés en plusieurs sous-familles déterminées en fonction des homologies de séquence, de similitudes au niveau de l'architecture modulaire des chaînes polypeptidiques et de leur assemblage supramoléculaire (Ricard-Blum et coll, 2005). 9 sous-familles sont alors définies (figure 1) :

- Les collagènes fibrillaires
- Les collagènes FACITs (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helix)
- Les collagènes à réseaux hexagonaux
- Les collagènes de membranes basales
- Les collagènes à filaments perlés
- Les collagènes des fibrilles d'ancrage
- Les collagènes transmembranaires
- Les collagènes à domaines en triple hélice multiples ou multiplexines
- Les autres collagènes

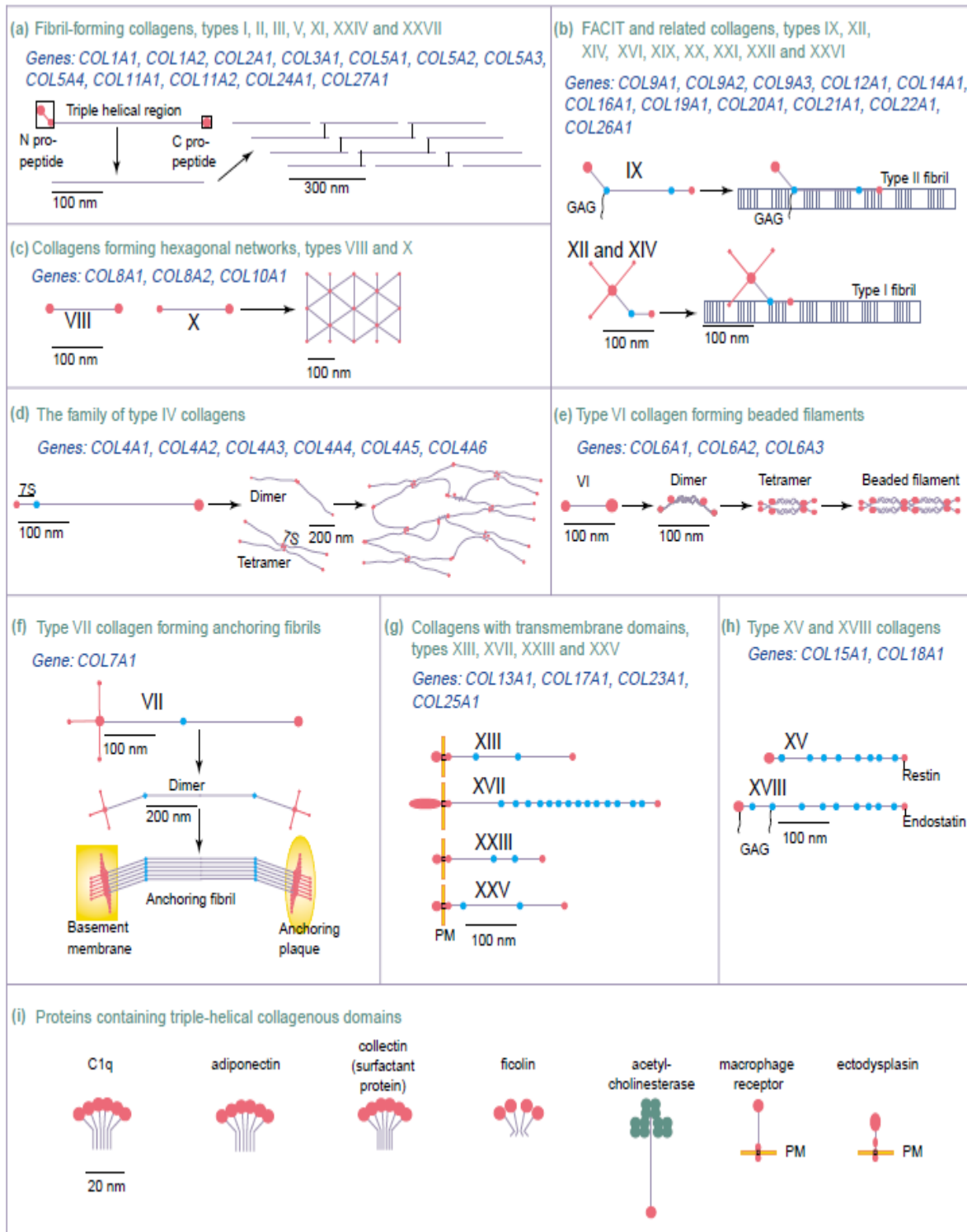


Figure 1: Classification des collagènes et organisation supramoléculaire (Myllyharju et Kivirikko, 2004)

La superfamille des collagènes peut-être divisée en 9 sous-familles sur la base de leur assemblage supramoléculaire et d'autres caractéristiques. Les chaînes polypeptidiques retrouvées dans les 27 premiers types de collagène sont codées par 42 gènes au total (représentés en bleu). Chaque chaîne contient un domaine N-terminal appelé 7S, un long domaine collagénique et un domaine C-terminal globulaire non collagénique appelé NC1. Les domaines collagéniques sont représentés en violet, les domaines N et C-terminaux sont représentés en rose foncé et les interruptions non collagénique au sein de la triple hélice sont représentées en bleu clair.

I-2 Le collagène IV

Le collagène de type IV, composant majeur des membranes basales, est également appelé “collagène formant des réseaux” (“network-forming collagen”), du fait de sa capacité à s’auto-assembler en réseaux. Ce collagène est essentiel à l’intégrité et aux fonctions biologiques des membranes basales (Myllyharju et Kivirikko, 2004); il intervient notamment dans les mécanismes d’adhésion, de migration, de différenciation et de croissance cellulaire.

Le collagène de type IV est constitué de 3 chaînes polypeptidiques parmi 6 possibles nommées $\alpha 1(\text{IV})$ à $\alpha 6(\text{IV})$. Les séquences en acides aminés des différentes chaînes α présentent 50 à 70% d’homologie. Malgré de très nombreuses combinaisons potentielles, les chaînes interagissent et s’assemblent avec une très grande spécificité pour former seulement 3 hétérotrimères différents : $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$, $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (Khoshnoodi et coll, 2008). Les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(\text{IV})$ ont été les premières décrites et sont donc appelées chaînes « classiques ». Elles sont présentes dans les membranes basales de tous les tissus tandis que les 4 autres chaînes ont des distributions restreintes à certains tissus.

I-2-1 Organisation génique et régulation

Les gènes codant pour les 6 chaînes α sont localisés par paires sur trois chromosomes différents. Les gènes COL4A1 et COL4A2 humains, situés sur le chromosome 13, sont orientés face à face et connectés par un promoteur commun de 127 pb (Pollner et coll, 1990). Les gènes COL4A5 et COL4A6 sont disposés de la même façon sur le chromosome X et sont séparés par un promoteur commun de 437 pb. Les gènes COL4A3 et COL4A4 sont retrouvés sur le chromosome 2 (figure 2). Les analyses de séquences de quelques espèces de mammifères ont permis de mettre en évidence un gène ancestral commun, qui, après 6 duplications consécutives, a donné naissance à 6 gènes. En se basant sur leur similarité de séquence, les gènes ont été divisés en 2 groupes : le groupe « $\alpha 1$ -like » qui comprend COL4A1, COL4A3 et COL4A5 et le groupe « $\alpha 2$ -like » qui comprend COL4A2, COL4A4 et COL4A6.

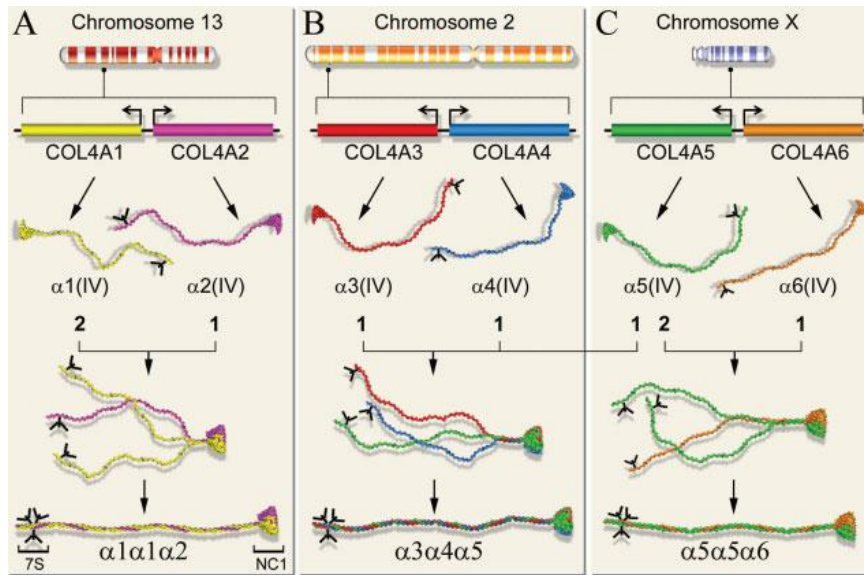


Figure 2: Vue schématique de la localisation, de l'organisation génique, du produit génique et de l'assemblage des 6 isoformes différents de collagène IV humain (Khoshnoodi et coll, 2008)

Les gènes COL4A1/COL4A2 sur le chromosome 13 (A), COL4A3/COL4A4 sur le chromosome 2 (B) et COL4A5/COL4A6 sur le chromosome X (C) sont organisés par paires, tête-bêche et séparés par un court promoteur commun. Les paires de gènes sont transcrits selon un mode bidirectionnel et traduits en chaînes α individuelles.

Le promoteur commun des gènes COL4A1 et COL4A2 ne possède pas d'activité transcriptionnelle par lui-même. Chaque gène contient une région activatrice dans la zone située en bordure du premier intron et du premier exon, qui active le promoteur soit dans la direction d' $\alpha 1(IV)$ soit dans celle d' $\alpha 2(IV)$ (Kefalides et Borel, 2005). Un silencer régule également la transcription de ces deux gènes (figure 3B). Au niveau de COL4A1, le premier exon code pour une région 5' non traduite et pour le peptide signal tandis que pour COL4A2 cette même région est divisée en 3 exons (figure 3A). 3 éléments cis-régulateurs différents, une boîte GC, un motif CCAAT et une boîte CTC fixent respectivement et spécifiquement le facteur de transcription sp1, un CCAAT-binding factor similaire à CP1, et un nouveau facteur découvert récemment, le CTC-binding factor (CTCBF). Ces motifs sont présents non seulement sur le promoteur mais aussi sur les deux régions activatrices, distribuées des deux côtés du promoteur (figure 3C). En dépit des nombreuses études sur la régulation de ces gènes, le mécanisme n'est toujours pas mis en évidence. Par exemple, les niveaux d'ARNm pour les chaînes $\alpha 1(IV)$ et $\alpha 2(IV)$ varient selon les cellules mais également selon les conditions, bien que le ratio de chaînes α traduites dans la molécule $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ reste toujours le même. Cela indique que l'expression génique des chaînes du collagène IV est hautement régulée à différents niveaux tels que la transcription, la stabilité et l'épissage des ARNs, l'efficacité de la traduction et des modifications post-traductionnelles et enfin la

reconnaissance chaîne spécifique des différentes chaînes α dans la cellule. La transcription donne un ratio final $\alpha1(IV)/\alpha2(IV)$ de $\frac{1}{2}$. Les produits de transcriptions de ces gènes subissent des réactions d'excision et d'épissage successives pour donner des ARNm matures qui sont ensuite traduits dans le réticulum endoplasmique.

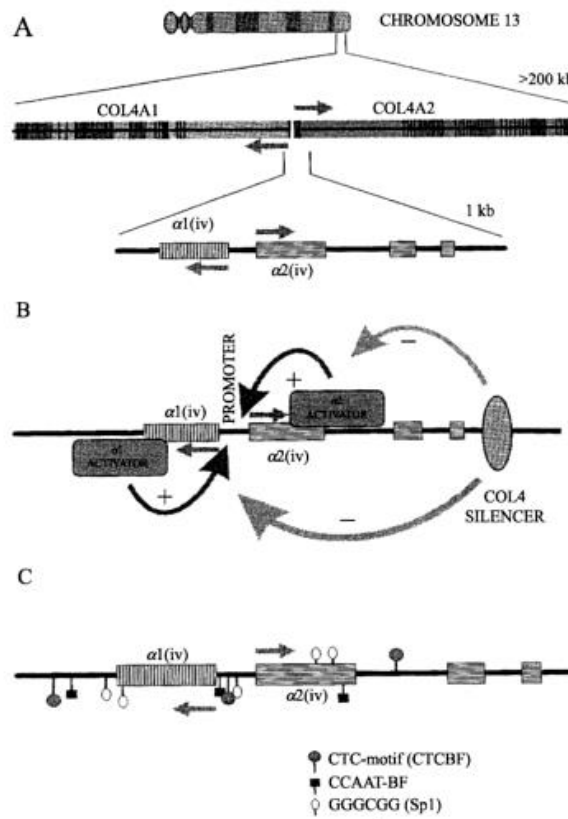


Figure 3: Régulation de la transcription des chaînes $\alpha1$ et $\alpha2(IV)$ (Kühn, 1994)

Les deux gènes sont localisés sur le chromosome 13, tête-bêche et sous le contrôle d'un promoteur commun de 127 pb. Au niveau du gène COL4A1, le premier exon code pour une région en 5' non traduite et pour le peptide signal. Pour le gène COL4A2, la région correspondante est divisée en 3 exons. Chaque gène contient une région activatrice qui active le promoteur soit dans la direction d' $\alpha1(IV)$, soit dans celle d' $\alpha2(IV)$. Un silencer influence la transcription également. 3 éléments cis-régulateurs sont présents au niveau du promoteur.

I-2-2 Structure du collagène IV

La molécule de collagène IV comporte 3 domaines distincts : le premier est un domaine de 30 nm de long, constitué par une triple hélice contenant de nombreuses zones imparfaitement hélicoïdales, situé à l'extrémité N-terminale dit le domaine 7S. Le domaine 7S de chaque chaîne α comporte environ 15 acides aminés. Ce domaine est facile à isoler par ultracentrifugation, et sédimente avec un coefficient de Sverberg égal à 7S, d'où son nom; le

second domaine est un domaine central à triple hélice qui est le plus long puisqu'il est constitué d'environ 1400 acides aminés pour chaque chaîne et mesure 360 nm de long. Il est constitué de l'enchaînement d'une séquence classique et répétitive Gly-Xaa-Yaa et il comprend de 21 à 26 interruptions non collagéniques. Ces interruptions confèrent non seulement une flexibilité moléculaire mais aussi des sites de fixation cellulaire et de liaisons croisées interchaînes. Le dernier est un domaine carboxy-terminal, globulaire, non collagénique, appelé le domaine NC1. Le domaine NC1 de chaque chaîne alpha est constitué d'environ 230 acides aminés. Le domaine NC1 a un rôle important dans l'assemblage de la triple hélice puisqu'il initie l'interaction moléculaire entre 3 chaînes α . La trimérisation en protomère se réalise ensuite selon un modèle en « fermeture éclair » à partir de l'extrémité carboxy-terminale (figure 4). Cette étape est réalisée dans l'appareil de Golgi. Le domaine NC1 est sensible à la pepsine et résistant à la collagénase bactérienne. L'inverse est observé pour le domaine en triple hélice.

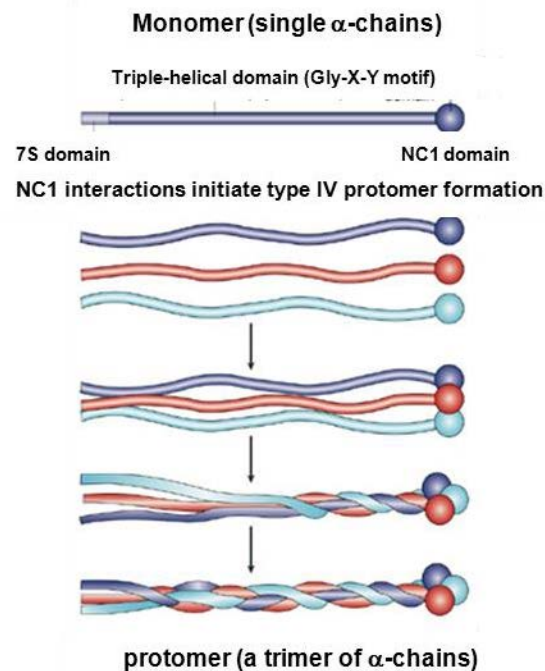


Figure 4: Représentation schématique de la formation du trimère de collagène IV (Kalluri, 2003)

La sélection des chaînes α pour l'association en protomère à triple hélice est gouvernée par la reconnaissance de séquences moléculaires codées par les régions hypervariables du domaine NC1. L'assemblage des 3 chaînes est initié au niveau des domaines NC1 puis progresse jusqu'au domaine 7S.

I-2-3 Mise en place du réseau de collagène IV

Le collagène de type IV ne forme pas de fibrilles, mais il polymérise sous forme de réseau, qui constitue l'essentiel de la *lamina densa* de la membrane basale. La première étape est la formation de dimères à partir de deux protomères de collagène IV qui se réalise à partir de leur domaine NC1 et qui permet d'obtenir un hexamère (figure 5). Ces dimères sont stabilisés par des ponts disulfures interchaînes, qui se forment grâce à la présence de 12 résidus cystéine hautement conservés dans les 6 chaînes $\alpha(IV)$. C'est ensuite la formation de tétramères qui se fait suite à l'interaction de 4 protomères *via* leurs régions 7S glycosylées, deux dans un sens et deux dans le sens opposé (Duncan et coll, 1983). Cela se fait par l'intermédiaire de nombreux ponts disulfure, ainsi que par des liaisons croisées dérivées de la lysine et de l'hydroxylysine (Bailey et coll, 1984). Toutes ces interactions forment le noyau de l'architecture du réseau de collagène IV. L'ensemble des dimères et des tétramères se combinent pour former un maillage très résistant. La présence de nombreux résidus riches en cystéine et en lysine est essentielle pour la formation de liaisons interchaînes de 4 protomères *via* des ponts disulfures et des liaisons croisées lysine-hydroxylysine. Le tétramère est hautement glycosylé sur des résidus lysine du domaine collagénique et sur des résidus asparagine de l'extrémité N-terminale (Nayak, 1991).

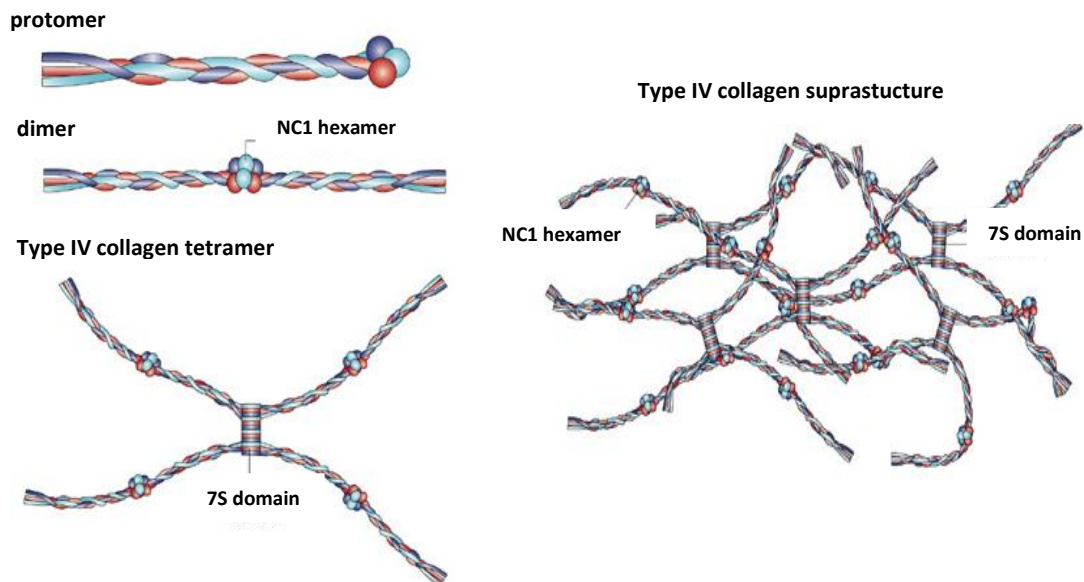


Figure 5: Représentation schématique de la mise en place du réseau de collagène IV (Adapté de Kalluri, 2003)

2 protomères se dimérisent via leur domaine NC1. 4 protomères interagissent via leur domaine 7S. Ces interactions forment le noyau de l'architecture du réseau de collagène IV.

I-2-4 Distribution tissulaire des chaînes α (IV)

L'hétérotrimère $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV) est majoritaire et ubiquitaire. On le retrouve dans toutes les membranes basales de l'organisme tandis que les 2 autres hétérotrimères ont une distribution plus restreinte et tissu-spécifique. $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV) est retrouvé au niveau des membranes basales glomérulaires immatures mais est ensuite remplacé par $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV). $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV) est également retrouvé au niveau des membranes basales de l'œil, de la cochlée, du poumon et du testicule tandis que le trimère $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (IV) est retrouvé au niveau des membranes basales de la peau (Jonction Dermo Epidermique ou JDE), de l'œsophage, de la capsule de Bowman, du rein et des cellules musculaires lisses (Steinhoff, 2011).

I-2-5 Collagène IV et pathologies

L'une des principales pathologies liées au collagène IV est le syndrome d'Alport et est caractérisé par une néphropathie progressive conduisant à une protéinurie, une hypertension et ultimement à une insuffisance rénale. Il est retrouvé sous deux formes : une forme héréditaire appelée syndrome d'Alport lié à l'X et qui est dû à une mutation du gène COL4A5. L'autre est la forme autosomale dominante ou autosomale récessive et est due à une mutation des gènes COL4A3 et COL4A4. La néphropathie à membrane basale fine est également due à des mutations hétérozygotes de ces gènes (Kashtan, 2003). Le syndrome de Goodpasture est une maladie rare auto-immune caractérisée par la présence d'auto-anticorps réagissant avec le domaine non collagénique de la chaîne $\alpha 3$ (IV) des membranes basales glomérulaires. Il est caractérisé par une glomérulonéphrite nécrosante, parfois accompagnée d'hémorragies pulmonaires (Alenzi et coll, 2012). De plus, des taux élevés de collagène IV sont retrouvés dans le sérum de patients atteints de nombreux cancers métastatiques tels que le cancer du sein, colorectal, gastrique et le cancer des poumons mais aussi du foie (Mazouni et coll, 2008), si bien qu'il pourrait devenir un marqueur pour la détection des cancers colorectaux métastatiques (Nyström et coll, 2011).

I-2-6 Collagène IV et vieillissement

Au niveau de la peau, une étude, réalisée par Vasquez en 1996, a montré que, bien que l'épaisseur de la membrane basale augmentait, le contenu en collagène IV diminuait avec l'âge à partir de 35 ans (Vasquez et coll, 1996) (figure 6). Une étude de Le Varlet en 1998 a

également montré, grâce à des immunomarquages, qu'il y avait moins de collagène IV dans les JDE de patients âgés par rapport aux JDE de patients jeunes (Le Varlet et coll, 1998). Il a été montré que dans certaines membranes basales telles que la membrane limitante interne (Candiello et coll, 2010) et les membranes basales du cortex rénal (Karttunen et coll, 1986), les concentrations en collagène IV augmentaient.

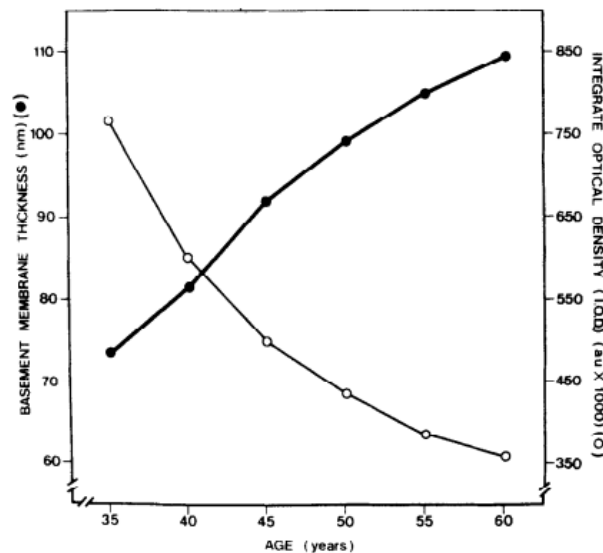


Figure 6: Epaisseur de la membrane basale et variation de collagène IV cutané (Vazquez et coll, 1996)

L'évaluation morphométrique de la membrane basale, réalisée en microscopie électronique, montre une corrélation entre son épaisseur et l'âge des patients. L'analyse densitométrique de marquages immunohistochimiques montre une diminution du contenu en collagène IV de la membrane basale en fonction de l'âge. Une corrélation négative entre ces deux paramètres a été mise en évidence.

I-3 Régulation de la synthèse de collagène IV par le TGF- β

I-3-1 Le TGF- β

I-3-1-1 Généralités

La superfamille du TGF- β est une famille de facteurs sécrétés d'environ 30 membres divisés en deux sous familles: les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) et les GDFs (Growth and Differentiation Factors) d'une part, et les activines, les nodales et le TGF- β d'autre part (Massagué et coll, 2000). Le TGF- β est un facteur de croissance ubiquitaire impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire et de la différenciation. Il existe trois isoformes humaines du TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, codées par trois gènes distincts. Ces

isoformes sont, du point de vue structural, très similaires (neuf résidus cystéines conservés, 76 à 80% d'identité entre les séquences protéiques).

I-3-1-2 Synthèse et sécrétion

Le TGF- β est sécrété sous forme d'un LLC (large latent complexe) composé d'une LTBP (latent TGF- β binding protein (115-240 kDa)) liée de manière covalente au propeptide situé en position N-terminale du précurseur du TGF- β (75 kDa) aussi appelé LAP (latent associated protein) et au TGF- β (25 kDa) (Fontana et coll, 2005) (figure 7).

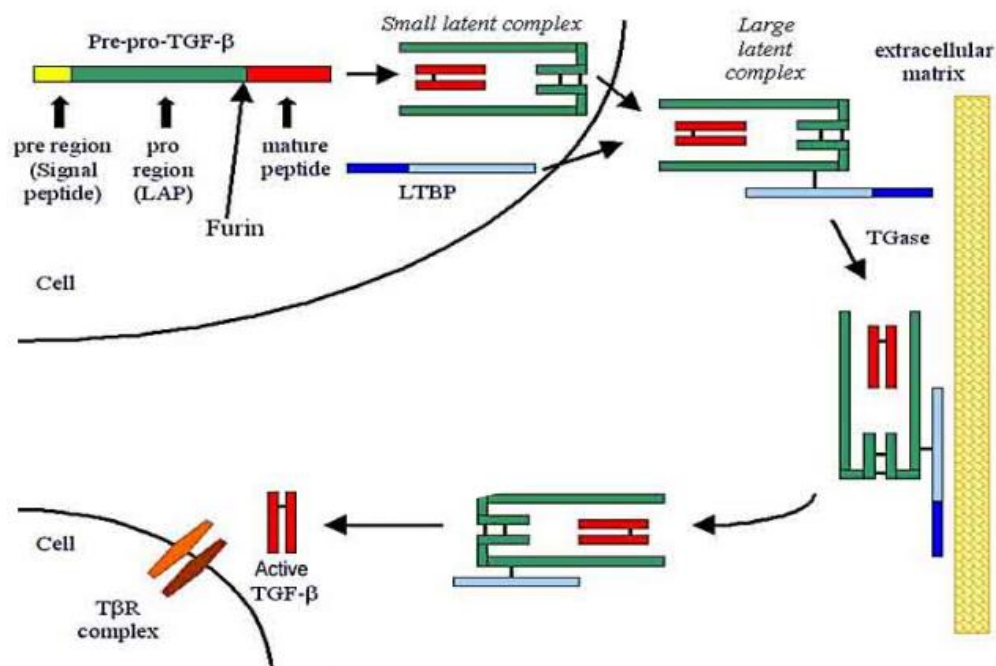


Figure 7: Activation de la forme latente du TGF- β (Gressner et coll, 2002)

Le petit complexe latent est composé du TGF- β lié de façon non covalente à un peptide LAP qui le maintient sous une forme latente, incapable de se lier à ses récepteurs. Le petit complexe latent se lie via des ponts disulfure à une LTBP (Latent TGF-beta Binding Protein) pour former ainsi le LLC (Large Latent Complex). La libération et l'activation de la forme latente sont des événements clés dans la régulation de la réponse au TGF- β .

I-3-1-3 Activation du récepteur

Chez les mammifères, il existe 5 récepteurs TGF- β de type I et 7 récepteurs de type II qui font partie de la famille des récepteurs sérine/thréonine kinase. Pour chaque membre de la famille du TGF- β , il existe une combinaison caractéristique de T β R-I et T β R-II. En absence de ligand, ces récepteurs se trouvent sous forme d'homodimères à la surface de la cellule. Le TGF- β 1 se lie à T β R-II avec une haute affinité et ceci permet le recrutement de T β R-I.

L'hétérodimérisation de TβR-I et TβR-II permet une transphosphorylation de TβR-I par TβRII. TβR-I phosphorylé peut alors activer, entre autres, les protéines Smads, ce qui permettra la transduction du signal jusqu'au noyau (Shi and Massague, 2003) (figure 8).

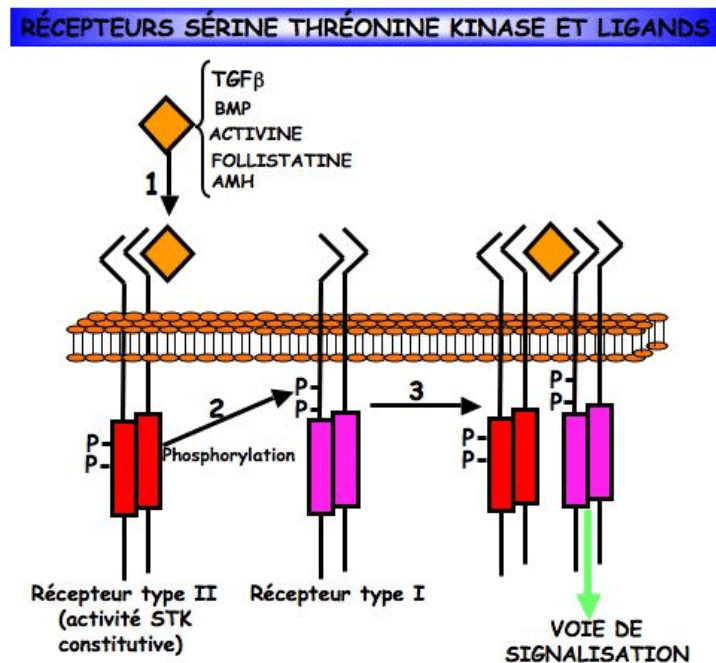


Figure 8: Activation du récepteur au TGF-β (sciencebio.com)

Le TGF-β1 se lie au TβR-II permettant alors le recrutement de TβR-I. L'hétérodimérisation de TβR-I et TβR-II permet une transphosphorylation de TβR-I par TβRII. TβR-I phosphorylé peut alors activer les protéines cibles.

I-3-1-4 Voies de signalisation impliquées

I-3-1-4-1 La voie des Smads

Les Smads se subdivisent en 3 familles: les R-Smads qui sont les substrats directs des récepteurs kinase de la famille du TGF-β, les Co-Smads qui participent à la transduction du signal en s'associant avec les R-Smads, et les I-Smads ou Inhibitory Smads qui inhibent la signalisation des deux autres groupes. Les R-Smads et les Co-Smads sont constitués d'un domaine conservé MH1 (Mad-homology-1) et d'un domaine C-terminal MH2 (Mad-homology-2) connectés par un segment « linker ». Le domaine C-terminal est responsable de l'activité transcriptionnelle lorsqu'il est fusionné à un domaine de fixation à l'ADN. Les I-Smads contiennent seulement le domaine MH2, ce sont des antagonistes des R-Smads (Li et coll, 2001). Les R-Smads regroupent Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 et Smad8 mais seuls Smad2 et Smad3 sont impliqués dans la voie du TGF-β. En ce qui concerne les I-Smad,

Smad6 et Smad7, seul Smad7 intervient dans la voie du TGF- β . Pour les Co-Smads, l'unique protéine connue dans cette famille est Smad4. Après activation du récepteur, les R-Smads vont recruter Smad4, qui est appelée co-smad et ce complexe est alors transloqué dans le noyau où il régule l'expression de nombreux gènes cibles (figure 9). Les I-Smads (Smad 7 pour la voie du TGF- β) agissent à deux niveaux : en se liant directement à T β RI et en inhibant ainsi la phosphorylation des R-Smads et en interagissant avec Smurf1/2, protéine de la famille des E3 ubiquitine ligases.

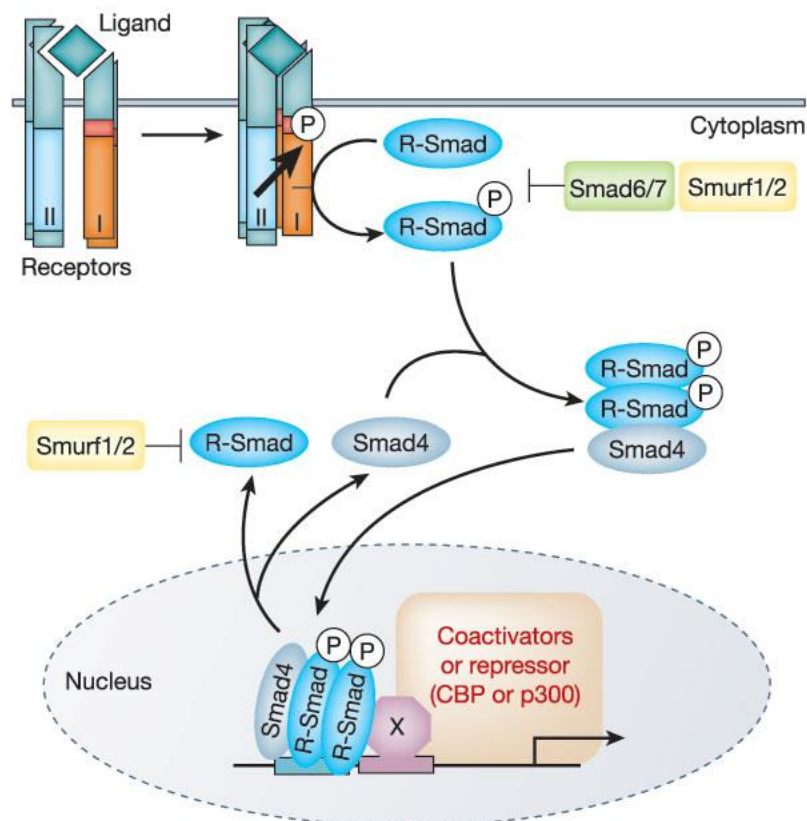


Figure 9: Schéma simplifié de la voie des Smads par le TGF- β (Derynck et Zhang, 2003)
 A la surface cellulaire, le ligand se fixe à un complexe de récepteurs transmembranaires et induit la phosphorylation du segment GS (représenté en vert) du récepteur de type I par le récepteur de type II qui pourra alors phosphoryler les Smads d'intérêt qui formeront un complexe avec Smad 4. Ce complexe transloquera dans le noyau où il régulera la transcription de gènes d'intérêt.

I-3-1-4-2 La voie des MAP kinases

La famille des MAPKs est divisée en trois sous-familles: les ERKs (ERK1 et ERK2) (Extracellular Signal-regulated Kinases), les SAP kinases (Stress-Activated Protein kinases) comme JNK1, JNK2 et JNK3 (c-Jun N-terminal kinases) et les p38/MAPKs (α , β , γ et δ). L'activation des voies MAPKs se fait de façon séquentielle. Tout d'abord, suite à une stimulation par des cytokines ou des facteurs de croissance, des récepteurs à activité tyrosine

kinases ou des récepteurs couplés à des protéines G associés à la membrane activent des MAPK kinase kinase (MAPKKK). Les MAPKKK activent des MAPKK (MAPK kinase) menant à l'activation par phosphorylation de MAPKs qui pourront alors phosphoryler toute une série de facteurs de transcriptions. Les ERKs sont phosphorylées par les MAPKKs, MEKK1 et MEKK2, qui sont elles-mêmes les substrats de la MAPKKK Raf-1. Les JNKs sont les substrats de MKK4 et MKK7 alors que p38MAPK est phosphorylée par MKK3 et MKK6, elles-mêmes activées par plusieurs MAPKKKs incluant ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) et TAK1 (TGF- β -activated kinase-1) (figure 10). Ces kinases peuvent jouer un rôle dans l'apoptose et la transition épithélio-mésenchymateuse induites par le TGF- β . La convergence entre les voies Smad et MAPK activées par le TGF- β aboutit souvent vers une coopération dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles.

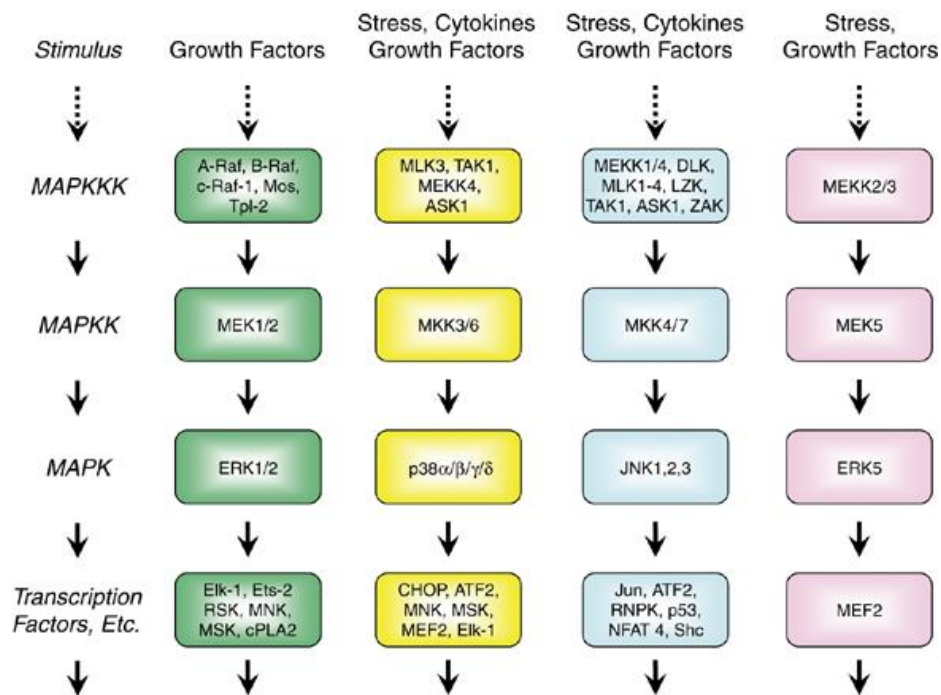


Figure 10: Voies de signalisation de la famille des MAPK (Roberts et Der, 2007)

Il y a 4 formes majeures de cascades MAPKKK-MAPKK-MAPK protéines kinases. Alors que la voie ERK est le plus souvent activée par des facteurs de croissance, les voies JNK, p38 et ERK5 sont activées par des stress environnementaux.

I-3-1-4-3 La voie des PI3K/Akt

Des études ont montré que le TGF- β était capable d'induire l'augmentation d'expression du collagène I, non seulement *via* la voie des Smads, mais aussi par la voie PI3K/Akt dans les cellules mésangiales (Runyan et coll, 2004). Cette voie a également un rôle

dans la transition épithelio-mésenchymateuse (Lamouille et Derynck, 2011). La phosphoinositide 3 kinase (PI3K) participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)P3). Ce composé recrute la sérine/thréonine kinase AKT à proximité de la membrane plasmique, où elle est alors phosphorylée (et activée) par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dépendent kinase 1) (Dreyer et coll, 2009) (figure 11).

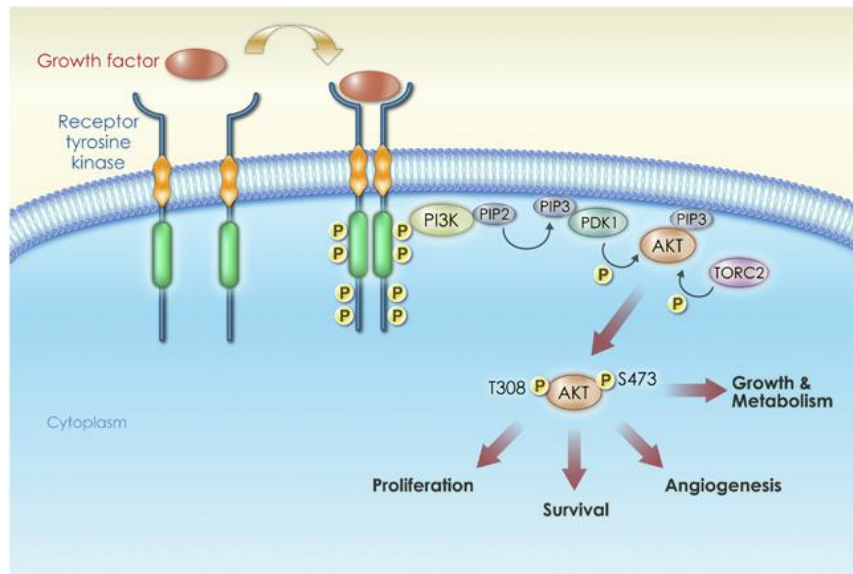


Figure 11: Représentation schématique de la voie PI3K/Akt (Garcia-Echeverria et Sellers, 2008). Après activation, le recrutement de PI3K au récepteur tyrosine kinase conduit à une augmentation des niveaux de PIP3. Ce phospholipide recrute alors des protéines telles qu'Akt qui seront phosphorylées sur deux résidus distincts par PDK1 et 2. Akt phosphorylée peut alors activer les voies de signalisation en amont.

I-3-2 Rôle dans la synthèse de collagène

I-3-2-1 Collagène I

Il est maintenant établi que le TGF- β est un régulateur majeur de la production des constituants de la matrice des tissus conjonctifs de la peau humaine. Le TGF- β est sans aucun doute le plus connu des facteurs profibrosants. Il est chimiotactique pour les fibroblastes, il stimule leur prolifération, il inhibe la synthèse de collagénases et augmente la synthèse des inhibiteurs des métalloprotéases que sont les TIMPs (pour Tissue Inhibitors of MétalloProtéases) et le PAI-1 (pour Plasminogen Activator Inhibitor 1). Ses effets sur la production de matrice extracellulaire par les cellules fibroblastiques ont pu être confirmés *in*

in vivo dans plusieurs modèles. Les mécanismes intracellulaires responsables des effets du TGF- β sont beaucoup mieux compris depuis l'identification des protéines Smads, qui relaient tout ou partie des effets intracellulaires du TGF- β . Dans les cellules mésangiales, l'induction du promoteur du collagène de type I par le TGF- β requiert également la cascade ras/MEK/ERK MAP kinase (Leask et Abraham, 2004). De plus, un élément de réponse au TGF- β (appelé CyRC ou TbRE) a été clairement identifié au sein du promoteur proximal de COL1A2 et étudié en détail. Il a été suggéré que la production de collagène par les fibroblastes stimulés avec TGF- β pouvait être liée à la différenciation cellulaire et à la transformation des fibroblastes en myofibroblastes (Pertrov et coll, 2002). L'expression du TGF beta par les kératinocytes augmente au cours du développement (kératinocytes foetaux versus kératinocytes de nouveau né et d'adultes), ainsi que l'expression de collagène I (Colwell et coll, 2002). Il s'avère également que lors du photo-vieillessement, c'est la diminution d'expression du TGF- β ou de son récepteur qui induit la diminution de collagène (Zhong et coll, 2011) (figure 12).

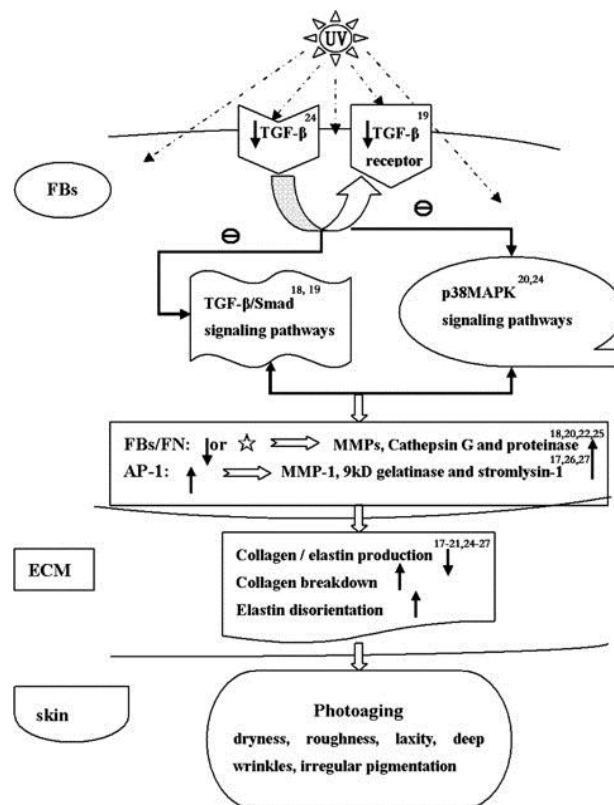


Figure 12: Lien entre le photo-vieillessement, le TGF- β et la synthèse de collagène (Zhong et coll, 2011)

Les radiations UV peuvent réguler négativement l'expression du TGF- β ou bien de son récepteur menant alors à la diminution du nombre ou à l'apoptose des fibroblastes aussi bien qu'à l'activation d'AP-1. Ces phénomènes induisent l'augmentation d'expression des MMPs, de la Cathepsine G etc... ce qui a pour conséquence de diminuer la production de collagène et d'élastine et d'augmenter la dégradation des composés de la MEC.

De plus, lors du vieillissement chronologique il a été observé une diminution d'expression de TGF- β corrélée à une diminution d'expression de procollagène I par les fibroblastes (Quan et coll, 2010 ; Oliver et coll, 2010) ce qui apporte une preuve que la diminution du collagène I au cours du vieillissement est due, en partie, à une diminution du TGF- β et/ou de son récepteur.

I-3-2-2 Collagène IV

Le TGF- β induit l'expression génique des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$ dans les cellules NIH-3T3 (fibroblastes dérivant d'embryons de souris) ainsi que dans les fibroblastes rénaux de rats (Grande et coll, 1993). Dans les cellules mésangiales, cette induction de synthèse de collagène IV par le TGF- β se réalise *via* un mécanisme impliquant Smad 2 et la voie des MAPKs (Jiang et coll, 2010). Il est également un médiateur autocrine de la production de collagène IV par les cellules épithéliales des tubulles rénaux (Grande et coll, 2002).

Lors d'un diabète mellitus, il semblerait que ce soit un effet autocrine ou paracrine qui soit responsable de l'augmentation de collagène IV dans les cellules endothéliales (Sternberg et coll, 1993). L'angiotensine II stimule la production de la chaîne $\alpha 3(IV)$ *via* un mécanisme impliquant la voie de signalisation du TGF- β et du VEGF (Chen et coll, 2005).

De fortes concentrations en glucose induisent une augmentation de la production de collagène IV par un mécanisme impliquant le TGF- β dans les cellules des tubulles proximaux (Du et coll, 2010). Il s'avère donc que, comme pour le collagène I, le TGF- β est impliqué dans la synthèse de collagène IV dans un certain nombre de types cellulaires.

II. La peau

II-1 Fonctions physiologiques de la peau

II-1-1 Protection

La fonction la plus importante de la peau est de former une barrière effective entre « l'intérieur » et « l'extérieur ». Cela comprend une barrière physique, une barrière chimique/biochimique et une barrière immunitaire (Proksch et coll, 2008).

❖ Barrière physique

La peau est soumise à de nombreuses et fréquentes agressions mécaniques : tractions aux articulations, chocs, frottements... elle doit les amortir afin de préserver sa propre intégrité et cette protection va se réaliser à 3 niveaux :

- grâce à la kératine de la couche cornée, une solide barrière qui oppose au stress son élasticité, sa dureté et sa résistance à la friction. La desquamation continue de ces cellules élimine les microorganismes qui s'y attachent.
- grâce aux fibres du derme : les fibres de collagène, qui confèrent à la peau leur force de tension, et les fibres élastiques, grâce auxquelles la peau revient en place après étirement.
- le coussin graisseux de l'hypoderme, qui protège les muscles et les os sous-jacents contre les chocs et les pressions.

❖ Barrière chimique/biochimique

Elle permet de lutter contre les allergènes, les germes et les éléments irritants. La peau est recouverte d'un mélange composé entre autres d'acides gras, de sébum et de peptides antibactériens. Le pH à la surface de la peau est maintenu acide (entre 4 et 5). Toutes ces conditions sont néfastes à la survie de nombreuses bactéries.

❖ Barrière immunologique

La fonction de protection contre les microorganismes intervient également à plusieurs niveaux :

- la couche cornée : qui rend la plupart des pathogènes imperméables à la peau.

- les cellules de la défense immunitaire : les cellules de langerhans siégeant dans l'épiderme et les leucocytes siégeant dans le derme.
- les glandes sébacées: qui produisent le sébum à action bactéricide et fongicide.
- la desquamation permanente: qui élimine les germes présents.

❖ Photoprotection

Il s'agit de la protection contre les rayonnements solaires qui se fait de plusieurs façons :

- la pigmentation : les mélanines ont une capacité de diffraction et de réflexion de la lumière ainsi que d'absorption photonique et de piègeurs de radicaux libres.
- les mécanismes de réparation de l'ADN : ce sont les mécanismes de dernier recours quand les photons ont échappés aux autres moyens de protection. Il en existe plusieurs types. La réparation par excision de nucléotides représente la principale défense contre les effets génotoxiques du rayonnement solaire. Il y a aussi la réparation post-réplivative qui est un mécanisme d'urgence quand la cellule en division est lésée par les UV, mais ce système peut faire des erreurs (Beani, 2012).

II-1-2 Détection des informations extérieures

Les terminaisons nerveuses contenues dans la peau, et notamment au bout des doigts, permettent à l'homme d'explorer son environnement par le toucher. La peau permet ainsi une sensibilité à la pression, à la température, et à la douleur. Elle possède quatre types de récepteurs, qui réagissent en fonction de stimuli différents, et qui renvoient des informations interprétables par le cerveau. Ces informations parcourent la colonne vertébrale, jusqu'au thalamus *via* deux types de canaux : l'un pour les informations concernant la douleur et la température, l'autre pour le toucher à proprement parler (texture, dureté, etc...).

Les 4 types de récepteurs sont les cellules de Merkel (pression), les corpuscules de Meissner (tactile), les corpuscules de Ruffini (chaleur), les corpuscules de Pacini (tactile).

II-1-3 Maintien de la température corporelle (thermorégulation)

La peau contient en effet un très vaste réseau de vaisseaux sanguins. Quand il fait chaud, ces vaisseaux se dilatent, permettant alors d'augmenter la surface du réseau sanguin et de libérer plus de chaleur dans le milieu extérieur. En même temps, la peau produit de la sueur grâce aux glandes sudoripares, ce qui rafraîchit également le corps. Quand il fait froid, les

vaisseaux sanguins de la peau vont au contraire se contracter, ce qui limite les pertes de chaleur du corps dans le milieu extérieur. La circulation cutanée se fait alors principalement dans les couches profondes, le tissu adipeux jouant un rôle d'isolant thermique. En surface cutanée, les échanges caloriques entre le sang et le milieu extérieur se trouvent ainsi limités. Les poils interviennent dans la régulation thermique par leur rôle isolant contre le froid ou le chaud, ils créent une couche d'air isolante entre la peau et les poils.

II-2 Structure

La peau humaine a une surface d'environ 2 m² chez l'adulte et représente un sixième du poids corporel. Elle est constituée de différents tissus formant une barrière vitale pour l'organisme vis-à-vis de l'environnement extérieur. Elle est formée de trois parties : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure 13).

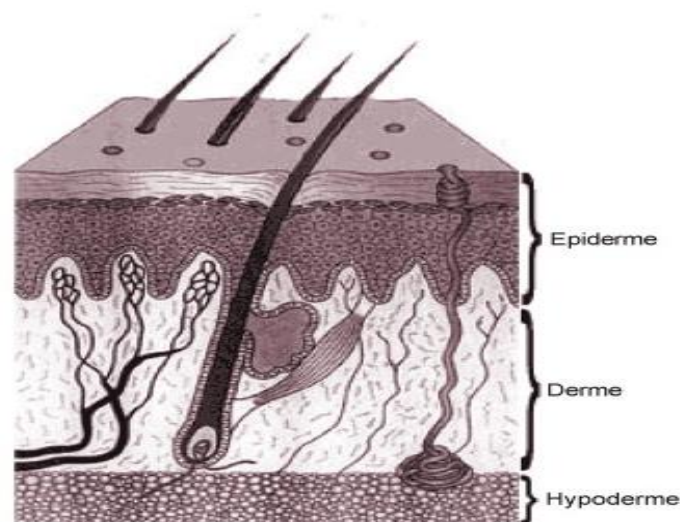


Figure 13: Les 3 couches de la peau (<http://www.alep-soap.com>)
La peau comprend trois couches superposées, l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

II-2-1 L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. L'épaisseur moyenne de l'épiderme est de 100 µm mais peut varier de 50 µm sur les paupières à 1 mm sur la paume des mains ou la plante des pieds. L'épiderme n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin et est seulement alimenté par diffusion depuis le derme. Il contient en revanche de nombreuses terminaisons nerveuses. L'épiderme est constitué à 95% de kératinocytes. Les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel forment les 5% restant. Il se compose de

quatre à cinq couches distinctes (selon le site anatomique). C'est un système cinétique hautement organisé, en renouvellement constant. Les cellules épidermiques prolifèrent au niveau de sa couche la plus profonde : la couche basale, et se différencient au cours de leur migration vers les couches supérieures pour former successivement la couche épineuse, la couche granuleuse, la couche claire et la couche cornée (figure 14).

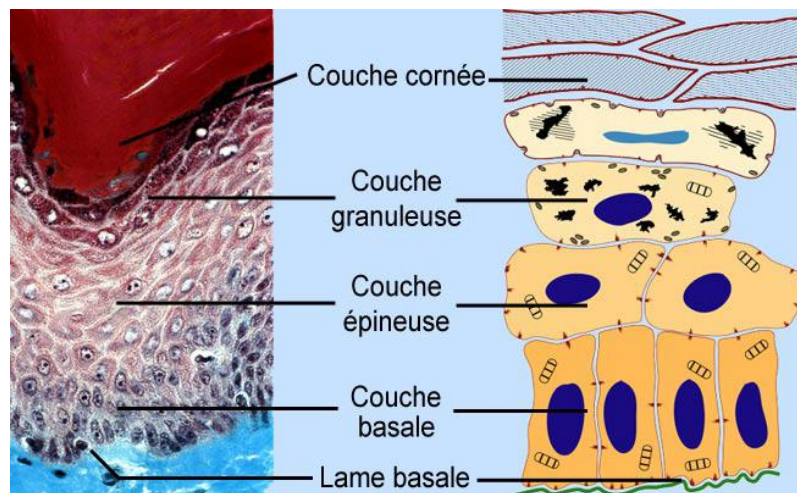


Figure 14: Les couches de l'épiderme (polgm.free.fr)

L'épiderme de la peau épaisse se compose de cinq couches distinctes, de la plus profonde à la plus superficielle: la couche basale (ou stratum germinativum), la couche épineuse (ou stratum spinosum), la couche granuleuse (ou stratum granulosum), la couche de claire (stratum lucidum) et la couche cornée (ou stratum corneum).

II-2-1-1 La couche cornée (stratum corneum)

C'est l'épiderme vivant (les couches basale, épineuse et granuleuse), qui est responsable de la formation et du renouvellement de la couche cornée. Elle est constituée de 5 à 15 couches de cellules et représente la couche la plus externe de l'épiderme en contact avec l'environnement extérieur. Pendant leur différenciation et leur maturation, les kératinocytes synthétisent et expriment différents types de protéines de structure et différents lipides. L'étape finale de cette différenciation, associée à de profonds changements de structure, donne naissance aux cornéocytes qui sont des cellules mortes, plates, contenant de l'eau et de la kératine. Ces cornéocytes sont incorporés dans une matrice lipidique. C'est ce qui a incité Michaels et son équipe, en 1975, à comparer cette couche à « des briques et du mortier ». Les lipides du mortier qui remplissent le sentier tortueux entre les cornéocytes empilés sont constitués d'un mélange complexe d'environ 13 espèces de céramides, cholestérol et acides gras libres ; ceux-ci fournissent la barrière de perméabilité. La couche cornée comporte deux

parties, une partie où les cornéocytes sont encore reliés les uns aux autres grâce aux cornéodesmosomes, et une autre partie où, sous l'action d'enzymes spécifiques, les cornéodesmosomes se dégradent, permettant aux cornéocytes de se détacher : c'est la desquamation. De cette façon, l'épiderme est constamment renouvelé tous les 25 à 40 jours.

II-2-1-2 La couche claire (stratum lucidum)

La couche claire est une couche morte homogène qui ne s'observe que dans la peau épaisse et qui correspond à une zone de transition entre la couche cornée et la couche granuleuse. Elle est constituée de 3 ou 4 assises de cellules jointives et a pour mission de servir de barrière à la peau, contre les agressions physiques (coupures, piqûres, ...) mais aussi chimiques (xénobiotiques, solvants).

II-2-1-3 La couche granuleuse (stratum granulosum)

C'est le lieu d'accumulation de la kératine. Elle est composée de 1 à 3 couches de cellules et est constituée de cellules granuleuses aplaties chargées de kératine et dont le noyau dégénère progressivement. Le cytoplasme des cellules de la couche granuleuse contient des grains de kératohyaline provoquant la maturation de la filaggrine. La filaggrine est une protéine située dans les couches les plus superficielles de l'épiderme. La profilaggrine, protéine riche en histidine, est le principal composant des grains de kératohyaline du *stratum granulosum*. Au cours de la différenciation terminale, la profilaggrine est déphosphorylée puis partiellement protéolysée en composés intermédiaires, puis en filaggrine. La filaggrine possède la capacité d'agréger les filaments de kératine en catalysant la formation des ponts disulfures entre les filaments de kératine. Elle entre dans la composition de l'enveloppe cornée. Elle joue un rôle dans l'hydratation puisqu'elle représente le réservoir essentiel des facteurs d'hydratation naturels (NMF).

II-2-1-4 La couche épineuse (stratum spinosum)

Cette couche est aussi dite « de Malpighi ». Elle est composée de kératinocytes dans les couches inférieures qui s'aplatissent dans les couches supérieures et qui sont liés les uns aux autres par des structures, les desmosomes ; les filaments de kératine associés les font

apparaître hérissés d'épines sur coupe histologique en microscopie optique (d'où le nom de couche épineuse). Cette couche confère à la peau sa résistance et sa souplesse.

II-2-1-5 La couche basale (stratum germinativum)

Cette couche assure le renouvellement des kératinocytes et contient aussi bien des cellules souches que des cellules progénitrices des kératinocytes (Fortunel et coll ; 2010). Les cellules souches sont situées sur la membrane basale sous-jacente. Les kératinocytes sont les cellules les plus nombreuses de l'épiderme, qui, en se divisant, progressent vers l'extérieur en se différenciant pour composer les autres couches de l'épiderme. Ils se multiplient de manière continue (10 à 17% des cellules se divisent chaque jour).

II-2-1-6 Principales cellules de l'épiderme

Elle comporte principalement 5 types de cellules :

- les kératinocytes, cités précédemment, se différencient au fil de leur diffusion et se chargeant en kératine. Au niveau de la couche cornée, les kératinocytes morts, alors appelés cornéocytes, sont éliminés par desquamation.
- les mélanocytes situés au fond de l'épiderme, produisant la mélanine, substance responsable de la couleur de la peau et dont le rôle est de protéger les tissus des effets du soleil.
- les cellules de Langerhans sont produites dans la moelle osseuse puis diffusent vers l'épiderme où elles s'intercalent entre les kératinocytes sur toute la hauteur de la couche de Malpighi. Elles assurent un rôle immunologique en contrôlant la présence d'antigènes.
- les cellules de Merkel, dispersées au sein des kératinocytes, sont toujours en contact avec une terminaison nerveuse. Elles jouent un rôle de mécanorécepteurs et sont impliquées dans la fonction du toucher.

II-2-2 Le derme

Le derme est un tissu de type conjonctif dont l'épaisseur, de 5 à 9 millimètres, est variable selon les régions corporelles. Le derme est composé, pour l'essentiel, de fibres de collagène, de fibres d'élastine et de fibronectine. Il existe trois sortes de fibres élastiques : les fibres d'élaunine (immatures), les fibres élastiques proprement dites (matures) et les fibres oxytalanes (Prost-Squarcioni et coll, 2008). Ces fibres confèrent à la peau son élasticité. Les fibres de collagènes sont constituées des collagènes I, III et V. Ces derniers sont associés à un

autre type de collagène, dit « FACIT », comprenant les collagènes XIV et XVI. Ces fibres de collagènes vont conférer au derme sa force de tension.

Cette matrice extracellulaire baigne dans une sorte de gel formé de glycosaminoglycannes, protéines qui, à la manière d'une éponge, captent l'eau dans le derme et agissent ainsi comme réservoir d'hydratation. A la différence de l'épiderme, il est vascularisé, ce qui lui permet non seulement d'apporter à l'épiderme énergie et nutriments mais aussi de jouer un rôle primordial dans la thermorégulation et la cicatrisation. Il comporte également de nombreuses fibres nerveuses, des follicules pileux, des glandes sébacées sécrétant le sébum, des glandes sudoripares ainsi que des cellules du système immunitaire (lymphocytes, mastocytes, macrophages et autres globules blancs). Le derme s'organise en deux couches :

II-2-2-1 Derme papillaire

Le derme papillaire ou superficiel est un tissu conjonctif lâche qui s'insinue entre les crêtes de l'épiderme, formant ainsi les papilles dermiques. Il est composé de collagène de type I, III et VII et de fines fibres élastiques. Cette matrice est relativement riche en cellules (fibroblastes, mastocytes et dendrocytes) et sert de support aux fibres nerveuses ainsi qu'aux capillaires sanguins et lymphatiques qui constituent un véritable tissu nourricier pour l'épiderme.

II-2-2-2 Derme réticulaire

Le derme réticulaire, plus profond, est un tissu conjonctif plus dense composé d'un entrecroisement de faisceaux de grosses fibres de collagène et de fibres élastiques présentant une orientation préférentiellement parallèle à la surface de la peau. Il contient moins de collagène de type III que le derme papillaire et il se différencie de celui-ci par un tissu conjonctif dense, principalement constitué de collagène de type I et de fibres d'élastine. Cette partie du derme contient peu de substance fondamentale et de cellules conjonctives. Le derme réticulaire héberge aussi les annexes dermo-épidermiques (follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares) ainsi que les cellules endothéliales qui participent à la formation des vaisseaux. Il contient un important réseau vasculaire assurant la nutrition de l'épiderme et des nerfs permettant les perceptions.

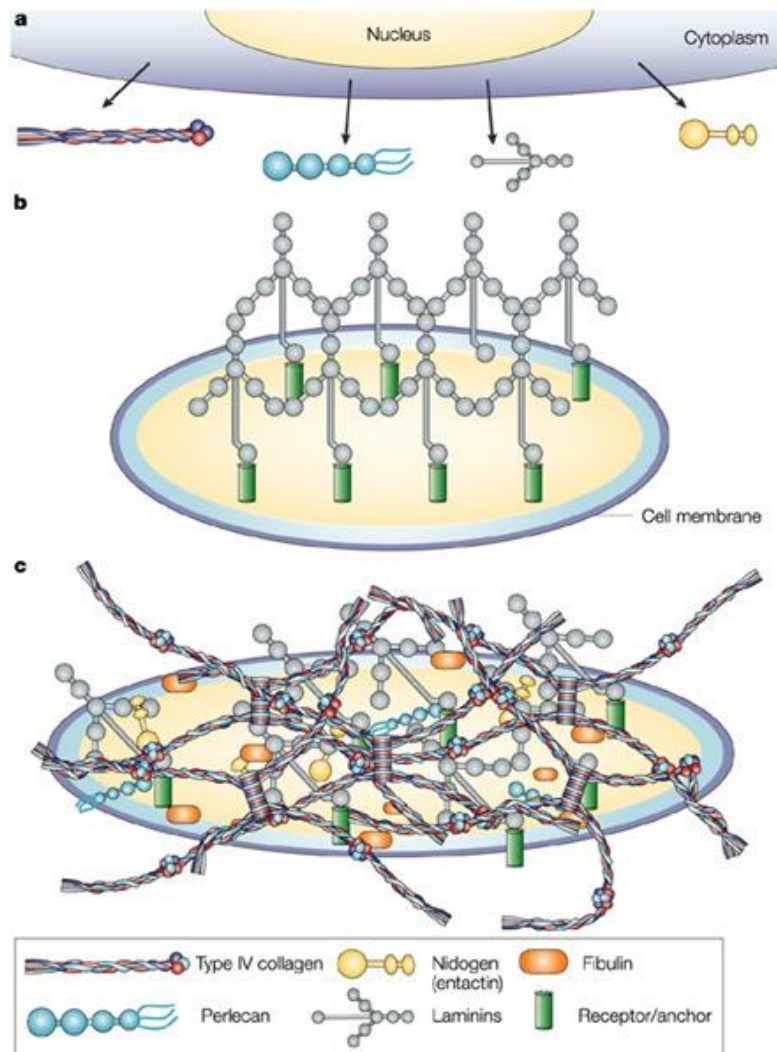
II-2-3 Hypoderme

L'hypoderme est le compartiment le plus profond et le plus épais de la peau. Il s'invagine dans le derme et est rattaché au derme sous-jacent par des fibres de collagène et d'élastine. Il est essentiellement constitué d'un type de cellules spécialisées dans l'accumulation et le stockage des graisses, les adipocytes. Ces adipocytes de l'hypoderme sont des cellules regroupées en lobules séparés par du tissu conjonctif. L'hypoderme joue le rôle de réserve énergétique. Les graisses contenues dans les adipocytes, peuvent être remises en circulation, *via* la voie veineuse, lors d'un effort intense ou lors d'une déficience en apport énergétique, et seront transformées en énergie. L'hypoderme participe, au moins passivement, à la thermorégulation puisque la graisse est un isolant thermique (skin-science.com).

II-3 Jonction dermo-épidermique

II-3-1-Généralités

La jonction dermo-épidermique est une membrane basale spécialisée. Les membranes basales sont des membranes de 50 à 100 nm d'épaisseur, composées de complexes protéiques de la matrice extracellulaire. Elles sont retrouvées sur la face basolatérale de toutes les monocouches cellulaires d'épithéliums et d'endothéliums du corps. Elles sont observables par microscopie électronique à transmission (Lebleu et coll, 2007). Les composants des membranes basales ont été étudiés, après isolement, à partir de sarcome de souris appelé EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) (Timpl et coll, 1978). Les 4 composés principaux des membranes basales sont le collagène de type IV, les laminines, le perlecane et le nidogène/entactine (figure 15).



Nature Reviews | Cancer

Figure 15: Principaux composants et organisation des membranes basales (Kalluri, 2003)

A : la cellule assemble les composés de la membrane basale en unités fonctionnelles (protomères de collagène IV, trimère de laminines, nidogène et perlécane) dans la cellule puis les secrète. **B** : la polymérisation des laminines initie l'échafaudage de la membrane basale à la surface basolatérale des cellules. **C** : Ce polymère s'associe au réseau de collagène IV. Les autres polymères s'associent à ces deux réseaux pour organiser une membrane basale fonctionnelle.

II-3-2 Structure

La JDE, d'une épaisseur d'environ 100 nm, présente en microscopie électronique 4 zones distinctes de l'épiderme vers le derme :

1) la membrane plasmique des cellules basales de l'épiderme avec, au niveau des kératinocytes basaux, des structures d'ancrages appelées hémidesmosomes. Elle mesure 7 à 9 nm d'épaisseur (Briggaman, 1975).

2) la *lamina lucida*, une zone claire aux électrons d'environ 20 à 40 nm d'épaisseur, riche en laminine 332 et 311.

3) la *lamina densa*, une zone dense aux électrons ayant approximativement 30 à 60 nm d'épaisseur, majoritairement constituée de collagène IV, de laminines 511 et 321, de nidogène et de protéoglycannes, en particulier le perlecane.

4) la zone fibrillaire, située sous la *lamina densa* avec des filaments d'ancrage constitués de collagène I, III et VII, des bobines de microfibrilles et des fibres de collagène.

La complexité de la JDE est caractérisée par la présence des complexes d'ancrage qui lui confèrent une solidité exceptionnelle et une organisation extrêmement spécialisée. Ils sont constitués par les hémidesmosomes au niveau de la membrane basale des kératinocytes basaux, des filaments d'ancrage qui s'étendent de la *lamina lucida* et qui s'insèrent dans la *lamina densa* dans le but de fixer les hémidesmosomes à la membrane basale, et des fibrilles d'ancrage qui se projettent de la *lamina densa* jusque dans les régions supérieures du derme papillaire où ils forment une boucle pour se réinsérer au sein de la *lamina densa* ou s'associer à d'autres structures du derme, les plaques d'ancrage (Keen et coll, 1987) (figure 16).

La JDE intervient à de nombreux niveaux : c'est un support mécanique pour l'attachement de l'épiderme au derme par le réseau de collagène IV, *via* les hémidesmosomes. Elle contrôle les échanges de produits métaboliques entre ces deux compartiments, notamment en régulant la perméabilité de la membrane basale. Cette régulation est sous la dépendance des protéoglycannes qui créent une barrière pour le passage des macromolécules anioniques. Elle est un réservoir important de facteurs de croissance. Elle est le support des kératinocytes lors du phénomène de cicatrisation. Elle laisse migrer à travers ses couches plusieurs types cellulaires lors de processus immunologiques et inflammatoires. Elle joue un rôle dans l'organisation et la différenciation cellulaire par interactions mutuelles entre les récepteurs cellulaires et les molécules de la matrice extracellulaire (Masunga, 2006).

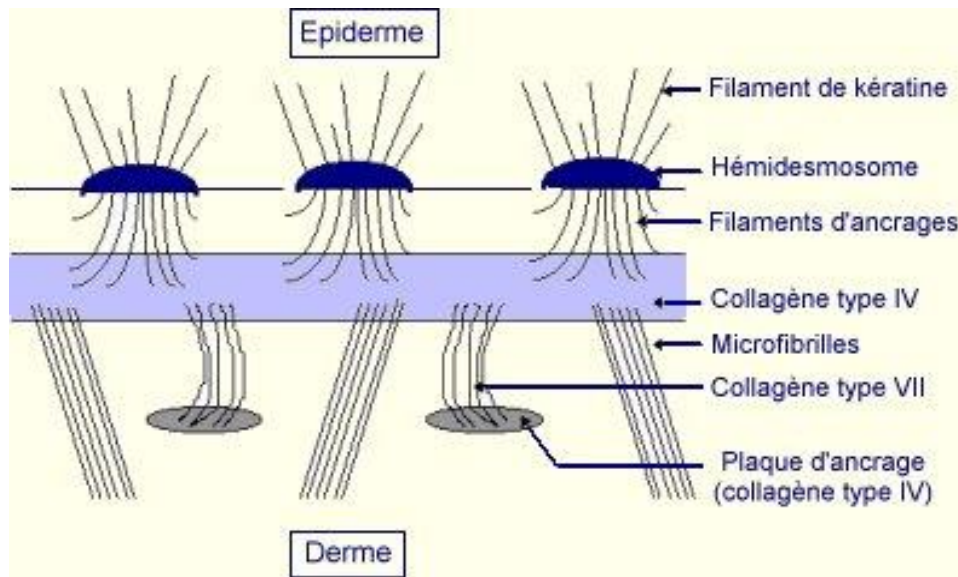


Figure 16: Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique (Siméon, 1999)
La jonction dermo épidermique contient des complexes d'ancrage constitués des hémidesmosomes des kératinocytes basaux, des filaments d'ancrage traversant la lamina lucida et la lamina densa et de fibres d'ancrage reliant la lamina densa aux plaques d'ancrage du derme papillaire.

Ce sont les kératinocytes dérivant de l'ectoderme et les fibroblastes dérivant du mésoderme qui synthétisent les composés de la JDE au cours du développement. Ainsi les protéines de la plaque des hémidesmosomes, les collagènes IV, V et VII, les laminines 332 et 311 et les protéoglycannes à héparane sulfate sont synthétisés par les kératinocytes basaux. Les fibroblastes du derme papillaire synthétisent le nidogène, les autres laminines de la JDE, le collagène IV et la fibronectine de la *lamina densa*, et les collagènes I, III et VII de la région sous la *lamina densa* (Burgeson et coll, 1997).

II-3-3 Les principaux composants

❖ La famille des laminines

Les laminines sont les protéines non collagéniques les plus abondantes des membranes basales. Ce sont des glycoprotéines de grande taille (400 à 900 kDa). Cette famille de protéines est constituée de 3 sous unités : α , β et γ qui s'assemblent pour former une morphologie en croix. 11 gènes codent pour les 11 chaînes de la famille des laminines ($\alpha 1-5$, $\beta 1-3$, and $\gamma 1-3$). Toutes les chaînes α contiennent à leur extrémité carboxy-terminale un large domaine globulaire G qui est le site majeur d'adhésion de la laminine. Ce domaine est constitué de cinq résidus basiques (globules LG1 à LG5). Ce module LG appartient à une

superfamille et est également retrouvé dans un grand nombre d'autres protéines de la MEC. Les laminines ont un rôle très important dans le réseau des membranes basales puisqu'elles forment, avec le collagène de type IV, l'architecture de base de toutes les membranes basales. La laminine 332 est celle que l'on retrouve majoritairement dans la jonction dermo-épidermique. Elle se situe à la base des filaments d'ancrage (Rousselle et coll, 1991). En plus de la laminine 332, les laminines 311 et 511 sont également présentes dans cette zone (Aumailley et coll, 1999). La laminine 332 est composée des chaînes $\alpha 3$, $\beta 3$, et $\gamma 2$ et mesure 100 nm de long. Elle interagit avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, composé transmembranaire des hémidesmosomes, à travers leur domaine globulaire localisé à l'extrémité carboxy-terminale de la sous-unité $\alpha 3$. Cette laminine 332 est aussi connue pour se lier au domaine NC1 du collagène de type VII. De ce fait, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$, un composé des hémidesmosomes (des kératinocytes de l'épiderme) est connecté au collagène VII qui est un constituant des fibres d'ancrages localisées dans le derme papillaire, *via* la molécule de laminine 332.

❖ Les molécules stabilisant les réseaux de collagène IV et de laminines

Le Nidogène (aussi nommé entactine) est une petite glycoprotéine sulfatée de 150 kDa et que l'on retrouve au niveau de la *lamina lucida*. Il se fixe aux laminines, à la fibronectine et au collagène IV. Le Perlecan est un glycosaminoglycane de 400 kDa. Il se fixe au collagène IV et à la laminine 111 et confère une charge négative, régulant ainsi la migration de cellules chargées à travers les membranes basales (Ray et coll, 1996).

❖ La famille des Plakines

2 membres de cette famille ont pour rôle de lier les filaments intermédiaires de kératine aux hémidesmosomes. Il s'agit de la plectine et de l'antigène de la pemphigoïde bulleuse de 230 kDa BP230 (McMillan et coll, 2003). La plectine a un rôle de liaison des molécules du cytosquelette entre-elles.

❖ La famille des intégrines

Les intégrines constituent une famille de récepteurs cellulaires des composants de la MEC. $\alpha 6\beta 4$ est exprimée au niveau du complexe des hémidesmosomes et elle est le principal récepteur de la laminine 332 (DiPersio et coll, 2000). Cette liaison est cruciale pour l'adhésion cellulaire. $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ sont localisées au niveau de la face latérale des

membranes plasmiques et connectées directement ou non au cytosquelette d'actine, jouant un rôle dans les interactions cellules-cellules.

❖ La famille des collagènes

BP180, aussi appelé collagène XVII, appartient à la famille des collagènes transmembranaires qui englobe un groupe de protéines de type collagène agissant à la fois comme des récepteurs de surface et des composants de la MEC. Il apparaît que BP180 agit comme une protéine d'ancrage cruciale, connectant les protéines hémidesmosomales intra et extracellulaires. Deux autres types de collagène sont présents au niveau de la JDE: le collagène de type VII dont les dimères constituent des fibres d'ancrages stabilisées par des ponts disulfures ; le collagène de type IV qui est le composant majeur des membranes basales.

III. Le vieillissement cutané

Le processus de vieillissement est une conséquence inévitable de la vie. Le vieillissement cutané apparaît comme étant le résultat de deux types de vieillissements combinés : le vieillissement intrinsèque et le vieillissement extrinsèque (Poljsak et coll, 2012). Les changements structuraux dus au vieillissement intrinsèque résultent du vieillissement physiologique et sont génétiquement déterminés. A ce type de vieillissement s'additionne donc le vieillissement extrinsèque causé par divers facteurs extérieurs tels que l'exposition solaire, les radiations ionisantes, le stress physique et psychologique, la consommation de tabac et d'alcool, les habitudes alimentaires, le style de vie, la pollution et les radiations UV.

III-1 Vieillissement extrinsèque

III-1-1 Influence du tabac et de la nicotine

La consommation de tabac provoque une augmentation des MMPs 1 et 3, provoquant ainsi la dégradation de collagène et une perte de l'équilibre entre la biosynthèse et la dégradation du tissu conjonctif dermique. Les espèces réactives de l'oxygène (en anglais : ROS= Reactive Oxygen Species) sont également impliquées dans le vieillissement prématuré lié au tabac (Morita, 2007). Une diminution de la biosynthèse des collagènes I et III est également observée ainsi qu'une accumulation de protéoglycannes altérés. Une augmentation de l'ARNm de la tropoélastine induisant une accumulation de matériel élastique anormale, appelée élastose, est également observée (Morita et coll, 2009). Des extraits de tabac induisent l'augmentation de la forme latente du TGF- β dans les surnageants de fibroblastes dermiques cultivés *in vitro* (Yin et coll, 2003). L'accumulation de cette forme non fonctionnelle, ainsi que la régulation négative de son récepteur spécifique, conduit à la diminution de synthèse des protéines de la matrice extracellulaire.

III-1-2 Influence de l'exposition solaire

A partir du spectre des radiations solaires, il a été montré que les UVB (290-320 nm), les UVA (320-400nm) et les infrarouges A (770-1400 nm) sont capable d'induire le processus de vieillissement cutané intrinsèque. Les UVB peuvent pénétrer dans l'épiderme tandis que les

UVA pénètrent également dans le derme et les infrarouges A pénètrent en plus dans l'hypoderme.

- Influence des Ultra-violets

L'incidence des changements induits par exposition aux UVs augmente avec l'âge et est associée avec une accumulation de mutations au sein des cellules cutanées.

Les UVs constituent le facteur de vieillissement extrinsèque majeur. Le procédé est complexe et les dommages occasionnés sont divers : dommages mitochondriaux, oxydations protéiques, dommages de l'ADN dus au raccourcissement des télomères, voies de signalisation initiées par les récepteurs, mais aussi des dommages directs de l'ADN et apparition de dimères de thymine.

Les voies de signalisations initiées par les récepteurs sont induites par la photoproduction de ROS. Les ROS vont activer les récepteurs de surface des cytokines et des facteurs de croissance aussi bien dans les kératinocytes que dans les fibroblastes. Cette activation de récepteurs va mener à une signalisation intracellulaire à travers la stimulation de kinases qui, elles-mêmes, induiront ensuite les facteurs de transcription AP-1 et NFκB. L'induction d'AP-1 aura pour conséquence de diminuer, d'une part, l'expression génique des 2 collagènes dermiques majeurs: les collagènes I et III et d'augmenter, d'autre part, la synthèse des métalloprotéinases matricielles dans les fibroblastes et les kératinocytes. NFκB stimule la transcription des cytokines inflammatoires qui sont impliquées dans l'attraction des neutrophiles contenant des collagénases neutrophiles qui dégradent le collagène.

Il y a également un lien entre le photo-vieillessement et les dommages mitochondriaux. En effet, les mutations de l'ADN mitochondrial dû aux UVs semblent médiées *via* les ROS. De plus les mitochondries génèrent de façon continue des ROS lors de la production d'ATP en consommant de l'oxygène *via* la chaîne respiratoire.

- Influence des Infra-rouges A (IRA)

Comme les UVs, les infrarouges provoquent une augmentation de MMP-1 *in vitro* et *in vivo*. De plus, une exposition aux infrarouges réduit également l'expression en collagène I. En effet, les irradiations IRA de la peau sont principalement absorbées par la mitochondrie et augmentent donc la production intra-mitochondriale de ROS. Ces ROS vont quitter la mitochondrie et altérer les niveaux intra-cytoplasmiques de calcium, activant alors la voie de

signalisation des MAP kinases, menant alors à des niveaux d'expression élevés de la MMP-1 (Kim et coll, 2006).

III-1-3 Influence de la pollution de l'air

Comme cité précédemment, la peau est une barrière en contact direct avec les polluants de l'air, ce qui accélère le vieillissement cutané. Des études ont montré que l'ozone était capable d'induire l'expression de MMP-9 au niveau des peaux de souris, suggérant ainsi un rôle dans le remodelage matriciel. Une étude épidémiologique récente a montré un lien direct entre les poussières en suspension dans l'air et l'accélération des principaux signes de vieillissement de la peau tels que les rides et l'apparition de taches cutanées. Ce mécanisme semble être médié par la production de ROS. De plus ces particules sont capables de servir de transporteurs pour les composés chimiques et les métaux se localisant au niveau de la mitochondrie menant au vieillissement cutané *via* les dommages mitochondriaux (Vierkotter et coll, 2012).

III-2 Vieillessement intrinsèque

III-2-1 Influence des facteurs génétiques

Le vieillissement cellulaire se traduit par un arrêt de réplication de la cellule. Ceci est appelé « sénescence réplivative » et résulte de dommages à l'ADN apparus au cours du temps. Elle est induite par une réduction progressive des télomères. Les télomères situés à l'extrémité des brins d'ADN, participent à la stabilité chromosomique. Les cellules cutanées font partie des cellules les plus rapides de l'organisme à se diviser. Les dommages de l'ADN s'accumulent avec l'âge, cette réplication rapide les rend par conséquent plus vulnérables à la sénescence réplivative.

III-2-2 Influence des variations hormonales

Avec l'âge, on observe un déclin du niveau d'hormones sexuelles que sont l'estrogène, la testostérone, le déhydroépiandrostérone (DHAÉ) et son dérivé sulfaté ainsi que des hormones de croissance. Ces hormones ont une grande influence sur les cellules cutanées.

Pour les estrogènes par exemple, il a été montré que les femmes ménopausées avaient un niveau de collagène I et III qui diminuait, ainsi que le ratio collagène III/collagène I en comparaison des femmes pré-ménopausées. La capacité de la peau à retenir l'eau, grâce,

notamment, aux lipides de la couche cornée, est également diminuée avec le déclin d'estrogène (Verdier-Sevrain et coll, 2007). Ces hormones se fixent aux récepteurs cellulaires, activant l'expression de gènes modulant le renouvellement des cellules cutanées. Avec la diminution du taux d'estrogène, ces cellules cutanées vont se renouveler plus lentement, avec pour conséquence un amincissement des couches dermiques et épidermiques. La circulation sanguine diminue également ainsi que la faculté de la peau à maintenir son élasticité (Raine-fanning et coll, 2003).

III-2-3 Influence du stress oxydatif

L'oxygène est essentiel pour la vie. Les humains, comme tous les aérobies ont besoin d' O_2 car des systèmes enzymatiques tels que la chaîne de transport des électrons nécessitent de l' O_2 . Ils ne peuvent tolérer les produits toxiques produits grâce aux défenses anti-oxydantes. L'oxygène génère des composés, les ROS, car ces entités radicalaires et moléculaires sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance. Ces ROS incluent les radicaux libres qui sont des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons (notés par un point) non appariés sur leur couche externe. La présence d'un électron célibataire confère à ces molécules, la plupart du temps, une grande instabilité (elles ne respectent pas la règle de l'octet), ce qui signifie qu'elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifiques, et que leur durée de vie en solution est très courte. Les radicaux libres importants pour la vie sont le radical hydroxyle ($OH\bullet$), superoxyde (O_2^-), l'oxyde nitrique ($NO\bullet$), thyl ($RS\bullet$) et peroxyde ($RO_2\bullet$). Le peroxydinitrite ($ONOO^-$), l'acide hypochlorique ($HOCl$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) et l'ozone (O_3) ne sont pas des radicaux libres mais peuvent facilement mener à des réactions avec les radicaux libres.

Ces ROS tendent à oxyder toutes les molécules alentours telles que l'ADN, les protéines et les lipides. Cela a pour conséquence une altération des fonctions cellulaires et/ou tissulaires menant à une instabilité de l'ADN, une dénaturation des protéines et une accumulation de bioproduits protéiques. Ces réactions d'oxydation sont physiologiquement indispensables mais peuvent, dans certaines conditions, être également nuisibles car elles peuvent altérer les tissus, contribuer à leur sénescence et au développement de certaines pathologies comme les cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Barouki ; 2006).

Pour prévenir les effets délétères dûs à ces composés, les organismes vivants ont développé un système antioxydant de défense très sophistiqué (enzymes et molécules anti-oxydantes,

enzymes de réparation de l'ADN, protéinases, phospholipases et acyltransférases) qui, dans certaines conditions extrêmes, peut se trouver débordé. On parle de stress oxydant ou stress oxydatif lorsque se produit un déséquilibre en faveur d'un excès de molécules pro-oxydantes avec des effets délétères sur l'organisme par rapport à l'activité des systèmes de défense anti-oxydante.

Les radicaux libres peuvent être formés de plusieurs façons, la source la plus abondante étant la mitochondrie puis qu'elle utilise 90% de l'oxygène utilisé par le corps humain. C'est à cet endroit que l'oxygène est réduit, par différentes étapes séquentielles, afin de produire de l'eau. Cela provoque la formation de plusieurs intermédiaires non stables tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$) (Wickens, 2001) (figure 17).

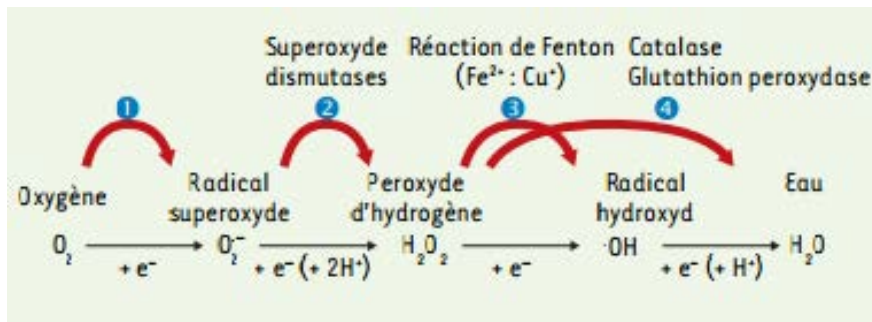


Figure 17: Origine des espèces réactives de l'oxygène (Oresajo et coll, 2012)

La réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner un par un, successivement sur O_2 en conduisant aux intermédiaires respectifs O_2^- , H_2O_2 et $\cdot OH$. (e^-) électron, (H^+) proton, (SOD) superoxyde dismutase, (O_2^-) anion superoxyde, (H_2O_2) peroxyde d'hydrogène.

Denham Harman fût le premier à associer les radicaux libres avec le concept de vieillissement. En 1956, il établit une connexion entre des données montrant que l'irradiation de systèmes vivants provoquait des mutations, l'apparition de cancer et le vieillissement par la production de radicaux libres et des données montrant que les radicaux libres étaient produits normalement dans des tissus vivants. En 1972, il émit l'hypothèse que la mitochondrie aurait un rôle dans le vieillissement. Il a basé cette théorie sur le fait qu'il y avait une étroite proximité entre les espèces oxygénées produites par les sous-produits de la respiration et l'ADN mitochondrial dans l'espace inférieur de la membrane de celle-ci. Un autre facteur pris en compte est l'inefficacité relative des mécanismes de réparation dans la mitochondrie et le fait que le génome mitochondrial n'est pas protégé par des histones comme le génome

nucléaire. Cela laisse donc suggérer que l'ADN mitochondrial serait une cible privilégiée pour les espèces réactives de l'oxygène produites par la mitochondrie (Joao et coll., 2005).

Le peroxyde d'hydrogène est aussi toxique pour les cellules et provoque une nouvelle génération de radicaux libres, particulièrement lors de sa réaction avec des métaux réduits des radicaux hydroxyles. Pour pallier à ce stress oxydatif, la peau est équipée d'un réseau de systèmes anti-oxydants. L'acide ascorbique, l'acide urique, l' α -tocopherol et le glutathion sont les molécules anti-oxydantes non enzymatiques les mieux connues. Il existe également des anti-oxydants enzymatiques comme la glutathion-peroxidase (GPx), la glutathion-réductase, la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) dans l'épiderme. La SOD convertit les anions superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sera alors dégradé en eau sous l'action de la CAT. Cependant, l'efficacité de ces systèmes de protection semble diminuer avec l'âge, indiquant donc que la génération de radicaux libres et le déclin des défenses anti-oxydantes qui lui sont couplées sont considérés comme des contributeurs potentiellement importants du vieillissement cutané.

Ce stress oxydatif, bien que décrit ici dans les processus de vieillissement intrinsèque, provient également lors du vieillissement extrinsèque. En effet, la peau humaine est constamment exposée directement à l'air, aux radiations solaires, aux polluants environnementaux, et à d'autres agressions chimiques et mécaniques capable d'induire la génération de radicaux libres et de ROS de notre métabolisme. Parmi les facteurs provoquant le vieillissement extrinsèque, ce sont les radiations UV qui sont responsables de plus de 80% de la génération de ROS.

IV. La sénescence

La sénescence cellulaire (du mot latin *senex*, signifiant vieil âge ou vieil homme) est considérée comme l'incapacité de la cellule à se diviser.

Quel que soit le stimulus qui la déclenche, la sénescence signifie, et c'est ce qui la différencie de la quiescence, qu'il se produit un arrêt du cycle cellulaire. Les cellules quiescentes (par exemple des cellules qui ont arrêté de proliférer en réponse à un sevrage en facteur de croissance ou à une inhibition de contact) reprennent leur prolifération en réponse à un signal mitogène alors que les cellules sénescents ne peuvent être stimulées par aucun des stimuli physiologiques connus.

IV-1 Evolution du concept de sénescence

Au début des années 1960, Leonard Hayflick a montré que les cultures primaires de fibroblastes humains de tissus embryonnaires de poumon cessaient de proliférer après un nombre limité de doublement de population ($DP\ 50 \pm 10$).

L'évolution de la culture cellulaire peut se diviser en trois phases : la phase I se situe entre la mise en culture d'un explant de peau humaine et l'établissement d'une culture primaire; la phase II constitue une phase de prolifération exponentielle de cellules dites « jeunes ». Un ralentissement de la division cellulaire mène ensuite à la phase III : la sénescence répliquative (figure 18). A ce stade, l'arrêt des mitoses est irréversible. Cependant, les cellules dites « vieilles » (Hayflick and Moorhead, 1961), peuvent rester métaboliquement actives pendant plusieurs mois, voire plusieurs années avant de mourir par nécrose. Ceci mime les processus ayant lieu lors du vieillissement normal de l'organisme (Chretien et coll., 2008)

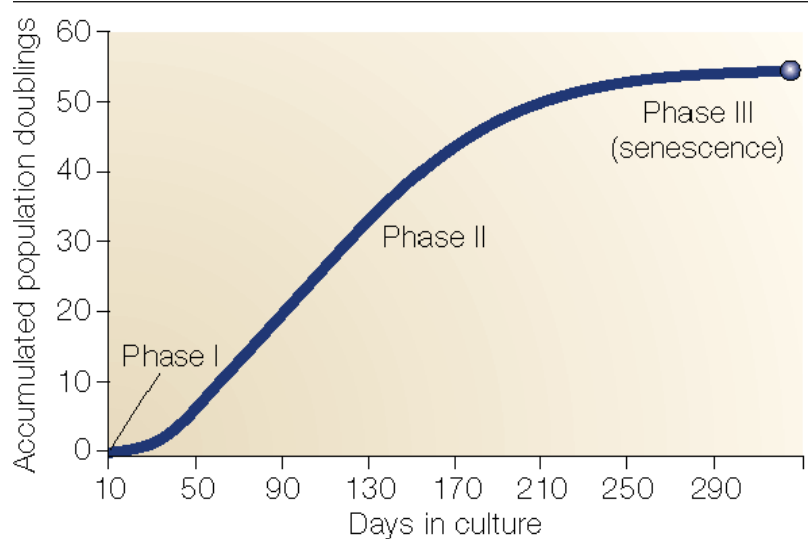


Figure 18: Evolution de la durée de vie des fibroblastes en culture (Shay et Wright, 2000)

La phase I correspond à la culture primaire, la phase II représente les cellules subcultivées pendant leur période de réplication exponentielle. La phase III représente la période durant laquelle la réplication cellulaire cesse tandis que le métabolisme continu.

La perte du potentiel de division cellulaire et les changements morphologiques des fibroblastes de poumons et de peau ont d'abord été proposés comme modèles pour l'étude du vieillissement à l'échelle cellulaire. Plus tard, ce que Hayflick avait décrit comme du « vieillissement cellulaire » s'est trouvé être approprié pour comprendre les événements qui suivent l'activation oncogénique et mènent à la transformation cellulaire. En plus de refléter la perte de l'homéostasie des tissus normaux comme une conséquence du vieillissement, la sénescence cellulaire est également connue pour être un mécanisme suppresseur de tumeurs.

IV-2 la sénescence réplivative

Ce phénomène de « sénescence réplivative » est à distinguer de l'apoptose ou de la nécrose puisque ce n'est pas de la mort cellulaire (Kipling, 2001). Cette sénescence réplivative semble résulter de la perte progressive des répétitions télomériques aux extrémités des chromosomes.

Comment la sénescence réplivative contribue-t-elle au vieillissement humain ? Il y a deux voies connues. La première est le simple modèle d'épuisement des capacités de division. Pour de nombreux organes, la division cellulaire fait partie intégrante des fonctions tissulaires. En effet, la réduction du nombre de cellules fonctionnelles liée au ralentissement des divisions cellulaires peut avoir de sérieux impacts sur la fonction des organes. L'autre voie par laquelle la sénescence réplivative peut contribuer à l'altération des fonctions tissulaires est une

modification de l'expression protéique des cellules (comme une surexpression de la collagénase par les fibroblastes dermiques). Nous évoquerons dans les prochains paragraphes les différentes caractéristiques des cellules sénescentes.

IV-2-1 Phénotype sénescent

Bien que la caractéristique principale de la sénescence répliquative soit la perte de réponse aux stimuli mitogènes, le « phénotype sénescent » est aussi caractérisé par des altérations de leurs propriétés de croissance, de morphologie ainsi que d'un dérèglement général de processus hautement régulés. La morphologie des fibroblastes vers la fin de leur vie répliquative est principalement caractérisée par des cellules élargies avec une augmentation de la taille de leur noyau et de leurs nucléoles mais aussi une augmentation du nombre des lysosomes et des appareils de golgi. Il y a une apparition de vacuoles dans le cytoplasme et dans le réticulum endoplasmique et une augmentation des microfilaments cytoplasmiques. En plus de ces changements morphologiques, les populations de cellules sénescentes exhibent une augmentation du nombre de cellules multinuclées. Les fibroblastes sénescents expriment des niveaux élevés de protéases dégradants la matrice extracellulaire ainsi que le tissu activateur du plasminogène (t-PA) et les membres de la famille des métalloprotéinases matricielles (MMP). L'expression des inhibiteurs de protéases TIMP1 et MIG-5 décroît ainsi que l'expression de certains composants de la matrice extracellulaire tels que l'élastine, la laminine et quelques formes de collagènes (Cristofalo et coll., 2004). Il y a également apparition d'une délétion caractéristique de 4977 pb de l'ADN mitochondrial.

A chaque division cellulaire, il y a un raccourcissement télomérique qui n'aura pas d'incidence sur la cellule qui continuera donc à fonctionner normalement. Cependant, quand les chromosomes deviendront trop courts, les télomères enverront un signal d'arrêt de la prolifération cellulaire (Xu et coll, 2013).

IV-2-2 Morphologie cellulaire

Klaus Bayreuther a montré que les fibroblastes de peau humains maintenus en culture se différencient spontanément selon 7 stades appelés morphotypes. Au cours des doublements de population en culture, les fibroblastes progressent des morphotypes mitotiques (F I, F II et F III) vers les morphotypes post-mitotiques (PMF IV, PMF V, PMF VI et PMF VII) (figure 19). Les F I sont des petites cellules fusiformes et effilées ; les F II sont des petites cellules de formes irrégulières et les F III sont de plus larges cellules de forme épithélioïdes irrégulières.

Les F IV sont de grandes cellules fusiformes ; les F V sont arrondis et de très grande taille; les F VI sont les cellules les plus larges et les F VII présentent une morphologie caractéristique de cellules en dégénérescence qui se détachent de leur support (Bayreuther et coll., 1998).

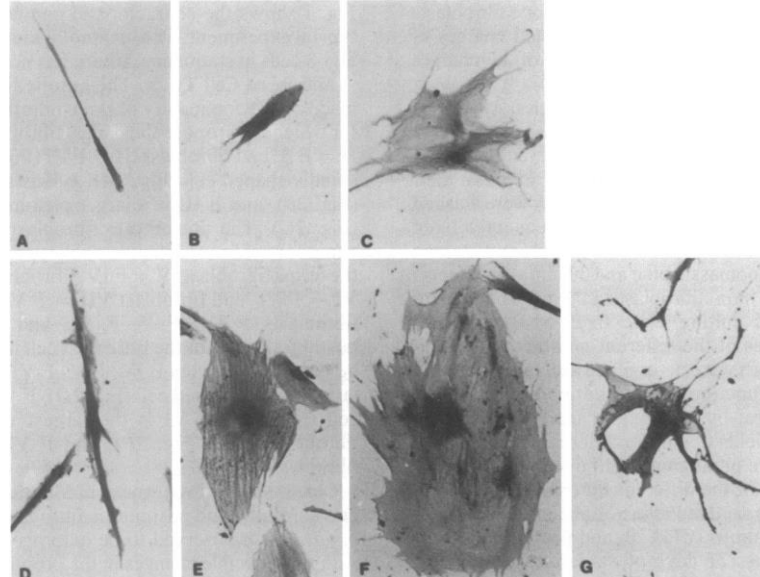


Figure 19: Morphotypes de fibroblastes. (A) F I. (B) F II. (C) F III. (D) F IV. (E) F V. (F) F VI. (G) F VII. (x 86.) (Bayreuther et coll., 1998)

Les MF I, MF II et MF III sont mitotiques tandis que les PMF IV, PMF V, PMF VI sont post-mitotiques.

IV-2-3 La SA β -gal (senescence associated beta-galactosidase)

La β -galactosidase est une enzyme lysosomale capable d'hydrolyser des β -galactosides en monosaccharides. Son activité optimale est observée à pH acide (pH 4,0 – 5,0), proche du pH lysosomal. La β -galactosidase peut cliver le substrat chromogénique 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -galactopyranoside (x-gal) et donner une coloration bleue aux cellules. En 1995 Dimri proposa l'existence de la senescence associated beta-galactosidase lorsqu'il observa que seules les cellules sénescents présentaient une coloration bleue à pH 6.0 lors du clivage de la X-Gal. Il proposa aussi que cette SA β -Gal était une enzyme distincte de la β gal lysosomale (Dimri et coll., 1995) (figure 20).

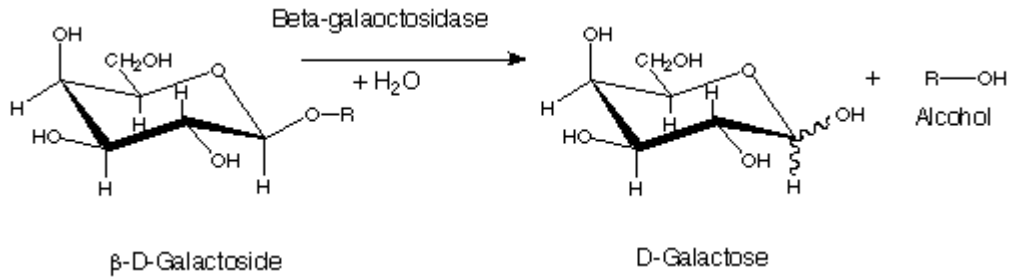


Figure 20: Action de la β -galactosidase sur un galactoside

La β -galactosidase est une hydrolase dont le rôle est d'hydrolyser des β -galactosides en monosaccharides.

Un article de Zang et Hu a montré 3 points importants au sujet de cette enzyme : la coloration SA β -Gal augmente avec l'âge réplcatif mais aussi dans les cellules quiescentes et les cellules privées de sérum. L'augmentation est irréversible en réponse à la sénescence ou au peroxyde d'hydrogène mais est complètement réversible sous d'autres conditions. Ils ont montré que la SA β -Gal n'est pas une enzyme spécifique mais l'enzyme lysosomale mesurée à pH suboptimal de 6,0 (Yang et coll., 2005).

IV-2-4 Délétion de l'ADN mitochondrial

Les mitochondries possèdent leur propre matériel génétique codé par un ADN circulaire double brin d'environ 16,5 kb. Au cours du vieillissement, des délétions, mutations ou modifications des nucléotides altèrent le génome mitochondrial. La délétion la plus commune est une délétion de 4,9 kb et il a été démontré que la fréquence d'apparition de cette délétion augmente lors du vieillissement de la peau *in vivo* (Pang et coll, 1994) (lee et coll, 1997).

IV-2-5 Les gènes associés à la sénescence

Plusieurs études différentes ont démontré que les fibroblastes en sénescence réplcatif présentent des modifications au niveau de l'expression de nombreux gènes. Ces études ont montré des modifications de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, la régulation du cycle cellulaire, le cytosquelette et dans le métabolisme (tableau 1). Suite à une étude basée sur la technique de l'hybridation soustractive, l'équipe de Gonos a mis en évidence des gènes dont l'expression est augmentée en sénescence réplcatif, comme par exemple l'apolipoprotéine J (apo J), la fibronectine, la protéine SM22 (Smooth Muscle 22), et l'ostéonectine (Gonos et coll, 1998). L'apo J est une protéine chaperonne qui est surexprimée

dans de nombreuses situations telles qu'un stress, une blessure ou pendant le développement. De plus, elle octroie une protection aux fibroblastes contre la sénescence induite prématurément par des stress sublétaux au t-BHP ou à l'éthanol (Dumont et al, 2002). Il est également bien établi que l'expression de certaines protéines matricielles est modifiée lors du vieillissement, par exemple, le collagène I diminue (Uitto, 2008) (Oikarinen, 1994) et une augmentation de certaines MMPs telle que la MMP-1 est également observée (Xia et coll, 2013).

Genes differentially expressed in old, pre-senescent BJ HDFs when compared to BJ HDFs at early PDs

Symbol	Gene name	O/Y	Function	GenBank
<i>Genes overexpressed in old BJ fibroblasts</i>				
MMP3	Matrix metalloproteinase 3	↑ 35.4	Degradation of extracellular matrix	NM_002422
MMP1	Matrix metalloproteinase 1	↑ 6.5	Degradation of extracellular matrix	NM_002421
IL6	Interleukin 6	↑ 4.5	Immune response	NM000600
IGFBP5	Insulin growth factor binding protein5	↑ 4.4	Signal transduction	M65062
PLAU	Urokinase	↑ 3.6	Regulation of cell-surface plasminogen activation	NM_002658
PAI2	Plasminogen activator inhibitor type2	↑ 3.2	Fibrinolysis; cell cycle	J02685
PKM2	pyruvate-kinase-muscle 2	↑ 3.1	Energetic metabolism	M26252
ANX1	Annexin1	↑ 3.1	Anti-inflammatory	NM_000700
CTGF	Connective tissue growth factor	↑ 3.0	Cell proliferation	U14750
CAV1	Caveolin-1	↑ 2.9	Signal transduction; endocytosis; potocytosis	NM_001753
S100A	S100 calcium binding protein A4	↑ 2.7	Cell cycle control	NM_002961
p21	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	↑ 2.5	Cell cycle control	U03106
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	↑ 2.5	Control of DNA replication	NM002592
FGF2	Fibroblast growth factor 2	↑ 2.3	Cell proliferation	NM_002006
CDC42	Cell division cycle42	↑ 2.2	Cell cycle	NM_001791
AOP2	Anti-oxidant-protein2	↑ 1.7	Defense system	NM_004905
<i>Genes not found expressed in young BJ fibroblasts</i>				
EGFR	Epidermal growth factor receptor	↑	Control of cell growth and differentiation	NM_005228
CATB	Catenin, beta 1	↑	Cell adhesion; transduction signal	NM_001904
SMAD2	SMAD2	↑	Signal transduction	U68018
IL1B	Interleukin1 beta	↑	Inflammatory and immune responses	M15330
<i>Genes underexpressed in old BJ fibroblasts</i>				
FES	Feline sarcoma oncogene	↓ 2.9	Cell proliferation	X52192
HMOX	Heme-oxygenase	↓ 2.6	Defense system	NM_002133
CCNF	CyclinF	↓ 2.4	Cell cycle control	NM_001761
APOJ	ApolipoproteinJ	↓ 2.4	Lipid metabolism	J02908
SPRR1B	Cornifin	↓ 2.2	Cell structure	NM_003125
MYBL2	b-myb	↓ 2.1	Cell cycle control	X13293
IGF1R	Insulin like growth factor 1 receptor	↓ 2.1	Cell proliferation; anti-apoptotic	NM_000875
E2F2	E2F transcription factor2	↓ 2.1	Cell cycle control; apoptosis	NM_004091
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor	↓ 2	Cell proliferation	NM_005211
BIN1	Bridging integrator 1	↓ 2	Cell cycle control; apoptosis	NM_004305
FGF8	Fibroblast growth factor 8	↓ 1.9	Cell proliferation	U36223
BAD	BCL2-antagonist of cell death	↓ 1.9	Pro-apoptotic	NM_004322
CASP3	Caspase3	↓ 1.9	Apoptosis	NM_004346
<i>Gene not found expressed in old BJ fibroblasts</i>				
ESR2	Estrogen receptor beta	↓	Cell-cell signalling	X99101

Tableau 1 : Comparaison de la différence d'expression de gènes d'intérêts de fibroblastes jeunes et âgés (De Magalhaes et coll, 2004)

IV-2-6 Raccourcissement des télomères

Dès 1971, le biologiste russe Olovnikov fit une proposition audacieuse qui se révéla prémonitoire. D'après lui, les molécules linéaires d'ADN ne peuvent pas être répliquées jusqu'au bout. À chaque réplication, elles perdent quelques bases. L'érosion des télomères est appelée télotomie. On peut comparer le chromosome à un sablier qui perdrait une partie de son contenu lors de chaque mitose. Quand tout le sable s'est écoulé, la cellule devient sénescence.

En 2009, le prix Nobel de Physiologie et médecine fut attribué aux Docteurs Blackburn, Greider and Szostak pour leur découverte de la protection des chromosomes par les télomères et la télomérase au cours de la réplication de l'ADN.

En bref, comme la machinerie de réplication de l'ADN nécessite un point d'attachement initial au brin d'ADN, de petits composés terminaux de l'ADN en cours de réplication ne peuvent pas être synthétisés au cours de la division cellulaire (Kovacic et coll, 2011). De ce fait, le matériel génétique serait perdu à chaque division cellulaire.

Les télomères sont des séquences nucléotidiques répétitives 5'-TTAGGG-3' aux extrémités des chromosomes. Ces longues étendues de séquences double brins d'ADN sont suivies par des répétitions simple brin riche en G (et dépourvu de C), encore appelé brins G, qui forment une extrémité simple brin 3' sortante dont la longueur est estimée de 130 à 210 bases chez l'Homme. Cette extrémité peut envahir la partie double brin pour former une structure en lasso appelée boucle-t (*t-loop*). L'extrémité 3' sortante est alors appariée avec le brin C et déplace le brin G en une boucle de déplacement (*D-loop*). Cette configuration particulière pourrait participer à la protection des extrémités chromosomiques en masquant la terminaison du télomère.

Un complexe de 6 protéines (TRF1 (Telomeric Repeat Binding Factor 1), TRF2 (Telomeric Repeat Binding Factor 2), POT1 (Protection Of Telomere 1), TIN2 (TRF1 Interacting factor 2), TPP1 (TriPeptidyl Peptidase 1) et RAP1 (Repressor Activator Protein 1) peut se lier à l'ADN télomérique double brin ou à l'extrémité 3' sortante simple brin forment le complexe télosome ou shelterin et fournit une protection de l'extrémité des chromosomes (figure 21). Le télosome intervient dans la formation de la boucle-t, dans la régulation de la longueur des télomères par la télomérase et dans la protection des extrémités télomériques contre les systèmes de signalisation et de réparation des dommages à l'ADN. Les fibroblastes humains perdent 50-100 pb à chaque raccourcissement télomérique.

Il a été suggéré que cette perte des répétitions télomériques est reconnue comme un dommage des doubles brins d'ADN et induit une réponse « check point ». Des études ont montrées qu'un *foci* de dommages à l'ADN apparait au niveau des télomères des cellules sénescents. Ce *foci* contient de nombreuses protéines de dommages à l'ADN telles que γ -H2AX, 53BP1, MDC1, NBS1, MRE11 et RAD17.

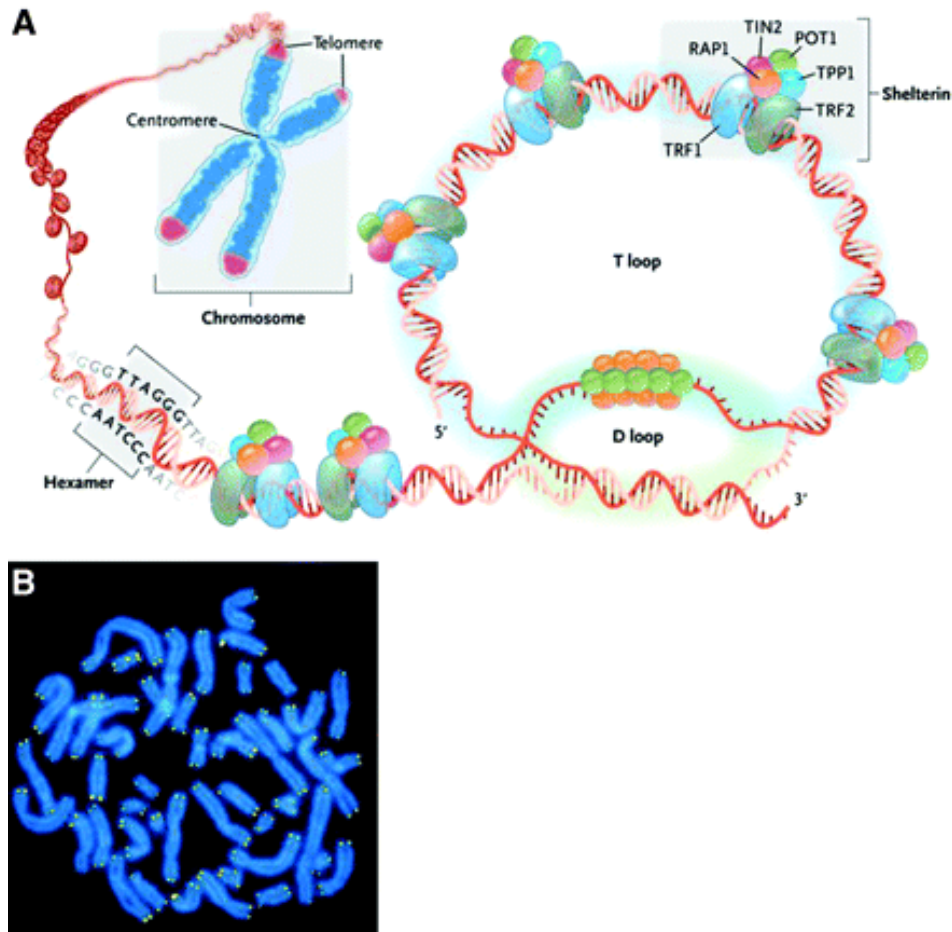


Figure 21: Structure des télomères et apparence microscopique (adapté de Young, 2010)

A : Les télomères sont situés à l'extrémité des chromosomes, ils sont composés de centaines de milliers de séquences d'ADN répétitives TTAGGG. Des protéines protectrices sont associées aux télomères (TRF1, TRF2, TIN2, POT1, TPP1, et RAP1). Les télomères de l'extrémité simple brin 3' envahissent l'hélice double brin formant alors la boucle t. **B** : les télomères peuvent être visualisés au microscope à la fin de la phase M en fluorescence grâce à la technique d'hybridation in situ.

IV-2-7 Arrêt irréversible du cycle cellulaire

L'une des cibles des voies de réparation des dommages à l'ADN est le facteur de transcription p53. C'est une protéine clé du processus de sénescence car elle fait le lien entre la voie de détection des dommages et les protéines de régulation du cycle cellulaire. Une fois

activé, p53 induit l'expression de l'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines p21^{WAF-1}. L'expression de p21^{WAF-1} a pour conséquence la capture et l'inhibition d'un autre facteur de transcription : E2F1. L'expression des gènes cibles d'E2F1 est nécessaire pour la progression des cellules en phase S du cycle cellulaire. Ainsi, l'inactivation d'E2F1 entraîne un arrêt des cellules au niveau de la transition G1-S, caractéristique des cellules sénescents (figure 22).

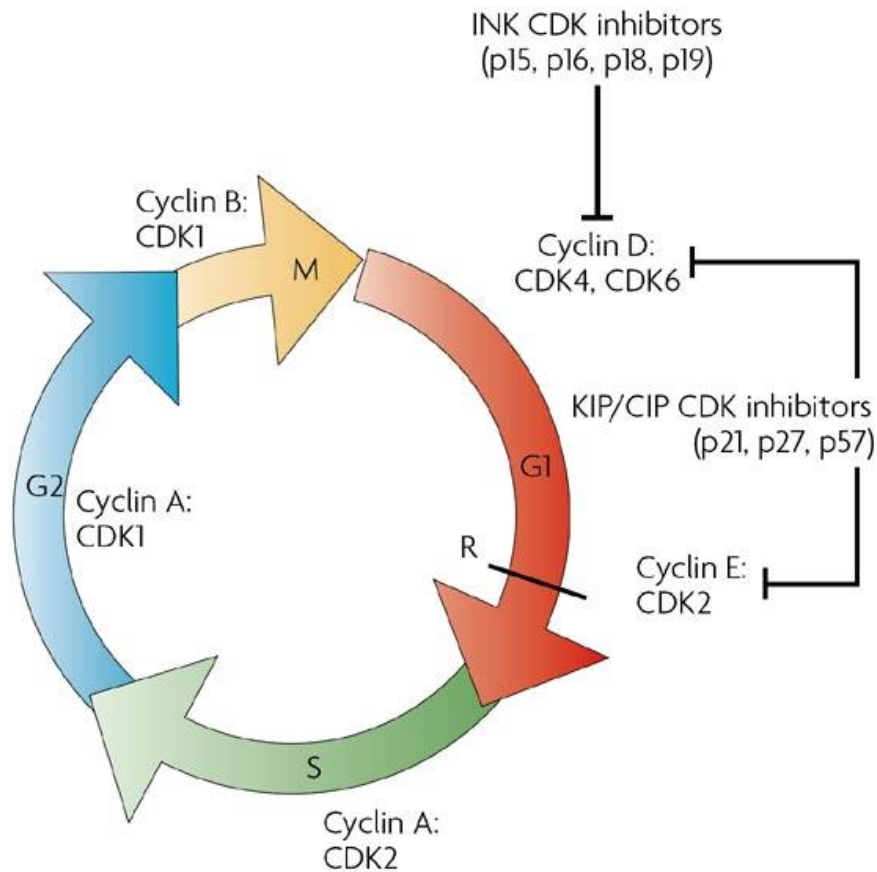


Figure 22: Cycle cellulaire et implication des CDKI (Dehay et Kennedy, 2007)

Le cycle cellulaire eucaryote comporte 4 phases successives : la phase M (mitose) dans laquelle le noyau et le cytoplasme se divisent ; la phase S (synthèse d'ADN) dans laquelle l'ADN nucléaire est répliqué ; la phase G1 impliquée dans le contrôle de l'intégrité de l'ADN avant de passer à sa réplication. Entre la phase S et M se situe la phase G2 dans laquelle la cellule vérifie la conformité de l'ADN répliqué avant de passer à la division cellulaire. La transition d'une phase à l'autre est sous le contrôle des complexes cyclines/CDK. L'activité des CDK est régulée par l'action de deux familles de protéines inhibitrices : la famille INK4 et la famille CIP/KIP.

IV-2-8 Voies de signalisations impliquées

La voie de signalisation induisant la sénescence commence donc par l'activation de la voie de dommages à l'ADN (figure 23).

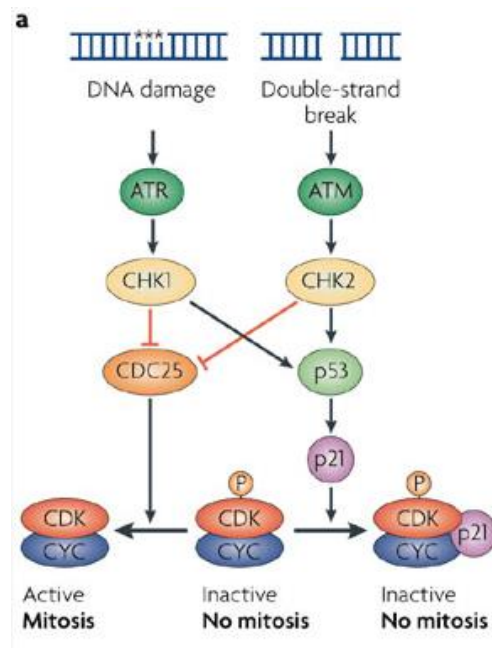


Figure 23: Voie de signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN (Nature, 2007)

La voie ATR-Chk1 répond principalement aux blocages des fourches de réplication et aux lésions produites par les rayons ultraviolets alors que la voie ATM-Chk2 répond aux cassures double-brin de l'ADN. Ces deux voies induisent un arrêt du cycle cellulaire via une inhibition des complexes cyclines/CDK, soit par activation de p53, soit par inhibition de cdc25.

3 protéines identiques au (phosphatidylinositol 3-kinase) sont connues comme étant les premières transductrices de signaux de dommages à l'ADN. La voie ATR-Chk1 répond principalement aux blocages des fourches de réplication et aux lésions produites par les rayons ultraviolets alors que la voie ATM-Chk2 répond aux cassures double-brin de l'ADN causées par les radiations ionisantes et le stress oxydatif (Herbig, 2004).

Ceci va induire une activation *via* la phosphorylation des protéines kinases Chk1 et Chk2 (cell cycle checkpoint kinase 1 et 2) qui vont activer la protéine p53, activant elle-même p21^{WAF-1}. Ces deux protéines sont appelées « suppresseurs de tumeurs » puisqu'elles participent au blocage du cycle cellulaire lorsque des dommages à l'ADN sont détectés. Une augmentation de la protéine p16^{INK-4a}, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, est également observée. Cependant, si p53 module de façon directe et positive l'expression de p21^{WAF-1}, il s'avère que le mécanisme qui régule p16^{INK-4a} n'est que partiellement élucidé. Des études ont montré que les ADN télomériques simples brins et riche en G induisent un arrêt du cycle dépendant de p53 qui devient stable si les cellules ne répondent pas par l'activation de la télomérase. Un arrêt transitoire est induit dans des cellules tumorales positives pour p53 mais négatives pour p16^{INK-4a}, laissant supposer que la première cible du signal de sénescence

répliquative est la voie p53/p21^{WAF-1} (Saretzki et coll, 1999) (figure 24). p21^{WAF-1} et p16^{INK-4a} participent ensuite à l'hypophosphorylation de Rb (protéine du rétinoblastome), qui va alors inhiber l'action du facteur de transcription E2F, et réprimer la transcription de gènes permettant la progression du cycle cellulaire comme les cyclines A, B et E. La progression du cycle cellulaire est donc bloquée. L'inhibition de E2F dans les cellules sénescentes est associée à des changements d'architecture chromatinienne caractérisés par des ponctuations multiples de l'ADN appelées SAHF (pour foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence). La formation de ces foyers dépend de l'état fonctionnel du gène *Rb*.

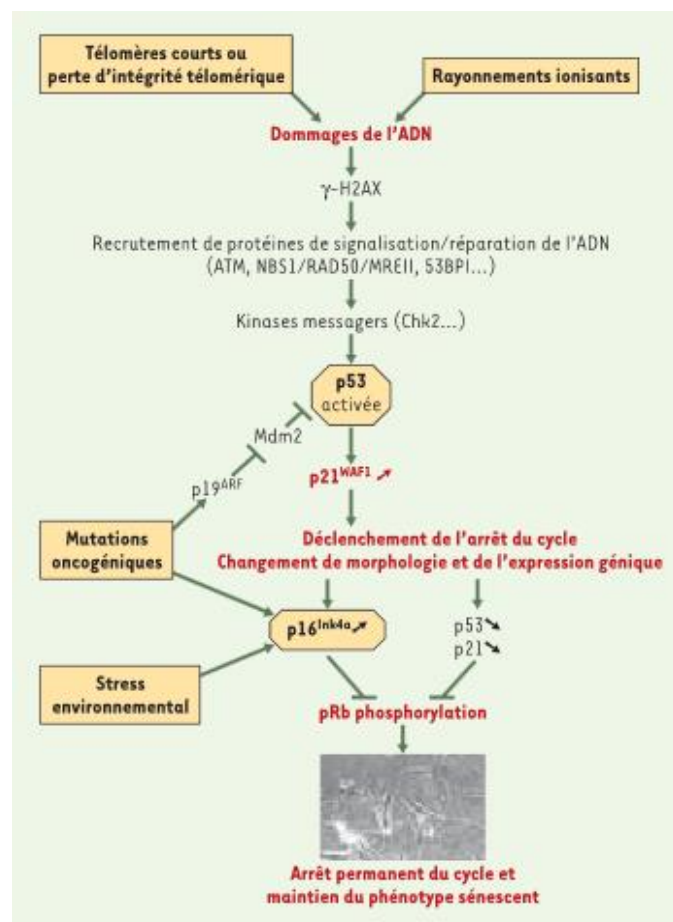


Figure 24: Mécanisme à la base de l'arrêt permanent du cycle cellulaire à la base de la sénescence (Gire,2005)

Divers stimulus peuvent activer un programme commun de sénescence. Le raccourcissement des télomères est le stimulus physiologique le mieux décrit dans l'induction de la sénescence. L'expression d'oncogènes activés peut également déclencher la sénescence et constituerait un mécanisme suppresseur de tumeur. Le programme effecteur de la sénescence comprend les voies p53/p21WAF1 et p16 INK4a/pRb. p53 serait activée par les kinases ATM/Chk2 (médiateurs des systèmes de réparation des dommages de l'ADN) ou par p19ARF (médiateur de la voie signalétique activée par ras oncogénique chez la souris). Le facteur p16INK4a serait activé par le stress imposé par des conditions inadéquates de culture et par une stimulation oncogénique dérégulée. Les mécanismes responsables de l'accumulation de p16INK4a sont encore méconnus.

D'autres études ont montré que lors du stress oxydatif, p16^{INK-4} était activée, probablement sous l'action de la protéine p38-MAPK, un membre de la famille des protéines kinases activées par le stress (Ben-Porath, 2005).

IV-2-9 Rôle de la sénescence dans le vieillissement

Comment le vieillissement des cellules peut-il jouer un rôle dans le vieillissement de l'organisme entier ? 2 voies sont possibles :

- l'accumulation de cellules sénescents, qui ne peuvent donc plus se diviser, induit une diminution du renouvellement cellulaire de l'organisme, et par conséquent du renouvellement tissulaire.
- les cellules sénescents présentent une augmentation de la sécrétion des MMPs, de cytokines inflammatoires ainsi que de certains facteurs de croissance, provoquant alors des inflammations locales, des ruptures de tissus et des environnements plus propices à la croissance néoplasique.

Ces deux phénomènes provoquent un déclin des fonctions tissulaires et participent ainsi au vieillissement de l'organisme entier (figure 25)

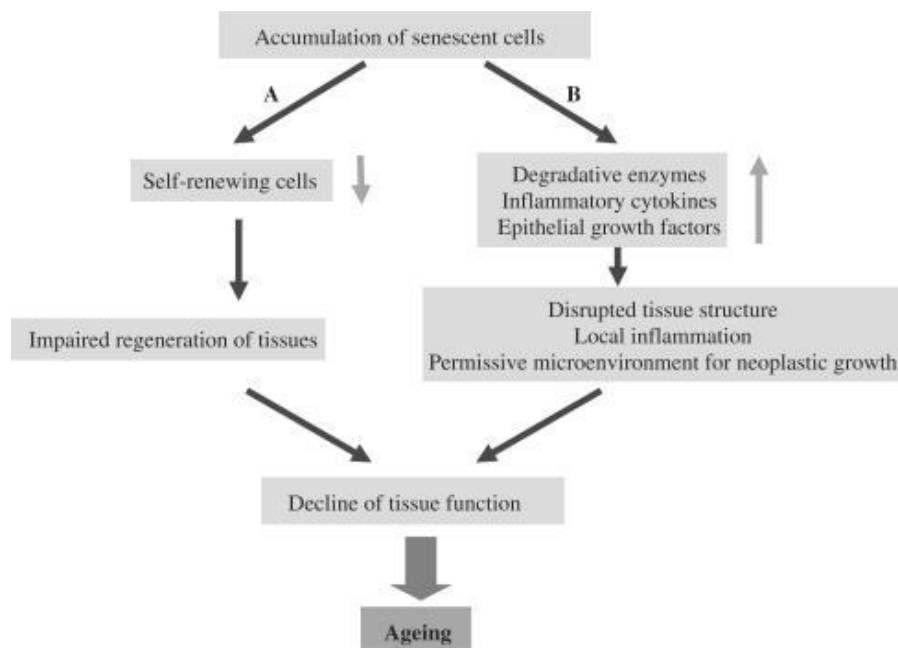


Figure 25: Les 2 voies possibles par lesquelles les cellules sénescents pourraient contribuer au processus de vieillissement (Chen et coll., 2007).

A : la sénescence réduirait l'auto-renouvellement cellulaire, causant une régénération imparfaite des tissus. **B** : la sénescence cellulaire pourrait induire des structures tissulaires dégradées, des inflammations locales et un micro-environnement permissif à la croissance néoplasique à travers la sécrétion d'enzymes de dégradation, de cytokines inflammatoires et de facteurs de croissance. Ces deux voies compromettent l'homéostasie des tissus ainsi que leurs fonctions menant alors au processus de vieillissement.

IV-3 La sénescence accélérée induite par le stress

Ce processus, contraste avec l'induction de la sénescence au cours des divisions cellulaires ; ce processus est désigné par le terme de sénescence prématurée induite par le *stress* (SIPS). Le fait que les différents types de stress soient potentiellement tumorigènes a fait naître l'idée que la sénescence est un mécanisme majeur d'inhibition de la prolifération dans des cellules normales exposées à un risque de transformation (Bischof et coll., 2009). La surexpression d'oncogènes, comme les formes activées de RAS ou RAF, peut induire un arrêt du cycle similaire à celui observé lors de la sénescence dans des cellules primaires humaines et murines. Ce mécanisme est dépendant de la protéine p16^{INK-4a}. La modification de la chromatine vers une structure plus condensée, en inhibant les histones désacétylases, induit également un phénotype identique à la sénescence. Certains stress causant des dommages à l'ADN provoquent des arrêts de croissance cellulaire: divers types de radiations, des médicaments induisant des cassures de l'ADN double brin et différentes voies générant des stress oxydatifs comme un traitement au peroxyde d'hydrogène (Fripiat et coll., 2001) ou au butylhydroperoxyde (t-BHP). Cela prouve que l'arrêt de prolifération peut être induit presque immédiatement par un stress intense ou plus lentement par des traitements chroniques ou semi-chroniques.

IV-3-1 stress aigu subléthal : sénescence accélérée induite par le stress oxydatif

D'un point de vue expérimental, ce stress est celui qui est le plus utilisé pour induire une « sénescence accélérée induite par le stress ». En effet un stress oxydatif subléthal induit une sénescence prématurée dans de nombreux types cellulaires aussi bien par traitement chronique que par traitement unique avec des doses hyperoxiques. Parmi les autres stress aigus on retrouve les traitements avec des doses sublétales d'éthanol, de t-BHP, ou l'exposition à des doses sublétales d'UVB. Cela réduit considérablement le taux de croissance, qui est lui-même dépendant des capacités antioxydantes de la cellule traitée (Toussaint et coll., 2000). La plupart des biomarqueurs de la sénescence répliquative apparaissent dans ces conditions comme : une morphologie identique à la sénescence, une absence de réponse aux stimuli mitogéniques, une augmentation des proportions de cellules positives pour la SA β -gal et bien sûr un arrêt irréversible du cycle cellulaire

IV-3-1-1 Voies de signalisation impliquées dans la sénescence accélérée induite par H_2O_2

Comme cité précédemment, le stress oxydatif, en plus d'activer la voie p53 et p21^{WAF-1} « classique », va activer également p16^{INK-4}, probablement sous l'action de la protéine p38-MAPK (figure 26).

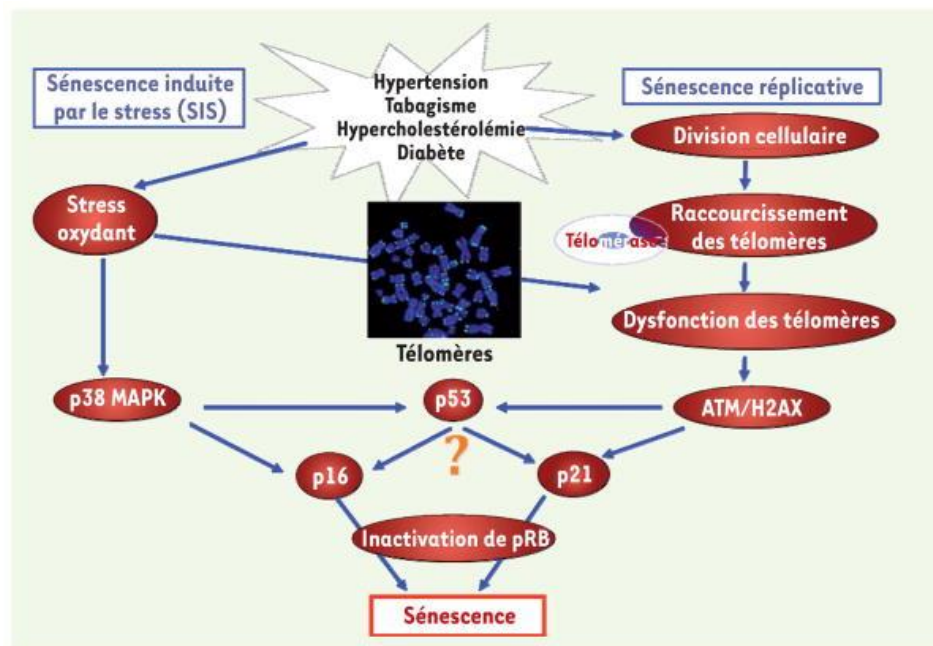


Figure 26: Activation de la sénescence par divers stimuli (Thorin-Trescases et coll, 2010)

La sénescence peut survenir selon deux voies majeures, la sénescence répliquative et la sénescence induite par le stress (SIPS). La sénescence répliquative conduit à l'érosion progressive des télomères jusqu'à un seuil critique où les télomères deviennent dysfonctionnels. Ceci active des protéines telles qu'ATM qui induit la phosphorylation de H2AX, un marqueur de dommage à l'ADN. De nombreuses protéines sont alors activées pour propager ce signal de dommage, dont p53, une protéine dite suppresseur de tumeurs. Celle-ci joue un rôle clé en activant p21, une protéine inhibitrice du cycle cellulaire qui empêche la phosphorylation de Rb et bloque ainsi la prolifération cellulaire. La sénescence induite par le stress, découle, entre autres, de l'activation de la voie p53-pRb. Un autre inhibiteur de cycline, p16, serait un intermédiaire potentiel. Ces différentes voies peuvent se croiser, puisque le stress oxydant peut directement endommager les télomères, et varier selon les types cellulaires. MAPK : mitogen activated protein kinase ; ATM : ataxia telangiectasia muté ; H2AX : histone de type H2AX ; pRb : protéine rétinoblastome phosphorylée.

Une surexpression de p21^{WAF-1} est observée après traitement à des doses subtoxiques déjà définies de peroxyde d'hydrogène. p21^{WAF-1} inhibe l'activité du complexe cycline D/kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (cdk 4 et 6) menant à l'hypophosphorylation de Rb. La protéine p53 augmente juste après le stress, puis revient à son niveau de base.

Le niveau de phosphorylation de la protéine de rétinoblastome (Rb) dépend de l'activité kinase des complexes cyclines/CDK. Rb doit être hyperphosphorylée pour que les cellules puissent entrer en phase S du cycle cellulaire. Les cellules sénescents stimulées avec des facteurs de croissances ne présenteront pas de phosphorylation de Rb. Un très faible niveau de phosphorylation de Rb est observé pendant plusieurs semaines suivant le traitement au peroxyde d'hydrogène. Une étude a montré que Cdk2 diminuait, tant au niveau protéique que génique, 72h après l'induction du stress par H₂O₂, ce qui suggère que l'hypophosphorylation de Rb est aussi partiellement dûe à la diminution de cette kinase et que cet effet médié par Cdk2 doit être un mécanisme additionnel à l'inhibition du complexe cycline D/ Cdk4 et 6 médié par p21^{WAF-1} (Fripiat et coll., 2003). Les fibroblastes traités au peroxyde d'hydrogène sont bloqués principalement en phase G1 du cycle cellulaire (comme les cellules sénescents). Au niveau des fibroblastes sénescents, le niveau de p21^{WAF-1} retourne à la normale tandis que la quantité de la CDKI p16^{INK-4a} est durablement élevée, tant au niveau génique que protéique (Kiyono et coll., 1998).

Les facteurs de croissances induisent la transcription de l'ARNm de *c-fos* dans des fibroblastes humains quiescents alors que cette induction disparaît dans les fibroblastes sénescents. Après activation, le facteur de transcription AP-1 induit la transcription de gènes nécessaires pour entrer en phase S. Les fibroblastes traités au peroxyde d'hydrogène présentent un faible niveau génique de *c-fos* comparé à des cellules non traitées. Ce faible niveau de *c-fos* participe à l'arrêt irréversible du cycle cellulaire.

IV-3-1-2 Expression des gènes associés à la sénescence par les fibroblastes dermiques humains traités avec H₂O₂

De nombreux gènes relatifs à la sénescence sont surexprimés 3 jours après le traitement au peroxyde d'hydrogène. Plusieurs études différentes ont démontré que les fibroblastes en sénescence accélérée présentent des modifications au niveau de l'expression de nombreux gènes. La MMP-1 et la SM22 sont surexprimées aussi bien au cours de la sénescence répliquative que lors de la sénescence induite par H₂O₂. L'interferon-gamma (IFN- γ) est connu pour être impliqué dans la régulation de gènes spécifiques de la sénescence et est aussi surexprimé. L'expression d'autres gènes associés à la sénescence (comme la diminution du collagène I et la surexpression de la stanniocalcine) est modifiée de manière identique lors de la sénescence répliquative et de l'induction de la sénescence par traitement avec H₂O₂ (Saretzki et coll., 1998). De plus l'expression génique de régulateurs clés du cycle cellulaire

est modifiée lors d'un traitement avec H₂O₂ : une augmentation génique des p21^{WAF-1} et p16^{INK-4a} est observée (comme expliqué dans le paragraphe ci-dessus) et une diminution de p27^{KIP-1} et de p19^{INK-4D} (Frippiat et coll, 2000). L'expression de nombreux autres gènes est modifiée lors de la sénescence prématurée induite par H₂O₂ (tableau 2).

Genes differentially expressed in BJ HDFs in H ₂ O ₂ -induced SIPS		
Gene	Name	S/C
<i>Genes overexpressed in H₂O₂-induced SIPS</i>		
MMP3	Matrix metalloproteinase 3	↑ 4.5
CTGF	Connective tissue growth factor	↑ 2.7
BAX	BCL2-associated X protein	↑ 2.4
EGR1	Early growth response1	↑ 2.4
FGF2	Fibroblast growth factor 2	↑ 2.3
P21	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	↑ 2.1
ODC	Ornithine decarboxylase 1	↑ 1.6
CANX	Calnexin	↑ 1.6
IGFBP5	Insulin growth factor binding protein5	↑ 1.6
<i>Genes not found expressed in non-stressed BJ fibroblasts</i>		
CATB	Catenin, beta 1	↑
CASP9	Caspase9	↑
IL1B	Interleukin1 beta	↑
CASP2	Caspase2	↑
MDM2	MDM2	↑
<i>Genes underexpressed in H₂O₂-induced SIPS</i>		
AOP2	Anti-oxidant-protein2	↓ 2.6
TFAP2A	Transcription factor AP2-alpha	↓ 1.8
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor2	↓ 1.7
VEGFR3	Vascular endothelial growth factor receptor3	↓ 1.6
GADD153	DNA damage inducible transcript3	↓ 1.6
PAI1	Plasminogen activator inhibitor type1	↓ 1.6
IGF1R	Insulin like growth factor 1 receptor	↓ 1.5

Tableau 2: Modification de l'expression de gènes lors de la sénescence prématurée induite par H₂O₂ (Magalhaes et coll, 2004)

IV-3-2 Stress chronique sublétale: sénescence accélérée induite par le stress au NaCl

Parmi les stress chroniques induisant la sénescence prématurée des fibroblastes dermiques, on retrouve un traitement avec 40% d'O₂ (hyperoxie sublétale) (Von Zglinicki et coll, 1995) ou avec de fortes concentrations en NaCl. En effet, des études ont montré que de

fortes concentrations en NaCl provoquaient des cassures de l'ADN des cellules médullaires de souris, induisant alors la sénescence par induction de la voie de réparation des dommages à l'ADN (Dmitrieva et coll, 2003).

B. But de l'étude

Le vieillissement cutané est généralement associé à un épaissement des membranes basales. Des études préliminaires réalisées par Vazquez et collaborateurs (1996) mettent en évidence une augmentation d'épaisseur de la membrane basale épithéliale chez des sujets âgés de plus de 35 ans alors que le collagène IV tend à décroître dans les mêmes conditions.

Les objectifs de cette étude sont :

- de rechercher si le vieillissement cutané s'accompagne effectivement de la diminution du collagène IV, en caractérisant le niveau d'expression de ses chaînes polypeptidiques constitutives.
- d'isoler les fibroblastes à partir de biopsies de peau provenant de sujets jeunes ou âgés et examiner la part de ce type cellulaire dans la production des diverses chaînes polypeptidiques constitutives du collagène IV au cours du vieillissement.
- de déterminer si la diminution d'expression au cours du vieillissement chronologique résulte d'une inhibition d'expression des gènes codant pour les chaînes α (IV).
- De déterminer le mécanisme impliqué et sa régulation possible afin de proposer, à terme, de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de restaurer l'intégrité de la membrane basale.

C. Matériel et Méthodes

I. Matériels et réactifs utilisés

L'ensemble du matériel et des réactifs utilisés lors des différentes expériences, ainsi que leur provenance, est répertorié dans les tableaux ci-dessous (liste alphabétique).

Matériel	Utilisation	Fournisseurs
Appareil 2100 Bioanalyseur	Puces à ARN	Agilent technologies
Appareil Chemidoc	Western-blot (Révélation)	Bio-Rad
Appareil de comptage cellulaire	Mesure de viabilité cellulaire	Invitrogen
Appareil photo	Acquisition d'images	Canon
Appareil stratagene Mx300SP	PCR temps réel	Agilent technologies
Capillaires LightCycler®	PCR temps réel	Roche
Cellulose DE52 - papier absorbant	Western-blot (transfert)	Whatman
Centrifugeuse 5810 R	centrifugation	Eppendorf
Centrifugeuse 5415 R	centrifugation	Eppendorf
Concentrateurs de milieux-vivaspin	Concentration protéique	Sartorius
Countess	Compteur de cellules	Invitrogen
Cuve Mini-PROTEAN II	Electrophorèse	Bio-Rad
Filtres à usage unique 0,2 µM	Filtration	D. Dutscher
Flacons de culture 25 cm ²	Culture cellulaire	Falcon
Flacons de culture 75 cm ²	Culture cellulaire	Falcon
Hotte à flux laminaire MS 12	Culture cellulaire	Jouan
Incubateur	Culture cellulaire	Jouan
Lames de verre ®- Superfrost	immunomarquages	Thermo scientific
Lamelles de verre ronde 12 mm	Culture cellulaire	VWR
Lecteur de microplaques UVM 340	Spectrophotométrie	Asys
Logiciel d'analyse ImageJ	Traitement des données	Wayne Rasband
Logiciel d'analyse image lab	Traitement des données	Bio-Rad
Logiciel d'analyse MxPro	Traitement des données	Agilent technologies
Logiciel 2100 Expert	Traitement des données	Agilent technologies

C. Matériels et Méthodes

Membrane Immobilon-P TM	Western-blot (transfert)	Millipore
Microscope confocal	Microscopie	Leica
Milieu de montage	Microscopie	Invitrogen
Milieu de montage Ultramount	Microscopie	Dako
pH-mètre	Préparation de solutions	Radiometer
Plaques de culture 6 puits	Culture cellulaire	Falcon
Puces ARN	Vérification intégrité des ARN	Agilent technologies
Thermocycleur	PCR	Eppendorf
Thermocycleur LightCycler®	PCR temps réel	Roche
Transblot	Western-blot (transfert)	Bio-Rad
Support puce ARN	Puces à ARN	Agilent technologies

Réactifs	Fournisseurs
Acétone	Prolabo
Acide acétique	Prolabo
Acide chlorhydrique	Prolabo
Acrylamide	Euromedex
Agarose	Euromedex
Anticorps bloquant anti-TGF- β	Fisher
APS (persulfate d'ammonium)	Euromedex
BET (bromure d'ethidium)	Euromedex
Béta-mercaptoéthanol	Sigma-Aldrich
Biorad Protein Assay Kit	Bio-Rad
Bleu de Coomassie G250 et R250	Sigma-Aldrich
Bleu trypan	Sigma-Aldrich
Blotto	Bio-Rad
Colorant Violet cristal	Sigma-Aldrich
CTGF (connective tissue growth factor)	Sigma-Aldrich
DEPC (diéthyl pyrocarbonate)	Sigma-Aldrich
DTT (dithiothréitol)	Merck
DMSO (diméthylsulfoxyde)	Sigma-Aldrich

C. Matériels et Méthodes

EDTA (Acide éthylène diamino-tétraacétique)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Prolabo
Glycérol	Sigma-Aldrich
Glycine	Euromedex
Glutaraldéhyde	Sigma-Aldrich
HEPES	Merck
IL-1 β (interleukine-1 β)	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Prolabo
Kit ECL prime	Amersham
Kit de détection de la sénescence	Sigma-Aldrich
Kit ELISA anti-collagène IV	Euromedex
Kit ELISA anti-TGF- β	Promega
Réactifs	Fournisseurs
Kit LSAB+ System-HRP	Dako
Méthanol	Prolabo
Maxima first strand DNA synthesis	Thermo scientific
Maxima sybr green/ROX qPCR Master Mix	Thermo scientific
MgCl ₂	Merck
NaCl	Euromedex
NaOH	Prolabo
Na ₃ VO ₄ (orthovanadate de sodium)	Sigma-Aldrich
Milieu de culture : DMEM 1g/L de glucose	Invitrogen
Milieu de culture : HBSS	Invitrogen
Milieu d'enrobage pour coupes congelées NEG 50	Thermo Scientific
Penicilline/streptomycine	Invitrogen
Pepsine	Invitrogen
Peroxyde d'hydrogène	Sigma-Aldrich
SAB (sérum albumine bovine)	Euromedex
SDS (Sodium Dodécyl sulfate)	Euromedex
SVF (sérum de veau fœtal)	Invitrogen
Standard de masse moléculaire de protéines	Fermentas
SYBR® Premix Ex Taq™	Takara Bio Inc

C. Matériels et Méthodes

Tampon de lyse RIPA (radioimmunoprecipitation assay)	Sigma-Aldrich
TEMED (tétraméthyl-éthylène-diamine)	Sigma-Aldrich
TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1)	Sigma-Aldrich
TGF- β signaling phospho-specific antibody array	Euromedex
Tri-reagent	Euromedex
Tris (tris-(hydroxyméthyl))-aminométhane	Euromedex
Trypsine-EDTA	Invitrogen
Tween-20	Sigma-Aldrich

Gène à amplifier	Amorce sens (5' \rightarrow 3')	Amorce antisens (5' \rightarrow 3')
α 1(IV) humaine	TAGAGAGGAGCGAGATGTTC	GTGACATTAGCTGAGTCAG G
α 2(IV) humaine	GGGTTACCCTGGCTTGAGTG	AGGCCCTTGATAGCCATCC
α 5(IV) humaine	TAAAAGAGCCCACGGTCAAG	AATGAATGGCTGGATGCTCT
α 6(IV) humaine	GGCACAAAGGATTTCTTGGA	GATTTGCCCTTGATGCCATA
α 1(IV) murine	GGTGAAAGGGGAGAAAAAGG	ACCTGTCAAACCTGGCTGTC
α 2(IV) murine	CTTACTGGGGACTTTGGTGA	CGTTATCCCAGGAAATCCAA
α 5(IV) murine	CCAAAAGGTGATCGTGGTTT	TCCCTGAAGACCAATTCCTG
α 6(IV) murine	GCTGCCTGGACTAGATGGAA	TAAGCCTGGTGGTCCTATGG
GAPDH humaine	ACGGATTTGGTCGTATTGGG	TGATTTTGGAGGGATCTCGC
RPS29 murin	AAGATGGGTCAACCAGCTCTAC TG	AGACGCGGCAAGAGCGGGA A
MMP-1 humaine	TGGCATTTCAGTCCCTCTATGG	AGGACAAAGCAGGATCACA GTT
Fibronectine humaine	ACCTACGGATGACTCGTGCTTTG A	CAAAGCCTAAGCACTGGCA CAACA
Apoprotéine j	GGATGAAGGACCAGTGTGACAA	CAGCGACCTGGAGGGATT

C. Matériels et Méthodes

humaine	G	
Ostéonectine humaine	GAGACCTGTGACCTGGACAATG	GGAAGGAGTGGATTTAGAT CACAAGA
SM22 humaine	CGTGGAGATCCCAACTGGTT	AAGGCCAATGACATGCTTTC C
p21 ^{WAF-1} humaine	CTGGAGACTCTCAGGGTCGAA	CCAGGACTGCAGGCTTCCT
p53 humaine	AAGAAACCACTGGATGGAGAA	CAGCTCTCGGAACATCTCGA A
TGF- β 1 humain	GCGTGCTAATGGTGGAAAC	CGGTGACATCAAAAGATAA CCAC
TGF- β RII humain	GTCTACTCCATGGCTCTGGT	ATCTGGATGCCCTGGTGGTT

Anticorps primaire	Spécificité	Origine	Dilution
COL4A (COL-94) : sc-59814 (Santa Cruz)	Collagène de type IV humain non dénaturé	Souris	1/100
Rabbit anti humain collagen type IV : MD-22-0011 (RayBiotech)	Collagène de type IV humain	lapin	1/5000
COL4A1/3 (G-20) : sc-9301 (Santa Cruz)	Chaînes α 1 et α 3 du collagène de type IV humain et murin	Chèvre	1/200
COL4A2 (C-17) : sc-70243 (Santa Cruz)	Chaîne α 1 du collagène de type IV humain	Lapin	1/200
Collagène IV clone CIV22 (DAKO)	Collagène de type IV humain de mammifères	Souris	1/200 ou 1/50 (immunocytochimie ; Immunohistochimie)
Anticorps bloquant anti-TGF- β 1 (TB21) (thermo scientific)	TGF- β 1 humain	Souris	10 μ g/mL

Anticorps secondaire couplé à la peroxydase	Spécificité	dilution
Anticorps de souris (SIGMA)	Anti-IgG de chèvre	1/10000
Anticorps de singe (GE healthcare)	Anti-IgG de lapin	1/10000
Anticorps de mouton (GE Healthcare)	Anti-IgG de souris	1/10000
Alexa fluor 488 (DAKO)	Anti-IgG de souris	1/200

II. Méthodes

II-1 Isolement et culture cellulaire

Les cellules étudiées sont des fibroblastes dermiques extraits de prépuces ou de fragments de seins « sains ». Ces biopsies, sont obtenues auprès du service de Chirurgie pédiatrique de l'American Memorial Hospital (Reims) (prélèvements de prépuces pour les patients de 1 à 10 ans) et du laboratoire d'anatomie et de cytologie pathologiques de l'Institut Jean Godinot (Reims) (prélèvements de fragments de seins pour les patients de 37 à 89 ans) respectivement.

Les fragments de peau sont tout d'abord dégraissés avant d'être coupés en très petits morceaux placés dans un flacon de culture ventilé de 25 cm² où nous les laissons sécher quelques minutes afin de faciliter l'adhésion au support de culture avant de rajouter du milieu DMEM supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal et de 1% de pénicilline 10000 U/mL streptomycine 100 µg/mL. Le milieu est changé deux fois par semaine. Les fibroblastes migrent à partir des explants et se multiplient jusqu'à confluence. Ils sont incubés à 37°C en atmosphère contrôlée contenant 5% de CO₂ et détachés à confluence avec une solution de PBS contenant 0,25% de trypsine, et utilisés avant le 5^{ème} passage.

II-2 Immunohistochimie

Les fragments de peau collectés sont rincés à la PBS puis dégraissés avant d'être coupés en morceaux d'environ 5 mm de diamètre et congelés à -80°C.

II-2-1 Coupes congelées

Les fragments de peau sont déposés dans du milieu d'enrobage pour coupes congelées et nous réalisons alors des coupes de 5 µm d'épaisseur, à l'aide d'un cryostat, que nous déposons sur lames SuperFrost®. Ces lames sont ensuite lavées deux fois dans de l'eau distillée pendant 5 minutes puis 2 fois 10 minutes dans la PBS avant d'être incubées avec l'anticorps primaire anti-collagène IV (DAKO) dilué au 1/200^{ème} pendant 45 minutes en chambre humide à température ambiante. Elles sont ensuite rincées 10 minutes à la PBS sous agitation puis incubées 10 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor 488 dilué au 1/200^{ème} dans de la PBS avant d'être rincées 10 minutes avec de la PBS puis 10

minutes avec de l'H₂O distillée et les noyaux sont ensuite contre colorés avec du DAPI. Des lames ont été préparées sans l'étape d'incubation avec l'anticorps primaire et d'autre sans l'étape d'incubation avec l'anticorps secondaire comme témoins négatifs. La fluorescence est observée au microscope confocal.

II-2-2 Coupes de peaux incluses en paraffine

Nous avons travaillé à partir de coupes de peau incluses en paraffine fournies par le Dr Patricia ROUSSELLE et le Dr Odile DAMOUR de l'institut de biologie et de chimie des protéines de Lyon. Pour ces marquages nous avons utilisé le kit LSAB+ System-HRP.

La première étape, le déparaffinage, consiste en 3 traitements de 5 minutes dans du méthylcyclohexane, puis 2 fois 5 minutes dans l'alcool à 100° suivis de 5 minutes dans l'alcool 95° et 5 minutes 70°. Les lames sont ensuite rincées d'abord 10 minutes à l'eau distillée puis 10 minutes à la PBS. La seconde étape dite « de démasquage » consiste à traiter les lames 30 minutes au bain marie bouillant avec du tampon citrate 0,007 mol, pH 7,3. Puis après un rinçage de 5 minutes à la PBS les lames sont placées 10 minutes à 37°C dans de la pepsine 0,4% dans l'HCl 0,2N puis de nouveau rincées 5 minutes à la PBS. La troisième étape consiste en l'inhibition des peroxydases endogènes par traitement avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 5 minutes avant de rincer à l'eau distillée.

L'étape suivante est le blocage des sites antigéniques non spécifiques en déposant sur les lames une solution de PBS à 5% de BSA, 30 minutes à température ambiante, en chambre humide. Les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire anti-collagène IV dilué au 1/50 pendant 1h en chambre humide à température ambiante. Après un rinçage de 10 min à la PBS, une goutte de réactif de biotinylation (Dako) est déposée pendant 45 minutes à température ambiante avant de rincer de nouveau 10 minutes à la PBS. Une goutte de réactif streptavidine couplé à l'HRP (Dako) est ensuite ajoutée pendant 45 minutes à température ambiante avant de rincer encore 10 minutes à la PBS. La révélation se fait ensuite par ajout sur les lames d'une goutte constituée de 50% de tampon et 50% de chromogène pendant 30 secondes. Les lames sont ensuite rincées 2 fois 5 minutes à l'eau distillée. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage avant d'être analysées au microscope.

II-3 Spectroscopie Raman sur coupes transversales de peau

II-3-1 Principe

La spectrométrie Raman repose sur le principe de la diffusion inélastique de la lumière par un milieu. En effet, lorsqu'on soumet un échantillon à une source excitatrice monochromatique de type laser, la majeure partie des photons incidents n'interagit pas avec le milieu et la lumière diffusée possède alors la même fréquence que la lumière incidente (diffusion élastique). Quelques photons incidents échangent cependant de l'énergie avec le milieu, ce qui engendre un changement de fréquence d'une partie de la lumière diffusée par rapport à celle incidente (diffusion inélastique) (figure 27).

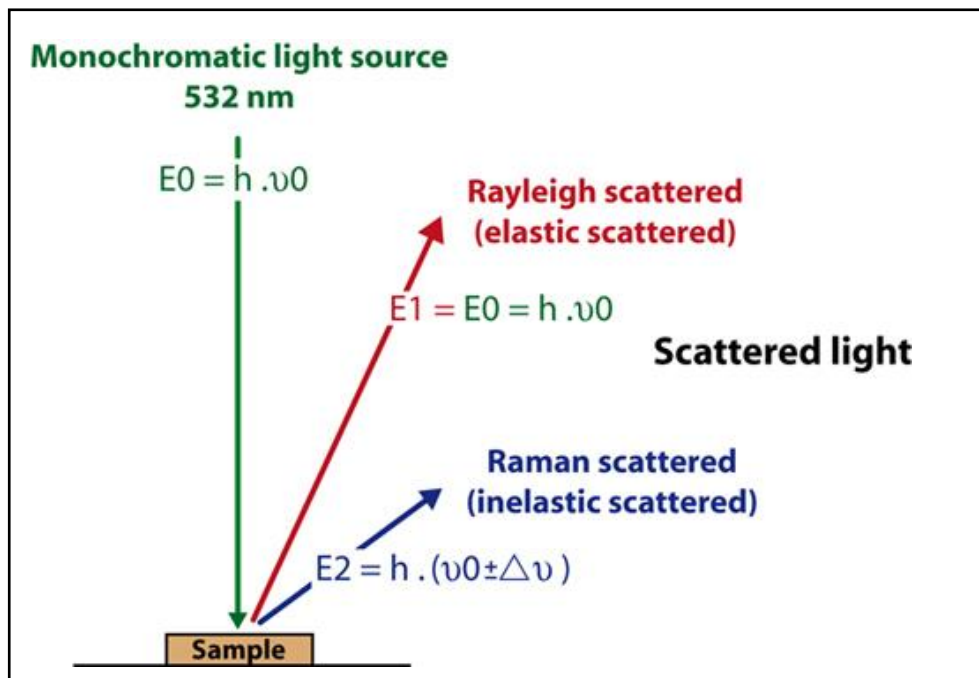


Figure 27 : Schéma de diffusion de la lumière

Lorsque le faisceau lumineux monochromatique entre en interaction avec un échantillon, la majorité des photons est diffusée élastiquement (même fréquence, même longueur d'onde) que les photons incidents (diffusion de Rayleigh ou diffusion élastique). Une petite fraction de photon sont diffusés à des énergies différentes que les photons incidents (diffusion Raman ou diffusion inélastique).

La mesure de l'intensité du rayonnement diffusé conduit à un spectre qui correspond à l'empreinte structurale du composé étudié, sur lequel la fréquence des bandes est reliée aux énergies de vibration des liaisons atomiques de la matière éclairée. Le spectre obtenu représente l'intensité de la diffusion Raman (axe des ordonnées) en fonction de la différence

de fréquence entre celle de la raie excitatrice et celles des raies de diffusion (axe des abscisses exprimée en cm^{-1}).

II-3-2 Analyse

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Olivier PIOT et The Thuong NGUYEN (Equipe « Biophotonique et Technologies pour la Santé », FRE CNRS/URCA 3481 MEDyC). Les données Raman ont été collectées avec un microspectromètre LabRAM (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France), équipé d'un détecteur CCD, et utilisant une diode laser de 660 nm comme source d'excitation. Un objectif x100 a permis de focaliser le rayon laser incident et de collecter la dispersion Raman. La résolution spectrale est de 4 cm^{-1} . Des coupes de peau de $5 \mu\text{m}$, issues de fragments de seins de 3 patients d'âges différents, sont déposées sur fenêtres de CaF_2 (Crystran Ltd., Dorset, UK) et analysées en mode image. Pour une coupe, 6 zones de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ autour de la JDE sont scannées point par point en utilisant un pas de $0,5 \mu\text{m}$.

II-4 Obtention des différents modèles de vieillissement

II-4-1 Modèle murin

II-4-1-1 Vieillesse naturelle

Nous avons isolé des fibroblastes de souris jeunes (7 semaines) et de souris âgées (95 semaines)

II-4-1-2 Vieillesse accélérée

Le modèle de souris SAM est souvent utilisé pour étudier le vieillissement. Ces souris ont été obtenues à partir de croisements consanguins de souris AKR/J permettant d'obtenir 5 lignées sources originales ARK présentant une sénescence accélérée et servant de lignées progénitrices de la série P (SAMP, senescence prone) et de 3 lignées de souris ARK présentant un vieillissement normal servant de lignées progénitrices de la série R (SAMR, senescence resistant) (Takeda et al., 1981). Il existe plusieurs lignées différentes dont les caractéristiques sont répertoriées. L'évaluation du degré de sénescence s'effectue en utilisant un système de note qualifiant les différents signes cliniques et les lésions comme étant liés au processus de vieillissement : souplesse de la peau, brillance et perte du poil, lésions du

système oculaire, comportement au niveau du temps de réaction. Dans cette étude nous avons utilisé des ARN de fibroblastes à P0 provenant de la peau du dos de souris SAMP et d'une lignée de souris SAMR, obtenus auprès de l'UMR CNRS 5086 à l'IBCP (Lyon).

II-4-2 Modèle humain

II-4-2-1 Vieillesse naturelle

Les fibroblastes dermiques issus de fragments de peaux de patients d'âges variables sont utilisés avant le 5^{ème} passage.

II-4-2-2 Vieillesse accélérée induit par passages successifs

Lorsque les fibroblastes atteignent l'état de confluence, ils sont trypsinés pour être réensemencés : ils subissent un "passage". Pour cela ils sont rincés avec de la PBS, détachés avec trypsine (0,5%) puis réensemencés. Les fibroblastes dermiques et les milieux conditionnés sont collectés à chaque passage et congelés à -80°C et -20°C respectivement.

II-4-2-3 Vieillesse accélérée induit par traitement au peroxyde d'hydrogène

50000 cellules sont ensemencées par puits (1 plaque 6 puits par condition) dans du milieu DMEM 1g/L de glucose supplémenté de 10% de SVF jusqu'à ce que les cellules atteignent environ 70% de confluence. Nous traitons ensuite les cellules avec des doses allant de 0 à 200 µM de peroxyde d'hydrogène. Après 1h30 de traitement, les cellules sont rincées 3 fois à la PBS puis du milieu neuf sans SVF est ajouté. Les cellules et les milieux conditionnés sont collectés 48h plus tard.

II-4-2-4 Vieillesse accélérée induit par traitement au chlorure de sodium

10000 cellules sont ensemencées par puits (1 plaque 6 puits par condition) dans du milieu DMEM 1g/L de glucose supplémenté de 10% de SVF. Après 2h d'incubation, correspondant à l'adhésion des cellules au support, le chlorure de sodium est ajouté pour obtenir une concentration finale allant jusqu'à 300 mM (le milieu de culture seul en contenant

150 mM). Au bout de 7 jours, les milieux sont changés, puis le 12^{ème} jour, ils sont remplacés par du milieu sans SVF pendant 48h avant de collecter les cellules et les milieux conditionnés.

II-5 Mesure de la viabilité cellulaire

Le bleu trypan est un colorant de haute masse moléculaire utilisé pour étudier la viabilité des cellules. Il s'infiltré au travers des membranes plasmiques endommagées des cellules mortes, les faisant apparaître en bleu alors que les cellules viables ne sont pas perméables à ce colorant). Après détachement des cellules et centrifugation, le culot cellulaire est repris dans 100 µL de milieu. 10 µL de cette suspension sont mélangés avec 10 µL de bleu trypan, puis 10 µL sont prélevés et déposés sur une cellule de comptage pour la mesure, à l'aide d'un compteur automatique (Countess, Life Technologies), des cellules bleues et des cellules non colorées.

II-6 Mesure de l'activité de la Senescence Associated-β-galactosidase

Cette étude a été réalisée avec un kit de détection (Senescence Cells Histochemical Staining Kit, Sigma-Aldrich) basé sur une coloration histochimique traduisant l'activité de la β-galactosidase à pH 6. Dans ces conditions, l'activité β-galactosidase est facilement détectable dans les cellules sénescents, mais indétectables dans les cellules quiescentes, immortelles ou tumorales.

Les cellules sont d'abord rincées 2 fois avec 1 mL de PBS par puits, puis elles sont fixées avec une solution de fixation préalablement diluée 10 fois pendant 6 à 7 minutes.

Les cellules sont de nouveau rincées 3 fois avec de la PBS puis 1 mL de la solution de réaction est ajoutée dans chaque puits. Cette solution contient 10% de solution de coloration 10X, 1,25% de réactif B, 1,25% de réactif C, 85% d'eau distillée et 2,5% de solution X-Gal préalablement chauffée une heure à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit à 37°C dans une atmosphère dépourvue de CO₂ puis les cellules colorées et non colorées sont comptées au microscope.

II-7 Analyse en PCR quantitative

II-7-1 Extraction d'ARN

Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le réactif d'extraction Tri Reagent™. Les cellules sont rincées trois fois par de la PBS puis lysées en présence de 1 mL de réactif permettant la dénaturation des acides nucléiques, la dissociation des protéines qui leur sont associées, et possédant également une activité inhibitrice sur les ribonucléases endogènes. La couche cellulaire est grattée puis le lysat est transféré dans un tube et incubé à température ambiante avant d'y ajouter 200 µL de chloroforme. Les tubes sont agités énergiquement, incubés durant 10 minutes à température ambiante puis centrifugés (12000 g – 10 min - 4°C). Le chloroforme permet la séparation des acides nucléiques par solubilisation différentielle. La phase aqueuse, contenant les ARN, est prélevée et précipitée par 500 µL d'isopropanol, pendant 2 heures à -20°C, avant d'être centrifugée (12000 g - 10 min - 4°C). Après élimination du surnageant, le culot d'ARN est lavé avec 1 mL d'éthanol 75 % (v/v), séché à l'air et dissous dans 20 µL d'eau distillée préalablement traitée au DEPC.

II-7-2 Analyse qualitative et quantitative des ARN

Cette étape a été réalisée à l'aide d'une puce ARN et du bioanalyser agilent. Cette technique utilise la technologie « lab-on-a-chip » (laboratoire sur puce). La puce en question est composée de plusieurs puits, dont 12 destinés aux échantillons, et 1 au marqueur de taille. Au niveau de ces puits, il existe des microréseaux.

9 µL d'un gel filtré (mêlé à un intercalant de l'ARN spécifique et fluorescent) sont déposés dans 2 puits spécifiques de la puce (notés G). Le gel est réparti équitablement au niveau de chaque puits, et remplit les microréseaux. 5 µL de tampon sont alors ajoutés dans chaque puits, avant de déposer ensuite 1 µL d'échantillon préalablement dénaturé 2 minutes à 70°C et le marqueur de taille. La puce est vortexée 1 minute afin d'homogénéiser le tampon et les échantillons, puis placée dans l'appareil. Le programme est lancé. Les puits sont analysés un par un, en commençant par le marqueur de taille, qui sert d'étalon aux niveaux qualitatif et quantitatif. Une électrode est en contact avec chaque puits. Au moment de l'analyse, cette électrode est soumise à un haut voltage, qui va permettre une séparation très rapide des brins d'ARN de l'échantillon en fonction de leur taille (passage à travers le gel, au sein des microréseaux plus ou moins rapide). Au moment de leur passage dans le gel, les molécules d'ARN vont se lier spécifiquement au colorant (cyanines). En fin de course (fin de colonne, fin du microréseau), les molécules sont détectées par fluorescence (figure 28). Les molécules sont excitées par 2 lasers, et les ARNs (liés à aux cyanines 3 et 5) vont émettre un rayonnement fluorescent.

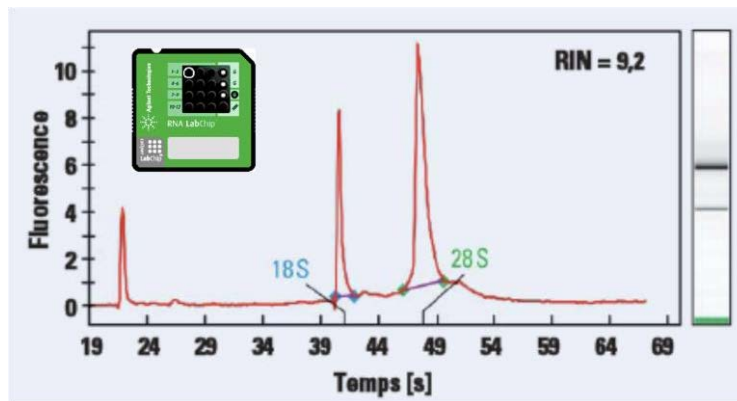


Figure 28: Profil des ARN analysés sur puces Agilent

Les résultats du contrôle de l'ARN sont obtenus sous forme de bandes de type gel et de pics d'électrophorèse. Un facteur d'intégrité ou RIN (RNA Integrity Number) est attribué à chaque échantillon d'ARN total, ce qui permet la normalisation des analyses.

II-7-3 Transcription inverse

Cette étape est réalisée à l'aide du kit « First Strand cDNA Synthesis » (Thermo Scientific). 2 µg d'ARN sont préparés dans un volume total de 16 µL d'eau DEPC. Ces ARN sont dénaturés 3 minutes à 90°C avant d'y ajouter 4 µL de mélange réactionnel 5X (contenant le tampon de réaction, les dNTPs, les oligo(dT)s et les random hexamer) et 2 µL du mélange enzymatique MAXIMA (contenant la reverse transcriptase et un inhibiteur des RNase afin de protéger les ARN de la dégradation). La réaction de polymérisation s'effectue à 42°C pendant 45 minutes.

II-7-4 PCR temps réel

II-7-4-1 Principe

La réaction d'amplification de la séquence d'ADN cible suit les mêmes étapes que la PCR classique, c'est-à-dire dénaturation, hybridation, élongation. A la différence d'une PCR classique, la PCR temps réel permet de quantifier et de caractériser l'amplicon formé en temps réel. Cela permet une quantification relative du gène d'intérêt par rapport à un gène de référence non régulé.

Le principe de la technique est la détection du nombre d'amplicons obtenus en fin d'élongation de chaque cycle de PCR en mesurant l'augmentation de l'intensité de fluorescence induite par l'incorporation du SYBR-Green dans l'ADN sous forme double brin.

En effet, ce composé n'est fluorescent que lorsqu'il est lié à de l'ADN double brin tandis que sous sa forme libre, cette cyanine asymétrique de formule C₃₂H₃₇N₄S, n'émet pas de fluorescence.

II-7-4-2 Mise au point

Les couples d'amorces ont été dessinés et sélectionnés selon plusieurs critères : la taille du fragment amplifié (inférieure à 250 pb) ainsi que l'absence de formation d'homo ou d'hétérodimères d'amorces et de boucles intramoléculaires (vérifiée grâce au logiciel OligoV2). La spécificité des amorces vis-à-vis de la séquence de l'ADN complémentaire cible est également vérifiée à l'aide du logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui permet de tester l'alignement des amorces avec l'ensemble des séquences répertoriées chez l'Homme. La qPCR est réalisée sur un mélange de cDNA dilués au 1/10^{ème}, 1/100^{ème}, 1/1000^{ème}, 1/10000^{ème} et 1/100000^{ème} afin de déterminer l'efficacité de PCR pour chaque couples d'amorces. Pour chaque gène, le couple d'amorce présentant la meilleure efficacité d'amplification (proche de 100%) et un seul produit d'amplification (vérifié avec la courbe de fusion) a été retenu pour la suite de l'étude.

II-7-4-3 Protocole

5 µL d'ADNc dilués au 1/50^{ème} sont additionnés de 12,5 µL du mélange SYBR GREEN (contenant la Taq polymérase et l'agent intercalant) ainsi que de 0,5 µL de composé fluorescent de référence (ROX), 0,5 µL d'amorces sens et anti-sens [0,2µM] et 6 µL d'H₂O.

Les milieux réactionnels sont déposés sur une plaque 96 puits puis placés dans l'appareil PCR en temps réel Mx3005P où l'amplification se réalise selon le programme suivant : 10 s à 95°C puis (5s à 95°C ; 30s à 60°C ; 15s à 72°C) pendant 50 cycles et enfin 1 min à 95°C ; 30 s à 65°C ainsi que 30 s à 95°C.

Les valeurs des Ct obtenues (correspondant à un niveau seuil où la fluorescence détectée est supérieure au bruit de fond) sont normalisées grâce aux gènes de ménage tels que la GAPDH, RPS-29 et la β-actine. La spécificité de la réaction est vérifiée par analyse de courbes de fusion. L'analyse de l'expression relative des gènes est réalisée selon la méthode du delta-delta Ct.

II-8 Analyse protéique

II-8-1 Obtention des protéines à partir des milieux conditionnés

Afin d'étudier l'expression des protéines sécrétées, les surnageants de culture sont collectés, centrifugés à 1200 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Ils sont ensuite placés sur des microconcentrateurs de type Vivaspin 6 PES 10 kDa, préalablement rincés à l'eau, dont la membrane retient les protéines de masse moléculaire supérieure à 10 kDa. Ils sont centrifugés à 3220 g pendant 1h30. Les protéines concentrées sont alors prêtes à être dosées.

II-8-2 Extraction des protéines à partir des couches cellulaires

La couche cellulaire, préalablement lavée à la PBS, est grattée avec 500 µL de tampon de lyse RIPA. L'extrait est alors collecté et placé dans des tubes à 4°C qui seront agités vigoureusement toutes les 5 minutes pendant 30 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 10000 g afin de ne récupérer que le surnageant contenant les protéines solubles qui sont alors prêtes à être dosées.

II-8-3 Dosage protéique

Nous utilisons une méthode fluorimétrique de détection des protéines. 10 µL d'échantillon dilué au 1/100^{ème} sont additionnés de 190 µL d'un mélange réactionnel composé de 199 µL de solution tampon et de 1 µL de réactif du kit de dosage protéique Quant-it™ Protein Assay. Les échantillons sont dosés à l'aide du fluorimètre Qubit™ préalablement calibré à l'aide de standards. La fluorescence est mesurée à la longueur d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission de 590 nm.

II-8-4 Western-blot

II-8-4-1 Electrophorèse

50 µg d'extraits protéiques totaux préalablement dénaturés 3 minutes à 95°C et additionnés de tampon de charge (Laemmli) migrent dans un gel Tris-Glycine dont le pourcentage d'acrylamide varie selon la masse moléculaire de la protéine étudiée. En effet, le pourcentage sera élevé pour séparer les protéines de faibles masses moléculaires alors qu'un pourcentage faible sera utilisé pour séparer les protéines de plus grandes masses moléculaires.

La migration se déroule pendant 1h30 heure à 100 volts dans une cuve contenant du tampon de migration (Tris 25 mM pH 8.3, SDS 0.1% (m/v), glycine 192 mM).

II-8-4-2 Transfert

La membrane de PVDF doit être préalablement activée dans du méthanol pendant 30 s puis équilibrée 15 min dans le tampon de transfert (Tris 48 mM pH 8,2, glycine 39 mM, méthanol 20% (v/v)). Les protéines du gel sont alors transférées sur la membrane dans une cuve contenant du tampon de transfert à l'aide d'un appareil de transfert durant 1h30 à 4°C à 80V ou 45 minutes à 100V selon la masse moléculaire de la protéine étudiée.

II-8-4-3 Immunodétection

Les membranes sont ensuite saturées à l'aide de TBS-T (Tris HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM et 0.1% de Tween 20) contenant 5% de blotto durant 2 heures à température ambiante. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T contenant 1% de blotto, toute la nuit à 4°C. Après 1 lavage au TBS-T de 10 min, puis 3 lavages de TBS-T de 5 min la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire dilué au 1/10000^{ème} dans du TBS-T contenant 1% de blotto, durant 1h à température ambiante. La membrane est lavée 2 fois 10 min au TBS-T puis 2 fois 10 min au TBS 1X simple afin d'éliminer le Tween 20. La révélation est effectuée à l'aide du Kit de chimiluminescence ECL et de l'appareil ChemiDoc.

II-8-5 Dosage E.L.I.S.A (enzyme-linked immunosorbant assay)

II-8-5-1 Collagène IV

Cette étude a été réalisée avec le kit ELISA pour le collagène IV de chez Usck (test ELISA sandwich). Nous avons déposé 100 µL de milieux conditionnés préalablement dilués au 1/10^{ème} sur une plaque pré-tapissée en anticorps anti-collagène IV. Une gamme étalon (0 à 4000 pg/mL) est réalisée en parallèle. La plaque est ensuite mise à incuber pendant 2h à 37°C. Le contenu des puits est ensuite éliminé et 100 µL de réactif de détection A sont ajoutés dans tous les puits avant de remettre la plaque à incuber 1h à 37°C (ce réactif contient des anticorps spécifiques du collagène IV couplé à de la biotine). Les puits sont de nouveaux vidés et rincés 3 fois avec la solution de lavage contenue dans le kit. 100 µL du réactif de détection B sont

alors ajoutés (ils contiennent de l'avidine couplé à l'HRP) et la plaque est remise à incuber 30 minutes à 37°C avant d'être de nouveau lavée 5 fois avec la solution de lavage. 90 µL de substrat TMB sont ajoutés et la plaque est mise à incuber 15 à 25 minutes à 37°C (selon l'intensité de coloration ; plus il y a de HRP fixé, plus le substrat va réagir et va se colorer en bleu) puis la réaction est stoppée par ajout de 50 µL de solution stop contenant de l'acide sulfurique 1N. L'absorbance est ensuite lue directement à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.

II-8-5-2 TGF-β1

Ce dosage a été réalisé avec le kit TGFβ₁ E_{MAX} ImmunoAssay Systems (Promega). Une plaque 96 puits est d'abord tapissée avec 100 µL d'anticorps monoclonal anti-TGF-β1 (1µg/mL) dilué au 1/1000^{ème} dans du tampon carbonate et laissée incubée toute la nuit. 270 µL de solution de blocage sont ajoutés dans chaque puits afin de bloquer tous les sites de fixation non spécifiques. Les milieux conditionnés à tester, dilués au 1/10^{ème}, sont ajoutés dans les puits ainsi que les échantillons de la gamme standard préalablement préparés par dilution en cascade d'un tube standard fourni (gamme allant de 32 à 1000 pg/mL). La plaque est ensuite incubée 1h30 sous agitation et à température ambiante. Les puits sont ensuite vidés et rincés 3 fois avec la solution de lavage. 100 µL/puits d'anticorps secondaire polyclonal anti-TGF-β1 dilué au 1/1000^{ème} dans le tampon 1X sont ensuite ajoutés et laissés à incuber 2h à température ambiante sous agitation. Les puits sont de nouveau vidés et rincés 5 fois avec le tampon 1X 100 µL d'HRP conjugué dilué au 1/100^{ème} dans le tampon 1X sont ajoutés et la plaque est de nouveau incubée 2h. Comme précédemment les puits sont rincés 5X. Dans la dernière étape 100 µL/puits de TMB sont ajoutés et la plaque est incubée à température ambiante pendant environ 15 minutes avant de stopper la réaction par ajout de 100µL d'acide chlorhydrique 1N. L'absorbance est mesurée à 450 nm au spectrophotomètre (figure 29).

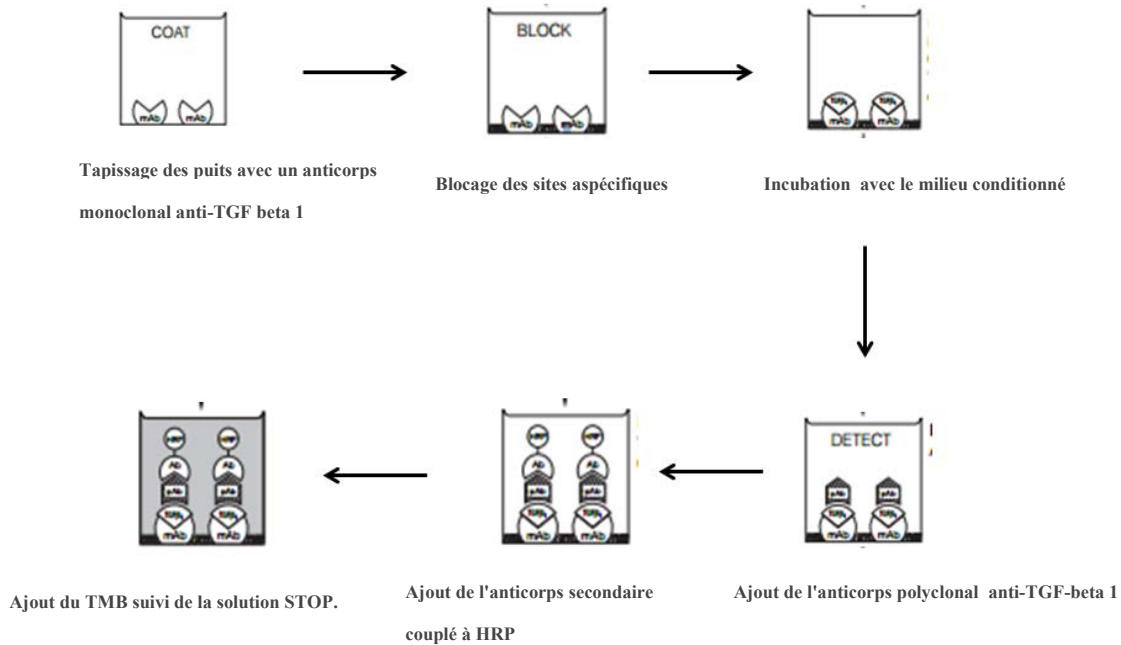


Figure 29: Principe du dosage ELISA anti TGF- β 1

Le TGF β 1 E_{max}® ImmunoAssay System est une méthode de détection sensible et spécifique de la forme active du TGF β 1. Les plaques sont tapissées d'anticorps monoclonaux anti-TGF β 1 qui fixent le TGF β 1 soluble. Le TGF β 1 capturé est reconnu par un second anticorps polyclonal spécifique. Le taux d'anticorps spécifiquement fixés est détecté par un second anticorps spécifique de l'anticorps polyclonal couplé à la peroxydase de raifort qui réagira avec le substrat chromogénique induisant un changement de couleur qui sera mesuré au spectrophotomètre.

II-8-6 Etude des protéines phosphorylées : voie du TGF- β 1

Cette étude a été réalisée avec le kit « TGF-Beta Signaling Phospho-Specific antibody Microarray» de chez Full Moon BioSystem. Les cellules sont lavées avec la PBS à 4°C puis collectées par grattage, centrifugées à 4°C puis le culot est lavé avec la PBS 1X. Le surnageant est éliminé et le culot additionné de billes de lyse et de 100 μ L de tampon de lyse dans lequel nous avons ajouté du NaVO₃ (1mM final), du NaF (1mM final) pour inhiber les phosphatases et des inhibiteurs de protéases (PICK dilué au 1/100^{ème}). Les tubes sont agités vigoureusement pendant 30 secondes, toutes les 10 minutes, pendant environ 1h sur glace puis centrifugés 15 min à 14000 rpm à 4°C. Pour purifier l'extrait protéique et remplacer le tampon de lyse par le tampon de biotinylation, le surnageant est alors placé dans sur colonne contenant le tampon de marquage et centrifugé à 750 g pendant 2 minutes. Nous vérifions alors la pureté des protéines en observant deux pics caractéristiques à 230 et 270 nm lors de l'absorption UV des échantillons au spectrophotomètre. Nous passons ensuite à la biotinylation des protéines ; pour cela, les protéines sont diluées à 10 μ g/mL dans un volume

total de 75 μL de tampon de marquage et 3 μL de réactif (contenant 100 μL de DMF et 1 mg de réactif biotine) sont ajoutés. Le mélange est incubé 1 à 2h à température ambiante sous agitation puis 30 μL de solution stop sont ajoutés et le mélange est à nouveau incubé 30 minutes. Les lames présentant 176 anticorps différents sont incubées en présence de solution de blocage, afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques, pendant 45 minutes sous une agitation de 55 rpm. Les lames sont ensuite rincées 10 fois avec de l'eau milliQ.

78 μL de lysat sont ensuite ajoutés à 6 mL de la solution de couplage et le mélange est déposé sur les lames dans une chambre de couplage, elle-même agitées à 35 rpm pendant 1 h. Les lames sont rincées 3 fois 10 minutes avec la solution de rinçage sous agitation à 55 rpm puis 10 fois à l'eau milliQ. La Cy3-streptavidine diluée au 1/1000^{ème} dans la solution de détection est ajoutée sur les lames qui sont incubées 20 minutes à l'abri de la lumière à 55 rpm avant de les rincer 3 fois 10 minutes avec la solution de rinçage, sous agitation à 55 rpm, puis 10 fois à l'eau milliQ. Les puces sont alors prêtes à être analysées à l'aide du Chemidoc (figure 30).

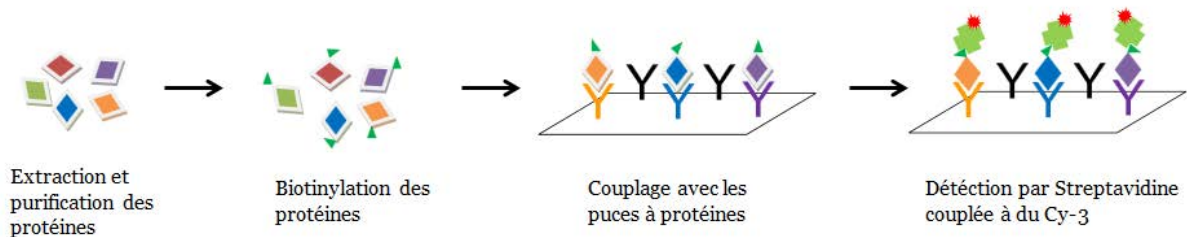


Figure 30: Principe de l'antibody array

Les protéines sont extraites puis biotinylées, mises en contact des 176 anticorps et détectées par Cy3-streptavidine.

II-8-7 Immunoprécipitation des Smads phosphorylées

Afin d'analyser l'activation des Smads phosphorylées dans le modèle de vieillissement avec H_2O_2 , nous avons traités nos fibroblastes comme cités précédemment mais nous les avons collectés à différents temps après l'incubation avec H_2O_2 , et non plus seulement après 48h. Les extraits cellulaires sont collectés comme expliqué ci-dessus puis les lysats cellulaires sont pré-purifiés par addition de 50 μL de billes de protéine G-agarose par mL de lysat et incubés 10 minutes à 4°C sur agitateur orbitale. Cette étape permet d'éliminer les protéines s'adsorbant à l'agarose. Les lysats sont ensuite centrifugés à 14000 g à 4°C pendant 10 minutes afin d'éliminer les billes et le surnageant est transféré dans un tube propre. Les protéines sont dosées afin d'avoir une concentration d'1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protéines totales dans de la

PBS afin de réduire la concentration de détergents dans le tampon. Nous ajoutons les anticorps dilués au 100^{ème} (Smad 2 ou Smad 3) à 500 µL de lysat cellulaire et nous laissons agiter sur une roue pendant 2h à 4°C avant d'ajouter 50 µL de protéine A-G-agarose et de remettre à agiter sur roue 1h. Les billes sont ensuite centrifugées 5 secondes à 14000 rpm ; le surnageant est alors jeté et les billes sont rincées 3 fois avec 800 µL de PBS ; elles sont ensuite re-suspendues dans 30 µL de tampon de charge, agitées vigoureusement, centrifugées et le surnageant est déposé sur gel d'acrylamide afin de réaliser le western-blot. L'anticorps utilisé pour l'immunorévélation est celui de la protéine phosphorylée (P-Smad 2/P-Smad 3).

II-9 Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type. Le test paramétrique de Student avec séries appariées (méthode des couples) a été utilisé pour l'analyse statistique.

Les données sont considérées statistiquement significatives pour un $p < 0,05$.

Les niveaux de probabilité sont schématisés de la manière suivante :

N.S = non significatif

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

D. Résultats

I. Etude de l'expression du collagène IV lors du vieillissement naturel

I-1 Analyses à partir de peaux totales

I-1-1 Analyse par western-blot sur peaux totales

Nous avons extrait les protéines à partir de prépuces et de seins de patients d'âges variables et avons réalisé un western-blot pour mettre en évidence la diminution de collagène IV. Nous avons pour cela utilisé un anticorps (RayBiotech) dirigé contre le collagène IV ($[\alpha 1(IV)_2 ; \alpha 2(IV)]$). La quantification de chaque western-blot se fait en rapportant l'intensité de la bande d'intérêt sur l'intensité des protéines totales de l'échantillon.

Le western-blot met en évidence une bande de masse moléculaire de 250 kDa correspondant au collagène IV.

Nous avons analysé des prépuces d'1, 2, 4 et 5 ans. L'expression est plus élevée à 1 an puis diminue de 50% à 2 ans puis elle n'est plus réellement modifiée (figure 31).

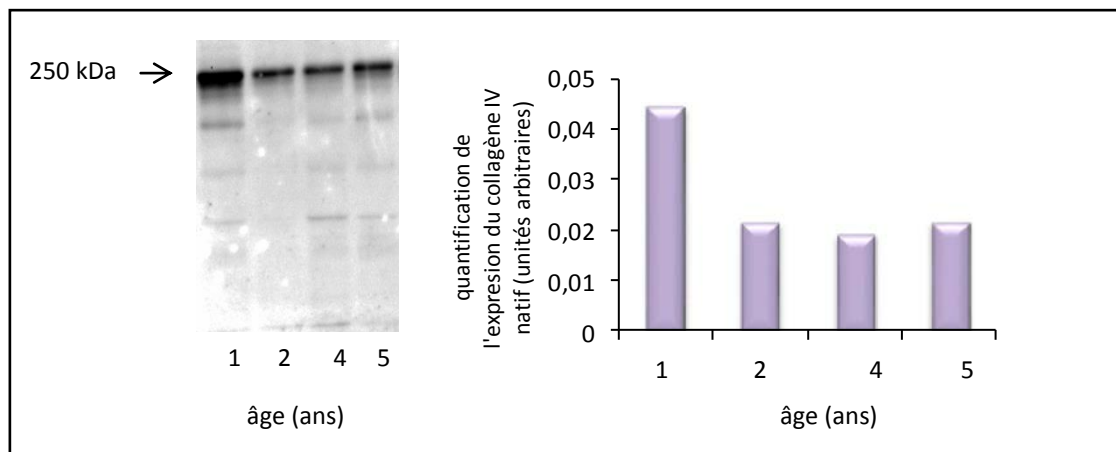


Figure 31: Etude, par western-blot, de l'expression du collagène IV natif à partir de prépuces

Les protéines sont extraites à partir de fragments de prépuces avec un tampon de lyse RIPA. L'expression protéique du collagène IV a été analysée par la technique de western-blot (50 μ g de protéines totales ont été déposés sur un gel contenant 7.5% d'acrylamide). Etude réalisée sur 4 patients âgés de 1, 2, 4 et 5 ans.

La même étude a été réalisée à partir des fragments de peaux issus de seins de 35, 45, 54, 64 et 80 ans. Le résultat montre une bande de même masse moléculaire que pour les prépuces (250 kDa) dont l'intensité diminue en fonction de l'âge (jusqu'à atteindre 72% de diminution entre 35 et 80 ans) (figure 32).

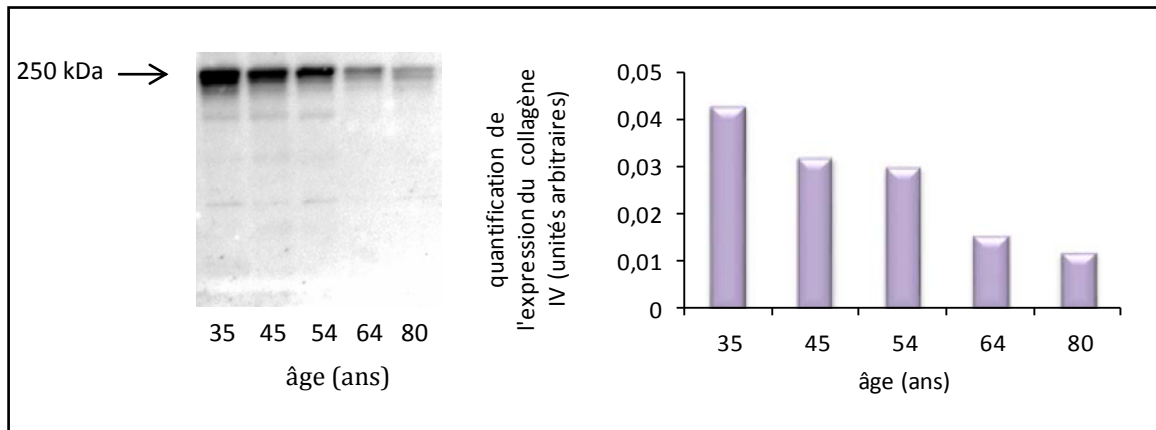


Figure 32: Etude, par western-blot, de l'expression du collagène IV natif à partir de fragments de peau de seins

Les protéines sont extraites à partir de fragments de seins avec un tampon de lyse RIPA. L'expression protéique du collagène IV a été analysée par la technique de western-blot (50 µg de protéines totales ont été déposés). Etude réalisée sur 5 patients âgés de 35, 45, 54, 64 et 80 ans.

I-1-2 Analyse immunohistochimique

I-1-2-1 Marquage fluorescent

I-1-2-1-1 Validation des coupes à étudier par mesure de la longueur de la JDE

La JDE s'aplanit au cours du vieillissement (disparition progressive des invaginations). Afin d'éliminer les peaux présentant des caractères atypiques, nous avons mesuré la longueur de la JDE sur les 38 coupes dont nous disposions.

Avec l'aide du Dr Christine Terryn, nous avons mis au point un programme sous Image J permettant de mesurer la longueur de la JDE sur chaque coupe, avec le même grossissement (figure 33).

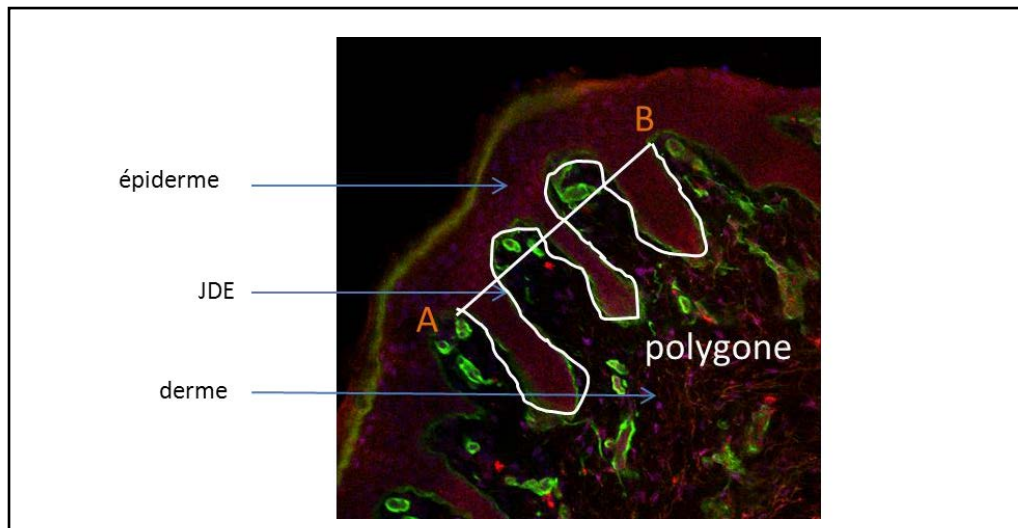


Figure 33: Détermination du degré d'invaginations de la JDE sur coupes transversales de peaux humaines

Les coupes de peaux sont soumises à des analyses immunohistochimiques à l'aide d'un anticorps anti-collagène IV. Le degré d'invagination est ensuite mesuré sur Image J.

Toutes les coupes dont les valeurs sont éloignées de plus de 2 écart-types de leur groupe sont considérées comme non représentatives et sont écartées de l'étude. Nous avons regroupé les coupes par tranche d'âges : de 1 à 10 ans (n=14), de 31 à 40 ans (n=2), de 41 à 50 ans (n=2), de 51 à 60 ans (n=7), de 61 à 70 ans (n=5), de 71 à 80 ans (n=3) et de 81 à 90 ans (n=3). La figure 39 représente le degré d'invagination en fonction de l'âge, une diminution proportionnelle est observée. Seules 2 coupes aberrantes ont été éliminées de l'étude (figure 34).

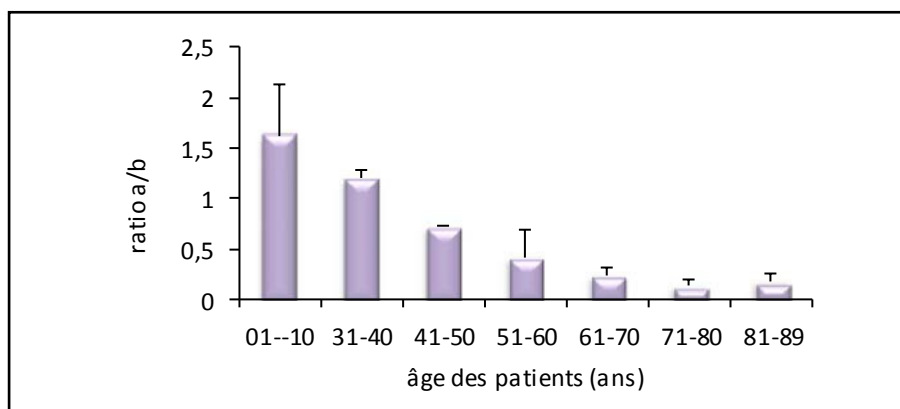


Figure 34 : Etude de l'invagination de la JDE au cours du vieillissement à partir des coupes marquées avec un anticorps anti-collagène IV

Degré d'invagination de la zone A-B : (longueur du polygone-distance A.B) / longueur du polygone. Les coupes ont été regroupées en 7 tranches d'âge : de 1 à 10 ans (n=14), de 31 à 40 ans (n=2), de 41 à 50 ans (n=2), de 51 à 60 ans (n=7), de 61 à 70 ans (n=5), de 71 à 80 ans (n=3) et de 81 à 90 ans (n=3).

I-1-2-1-2 Analyse du réseau de collagène IV au cours du vieillissement

Le but de l'étude est de mettre en évidence une éventuelle discontinuité du collagène IV au niveau de la JDE. Pour cela, des coupes transversales de peaux issues de prépuces et de seins ont été marquées avec un anticorps anti-collagène IV (DAKO) puis un anticorps secondaire couplé à un Alexa-fluor. Le collagène de type IV est bien retrouvé au niveau de la jonction dermo-épidermique ainsi qu'au niveau des vaisseaux sanguins dans le derme (figure 35).

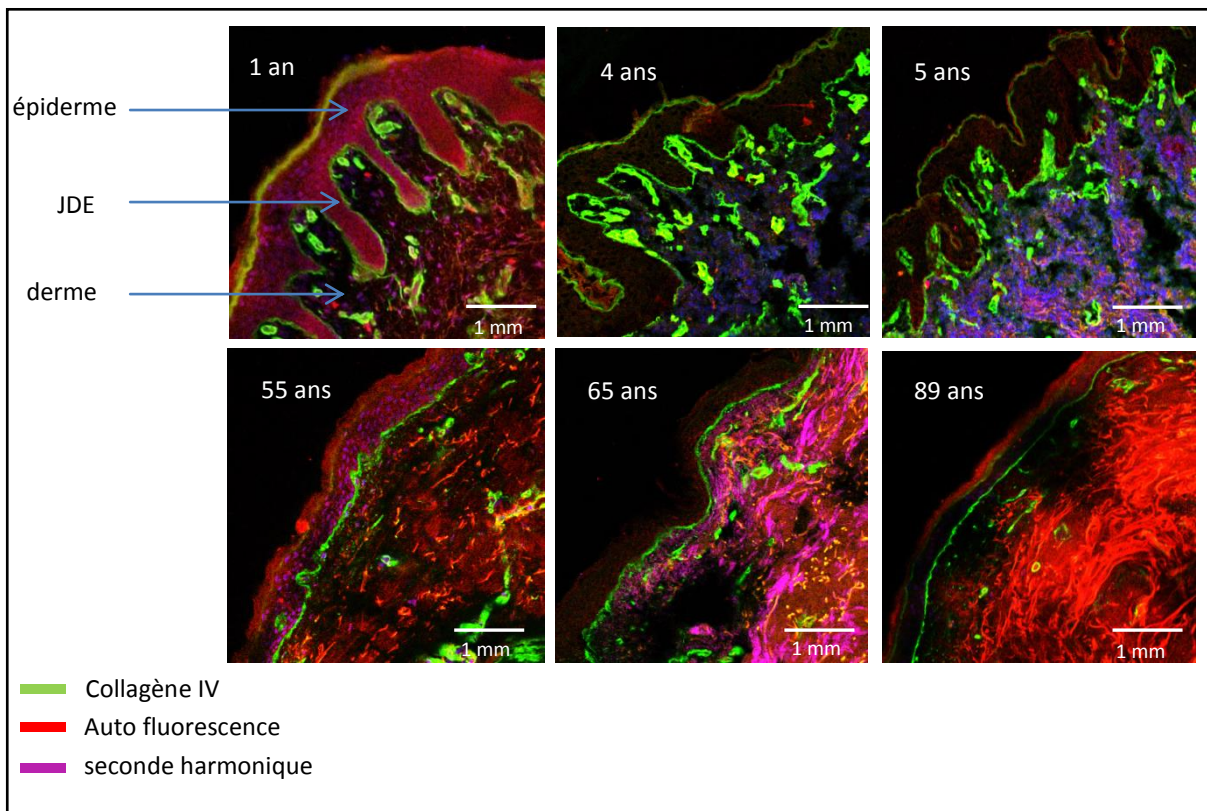


Figure 35: Visualisation, en microscopie confocale, de la distribution du collagène IV sur coupes transversales de peau au cours du vieillissement (x20).

Les coupes de peau sont incubées avec un anticorps anti-collagène IV puis avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor® 488. Elles sont observées à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x20 et photographiées. Le marquage du collagène IV est représenté en vert, l'autofluorescence en rouge et les ondes de secondes harmoniques en violet.

Sur les 34 coupes éligibles, nous avons mis au point un programme sous image J qui permet de quantifier les discontinuités éventuelles du réseau de collagène IV au cours du vieillissement. Pour cela, sur une zone donnée de la JDE, nous avons calculé le nombre de pixels colorés sur le nombre de pixels totaux. Plus ce ratio diminue plus le réseau est discontinu (figure 36).

Les variations interindividuelles sont nombreuses et n'ont pas permis de mettre en évidence de modification de la continuité du réseau en collagène IV au cours du vieillissement.

Toutes les coupes n'ayant pas été réalisées et analysées le même jour, nous n'avons pas réalisé de mesure quantitative de l'expression de collagène IV par la technique d'immunofluorescence.

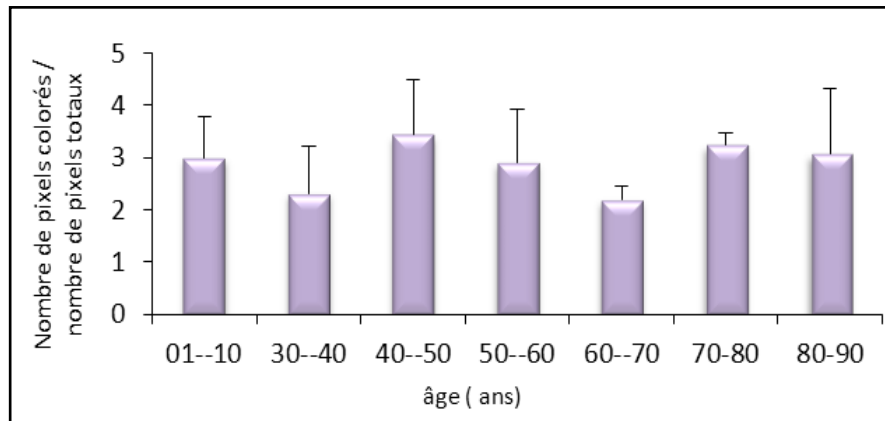


Figure 36: Estimation de la continuité du réseau de collagène IV au cours du vieillissement. Un ratio du nombre de pixels colorés sur le nombre de pixels totaux au niveau d'une zone de la JDE a été réalisé. Patients de 1 à 10 ans (n=12), de 31 à 40 ans (n=2), de 41 à 50 ans (n=2), de 51 à 60 ans (n=7), de 61 à 70 ans (n=5), de 71 à 80 ans (n=3) et de 81 à 90 ans (n=3).

I-1-2-2 Marquage révélé à la peroxydase

N'ayant pu quantifier l'intensité du marquage et la quantité de collagène IV au cours du vieillissement à l'aide du marquage fluorescent, nous avons décidé de réaliser un marquage à la DAB pour révéler le collagène de type IV. Pour cela nous avons travaillé sur des coupes provenant d'échantillons de peau inclus en paraffine fournis par le Dr Patricia Rousselle de l'IBCP de Lyon. Cependant, les variations interindividuelles étant considérables, cette étude ne nous a pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les coupes de peaux jeunes et âgées (figure 37).

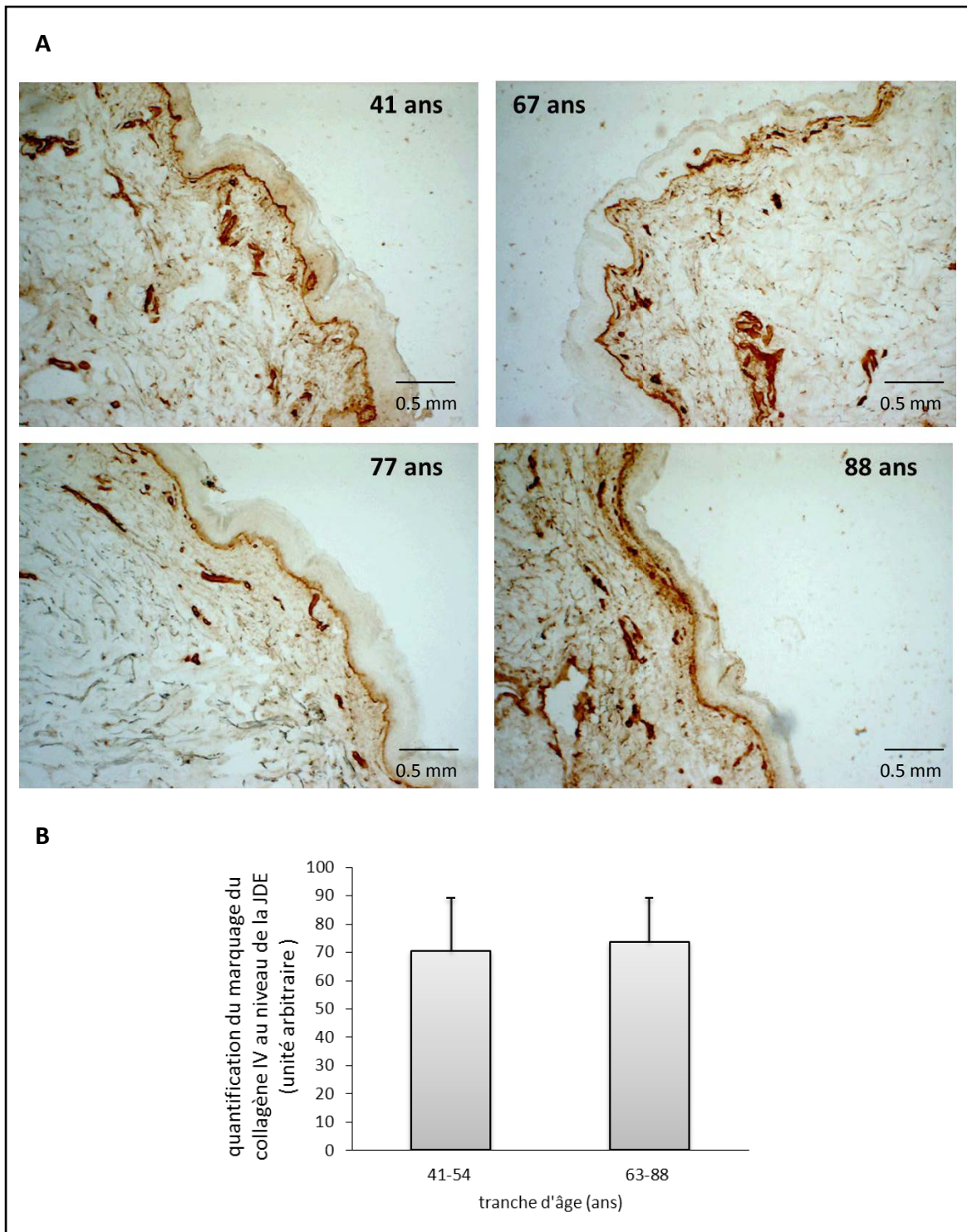


Figure 37: Visualisation, en microscopie optique, de l'expression du collagène IV sur coupes transversales de peau au cours du vieillissement (x20)

A : les coupes de peau ont été marquées avec un anticorps anti-collagène IV biotinylé, lui-même révélé à l'aide de la streptavidine-HRP induisant une coloration marron lors de la réaction avec le chromogène. **B :** L'intensité de fluorescence a été quantifiée à l'aide du logiciel Image J. Tranche d'âge 41-54 ans (n=6 patients) et tranche d'âge 63-88 ans (n=5 patients).

I-1-3 Etude du collagène IV de la JDE par microscopie RAMAN

La microscopie RAMAN a pour avantage d'être non destructive pour les échantillons testés. Des études préliminaires nous ont d'abord permis de mettre en évidence les différences spectrales entre le collagène I et le collagène IV purifiés (figure 38). Afin de pouvoir comparer les résultats, les spectres ont été normalisés sur la bande amide I. Elle est située à 1668 cm^{-1} et 1673 cm^{-1} pour les collagènes I et IV respectivement. La bande Amide I correspond principalement aux vibrations d'étirement des groupes carbonyle $\text{C}=\text{O}$ des liaisons peptidiques de la séquence Gly-X-Y. Le décalage en nombre d'onde de la bande amide I reflète des environnements, au niveau des groupes carbonyle, différents entre les deux types de collagène; ce qui pourrait provenir d'une différence de proportion d'acides aminés aux positions X et Y. La différence du ratio des intensités intégrées I_{1271}/I_{1246} met en évidence une différence dans les proportions de résidus proline. Le pic à 875 cm^{-1} provient des hydroxyprolines, les vibrations à 856 et 920 cm^{-1} sont attribuées aux prolines et la bande à 938 cm^{-1} correspond à la vibration de l'étirement C-C du squelette formé par les séquences Gly-X-Y. En prenant en compte la normalisation du spectre sur la bande amide I, le contenu en résidus proline et hydroxyproline apparaît plus élevé dans le collagène IV que dans le collagène I. Les 2 vibrations spécifiques de la phénylalanine (1004 and 1033 cm^{-1}) sont plus intenses dans le collagène IV, ce qui pourrait traduire une quantité plus importante de cet acide aminé dans la collagène IV ou bien des différences conformationnelles de ces résidus entre les deux protéines. La vibration de 815 cm^{-1} correspond à l'étirement C-O-C qui peut être attribué aux liaisons croisées glucosyl-galactosyl-hydroxylysinonorleucine entre les tropocollagènes. Ce pic est plus intense au niveau du collagène I, ce qui montre un contenu plus important en liaisons croisées dans ce collagène, ce qui est corrélé avec la structure fibrillaire du collagène I. L'information spectrale associée aux ponts disulfures se situe dans la gamme $500\text{-}550\text{ cm}^{-1}$. En effet, les vibrations d'étirement S-S du collagène IV apparaissent à 510 et 540 cm^{-1} et ces signaux sont dus aux ponts disulfures des domaines 7S. Cela indique que ces ponts peuvent se trouver dans différents types de conformation: très stable gauche-gauche-gauche (510 cm^{-1}) et moins stable trans-gauche-trans (540 cm^{-1}). Ces pics sont associés avec une vibration d'étirement C-S à 722 cm^{-1} . Cette information conformationnelle du domaine 7S peut être utilisée comme marqueur in situ de la

stabilité du réseau de collagène IV. Au contraire, pour le collagène I, les vibrations S-S à 510 et 540 cm^{-1} n'apparaissent pas clairement.

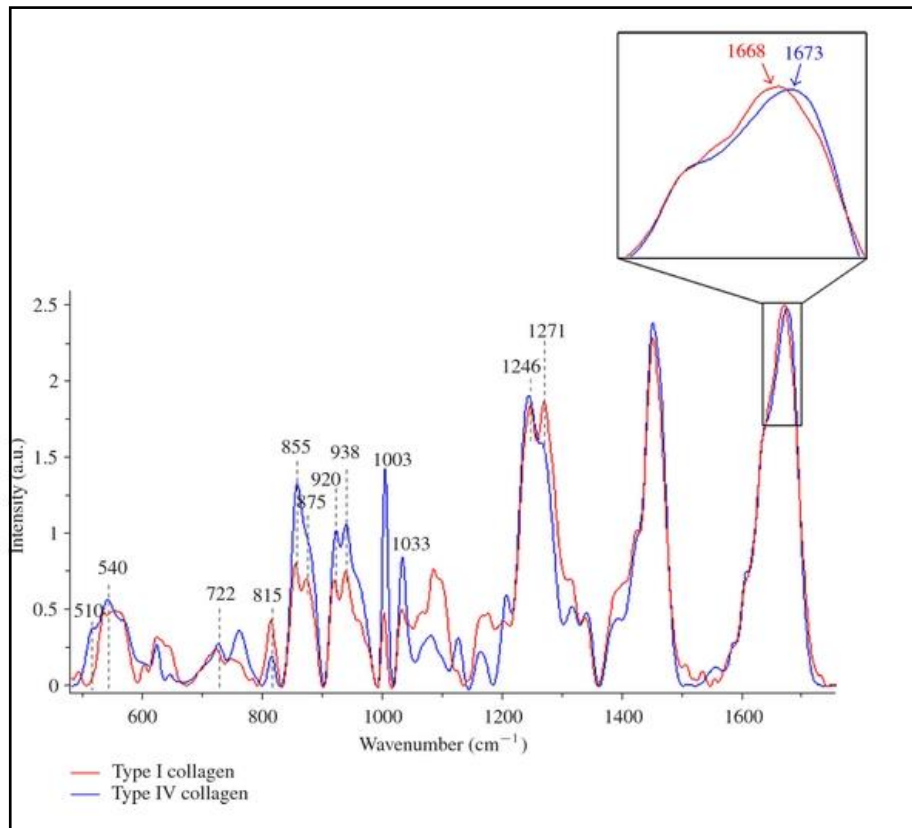


Figure 38: Spectres RAMAN des collagènes I et IV purifiés

Les collagènes I et IV purifiés ont été déposés sur lame de CaF_2 . L'acquisition des spectres a été réalisée selon le mode point par point. Le temps d'acquisition était de 30s/spectre et la zone spectrale de 500 à 1800 cm^{-1} .

Alors que les différences spectrales entre les collagènes I et IV ont été déterminées à partir d'extraits purs, nous avons tenté de mettre en évidence une signature spectrale du collagène IV au sein de coupes de peaux jeunes et âgées.

Au niveau de la JDE, la bande amide I est retrouvée à 1658 cm^{-1} , traduisant une structure prédominante en α -hélice. Au niveau de la région spectrale 800-980 cm^{-1} , les pics correspondant aux résidus hydroxyproline (876 cm^{-1}) et proline (920 cm^{-1}) sont présents en plus forte intensité dans les spectres du derme et de la JDE que pour le spectre de l'épiderme. Le signal à 815 cm^{-1} , attribué aux vibrations élastiques des liaisons croisées du collagène, est également visible dans le derme et la JDE mais pas au niveau de l'épiderme (figure 39).

Ces résultats montrent que les collagènes I et IV présentent des signatures Raman très spécifiques. Sur la base de ces signatures, il est possible de distinguer les structures cutanées. Il faut toutefois noter que le signal enregistré au niveau de la JDE ne correspond pas exclusivement à cette structure du fait de la limite de résolution de la microscopie Raman (environ 1 μm) en comparaison avec la taille de la JDE. Des développements instrumentaux

basés sur l'optique en champ proche devraient prochainement permettre d'enregistrer un signal spécifique de la JDE. Ce qui permettra aussi d'étudier in situ les altérations de la JDE associées au vieillissement cutané.

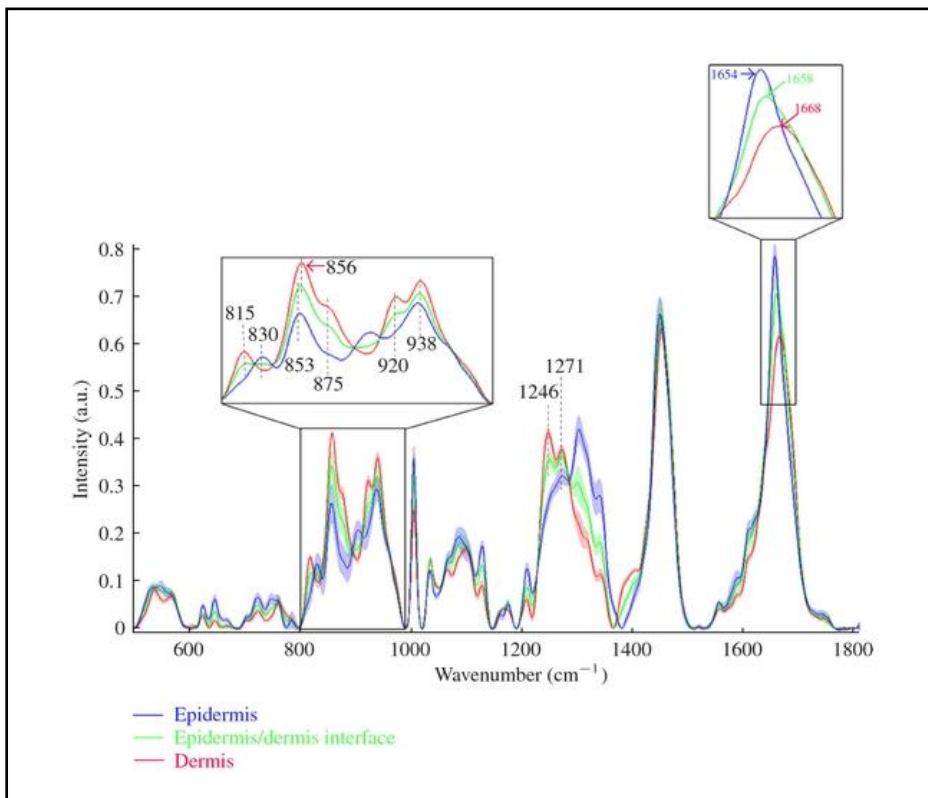


Figure 39: Spectre moyen et déviation standard de l'épiderme, du derme et de la jonction dermo-épidermique

Les spectres ont été recueillis à partir d'une coupe de peau issue du sein d'une patiente de 41 ans et déposée sur une lame de CaF_2 . L'épiderme, le derme et l'hypoderme ont été analysés par spectroscopie RAMAN selon un mode image. 6 zones de 50 x 50 μm^2 de diamètre ont été scannées point par point avec un pas de 0,5 μm .

I-2 Analyse à partir de fibroblastes dermiques

Dans un premier temps, nous avons étudié les variations d'expression génique du collagène IV par les fibroblastes dermiques issus de prépuces et de seins afin d'avoir un

panel de patients d'âges très variables. Les fibroblastes dermiques étudiés ont été isolés à partir de fragments de peau de patients regroupés en 5 tranches d'âges : 1 à 10 ans (n=8); 11 à 20 ans (n=5); 41 à 50 ans (n=2); 51 à 60 ans (n=2); 61 à 70 ans (n=7). L'expression des différentes chaînes α (IV) a été mesurée par PCR en temps réel. Les chaînes α 3 et α 4 (IV) ne sont pas exprimées par les fibroblastes dermiques en culture. Les chaînes α 1 et α 2(IV) sont fortement exprimées de 1 à 10 ans, puis une diminution importante survient (90 % de baisse d'expression entre 1-10 ans et 41-50 ans pour α 1(IV) et 88 % pour α 2(IV)) jusqu'à une stabilisation observée à partir du groupe 41-50 ans (figure 40).

Nous avons également étudié l'expression des chaînes α 5 et α 6(IV), mais l'efficacité de la PCR étant inférieure à 90%, nous n'avons pas validé les résultats obtenus. Ceci s'explique par le fait que ces deux chaînes sont très faiblement exprimées dans la JDE.

Dans cette première expérience, nous avons comparé des fibroblastes provenant de 2 tissus différents et les résultats peuvent être remis en question. C'est pourquoi nous avons décidé de recommencer cette expérience en prenant soin d'étudier l'expression génique des fibroblastes issus de prépuces d'une part, ceux issus de seins d'autre part afin d'éliminer les variations liées au tissu.

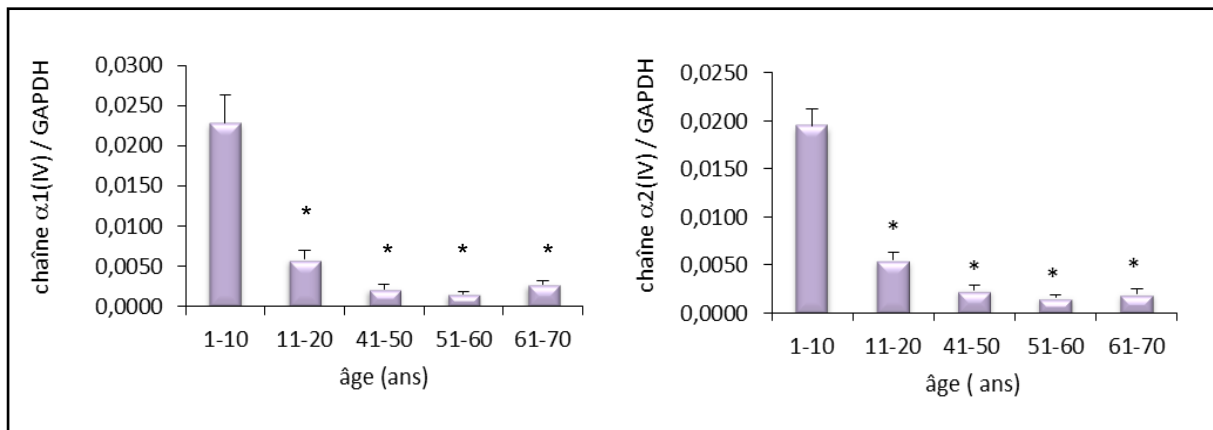


Figure 40: Etude, par PCR en temps réel, de l'expression des chaînes α 1 et α 2(IV) par les fibroblastes dermiques humains issus de prépuces et de seins au cours du vieillissement
Les fibroblastes dermiques étudiés ont été isolés à partir de biopsies de patients regroupés en 5 tranches d'âge: 1-10 ans (n=8), 11-20 ans (n=5), 41-50 ans (n=2), 51-60 ans (n=2) et 61-70 ans (n=7). L'expression des chaînes α 1 et α 2(IV) a été analysée par PCR en temps réel.

I-2-1 Fibroblastes issus de prépuces

Les fibroblastes dermiques ont été isolés à partir de fragments de peau de patients de 1 à 12 ans (n=14). De très grandes variabilités interindividuelles sont observées, notamment entre les 3 patients de 2 ans. Il y a une tendance à la diminution, que nous avons essayé de mettre plus en évidence en regroupant les échantillons par tranche d'âge, mais aucun résultat significatif ne peut être obtenu du fait des variations interindividuelles (figure 41).

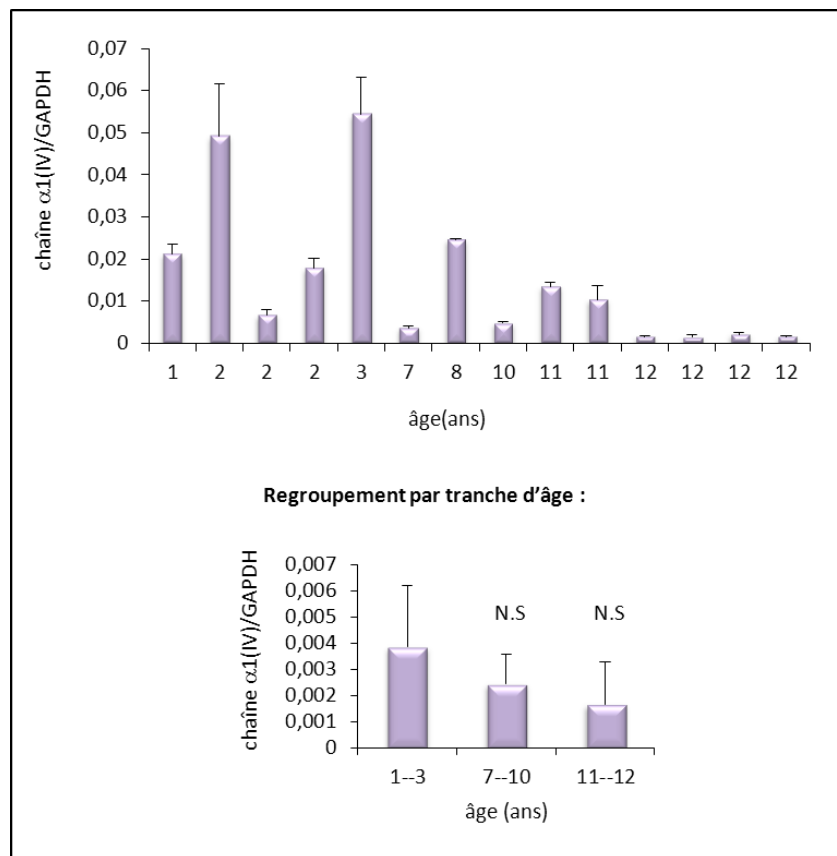


Figure 41: Etude, par PCR en temps réel, de l'expression de la chaîne $\alpha 1(IV)$ par les fibroblastes dermiques humains issus de prépuces au cours du vieillissement
Les fibroblastes dermiques étudiés ont été isolés à partir de prépuces de patients regroupés en 3 tranches d'âge : 1-3 ans (n=5), de 7-10 ans (n=3), de 11-12 ans (n=6). L'expression de la chaîne $\alpha 1(IV)$ à été analysée par PCR en temps réel.

I-2-2 Fibroblastes issus de seins

I-2-2-1 Niveau génique

Les fibroblastes dermiques ont été isolés à partir de fragments de peau de patients regroupés en 4 tranches d'âge : 30 à 40 ans (n=3), 41 à 50 ans (n=6), 51 à 60

ans (n=5), de 61 à 70 ans (n=12). La chaîne $\alpha 1(IV)$ est exprimée plus fortement dans la tranche d'âges 30-40 ans, puis une baisse d'expression de 62% est observée pour la tranche d'âges 41-50 ans (même si cette dernière n'est pas significative), et cette baisse est stabilisée dans les tranches d'âges supérieures (74 et 80% de baisse pour les tranches d'âges 51-60 et 61-70 ans respectivement (figure 42). Du fait des très grandes variations interindividuelles, les résultats ne sont que faiblement significatifs

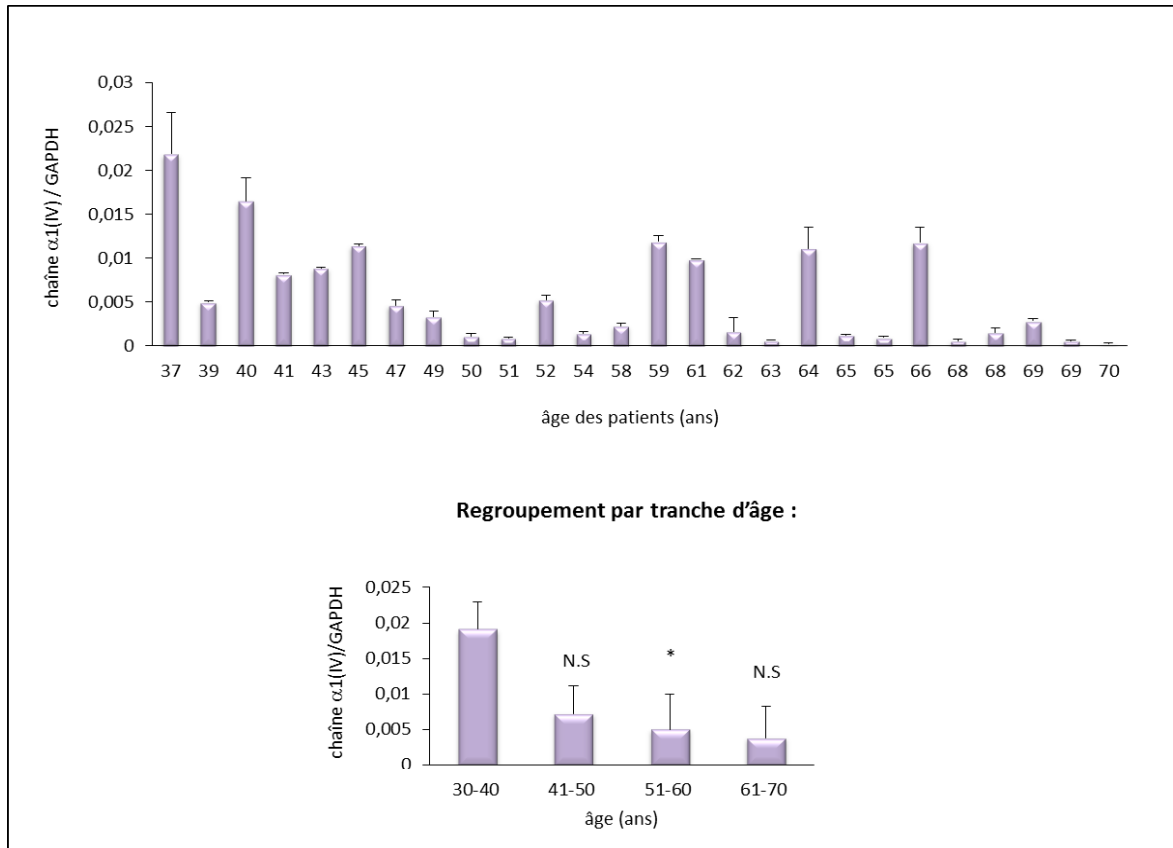


Figure 42: Etude, par PCR en temps réel, de l'expression de la chaîne $\alpha 1(IV)$ par les fibroblastes dermiques humains issus de seins au cours du vieillissement
Les fibroblastes dermiques étudiés ont été isolés à partir de fragments de seins de patients regroupés en 4 tranches d'âge: 30-40 ans (n=3), de 41-50 ans (n=6), 51-60 ans (n=5) et 61-70 ans (n=12.) L'expression de la chaîne $\alpha 1(IV)$ à été analysée par PCR en temps réel.

I-2-2-2 Niveau protéique

Pour confirmer cette tendance à la diminution d'expression de collagène IV par les fibroblastes dermiques au cours du vieillissement, nous avons réalisé un dosage E.L.I.S.A à partir de milieux conditionnés de culture de fibroblastes issus de seins de patients de 39, 54, 73 et 81 ans. Une baisse de 62.5% de la concentration en collagène IV est observée entre les milieux conditionnés issus de patients de 39 ans et de 54 ans.

Entre les deux extrêmes 39 et 81 ans, la baisse de concentration en collagène IV est de plus de 90% (figure 43).

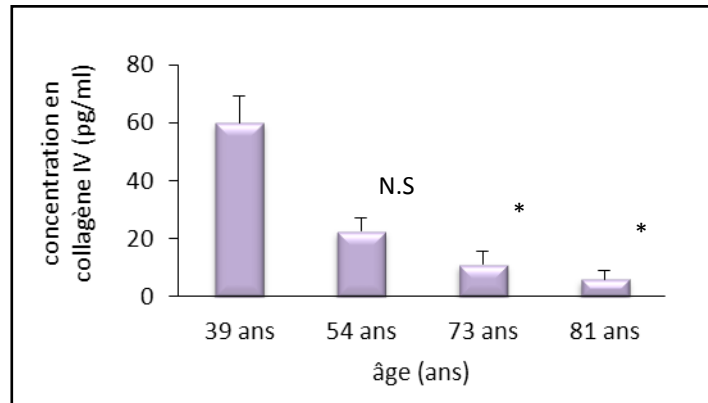


Figure 43: Etude, par dosage E.L.I.S.A, de la production de collagène IV par les fibroblastes dermiques humains

Les milieux conditionnés de fibroblastes issus de 4 patients d'âges différents ont été mis en présence des anticorps anti-collagène IV couplé à de la biotine. Puis de l'avidine-HRP est ajouté et la révélation se fait par ajout du substrat TMB. La lecture de l'absorbance se fait à 450 nm.

Les variations interindividuelles importantes vont rendre très difficile l'étude du mécanisme impliqué dans la diminution de collagène IV au cours du vieillissement puisque nous avons observé que certains fibroblastes de patients de 60 ans exprimaient plus de collagène IV que ceux de patients de 35 ans. Nous avons donc décidé d'étudier ce mécanisme dans un modèle de vieillissement présentant moins de variations interindividuelles.

II. Mise au point d'un modèle de vieillissement accéléré pour étudier la diminution de collagène IV

II-1 Modèle murin

Nous avons tout d'abord pensé au modèle murin, très utilisé du fait de sa disponibilité, de son faible coût, du fait que 99 % de ses gènes soient communs avec ceux de l'homme. De plus, les souris présentent une durée de vie courte, ce qui offre la possibilité de travailler sur une même souris au cours de son vieillissement. Pour cela, nous devons d'abord déterminer si la diminution d'expression des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6(IV)$ observée chez l'Homme était également retrouvée au niveau des fibroblastes dermiques murins. Pour cela, des fibroblastes murins ont été isolés à partir de biopsies cutanées réalisées sur le dos de souris C57Bl6 ayant subi un vieillissement normal ou accéléré (senescence accelerated mice ou SAM).

II-1-1 Vieillissement naturel

Nous avons isolé des fibroblastes de souris jeunes (7 semaines) et de souris âgées (95 semaines). A confluence, l'extraction d'ARN a été réalisée et l'expression des gènes codant pour les différentes chaînes $\alpha(IV)$ analysée par PCR en temps réel.

Nous observons une diminution de 68 % de l'expression des gènes codant pour $\alpha 1(IV)$ et de 55 % pour $\alpha 2(IV)$ au cours du vieillissement tandis que pour les chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6(IV)$, c'est une augmentation de 38 et 86% respectivement qui est observée (figure 44).

Nous ne pouvons donc pas utiliser ce modèle car les chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6(IV)$ ne suivent pas la même évolution que chez l'humain. Elles semblent « compenser » la diminution des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$.

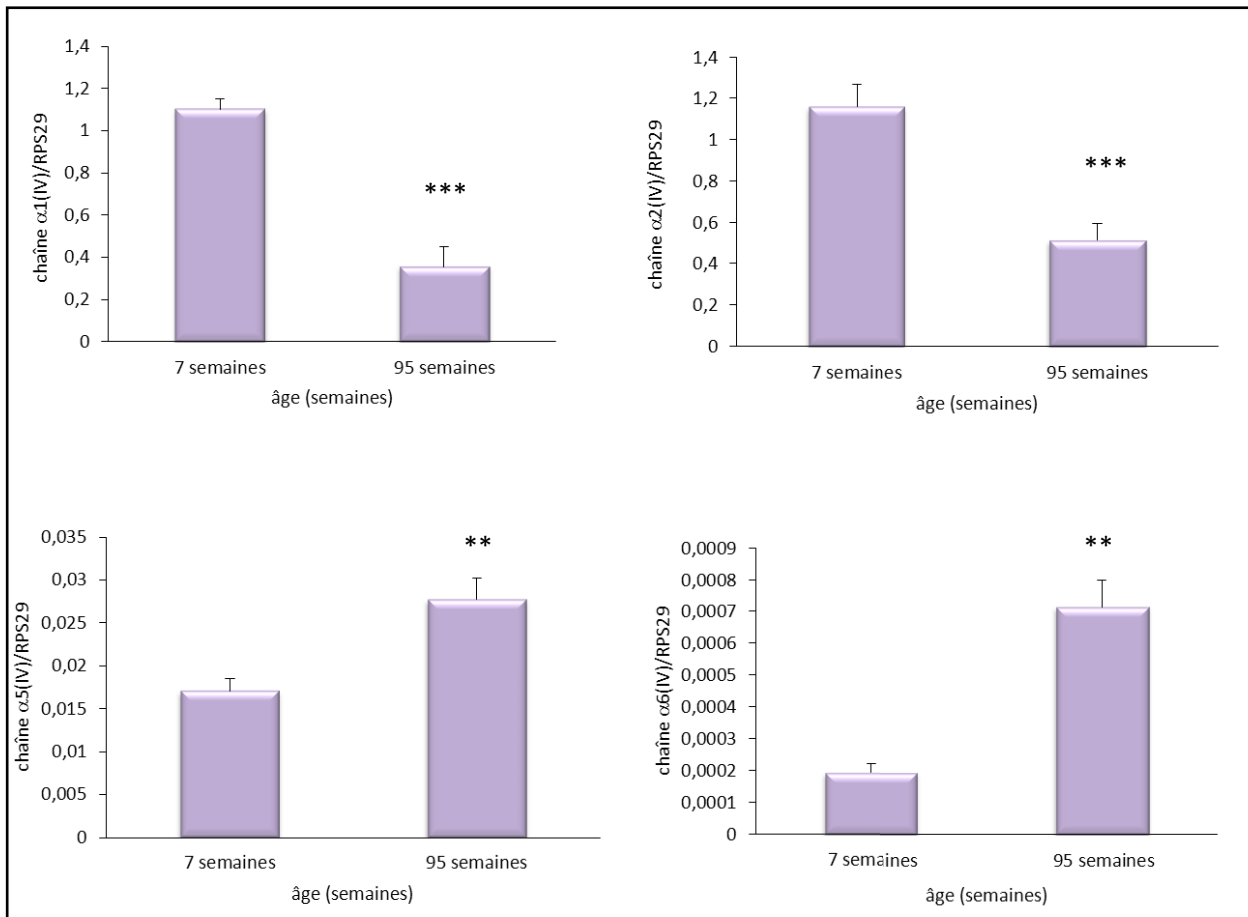


Figure 44: Etude, par PCR en temps réel, de l'expression des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6(IV)$ par des fibroblastes dermiques murins prélevés chez des souris âgées de 7 et 95 semaines
Des fibroblastes de souris de 7 et 95 semaines ont été isolés. L'expression génique des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6(IV)$ à été dosé par PCR en temps réel. L'expérience à été réalisée en triplicata.

II-1-2 Vieillessement accéléré : souris SAM

La souris en sénescence accélérée (SAM, pour Senescence-Accelerated Mouse) est un modèle de vieillissement établi par une sélection phénotypique à partir d'un pool génétique des souris d'AKR/J. Parmi les souris SAM, les souris SAMP (Senescence-Accelerated Mouse Prone) sont considérées actuellement comme un bon modèle de vieillissement. Avec l'âge, ces animaux montrent des déficits de mémoire et également une augmentation de marqueurs de stress oxydatif, dans le cerveau et dans plusieurs organes périphériques.

Dans cette étude, nous avons utilisé des ARN de fibroblastes à P0 provenant de la peau du dos de souris SAMP et SAMR (Senescence-Accelerated Mouse Resistant) témoin.

Nous constatons que pour les souris présentant un vieillissement accéléré, il n'y a

aucune variation significative de l'expression génique des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$ (figure 45). Ces souris ne constituent donc pas un bon modèle d'étude.

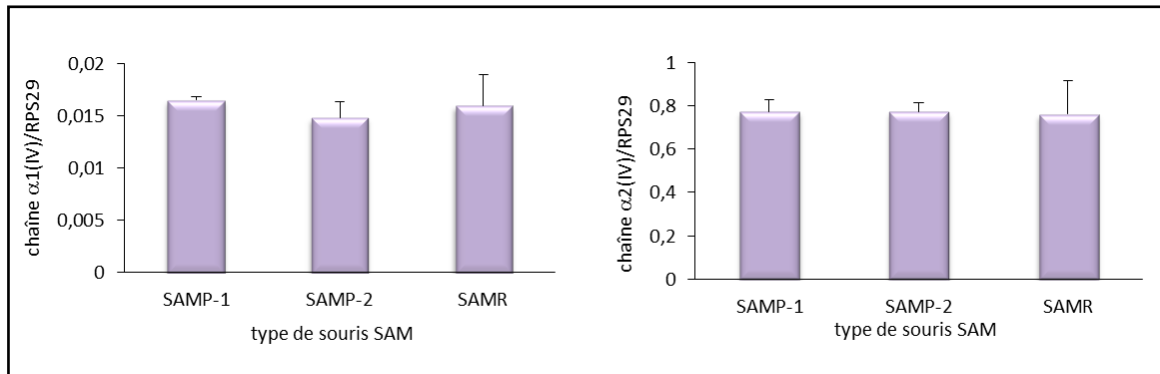


Figure 45: Etude, par PCR en temps réel, de l'expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$ par des fibroblastes dermiques murins provenant de souris SAM

Des fibroblastes de souris SAMR et SAMP ont été isolés. L'expression génique des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$ a été mesurée par PCR en temps réel. L'expérience a été réalisée en triplicata.

II-2 Modèle humain

II-2-1 Vieillessement par passages successifs

Le modèle de vieillissement des fibroblastes par passages successifs est représentatif du vieillissement chronologique puisqu'il s'agit d'induire la sénescence répliquative du fibroblaste (sénescence induite par réduction progressive des extrémités télomériques). Il suffit de faire proliférer des fibroblastes *in vitro* dans des boîtes de culture en utilisant des conditions nutritionnelles et d'oxygénation précises. Nous avons alors effectué des "passages" successifs: lorsque les cellules ensemencées sont arrivées à confluence par multiplication mitotique, il suffit de les "repiquer" pour obtenir un nouveau "passage" et de nouvelles mitoses, ainsi de suite... Pour un passage donné, le nombre des mitoses reste limité. En effet, lorsque les cellules atteignent la confluence et forment un tapis continu au fond de la boîte, le mécanisme d'inhibition de contact stoppe l'entrée des fibroblastes dans le cycle répliquatif. La théorie de Hayflick nous apprend que le nombre des passages est limité pour un fibroblaste normal (environ 65 passages chez l'Homme soit environ 180 à 200 mitoses successives). En effet, la perte progressive des télomères à chaque mitose induira l'arrêt irréversible du cycle cellulaire et la cellule entrera en sénescence.

Nous avons donc commencé à travailler avec des fibroblastes issus de patient de 10 ans et nous les avons cultivés jusqu'au 10^{ème} passage. Dans un premier temps nous avons

vérifié que les cellules à passage 10 peuvent réellement être considérées comme « vieilles » en étudiant l'expression de gènes témoins de la sénescence répllicative. L'expression de collagène I est décrite comme diminuant au cours du vieillissement, alors que celle de la MMP-1 augmente.

Dans un second temps, nous avons étudié l'expression du collagène IV afin de vérifier qu'elle se comporte comme lors du vieillissement physiologique.

II-2-1-1 Mise en évidence du phénotype sénescence

II-2-1-1-1 Etude de la morphologie

D'un point de vue morphologique, une cellule entrant en sénescence devient plus étalée, avec un noyau plus large et un volume cytoplasmique accru. Des modifications du cytosquelette sont à l'origine de cette morphologie caractéristique. Des fibroblastes issus d'un patient de 10 ans ont été cultivés jusqu'au passage 15. La morphologie des cellules au 6^{ème} passage a été comparée à celle des fibroblastes au 15^{ème} passage. Une morphologie caractéristique des cellules à p15 est observée ; les cellules sont plus volumineuses et plus étalées (figure 46).

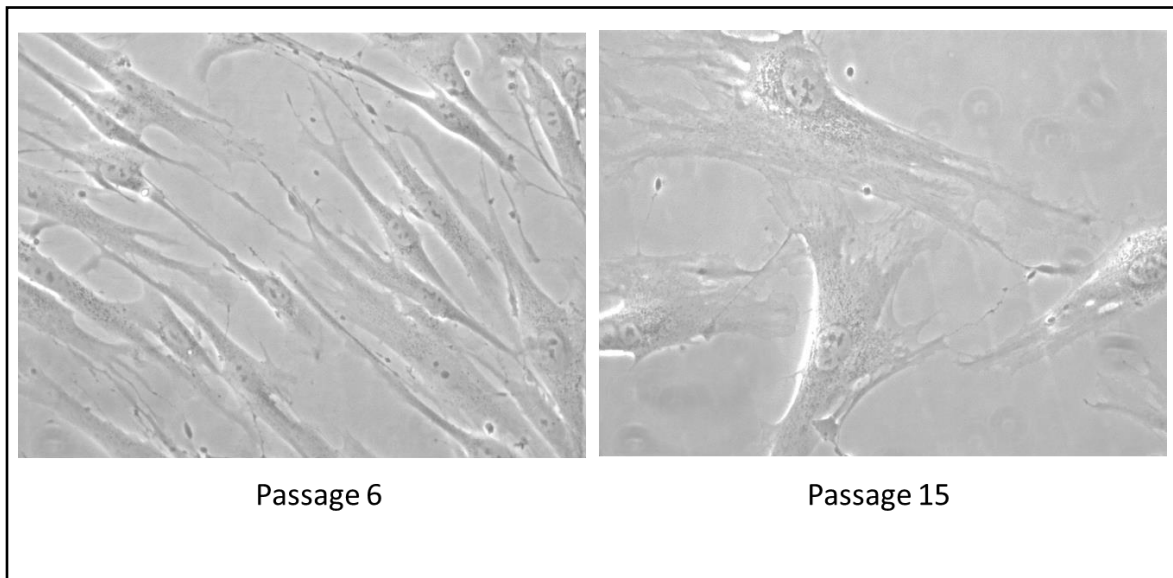


Figure 46: Observation morphologique, par microscopie optique, des fibroblastes dermiques cultivés aux passages 6 et 15 (objectif x40)

Les fibroblastes issus d'un patient de 10 ans et cultivés à passage 6 et 15 ont été observés au microscope optique à l'objectif 40.

II-2-1-1-2 Observation de l'activité de la SA β -Galactosidase

Hormis l'accroissement de taille, une autre caractéristique phénotypique des cellules sénescentes est l'augmentation du nombre et du volume des lysosomes (Lee, Han et al. 2006).

La β -galactosidase est naturellement présente dans les lysosomes. Bien que son activité soit optimale à pH 4, il a été proposé qu'une activité résiduelle existe à pH 6. Ainsi, du fait de l'augmentation de la quantité de lysosomes, donc de β -galactosidase, cette activité devient détectable dans les cellules sénescentes. A partir de fibroblastes prélevés chez un patient de 7 ans, la quantité de cellules sénescentes est plus élevée chez les fibroblastes à p15 par rapport à p7 (figure 47).

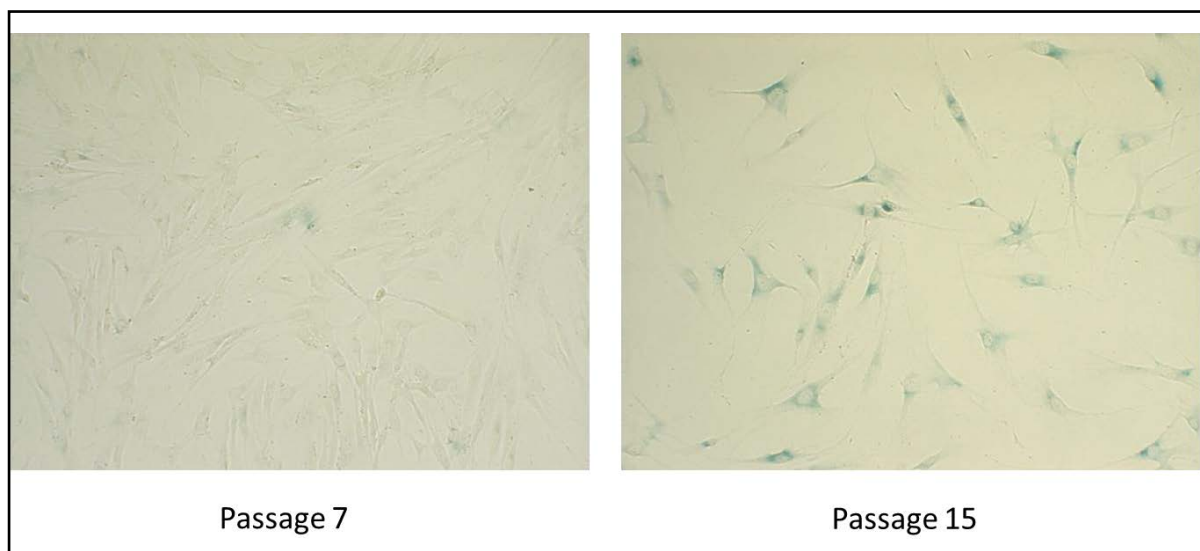


Figure 47: Observation, par microscopie optique, de l'activité de la SA- β galactosidase de fibroblastes dermiques cultivés à p7 et p15.

Les fibroblastes issus d'un patient de 10 ans et cultivés jusqu'au passage 15 ont été mis en contact du substrat X-gal à pH6 et observés au microscope optique à l'objectif 20.

Comme précédemment, nous avons extrait l'ARN des fibroblastes puis étudié l'expression des gènes d'intérêt par PCR en temps réel. Pour cette étude, nous avons utilisé RPS29 comme gène de ménage car l'expression de la GAPDH varie au cours des passages successifs.

II-2-1-1-3 Etude de l'expression de collagène I

Le collagène I est bien connu pour sa diminution d'expression au cours du vieillissement physiologique. Entre le 4^{ème} et le 10^{ème} passage, il y a une diminution de 42% de l'expression génique du collagène I par les fibroblastes (figure 48).

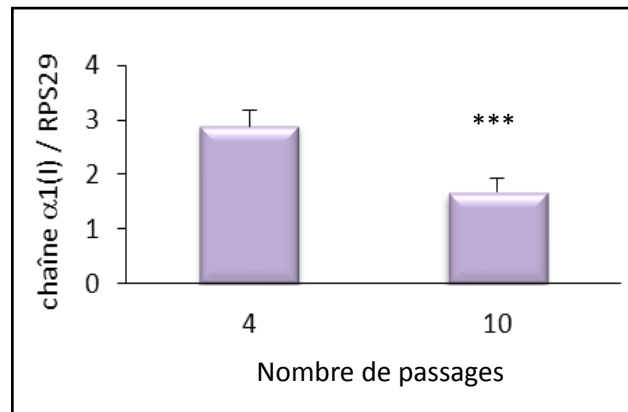


Figure 48: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne $\alpha 1(I)$ par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10.

Les fibroblastes sont issus d'un patient de 10 ans et cultivés jusqu'au passage 10. L'expression de la chaîne $\alpha 1$ (IV) a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage RPS29. L'expérience a été réalisée en triplicata.

II-2-1-1-4 Etude de l'expression de la MMP-1

La MMP-1 est connue comme augmentant lors d'un vieillissement chronologique. Cependant, il s'avère que dans ce modèle, nous observons une diminution de son expression de 78% entre les passages 4 et 10 (figure 49).

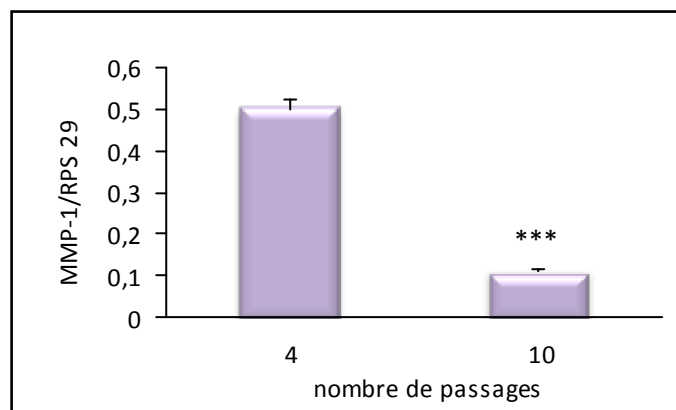


Figure 49 : Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10.

Les fibroblastes sont issus d'un patient de 10 ans et cultivés jusqu'au passage 10. L'expression de la MMP-1 a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage RPS29. L'expérience a été réalisée en triplicata.

II-2-1-1-5 Etude de l'expression de gènes associés à la sénescence

4 gènes sont connus comme augmentant au cours de la sénescence, c'est pourquoi ils sont souvent étudiés pour vérifier l'induction ou non du vieillissement cellulaire.

Il s'agit de gènes codant pour la fibronectine, l'ostéonectine, la smooth muscle 22 (SM22) et l'apoprotéine J (Dumont et coll, 2000). Entre les passages 4 et 10, il y a une augmentation significative de l'expression de ces 4 gènes (de 30%, 47%, 26% et 42% respectivement) (figure 50).

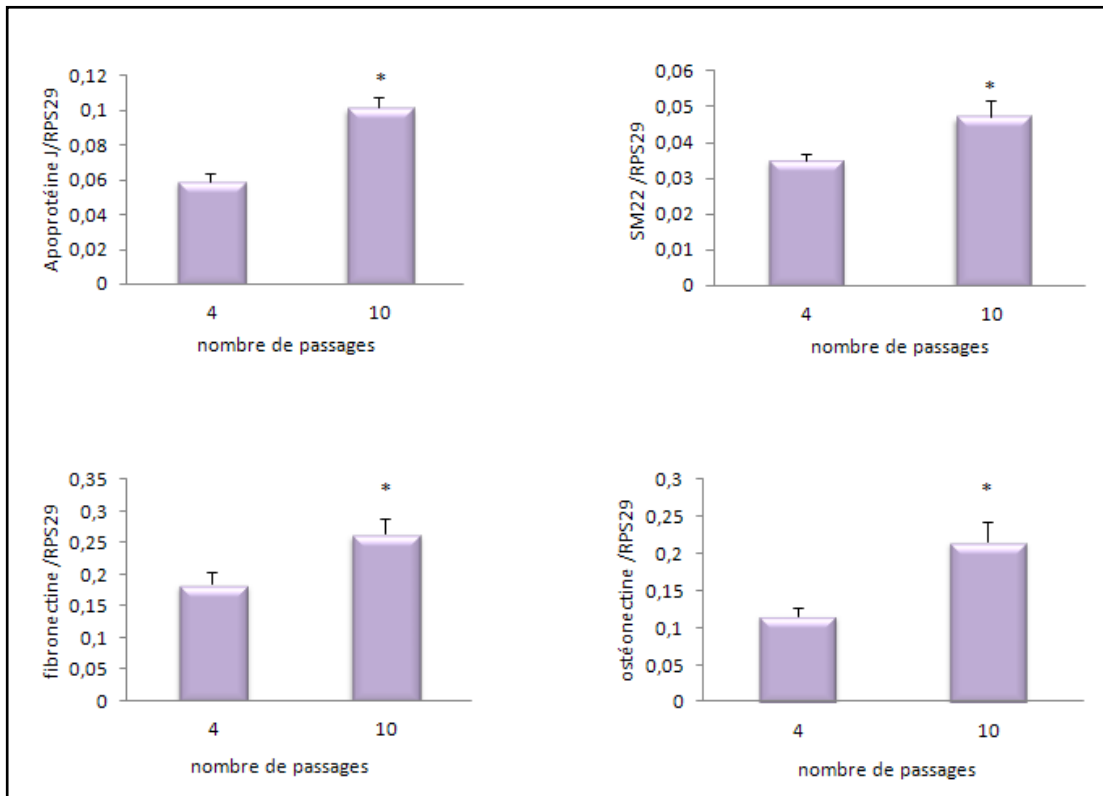


Figure 50: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de gènes associés à la sénescence par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10.

Les fibroblastes sont issus d'un patient de 10 ans et cultivés jusqu'au passage 10. L'expression génique de l'apoptine J, de la SM22, de la fibronectine et de l'ostéonectine a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage RPS29. L'expérience a été réalisée en triplicata.

II-2-1-1-6 Etude de l'expression de gènes associés au cycle cellulaire

Comme démontré par l'équipe de Furukawa en 2007, lors de la sénescence, p53 est activée et cela induit une augmentation de p21^{WAF-1} qui est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire par blocage des complexes cyclines/CDK.

Nous observons une augmentation significative de 52,5% de l'expression génique de $p21^{WAF-1}$, ce qui témoigne de l'arrêt du cycle cellulaire. $p53$ ne varie pas de manière significative (figure 51).

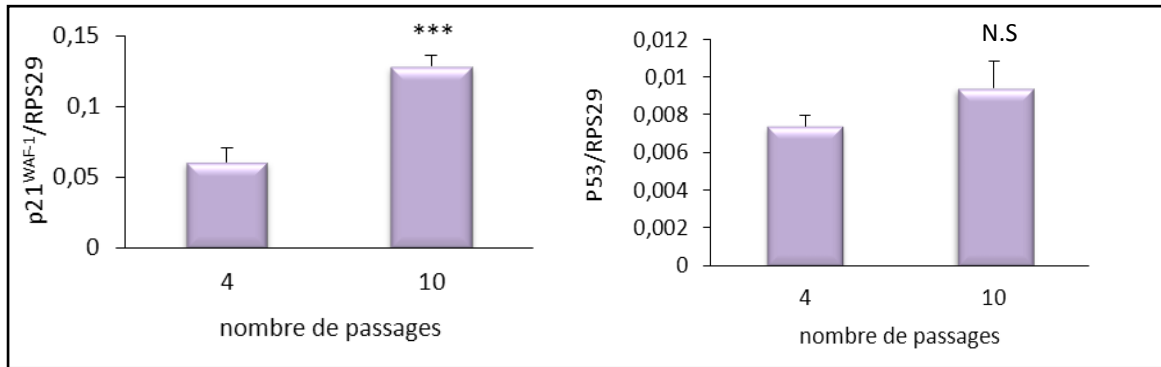


Figure 51: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de $p21^{WAF-1}$ et de $p53$ par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10.

Les fibroblastes sont issus d'un patient de 10 ans et cultivés jusqu'au passage 10. L'expression génique de $p21^{WAF-1}$ et de $p53$ a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage $RPS29$. L'expérience a été réalisée en triplicata.

II-2-1-2 Etude de l'expression du collagène IV

Nous avons donc montré que les fibroblastes présentent un phénotype sénescence à passage 10. Nous avons, par la suite, vérifié que l'expression du collagène IV suivait bien la même évolution que lors d'un vieillissement naturel.

II-2-1-2-1 Expression génique des chaînes $\alpha1$ et $\alpha2(IV)$

L'expression génique des chaînes $\alpha1$ et $\alpha2(IV)$ diminue respectivement de 60 et 86% entre les passages 4 et 10 (figure 52). Ce modèle de vieillissement suit donc la même variation d'expression génique que lors d'un vieillissement chronologique. La dernière étape nécessaire à la validation du modèle est de vérifier que l'expression protéique diminue également au cours de cette sénescence répliquative.

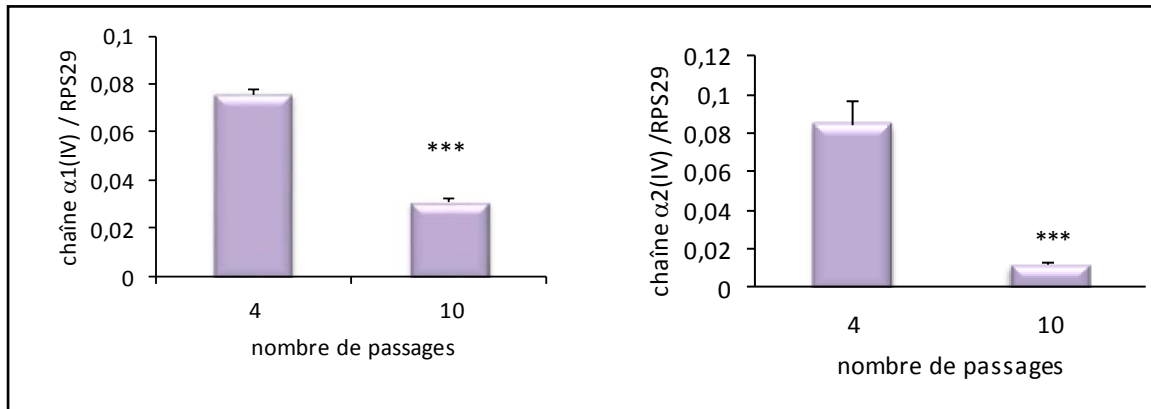


Figure 52: Etude, par PCR temps réel, de l'expression des chaînes $\alpha1$ et $\alpha2(IV)$ par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10.

Les fibroblastes sont issus d'un patient de 10 ans et cultivés jusqu'au passage 10. L'expression génique des chaînes $\alpha1$ et $\alpha2(IV)$ a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage RPS29. L'expérience a été réalisée en triplicata.

II-2-1-2-2 Expression protéique du collagène IV

II-2-1-2-2-1 Par western-blot

Nous avons réalisé des western-blots de la chaîne $\alpha1(IV)$ à partir des milieux conditionnés de fibroblastes issus de patients de 10 ans (fibroblastes utilisés pour l'étude de l'expression génique) à passage 4 et à passage 15. Il n'y a pas de variation significative de l'expression protéique de collagène IV entre le 4^{ème} et le 15^{ème} passage (figure 53). Ce résultat n'est pas corrélé à la diminution d'expression génique retrouvée entre le 4^{ème} et le 10^{ème} passage. Il ne reflète pas non plus la diminution d'expression observée dans les conditions de vieillissement physiologique.

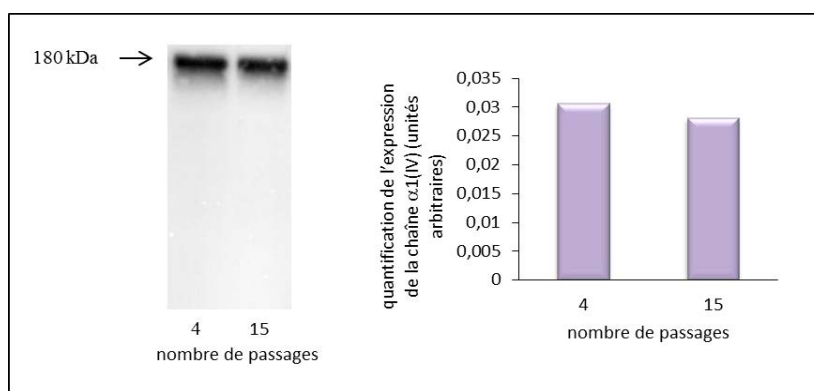


Figure 53: Etude, par western-blot, de l'expression de la chaîne $\alpha1(IV)$ par les fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10.

Les fibroblastes sont issus d'un patient de 10 ans et cultivés jusqu'à passage 10. L'expression protéique de la chaîne $\alpha1(IV)$ a été analysée par western blot (50 μ g de protéines totales ont été déposés sur un gel contenant 7.5% d'acrylamide). La quantification relative se mesure par la ratio de la bande d'intérêt sur la quantité de protéines totales contenue dans les échantillons.

Pour vérifier que le résultat obtenu n'est pas dépendant du patient étudié, nous avons réalisé cette étude de la variation protéique de la chaîne $\alpha 1(IV)$ sur des fibroblastes provenant de divers patients.

Les milieux conditionnés de fibroblastes provenant de patients de 2 ans ont été collectés à passage 4 et comparés à ceux collectés à passage 9 ; d'autres milieux ont été collectés à partir de fibroblastes de patients de 79 ans et comparés à passage 4 et 10. Nous n'observons pas non plus de variations majeures de l'expression protéique de la chaîne $\alpha 1(IV)$ dans ces deux séries de fibroblastes (figure 54).

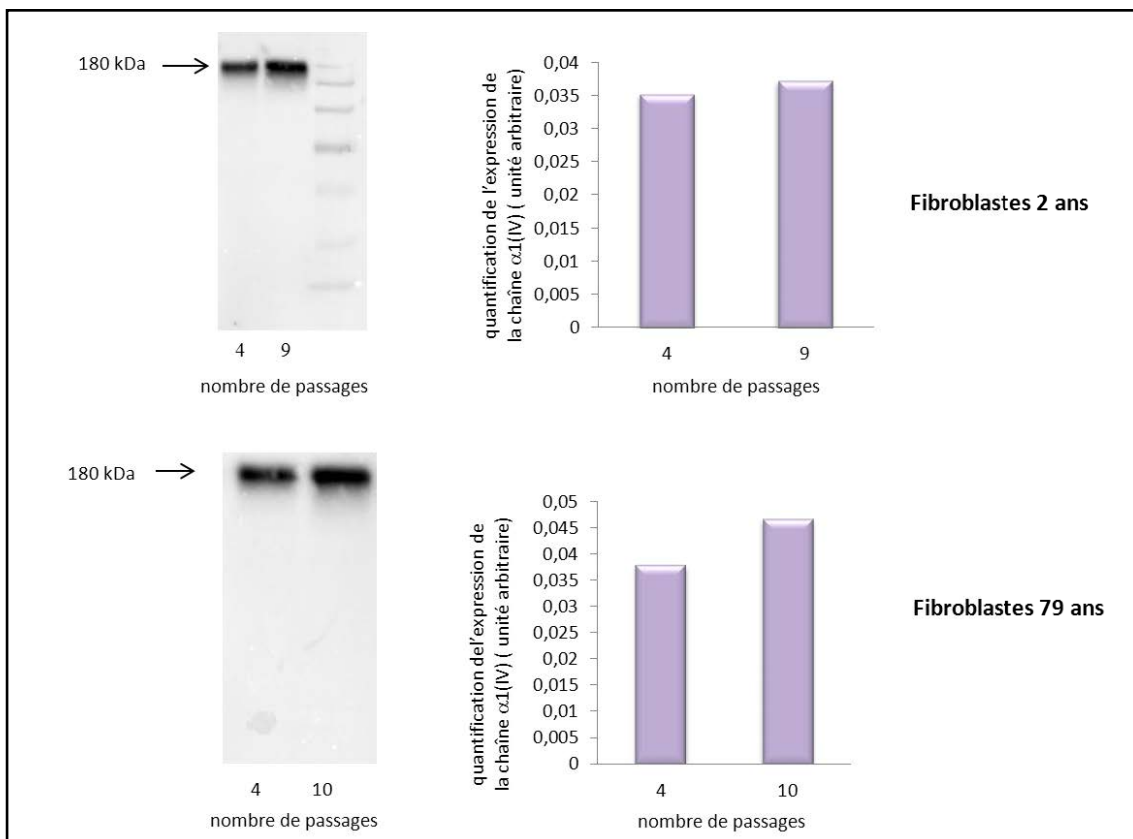


Figure 54: Etude, par western-blot, de l'expression de la chaîne $\alpha 1(IV)$ par les fibroblastes dermiques issus de patients âgés de 2 et 79 ans à différents passages

Les fibroblastes sont issus d'un patient de 2 ans et cultivés à passage 4 et 9 et d'un patient de 79 ans et cultivés à passage 4 et 10. L'expression protéique de la chaîne $\alpha 1(IV)$ a été analysée par western blot (50 μ g de protéines totales ont été déposés sur un gel contenant 7.5% d'acrylamide). La quantification relative se mesure par la ratio de la bande d'intérêt sur la quantité de protéines totales contenue dans les échantillons.

II-2-1-2-2-2 Par dosage ELISA

Le contenu en collagène IV des milieux conditionnés provenant de fibroblastes issus de patients de 10 ans (p4 et p15) ont été dosés par ELISA. Il n'y a pas de variation

significative de la concentration de collagène IV (458 pg/mL à p4 et 440 pg/mL à p15) (figure 55). Nous excluons donc ce modèle pour l'étude de la variation du collagène IV étant donné que nous ne retrouvons pas la diminution protéique observée lors du vieillissement chronologique.

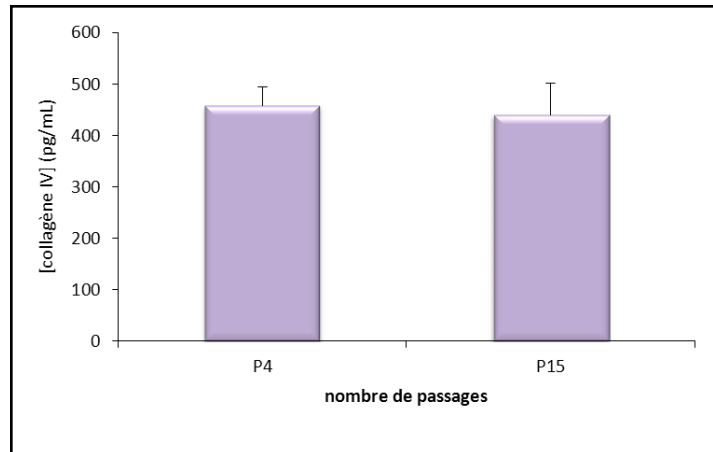


Figure 55: Etude, par dosage ELISA, de la production de collagène IV par fibroblastes dermiques cultivés aux passages 4 et 10.

Les milieux conditionnés de fibroblastes issus d'un patient de 10 ans et cultivés à passage 4 et 10 ont été mis en présence des anticorps anti-collagène IV couplé à de la biotine. Puis de l'avidine-HRP est ajouté et la révélation se fait par ajout du substrat TMB. La lecture de l'absorbance se fait à 450 nm.

II-2-2 Sénescence prématurée induite par le stress

Après abandon du précédent modèle, nous avons donc décidé de mettre au point un modèle de vieillissement des fibroblastes par SIPS (senescence induite par un stress). Nous avons testé deux types de stress : l'un est inspiré des travaux de Dmitrieva et Burg en 2007 et consiste à traiter les cellules avec de fortes concentrations en chlorure de sodium ; l'autre est le modèle de vieillissement des fibroblastes par des doses élevées mais non létales de peroxyde d'hydrogène, modèle le plus utilisé. Voici un tableau récapitulatif des différentes séries de fibroblastes utilisées pour cette étude.

Pour le stress induit par traitement avec H₂O₂, les doses utilisées vont de 50 à 200 μM (figure 56).



Figure 56: Récapitulatif du traitement des fibroblastes avec H₂O₂
Les fibroblastes sont traités 1h30 avec 0 à 200 μM d' H₂O₂. les cellules sont ensuite rincées et le milieu est remplacé par un milieu neuf sans sérum pendant 48h.

Pour le stress induit par traitement au NaCl, nous avons traité avec des doses finales de 200 à 300 mM, la dose témoin contenu dans le milieu de culture étant de 150 mM (figure 57).

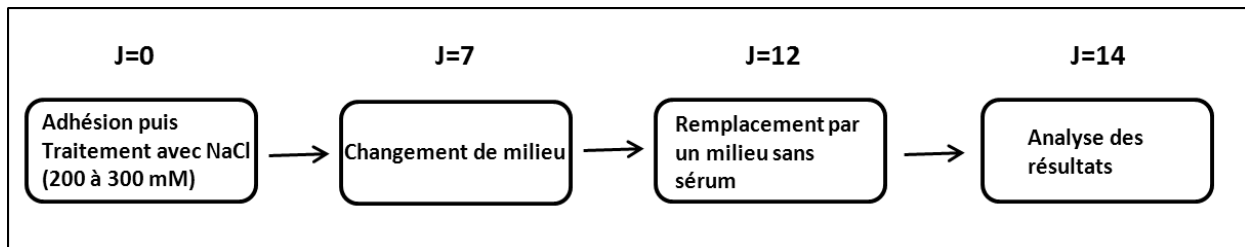


Figure 57: Récapitulatif du traitement des fibroblastes avec NaCl
Les fibroblastes sont incubés pendant 14 jours avec 150 à 300 mM de NaCl. Le milieu est renouvelé le 7^{ème} jour. Le 12^{ème} jour le milieu est remplacé par un milieu sans sérum pendant 48h.

II-2-2-1 Test de viabilité au bleu trypan

Nous avons tout d'abord vérifié quelles concentrations en H₂O₂ et NaCl pouvaient être utilisées sans qu'il y ait apparition de toxicité. Pour cela, nous avons réalisé des tests de viabilité cellulaire au bleu trypan. Pour les fibroblastes traités avec le peroxyde d'hydrogène, nous avons testé la viabilité sur 9 séries de cellules et calculé le pourcentage moyen de viabilité en fonction de la dose d'H₂O₂ utilisé (figure 58). Nous avons alors décidé de sélectionner la dose de 100 μM d'H₂O₂ puisqu'au-delà, la mortalité est supérieure à 5% (15% et 23% pour 150 et 200 μM respectivement).

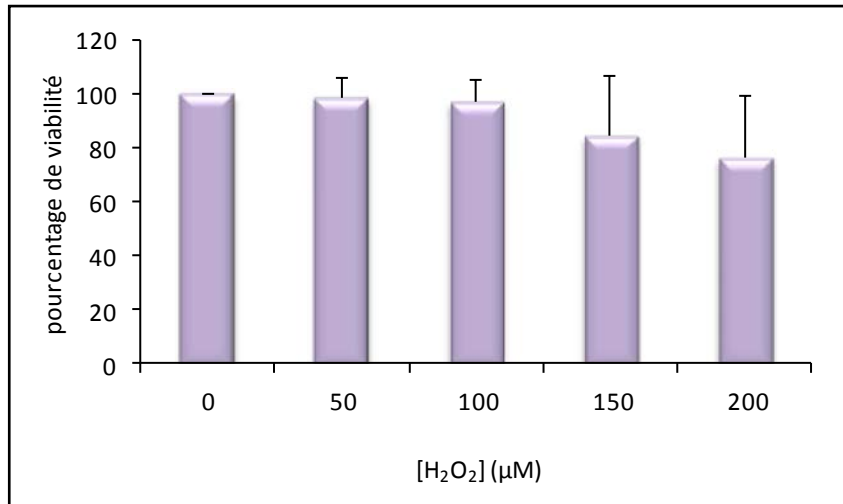


Figure 58: Mesure, par coloration au bleu trypan, de la viabilité des fibroblastes dermiques traités avec 0 à 200 μM d'H₂O₂

La viabilité des cellules traitées avec 0 à 200 μM d' H₂O₂ est mesurée par le test au bleu trypan. Le bleu trypan est ajouté au culot cellulaire (à volume égal), 10 μL sont déposés sur lame placée sur un appareil de comptage automatique. (Etude réalisée sur 6 séries de fibroblastes issus de patients de 1 an, 2 ans, 5 ans et 48 ans et utilisés avant le 5^{ème} passage).

Pour les fibroblastes traités avec le chlorure de sodium, les tests de viabilité ont été réalisés sur 6 séries de fibroblastes (figure 59). Nous avons décidé de sélectionner la dose de 225 mM de NaCl puisqu'au-delà, la mortalité est supérieure à 5% (17,5% et 32% pour 250 et 300 mM respectivement).

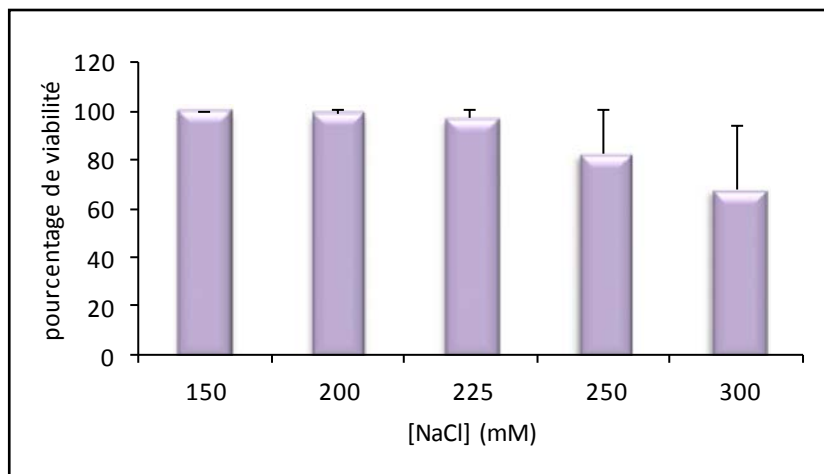


Figure 59: Mesure, par coloration au bleu trypan, de la viabilité des fibroblastes dermiques traités avec 150 à 300 mM de NaCl

La viabilité des cellules incubées en présence de 150 à 300 mM de NaCl est mesurée par le test au bleu trypan. Le bleu trypan est ajouté au culot cellulaire (à volume égal), 10 μL sont déposés sur lame placée sur un appareil de comptage automatique. (Etude réalisée sur 5 séries de fibroblastes issus de patients de 1 an, 2 ans, 4 ans, 5 ans et 48 ans et utilisés avant le 5^{ème} passage).

II-2-2-2 Mise en évidence du phénotype sénescence

II-2-2-2-1 Etude de la morphologie

La première chose à faire pour vérifier l'induction de la sénescence aux doses sub-toxiques déterminées est donc l'observation microscopique des cellules.

Les cellules traitées avec 100 μM d' H_2O_2 présentent une morphologie caractéristique des cellules sénescences. Elles sont plus grandes, plus larges et plus étalées que les fibroblastes contrôles fusiformes (figure 60).

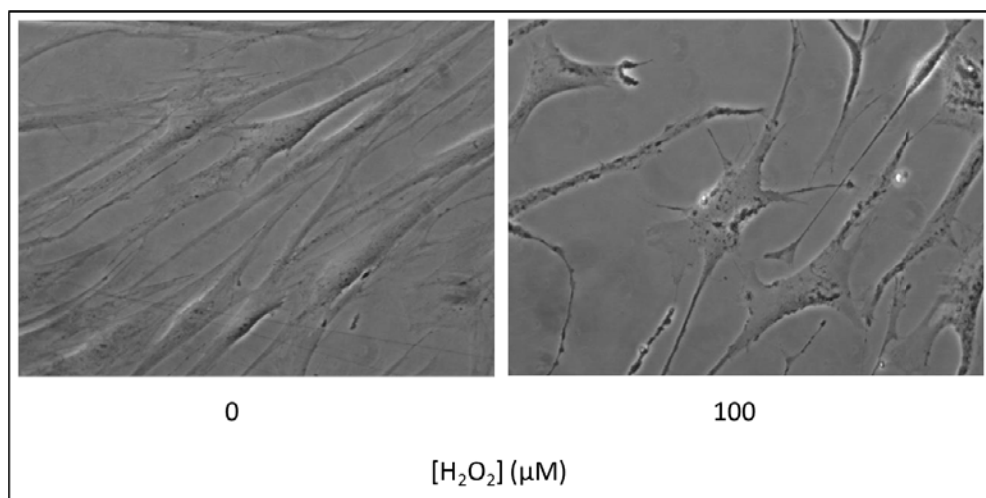


Figure 60: Observation morphologique, par microscopie optique, des fibroblastes dermiques humains traités avec des doses croissantes d' H_2O_2 (objectif x40)

Les fibroblastes contrôles et traités avec 100 μM H_2O_2 issus d'un patient de 5 ans et utilisés avant le 5^{ème} passage ont été observés au microscope optique à l'objectif 40.

Les cellules traitées avec 225 mM de NaCl présentent également cette morphologie caractéristique (figure 61).

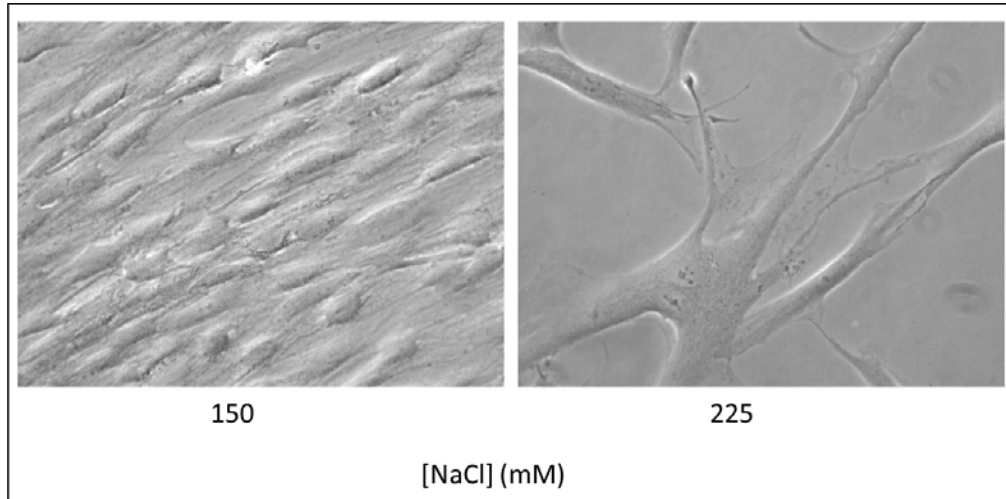


Figure 61: Observation morphologique, par microscopie optique, des fibroblastes dermiques traités avec des doses croissantes de NaCl (objectif x40)

Les fibroblastes contrôles (incubés en présence de 150 mM de NaCl) et incubés en présence de 225 mM de NaCl issus d'un patient de 4 ans et utilisés avant le 5^{ème} passage ont été observés au microscope optique à l'objectif 40.

II-2-2-2-2 Observation de l'activité de la SA-β-Galactosidase

Les fibroblastes traités avec 100 μM d'H₂O₂ présentent la coloration caractéristique des cellules sénescentes alors que les contrôles en présentent peu (figure 62).

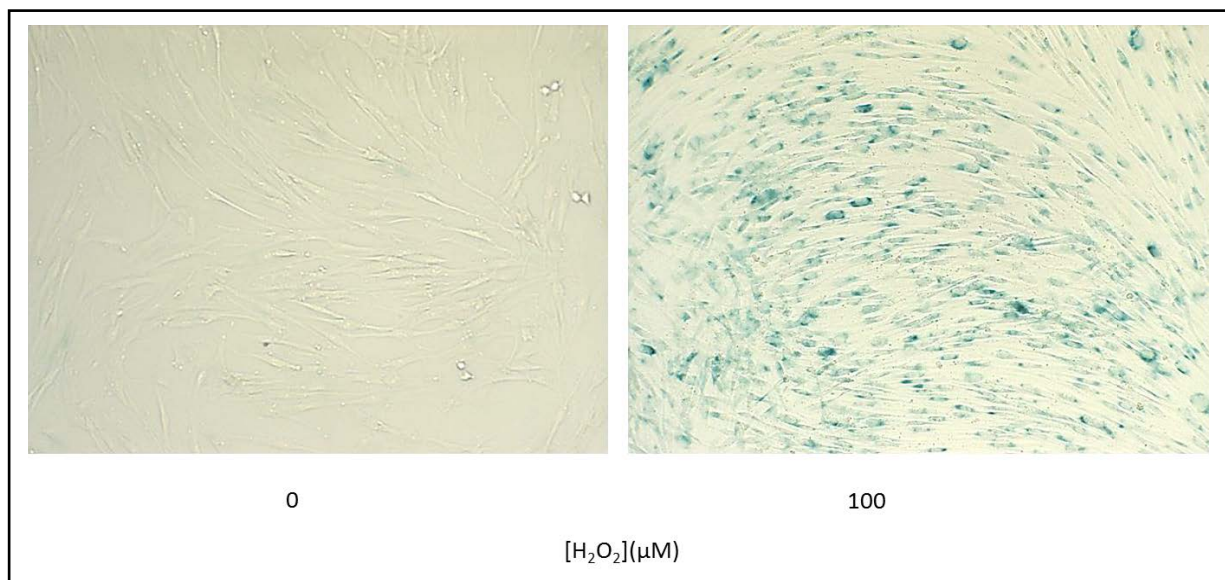


Figure 62: Observation, par microscopie optique, de l'activité de la SA-β galactosidase de fibroblastes dermiques traités avec 100 μM d'H₂O₂ (objectif x 10)

Les fibroblastes contrôles et traités avec 100 μM H₂O₂ issus d'un patient de 5 ans et utilisés avant le 5^{ème} passage ont été mis en contact du substrat X-gal à pH6 et observés au microscope optique à l'objectif 10.

Les fibroblastes traités avec 225 mM de NaCl présentent bien la coloration caractéristique des cellules sénescentes alors que les cellules contrôles ne présentent pas de coloration (figure 63). Ce résultat confirme nos observations sur les changements morphologiques et l'état de sénescence des fibroblastes.

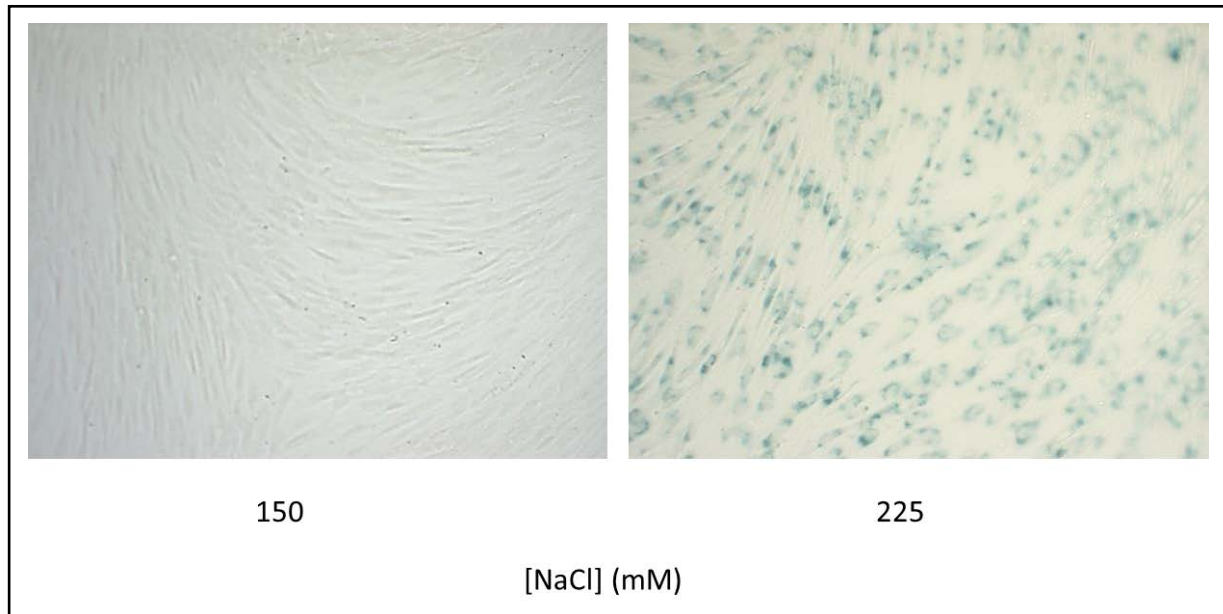


Figure 63: Observation, par microscopie optique, de l'activité de la SA-β galactosidase de fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl (objectif x 10)
Les fibroblastes contrôles (incubés en présence de 150 mM de NaCl) et incubés en présence de 225 mM de NaCl issus d'un patient de 1 an et utilisés avant le 5^{ème} passage ont été mis en contact du substrat X-gal à pH6 et observés au microscope optique à l'objectif 10.

Comme pour le modèle de sénescence répllicative, nous avons vérifié l'induction de la sénescence en étudiant l'expression de gènes connus pour varier lors du vieillissement. Cette étude est réalisée par PCR en temps réel.

II-2-2-2-3 Etude de l'expression de collagène I

Nous avons donc étudié l'expression génique du collagène de type I par les fibroblastes provenant de 3 patients différents pour le modèle avec H₂O₂ et 3 autres patients pour le modèle avec NaCl.

Pour les 3 séries de fibroblastes testées, nous observons une diminution d'expression du collagène I. Il y a une diminution de 90% entre les fibroblastes contrôles et ceux traités avec 100 μM d' H₂O₂ pour les fibroblastes issus de patients de 2 ans (F2), 54% pour les fibroblastes issus de patients de 5 ans (F5) et 88% pour fibroblastes issus de patients de 48 ans (F48) (figure 64).

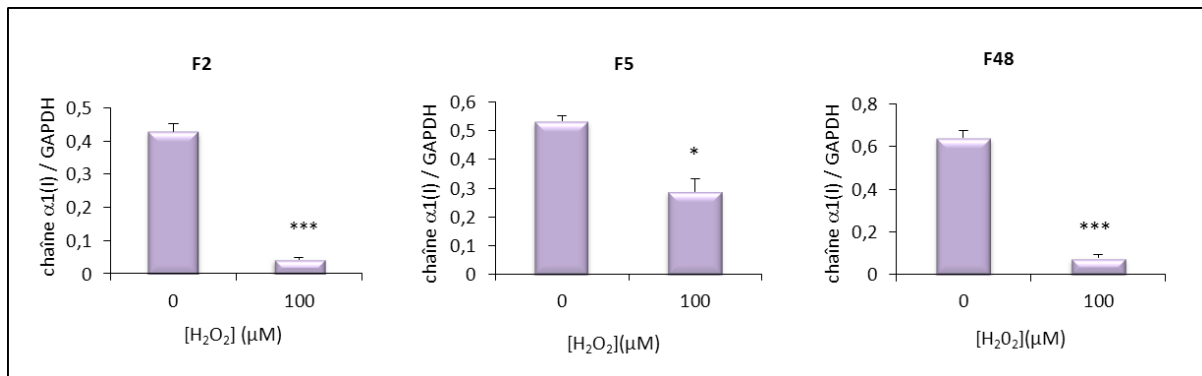


Figure 64: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne α1(I) par les fibroblastes dermiques traités avec 100 μM d'H₂O₂

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et traités avec 100 μM H₂O₂ issus de patients de 2 ans, de 5 ans et de 48 ans utilisés avant le 5^{ème} passage.

L'expression génique de la chaîne α1(I) a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

Pour les fibroblastes traités avec 225 mM de NaCl, nous observons également une diminution significative d'expression du collagène I entre les fibroblastes contrôles et ceux traités avec 225 mM. Une diminution de 43% pour les fibroblastes issus de patients de 1 an (F1), 19% pour les fibroblastes issus de patients de 5 ans (F5), et 94% pour les fibroblastes issus de patients de 48 ans (F48) (figure 65).

Les fibroblastes issus de patients les plus âgés réagissent davantage à l'induction de sénescence puisque la diminution d'expression est plus importante.

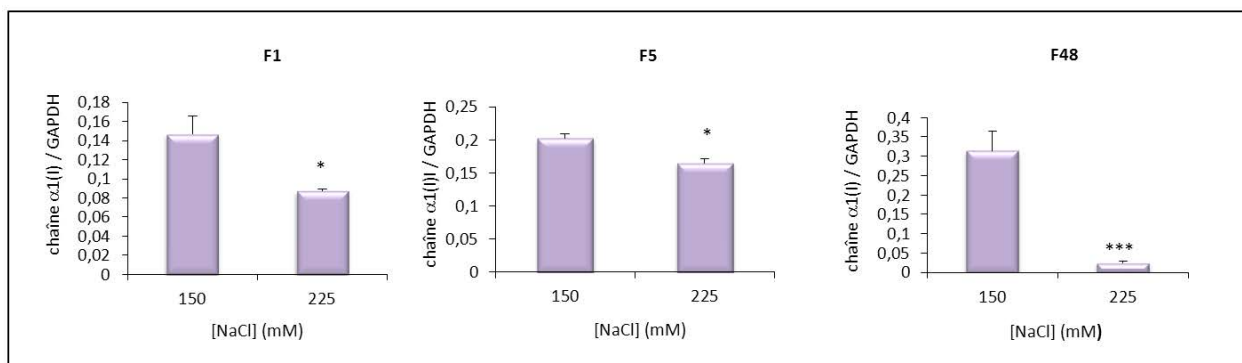


Figure 65: étude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne α1(I) par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et incubés avec 225 mM de NaCl issus de patients de 1 an, de 5 ans et de 48 ans utilisés avant le 5^{ème} passage.

L'expression génique de la chaîne α1(I) a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

II-2-2-2-4 Etude de l'expression de la MMP-1

Nous observons une augmentation significative de l'expression de MMP-1 par les fibroblastes traités avec 100 μM d' H_2O_2 par rapport aux fibroblastes contrôles. L'augmentation est de 122% pour les F2, 20% pour les F5 et 354% pour les F48 (figure 66).

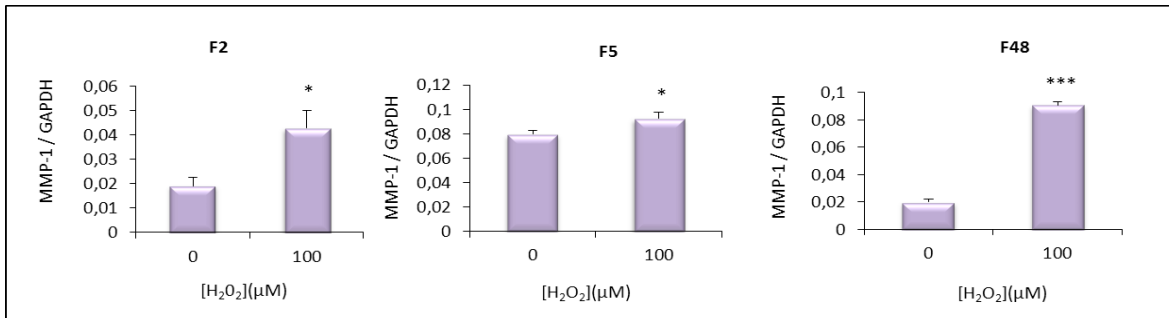


Figure 66: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques traités avec 100 μM d' H_2O_2

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et traités avec 100 μM H_2O_2 issus de patients de 2 ans, de 5 ans et de 48 ans utilisés avant le 5^{ème} passage (Toutes les études en PCR temps réel sur ce modèle de vieillissement ont été réalisées à partir de ces 3 séries de fibroblastes). L'expression génique de la MMP-1 a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

Une augmentation significative de l'expression de la MMP-1 est également observée pour les fibroblastes traités avec 225 mM de NaCl. L'augmentation est de 84% pour les F2, de 477% pour les F5 et de 3000% pour les F48 (figure 67). Une fois de plus les fibroblastes issus des patients les plus âgés répondent de façon plus importante au traitement.

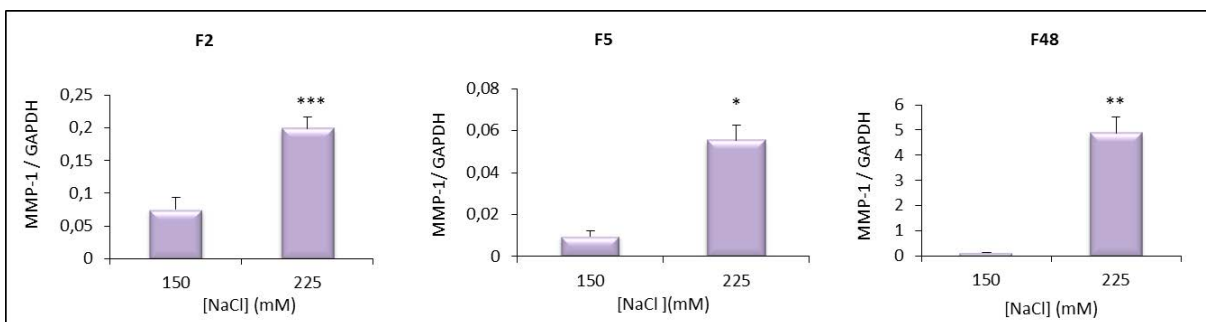


Figure 67: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la MMP-1 par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et incubés avec 225 mM de NaCl issus de patients de 1 an, de 5 ans et de 48 ans utilisés avant le 5^{ème} passage. (Toutes les études en PCR temps réel sur ce modèle de vieillissement ont été réalisées à partir de ces 3 séries de fibroblastes). L'expression génique de la MMP-1 a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

II-2-2-2-5 Etude de l'expression de gènes associés au cycle cellulaire

La sénescence (répllicative ou induite par un stress) est essentiellement induite par la voie de signalisation p53/p21^{WAF-1}. C'est pourquoi nous avons décidé de vérifier leur variation d'expression génique dans les deux modèles de vieillissement.

Il y a une augmentation de 72% de l'expression génique de p21^{WAF-1} dans les F5 traités avec 100 μ M d'H₂O₂. Le résultat est cohérent avec le phénotype sénescence des cellules puisque le cycle cellulaire est stoppé en phase G1 lors d'une augmentation de p21^{WAF-1}. Aucune variation de l'expression de p53 n'est observée dans les fibroblastes traités. Ceci peut s'expliquer par le fait que, lors de la sénescence, c'est l'activité de p53 qui augmente, suite à l'augmentation de p21^{WAF-1}, et non l'expression génique (figure 68).

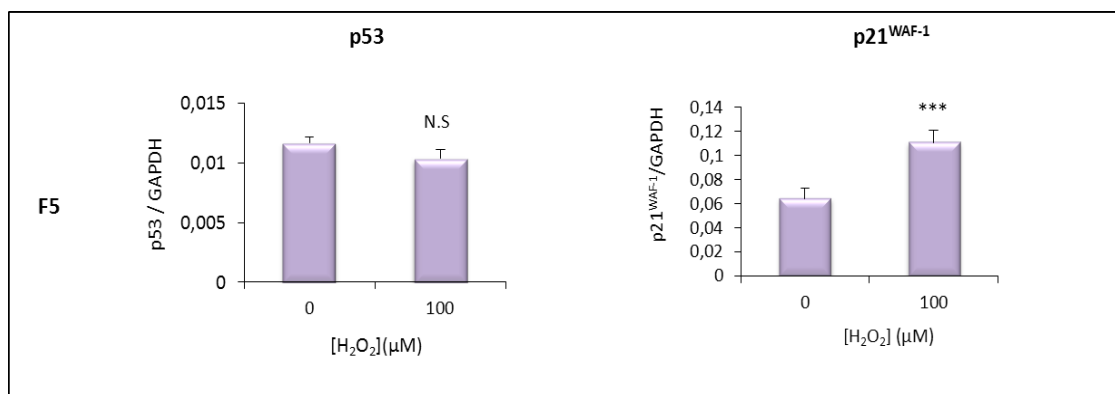


Figure 68: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de p53 et p21^{WAF-1} par les fibroblastes dermiques traités avec 100 μ M d'H₂O₂

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et traités avec 100 μ M H₂O₂ issus de patients de 5 ans utilisés avant le 5^{ème} passage. L'expression génique de p53 et p21^{WAF-1} a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

Pour les fibroblastes traités avec 225 mM de NaCl dans les F1, il n'y pas de variation significative de l'expression génique de p21^{WAF-1} et de p53 (figure 69). Pour ce type de stress, l'arrêt du cycle cellulaire n'est peut-être pas dû à l'axe p53/p21 mais à une voie parallèle. En effet, dans les cellules rénales c'est une augmentation d'expression de p16^{INK-4a} qui est observé lors d'une sénescence induite par NaCl (Dmitrieva et Burg, 2007). Nous avons donc essayé de mettre au point des amorces spécifiques de ce gène mais, du fait de sa taille extrêmement petite, les choix ont été très restreints et les 2 couples d'amorces dessinées, malgré le respect de tous les critères

nécessaires, ne nous ont pas permis d'amplifier ce gène dans les fibroblastes traités avec NaCl.

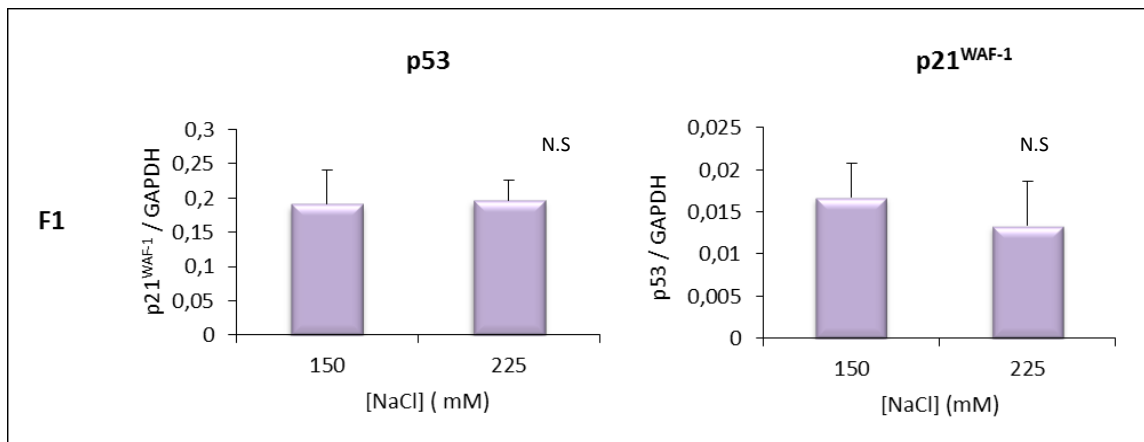


Figure 69: étude, par PCR temps réel, de l'expression de p53 et p21 par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et incubés avec 225 mM de NaCl issus de patients de 1 an utilisés avant le 5^{ème} passage.

L'expression génique de p53 et p21^{WAF-1} a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

Nous avons donc montré que les fibroblastes dermiques traités avec soit 100 μ M d' H_2O_2 , soit 225 mM de NaCl entraînent en sénescence accélérée. L'étape suivante pour la validation de ces modèles de vieillissement pour l'étude de l'expression du collagène IV était donc de vérifier que l'expression génique et protéique de ce collagène suivait bien la même évolution que lors d'un vieillissement chronologique.

II-2-2-3 Etude de l'expression génique du collagène IV

II-2-2-3-1 Expression génique

II-2-2-3-1-1 La chaîne α 1(IV)

Les fibroblastes traités avec 100 μ M d' H_2O_2 présentent une diminution d'expression de la chaîne α 1(IV) significative de 97% pour les F2, 50% pour les F5 et 51% pour F48 (Figure 70).

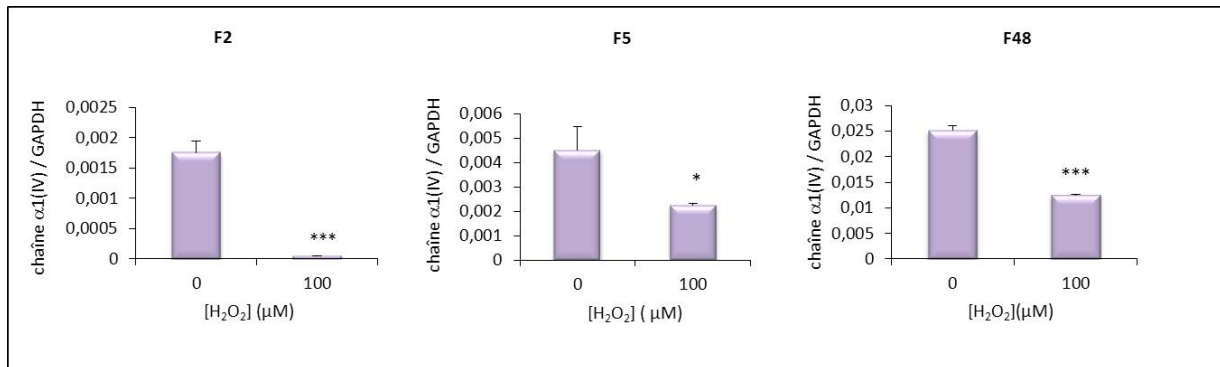


Figure 70: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne $\alpha 1(IV)$ par les fibroblastes dermiques traités avec 100 μM d' H_2O_2

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et traités avec 100 μM H_2O_2 issus de patients de 2 ans, de 5 ans et de 48 ans utilisés avant le 5^{ème} passage.

L'expression génique de la chaîne $\alpha 1(IV)$ a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

Nous retrouvons également une diminution d'expression génique significative chez les fibroblastes traités avec 225 mM de NaCl (43% pour les F1, 32% pour les F5 et 84% pour les F48) (figure 71).

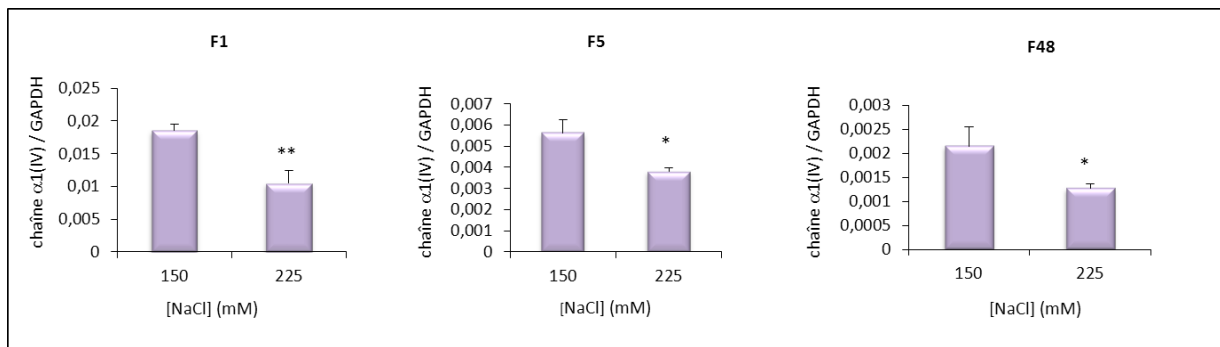


Figure 71: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne $\alpha 1(IV)$ par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et incubés avec 225 mM de NaCl issus de patients de 1 an, de 5 ans et de 48 ans utilisés avant le 5^{ème} passage.

L'expression génique de la chaîne $\alpha 1(IV)$ a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

II-2-2-3-1-1 La chaîne $\alpha 2(IV)$

L'expression de la chaîne $\alpha 2(IV)$ diminue significativement entre les fibroblastes contrôles et ceux traités avec 100 μM d' H_2O_2 . Cette diminution est de 76,5% pour les F2, 73% pour les F5 et 57% pour les F48 (figure 72).

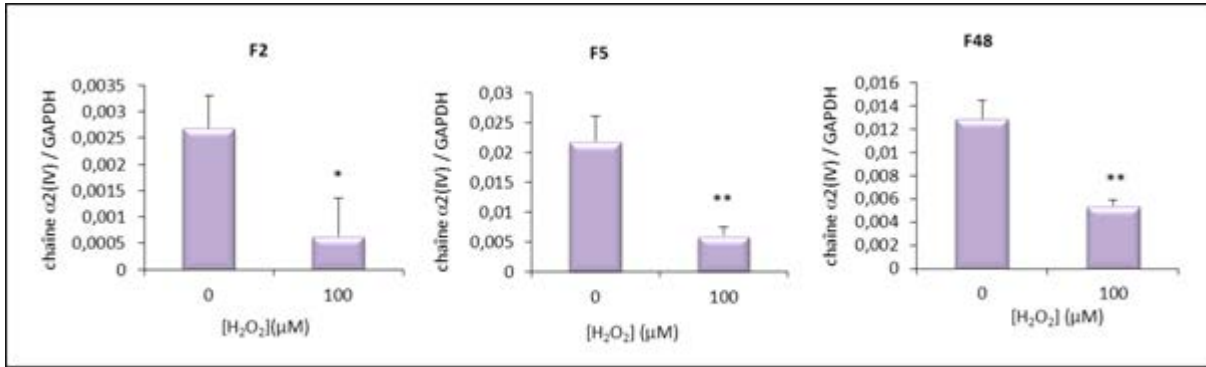


Figure 72: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne $\alpha 2(IV)$ par les fibroblastes dermiques traités avec 100 μM d' H_2O_2

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et traités avec 100 μM H_2O_2 issus de patients de 2 ans, de 5 ans et de 48 ans utilisés avant le 5^{ème} passage.

L'expression génique de la chaîne $\alpha 2(IV)$ a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

Les fibroblastes traités avec 225 mM de NaCl présentent également une diminution d'expression par rapport aux fibroblastes contrôles (150 mM). Cependant elle n'est significative que pour les F1 (64%). Pour F5 la diminution est de 16% et pour F48 elle est de 10% (figure 73).

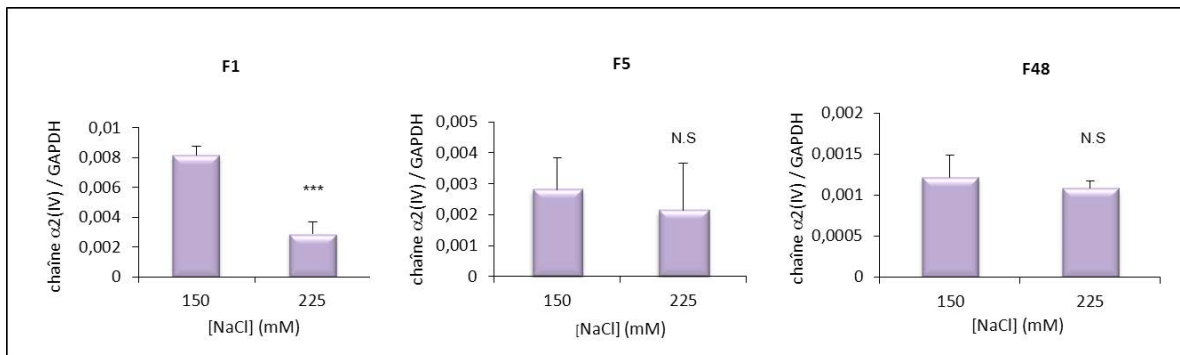


Figure 73: Etude, par PCR temps réel, de l'expression de la chaîne $\alpha 2(IV)$ par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et incubés avec 225 mM de NaCl issus de patients de 1 an, de 5 ans et de 48 ans utilisés avant le 5^{ème} passage.

L'expression génique de la chaîne $\alpha 2(IV)$ a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

Nous avons, pour les deux modèles de vieillissement, prouvé que l'expression génique des deux principales chaînes du collagène IV suivait la même évolution que lors d'un vieillissement chronologique. Il restait à vérifier que l'expression protéique évoluait de la même manière.

II-2-2-3-2 Expression protéique

II-2-2-3-2-1 Par western-blot

Nous avons analysé par western-blot les milieux conditionnés de fibroblastes traités avec H₂O₂ et NaCl.

Pour les 3 séries de fibroblastes traités par 100 μM d'H₂O₂, il y a une diminution de la bande de 180 kDa correspondant à la chaîne α1(IV). La quantification des bandes rapportées aux protéines totales montre que pour les 2 séries de fibroblastes de 2 ans (P2(1) et P2(2)) la diminution est située entre 40 et 70%. La diminution est de 65% pour les F5 (figure 74).

Ce modèle peut donc être utilisé pour l'étude du mécanisme impliqué dans la diminution de collagène IV puisqu'il s'approche du vieillissement physiologique.

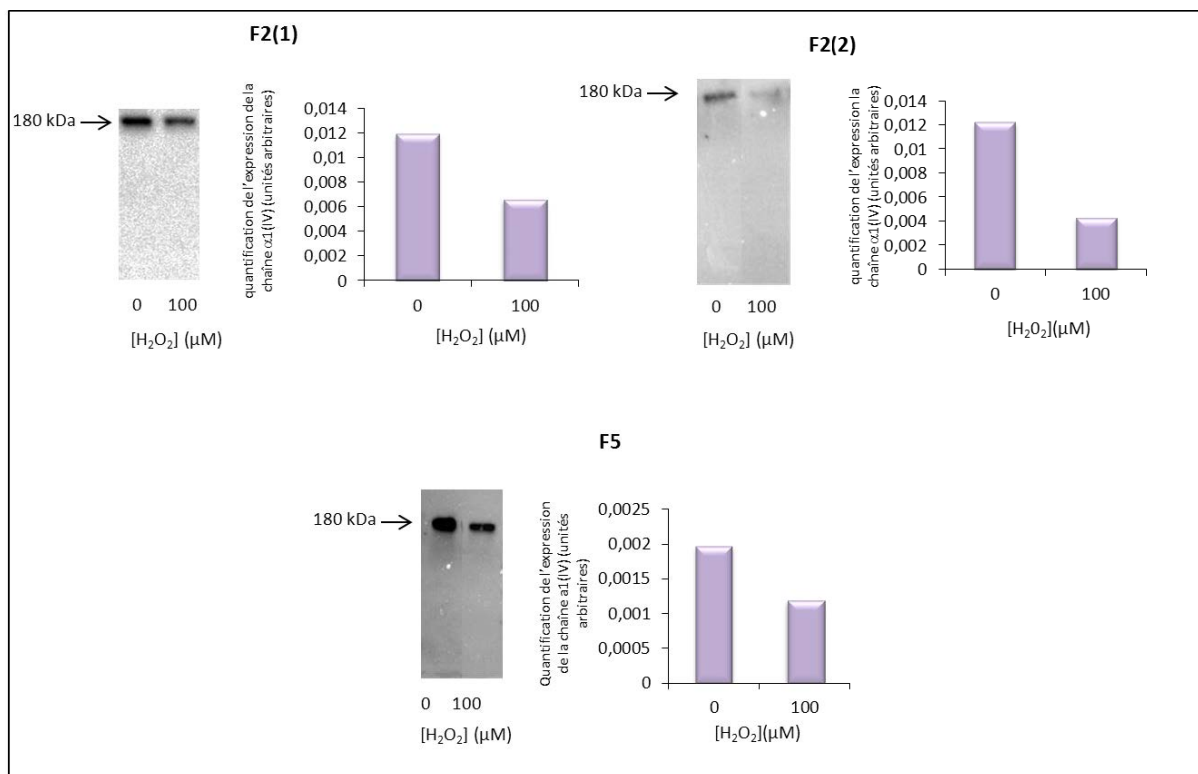


Figure 74: Etude, par western-blot, de l'expression de la chaîne α1(IV) par les fibroblastes dermiques traités avec 100 μM d'H₂O₂

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et traités avec 100 μM H₂O₂ issus de patients de 2 ans et de 5 ans utilisés avant le 5^{ème} passage. (la seconde série de fibroblastes issus d'un patient de 2 ans et la série issue d'un patient de 5 ans correspondent à celles étudiées en PCR en temps réel pour ce modèle de vieillissement). L'étude de l'expression protéique de la chaîne α1(IV) a été réalisée par la technique de western-blot (50 μg de protéines totales ont été déposés sur un gel contenant 7.5% d'acrylamide). La quantification relative se mesure par le ratio de la bande d'intérêt sur la quantité de protéines totales contenue dans les échantillons.

Pour le modèle de vieillissement induit par 225 mM de NaCl, aucune variation d'expression protéique n'a pu être détectée que ce soit avec un anticorps dirigé contre le collagène IV total ou la chaîne $\alpha 1(IV)$ (figure 75). Nous ne pouvons donc pas valider ce modèle pour l'étude du mécanisme impliqué dans la régulation de collagène IV puisqu'il ne reproduit pas la diminution observée dans les conditions physiologiques lors du vieillissement.

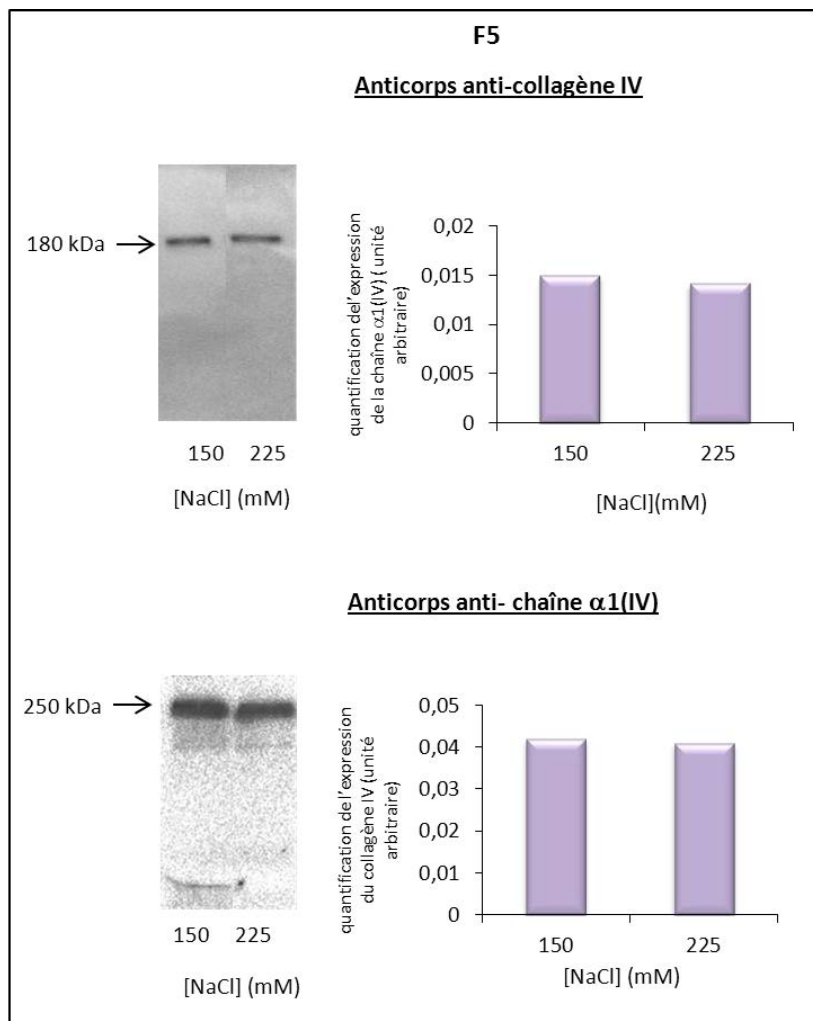


Figure 75: Etude, par western-blot, de l'expression du collagène IV par les fibroblastes traités avec 225 mM de NaCl

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et incubés avec 225 mM de NaCl issus de patients de 5 ans utilisés avant le 5^{ème} passage (Cette série de fibroblastes correspond à celle étudiée en PCR en temps réel sur ce modèle de vieillissement). L'étude de l'expression protéique de la chaîne $\alpha 1(IV)$ a été réalisée par la technique de western-blot (50 μ g de protéines totales ont été déposés sur un gel contenant 7.5% d'acrylamide). La quantification relative se mesure par la ratio de la bande d'intérêt sur la quantité de protéines totales contenue dans les échantillons.

II-2-2-3-2-1 Par dosage E.L.I.S.A

Afin de confirmer les résultats obtenus par western-blot, nous avons réalisé un dosage E.L.I.S.A sur une série de fibroblastes traités avec 225 mM de NaCl et une autre traitée avec 100 μ M d' H_2O_2 . L'expression protéique de collagène IV diminue de 82% avec le traitement à 100 μ M d' H_2O_2 (figure 76).

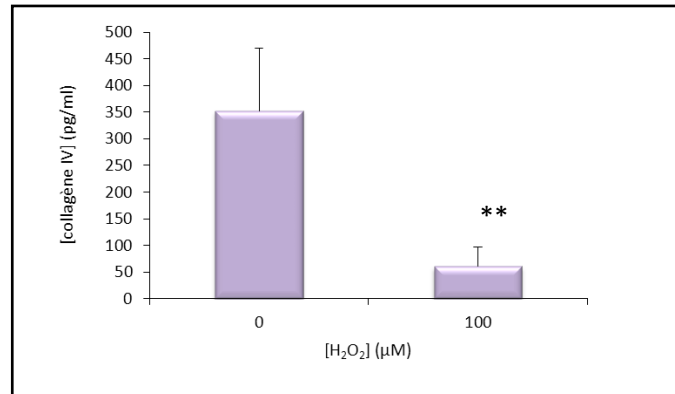


Figure 76: Etude, par dosage E.L.I.S.A, de la production de collagène IV par les fibroblastes dermiques traités avec 100 μ M d' H_2O_2

Les milieux conditionnés de fibroblastes contrôles et traités avec 100 μ M H_2O_2 issus de patients de 2 ans utilisés avant le 5^{ème} passage ont été mis en présence des anticorps anti-collagène IV couplé à de la biotine. Puis de l'avidine-HRP est ajouté et la révélation se fait par ajout du substrat TMB. La lecture de l'absorbance se fait à 450 nm.

Il n'y a pas de variations significatives de la concentration de collagène IV lorsque les cellules sont traitées avec 225 mM de NaCl par rapport aux cellules contrôles (figure 77).

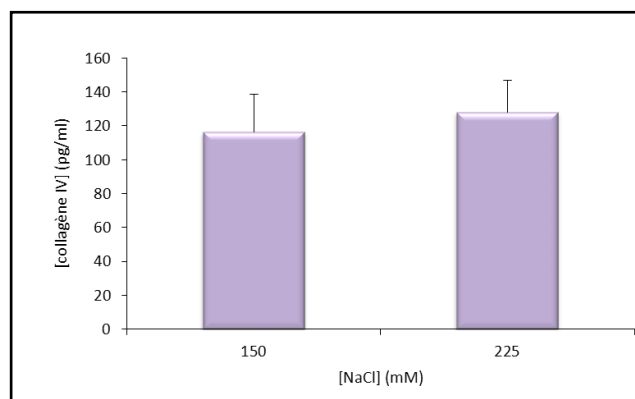


Figure 77: Etude, par dosage E.L.I.S.A, de la production de collagène IV par les fibroblastes dermiques traités avec 225 mM de NaCl

Les milieux conditionnés de fibroblastes contrôles et incubés avec 225 mM de NaCl issus de patients de 2 ans utilisés avant le 5^{ème} passage ont été mis en présence des anticorps anti-collagène IV couplé à de la biotine. Puis de l'avidine-HRP est ajouté et la révélation se fait par ajout du substrat TMB. La lecture de l'absorbance se fait à 450 nm.

III. Effet du TGF- β 1 sur l'expression du collagène IV par les fibroblastes dermiques humains contrôles et sénescents

Le TGF- β 1 augmente l'expression du collagène IV dans les cellules mésangiales et les fibroblastes NIH 3T3, mais rien n'a été publié concernant les fibroblastes dermiques humains. Nous avons donc étudié l'effet du TGF- β 1 sur l'expression du collagène IV par les fibroblastes dermiques humains dans les conditions physiologiques et dans des conditions de stress induites par 100 μ M d' H_2O_2 .

III-1 Etude de l'effet dose du TGF- β 1 sur les fibroblastes contrôles

Les cellules sont cultivées pendant 48 heures en absence de SVF et en présence de concentrations croissantes de TGF- β 1 (0,5 à 20 ng/mL). Les ARN sont quantifiés par PCR en temps réel et les milieux conditionnés sont collectés pour réaliser le western-blot.

L'expression des chaînes α 1 et α 2 augmente de manière statistiquement significative dès 2,5 ng/mL de TGF- β 1. L'effet maximum est obtenu pour une concentration de 10 ng/mL pour α 1(IV) (augmentation de 20 fois par rapport aux fibroblastes non traités) et pour α 2(IV) (augmentation de 10 fois) puis il diminue à nouveau pour une concentration de 20 ng/mL. On note une valeur abhérante pour la chaîne α 2 en présence de 5 ng/mL de TGF- β 1.

Le western-blot met en évidence une bande de 250 kDa, correspondant au collagène IV natif.

Au niveau protéique, la différence d'expression n'est pas aussi prononcée qu'au niveau transcriptionnel. Il y a une augmentation progressive de la synthèse de collagène IV qui atteint un plateau dès 2,5 ng/mL jusqu'à 10 ng/mL (50% d'augmentation de la synthèse de collagène IV), puis il y a une diminution à 20 ng/mL (l'augmentation observée n'est plus que de 18%) (figure 78).

Suite aux résultats obtenus en PCR et en western-blot, nous avons choisi de nous placer à la concentration de 10 ng/mL de TGF- β 1 pour les expériences de vieillissement accéléré.

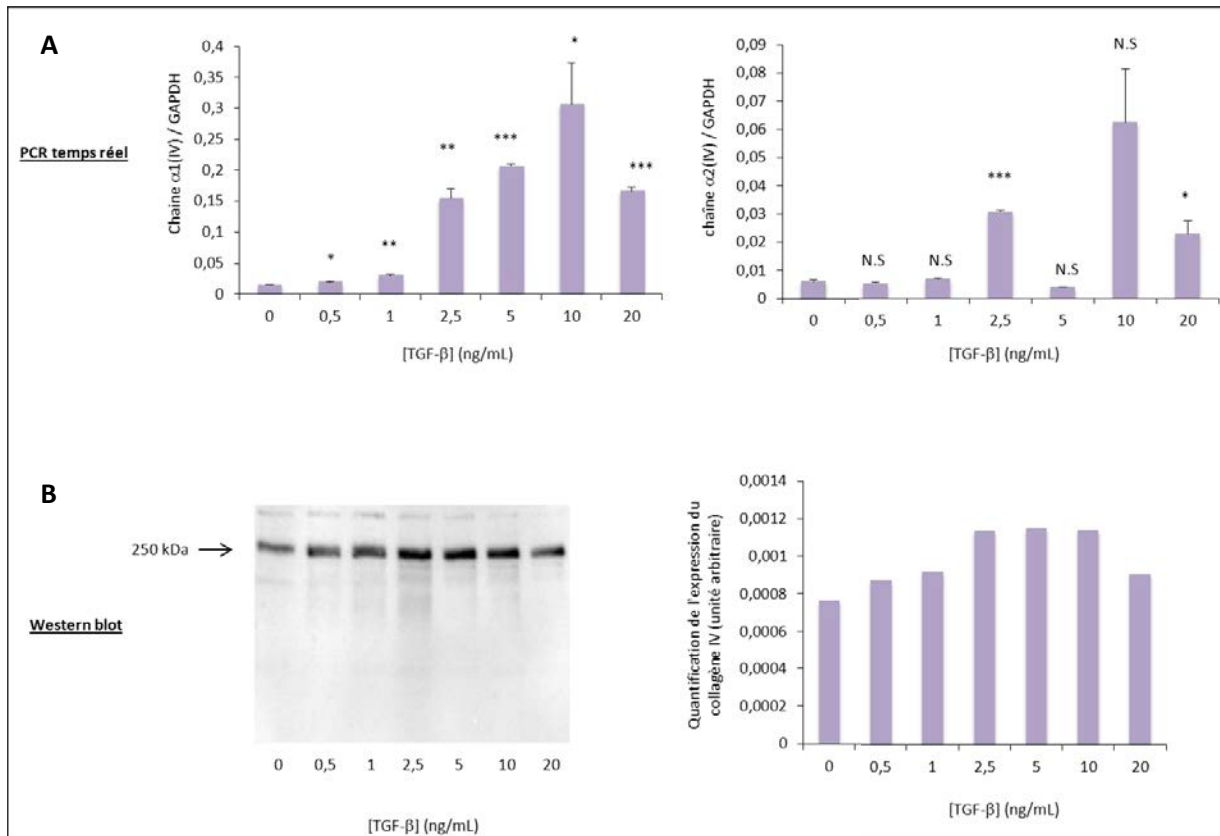


Figure 78: Effet dose du TGF- β 1 sur l'expression du collagène de type IV dans des fibroblastes dermiques humains

A : L'étude a été réalisée sur fibroblastes traités avec 0 à 20 ng/ml de TGF- β 1 issus de patients de 1 an utilisés avant le 5^{ème} passage. L'expression génique des chaînes α 1 et α 2(IV) a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

B : L'étude a été réalisée sur fibroblastes traités avec 0 à 20 ng/ml de TGF- β 1 issus de patients de 1 an utilisés avant le 5^{ème} passage. L'expression protéique du collagène I a été analysée par la technique de western-blot (50 μ g de protéines totales ont été déposés). La quantification relative se mesure par la ratio de la bande d'intérêt sur la quantité de protéines totales contenue dans les échantillons.

III-2 Effet de l'anticorps bloquant anti-TGF- β 1 sur la synthèse de collagène IV par les fibroblastes dermiques.

Nous avons traité les fibroblastes dermiques avec un anticorps bloquant du TGF- β puis avec ou sans TGF- β 1 afin de vérifier dans un premier temps l'efficacité de cet anticorps. La bande de 250 kDa correspondant au collagène IV total est bien inhibée

lorsque les cellules sont incubées en présence d'anticorps bloquant puis de TGF- β 1, nous permettant alors de valider l'effet de cet anticorps (figure 79).

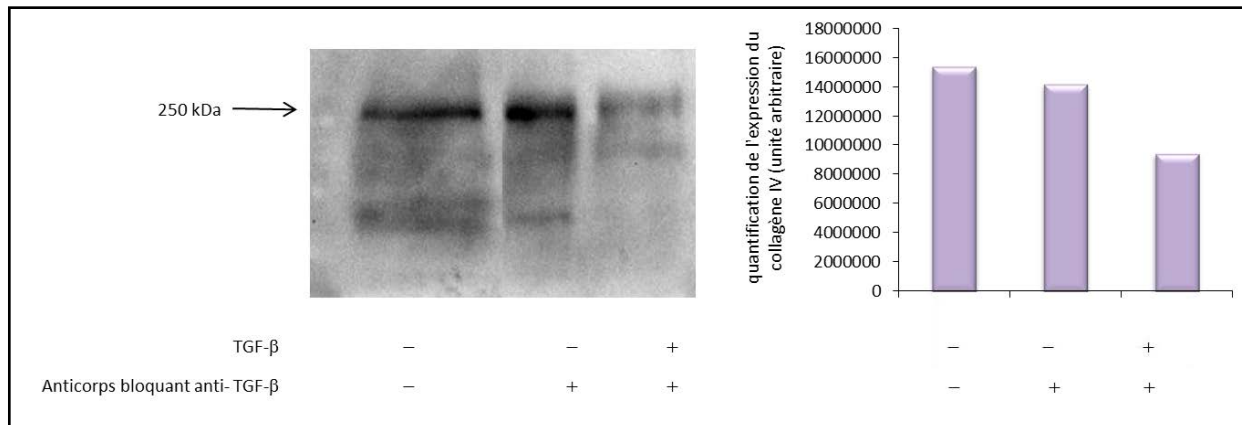


Figure 79: Effet de l'anticorps bloquant du TGF- β sur la synthèse de collagène IV par les fibroblastes dermiques humains

Les fibroblastes issus de patients de 2 ans et utilisés avant le 5^{ème} passage ont été traités avec 10 μ g/ml d'anticorps bloquants du TGF- β 1 puis plus ou moins 10 ng/ml de TGF- β 1. Les fibroblastes contrôles n'ont été traités avec aucun de ces deux composés. L'expression protéique du collagène I a été analysée par la technique de western-blot (50 μ g de protéines totales ont été déposés). La quantification relative se mesure par le ratio de la bande d'intérêt sur la quantité de protéines totales contenue dans les échantillons.

III-3 Etude de l'effet du TGF- β 1 sur les fibroblastes sénescents

Les fibroblastes sont incubés en présence ou en absence de 100 μ M d' H_2O_2 durant 1h30, puis les cellules sont incubées 48h en présence de DMEM sans SVF, jusqu'à apparition de la sénescence. Les fibroblastes sont alors incubés de nouveau pour 48h en présence ou en absence de TGF- β 1.

L'incubation des fibroblastes sénescents avec le TGF- β 1 (10 ng/mL) augmente de 272% l'expression de la chaîne α 1(IV) par rapport aux fibroblastes sénescents non traités (figure 80).

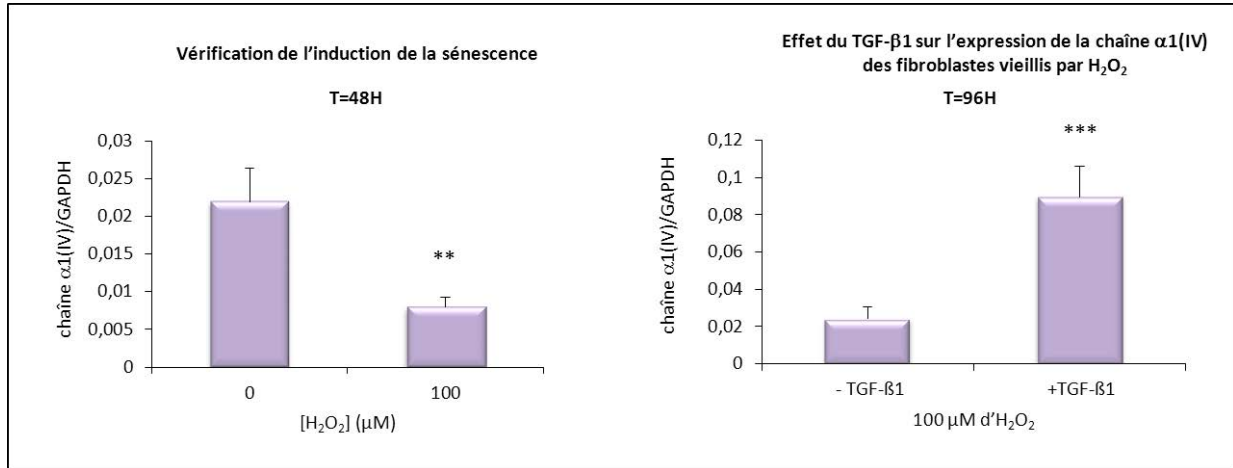


Figure 80: Etude, par PCR temps réel, de l'expression du collagène IV par les fibroblastes sénescents

Les fibroblastes issus de patients de 2 ans et utilisés avant le 5^{ème} passage ont été traités 1h30 avec 100 μM d'H₂O₂ puis le milieu a été remplacé par du milieu neuf sans sérum pendant 48h. L'induction de la sénescence a été vérifiée par étude de l'expression génique de la chaîne α1(IV) par PCR en temps réel. *Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata (A).* Les fibroblastes ont ensuite été traités avec du TGF-β1 pendant 48h et l'expression génique de la chaîne α1(IV) par PCR en temps réel. *Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata*

IV. Etude du mécanisme impliqué dans la diminution du collagène IV au cours du vieillissement

Il est maintenant bien établi que la diminution du TGF- β 1 joue un rôle dans la diminution de l'expression du collagène de type I au cours du vieillissement. Nous avons montré que le TGF- β 1 régule l'expression de collagène IV par les fibroblastes non sénescents et sénescents. Nous nous sommes donc intéressés à la voie de signalisation du TGF- β 1 dans notre modèle de sénescence induite par H₂O₂.

IV-1 Etude des protéines phosphorylées : voie du TGF- β 1

Nous avons tenté de mettre en évidence des variations de phosphorylation ou d'expression de protéines impliquées dans la voie du TGF- β 1 lorsque la sénescence est induite par traitement des fibroblastes avec 100 μ M d'H₂O₂ à l'aide d'un kit « *protein array* » dédié à la voie du TGF- β 1.

A l'aide d'un programme sous Image J permettant de quantifier l'intensité des spots obtenus et de supprimer les pixels parasites correspondant au bruit de fond, nous avons pu mettre en évidence des différences d'expression entre les fibroblastes contrôles et les fibroblastes sénescents.

Le tableau ci-dessous répertorie les protéines pour lesquelles nous avons observé des variations. L'expression du TGF- β 1 et du du TG β RII diminuent de 27% et 13% respectivement.

augmentation d'expression	
nom de la protéine	variation d'expression (en %)
SAPK/JNK (Phospho-Tyr185)	23,3
Rac1/cdc42 (Ab-71)	16,2
PKC theta (Ab-676)	9
Myc (Ab-62)	16,7
Abl1 (Phospho-Tyr412)	6,5
Abl1 (Phospho-Tyr204)	5,4
AKT1 (Phospho-Ser124)	37,4
p38 MAPK (Phospho-Tyr322)	45,8
Smad3 (Phospho-Ser204)	8,5
Smad2 (Phospho-Ser250)	10,4
MKK6 (Ab-207)	6,8
Shc (Ab427)	16,4
PAK1/2/3 (Ab-423/402/421)	37
SEK1/MKK4 (Ab-80)	18,8
S6K-alpha 6 (Inter)	30,4
RASE (Inter)	19,4
RASF4 (Inter)	32,2
diminution d'expression	
Myc (Phospho-Ser373)	-25
AKT (Phospho-Ser473)	-29
PKC zeta (Ab-410)	-36,5
TGF beta receptor II (inter)	-27
TGF beta1 (inter)	-13

Tableau 3: Variation de l'expression de protéines impliquées dans la voie du TGF- β lors d'un traitement avec 0 et 100 μ M d' H_2O_2
Etude réalisée sur fibroblastes issus de patients de 5 ans et utilisés avant le 5ème passage

IV-2 Etude de l'expression du TGF- β 1 et de son récepteur TGF- β RII par des fibroblastes vieilliss artificiellement

Suite aux résultats précédents, nous avons étudié l'expression du TGF- β 1 et de son récepteur T β RII dans les F1 traités avec 100 μ M d' H_2O_2 .

IV-2-1 TGF- β 1

IV-2-1-1 Expression génique

Nous avons donc étudié l'expression génique du TGF- β 1 par PCR en temps réel et comme le montre la figure 86, il n'y a pas de variation significative de son expression dans les fibroblastes sénescents.

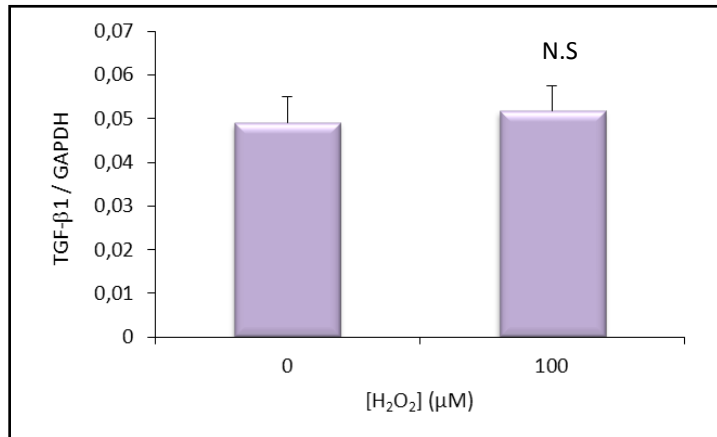


Figure 81: Etude, par PCR temps réel, de l'expression du TGF-β1 par les fibroblastes sénescents
L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et traités avec 100 μM d'H₂O₂ issus de patients de 2 ans utilisés avant le 5^{ème} passage (Cette série correspond à celle étudié en PCR temps réel dans ce même modèle de vieillissement). L'expression génique du TGF-β1 a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

IV-2-1-2 Expression protéique

Après avoir montré que l'expression génique du TGF-β1 ne variait pas dans les fibroblastes sénescents, nous avons décidé d'étudier son expression protéique en réalisant une étude cinétique de son expression. Pour cela nous avons collecté les milieux conditionnés de fibroblastes traités avec 100 μM d' H₂O₂ depuis la fin du traitement (t0) jusqu'à 48h et avons dosé leur contenu en TGF-β1 par ELISA.

Pour les F5(1), F5(2) et F5(3), la quantité de TGF-β1 augmente durant les 2 premières heures puis elle s'infléchit jusqu'au temps 24 h et évolue ensuite différemment en fonction de la série (figure 87).

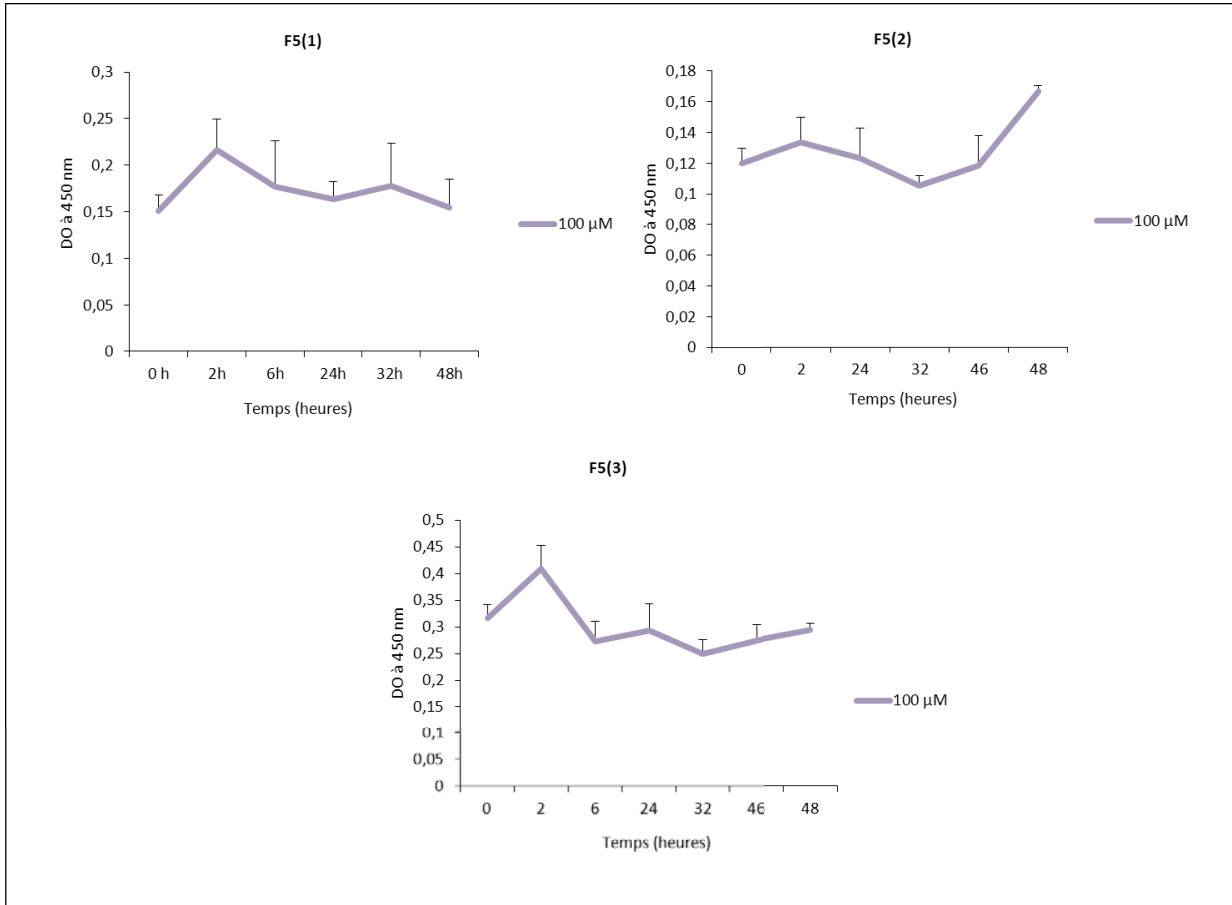


Figure 82: Etude, par dosage E.L.I.S.A, de l'expression du TGF-β1 par les fibroblastes dermiques humains vieilliss artificiellement par traitement avec 100 μM d'H₂O₂

Les milieux conditionnés de fibroblastes traités avec 100 μM de TGF-β1 issus de patients de 5 ans utilisés avant le 5^{ème} passage ont été mis en présence de l'anticorps anti-collagène IV couplé à de la biotine. Puis de l'avidine-HRP est ajouté et la révélation se fait par ajout du substrat TMB. La lecture de l'absorbance se fait à 450 nm.

IV-2-2 TβRII

Nous avons ensuite étudié l'expression génique du récepteur au TGF-β1, appelé TβRII, par PCR en temps réel 48h après traitement nous avons montré qu'elle diminue de 35% dans les fibroblastes sénescents (figure 83).

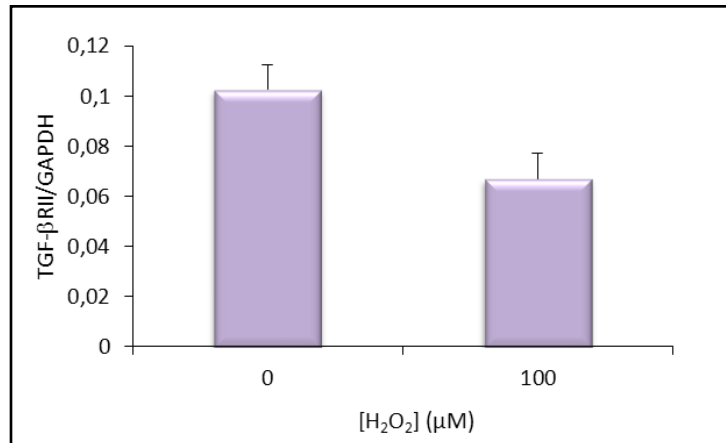


Figure 83 : Etude, par PCR temps réel, de l'expression du TβRII par les fibroblastes sénescents. L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et traités avec 100 μM d'H₂O₂ issus de patients de 2 ans utilisés avant le 5^{ème} passage. (Cette série correspond à celle étudié en PCR temps réel dans ce même modèle de vieillissement). L'expression génique du TGF-βRII a été analysée par PCR en temps réel. Les résultats sont normalisés avec le gène de ménage GAPDH. L'expérience a été réalisée en triplicata.

IV-3 Etude de la voie des Smads.

Lors de l'étude des protéines de la voie du TGF-β1, nous avons mis en évidence une modification de l'expression des phospho-Smads 2 et 3. Nous avons donc tenté de vérifier ce résultat en réalisant des immunoprécipitations de ces protéines à partir d'extraits cellulaires de fibroblastes traités ou non avec 100 μM d'H₂O₂.

Bien qu'à première vue l'augmentation de la phosphorylation de Smad 2 et 3 semble très augmentée chez les fibroblastes sénescents, les ratios Smad 2 phosphorylée / Smad 2 totale et Smad 3 phosphorylée / Smad 3 ne tendent que vers une faible augmentation.

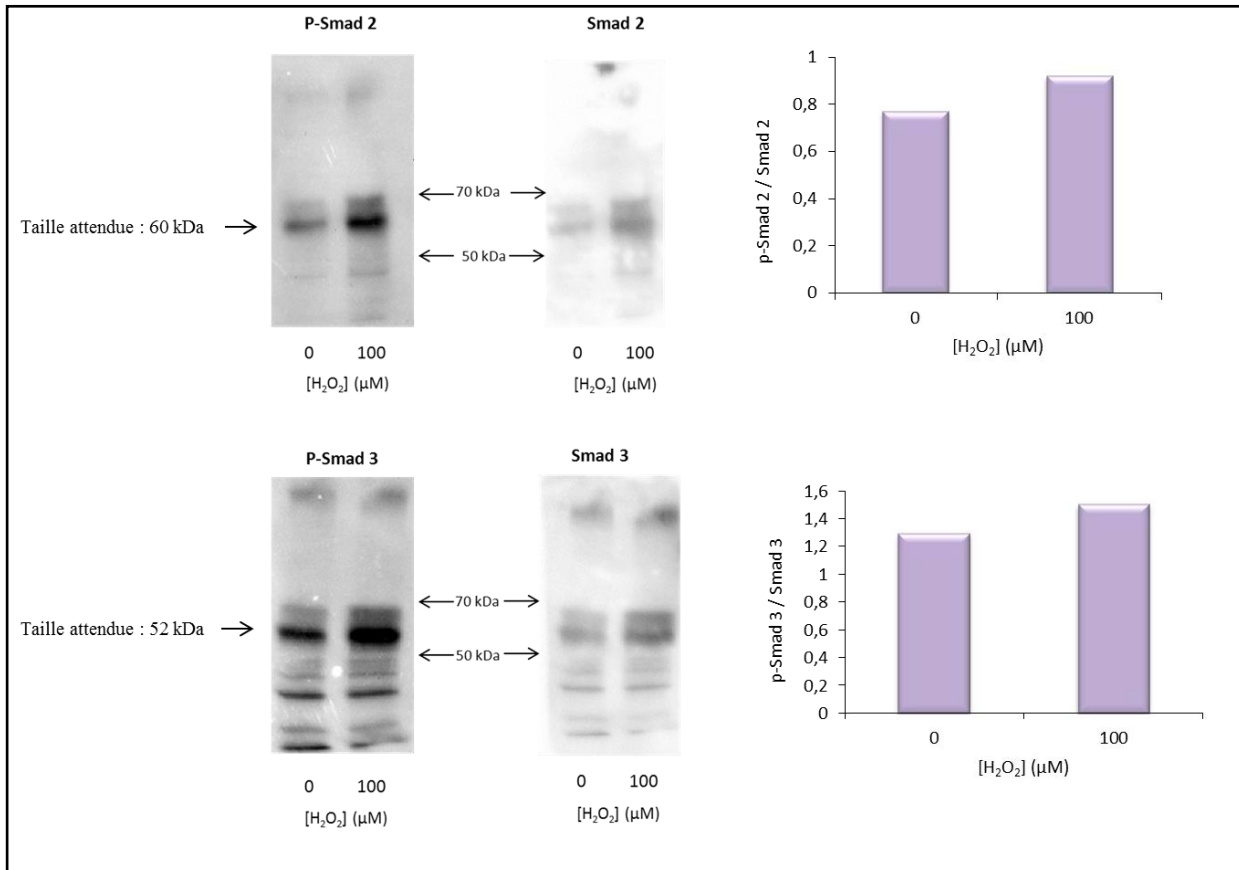


Figure 84: Etude, par western-blot, de l'expression de smad2 et 3 et de leur forme phosphorylée par les fibroblastes sénescents

L'étude a été réalisée sur fibroblastes contrôles et traités avec 100 μM d'H₂O₂ issus de patients de 5 ans utilisés avant le 5^{ème} passage. 10 μg d'extraits protéiques des fibroblastes ont été incubés en présence d'anticorps anti-Smad2/3 puis avec des billes d'agarose couplées aux protéine A et G. Les billes sont ensuite collectées et mélangées à du tampon de charge. L'expression protéique du collagène I a été analysée par la technique de western-blot (50 μg de protéines totales ont été déposées sur gel contenant 10% d'acrylamide). La quantification relative se mesure par la ratio de la bande d'intérêt sur la quantité de protéines totales contenue dans les échantillons.

E. Discussion

Le collagène de type IV est présent exclusivement au niveau des membranes basales où il est le composé majoritaire. Il forme un réseau supramoléculaire, sa molécule élémentaire étant constituée par l'association en triple hélice de 3 chaînes α parmi six chaînes possibles ($\alpha 1$ à $\alpha 6$).

Au niveau de la peau, la membrane basale est appelée jonction dermo-épidermique et est située à l'interface entre l'épiderme et le derme.

Les travaux de Vázquez et coll, mettent en évidence une diminution de collagène IV corrélée avec l'âge au niveau de la peau de patientes âgées de 35 à 63 ans. Cependant, le mécanisme n'a pas été déterminé à ce jour. Le but de notre étude était de confirmer cette diminution de collagène IV au cours du vieillissement et d'étudier le mécanisme impliqué.

Nous avons donc, dans un premier temps, étudié l'expression du collagène de type IV dans des fragments de peau. Au niveau de peaux provenant de prépuces, l'expression du collagène IV semble être maximale à 1 an puis diminuer à 2 ans et se stabiliser. Pour les peaux âgées l'expression protéique de collagène IV diminue au cours du vieillissement entre 35 et 80 ans, confirmant des résultats obtenus par Vazquez et Le Varlet. L'étude de l'expression génique n'a pas pu être réalisée du fait de la difficulté à maintenir l'intégrité des ARN puisque les prélèvements de peaux ne nous sont pas toujours confiés à la sortie du bloc opératoire. Cette étude, réalisée sur des extraits de peau totale (derme + épiderme) ne permet pas de différencier le collagène présent au niveau de la JDE de celui situé au niveau des vaisseaux sanguins.

Pour analyser les éventuelles discontinuités du collagène IV au niveau de la jonction dermo-épidermique uniquement, nous avons réalisé des immunomarquages fluorescents du collagène IV sur coupes de peaux. Pour les peaux jeunes, la JDE est fortement invaginée tandis que pour les peaux âgées, la JDE s'aplanit et l'épaisseur de l'épiderme diminue (Levakov et coll, 2012). Nous avons évalué la longueur de la JDE pour une distance donnée et vérifié qu'elle diminuait au cours du vieillissement. Pour les études suivantes, nous avons éliminé les échantillons atypiques, c'est-à-dire présentant un écart-type 2 fois supérieur à la moyenne. Nous n'avons malheureusement pu mettre en évidence de différence significative sur la continuité du marquage de collagène IV entre les coupes de peaux jeunes et âgées, du fait des nombreuses variations interindividuelles. Nous n'avons pas pu quantifier le collagène IV par cette technique du fait de la photostabilité de l'alexa fluor. Nous avons donc, dans le but de quantifier le collagène IV de la JDE, réalisé des marquages immunoenzymatiques sur coupes de peaux incluses en paraffine et provenant toutes d'une même zone du corps.

Cependant nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence de différences significatives d'expression du collagène IV au sein de la JDE du fait des variabilités interindividuelles.

Parallèlement aux études immunohistochimiques classiques, nous avons tenté d'analyser le collagène IV par spectroscopie RAMAN, technique non invasive qui ne nécessite aucun marquage préalable. Nous avons tenté de mettre en évidence une signature spectrale du collagène IV en collaboration avec Olivier Piot et The Thuong N-Guyen. L'étude a tout d'abord été réalisée sur collagène I et collagène IV purs. Elle a permis de mettre en évidence des différences spectrales entre ces deux types de collagène. En prenant en compte la normalisation du spectre sur la bande amide I, le contenu en résidus proline et hydroxyproline apparaît plus élevé dans le collagène IV que dans le collagène I. Les vibrations spécifiques de la phenylalanine sont plus intenses dans le collagène IV, ce qui traduit une quantité plus importante de cet acide aminé dans le collagène IV mais aussi peut-être des différences conformationnelles de ces résidus entre les deux protéines. La vibration correspondant pouvant être attribuée aux liaisons croisées glucosyl-galactosyl-hydroxylysinonorleucine entre les tropocollagènes présente un pic plus intense au niveau du collagène I, ce qui montre un contenu plus important en liaisons croisées dans ce collagène et est corrélé avec la structure fibrillaire du collagène I. L'information spectrale associée aux ponts disulfures se situe dans la gamme 500-550 cm^{-1} . En effet, les vibrations d'étirement S-S du collagène IV apparaissent à 510 et 540 cm^{-1} et ces signaux sont dus aux ponts disulfures des domaines 7S et traduit le fait que ces ponts peuvent se trouver dans différents types de conformation et cette information conformationnelle du domaine 7S peut être utilisée comme marqueur *in situ* de la stabilité du réseau de collagène IV. La détermination de la signature spectrale du collagène IV permet d'apporter un nouvel outil pour l'étude des altérations moléculaires de la peau induites par le vieillissement chronologique. L'étude de coupes de peaux jeunes et âgées a permis de mettre en évidence des différences spectrales entre le derme et l'épiderme. Pour ce qui est de la jonction dermo-épidermique, il s'avère que les spectres recueillis ne sont pas uniquement ceux de la JDE mais aussi ceux de l'épiderme et du derme. En microscopie RAMAN la résolution utilisée est de l'ordre du micromètre alors que la JDE mesure environ 100 nm. De nouvelles études, basées sur la spectroscopie à champ proche, dont la résolution est de l'ordre du nanomètre, sont actuellement en cours. Elles permettront d'analyser spécifiquement la jonction dermo-épidermique.

Les kératinocytes et les fibroblastes dermiques sont les 2 types cellulaires majeurs participant au dépôt de collagène IV au niveau de la jonction dermo-épidermique. Par manque de temps

et pour des raisons techniques, nous avons choisi de nous consacrer à l'étude de l'expression protéique du collagène IV par les fibroblastes dermiques humains uniquement.

Nous avons étudié l'expression des six chaînes constitutives du collagène de type IV par des fibroblastes dermiques en culture, provenant de patients d'âge croissant. Au niveau de la JDE, les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(\text{IV})$ sont largement exprimées (Abreu-Velez et Howard, 2012), les chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sont faiblement exprimées et les chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 4(\text{IV})$ ne sont pas exprimées (Hasegawa et coll, 2007).

Cette étude a d'abord été réalisée à partir de fibroblastes issus de prépuces et de seins afin d'avoir un panel important de patients d'âges différents et donc des résultats statistiquement significatifs. En accord avec les résultats publiés dans la littérature, nous n'avons pu mettre en évidence l'expression des chaînes $\alpha 3(\text{IV})$ et $\alpha 4(\text{IV})$. L'expression génique des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6(\text{IV})$ a également été étudiée ; cependant, du fait de la très faible expression de ces chaînes par les fibroblastes dermiques, l'efficacité des réactions PCR était inférieure à 90%. Les résultats n'ont donc pas pu être validés bien qu'une tendance à la diminution de l'expression de ces deux chaînes ait été observée en fonction de l'âge. Pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(\text{IV})$, nous avons montré une diminution importante d'expression après 10 ans, se poursuivant jusqu'à 40 ans et se stabilisant ensuite. Il est important de noter que l'expression génique des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(\text{IV})$ évolue de façon identique au cours du vieillissement ; ceci peut s'expliquer par le fait que leurs deux gènes sont localisés tête-bêche sur le même chromosome et qu'ils sont sous le contrôle d'un promoteur commun (Khoshnoodi et coll, 2008). Afin de s'affranchir des différences d'expression dépendantes des tissus, nous avons étudié l'expression génique des chaînes de collagène IV par les fibroblastes issus de prépuces d'une part, et de seins d'autre part. Pour les fibroblastes issus de prépuces, une tendance à la diminution d'expression de la chaîne $\alpha 1(\text{IV})$ entre 1 et 12 ans a été mise en évidence mais les très grandes variabilités interindividuelles ne nous ont pas permis d'obtenir un résultat statistiquement significatif. De plus, les circoncisions sont généralement réalisées sur de jeunes enfants et nous n'avons obtenu que peu de prépuces pour les tranches d'âges supérieures à 5 ans. Pour les fibroblastes issus de fragments de seins, nous avons également mis en évidence une diminution d'expression de la chaîne $\alpha 1(\text{IV})$, et cette diminution est significative entre les groupe 30-40 et le groupe 51-60 ans. Cependant les variations interindividuelles sont très importantes. Nous avons confirmé cette diminution d'expression du collagène IV au niveau protéique par dosage ELISA mais les résultats sont à prendre avec précaution dans la mesure où l'étude n'a été réalisée que sur 4 échantillons. Cette étude semble toutefois confirmer les résultats de

Vazquez montrant que le collagène de type IV de la jonction dermo-épidermique diminue au cours du vieillissement. Cette diminution semble due, au moins en partie, à la diminution d'expression génique du collagène IV par les fibroblastes dermiques avec l'âge.

Les variations interindividuelles étant considérables chez l'homme, nous avons d'abord pensé à utiliser un modèle murin, modèle très utilisé du fait du faible coût des souris, de leur vitesse de vieillissement et du fait que la plupart de leur gènes sont connus et retrouvés chez l'humain. En collaboration avec Romain Debret de l'IBCP de Lyon, nous avons étudié l'expression des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ présentes au niveau de la JDE. Pour les fibroblastes dermiques murins, une diminution d'expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$ est observée chez les souris âgées par rapport aux souris jeunes, laissant penser que ces souris pourraient constituer un bon modèle d'étude de la diminution de collagène IV au cours du vieillissement. Cependant, quand nous avons étudié l'expression génique des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6(IV)$, nous avons constaté une forte augmentation de ces chaînes, contrairement au modèle humain où les différences n'étaient pas significatives mais tendaient tout de même vers une diminution d'expression. L'augmentation d'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6(IV)$ semblent compenser la diminution d'expression des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$. Un tel phénomène compensatoire a déjà été observé dans d'autres conditions physiopathologiques, par exemple au cours du développement embryonnaire, lorsque le trimère ubiquitaire $\alpha 1\alpha 1\alpha 2(IV)$ est remplacé de façon tissu spécifique et stade de développement spécifique par les autres isoformes dits « minoritaires » (Poschl et coll, 2004). Par ailleurs, les souris KO pour $\alpha 3(IV)$ présentent un niveau d'ARNm pour $\alpha 1$ et $\alpha 2$ plus élevé que les souris sauvages au niveau de la membrane basale glomérulaire (Miner et Sanes, 1996).

Toujours en collaboration avec Romain Debret, nous avons étudié l'expression de collagène IV dans un modèle de souris présentant une sénescence prématurée. Les souris SAM sont obtenues par croisements consanguins continus entre frères et soeurs à partir de 5 lignées sources originales ARK présentant une sénescence accélérée (SAMP, senescenceprone) et de 3 lignées de souris ARK présentant un vieillissement normal (SAMR, senescenceresistant) (Takeda et coll, 1981). Les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(IV)$ ne varient pas dans ce modèle de vieillissement, ce qui fait que ce type de souris ne constituent pas un bon modèle d'étude. Ces souris sont plus adaptées à l'étude de pathologies cérébrales.

Nous avons donc recherché un modèle d'étude sur fibroblastes humains. Nous avons tout d'abord pensé à un modèle de vieillissement par passages successifs car il est le plus représentatif du vieillissement naturel étant donné qu'à chaque passage il y a une perte

progressive des extrémités télomériques (Funk et coll, 2000). Nous avons montré que la sénescence est bien induite à passage 10 : l'augmentation de p21^{WAF-1} et de gènes caractéristiques des cellules sénescents. Le fait que p53 ne présente pas de variation significative s'explique par le fait que lors de l'induction de la sénescence, c'est son activation et/ou son augmentation d'expression protéique qui provoque l'induction d'expression de p21^{WAF-1} (Furukawa et coll, 2007), et non pas son augmentation d'expression génique (Kim et coll, 2002). De plus il a été montré que p21^{WAF-1} pouvait être augmenté de façon indépendante de p53 mais le mécanisme est encore à ce jour inconnu (Chen, 2000). Nous avons également vérifié que des gènes de protéines matricielles variaient lors de l'induction de la sénescence. En effet, lors d'un vieillissement chronologique, l'expression génique du collagène I et de la MMP-1 sont décrits dans la littérature comme diminuant (Uitto, 2008) et augmentant (Xia et coll, 2013) respectivement. Dans ce modèle nous n'avons pas montré d'augmentation de l'expression génique de MMPs. Nous avons étudié l'expression de gènes associés à la sénescence tels que l'apoptotines J, la smooth muscle 22 (SM22), l'ostéonectine et la fibronectine décrits pour augmenter au cours du vieillissement (Gonos et coll, 1998). Nous retrouvons ces augmentations dans notre modèle. Nous avons ensuite montré qu'au niveau génique, le collagène IV suivait la même évolution que lors d'un vieillissement chronologique, cependant au niveau protéique aucune variation significative entre p4 et p10 n'a pu être mise en évidence.

Nous avons alors décidé de mettre au point un modèle de sénescence induite par un stress (SIPS: stress induced premature senescence) en traitant les fibroblastes avec de l'H₂O₂ (Wang et coll, 2013) ou avec du NaCl (Dmitrieva et Burg, 2007).

Nous avons traité les fibroblastes au peroxyde d'hydrogène avec des doses allant de 50 à 200 µM pendant 1h30 et avons déterminé la dose subtoxique en mesurant la viabilité à l'aide du bleu trypan. Les fibroblastes traités avec 100 µM d'H₂O₂ ne présentent pas de mort cellulaire alors que les doses plus élevées ont des effets différents en fonction des fibroblastes testés. Certains ne présentent pas de mort cellulaire alors que pour d'autres une diminution de 40% de la viabilité est observée. Comme nous voulons faire un modèle de vieillissement unique pour tous les fibroblastes nous avons choisi d'utiliser la dose de 100 µM.

Pour les fibroblastes traités avec 200 à 300 mM de chlorure de sodium, nous avons sélectionné la dose de 225 mM puisqu'au-delà les fibroblastes réagissent également assez différemment.

Pour vérifier que la sénescence a bien été induite avec les traitements aux doses subtoxiques d' H₂O₂ et de NaCl, nous avons d'abord observé le changement de morphologie des cellules. Les fibroblastes traités avec 100 µM d' H₂O₂ d'une part et ceux traités 225 mM de NaCl présentent bien la morphologie caractéristique des cellules sénescents. D'un point de vue morphologique, la sénescence semble donc être induite avec les doses d'H₂O₂ et de NaCl sélectionnées. Nous avons ensuite observé l'activité SA-β-galactosidase des cellules traitées et, pour les deux traitements, il y a une augmentation de son activité. Cependant, loin d'être directement corrélée au processus de sénescence, la spécificité du test SA-β-Gal a été plusieurs fois remise en cause (Severino, Allen et al. 2000; Yang and Hu 2005). En effet, un marquage positif a été observé par exemple lorsque des fibroblastes ont été maintenus en culture avec une faible concentration de sérum, ou après une longue période à confluence. Or, nous avons privé les cellules de sérum pendant 48h, ce qui pourrait avoir induit des faux positifs. Nous avons donc cherché à mettre en évidence l'induction de la sénescence par étude de l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire tels que p21^{WAF-1} et p53 (Chen, 200). Les fibroblastes traités avec 100 µM d'H₂O₂ présentent une augmentation d'expression de p21^{WAF-1} et aucune variation significative de l'expression de p53. Comme expliqué précédemment pour le modèle de vieillissement par passages successifs, il semble que c'est son activation et/ou son augmentation d'expression protéique qui provoque l'induction d'expression de p21^{WAF-1}. Les fibroblastes traités avec 225 mM de NaCl ne présentent pas de variation d'expression de p21^{WAF-1} et de p53. Cela peut s'expliquer par le fait que la sénescence induite par NaCl passe par une voie indépendante de la voie p16^{INK-4a} (Dmitrieva et Burg, 2007). Nous avons vérifié que les gènes des protéines matricielles, collagène I et MMP-1, variaient bien comme lors d'un vieillissement chronologique. Nous avons donc montré que le traitement avec 100 µM d'H₂O₂ et celui avec 225 mM de NaCl ont induit la sénescence prématurée des fibroblastes dermiques. Comme pour les autres modèles, l'étape suivante était de vérifier que l'expression du collagène IV suivait bien la même évolution que lors d'un vieillissement chronologique. Pour les deux traitements, l'expression génique des chaînes α1 et α2(IV) diminuent. Au niveau protéique, le traitement avec 225 mM de NaCl n'a provoqué aucune variation d'expression du collagène IV. Ce modèle de vieillissement accéléré des fibroblastes ne peut donc pas être validé et utilisé pour l'étude de la variation du collagène IV au cours du temps. Ces résultats sont semblables au modèle de vieillissement par passage successifs ou la diminution d'expression du collagène IV est bien induite au niveau génique mais pas retrouvée au niveau protéique.

Pour le vieillissement induit par H₂O₂, la diminution d'expression du collagène IV est également retrouvée au niveau protéique. Nous avons vérifié ces variations d'expressions protéique par dosage ELISA.

Le modèle de vieillissement induit par H₂O₂ est donc validé et sera utilisé pour étudier les mécanismes conduisant à la variation du collagène IV au cours du temps.

Dans la seconde partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à différents facteurs pouvant moduler l'expression de collagène IV. Une étude a été réalisée au sein du laboratoire par Etienne Delobbe, qui a testé l'effet de 3 cytokines sur la synthèse de collagène IV par les fibroblastes dermiques humains contrôlés. Ces effecteurs sont le TGF- β 1, et le CTGF, connus pour augmenter l'expression de différents types de collagènes dans divers types cellulaires (Bettinger et coll, 1996 ; Oliver et coll, 2010), ainsi que l'IL-1 β , connu pour diminuer l'expression de la chaîne α 1(I) (Siwik et coll, 2000). Le CTGF n'induit pas de modification de l'expression du collagène IV, l'IL-1 β induit une faible augmentation et le TGF- β 1 est celui qui augmente le plus significativement la synthèse de collagène IV, tant au niveau transcriptionnel que traductionnel. Ce résultat est en accord avec plusieurs études qui ont montré que le TGF- β 1 stimulait la synthèse de collagène IV dans certains types cellulaires comme les fibroblastes embryonnaires murins NIH-3T3 où il induit l'expression génique des chaînes α 1 et α 2(IV) (Grande et coll, 1993), mais également dans les cellules mésangiales murines (Jiang et coll, 2010; Leil et coll, 1998).

De plus, il est maintenant bien établi que le TGF- β augmente la synthèse de collagène I et que sa diminution d'activité est aussi impliquée dans la diminution de ce collagène au cours du vieillissement (Quan et coll, 2004). Suite à cette première expérience et à ces constatations, nous avons décidé de nous focaliser sur le TGF- β 1. L'utilisation d'anticorps bloquants du TGF- β 1 nous a permis de mettre en évidence une diminution de la synthèse de collagène IV lorsque la voie du TGF- β 1 est inactivée. Nous avons étudié l'expression du collagène IV dans notre modèle de vieillissement, en présence ou en absence de TGF- β 1. Nous avons traité les fibroblastes présentant un phénotype sénescence avec le TGF- β 1 afin de vérifier qu'il était toujours capable de stimuler la synthèse de collagène IV dans ces conditions et de restaurer le taux basal d'expression.

Dans une troisième partie, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'action conduisant à la diminution de collagène de type IV. Nous avons, à l'aide de « protein array », étudié l'expression de protéines impliquées dans la voie du TGF- β dans des fibroblastes témoins et des fibroblastes sénescents (traités avec 100 μ M d'H₂O₂) et avons mis en évidence

une diminution d'expression du récepteur au TGF- β 1, le T β RII, ainsi que, de façon moins importante, une diminution d'expression du TGF- β 1. Nous avons également observé une augmentation de phospho-Smad 2 et 3. Une augmentation de JNK et p38MAPK est également observée. Ces protéines sont impliquées dans la diminution d'expression de procollagène I par les fibroblastes dermiques lors d'un stress induit par les UVs (Rittier et Fisher, 2002). Il est possible que ces molécules jouent également un rôle dans la diminution de la synthèse de collagène IV. Des modulations d'expression (positives telles que pour la MAP kinase kinase 6, la protéine kinase C theta, AKT1, ou négatives telles que pour la PKC zeta) ou de phosphorylations (positives telles que pour JNK, AKT1 ou négatives telles que pour Myc) ont été également mises en évidence. Une des perspectives est d'étudier l'effet d'une inhibition ou d'une surexpression de l'expression ou de la phosphorylation de ces protéines sur la synthèse de collagène IV par les fibroblastes dermiques sénescents. L'étude de l'expression génique du TGF- β 1 et de son récepteur T β RII a révélé que le TGF- β 1 ne variait pas dans des fibroblastes sénescents comparé à des fibroblastes contrôle tandis que son récepteur diminuait. Le fait que l'ARNm du TGF- β 1 ne varie pas est en corrélation avec une étude réalisée en 1996 montrant que c'est n'est pas le niveau basal de TGF- β 1 qui est modifié au cours du vieillissement mais son activité (Zeng et coll, 1996). De plus, il a également été montré que lors d'un vieillissement dû aux UV, c'est l'expression génique du récepteur qui diminue mais pas celle du TGF- β 1 lorsque les cellules étaient exposées aux UV (Han et coll, 2004). Nous avons tout de même étudié l'expression protéique de TGF- β 1 après traitement en réalisant une cinétique allant de 0 à 48 h et nous avons montré une diminution de TGF- β 1 2h après le traitement se prolongeant jusqu'entre 24 et 48 h.

Pour vérifier que la voie des Smads est bien impliquée dans la synthèse de collagène IV, nous avons réalisé des immunoprécipitations des phospho-Smad 2 et 3 à partir d'extraits cellulaires de fibroblastes traités ou non avec 100 μ M d' H_2O_2 avons montré une légère augmentation de la phosphorylation de Smad 2 et 3 à chez les fibroblastes sénescents par rapport aux fibroblastes témoins, ce qui est semble confirmer les résultats observés par « protein array ». Nous continuons actuellement cette étude réalisant une cinétique allant de 0 à 48 h sur des fibroblastes traités avec 100 μ M d' H_2O_2 afin de confirmer l'augmentation de phosphorylation mais aussi de déterminer combien de temps après le traitement avec H_2O_2 cette augmentation débute.

Les résultats de cette étude suggèrent que la diminution d'expression de collagène IV dans les membranes basales âgées, pourrait être, en partie, due à la diminution d'expression de

collagène IV par les fibroblastes dermiques sénescents puisqu'il a été rapporté qu'une accumulation de fibroblastes sénescents est observée avec l'âge *in vivo* (Dimri et coll, 1995).

F. Conclusion et perspective

Nous avons démontré que l'expression protéique des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(\text{IV})$ dans des extraits de peaux totales tend à diminuer au cours du vieillissement. Cependant nous n'avons pas pu différencier le collagène IV de la jonction dermo-épidermique de celui présent dans les vaisseaux sanguins du derme. Nous avons, pour pallier à ce problème, réalisé des microdissections lasers afin de ne récupérer que la JDE mais la très faible quantité de protéines obtenus du fait de la faible épaisseur de la JDE ne nous a pas permis de mettre au point un western-blot assez sensible pour détecter le collagène de type IV.

Nous n'avons pu réaliser l'étude de l'expression génique de ces chaînes puisque nous n'avons extrait que des ARN dégradés du fait du temps écoulé entre la collecte des fragments de peaux au bloc opératoire et le moment où nous récupérons ces fragments. Une perspective est de pouvoir récupérer les fragments de peau directement à la sortie du bloc opératoire afin d'extraire les ARN le plus rapidement possible et ainsi éviter leur dégradation.

Pour l'expression génique de la chaîne $\alpha 1(\text{IV})$ par les fibroblastes dermiques, nous avons montré une diminution d'expression de cette chaîne au cours du vieillissement dans des fibroblastes issus de prépuces et de seins. Mais du fait de l'origine différente des fragments de peaux nous avons ensuite préféré réaliser deux études distinctes, l'une sur les fibroblastes de prépuces, l'autre sur ceux de seins. Mais les prépuces de patients âgés sont très rares. Les fragments de peau prélevés à distance des tumeurs mammaires sont aussi très rares chez les sujets jeunes. Il faudrait idéalement prélever un fragment de peau à une localisation accessible chez des patients de tous âges.

De plus, par manque de temps, nous n'avons pu étudier l'expression de collagène IV par les kératinocytes. Des études préliminaires réalisées sur kératinocytes issus de prépuces et de seins avaient mis en évidence une diminution d'expression des 4 chaînes présentes dans la JDE. Cependant du fait de la provenance différente des kératinocytes, nous n'avons pas validé ce résultat. Il serait donc intéressant d'étudier les variations d'expressions du collagène IV soit dans des kératinocytes provenant d'une même origine mais chez des patients d'âges différents, soit, pour s'affranchir des variations interindividuelles, induire un vieillissement prématuré des kératinocytes par traitement aux UVs (Debacq-Chainiaux et coll, 2012).

La mise au point d'un modèle pour étudier le mécanisme impliqué dans la diminution de collagène IV lors du vieillissement nous a permis de nous affranchir des importantes variations interindividuelles. Le modèle murin n'est pas adapté à l'étude des variations de collagène IV au cours du temps puisqu'il semble y avoir un phénomène compensatoire de la

diminution d'expression d' $\alpha 1$ et $\alpha 2(\text{IV})$ par $\alpha 5$ et $\alpha 6(\text{IV})$ qui n'est pas observé chez l'humain. Les souris SAM ne présentent également pas un modèle d'étude adapté puisque les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(\text{IV})$ ne varient pas entre les souris vieilles artificiellement et les souris témoins.

Le modèle de vieillissement par passages et par traitement au NaCl n'ont pas pu être utilisés non plus bien que l'expression génique des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2(\text{IV})$ suive la même évolution que lors d'un vieillissement chronologique, aucune variation de l'expression protéique n'est observée. Cependant ces modèles peuvent être utilisés pour étudier la régulation de l'expression génique de ces chaînes au cours du vieillissement. En effet, la diminution génique d' $\alpha 1$ et $\alpha 2(\text{IV})$ semble corrélée, ce qui n'est pas surprenant compte tenu du fait que ces deux gènes sont sous le contrôle d'un promoteur commun. Ce promoteur possède des sites de fixation et est régulé par le facteur sp1 (boîte GC et boîte CTC), le CCAAT-binding factor et le CTC-binding factor. Une des perspectives est d'étudier les potentielles variations d'expression de ces facteurs de transcription par les fibroblastes vieillis artificiellement par rapport aux fibroblastes témoins.

Le modèle de vieillissement par traitement avec H_2O_2 représente un modèle adapté pour notre étude puisqu'il suit les variations géniques et protéiques du collagène IV au cours d'un vieillissement chronologique.

Nous avons montré que le TGF- $\beta 1$ induisait la synthèse de collagène IV par les fibroblastes dermiques contrôles. De plus une inhibition du TGF- $\beta 1$ par un anticorps bloquant inhibe la synthèse de collagène IV par les fibroblastes dermiques. Dans les fibroblastes sénescents (vieillis artificiellement par H_2O_2) un traitement au TGF- $\beta 1$ est capable de restaurer l'expression de collagène IV.

L'expression de plusieurs protéines de la voie du TGF- $\beta 1$ est modifiée lorsque les cellules sont sénescents. Une des perspectives est donc de voir si ces modifications d'expression et de phosphorylation des protéines de la voie du TGF- $\beta 1$ sont liées avec la baisse d'expression de collagène IV. Ce qui permettrait, à terme, de cibler les protéines en amont de cette voie de signalisation et de moduler leur expression afin de restaurer le collagène de type IV des fibroblastes âgés ou de contrer sa diminution au cours du vieillissement.

Les perspectives à long terme de cette étude sont donc de déterminer le mécanisme exact à l'origine de cette diminution de collagène IV au niveau de la jonction dermo-épidermique dans le but de proposer, à terme des solutions permettant de rétablir son

expression afin de maintenir l'intégrité de la membrane basale dermo-épidermique au cours du vieillissement.

De plus, les domaines non collagéniques NC1 possèdent des propriétés anti-angiogéniques et/ou anti-tumorales importantes. Le maintien de l'expression de ce collagène de type IV pourrait donc permettre de s'opposer au développement de cancers cutanés chez les personnes âgées.

G. Bibliographie

ABREU-VELEZ AM, HOWARD MS.

Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes.

N Am J Med Sci. 2012 ; 4(1) : 1-8.

ALENZI FQ, SALEM ML, ALENAZI FA, WYSE RK.

Cellular and molecular aspects of Goodpasture syndrome.

Iran J Kidney Dis. 2012 ; 6(1) : 1-8.

AUMAILLEY M, ROUSSELLE P.

Laminins of the dermo-epidermal junction.

Matrix Biol. 1999 ; 18(1) : 19-28.

BAILEY AJ, SIMS TJ, LIGHT N.

Cross-linking in type IV collagen.

Biochem J. 1984 ; 218(3) : 713-23.

BAYREUTHER K, RODEMANN HP, HOMMEL R, DITTMANN K, ALBIEZ M, FRAN CZ PI.

Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage.

J Cell Sci Suppl. 1998 ; 10 : 115-30.

BEN-PORATH I, WEINBERG RA.

The signals and pathways activating cellular senescence.

Int J Biochem Cell Biol. 2005 ; 37(5) : 961-76.

BETTINGER DA, YAGER DR, DIEGELMANN RR, COHEN IK.

The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis.

Plast Reconstr Surg. 1996 ; 98(5) : 8 27-33.

.

BISCHOF O, DEJEAN A, PINEAU P.

Une re-vue de la sénescence cellulaire : Ami ou ennemi de la promotion tumorale ?

Medecine/Sciences. 2009 ; 25 : 153-60.

BRIGGAMAN RA, WHEELER CE.

The epidermal-dermal junction.

J Invest Dermatol. 1975 ; 65(1) : 71-84.

BURGESON RE, CHRISTIANO AM.

The dermal-epidermal junction

Curr Opin Cell Biol. 9 (5) (1997) , pp. 651–658.

CANDIELLO J, COLE GJ, HALFTER W.

Age-dependent changes in the structure, composition and biophysical properties of a human basement membrane.

Matrix Biol. 2010 ; 29(5) : 402-10.

CHEN QM.

Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints.

Ann N Y Acad Sci. 2000 ; 908 : 111-25.

CHEN JH, HALES CN, OZANNE SE.

DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative?

Nucleic Acids Res. 2007 ; 35(22) : 7417-28.

CHEN S, LEE JS, IGLESIAS DE LA CRUZ MC, WANG A, IZQUIERDO-LAHUERTA A, GANDHI NK, DANESH FR, WOLF G, ZIYADEN FN.

Angiotensin II stimulates alpha3(IV) collagen production in mouse podocytes via TGF-beta and VEGF signalling: implications for diabetic glomerulopathy.

Nephrol Dial Transplant. 2005 ; 20(7):1320-8.

COLWELL AS, FAUDO R, KRUMMEL TM, LONGAKER MT, LORENZ HP.

Transforming growth factor-beta, Smad, and collagen expression patterns in fetal and adult keratinocytes.

Plast Reconstr Surg. 2007 ; 119(3) : 852-7.

CRISTOFALO VJ, LORENZINI A, ALLEN RG, TORRES C, TRESINI M.

Replicative senescence: a critical review.

Mech Ageing Dev. 2004 ; 125(10-11) : 827-48.

DEBACQ-CHAINIAUX F, LEDUC C, VERBEKE A, TOUSSAINT O.

UV, stress and aging.

Dermatoendocrinol. 2012 ; 4(3) : 236-40.

DEHAY C, KENNEDY H.

Cell-cycle control and cortical development

Nature reviews. 2007 ; Neuroscience 8 , 438-450

DE MAGALHAES J.P, CHAINIAUX F, DE LONGUEVILLE F, MAINFROID V, MIGEOT V, MARCQ L, REMACLE J, SALMON M, TOUSSAINT O.

Gene expression and regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human foreskin fibroblasts expressing or not telomerase.

Exp Gerontol. 2004 ; 39(9):1379-89.

DERYNCK R, ZHANG YE.

Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.

Nature. 2003 ; 425(6958) : 577-84.

DIMRI GP, LEE X, BASILE G, ACOSTA M, SCOTT G, ROSKELLEY C, MEDRANO EE, LINSKENS M, RUBELGI I, PEREIRA-SMITH O.

A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 ; 92(20) : 9363-7.

DiPERSIO CM, VAN DER NEUT R, GEORGES-LABOUESSE E, KREIDBERG JA, SONNENBERG A, HYNES RO.

alpha3beta1 and alpha6beta4 integrin receptors for laminin-5 are not essential for epidermal morphogenesis and homeostasis during skin development.

J Cell Sci. 2000 ; 113 : 3051-62.

DMITRIEVA NI, BULAVIN DV, BURG MB

High NaCl causes Mre11 to leave the nucleus, disrupting DNA damage signaling and repair.
Am J Physiol Renal Physiol. 2003 ; 285: F266-74.

DREYER C, RAYMOND E, FAIVRE S.

La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR
Cancéro dig. Vol. 1 N° 3 - 2009 - 187-189 187.

DUMONT P, CHAINIAUX F, ELIAERS F, PETROPOULOU C, REMACLE J, KOCH-BRANDT C,
GONOS ES, TOUSSAINT O.

Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and
premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide.
Cell Stress Chaperones. 2002 ; 7(1) : 23-35.

DUMONT P, BURTON M, CHEN Q.M, GONOS ES, FRIPPIAT C, MAZARATI JB, ELIAERS F,
REMACLE J, TOUSSAINT O.

Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal
human fibroblast.
Free Radic Biol Med. 2000 ; 28 , 361-73.

DU B, MA LM, HUANG MB, ZHOU H, HUANG HL, SHAO P, CHEN YQ, QU LH.

High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells.
FEBS Lett. 2010 ; 584(4) : 811-6.

DUNCAN KG, FESSLER LI, BACHINGER HP, FESSLER JH.

Procollagen IV. Association to tetramers.
J Biol Chem. 1983 ; 258(9) : 5869-77.

FRIPPIAT C, CHEN QM, SDANOV S, MAGALHAES JP, REMACLE J, TOUSSAINT O.

Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts.

J. Biol. Chem. 2001 ; 276 pp. 2531-2537.

FRIPPIAT C, REMACLE J, TOUSSAINT O.

Down-regulation and decreased activity of cyclin-dependent kinase 2 in H₂O₂-induced premature senescence.

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2003 ; 35 : 246–254.

FRIPPIAT C, CHEN QM, REMACLE J, TOUSSAINT O.

Cell cycle regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins.

Exp Gerontol. 2000 ; 35(6-7) : 733-45.

FONTANA L, CHEN Y, PRIJATELJ P, SAKAI T, FASSLER R, SAKAI LY, RIFKIN DB.

Fibronectin is required for integrin alpha_vbeta₆-mediated activation of latent TGF-beta complexes containingLTBP-1.

FASEB J. 2005 ; 19(13) : 1798-808.

FORTUNEL NO, CADIO E, VAIGOT P, CHADLI L, MORATILLE S, BOUET S, ROME PH, MARTIN T.

Exploration of the functional hierarchy of the basal layer of human epidermis at the single-cell level using parallel clonal microcultures of keratinocytes

Exp Dermatol. 2010 ; 19(4) : 387-92.

FUNK WD, WANG CK, SHELTON DN, HARLEY CB, PAGON GD, HOEFFLER WK.

Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model.

Exp Cell Res. 2000 ; 258(2) : 270-8.

GARCIA-ECHEVERRIA C, SELLER W.R.

Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer

Oncogene (2008) 27, 5511–5526; doi:10.1038/onc.2008.246

GIRE V.

Senescence: a telomeric limit to immortality or a cellular response to physiologic stresses?

Med Sci. 2005 ; 21(5):491-7.

GONOS S, DERVENTZI A, KVEIBORG M, AGIOSTRATIDOU G, KASSEM M, CLARK FC, PARMJIT S, RATTAN S.

Cloning and Identification of Genes That Associate with Mammalian Replicative Senescence

Exp cell resaech. 1998 ; 240 , 66–74.

GHOHESTANI RF, Li K, ROUSSELLE P, UITTO J.

Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone.

Clin Dermatol. 2001 ; 19 (5) : 551-62.

GONOS ES, DERVENTZI A, KVEIBORG M, AGIOSTRATIDOU G, KASSEM M, CLARK BF, JAT PS, RATTAN SI.

Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence.

Exp Cell Res. 1998 ; 240(1) : 66-74.

GRANDE JP, WARNER GM, WALKER HJ, YUSUFI AN, CHENG J, GRAY CE, KOPP JB, NATH KA.

TGF-beta1 is an autocrine mediator of renal tubular epithelial cell growth and collagen

IV production.

Exp Biol Med. 2002 ; 227(3) : 171-81.

GRANDE J, MELDER D, ZINSMEISTER A, KILLEN P.

Transforming growth factor-beta 1 induces collagen IV gene expression in NIH-3T3 cells.

Lab Invest. 1993 ; 69(4) : 387-95.

GRESSNER A.M, WEISKIRCHEN R, BREITKOPF K, DOOLEY S.

Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis.

Front Biosci. 2002 ; 7:d793-807.

HAN KH, CHOI HR, WON CH, CHUNG JH, CHO KH, EUN HC, KIM KH.

Alteration of the TGF-beta/SMAD pathway in intrinsically and UV-induced skin aging.

Mech Ageing Dev. 2005 ; 126(5) : 560-7.

HASEGAWA H, NAITO I, NAKANO K, MOMOTA R, NISHIDA K, TAGUCHI T, SADO Y, NINOMIYA Y, OHTSUKA A.

The distributions of type IV collagen alpha chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages.

Arch Histol Cytol. 2007 ; 70(4) : 255-65.

HASHMI S, MARINKOVICH MP.

Molecular organization of the basement membrane zone.

Clin Dermatol. 2011 ; 29(4) : 398-411.

HERBIG U, JOBLING BP, CHEN DJ, SEVIDY JM.

Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a).

Molecular Cell 2004 , pp. 501-513.

HUDSON BG.

The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family.

J Am Soc Nephrol. 2004 ; 15(10) : 2514-27.

JIANG W, ZHANG Y, WU H, ZHANG X, GAN H, SUN J, CHEN Q, GUO M, ZHANG Z

Role of cross-talk between the Smad2 and MAPK pathways in TGF-beta1-induced collagen IV expression in mesangial cells.

Int J Mol Med. 2010 ; 26(4) : 571-6.

KALLURI R.

Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis

Nat Rev Cancer. 2003 ; 3(6) : 422-33.

KARTTUNEN T, RISTELI J, AUTIO-HARMAINEN H, RISTELI L.

Effect of age and diabetes on type IV collagen and laminin in human kidney cortex.

Kidney Int. 1986 ; 30(4) : 586-91.

KASHTAN CE.

Alport Syndrome and Thin Basement Membrane Nephropathy : Diseases Arising From Mutation in Type IV collagen.

Saudi J Kidney Dis Transpl. 2003 ; 14:276-89.

KEENE DR, SAKAI LY, LUNSTRUM GP, MORRIS NP, BURGESSON RE.

Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils.

J Cell Biol. 1987 ; 104 : 611–621.

KEFALIDES NA, BOREL JP,

Structural Macromolecules: Type IV Collagen

Current Topics in Membranes. 2000 ; 56 : 115-145.

KHOSHNOODI J, PEDCHENKO V, HUDSON BG.

Mammalian Collagen IV

Microsc Res Tech. 2008 ; 71(5) : 357-70.

KIM MS, KIM YK, CHO KH, CHUNG JH.

Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin.

Mech Ageing Dev. 2006 ; 127(12) : 875-82.

KIPLING D.

Telomeres, replicative senescence and human ageing.

Maturitas. 2001 ; 38(1):25-37.

KOLI K, SAHARINEN J, HYYTIAINEN M, PENTTINEN C, KESKI-OJA J.

Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta.

Microsc Res Tech. 2001 ; 52(4) : 354-62.

KOVACIC JC, MORENO P, HACHINSKI V, NABEL EG, FUSTER V.

Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 1 of a 2-part review.

Circulation. 2011; 123(15) : 1650-60.

KUBICZKOVA L, SEDLARIKOVA L, HAJEK R, SEVCIKOVA S

TGF- β - an excellent servant but a bad master.

J Transl Med. 2012 ; 10 : 183.

KUHN K.

Basement membrane (type IV) collagen.

Matrix Biol. 1995 ; 14(6) : 439-45.

LAFFORGUES C.

Lipides épidermiques et *stratum corneum*

Réalités Thérapeutiques en Dermato-Vénérologie N° 179 - Cahier 2.

LAMOUILLE S, DERYNCK R.

Emergence of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin axis in transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition.

Cells Tissues Organs. 2011 ; 193(1-2) : 8-22.

LEASK A, ABRAHAM DJ.

TGF- β signaling and the fibrotic response

The FASEB Journal. 2004 vol. 18 no. 7 816-827.

LEBLEU VS, MACDONALD B, KALLURI R.

Structure and function of basement membranes.

Exp Biol Med. 2007 ; 232(9) : 1121.

LEE C.M, WEINDRUCH R, AIKEN JM.

Age-associated alterations of the mitochondrial genome.

Free Radic Biol Med. 1997 ; 22, 1259-69.

LEI J, SILBIGER S, ZIYAHED FN, NEUGARTEN J.

Serum-stimulated α 1 type IV collagen gene transcription is mediated by TGF- β and inhibited by estradiol.

Am J Physiol Renal Physiol. 1998 ; 274 : F252-F258.

LEVAKOV A, VUCKOVIC N, DOLAI M, KACANSKI MM, BOZANIC S.

Age-related skin changes.

Med Pregl. 2012 ; 65(5-6) : 191-5.

LE VARLET B, CHAUDAGNE C, SAUNOIS A, BARRE P, SAUVAGE C, BERTHOULOUX B, MEYBECK A, DUMAS M, BONTE F.

Age-related functional and structural changes in human dermo-epidermal junction components.

J Investig Dermatol Symp Proc. 1998 ; 3(2) : 172-9.

LI C, GARLAND JM, KUMAR S.

Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer.

J Natl Cancer Inst. 2001 ; 93(7) : 555-7.

LIN CH, YU MC, TUNG WH, CHEN TT, YU CC, WENG CM, TSAI YJ, BAI KJ, HONG CY, CHIEN MH, CHEN BC.

Connective tissue growth factor induces collagen I expression in human lung fibroblasts through the Rac1/MLK3/JNK/AP-1 pathway.

Biochim Biophys Acta. 2013 ; S0167-4889 (13) 00291-7.

MAGALHAES JP, CHAINIAUXA F, DE LONGEVILLE F, MAINFROID V, MIGEOT V, MARCQ L,
REMACLE J SALMONA M, TOUSSAINT O.

Gene expression and regulation in H₂O₂-induced premature senescence of human foreskin
fibroblasts expressing or not telomerase

Experimental Gerontology. 2004; 39 1379–1389.

MASSAGUE J, BLAIN SW, LO RS.

TGF beta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders.

Cell. 2000 ; 103(2) : 295-309.

MASUNAGA T.

Epidermal basement membrane: its molecular organization and blistering disorders.

Connect Tissue Res. 2006 ; 47(2) : 55-66.

MAZOUNI C, ARUN F, AYERS M, KRISHNAMURTHY S, WANG B, HORTOBAGYI GN, BUSDAR
AU, PUSZTAI L.

Collagen IV levels are elevated in the serum of patients with primary breast cancer
compared to healthy volunteers.

Br J Cancer. 2008 ; 99(1) : 68-71

McMILLAN JR, AKIYAMA M, SHIMIZU H.

Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and
molecular interactions.

J Dermatol Sci. 2003 ; 31(3) : 169-77.

MENON GK, CLEARY GW, LANE ME.

The structure and function of the stratum corneum

Int J Pharm. 2012 ; 435(1) : 3-9.

MINER JH, SANES JR.

Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications
for Alport syndrome

J Cell Biol. 1996 ; 135(5) , 1403-13.

MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO KI.

Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms.

Trends Genet. 2004 ; 20(1) : 33-43.

MORITA A, TORII K, MAEDA A, YAMAGUCHI Y

Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging.

J Investig Dermatol Symp Proc. 2009 ; 14(1) : 53-5.

NAYAK BR, SPIRO RG.

Localization and structure of the asparagine-linked oligosaccharides of type IV collagen from glomerular basement membrane and lens capsule.

J Biol Chem. 1991 ; 266(21) : 13978-87.

NISHIMURA R, HATA K, IKEDA F, MATSUBARA T, YAMASHITA K, ICHIDA F, YONEDA T.

THE ROLE OF SMADS IN BMP SIGNALING

Frontiers in Bioscience 7. 2002 ; d752-764.

NYSTRÖM H, NAREDI P, HAFSTRÖM L, SUND M.

Type IV collagen as a tumour marker for colorectal liver metastases.

Eur J Surg Oncol. 2011; 37(7) : 611-7

OGRUNC M, DI FAGAGNA F.

Never-ageing cellular senescence.

Eur J Cancer. 2011 ; 47(11) : 1616-22.

OIKARINEN A.

Aging of the skin connective tissue: how to measure the biochemical and mechanical properties of aging dermis.

Photodermatol Photoimmunol Photomed. 1994 ; 10(2) : 47-52.

OLIVER N, STERNLICHT M, GERRITSEN K, GOLDSCHMEDING R.

Could aging human skin use a connective tissue growth factor boost to increase collagen content?

J Invest Dermatol. 2010 ; 130(2) : 338-41.

ORESAJO C, PILLAI S, MANCO M, YATSKAYER M, McDANIEL D.

Antioxidants and the skin: understanding formulation and efficacy.

Dermatol Ther ; 25(3):252-9.

PERES PS, TERRA VA, GUARNIER FA, CECCHINI R, CECCHINI AL.

Photoaging and chronological aging profile: Understanding oxidation of the skin.

J Photochem Photobiol B. 2011 ; 103(2) : 93-7

PETROV VV, FAGARD RH, LIJNEN PJ.

Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts.

Hypertension. 2002 ; 39(2) : 258-63.

POLJSAK B, DAHMANE RG, GODIC A

Intrinsic skin aging: the role of oxidative stress

Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat. 2012 ; 21(2) : 33-6.

POLLNER R, FISCHER G, PÖSCHL E, KÜHN K.

Regulation of divergent transcription of the genes coding for basement membrane type IV collagen.

Ann N Y Acad Sci. 1990 ; 580 : 44-54.

POSCHL E, SCHLOTZER-SCHREHARDT U, BRACHVOGEL B, SAITO K, NINOMIYA Y, MAYER U.

Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development.

Development. 2004 ; 131(7) : 1619-28.

PROKSCH E, BRANDNER JM, JENSEN JM.

The skin: an indispensable barrier

Exp Dermatol. 2008 ; 17(12) : 1063-72.

PROST-SQUARCIONI C, FRAITAG S, HELLER M, BOEHM N.

Functional histology of dermis

Ann Dermatol Venereol. 2008; 135(1 Pt 2) : 1S5-20.

QUAN TH, SHAO Y, HE T

Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin.

J Invest Dermatol. 2010 ; 130 : 415–24.

QUAN T, HE T, KANG S, VOORHEES JJ, FISHER GJ.

Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling.

Am J Pathol. 2004 ; 165(3) : 741-51.

RAINE-FENNING NJ, BRINCAT MP, MUSCAT-BARON Y.

Skin aging and menopause: implications for treatment.

Am J Clin Dermatol. 2003 ; 4(6) : 371-8.

RAY MC, GATELY LE.

Basement membrane zone.

Clin Dermatol. 1996 ; 14(4) : 321-30.

RICARD-BLUM S, RUGGIERO F.

The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane.

Pathol Biol. 2005 ; 53(7) : 430-42.

ROBERTS P.J, DER C.J.

Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer.

Oncogene. 2007; 26(22):3291-310.

ROUSSELLE P, LUNSTRUM GP, KEENE DR, BURGESSON RE.

Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments.

J Cell Biol. 1991 ; 114(3) : 567-76.

RUNYAN CE, SCHNAPER HW, PONCELET AC.

The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway enhances Smad3-stimulated mesangial cell collagen I expression in response to transforming growth factor-beta1.

J Biol Chem. 2004 ; 279(4) : 2632-9.

SANCHEZ-LOPEZ E, RODRIGUEZ-VITA J, CARTIER C, RUPEREZ M, ESTEBAN V, CARVAJAL G, RODRIGUEZ-DIEZ R, PLAZA J.J, EDIGO J, RUIZ-ORTEGA M.

Inhibitory effect of interleukin-1 β on angiotensin II-induced connective tissue growth factor and type IV collagen production in cultured mesangial cells.

Am J Physiol Renal Physiol. 2008 ; 294: F149–F160.

SHAY JW, WRIGHT WE.

Hayflick, his limit, and cellular ageing.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2000 ; 1(1) : 72-6

SHI Y, MASSAGUE J.

Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.

Cell. 2003 ; 113(6) : 685-700.

SIWIK DA, CHANG DL, COLUCCI WS.

Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro.

Circ Res. 2000 ; 86(12) : 1259-65.

STEINHOFF G.

Regenerative medicine

Springer 2001

STERNBERG M, GRIGOROVA-BORSOS AM, GUILLOT R, KASSAB JP, BAKILLAH A, URIOS P,
COHEN-FORTERRE L, MOZERE G, ANDRE J, LEBLOND V.

Changes in collagen type IV metabolism in diabetes

C R Seances Soc Biol Fil. 1993 ; 187(2) : 247-57.

TAKEDA T, HOSOKAWA M, TAKESHITA S, IRINO M, HIGUCHI K, MATSUSHITA T, TOMITA Y,
YASUHIRA K, HAMAMOTO H, SHIMIZU K, ISHII M, YAMAMURO T.

A new murine model of accelerated senescence.

Mech Ageing Dev. 1981 ; 17(2) : 183-94.

THORIN-TRESCASES N, VOGHEL G, FARHAT N, DROUIN A, GENDRON M.E, THORIN R.

Âge et stress oxydant: Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale

Med Sci. 2010 ; 26(10) : 875–880.

TIMPL R, MARTIN GR, BRUCKNER P, WICK G, WIEDEMANN H.

Nature of the collagenous protein in a tumor basement membrane.

Eur J Biochem. 1978 ; 84(1) : 43-52.

TOUSSAINT O, MEDRANO EE, VON ZGLINICKI T.

Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human
diploid fibroblasts and melanocytes.

Exp Gerontol. 2000 ; 35(8) : 927-45.

TOUSSAINT O, HOUBION A, REMACLE J.

Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the
cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts
in culture.

Mech Ageing Dev. 1992 ; 65 : 65-83.

UITTO J.

The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure.

J Drugs Dermatol. 2008 ; 7(2 Suppl) : 12-6.

VAN AGTMAEL T, BRUCKNER-TUDERMAN L.

Basement membranes and human disease.

Cell Tissue Res. 2010 ; 339 , 167–188.

VAZQUEZ F, PALACIOS S, ALEMÁN N, GUERRERO F

Changes of the basement membrane and type IV collagen in human skin during aging

Maturitas. 1996; 25(3) : 209-15.

VERDIER-SEVRAIN S.

Effect of estrogens on skin aging and the potential role of selective estrogen receptor modulators.

Climacteric 2007 ; 10(4) : 289-97.

VIERKOTTER A , KRUTMANN J.

Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations.

Dermatoendocrinol. 2012; 4(3) : 227-31.

VON ZGLINICKI T, SARETZKI G, DOCKE W, LOTZE C.

Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?

Exp Cell Res. 1995 ; 220(1) : 186-93.

WICKENS AP.

Ageing and the free radical theory.

Respir Physiol. 2001; 128(3) : 379-91.

XIA W, HAMMERBERG C, LI Y, HE T, QUAN T, VOORHEES JJ, FISHER GJ

Expression of catalytically active matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts induces collagen fragmentation and functional alterations that resemble aged human skin.

Aging Cell. 2013 ; 12(4) : 661-71.

XU Z, DUC KD, HOLCMAN D, TEIXEIRA MT.

The length of the shortest telomere as the major determinant of the onset of replicative senescence.

Genetics. 2013 ; 194(4) : 847-57.

YANG NC, HU ML.

The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells.

Exp Gerontol. 2005 ; 40(10) : 813-9

YIN L, MORITA A, TSUJI T.

Tobacco smoke extract induces age-related changes due to modulation of TGF-beta.

Exp Dermatol. 2003 ; 12 Suppl 2 : 51-6.

YING E, ZHANG

Non-Smad pathways in TGF- β signaling

Cell Res. 2009 ; 19(1) : 128–139.

YOUNG NS.

Telomere biology and telomere diseases: implications for practice and research.

Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2010 ; 2010 : 30-5.

ZDANOV S, REMACLE J, TOUSSAINT O.

Establishment of H₂O₂-induced premature senescence in human fibroblasts concomitant with increased cellular production of H₂O₂.

Ann N Y Acad Sci. 2006 ; 1067 : 210-6.

ZENG G, McCUE HM, MASTRANGELO L, MILLIS AJ.

Endogenous TGF-beta activity is modified during cellular aging: effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression.

Exp Cell Res. 1996 ; 228(2):271-6.

ZHONG J, HU N, IONG X, LEI Q, LI L.

A novel promising therapy for skin aging: dermal multipotent stem cells against photoaged skin by activation of TGF- β /Smad and p38 MAPK signaling pathway.

Med Hypotheses. 2011 ; 76(3) : 343-6.

RESUME

Titre : Etude de la diminution du collagène IV au cours du vieillissement cutané et des mécanismes impliqués

Le vieillissement cutané s'accompagne d'altérations des composants de la matrice extracellulaire. Des études ont montré que le contenu en collagène IV diminuait dans la peau à partir de 35 ans. Le collagène IV, constituant majeur des membranes basales, est formé de l'association, en triple hélice, de 3 chaînes α parmi 6 possibles: $\alpha 1(\text{IV})$ à $\alpha 6(\text{IV})$. Au niveau de la membrane basale cutanée, encore appelée jonction dermo-épidermique, seulement deux isoformes de collagène IV ont été mises en évidence : [$\alpha 1(\text{IV})_2$; $\alpha 2(\text{IV})$], isoforme majoritaire, et [$\alpha 5(\text{IV})_2$; $\alpha 6(\text{IV})$], isoforme minoritaire, synthétisées par les fibroblastes et les kératinocytes. Nous avons vérifié, par western-blot sur des extraits de peaux, cette diminution de collagène IV. Nous avons ensuite analysé la répartition du collagène IV au niveau de la JDE sur des coupes transversales de peau et n'avons pu mettre en évidence de discontinuité dans le réseau de collagène IV avec l'âge, du fait des fortes variations inter-individuelles. Parallèlement, sur coupe de peau, nous avons tenté de mettre en évidence des différences spectrales du collagène IV avec l'âge par spectroscopie Raman mais la résolution s'est avérée insuffisante. Nous avons isolé des fibroblastes de patients d'âges différents et montré une diminution de l'expression génique de la chaîne $\alpha 1(\text{IV})$ malgré de fortes variations inter-individuelles. Afin de s'affranchir de ces variations inter-individuelles pour étudier les mécanismes impliqués dans la diminution d'expression du collagène IV, nous avons mis au point un modèle de vieillissement accéléré de fibroblastes traités à l' H_2O_2 et vérifié le phénotype sénescence des cellules (morphologie modifiée, augmentation de l'activité SA- β -galactosidase, augmentation de p21^{WAF-1}...). Nous nous sommes intéressés à la voie du TGF- $\beta 1$. Nous avons montré que l'expression du récepteur au TGF- $\beta 1$, T β RII, diminuait dans le modèle de vieillissement accéléré. Nous avons également montré qu'un anticorps bloquant anti-TGF- $\beta 1$ reproduisait la diminution d'expression de collagène IV observée au cours de la sénescence. La détermination du mécanisme impliqué pourrait permettre, à terme, de proposer de nouvelles stratégies pour maintenir l'intégrité de la membrane basale lors du vieillissement cutané.

Mots clés : collagène de type IV, vieillissement cutané, fibroblastes dermiques, sénescence, TGF- $\beta 1$

ABSTRACT

Title: Study of type IV collagen decrease during skin aging and involves mechanisms

During aging skin there are extracellular matrix alterations. Preliminary studies showed that type IV collagen content decreased in skin with age after 35 years. Type IV collagen is a major component of basement membranes. It's constituted by the association of 3 alpha chains among 6 possible ($\alpha 1$ to $\alpha 6$). In the cutaneous basement membrane also called dermo-epidermal junction, only two isoform of type IV collagen were found: [$\alpha 1(\text{IV})_2$; $\alpha 2(\text{IV})$], which is majoritary isoform, and [$\alpha 5(\text{IV})_2$; $\alpha 6(\text{IV})$], which is minority, both synthesized by fibroblasts and keratinocytes. We checked the decrease in type IV collagen by western-blot on skin extracts. We then analyzed the distribution of this collagen in the DEJ on skin sections but we were not able to highlight a discontinuity in the network of type IV collagen during aging. At the same time, we tried to highlight spectral differences of the collagen IV with aging by Raman spectroscopy on skin sections but the resolution was insufficient. 35 years. We showed a decrease of type IV collagen expression by dermal fibroblasts in spite of strong variation between patients. In order to study the mechanism involved in type IV collagen variation during aging in dermal fibroblasts avoiding inter-individual variations, we develop an accelerated aging model of fibroblasts by treatment with H_2O_2 . We checked the senescent phenotype of the cells (modified morphology, increase of SA- β -galactosidase activity, increase of p21^{WAF-1}...). We were interested on the TGF- $\beta 1$ pathway and we showed that TGF- $\beta 1$ receptor, called T β RII, was decreased in our accelerated aging model. We also showed that a blocking antibody against TGF- $\beta 1$ reproduced the decrease of type IV collagen expression observed during the senescence. during aging. The determination of the involved mechanism could lead to propose new strategies to maintain the integrity of the basal membrane during skin aging.

Keywords : IV collagen, skin aging, dermal fibroblasts, senescence, TGF- $\beta 1$