



Année 2015

N°

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE  
**THESE**  
Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**  
**Discipline : Physique (Spécialité Biologie-Biophysique)**

Présentée et soutenue publiquement

Par

**Christophe EKLOUH-MOLINIER**

Le 14 décembre 2015

Titre :

**Caractérisation moléculaire et structurale du vieillissement cutané  
au moyen de la micro-imagerie d'absorption infrarouge  
et de la micro-spectroscopie de diffusion Raman**

**JURY**

Pr Arlette BAILLET-GUFFROY	Université de Paris-Sud	Présidente du jury
Dr Florian FORMANEK	L'Oréal Research & Innovation	Rapporteur
Dr Sylvie BRASSART-PASCO	Univ. Reims Champagne-Ardenne	Examinateur
Pr Olivier PIOT	Univ. Reims Champagne-Ardenne	Directeur de thèse
Pr Michel MANFAIT	Univ. Reims Champagne-Ardenne	Invité
Mme Virginie COUTURAUD	Centre d'Etudes & de Recherche en Cosmétologie	Invité

*“The measure of greatness in a scientific idea is the extent to which it stimulates thought and opens up new lines of research.”*

Paul A.M. Dirac, 1968

## **Remerciements**

### **A Madame le Professeur Arlette Baillet-Guffroy**

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse. Je vous remercie pour votre participation au jury de soutenance et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

### **A Monsieur le Docteur Florian Formanek**

Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail de thèse, d'en être rapporteur et de faire partie du jury de soutenance. Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de mon respect.

### **A Madame le Docteur Sylvie Brassart-Pasco**

Je te remercie très sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail et de faire partie du jury de soutenance. Merci également pour ton aide précieuse lors de nos études sur le collagène dermique.

### **Aux Messieurs les Professeurs Michel Manfait et Olivier Piot**

Je vous exprime à tous les deux toute ma reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de l'unité MéDIAN et de m'avoir donné tous les moyens pour réaliser ce travail dans de bonnes conditions. Merci de m'avoir permis de présenter mon travail dans de nombreux congrès nationaux et internationaux.

**Olivier**, je tiens à t'exprimer toute ma gratitude et mes plus sincères remerciements pour ton encadrement. Merci pour ta rigueur scientifique, pour tes conseils et ton aide lors de la rédaction des publications et de ce manuscrit de thèse, ainsi que pour la confiance que tu m'as accordée pendant mes trois années de doctorat. Merci également pour ta bonne humeur et surtout de m'avoir permis de faire les vendanges à tes côtés !

### **A Monsieur le Professeur Ganesh Sockalingum**

Je te remercie très sincèrement de m'avoir guidé durant mon Master 2. Un grand merci pour tes précieux conseils, ta rigueur et tes encouragements tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Merci également pour m'avoir donné l'opportunité de participer à des collaborations scientifiques. Au-delà tes qualités scientifiques, j'ai beaucoup apprécié tes qualités humaines. Merci pour tout !

### **A Monsieur le Professeur Pierre Jeannesson**

Je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements pour votre rigueur, vos précieux conseils et vos remarques franches et constructives. Vous m'avez appris depuis mon Master 2 à être capable de se remettre toujours en question et pour ça, je vous dis mille mercis !

### **Je tiens également à remercier :**

**L'Union Européenne (FEDER) et la région Champagne-Ardenne** pour le financement de mon doctorat, **la Plateforme IBiSA « Imagerie Cellulaire et Tissulaire » (PICT)** pour l'accès aux

différents appareils et stations de travail, ainsi que **l'Ambassade de France** pour leur soutien dans la réalisation de collaborations scientifiques en Angleterre.

**Virginie Couturaud, Pascale Barlier, Olivia Darner et Charlotte Ruelens** du Centre d'Etudes et de Recherche en Cosmétologie (CERCO) de Paris, **Johnny Beaugrand et Miguel Pernes** de l'INRA de Reims pour tout l'intérêt porté à nos projets, leur gentillesse et leur accueil chaleureux dans le cadre de nos collaborations respectives.

**Gianfelice Cinque et Katia Wehbe** du Synchrotron DIAMOND (Angleterre) pour leur implication, leur accueil et leur disponibilité.

**Nicole Bouland, Caroline Fichel et Saviz Nasri** pour leur gentillesse et leur aide pour la préparation des coupes tissulaires ; **Cyril Gobinet et David Sebiskeveradze** pour leur aide précieuse pour le traitement des données, ainsi que leur sympathie.

**Abdelilah Beljebbar** pour m'avoir permis d'assister le Docteur **Christine Chauvin** en TP de Chimie Analytique. Merci à **Christine** de m'avoir encadrée durant ses enseignements.

**Joan Attia, Jean-François Angiboust, Roselyne Garnotel, Nathalie Lalun, Hamid Morjani, Christine Terryn, Aurélie Trussardi-Régnier, Valérie Untereiner et Laurence Van Gulick** pour leur sympathie, leurs conseils et leur aide expérimentale. **Joan**, je te remercie encore pour tes conseils et remarques lors de la rédaction de ce manuscrit.

**Les Docteurs Goutam Chandra, Vincent Gaydou, Teddy Happillon et The Thuong Nguyen** pour leur aide très précieuse qu'ils m'ont apporté au cours de ces trois années de doctorat. Merci également pour votre implication dans ce travail de thèse, pour votre patience et surtout pour votre bonne humeur quotidienne.

**Marie Guilbert**, mon « encadrante non-officielle » durant mon Master 2, je ne te remercierais jamais assez de m'avoir apporté ton aide si précieuse et de m'avoir initié à la spectroscopie. Ce fut également un vrai plaisir d'avoir travaillé à tes côtés dans le cadre de collaborations scientifiques. Merci également pour tous tes précieux conseils, ton soutien, ta bonne humeur et ton amitié !

**Aurélie Lecellier**, ma « grande sœur », merci de m'avoir apporté ton soutien, tes conseils tant sur le plan professionnel que personnel, ta sympathie et ton amitié ! Promis, je passerais bientôt te voir en Normandie !

**Quê**, ma génialissime meilleure pote ! Un grand merci pour tous ces moments de rigolade, ta grande sincérité, tes qualités humaines, et surtout pour ton amitié. Je ne te remercierais jamais assez pour tes encouragements qui ont toujours su me motiver ! Cám ơn !

**Lila**, ma très chère (et très taquine) amie, merci énormément pour tes conseils, ton soutien sans faille, ton humour et toutes ces petites attentions dont tu as fait preuve à mon égard ! Je te souhaite en tout cas bon courage pour la fin de ta thèse ;) !

**Michaël**, mon cher collègue de bureau ! Merci pour ton implication au cours de ma deuxième année de thèse, ta bonne humeur et toutes les discussions et éclats de rires ! Je te souhaite un bon courage pour la fin de ta thèse, tu vas y arriver ;) !

**Brigitte, Camille, Céline, Charles** (bon courage pour la fin, vieux !), **Georges, Hadrien, Hassan, Ihcen, Jaafar, Jaya, Jennifer, Louis, Martine, Marwa** (bon courage pour la fin !), **Mathieu, Mathilde, Mireille, Mohammed, Nathalie** (bon courage, la fin est proche !!!), **Pascaline, Philippe, Shawn** (keep up, dude !), ainsi que toute **l'équipe MéDIAN** pour leur soutien, leur bonne humeur et tous ces bons moments passés ensemble.

Enfin, je remercie profondément ma **famille** pour leur soutien infaillible, et surtout mes **parents** qui m'ont toujours encouragé, surtout dans les moments difficiles. C'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui et pour ça, je vous en suis extrêmement reconnaissant ! Je suis fier d'avoir des parents tels que vous !!!

A celles et ceux qui m'ont aidé de près ou de loin, comme on dit en créole réunionnais, mi remercie zot toute dans le fond mon kér ☺ !!!

## **Résumé**

### **Caractérisation moléculaire et structurale du vieillissement cutané au moyen de la micro-imagerie d'absorption infrarouge et de la microspectroscopie de diffusion Raman.**

La peau assure la protection de l'organisme contre les agressions extérieures. Pourtant, la peau n'est pas à l'abri des effets inéluctables du vieillissement chronologique. En effet, ce processus a pour conséquence d'altérer la structure des différentes couches cutanées au point d'en affecter leurs caractéristiques fonctionnelles. Ce travail de thèse a pour but de caractériser les modifications moléculaires et structurales de la peau au cours du vieillissement chronologique à l'aide de méthodes non-invasives que sont les spectroscopies optiques vibrationnelles. Ainsi avons-nous pu mettre en évidence des altérations structurales du réseau de collagène dans des échantillons de peaux d'âges différents à l'aide d'une approche basée sur l'imagerie IR-TF (Infrarouge à Transformée de Fourier) en mode polarisé. Par la suite, nous avons démontré l'influence des molécules d'eau sur les changements d'orientation des fibres de collagène avec l'âge en adoptant une méthodologie basée sur la substitution, thermodynamiquement favorable, des molécules d'eau liée au collagène ( $H_2O$ ) par des molécules d'eau deutérée ( $D_2O$ ). Lors d'études réalisées *in vivo*, nous avons établi des corrélations entre les propriétés physiques (mécanique et statut d'hydratation) et les informations moléculaires du *stratum corneum* (*SC*) en traitant les données Raman et biométriques par la méthode des moindres carrés partiels (PLS). En s'appuyant sur la complémentarité des techniques biophysiques employées, ces différentes études ont permis d'illustrer le potentiel des spectroscopies vibrationnelles pour évaluer le vieillissement cutané et en déterminer certaines bases moléculaires.

## **Mots-Clés**

Vieillissement cutané, micro-imagerie infrarouge en mode polarisé, micro-spectroscopie confocale Raman, réseau de collagène dermique, échange  $H_2O/D_2O$ , *stratum corneum*, propriétés biométriques mécaniques.

## **Abstract**

### **Molecular and structural characterization of the skin aging by the means of the infrared micro-imaging and Raman micro-spectroscopy.**

The skin protects the body against external aggressions. However, the skin is not immune to the inevitable effects of the chronological aging. Indeed, this process leads to several structural alterations of the different cutaneous layers to the point of affecting their functional characteristics. This thesis work aims to assess the molecular and structural changes of the skin during chronological aging by using non-invasive methods such as optical vibrational spectroscopies. To do this, we highlighted the structural modifications of the collagen network in different-aged skin samples by using an approach based on FT-IR imaging (Fourier Transform Infrared) in polarized mode. Subsequently, we demonstrated the influence of water molecules on the changes of collagen fibers with age by adopting a methodology based on the substitution, thermodynamically favorable, of the collagen-bound water molecules ( $H_2O$ ) by deuterated water molecules ( $D_2O$ ). In *in vivo* studies, we have established correlations between physical and molecular properties of the *stratum corneum* (SC) by analyzing the Raman and biometric measurements with the Partial Least Squares (PLS) processing. Based on the complementarity of the biophysical techniques employed, these studies permitted to evaluate the impact of the chronological aging on the skin and could open some interesting prospects in both cosmetology and dermatology.

## **Keywords**

Skin aging, infrared micro-imaging in polarized mode, confocal Raman micro-spectroscopy, dermal collagen network,  $H_2O/D_2O$  exchange, *stratum corneum*, biometric mechanical properties.

## **Sommaire**

<b>Liste des abréviations .....</b>	i
<b>Liste des figures et des tableaux .....</b>	iii
<b>Avant-propos .....</b>	1
<b>CHAPITRE I : GENERALITES SUR LA STRUCTURE ET LE VIEILLISSEMENT DE LA PEAU.....</b>	4
I.1. Histologie et physiologie de la peau .....	5
I.1.1. Epiderme .....	6
I.1.2. Jonction épidermo-dermique (JED).....	14
I.1.3. Derme .....	14
I.1.3.1. Cellules du derme.....	16
I.1.3.2. Protéines.....	17
I.1.3.2.1. Collagène .....	17
I.1.3.2.2. Elastine .....	20
I.1.3.2.3. Gel interfibrillaire .....	21
I.2. Physiologie du vieillissement de la peau .....	22
I.2.1. Vieillissement intrinsèque .....	22
I.2.1.1. Facteurs responsables .....	22
I.2.1.1.1. Facteur génétique.....	22
I.2.1.1.2. Stress oxydatif .....	23
I.2.1.1.3. Modifications post-traductionnelles .....	23
I.2.1.1.4. Ménopause .....	24
I.2.1.2. Modifications cellulaires et moléculaires.....	24
I.2.1.2.1. Epiderme.....	24
I.2.1.2.2. Jonction épidermo-dermique (JED).....	25
I.2.1.2.3. Derme .....	25
I.2.1.2.4. Autres .....	26
I.2.1.3. Conséquences fonctionnelles et cliniques .....	26
I.2.2. Vieillissement extrinsèque.....	27
I.2.2.1. Facteurs responsables .....	27
I.2.2.1.1. Exposition solaire .....	27
I.2.2.1.2. Tabac .....	28
I.2.2.1.3. Environnement.....	28
I.2.2.1.4. Nutrition .....	28
I.2.2.2. Modifications cellulaires et moléculaires .....	29
I.2.2.2.1. Epiderme.....	29
I.2.2.2.2. Derme .....	29
I.2.2.3. Conséquences fonctionnelles et cliniques .....	29

---

I.3. Problématiques et objectifs .....	30
<b>CHAPITRE II : DEMARCHEES METHODOLOGIQUES .....</b>	<b>32</b>
II. 1. Spectroscopies vibrationnelles .....	33
II.1.1. Principe .....	33
II.1.1.1. Interaction rayonnement-matière .....	33
II.1.1.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge .....	35
II.1.1.3. Spectroscopie de diffusion Raman.....	40
II.1.2. Instrumentation .....	42
II.1.2.1. Spectroscopie d'absorption infrarouge .....	42
II.1.2.2. Spectroscopie de diffusion Raman.....	47
II.2. Autres méthodes analytiques appliquées à l'étude de la peau .....	50
II.2.1. Caractérisation <i>ex vivo</i> de l'hydratation de la peau par gravimétrie d'adsorption de vapeur d'eau (ou DVS pour <i>Dynamic Vapor Sorption</i> ) .....	50
II.2.2. Mesure <i>in vivo</i> de la perte insensible en eau au niveau de la peau .....	52
II.2.3. Mesure <i>in vivo</i> des propriétés mécaniques de la peau par succion.....	54
II.3. Application des spectroscopies IR et Raman dans l'étude du vieillissement cutané .....	56
II.4. Analyse des données spectrales.....	57
II.3.1. Pré-traitements .....	57
II.3.1.1. Elimination des spectres aberrants .....	57
II.3.1.2. Lissage .....	58
II.3.1.3. Correction de la ligne de base.....	58
II.3.1.4. Normalisation .....	58
II.3.1.5. Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC) .....	59
II.3.2. Classifications non supervisées des spectres .....	59
II.3.2.1. Analyse hiérarchique ascendante (HCA) .....	60
II.3.2.2. K-means.....	60
II.3.2.3. Fuzzy C-means (FCM) .....	61
II.3.3. Analyses statistiques multivariées.....	65
II.3.3.1. Sélection de variables sur les données spectrales par Randfeatures .....	65
II.3.3.2. Analyse en composantes principales (ACP) .....	66
II.3.3.3. Régression par moindres carrés partiels (PLS) .....	67
II.3.3.4. Corrélation bidimensionnelle (2D) .....	70
<b>CHAPITRE III : EVALUATION EX VIVO DES ALTERATIONS STRUCTURALES DU RESEAU DE COLLAGENE ET DE LEUR RELATION AVEC LES INTERACTIONS COLLAGENE/EAU AU COURS DU VIEILLISSEMENT CUTANE PAR MICRO-SPECTROSCOPIES VIBRATIONNELLES.....</b>	<b>74</b>
III. 1. Préambule du chapitre III.....	75
III. 2. Article #1 .....	76
III. 3. Article #2 .....	89
III. 4. Article #3 .....	109

III. 5. Etude complémentaire.....	141
<b>CHAPITRE IV : ETUDES IN VIVO SUR LE VIEILLISSEMENT CUTANE. CORRELATION ENTRE LES MESURES SPECTRALES RAMAN ET LES MESURES BIOMETRIQUES DE LA PEAU .....</b>	<b>149</b>
IV. 1. Préambule du chapitre IV .....	150
IV. 2. Article #4 .....	151
IV. 3. Etude complémentaire .....	183
<b>CHAPITRE V : LA GLYCATION NON-ENZYMATIQUE : UN PHENOMENE CONTRIBUANT AU VIEILLISSEMENT CHRONOLOGIQUE.....</b>	<b>191</b>
V. 1. Généralités sur la glycation non-enzymatique .....	192
V. 2. Résultats & Discussion .....	196
V.2.1.    Préambule du chapitre V .....	196
V. 2. 2. Article #5 .....	197
V. 2. 3. Article #6 .....	228
Conclusions et perspectives .....	261
Références bibliographiques.....	264
Productions scientifiques .....	278

## Liste des abréviations

- 2D:** Bidimensionnel  
**3D:** Tridimensionnel  
**Å:** Angström  
**ACP:** Analyse en Composantes Principales  
**ADN:** Acide Désoxyribonucléique  
**AGES:** Advanced Glycation End-products  
**Arg:** Arginine  
**BaF<sub>2</sub>:** fluorure de barium  
**CaF<sub>2</sub>:** fluorure de calcium  
**CCD:** Charge-Coupled Device  
**CEdG:** N<sup>2</sup>-carboxyethyl-2'-déoxyguanosine  
**CML:** Nε--carboxyméthyl-lysine  
**CO<sub>2</sub>:** Dioxyde de carbone  
**D<sub>2</sub>O:** Eau deutérée  
**DRS:** Diffuse Reflectance Spectroscopy  
**DVS:** Dynamic Vapor Sorption  
**EMSC:** Extended Multiplicative Signal Correction  
**FCM:** Fuzzy C-Means  
**FIR:** Far Infrared  
**FPA:** Focal Plane Array  
**GAGs:** Glycosaminoglycans  
**Gly:** Glycine  
**H:** Hydrogène  
**H-H:** Hailwood-Horrobin  
**HCA:** Hierarchical Cluster Analysis  
**HPLC:** High Performance Liquid Chromatography  
**Hyp:** 4-Hydroxyproline  
**IGA:** Intelligent Gravimeter Analyzer  
**IR:** Infrarouge  
**IR-TF:** Infrarouge à Transformée de Fourier  
**kDa:** KiloDalton  
**KRS-5:** bromoiodure de thallium  
**Lys:** Lysine  
**JED:** Jonction Epidermo-Dermique  
**LDA:** Linear Discriminant Analysis  
**LPP:** Long Periodicity Phase  
**LVs:** Latent Variables  
**MEC:** Matrice extracellulaire  
**MCT:** Mercure Cadmium Telluride  
**MIR:** Mid Infrared  
**MIRIAM:** Multimode InfraRed Imaging And Micro-spectroscopy

- MMPs:** Métalloprotéinases  
**MSC:** Multiplicative Signal Correction  
**NaCl:** Chlorure de Sodium  
**ND:** Neutral density  
**NIR:** Near Infrared  
**NMF:** Natural Moisturizing Factor  
**NMR:** Nuclear Magnetic Resonance  
**OCT:** Optical Coherence Tomography  
**PGs:** Protéoglycanes  
**PIE:** Perte Insensible en Eau  
**PLS:** Partial Least Squares  
**PPII:** Polyproline II  
**Pro:** Proline  
**RBA:** Redundancy-Based Algorithm  
**RH:** Relative Humidity  
**RMSE:** Root Mean Square Error  
**RMSEC:** Root Mean Square Error Calibration  
**RMSECV:** Root Mean Square Error Cross-Validation  
**RMSEP:** Root Mean Square Error Prediction  
**ROS:** Reactive Oxygen Species  
**S/B:** Rapport signal sur bruit  
**SB:** *Stratum Basale*  
**SC:** *Stratum Corneum*  
**SG:** *Stratum Granulosum*  
**SL:** *Stratum Lucidum*  
**SPP:** Short Periodicity Phase  
**SS:** *Stratum Spinosum*  
**TF:** Transformée de Fourier  
**UV:** Ultraviolet  
**ZnSe:** sélénium de zinc

## Liste des figures et des tableaux

### Figures:

Figure 1 : Schéma descriptif de la structure de la peau. ....	5
Figure 2 : Les différentes couches et types cellulaires de l'épiderme. ....	7
Figure 3 : Représentation schématique du modèle « Briques et Mortier » des composants structuraux et fonctionnels du <i>stratum corneum</i> . ....	9
Figure 4 : Empaquetage lipidique dans le <i>stratum corneum</i> humain. ....	10
Figure 5 : Pénétration des rayons UV au niveau de la peau. ....	11
Figure 6 : La perte insensible en eau dans la peau. ....	13
Figure 7 : Représentation schématique de la jonction épidermo-dermique. ....	14
Figure 8 : Mise en évidence de l'épiderme (1), du derme papillaire (2), et du derme réticulaire (3) sur une coupe de peau humaine.....	15
Figure 9 : Comparaison des structures de la triple hélice de collagène et de l'hélice $\alpha$ de la kératine. ....	18
Figure 10 : Vue axiale des trois hélices gauche polyproline II (PPII) centrées par les résidus glycine. ....	18
Figure 11 : Représentation schématique des différents types de liaisons hydrogène au sein d'une triple hélice de collagène. ....	19
Figure 12 : Formation des fibres de collagène par alignement et pontage des fibrilles .....	20
Figure 13 : Mise en évidence des fibres oxytalaniques, élaunines et élastiques matures sur une coupe de peau humaine .	21
Figure 14 : Schéma représentatif du rayonnement électromagnétique. ....	33
Figure 15 : Diagramme de Jablonski. ....	34
Figure 16 : Modes de vibration : exemple du groupement CH <sub>2</sub> d'une molécule. ....	35
Figure 17 : Représentation schématique de la polarisation d'un faisceau IR. ....	37
Figure 18 : Fonctionnement du polariseur à « grille de fils ». ....	38
Figure 19 : Intérêt de la polarisation en spectroscopie : exemple de la molécule de collagène de type I. ....	39
Figure 20 : Différents phénomènes de diffusion entre un photon et la matière . ....	41
Figure 21 : Représentation schématique de l'interféromètre de Michelson. ....	43
Figure 22 : Interférences constructives et destructives. ....	43
Figure 23 : Image photographique de l'imageur infrarouge Spotlight 300/Spectrum One .....	44
Figure 24 : Image photographique de l'imageur infrarouge Hyperion 3000/Vertex 70 et schéma descriptif du spectromètre Vertex 70 .....	45
Figure 25 : Image photographique du synchrotron Diamond Light Source en Angleterre et schéma du fonctionnement du synchrotron .....	46
Figure 26 : Image photographique du système Raman XploRA et schéma descriptif du micro-spectromètre Raman	47
Figure 27 : Image photographique représentant le système de la micro-sonde confocale Raman .....	49
Figure 28 : Schéma conceptuel de la microbalance de sorption d'eau. ....	50
Figure 29 : Exemple d'isothermes de désorption et de sorption.....	52
Figure 30 : Image photographique de la sonde Aquaflux AF200 et schéma de la chambre fermée équipée d'un condensateur.....	54
Figure 31 : Image photographique du Cutomètre® MPA580 et schéma de la sonde de mesure. ....	54
Figure 32 : Courbe de déformation de la peau obtenue à l'aide du Cutomètre® .....	55
Figure 33 : Choix du nombre de variables latentes (LVs) utilisé par la méthode de validation croisée.....	69

Figure 34 : Exemple d'une carte de corrélation 2D synchrone. ....	71
Figure 35 : Exemple d'une carte de corrélation 2D asynchrone.....	73
Figure 36 : Comparaison de la monocouche d'eau et des multicouches d'eau calculées en utilisant le modèle d'Hailwood-Horrobin. ....	143
Figure 37 : Spectres Raman acquis sur un échantillon de derme âgé de 35 ans et incubé dans une solution de H <sub>2</sub> O puis dans une solution pure (100%) de D <sub>2</sub> O pendant différents temps d'incubation.....	144
Figure 38 : Comparaison des teneurs en eau de la monocouche d'eau provenant des échantillons de dermes jeunes et de dermes âgés .....	146
Figure 39 : Calcul des aires intégrées des sous-bandes correspondant aux molécules d'eau liées dans des échantillons de dermes jeunes et de dermes âgés, incubés dans différents mélanges de H <sub>2</sub> O/D <sub>2</sub> O.....	147
Figure 40 : Evolution de la perte insensible en eau (PIE) en fonction de l'âge chronologique des volontaires. ....	186
Figure 41 : Vecteurs de régression mettant en évidence les vibrations spectrales sensibles à la PIE pour des profondeurs de 3 µm, de 9 µm, et de 15 µm par des barres grisées.....	189
Figure 42 : Les étapes de la réaction de glycation non-enzymatique du collagène de type I.....	193
Figure 43 : Structures chimiques des principaux produits de glycation avancée (AGEs) : .....	194
Figure 44 : Structure chimique de la N <sup>2</sup> -carboxyethyl-2'-déoxyguanosine (CEdG). ....	195

**Tableaux:**

Tableau 1 : Classification des phototypes selon Fitzpatrick. ....	12
Tableau 2 : Règles de Noda pour l'ordre séquentiel des variables spectrales ( $v_1 > v_2$ ).....	73
Tableau 3 : Nombre de variables latentes utilisées, RMSEC, RMSEP, et valeurs de R <sup>2</sup> pour la mesure de la PIE et pour chaque profondeur de la peau (3, 9, et 15 µm). ....	187
Tableau 4 : Vibrations spectrales Raman associées aux coefficients de régression et sensibles à la mesure de la PIE pour chaque profondeur de la peau (3, 9, et 15 µm).....	188

## Avant-propos

Inscrit dans le cadre du projet VITALITE (Vieillissement Tégumentaire, Analyse de la Lumière en Interaction avec les Tissus Endommagés), ce travail de thèse s'intitule « Caractérisation moléculaire et structurale du vieillissement cutané au moyen de la micro-imagerie d'absorption infrarouge et de la micro-spectroscopie de diffusion Raman ». Ce projet Emergence est cofinancé par l'Union Européenne (FEDER) et la région Champagne-Ardenne.

De grandes avancées en médecine, dans la nutrition et dans la sensibilisation du public ont permis de contribuer à l'augmentation de notre espérance de vie. Ainsi, l'apparence physique est devenue un sujet de plus en plus important dans notre société. En effet, l'état de notre peau change au cours du vieillissement et les signes résultant de ce phénomène inévitable peuvent avoir un impact non négligeable sur le plan esthétique, voire psychologique. Au-delà de cet intérêt croissant pour préserver l'apparence d'une peau jeune, la détérioration cutanée avec l'âge est bien plus qu'un simple problème cosmétique. Au cours de son vieillissement, la peau devient de plus en plus en proie à diverses maladies cutanées. De ce fait, le vieillissement de la peau est devenu un sujet d'importance majeure aussi bien en cosmétologie qu'en dermatologie. Le processus de vieillissement cutané est attribué à des facteurs à la fois intrinsèques (facteurs génétiques et endocriniens, métabolisme cellulaire, modification des protéines matricielles) et extrinsèques (exposition solaire, conduite à risque, environnement, nutrition). Ce phénomène multifactoriel conduit à des modifications structurales et fonctionnelles au niveau de la peau telles que l'apparition de rides, la perte d'élasticité ou bien même une sécheresse cutanée.

Bien qu'il existe des moyens de prévention contre le vieillissement extrinsèque tels que l'utilisation de crèmes de protection solaire et l'adoption d'une meilleure hygiène de vie, il est plus difficile de se prémunir contre les effets du vieillissement chronologique. Le mécanisme de ce processus présente un impact à l'échelle moléculaire et cellulaire, affectant par conséquent la structure et la fonction des différentes couches de la peau. C'est pourquoi il est important de comprendre au préalable la structure et le rôle de la peau et des principaux constituants cutanés.

Organe à la fois sophistiqué et dynamique, la peau constitue avant tout un rempart entre l'organisme et l'environnement extérieur. Ce rôle de fonction barrière est assuré par la couche la plus superficielle de la peau, la couche cornée. Cependant, la couche cornée subit les ravages du vieillissement, affectant ainsi son rôle principal de barrière. Par conséquent, les couches sous-jacentes de la peau ne sont plus protégées efficacement à la fois contre les effets inexorables du temps et contre les agressions extérieures. Parmi les différentes couches cutanées, le derme confère à la peau sa résistance et son élasticité. Ce tissu conjonctif dense est constitué essentiellement de collagène de type I, représentant 70 à 80 % du poids sec de la peau. Élément fondamental de l'architecture de la peau, le collagène de type I subit également des modifications structurales et fonctionnelles au cours du vieillissement cutané. L'étude de ces altérations, subies au niveau de la couche cornée et du derme constitue une thématique de recherche d'intérêt pour mieux comprendre le vieillissement cutané ; et ainsi essayer de le prévenir.

Dans ce travail, nous avons utilisé les techniques de micro-spectroscopie optique vibrationnelle pour appréhender l'impact du vieillissement sur la peau. Les spectroscopies vibrationnelles d'absorption infrarouge et de diffusion Raman sont des techniques d'analyse basées sur l'interaction non-destructive entre la lumière et la matière. Ces méthodes biophysiques offrent la possibilité de sonder la composition biomoléculaire intrinsèque d'un échantillon à une échelle microscopique sans utiliser de marquage préalable. La mise en œuvre de ces approches biophotoniques permettent ainsi de mettre en évidence des marqueurs spectroscopiques spécifiques de l'état physiologique ou pathologique du matériel d'étude. Ces marqueurs reflètent les altérations moléculaires et structurales des tissus cutanés avec l'âge.

Ce manuscrit est présenté selon les six chapitres suivants :

**Le chapitre I** introduit le contexte scientifique en présentant la structure et la fonction de la peau et de ses constituants. Le mécanisme du vieillissement cutané sera également détaillé dans cette section en s'intéressant aux différentes causes possibles, aux changements qu'il engendre aux niveaux moléculaires et cellulaires, et enfin aux conséquences fonctionnelles et cliniques résultant de ce processus.

**Le chapitre II** concerne la démarche méthodologique adoptée dans ce travail de thèse. Il expose le principe et l'instrumentation de chacune des méthodes biophysiques appliquées à l'étude du vieillissement de la peau (imagerie infrarouge, micro-spectroscopie Raman, évaporimétrie, mesures des propriétés mécaniques par succion).

Le **chapitre III** présente des résultats obtenus d'abord en imagerie infrarouge sur des coupes histologiques de peaux humaines d'âges différents. Nous avons pu également réaliser une étude complémentaire en micro-spectroscopie Raman sur des blocs de peau excisée. Ce travail nous a permis de mettre en évidence des modifications d'organisation du réseau de collagène dans le derme.

Le **chapitre IV** porte sur des analyses Raman *in vivo* en utilisant comme méthode de traitement de données, la régression par moindres carrés partiels (*PLS* pour *Partial Least Squares*). Cette méthodologie a permis de corréler les mesures Raman avec les données biométriques de la peau, plus précisément les mesures mécaniques et la perte insensible en eau (PIE).

Le **chapitre V** expose des travaux sur l'une des causes du vieillissement chronologique : la glycation non-enzymatique. Afin de montrer que cette modification post-traductionnelle tardive affecte aussi bien le collagène de type I que les molécules d'ADN, des modèles de coating 2D et de glycation *in vitro* ont été réalisés pour le collagène et l'ADN respectivement.

Enfin, le **chapitre VI** présente les différentes conclusions de ce travail ainsi que des perspectives envisagées au regard du potentiel des micro-spectroscopies infrarouge et Raman. Il sera aussi question de compléter les analyses vibrationnelles par d'autres approches innovantes, telles que la tomographie par cohérence optique (*OCT* pour *Optical Coherence Tomography*) et la spectroscopie par réflectance diffuse (*DRS* pour *Diffuse Reflectance Spectroscopy*).

**CHAPITRE I :**

**GENERALITES SUR LA STRUCTURE ET LE  
VIEILLISSEMENT DE LA PEAU**

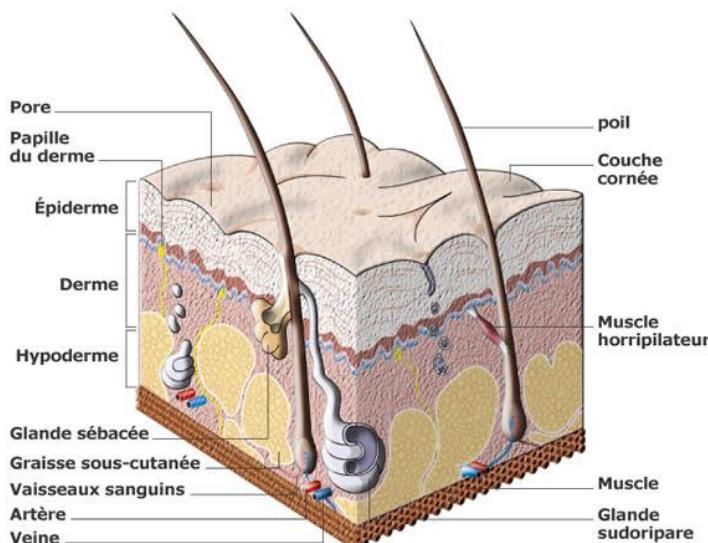
## I.1. Histologie et physiologie de la peau

La peau constitue l'un des organes les plus complexes et les plus importants du corps humain, tant par sa surface que par son poids (environ 2 m<sup>2</sup> pour un poids d'environ 3 kg chez un adulte de 75 kg). Elle accomplit de multiples fonctions importantes qui sont essentielles à la vie humaine :

- Protection (thermique, mécanique, contre les rayonnements ultraviolets (UV), chimique, anti-infectieuse)
- Sécrétion (sueur, sébum)
- Perception des informations du milieu environnant
- Socialisation (apparence, expressions psychologiques)

Bien que l'épaisseur de la peau varie selon les différentes régions du corps, sa structure reste généralement identique. La peau se compose en trois couches bien distinctes (Figure 1) auxquelles sont associées des annexes (glandes sudoripares, follicules pilosébacés) :

- Epiderme (épithélium malpighien stratifié kératinisé)
- Derme (tissu conjonctif fibro-élastique)
- Hypoderme (tissu adipeux sous-cutané)



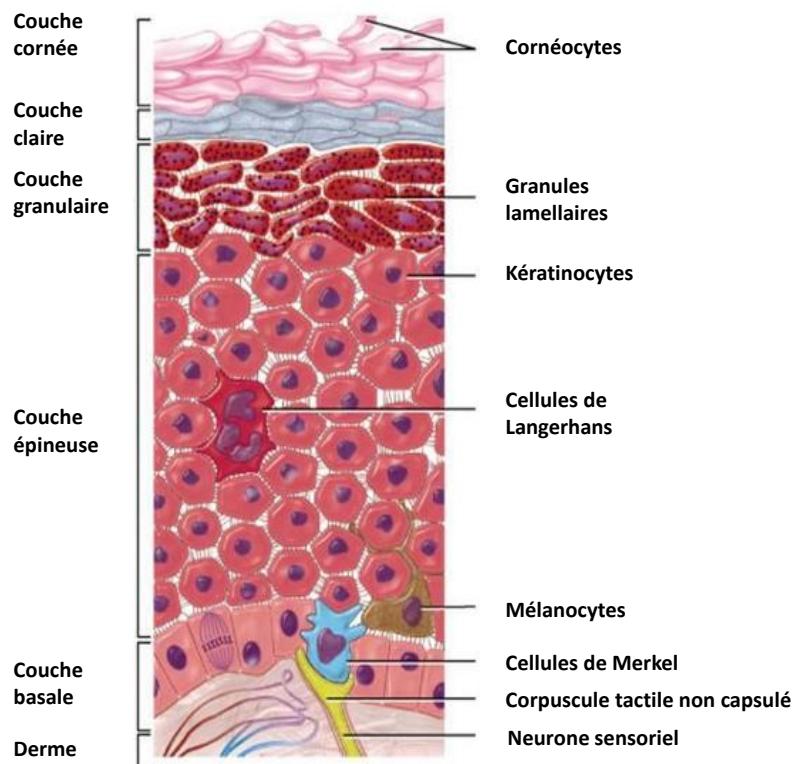
**Figure 1 :** Schéma descriptif de la structure de la peau.

(Source : <http://www.lapeauetlescosmetiques.e-monsite.com>)

### **I.1.1. Epiderme**

L'épiderme (Figure 2) est un épithélium pavimenteux kératinisé dont l'épaisseur varie selon sa localisation (de 0.05 mm pour les paupières à 1.5 mm pour la paume des mains). Il constitue la couche la plus superficielle de la peau et est composé de plusieurs types cellulaires :

- Les **kératinocytes** (du grec *keras* = corne ; *kytos* = cellule) représentent environ 85 à 90% des cellules épidermiques et présentent une forte activité mitotique au niveau de la couche basale de l'épiderme. Ces cellules sont caractérisées par la production de la kératine qui est une protéine fibreuse, résistante et imperméable. Les propriétés conférées à cette protéine vont permettre la protection de la peau et des tissus sous-jacents contre tout type d'agressions. Lors de leur migration vers les couches superficielles de la peau, les kératinocytes vont s'aplatir et perdre leur noyau pour se transformer en cornéocytes : ce processus de maturation est appelé kératinisation.
- Les **mélanocytes** (du grec *melas* = noir) constituent 2 à 3 % des cellules de l'épiderme et s'intercalent entre les kératinocytes au niveau de la couche basale (excepté chez les populations noires où les mélanocytes se retrouvent dans toutes les couches de l'épiderme). Lorsqu'elles sont stimulées par les rayonnements UV, ces cellules secrètent de la mélanine, molécule responsable de la pigmentation de la peau et de la protection des kératinocytes souches contre les radiations. Les grains de mélanine sont assemblés dans le cytoplasme sous forme de mélanosomes. L'insinuation des dendrites mélanocytaires entre les kératinocytes permet la transmission par phagocytose des mélanosomes vers les kératinocytes.
- Les **cellules de Langerhans** représentent 3 à 4 % de la population cellulaire épidermique et sont considérées comme des macrophages intra-épidermiques. Elles se situent dans la couche épineuse de l'épiderme, constituant ainsi la première ligne de défense immunitaire.
- Les **cellules de Merkel** ne constituent que 1% des cellules épidermiques et sont présentes au niveau de la couche basale, dispersées entre les kératinocytes. Ce sont des cellules impliquées au niveau des sensations tactiles : elles sont associées aux terminaisons nerveuses qui reçoivent les stimuli vibratoires enregistrés.



**Figure 2 :** Les différentes couches et types cellulaires de l'épiderme.

L'épiderme est la seule couche de la peau à ne pas être vascularisée et se subdivise en plusieurs couches cellulaires, de l'intérieur vers l'extérieur :

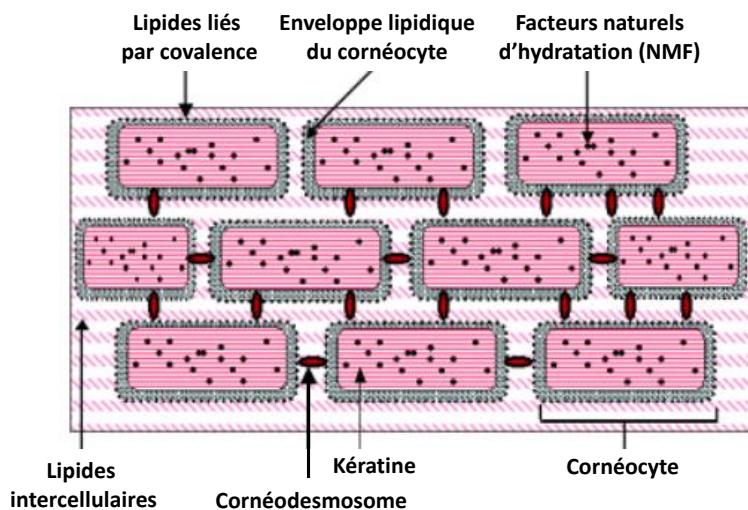
- **La couche basale** (ou *stratum basale* ou *SB*) est formée d'une rangée de kératinocytes cuboïdes dont 10% de ses cellules sont des cellules souches se divisant chaque jour pour produire de nouveaux kératinocytes. Les kératinocytes de cette couche cellulaire ont la particularité de posséder un appareil de Golgi très développé et un cytosquelette comprenant des filaments intermédiaires composés de kératine. Cette couche comporte également des mélanocytes, des cellules de Langerhans et des cellules de Merkel.
- **La couche épineuse** (ou *stratum spinosum* ou *SS*) repose sur la couche basale et est formée de 3 à 4 couches de kératinocytes polyédriques pourvus de spicules (ou épines) d'où le nom de cellules épineuses. Ces spicules sont semblables à des desmosomes permettant ainsi aux cellules d'être solidement attachées les unes aux autres. Des prolongements de cellules de Langerhans et de mélanocytes se retrouvent également dans cette couche.
- **La couche granuleuse** (ou *stratum granulosum* ou *SG*) comporte 3 à 5 épaisseurs de kératinocytes aplatis en apoptose. Ces cellules présentent des noyaux et des organites

en dégénérescence et synthétisent des granules de kératohyaline, protéine regroupant les filaments intermédiaires en faisceaux épais. Des corps lamellaires (ou kératinosomes) sont également contenus dans ces cellules : ces éléments migrent aux pôles cellulaires, fusionnent avec la membrane plasmique pour y libérer leur contenu riche en phospholipides. Cette sécrétion lipidique permet le comblement des espaces entre les cellules granuleuses mais également entre les cellules de la couche cornée.

- La **couche claire** (ou *stratum lucidum* ou *SL*) est composée de 2 assises cellulaires entre la couche granuleuse et la couche cornée et ne se trouve qu'au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds.
- La **couche cornée** (ou *stratum corneum* ou *SC*) contient 15 à 20 couches cellulaires et joue le rôle de barrière contre la perte d'eau et les agressions extérieures. Cette couche superficielle de l'épiderme présente une épaisseur variant entre 10 et 15 µm, sauf au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds. Souvent représentée schématiquement (Figure 3) sous la forme d'un « mur de briques » (1), la couche cornée est constituée de plusieurs éléments:
  - Les cornéocytes (les « briques ») qui sont des kératinocytes morts riches en filaments de kératine. Reliées entre elles par des cornéodesmosomes, ces cellules constituent entre 75 et 80 % du volume du *SC*. Deux types de kératine sont principalement formés dans les kératinocytes : la kératine de type I (ou acide) dont la chaîne latérale des acides aminés est chargée négativement, et la kératine de type II (ou basique) dont la chaîne latérale des acides aminés est chargée positivement. Ces deux types de kératine vont former ensemble une structure appelée « superhélice » dont le rôle est important pour la structure et le maintien de l'intégrité des cornéocytes. Une altération dans l'assemblage de ces « superhélices » pourrait mener à la fragilité des cellules. Les filaments de kératine sont organisés en lamelles très organisées et condensées et interagissent avec une autre protéine : la filaggrine. Synthétisée sous la forme d'un précurseur dans les granules de kératohyaline, la profilaggrine subit une maturation lors de la libération du contenu des granules de kératohyaline dans le cytoplasme des kératinocytes. La filaggrine joue un rôle important dans l'agrégation des filaments de kératine en faisceaux épais. La protéolyse de la filaggrine permet d'obtenir un mélange d'acides aminés constitutifs et d'autres éléments ayant la faculté de retenir l'eau. Représentant environ 10 % du poids

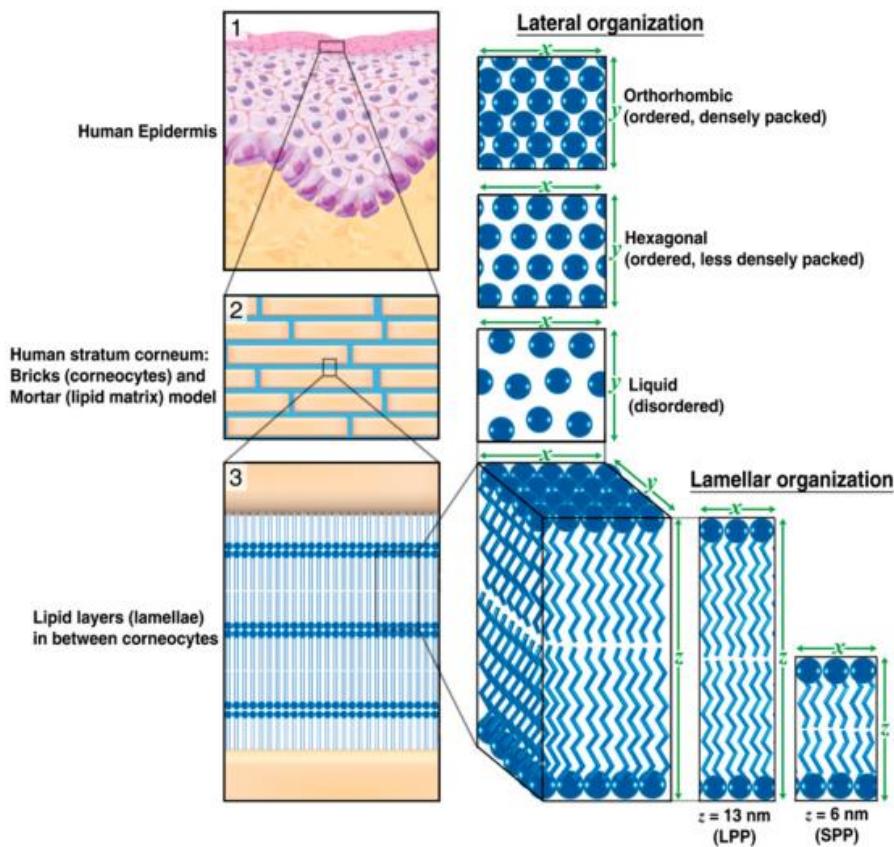
sec des cornéocytes, ces substances hygroscopiques sont appelées facteurs naturels d'hydratation (ou *NMF* pour *natural moisturizing factor*).

- Les lipides extracellulaires (le « mortier ») constituent 20 et 25% du volume du *SC*. Jouant un rôle dans la cohésion des cornéocytes entre eux, cette matrice lipidique est composée essentiellement d'acides gras libres, de céramides, et de cholestérol. Cette composition peut différer en fonction des individus et du site anatomique. Les lipides sont sécrétés par les kératinosomes qui fusionnent avec la membrane des cellules du *SG* pour y relâcher les lipides précurseurs. Ces derniers seront par la suite modifiés et arrangés en bicouches lamellaires parallèles aux membranes des cornéocytes.



**Figure 3 :** Représentation schématique du modèle « Briques et Mortier » des composants structuraux et fonctionnels du *stratum corneum* (1).

Des études en diffraction des rayons X ont permis d'identifier deux phases lamellaires ayant des périodicités (ou distances de répétition) de 6,4 nm (courte périodicité de phase ou *SPP* pour *short periodicity phase*) et de 13,4 nm (longue périodicité de phase ou *LPP* pour *long periodicity phase*) (2). Il a aussi été suggéré que la phase lamellaire *LPP* est importante pour la fonction barrière de la peau. Au sein des lamelles, les lipides présentent différentes organisations dites latérales : orthorhombique, hexagonale et désordonnée (Figure 4).



**Figure 4 :** Empaquetage lipidique dans le *stratum corneum* (*SC*) humain. (1) La couche superficielle de l'épiderme, le *SC*. (2) Le modèle de « brique et mortier ». (3) Les phases lamellaires peuvent présenter une longue (*LPP*) ou une courte (*SPP*) périodicité. Les organisations latérales (orthorhombique, hexagonale, désordonnée) se réfèrent au plan perpendiculaire par rapport à la direction de l'organisation lamellaire (2).

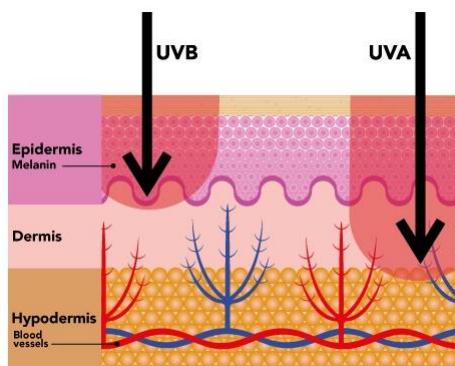
D'autres éléments du *SC* peuvent jouer un rôle très important dans la fonction barrière, notamment dans le mécanisme de la desquamation. Afin de dissoudre les cornéodesmosomes assurant la cohésion des cornéocytes entre eux, les kératinosomes sécrètent un cocktail d'enzymes protéolytiques et lipolytiques au niveau des espaces intercellulaires. Cela aura pour conséquence de dégrader les lipides extracellulaires et la cornéodesmosine qui est une protéine essentielle à l'établissement des cornéodesmosomes. Les cellules mortes sont ainsi éliminées de la surface de la peau. Le renouvellement du *SC* est estimé entre 15 et 20 jours.

Ainsi, le *SC* joue un rôle crucial au sein de la peau, de par sa structure et son contact avec le milieu extérieur. Cette couche cornée constitue la principale barrière de la peau vis-à-vis de différentes agressions possibles :

- Barrière photoprotectrice :

Afin de limiter la pénétration des rayons solaires (Figure 5) à travers la peau et par conséquent les dommages causés tant au niveau cellulaire que tissulaire, plusieurs phénomènes feront leur apparition :

- Epaississement de la couche cornée : Une augmentation du nombre de cornéocytes est due à une kératinisation accrue provoquée par l'irradiation de l'épiderme aux rayons UV de type B (UVB) (3). Ce mécanisme de défense permet ainsi aux cellules de la couche basale d'être hors de portée des UVB ayant une action mutagène sur le matériel génétique de ces cellules (4). Néanmoins, certaines études ont pu montrer que ce rôle défensif est cependant modeste (5).
- Substances sécrétées : L'acide urocanique est une molécule sécrétée à la surface de la peau par la sueur eccrine dont le rôle est d'absorber les UVB (6). De plus, une augmentation des lipides, plus particulièrement les céramides, sera induite par l'exposition du *SC* aux UVA et UVB et contribuera à la filtration de ces rayons (7).



**Figure 5 :** Pénétration des rayons UV au niveau de la peau.

(Source : <http://sante.gouv.qc.ca>)

- Influence du phototype :

La détermination d'un phototype permet de prédire les réactions de la peau, tant par la fréquence des coups de soleil que par l'intensité du bronzage, vis-à-vis des rayonnements UV. Une des grandes classifications, celle de Fitzpatrick, repose sur la susceptibilité de la peau à brûler et à bronzer sous l'effet des rayons UV.

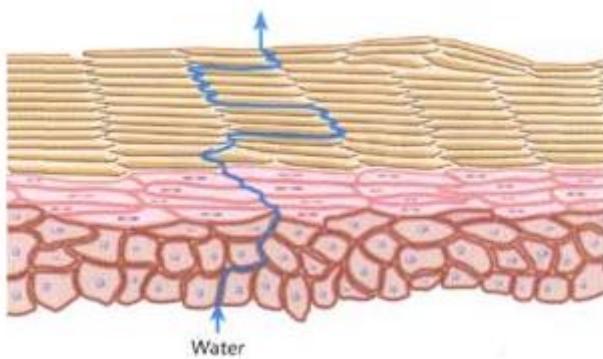
Phototype	Couleur de la peau non exposée	Réaction de la peau à l'exposition du soleil
I	Blanche	Brûle toujours, ne bronde jamais
II	Blanche	Brûle toujours, bronde un peu
III	Blanche à olive	Brûle un peu, bronde graduellement
IV	Brune	Brûle un peu, bronde bien
V	Brune	Brûle rarement, bronde très facilement
VI	Brune foncée à noire	Ne brûle pas, bronde toujours beaucoup

**Tableau 1 :** Classification des phototypes selon Fitzpatrick.

- Barrière à la diffusion de l'eau :

La structure compacte et dense du SC permet également le ralentissement de la diffusion de l'eau en provenance du derme qui constitue le principal réservoir d'eau de la peau (environ 80 %). Un gradient d'hydratation décroissant va permettre aussi à l'eau libre (non liée aux molécules biologiques) de diffuser des couches dermiques jusqu'à la couche cornée. Ce phénomène est appelé perte insensible en eau (ou PIE ou TEWL pour *Transepidermal Water Loss*) qui, bien que l'évaporation de l'eau à la surface de la peau soit constante, est constamment compensée par la diffusion constante de l'eau provenant des couches dermiques. La couche cornée va jouer un rôle essentiel dans la limitation de l'évaporation de l'eau. Les céramides de la matrice lipidique vont permettre la régulation du flux d'eau trans-épidermique. Plus précisément, la structure chimique de ces molécules amphiphiles va permettre la formation de feuillets organisés en bicouches lipidiques, créant ainsi une structure lamellaire très stable. La stabilité de ce réseau supra-moléculaire est assurée par la présence de longues chaînes carbonées et des liaisons hydrogènes reliant les céramides entre eux (8). La fixation de l'eau est également assurée par les cornéocytes riches en kératine très

hydrophile et en NMFs ayant des propriétés hygroscopiques (9). De plus, l'épaisseur du SC constitue elle-même un frein à la diffusion de l'eau, obligeant celle-ci à passer un chemin tortueux, sur une distance beaucoup plus importante que l'épaisseur du SC lui-même (10).



**Figure 6 :** La perte insensible en eau dans la peau.

(Source : <http://eczemafree.org>)

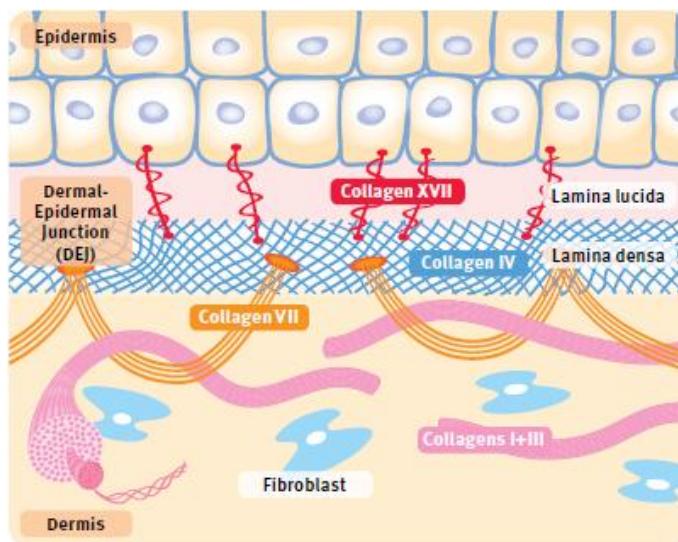
- Autres fonctions barrière :

La peau présente également un **rôle défensif** contre les agressions mécaniques étant diverses et variées (pincements, chocs, frottements, coupures,...). La kératine confère une résistance très importante à l'épiderme et offre une certaine souplesse à la peau. Cette protéine fibreuse permet ainsi à la peau de se déformer sous l'effet de contraintes mécaniques et de retrouver sa structure initiale une fois que ces contraintes ont cessé. Enfin, les cellules de Langerhans, situées dans la couche épineuse de l'épiderme, vont assurer la défense de la peau contre les agents pathogènes (allergènes, bactéries, virus,...). Présentant des propriétés phagocytaires et enzymatiques, ces cellules immunitaires ont pour rôle de capter les agents pathogènes pour les présenter aux lymphocytes T.

En fonction de la température, la peau joue le rôle de **barrière thermique**, maintenant ainsi de façon efficace la température constante du corps. En cas d'exposition au froid, des petits vaisseaux sanguins et les muscles arrecteurs des follicules pilosébacés vont se contracter afin de s'opposer au refroidissement de l'organisme. A l'inverse, la vasodilatation des petits vaisseaux sanguins et la sudation vont permettre l'évacuation de l'excès de chaleur.

### I.1.2. Jonction épidermo-dermique (JED)

Faisant entre 50 à 200 nm d'épaisseur, cette fine couche (Figure 7) permet l'adhérence entre l'épiderme et le derme. Outre ce rôle en tant que support mécanique, la jonction épidermo-dermique (JED) permet la diffusion contrôlée de produits métaboliques (provenant des vaisseaux sanguins) entre les compartiments épidermique et dermique. Cette interface épidermo-dermique joue également un rôle dans les échanges de type cellulaire : comme par exemple en limitant le passage de cellules tumorales de l'épiderme vers le derme, ou en se laissant traverser par différents types cellulaires impliqués dans des processus inflammatoires et de cicatrisation. La JED est essentiellement constituée de la membrane basale (formée par la membrane plasmique des kératinocytes basaux), de complexes d'ancre (formés par des hémidesmosomes et des filaments d'ancre), ainsi que de collagène de types IV, VII et XVII.



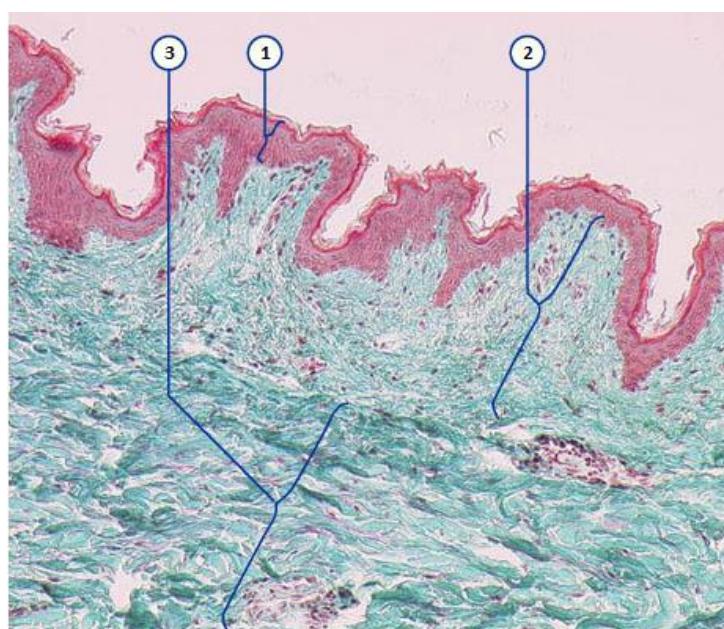
**Figure 7 :** Représentation schématique de la jonction épidermo-dermique.

(Source : <http://www.platinumskincare.com>)

### I.1.3. Derme

Assurant à la peau sa résistance et son élasticité, le derme (Figure 8) est un tissu conjonctif d'épaisseur variant entre 1 et 4 mm en fonction du site anatomique concerné. Cette couche dermique est composée essentiellement de protéines fibreuses telles que le collagène et l'élastine. Le collagène représente environ 90 % de la masse sèche du derme et joue un rôle dans la résistance mécanique de la peau (11). L'élastine représente quant à elle environ 5 %

de la masse sèche du derme et confère à la peau son élasticité (12). Ces protéines fibreuses baignent dans un gel inter-fibrillaire, également appelé substance fondamentale, composé de glycosaminoglycans (GAGs), de protéoglycans (PGs) et d'eau (13). Le derme comprend également d'importantes ramifications vasculaires permettant d'assurer la nutrition, la thermorégulation et la défense immunitaire de la peau. On y retrouve également des cellules musculaires lisses (muscles arrecteurs des poils) et des fibres musculaires striées. Des annexes cutanées, telles les glandes sudoripares eccrines (productrices et sécrétrices de sueur), les glandes sébacées (productrices de sébum) et les follicules pileux, se trouvent dans cette couche tissulaire.



**Figure 8 :** Mise en évidence de l'épiderme (1), du derme papillaire (2), et du derme réticulaire (3) sur une coupe de peau humaine (coloration de Goldner).

(Source : <https://www.unifr.ch>)

Le derme peut être subdivisé en deux couches :

- Le derme papillaire:

Représentant environ 1/5<sup>ème</sup> de l'épaisseur totale du derme, cette couche superficielle est constituée d'un tissu conjonctif lâche composé de fines fibres de collagène de type I, associé au type III, et de quelques fibres élastiques. On y retrouve une forte densité de fibroblastes permettant une forte activité métabolique intense et une synthèse importante de PGs. Des

petites projections en forme de mamelons, appelées papilles dermiques, vont accroître la surface de cette sous-couche dermique. Ces excroissances dermiques donnent à l'interface de l'épiderme un relief irrégulier et contiennent des boucles de papillaires. Quelques-unes de ces papilles dermiques hébergent l'essentiel des terminaisons nerveuses responsables de la fonction sensorielle de la peau, comme par exemple les récepteurs du toucher appelés corpuscules de Meissner.

- Le derme réticulaire:

Cette couche dermique profonde représente environ 4/5<sup>ème</sup> de l'épaisseur totale du derme. Il est constitué d'un tissu conjonctif dense, composé de fibres de collagène organisées en faisceaux entrelacés et de grosses fibres élastiques. Le derme réticulaire se distingue du derme papillaire par une plus faible proportion de substance fondamentale et de cellules. C'est également dans ce type de tissu que sont retrouvées les annexes cutanées. Ayant un rôle principalement d'ordre mécanique, le derme profond confère à la peau sa résistance, son extensibilité et son élasticité.

#### ***1.1.3.1. Cellules du derme***

Les principales cellules constituant le derme sont les fibrocytes, appelés fibroblastes lorsqu'ils reprennent une activité proliférative. Etant moins actives, les fibrocytes présentent un cytoplasme moins abondant et plus pauvre en organites que celui des fibroblastes. Quant à ces derniers, ce sont des cellules étoilées émettant de nombreux prolongements cytoplasmiques en direction des cellules adjacentes. La richesse du cytoplasme de ces cellules en organites leur permet de synthétiser de nombreuses protéines telles que le collagène, l'élastine, les protéoglycans et les glycoprotéines de structure. Toutes ces molécules exportées constituent la matrice extracellulaire (MEC). De plus, les fibroblastes participent à la synthèse de protéines telles que les collagénases et autres protéases, capables de dégrader la MEC afin d'assurer son renouvellement.

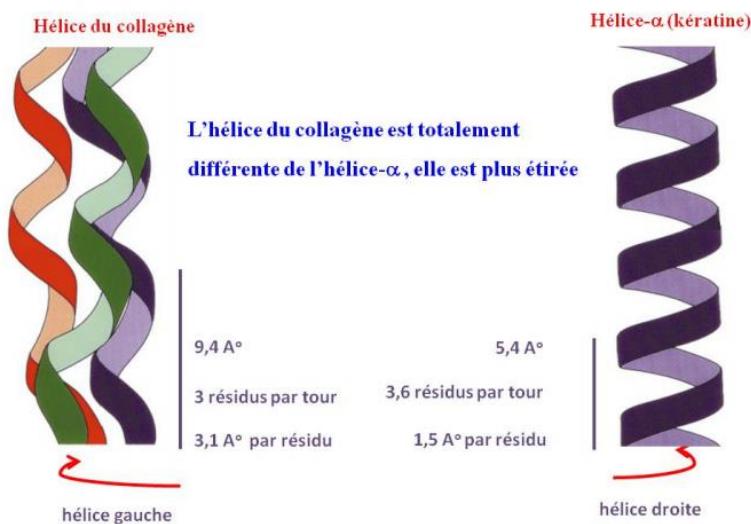
Les autres cellules telles que les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes présentent un rôle de défense et sont impliqués dans les processus inflammatoires et de cicatrisation.

### **I.1.3.2. Protéines**

#### *I.1.3.2.1. Collagène*

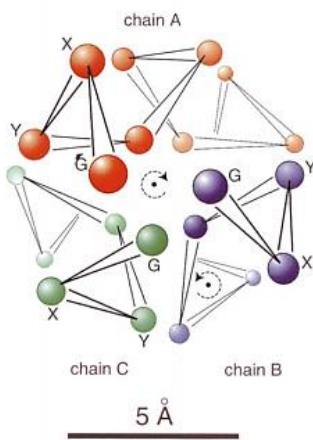
Représentant environ 70% du poids sec de la peau, le collagène constitue l'une des protéines les plus importantes de la peau. Bien qu'elle soit considérée comme une protéine, il est plus adéquat de parler des collagènes puisqu'ils constituent une famille de protéines. En effet, il a été répertorié à ce jour 28 différentes molécules de collagène, assemblées selon une quarantaine de chaînes  $\alpha$  génétiquement distinctes. C'est de par leur diversité moléculaire que les collagènes présentent des fonctions biologiques différentes en fonction de leur distribution tissulaire (14). Ces collagènes sont classés en plusieurs groupes selon leur organisation supramoléculaire, tels que les collagènes fibrillaires (*e.g.* collagènes de types I et III retrouvés au niveau du derme) et les collagènes non-fibrillaires (*e.g.* collagènes de types IV, VII et XVII retrouvés au niveau de la JED). Bien qu'ils soient caractérisés par une large diversité, tous les collagènes partagent des caractéristiques structurales communes. En effet, une protéine appartiendrait à la « superfamille » des collagènes si elle remplit deux conditions : la protéine doit présenter un domaine en triple hélice dans sa structure tertiaire, et doit comporter un motif d'acides aminés Gly-X-Y répété  $n$  fois dans sa séquence primaire.

Parmi tous les différents types de collagènes présents dans la peau, le collagène de type I constitue la protéine la plus majoritaire car elle représente 80% du poids sec du derme. Sa principale fonction est de maintenir la résistance mécanique de la peau. La molécule de base du collagène de type I est le tropocollagène qui présente une masse moléculaire de 285 kDa pour une longueur de 300 nm et un diamètre de 1,5 nm. Le tropocollagène est composé de trois chaînes polypeptidiques  $\alpha$ , deux chaînes  $\alpha_1$ (I) et une chaîne  $\alpha_2$ (II), chacune possédant une masse moléculaire de 95 kDa. Ces trois chaînes s'enroulent autour d'un axe central afin de former une triple hélice droite. Chaque chaîne  $\alpha$  est organisée en une hélice gauche de type polyproline II (PPII) ayant une périodicité de 9,4 Å, soit 3 acides aminés par tour de spire, ce qui correspond à une distance de 3,1 Å entre 2 acides aminés consécutifs (Figure 9). A l'inverse de la structure secondaire en hélice  $\alpha$  que l'on retrouve dans les molécules d'ADN et de kératine et qui s'enroule à droite, l'hélice PPII ne comporte pas de liaisons H intra-chaînes classiques. C'est pour cette raison que le niveau de compaction est plus faible pour l'hélice PPII (3,1 Å/résidu) que pour l'hélice  $\alpha$  (1,5 Å/résidu) (15).



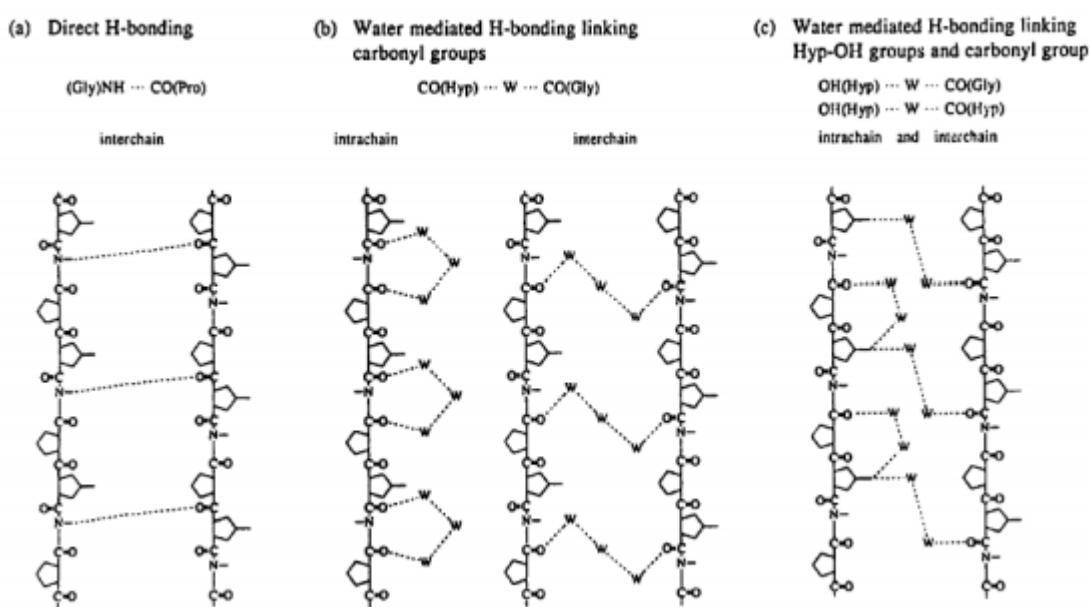
**Figure 9 :** Comparaison des structures de la triple hélice de collagène (*à gauche*) et de l'hélice  $\alpha$  de la kératine (*à droite*) (16).

La séquence primaire de chaque hélice PPII consiste en la succession du triplet Gly-X-Y répété  $n$  fois : un des trois acides aminés correspond à un résidu glycine (Gly), et le plus souvent les acides aminés en position X et Y sont respectivement un résidu proline (Pro) (40% des cas) et un résidu de 4-hydroxyproline (Hyp) (10% des cas). Chaque hélice PPII s'enroule grâce à la répulsion des cycles pyridolines des résidus Pro. Comme l'illustre la figure 10, les résidus Gly, n'ayant aucune chaîne latérale, se retrouvent au centre de la structure ; tandis que les résidus X et Y, étant pourvus de chaînes latérales plus encombrantes, se retrouveront à la surface de la triple hélice (16).



**Figure 10 :** Vue axiale des trois hélices gauche polyproline II (PPII) centrées par les résidus glycine. De par leurs chaînes latérales très encombrantes, les résidus X et Y se retrouvent à l'extérieur de la triple hélice de collagène (16).

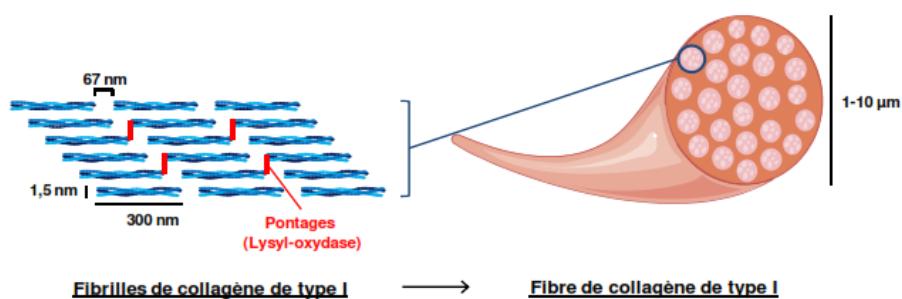
L'enroulement et la stabilité de la triple hélice du collagène se fait par la formation de nombreuses liaisons hydrogène, comme le décrit la figure 11 (17). Des liaisons hydrogène inter-chaînes [Fig.11(A)] s'établissent directement entre le groupement amine (-NH) d'un résidu Gly et le groupement carbonyle (-C=O) d'un résidu Pro. Des molécules d'eau sont plus fréquemment impliquées dans la formation de liaisons hydrogène intra- et inter-chaînes. Ces molécules d'eau relient les groupements -C=O de résidus Gly avec les groupements -C=O de résidus d'Hyp [Fig.11(B)], mais elles peuvent également aussi relier les groupements -C=O de résidus Gly ou d'Hyp avec les groupements hydroxyles (-OH) de résidus d'Hyp [Fig.11(C)]. Ainsi, la stabilité et la rigidité de la triple hélice de collagène est dû au nombre important de résidus Pro et Hyp participant à la formation de liaisons hydrogène intra- et inter-chaînes.



**Figure 11 :** Représentation schématique des différents types de liaisons hydrogène au sein d'une triple hélice de collagène (17).

La synthèse des chaînes  $\alpha$  se fait sous la forme de longs précurseurs appelés prochaînes, dont l'association permet la formation du procollagène. Ces prochaînes présentent à leurs extrémités des régions globulaires, appelées propeptides N- et C-terminaux, qui seront éliminées par clivage enzymatique au cours de la maturation de la molécule. La perte de ces propeptides entraîne ainsi une diminution de la solubilité des molécules d'un facteur 1000 (18). Cela a pour conséquence de provoquer l'agrégation spontanée des molécules de

tropocollagène qui vont former des structures supramoléculaires correspondant aux fibrilles de collagène. En effet, une fibrille correspond par définition à l’assemblage de 6 molécules de tropocollagène alignées parallèlement les unes par rapport aux autres avec un décalage de 67 nm (19). Cette structure est stabilisée par des liaisons croisées covalentes intermoléculaires entre des résidus lysine et hydroxylysine localisés au niveau des télopeptides (Figure 12). L’action d’enzymes de la famille des lysyl-oxydases va permettre de catalyser ce mécanisme (20). A leur tour, les fibrilles de collagène vont s’associer avec d’autres protéines de la MEC comme les protéoglycanes afin de former des structures plus volumineuses : les fibres de collagène, étant caractérisées par une stabilité mécanique très importante (21).



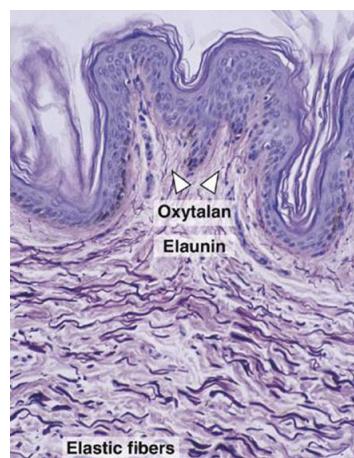
**Figure 12 :** Formation des fibres de collagène par alignement et pontage des fibrilles (19).

#### *I.1.3.2.2. Elastine*

Composées principalement d’élastine, les fibres élastiques (Figure 13) constituent également la MEC du derme et représentent environ 2 à 5 % de son poids sec. L’élastine est une macromolécule protéique non glycosylée et hydrophobe qui diffère des collagènes par sa faible teneur en Hyp. Cette protéine est essentiellement composée de desmosine et isodesmosine, acides aminés caractéristiques de l’élastine, assurant le pontage entre les polypeptides et conférant aux fibres élastiques une structure tridimensionnelle en filet. Les fibres élastiques sont synthétisées par les fibroblastes sous forme de tropoélastine et se polymérisent dans la substance fondamentale grâce à une glycoprotéine : la fibrilline. Ainsi, il existe trois différents types de fibres élastiques (22) :

- Les fibres oxytalanes sont de très fines fibres élastiques situées transversalement les unes par rapport aux autres et sont les premières à disparaître au cours du vieillissement. Contenant très peu d’élastine, ces fibres particulières sont très fragiles et sont localisées principalement dans le derme papillaire.

- Les fibres élaunines sont des fibres élastiques immatures au diamètre intermédiaire et sont localisées à la jonction du derme papillaire et du derme réticulaire.
- Les fibres élastiques « matures » et plus épaisses sont localisées au niveau du derme réticulaire et ont pour rôle de rétablir la disposition fibreuse normale suite à une déformation par des contraintes mécaniques externes. Ainsi, comme leur nom l'indique, ces fibres sont responsables de l'élasticité de la peau pouvant être étirée jusqu'à 120 à 150 %, avant de revenir à sa position de départ. Ceci n'est possible que si le degré de pontage de l'élastine est suffisant pour permettre le retour de la peau à son état initial après la cessation des forces.



**Figure 13 :** Mise en évidence des fibres oxytalanes, élaunines et élastiques matures sur une coupe de peau humaine (coloration de Weigert).

(Source : <http://intranet.tdmu.edu.ua>)

#### *I.1.3.2.3. Gel interfibrillaire*

Ce gel contient la substance fondamentale qui remplit les espaces interstitiels situés entre les fibres de collagène et d'élastine et qui assure la cohésion des fibroblastes entre eux. Les protéoglycans (PGs) sont des protéines reliées par des liaisons covalentes à des longues chaînes de glycosaminoglycans (GAGs), qui constituent une répétition d'unités dissacharidiques sulfatées. Cet ensemble permet d'avoir une substance fondamentale très hydratée et souple, rendant la diffusion de métabolites ainsi possible. Les principaux GAGs dermiques sont l'acide hyaluronique, qui est le plus abondant (50 % des GAGs), le dermatane sulfate, la chondroïtine sulfate et l'héparane sulfate (23). L'acide hyaluronique joue un rôle prépondérant dans la rétention d'eau au sein de la MEC, ce qui permet une bonne hydratation

et une certaine viscoélasticité du derme. En effet, cette molécule très hydrophile est très malléable, et lors de compressions elle va pouvoir chasser l'eau retenue et retrouver sa forme initiale. Ainsi, cela permet à la peau d'avoir une bonne tolérance aux déformations, et de protéger les autres molécules des fortes pressions.

Enfin, on y retrouve également des glycoprotéines de structure : ces macromolécules sont composées d'une chaîne polypeptidique unie à des molécules glucidiques. Ces glycoprotéines sont principalement représentées par la fibrilline, la fibronectine et la laminine (24).

## **I.2. Physiologie du vieillissement de la peau**

Malgré sa durabilité, la peau subit, comme tous les autres organes, les effets inexorables du temps. Parmi toutes les manifestations de l'avancée en âge d'un être vivant, le vieillissement cutané est un phénomène présentant les signes les plus visibles. Les modifications typiques du tissu cutané sont principalement caractérisées par un dessèchement de la peau associé à une perte d'élasticité, conduisant ainsi à la formation de rides. Bien que de nombreuses études se soient intéressées à ce sujet, le vieillissement cutané demeure encore à l'heure actuelle un processus multifactoriel très complexe. En effet, le vieillissement de la peau résulte de la combinaison de deux types de vieillissements : le vieillissement intrinsèque (ou chronologique) et le vieillissement extrinsèque. C'est pourquoi il est important de bien comprendre au préalable le mécanisme du vieillissement cutané en déterminant les différentes causes possibles, les changements qu'il engendre aux niveaux moléculaires et cellulaires, et enfin les conséquences fonctionnelles et cliniques résultant de ce processus.

### **I.2.1. Vieillissement intrinsèque**

#### ***I.2.1.1. Facteurs responsables***

##### ***I.2.1.1.1. Facteur génétique***

Le vieillissement intrinsèque est déterminé par une horloge biologique individuelle génétiquement programmée. Les cellules de notre corps présentent des mécanismes de réPLICATION et de réPARATION de l'ADN qui vont déterminer notre espérance de vie. Cependant, les chromosomes, porteurs du patrimoine génétique de chaque individu, se raccourcissent à

chaque division cellulaire. Le vieillissement cellulaire se traduit ainsi par un arrêt de réPLICATION DES CELLULES, rentrant par la suite dans un état de sénescence réPLICATIVE. Cela résulte en l'apparition de dommages à l'ADN au cours du temps. Les télomères, situés à l'extrémité des brins d'ADN et jouant un rôle-clé dans la stabilité chromosomique, vont être progressivement réduits au cours de la sénescence réPLICATIVE. En plus de la perte des bases télomériques s'ajoutent les mutations d'ADN, les erreurs de réPLICATION ET LES RÉPARATIONS QUI S'AVÈRENT DE MOINS EN MOINS EFFICACES AVEC L'ÂGE (25).

#### *I.2.1.1.2. Stress oxydatif*

Bien qu'il soit indispensable pour la vie, l'oxygène génère des composés radicalaires et moléculaires appelés espèces réactives à l'oxygène (ou *ROS* pour *Reactive Oxygen Species*) pouvant se révéler nuisibles au cours du vieillissement. En effet, les ROS vont oxyder les protéines et entraîner au niveau du derme une dénaturation du collagène, de l'élastine et de l'acide hyaluronique. De plus, des agglomérats protéiques seront également accumulés dans la peau. Les radicaux libres s'attaquent également aux membranes riches en acides gras polyinsaturés. Cela a pour conséquence de provoquer des altérations des fonctions cellulaires menant ainsi à une instabilité de l'ADN. Ainsi, les dégradations au niveau de l'ADN provoquent des mutations et la mort programmée (ou apoptose) des cellules. En plus d'une production des ROS de moins en moins maîtrisée avec l'âge, les enzymes et autres molécules anti-oxydantes présentent une moins bonne performance au cours du temps (26).

#### *I.2.1.1.3. Modifications post-traductionnelles*

Après avoir été synthétisées, les protéines subissent des modifications post-traductionnelles tardives au cours de leur vie biologique. Ces changements sont caractérisés par la formation non enzymatique de produits altérant les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines. Parmi ces modifications post-traductionnelles, on peut prendre l'exemple de :

- La carbamylation qui consiste en la fixation d'acide isocyanique, provenant de la décomposition de l'urée, sur les résidus lysine des protéines,
- La glycation qui permet la fixation d'oses sur les résidus lysine et arginine des protéines,

- La carbonylation qui consiste à former des liaisons covalentes avec des aldéhydes lipidiques (*i.e.* acroléine, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)) (27).

Ces réactions interviennent lors du vieillissement physiologique, mais peuvent aussi être exacerbées sous certaines circonstances pathologiques.

#### *I.2.1.1.4. Ménopause*

Faisant partie du vieillissement chronologique, la ménopause accentue également le vieillissement cutané. Tournant majeur dans la vie d'une femme, la ménopause se manifeste par une carence en œstrogènes. Chez la femme pré-ménopausée, ces hormones sexuelles se fixent sur des récepteurs aux œstrogènes présents à la surface des kératinocytes et des fibroblastes. Cela a pour conséquence d'activer le renouvellement des cellules cutanées et de stimuler la production de molécules telles que le collagène et l'acide hyaluronique. Après la ménopause, la diminution du taux d'œstrogènes provoque un renouvellement plus lent des cellules cutanées, entraînant ainsi un amincissement de la peau avec l'âge. De plus, il a été montré que les femmes ménopausées présentaient des taux de collagènes de type I et III plus faibles que ceux des femmes en pré-ménopause (28). D'autres études ont pu également démontrer une diminution des lipides du SC, altérant ainsi la capacité de la peau à retenir l'eau (29). Une baisse de tonicité de la peau a également été observée (28), avec l'apparition de couperose due aux bouffées de chaleur.

#### *I.2.1.2. Modifications cellulaires et moléculaires*

##### *I.2.1.2.1. Epiderme*

Avec le vieillissement chronologique, on observe un amincissement de la partie « vivante » de l'épiderme dû à une diminution de la capacité de prolifération des kératinocytes avec l'âge (30). Toutefois, les couches épineuses et granuleuses ne sont pas atteintes. De plus, un épaississement du SC a pu être observé au niveau de certaines zones du corps (31). Ceci s'explique par un dysfonctionnement des protéinases assurant la dégradation des cornéodesmosomes : cela a pour conséquence de diminuer la cohésion entre les cornéocytes et ainsi d'accélérer le processus de desquamation du SC. Une diminution du nombre de mélanocytes (10 à 20 % par décennie) a également été observée (32) : cela entraîne une diminution de la protection de la peau vis-à-vis des rayonnements UV. En plus de la

diminution de leur capacité de protection, les mélanocytes restants vont s'accumuler et former les « taches de vieillesse », appelées également lentigos séniles. Quant aux cellules de Langerhans, leur nombre peut diminuer jusqu'à 50 %, ce qui a pour conséquence de modifier la réponse immunitaire cutanée (33). Les personnes âgées sont ainsi plus sensibles aux infections cutanées, dont un risque accru de développer un cancer cutané. De plus, plusieurs études ont montré une diminution quantitative des stérolestérols et triglycérides nécessaires à l'hydratation de la peau (34).

#### *I.2.1.2.2. Jonction épidermo-dermique (JED)*

Egalement concernée par le vieillissement cutané, la JED s'aplatit avec l'âge. En effet, il a été observé que la perte des ondulations, dues à l'invagination des papilles dermiques dans le derme, entraînait la diminution de la surface d'échange entre le derme et l'épiderme (36), entraînant une réduction de l'apport en nutriments et en oxygène des cellules cutanées, favorisant une moins bonne résistance aux traumatismes, et *in fine* en augmentant le risque de séparation entre l'épiderme et le derme.

#### *I.2.1.2.3. Derme*

Le derme subit également les conséquences du vieillissement cutané, tant bien au niveau de son épaisseur pouvant diminuer jusqu'à 20% (37) que sur le nombre et la structure de ses constituants. Les fibroblastes diminuent en taille et en nombre, ce qui impacte directement sur leur capacité à synthétiser les protéines de la MEC telles que le collagène de type I (37). Le nombre de macrophages diminue également avec l'âge, ce qui conduit à un manque de collagénases et autres protéinases capables de digérer les collagènes réticulés (*i.e.* dont la fonction a été altérée au cours du vieillissement) (37). Les fibres de collagène se fragmentent et tendent à s'orienter parallèlement à la surface du derme papillaire. Le vieillissement de ces molécules correspond au phénomène de réticulation, ce qui diminue ainsi leur solubilité, leur résistance enzymatique et leur élasticité. Quant aux fibres élastiques, celles du derme papillaire (*i.e.* les fibres oxytalanes et élaunines) sont touchées en premier lieu par le vieillissement dès l'âge de 30 ans (38). La diminution, voire la disparition de ces fibres élastiques immatures permet ainsi la formation de rides se creusant par manque de soutien des couches dermiques superficielles. Les fibres élastiques matures du derme réticulaire sont touchées que plus tard par le vieillissement cutané et ont tendance à

s'hypertrophier et à se fragmenter (38). Enfin, la substance fondamentale, essentiel pour la fixation de l'eau et par conséquent pour l'hydratation de la peau, est modifiée tant bien au niveau de sa quantité que de sa qualité. En effet, il a été constaté une diminution de l'acide hyaluronique et des PGs dans le derme au cours du vieillissement, ce qui résulte en une moindre capacité du derme à fixer l'eau (39).

#### *I.2.1.2.4. Autres*

Il a été observé que la graisse hypodermique était redistribuée dans tout le corps, avec une diminution de celle au niveau du visage et des jambes et une augmentation de celle au niveau de l'abdomen et des cuisses. De plus, la vascularisation des follicules pileux s'en retrouve diminuée avec l'âge, ce qui conduit à une diminution de la quantité de poils sur le corps. Egalelement touchées par le vieillissement, les glandes sudoripares voient leur nombre diminuer ainsi que la qualité de la sueur qu'elles sécrètent.

#### *I.2.1.3. Conséquences fonctionnelles et cliniques*

Au cours du vieillissement chronologique, la peau devient moins élastique et moins résistante aux traumatismes. La perte d'élasticité, l'aplatissement de la JED et du tissu de soutien sont responsables de la déformation de la peau et du relâchement cutanéo-musculaire. L'ovale du visage est également altéré avec l'apparition de bajoues, d'un double menton, de poches sous les yeux et d'une ptôse des paupières. Il a également été retrouvé chez les personnes âgées une cicatrisation ralentie, ainsi qu'une diminution de l'immunité et de la capacité de bronzage. De plus, le pouvoir isolant de la peau diminue, et donc ses capacités de thermorégulation, ce qui conduit à un risque d'hypothermie plus élevé.

## **I.2.2. Vieillissement extrinsèque**

### ***I.2.2.1. Facteurs responsables***

#### ***I.2.2.1.1. Exposition solaire***

En dépit du rôle photo-protecteur de la couche d'ozone, une partie des radiations solaires parvient jusqu'à nous et est capable d'accélérer le processus de vieillissement cutané. Les UV-B (280-320 nm) sont surtout absorbés par l'épiderme, les UV-A (320-400 nm) pénètrent dans le derme, et les infrarouges A (700-1400 nm) peuvent même atteindre l'hypoderme.

##### **- Influence des rayonnements UV**

Les rayonnements UV sont l'une des principales causes du vieillissement extrinsèque. Leur mode d'action est réalisé de deux façons différentes : soit directement sur l'ADN, soit indirectement par l'intermédiaire des ROS. Il a été montré que les rayonnements UV pouvaient induire de multiples dommages tels que des oxydations protéiques et des lésions au niveau de l'ADN (40, 41). De plus, des dommages au niveau des mitochondries ont pu être observés (42). Véritable centrale énergétique des cellules, la mitochondrie joue un rôle crucial dans la respiration cellulaire. Des mutations de l'ADN mitochondrial peuvent être observées dans des zones cutanées non photo-protégées. Cela a pour conséquence d'entraîner une altération de la fonction mitochondriale, *i.e.* dans la production incontrôlée de ROS et une défaillance dans la production d'énergie.

##### **- Influence des rayonnements infrarouge**

Tout comme les rayonnements UV, les rayonnements IR-A sont absorbés par la peau et vont altérer les fonctions des mitochondries en augmentant la production intra-mitochondriale de ROS. Ces radicaux libres vont soit affecter directement le collagène en l'oxydant, soit indirectement en augmentant l'expression de métalloprotéinases (*e.g.* MMP-1), ayant pour rôle de dégrader le collagène (43).

*I.2.2.1.2. Tabac*

Le tabac est un facteur favorisant le vieillissement cutané et la formation de rides. Il entraîne l'apparition de rides précoces et une accentuation de ces dernières, notamment les rides radiaires péribuccales, les rides verticales (appelées également rides du Lion), et celles de la patte d'oeie. Plusieurs mécanismes en sont responsables : tout d'abord, la consommation de tabac favorise la production de ROS, augmentant ainsi le stress oxydatif et les dommages à l'ADN (44). De plus, il a été observé une augmentation du nombre de liaisons croisées du collagène et une diminution de la biosynthèse des collagènes de types I et III. Le tabac présente également une activité élastinolytique en stimulant des MMPs dans le but de dégrader les fibres élastiques du derme. Cela a pour conséquence d'induire l'accumulation de matériel élastique anormale appelée élastose actinique (45). De plus, le tabac provoquerait la diminution de la production d'œstrogènes, entraînant ainsi une ménopause précoce au niveau de la peau des fumeuses (46).

*I.2.2.1.3. Environnement*

Etant en contact direct avec les polluants de l'air et nous protégeant contre eux, la peau voit ainsi son vieillissement s'accélérer. En effet, l'ozone serait nocif pour la peau car il entraînerait la peroxydation des lipides de la bicouche membranaire et la production de ROS. Bien que son rôle soit de nous protéger contre la majorité des radiations solaires, l'ozone peut également induire l'expression des MMPs et de réduire la production des vitamines C et E, indispensables pour contrer la production de ROS (47, 48).

*I.2.2.1.4. Nutrition*

L'apport nutritionnel joue également un rôle important dans le vieillissement, tant bien sur sa quantité que sur sa qualité. De nombreuses molécules anti-oxydantes telles que les vitamines (A, C, E, K) et les caroténoïdes permettent de lutter contre les symptômes du vieillissement. Les oligoéléments interviennent également comme cofacteur d'enzymes anti-oxydantes, et certains acides gras essentiels (*e.g.* acide linoléique) dans le maintien de l'hydratation de la peau et dans la fonction barrière du SC. Des carences de ces éléments essentiels ainsi qu'une alimentation déséquilibrée favorisent le vieillissement cutané. De plus, consommer peu d'eau et/ou en excès de l'alcool ne fait qu'accentuer l'apparition des rides.

### ***I.2.2.2. Modifications cellulaires et moléculaires***

#### ***I.2.2.2.1. Epiderme***

Les kératinocytes présentent des formes irrégulières et perdent leur polarité au niveau de la couche basale. En plus d'une baisse de leur prolifération, il a été observé que ces cellules épidermiques s'accumulent suite à des mutations de leur ADN (30). Ces altérations empêcheraient ainsi l'apoptose des kératinocytes, pouvant ainsi mener à une prolifération tumorale. Comme pour le vieillissement intrinsèque, les cellules de Langerhans sont également touchées, ce qui a pour conséquence d'augmenter le risque de cancer (49).

#### ***I.2.2.2.2. Derme***

Le vieillissement extrinsèque entraîne au niveau du derme une dégénérescence des fibres de collagène et une accumulation du tissu élastique anormal, appelée également élastose actinique. De plus, l'exposition de la peau aux rayonnements UV conduit à une augmentation de l'expression des MMPs, dégradant ainsi les fibres de collagène (50). Tout comme le vieillissement intrinsèque, la capacité des constituants de la substance fondamentale à retenir l'eau est également atteinte (51).

### ***I.2.2.3. Conséquences fonctionnelles et cliniques***

Au niveau des zones photo-exposées telles que le visage et le cou, on observe des ridules et des rides plus profondes que l'on retrouve au niveau de la patte d'oeil de l'œil, au-dessus de la lèvre supérieure, du front et des joues. Des rides d'expressions dans les zones de mobilité du visage sont également visibles. De plus, le vieillissement photo-induit entraîne surtout une baisse de la fonction immunitaire de la peau et de la sécrétion de sébum au niveau des glandes sébacées.

### **I.3. Problématiques et objectifs**

Comme cela a été exposé dans l'introduction, les différentes couches de la peau subissent des modifications moléculaires et structurales au cours du vieillissement. D'une part, la capacité de prolifération des kératinocytes est amoindrie, provoquant ainsi un amincissement de l'épiderme viable. Cela a pour conséquence de causer l'accumulation des cornéocytes, ce qui résulte ainsi en un épaississement du SC. D'autre part, une atrophie du derme est observée due à une modification de ses constituants dont principalement le collagène de type I.

Afin d'observer les effets du vieillissement chronologique sur les différents couches cutanées, des techniques non-invasives appliquées à l'étude de ces modifications sont particulièrement intéressantes. A titre d'exemple, la microscopie à lumière polarisée permet d'étudier *ex vivo* le réseau de collagène dans la peau (52). Cependant, la limite de cette technique réside dans le fait qu'elle ne peut extraire que des informations morphologiques. Pour évaluer l'état de la peau *in vivo*, des méthodes biophysiques telles que la mesure de la perte insensible en eau (PIE) ou la mesure des propriétés mécaniques cutanées ; sont employées en routine lors d'études en dermatocosmétique. Les valeurs obtenues lors de ces mesures sont généralement confrontées avec l'âge des volontaires afin de mettre en évidence des corrélations entre les propriétés physico-chimiques de la peau et le vieillissement chronologique. Or, il apparaît que ces corrélations sont généralement faibles (53, 54, 55) car des différences existent entre l'âge apparent (ou âge physiologique) d'un individu et son âge chronologique (déterminé à partir de sa date de naissance).

Ces exemples illustrent les limitations technologiques existantes. Dans ce contexte, nous avons opté pour les techniques de spectroscopie vibrationnelle. Elles permettent non seulement une caractérisation moléculaire et structurale du réseau de collagène du derme (micro-imagerie infrarouge en mode polarisé) ; mais aussi de sonder *in vivo* la composition moléculaire des couches cutanées superficielles pour évaluer au mieux l'âge physiologique de la peau (micro-spectroscopie confocale Raman).

Les principaux points de recherche abordés au cours de cette thèse sont :

- L'emploi d'une approche innovante (micro-imagerie infrarouge en mode polarisé) pour observer les changements d'orientation des fibres de collagène dans le derme au cours du vieillissement chronologique de la peau.

- L'évaluation de la relation entre les molécules d'eau et le réseau de collagène dermique dans l'étude de l'impact du vieillissement chronologique sur les caractéristiques structurales et moléculaires des constituants du derme.
- La caractérisation *in vivo* de la composition moléculaire de la peau et des altérations de ses propriétés biomécaniques et de sa fonction barrière qu'elle subit avec l'âge.

**CHAPITRE II :**

**DEMARCHES METHODOLOGIQUES**

## **II. 1. Spectroscopies vibrationnelles**

### **II.1.1. Principe**

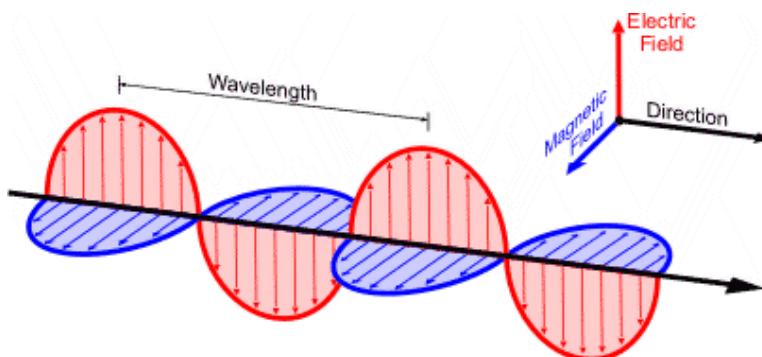
#### ***II.1.1.1. Interaction rayonnement-matière***

Le rayonnement électromagnétique est considéré comme la propagation d'énergie ou de particules sans transport de matière. Ce rayonnement (Figure 14) se décrit par la propagation périodique du champ électrique  $\vec{E}$  et du champ magnétique  $\vec{B}$ , dépendants l'un l'autre. Le rayonnement électromagnétique est défini par sa longueur d'onde  $\lambda$ , ou par l'énergie  $E$  des photons qui lui sont associés selon l'expression suivante :

$$E = h \cdot v = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (\text{Eq.1.})$$

Avec :  $h$  constante de Planck ( $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}^{-1}$ )

$c$  vitesse de la lumière dans le vide ( $3 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ )



**Figure 14 :** Schéma représentatif du rayonnement électromagnétique.

Lorsqu'un rayonnement électromagnétique interagit avec les champs électriques et magnétiques des atomes ou des molécules, différents phénomènes sont observés en fonction de l'énergie de ce rayonnement. Les spectroscopies optiques sont des techniques permettant de mesurer ces phénomènes d'interaction entre le rayonnement électromagnétique et la matière. Le diagramme de Jablonski (Figure 15) représente, dans le cadre d'une description quantique, ces différents types d'interaction rayonnement-matière :

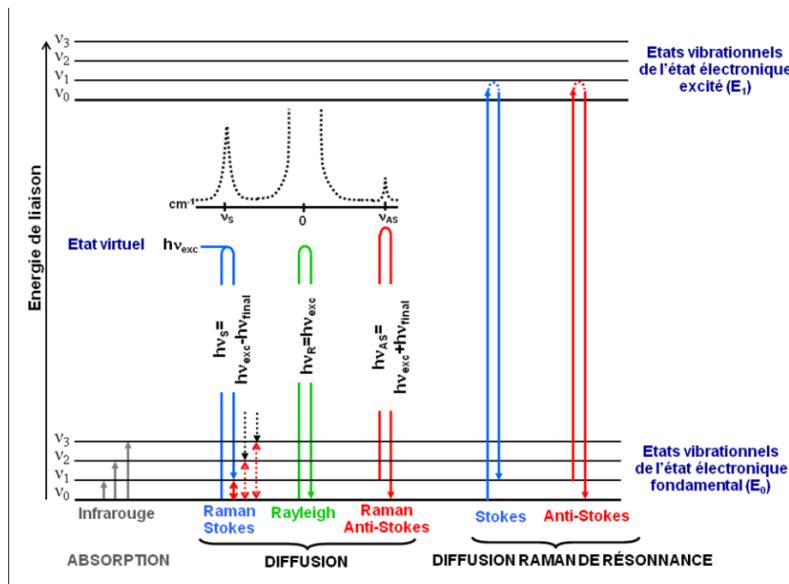


Figure 15 : Diagramme de Jablonski.

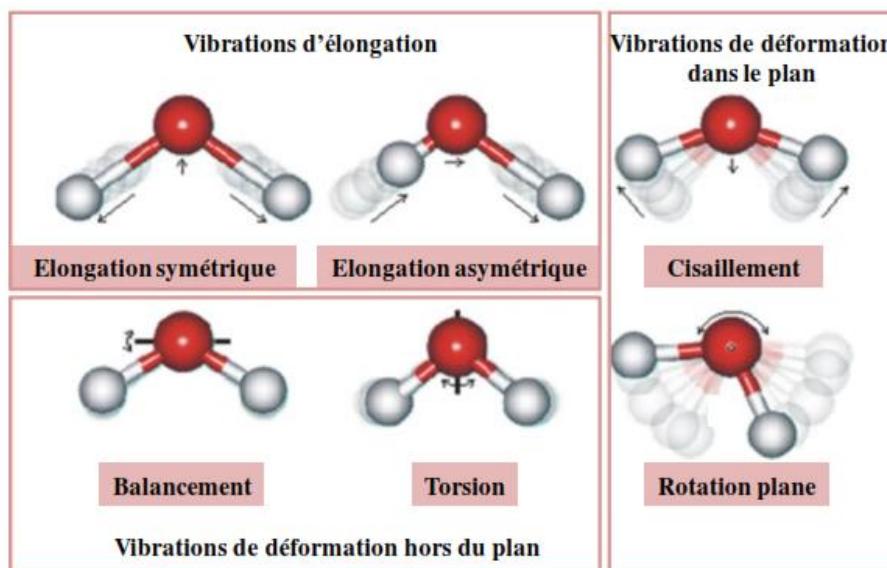
- En spectroscopie d'absorption infrarouge, les informations sont issues de la diminution de l'intensité du faisceau lumineux transmis par l'échantillon pour chaque longueur d'onde. Cette absorption permet ainsi d'obtenir une information quantitative par la loi de Beer-Lambert.
- En spectroscopie de diffusion Raman, la radiation monochromatique, provenant d'une source laser, interagit avec la matière. Les radiations diffusées, à des longueurs d'onde différentes de celle de la radiation incidente, sont ainsi analysées.
- En spectroscopie d'émission de fluorescence, un électron passe d'un niveau fondamental à un niveau électronique excité. Le retour de cet électron à un état électronique plus stable donne lieu au phénomène d'émission de fluorescence, d'énergie  $E$  moindre et de longueur d'onde  $\lambda$  plus importante que le rayonnement incident.

Les spectroscopies optiques, également appelées spectroscopies vibrationnelles, sont basées sur des transitions entre des niveaux vibrationnels d'un état électronique. D'après la théorie de la mécanique quantique, l'énergie  $E$  d'une molécule peut être quantifiée et considérée comme la somme des énergies des états électronique  $E_{el}$  et de vibration  $E_{vib}$ . Dans le cas de gaz, on ajoute également une énergie de rotation  $E_{rot}$ :

$$E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad (\text{Eq.2.})$$

Avec:  $E_{rot} < E_{vib} < E_{el}$

L'intérêt sera porté ici sur les énergies de vibration des molécules. En prenant l'exemple de molécules polyatomiques non linéaires de N atomes, on peut dénombrer  $3N-6$  degrés de liberté pour les différents modes de vibration des liaisons ( $3N-5$  dans le cas de molécules linéaires telles que le CO<sub>2</sub>). Ces mouvements vibrationnels correspondent à des élongations, des déformations d'angle, ou à des déformations hors plan, comme schématisé ci-dessous (Figure 16). Chacun de ces modes est associé à un nombre d'onde de vibration  $\bar{v}$  qui correspond à une transition entre deux niveaux vibrationnels d'un état électronique fondamental.



**Figure 16 :** Modes de vibration : exemple du groupement CH<sub>2</sub> d'une molécule.

Ainsi, les spectroscopies vibrationnelles ont pour but de déterminer les fréquences de vibration des molécules issues de l'échantillon analysé. Comme les fréquences dépendent de l'énergie des liaisons entre les atomes d'une molécule, il est donc possible de déduire du spectre obtenu des informations sur la nature et la structure d'une molécule.

#### **II.1.1.2. Spectroscopie d'absorption infrarouge**

Cette technique est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge (IR) par l'échantillon analysé. La fenêtre spectrale de l'IR comprend des longueurs d'onde  $\lambda$  comprises entre 0.8 et 1000 μm, soit pour des nombres d'onde  $\bar{v}$  compris entre 12800 et 10 cm<sup>-1</sup> respectivement. Cette région spectrale se décompose en trois parties bien distinctes : le proche infrarouge (ou

*NIR* pour *near infrared*) se situe entre 12800 et 4000 cm<sup>-1</sup> (0.8 μm < λ < 2,5 μm), le moyen infrarouge (ou *MIR* pour *mid infrared*) entre 4000 et 400 cm<sup>-1</sup> (2,5 μm < λ < 25 μm), et le lointain infrarouge (ou *FIR* pour *far infrared*) entre 400 et 10 cm<sup>-1</sup> (25 μm < λ < 1000 μm). Notre intérêt sera porté ici sur le domaine du moyen infrarouge (*MIR*) correspondant au domaine d'énergie de vibration des molécules (2,5 μm < λ < 25 μm). Le rayonnement IR sera absorbé si ce dernier présente une énergie de vibration de même ordre de grandeur que celle des atomes de la molécule. Une diminution de l'intensité du rayonnement IR réfléchi ou transmis sera par la suite enregistré. L'interaction du rayonnement IR avec les molécules ne peut s'effectuer que dans le cas où la molécule possède au moins une liaison présentant un moment dipolaire. Ainsi, pour qu'un mode de vibration soit actif en IR, la variation de son moment dipolaire doit être non nulle lors du mouvement de vibration. Dans le cas contraire, une liaison ayant une variation du moment dipolaire nulle ne pourra pas absorber et le mode de vibration sera inactif en IR.

Le spectre IR obtenu représente l'absorbance A (ou transmittance T) en fonction du nombre d'onde  $\bar{v}$  (inversement proportionnel à la longueur d'onde λ). En supposant que l'échantillon soit traversé par un rayonnement monochromatique (caractérisé par une seule fréquence ν), une partie de l'énergie de ce rayonnement pourra être absorbé, et ceci avec une information quantitative. Cet aspect quantitatif de l'analyse spectrale est modélisé par la loi de Beer-Lambert définie par la formule suivante :

$$A_\lambda = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{Eq.3.})$$

Avec : I<sub>0</sub> intensité du rayonnement incident (sans unités)

I intensité du rayonnement transmis (sans unités)

ε coefficient d'extinction molaire (L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

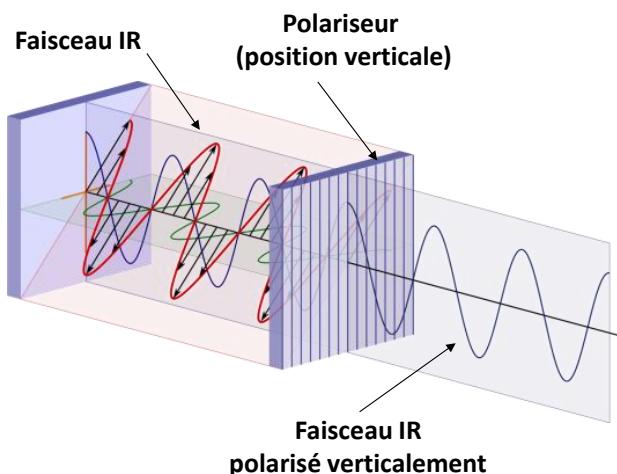
c concentration de la substance absorbante (mol.L<sup>-1</sup>)

l épaisseur de l'échantillon (cm)

Comme l'absorbance est proportionnelle à la concentration de l'échantillon analysé, la spectroscopie d'absorption IR peut donc être utilisée en tant que méthode d'analyse quantitative.

### Principe de la polarisation en spectroscopie IR

Si les plans de vibration du champ électrique  $\vec{E}$  et du champ magnétique  $\vec{B}$  sont fixés dans l'espace, le rayonnement IR est dit polarisé linéairement. En général, le champ électrique  $\vec{E}$  est choisi pour définir l'état de polarisation, dû au fait que la perturbation produite par le champ électrique  $\vec{E}$  sur la matière est beaucoup plus importante que celle exercée par le champ magnétique  $\vec{B}$ . Dans le cas de la lumière naturelle non polarisée, la polarisation instantanée fluctue rapidement d'une manière aléatoire. Le dispositif permettant de produire de la lumière polarisée linéairement à partir de lumière non polarisée est appelé polariseur. La fonction d'un polariseur est donc de sélectionner la composante du rayonnement IR dont le champ électrique  $\vec{E}$  est placé dans une direction bien spécifique et de rejeter tous les autres composantes, comme indiqué sur la Figure 17.

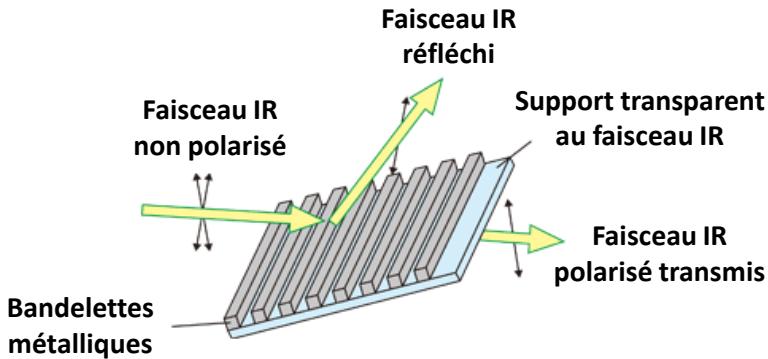


**Figure 17 :** Représentation schématique de la polarisation d'un faisceau IR.

(Source : <http://kezako.unisciel.fr>)

Le polariseur à « grille de fils » (ou *wire-grid polarizer*) est plus communément utilisé pour des applications en spectroscopie IR. Ce dispositif est constitué d'un ensemble de bandelettes métalliques parallèles, espacées de façon égale entre elles et déposées sur un substrat (bromoiodure de thallium (KRS-5), sélénium de zinc (ZnSe), fluorure de calcium (CaF<sub>2</sub>), fluorure de barium (BaF<sub>2</sub>,...)) transparent au rayonnement IR. Les bandelettes métalliques vont ainsi fournir une forte conductivité pour le champ électrique  $\vec{E}$  qui sera parallèle à ces bandelettes, et par conséquent vont permettre l'absorption et la réflexion du champ électrique

$\vec{E}$  dans cette direction. En revanche, le champ électrique  $\vec{E}$  perpendiculaire aux bandelettes métalliques sera totalement transmis à travers les espaces inter-bandelettes non conducteurs (Figure 18).



**Figure 18 :** Fonctionnement du polariseur à « grille de fils ».

(Source : <http://www.jvc.eu>)

Si un faisceau IR polarisé linéairement est utilisé pour obtenir un spectre IR, l'absorbance A de la vibration associée à une liaison moléculaire sera proportionnelle au carré du produit scalaire du moment dipolaire  $\vec{M}$  de cette liaison et du vecteur du champ électrique  $\vec{E}$  :

$$A \propto \sum(\vec{M} \cdot \vec{E})^2 \Leftrightarrow A \propto \sum(\cos^2 \gamma) \quad (\text{Eq.4.})$$

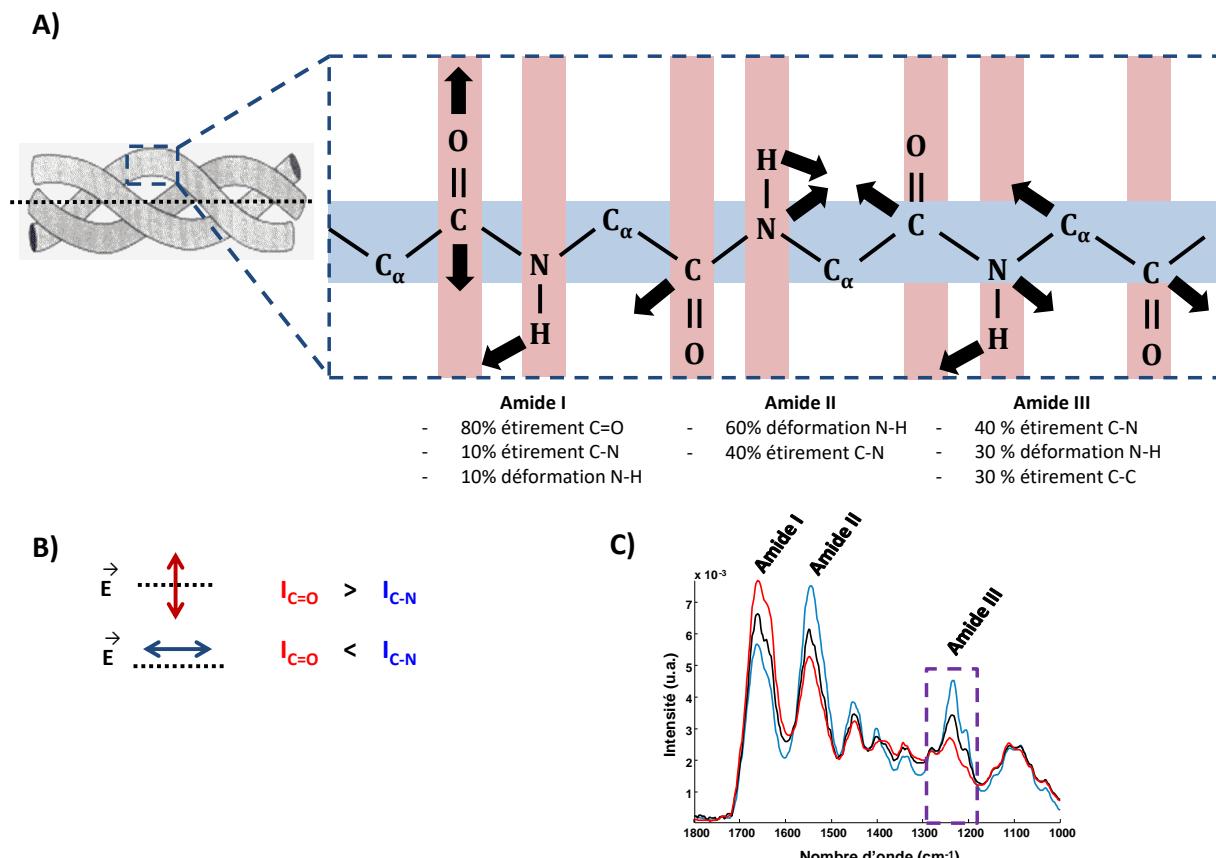
Avec:  $\gamma$  angle entre les vecteurs du moment dipolaire et du champ électrique (radians)

L'équation ci-dessus montre clairement que l'absorbance est maximale lorsque  $\vec{M}$  et  $\vec{E}$  sont parallèles (pour  $\gamma = 0$  rad), et est nulle lorsque  $\vec{M}$  et  $\vec{E}$  sont perpendiculaires (pour  $\gamma = \frac{\pi}{2}$  rad).

Cela illustre la dépendance de l'intensité de la bande d'absorption IR au carré du cosinus de l'angle. Il est important de souligner que seule l'orientation des moments dipolaires est mesurée et non pas celle des molécules elles-mêmes. Pour des échantillons isotropiques tels que les fluides et les échantillons n'ayant aucune orientation préférentielle, l'absorbance est indépendante de la polarisation du faisceau IR incident puisque la somme des absorbances correspond à toutes les liaisons moléculaires absorbantes orientées aléatoirement. Dans le cas où un échantillon montrerait une anisotropie d'orientation des moments dipolaires, l'absorbance de la vibration atteindra son maximum lorsque le faisceau IR sera polarisé dans

la même direction que les dipôles oscillants. Cette propriété directionnelle de la spectroscopie d'absorption IR permet d'étudier l'orientation des groupements moléculaires.

Par exemple, il est intéressant d'utiliser la polarisation en spectroscopie IR pour la molécule de collagène de type I (Figure 19).



**Figure 19 :** Intérêt de la polarisation en spectroscopie : exemple de la molécule de collagène de type I. (A) La molécule de collagène de type I présente des liaisons moléculaires  $C=O$ ,  $C-N$  et de  $N-H$  dont les modes vibrationnels sont plus ou moins induits en fonction du champ électrique  $E$ . (B) Le champ électrique peut induire fortement l'étirement des liaisons  $C=O$  et  $C-N$  en fonction de son orientation à l'axe de la molécules de collagène de type I. (C) La forte induction des étirements des liaisons  $C=O$  et  $C-N$ , dépendant du champ électrique  $E$ , permet d'obtenir une signature spectrale du collagène de type I bien spécifique.

Au sein de la structure moléculaire du collagène de type I, on retrouve tout type de liaisons moléculaires telles que des  $C=O$ ,  $C-N$  et de  $N-H$ , caractérisant les bandes vibrationnelles Amide I, II et III. Lorsque le faisceau IR est polarisé de telle sorte que le champ électrique  $E$  soit dans une direction perpendiculaire à la triple hélice de collagène, et donc dans l'axe des

doubles liaisons C=O, l'étirement des C=O sera fortement induit tandis que l'étirement des C-N le sera faiblement. A l'inverse, si le faisceau IR est polarisé de telle sorte que le champ électrique E soit dans une direction parallèle à la triple hélice de collagène, et donc perpendiculaire à l'axe des doubles liaisons C=O, l'étirement des C=O sera faiblement induit, alors que l'étirement des C-N le sera fortement. En sachant que les bandes vibrationnelles Amide I et II sont sensibles à la polarisation, il est possible de se servir de cette particulière caractéristique pour déterminer l'orientation des fibres de collagène dermique en établissant un ratio, celui des aires intégrées de la bande Amide I sur celles de la bande Amide II.

#### ***II.1.1.3. Spectroscopie de diffusion Raman***

En 1928, Sir Venkata Raman a découvert l'effet Raman qui résulte de l'interaction inélastique entre un faisceau laser et les molécules composant un échantillon. Ce phénomène de diffusion Raman est lié à la polarisabilité  $\alpha$  des liaisons moléculaires, c'est-à-dire à la capacité du nuage électronique d'une liaison à se déformer et donc à acquérir un moment dipolaire induit  $\vec{P}$  sous l'effet du champ électrique  $\vec{E}$  du rayonnement incident :

$$\vec{P} = \bar{\alpha} \cdot \vec{E} \quad (\text{Eq.5.})$$

Avec :  $\vec{P}$  moment dipolaire induit de la liaison moléculaire

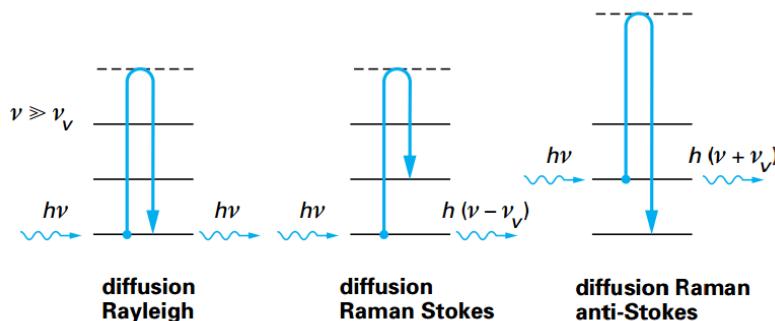
$\bar{\alpha}$  tenseur de polarisabilité de la liaison moléculaire

$\vec{E}$  champ électrique du rayonnement incident

En supposant que le champ électrique  $\vec{E}$  du rayonnement incident oscille à la fréquence  $v$ , que la liaison moléculaire vibre à la fréquence  $v_v$ , et que cette vibration entraîne une variation de la polarisabilité, alors le rayonnement électromagnétique diffusé possède plusieurs composantes de différentes fréquences (Figure 19) :

- Le phénomène le plus fréquemment observé est la diffusion Rayleigh, où le rayonnement diffusé présente la même fréquence  $v$  que le rayonnement électromagnétique incident. 1 photon sur  $10^4$  est diffusé élastiquement par les molécules de l'échantillon, donc sans changement d'énergie.

- L'autre phénomène constitue la diffusion Raman qui est un évènement beaucoup plus rare : 1 photon sur  $10^8$  diffuse de manière inélastique avec une légère variation en énergie. Aussi, deux diffusions inélastiques peuvent être observées : la diffusion Raman de type Stokes (onde diffusée de fréquence  $\nu - \nu_v$ ) et de type anti-Stokes (onde diffusée de fréquence  $\nu + \nu_v$ ) selon le niveau d'énergie de départ comme indiqué sur la figure 20.



**Figure 20 :** Différents phénomènes de diffusion entre un photon et la matière (56).

Les spectres Raman représentent l'intensité Raman diffusée par la matière excitée par une source laser, en fonction de la différence de fréquence entre les photons incidents et les photons diffusés. Tout comme un spectre IR, un spectre Raman s'exprime en fonction du nombre d'ondes  $\bar{v}$ . À une température donnée, la répartition en niveaux d'énergie d'un ensemble de molécules obéit à la loi de Maxwell-Boltzmann. Or, seules les molécules se trouvant dans un état d'énergie vibrationnelle excité permettront l'obtention d'une diffusion Raman anti-Stokes de type  $v \rightarrow v - 1$ . C'est pour cette raison que, à température ambiante, la diffusion Raman Stokes est mesurée en pratique car les raies Stokes sont d'intensité plus élevée que les raies anti-Stokes. Le rapport des intensités des raies Stokes et anti-Stokes est déduit par la relation suivante :

$$\frac{I_{\text{anti-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} = \left(\frac{\nu + \nu_v}{\nu - \nu_v}\right)^4 \cdot e\left(\frac{-h \cdot \nu_v}{k \cdot T}\right) \quad (\text{Eq.6.})$$

Avec :  $\nu$  fréquence de l'onde excitatrice

$\nu_v$  fréquence de vibration de la liaison moléculaire excitée

$k$  constante de Boltzmann ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ )

$T$  température (K)

Ainsi, la connaissance du rapport d'intensité des raies anti-Stokes et Stokes pour une vibration donnée peut être utilisée pour déterminer la température d'un échantillon sans aucun contact matériel. On peut remarquer que l'intensité de la diffusion Raman augmente avec la fréquence de l'onde incidente à la puissance 4. Cependant, une limite survient en pratique lorsque la fréquence d'excitation maximale induit des phénomènes d'émission de fluorescence parasite, masquant l'effet Raman. La spectroscopie Raman présente l'avantage de permettre l'analyse des échantillons biologiques en milieu aqueux dû à la faible diffusion de l'eau.

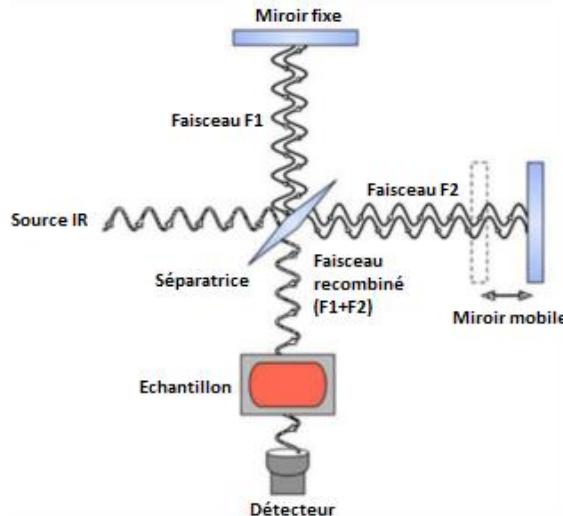
## **II.1.2. Instrumentation**

### ***II.1.2.1. Spectroscopie d'absorption infrarouge***

L'acquisition des données spectrales IR est réalisée à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF). Une source de lumière polychromatique, appelée Globar, émet de l'énergie dans le MIR ( $2,5 \mu\text{m} < \lambda < 25 \mu\text{m}$ ) sous la forme d'un faisceau qui résulte de l'échauffement de filaments de carbure de silicium par un courant électrique. Le faisceau IR est ensuite envoyé vers l'interféromètre de Michelson permettant de mesurer simultanément les intensités d'absorbance correspondant à différents nombres d'ondes transmis (ou absorbés).

#### Principe de l'interféromètre de Michelson et de la transformée de Fourier (TF)

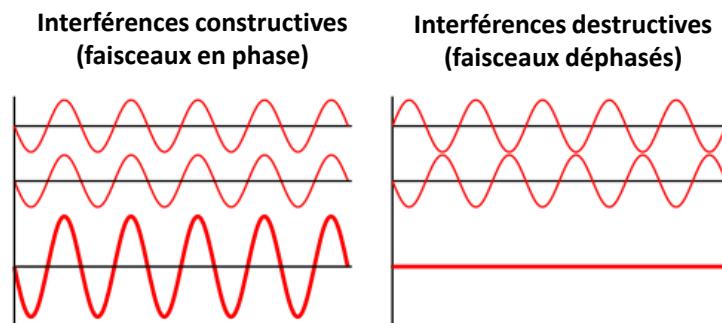
L'interféromètre de Michelson (Figure 21) est un dispositif optique constitué d'une lame séparatrice semi-transparente (en  $\text{CaF}_2$  pour le MIR) sur laquelle arrive le faisceau IR incident. Ce dernier est séparé en deux: une partie (F1) est réfléchie sur un miroir fixe, et l'autre (F2) passe à travers la séparatrice puis est dirigé vers un miroir mobile. Les deux miroirs sont placés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre, et le miroir mobile se déplace à vitesse constante le long de son axe. Le faisceau F1 va donc parcourir un trajet optique fixe, tandis que le faisceau F2 devra réaliser un chemin optique de longueur variable (selon la position du miroir mobile).



**Figure 21 :** Représentation schématique de l'interféromètre de Michelson.

Les faisceaux F1 et F2 vont ensuite se recombiner au niveau de la séparatrice : cependant, les différences entre les deux trajets optiques empruntés par les deux faisceaux seront à l'origine d'interférences de deux types (Figures 22) :

- Lorsque les deux faisceaux de même nature (donc de même longueur d'onde) ont parcouru le même trajet optique, ils sont en phase et leurs intensités s'ajoutent : on parle d'interférences constructives (ou positives).
- Lorsque les deux faisceaux de même nature ont parcouru un chemin optique différent (la différence de trajet étant égale à une demi-longueur d'onde ou à un nombre impair de la demi-longueur d'onde), ils arrivent en opposition de phase et leurs intensités s'annulent : on parle d'interférences destructives (ou négatives).



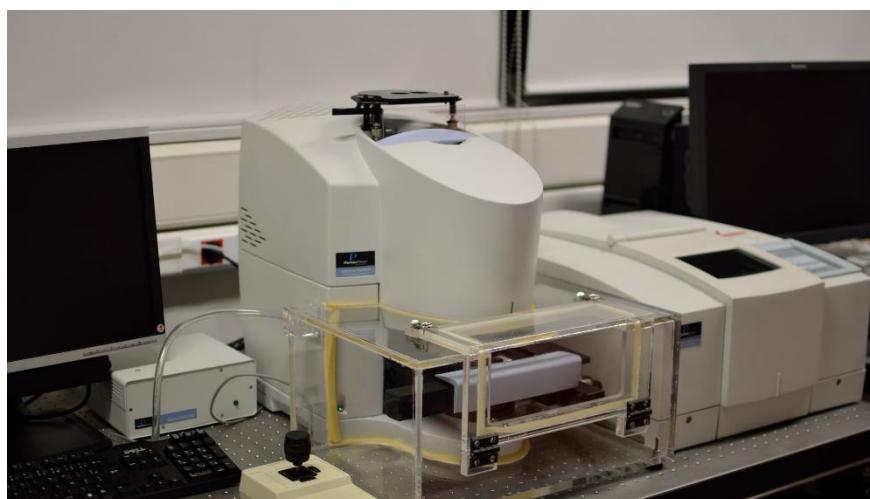
**Figure 22 :** Interférences constructives et destructives.

(Source : <http://lehollandaisvolant.net>)

L'ensemble des interférences constructives et destructives vont constituer un signal appelé interférogramme qui représente l'intensité du signal en fonction de la position du miroir mobile. Le faisceau IR ainsi modulé est ensuite dirigé vers l'échantillon avec lequel il interagira (absorption à certaines longueurs d'onde caractéristiques des liaisons moléculaires de l'échantillon). L'interférogramme ainsi modifié sera transformé en spectre IR par une opération mathématique appelée transformée de Fourier (TF), d'où le nom de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF). Cet algorithme permet la conversion des unités de temps (ou dans notre cas de déplacement, étant donné que la vitesse du miroir mobile est connue et fixe) en unités de fréquence ou nombre d'onde (exprimé en  $\text{cm}^{-1}$ ).

Imageur infrarouge Spotlight 300/Spectrum One (Perkin-Elmer)

Cet appareil est constitué d'un microscope Spotlight 300 couplé à un spectromètre Spectrum 100 IR-TF (Perkin-Elmer, France) illustré par la Figure 23.



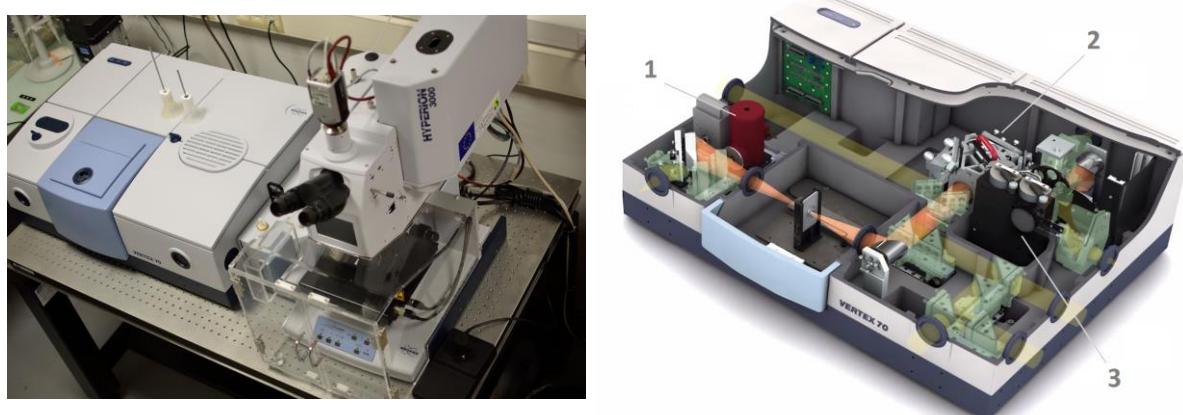
**Figure 23 :** Image photographique de l'imageur infrarouge Spotlight 300/Spectrum One (Perkin Elmer).

Le micro-spectromètre est constitué d'une source excitatrice Globar et le faisceau qui en émane est focalisé sur l'échantillon à l'aide d'objectifs Cassegrain. L'échantillon est disposé sur une platine motorisée permettant des déplacements dans le plan X-Y. Un système Z-fold permet de passer d'une taille de pixel de  $6,25 \times 6,25 \mu\text{m}^2$  à  $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ . Une enceinte de purge, équipée d'une arrivée d'air sec permet de minimiser les contributions atmosphériques telles que le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et la vapeur d'eau. Un système de deux détecteurs de type MCT (Mercure Cadmium Telluride) est refroidi à l'azote liquide. L'un des détecteurs,

composé d'un seul élément de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ , est utilisé pour l'acquisition des spectres points. L'autre détecteur, composé de 16 éléments de  $6,25 \times 6,25 \mu\text{m}^2$ , est destiné à l'imagerie spectrale. Le logiciel SpectrumImage permet l'acquisition et la reconstruction des images spectrales.

### Imageur infrarouge Hyperion 3000/Vertex 70 (Bruker)

Dans notre étude, nous avons également utilisé un second système constitué d'un spectromètre Vertex 70 IR-TF couplé à un microscope Hyperion 3000 (Bruker Optics, Allemagne) illustré par la figure 24.



**Figure 24 :** Image photographique de l'imageur infrarouge Hyperion 3000/Vertex 70 (Bruker) (*à gauche*) et schéma descriptif du spectromètre Vertex 70 (*à droite*) : (1) compartiment réservé aux détecteurs, (2) interféromètre de type RockSolid<sup>TM</sup>, et (3) module de la source interne.

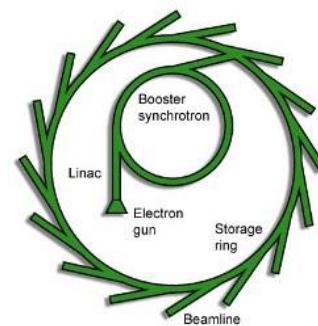
Le spectromètre IR est constitué d'un interféromètre différent de celui de Michelson. Contrairement aux miroirs plats retrouvés dans un interféromètre classique, l'interféromètre RockSolid<sup>TM</sup> de Bruker est composé de deux miroirs rétroréflecteurs à coins de cube qui sont pratiquement insensibles à d'éventuels mouvements angulaires des miroirs ; permettant d'assurer la stabilité de la mesure.

L'imageur IR est également équipé d'un détecteur FPA (*Focal Plane Array* pour matrice à plan focal), conçu initialement pour des applications à des fins militaires. Ce détecteur multiéléments consiste en une matrice de pixels, dont la taille correspond à la limite de diffraction (57). Le détecteur FPA de notre système est en configuration  $64 \times 64 \text{ pixels}^2$  (soit

4096 pixels au total) et nécessite d'être refroidi avec de l'azote liquide, tout comme pour le détecteur MCT. A titre d'exemple, le détecteur FPA permet l'acquisition d'une image IR contenant 8192 spectres en 3 minutes avec une taille de pixel de  $2,7 \times 2,7 \mu\text{m}^2$  (avec un objectif x15) ; tandis que le détecteur MCT requiert un temps d'acquisition d'une heure pour une taille de pixel de  $6,25 \times 6,25 \mu\text{m}^2$ . Les images spectrales sont acquises à l'aide du logiciel Opus 7.0 (Bruker Optics, Allemagne).

### Utilisation de la source Synchrotron

Nous avons été amenés à réaliser des expérimentations à l'aide du rayonnement du synchrotron Diamond Light Source, basé à Oxfordshire en Angleterre. Ce synchrotron (Figure 25), présentant une circonférence de près d'un demi-kilomètre, consiste à accélérer des électrons, atteignant des vitesses proches de celle de la lumière. La source de lumière qui en est produite est 10 milliards de fois plus brillante que celle du soleil. Cette très puissante lumière va être alors dirigée vers des stations expérimentales appelées lignes de lumière. Ainsi, différentes lignes de lumière sont classées en fonction de la gamme d'énergie des rayons qu'elles exploitent (rayons X, IR, UV, Terahertz,...).



**Figure 25 :** Image photographique du synchrotron Diamond Light Source en Angleterre (*à gauche*) et schéma du fonctionnement du synchrotron (*à droite*).

(Source : <http://www.diamond.ac.uk>)

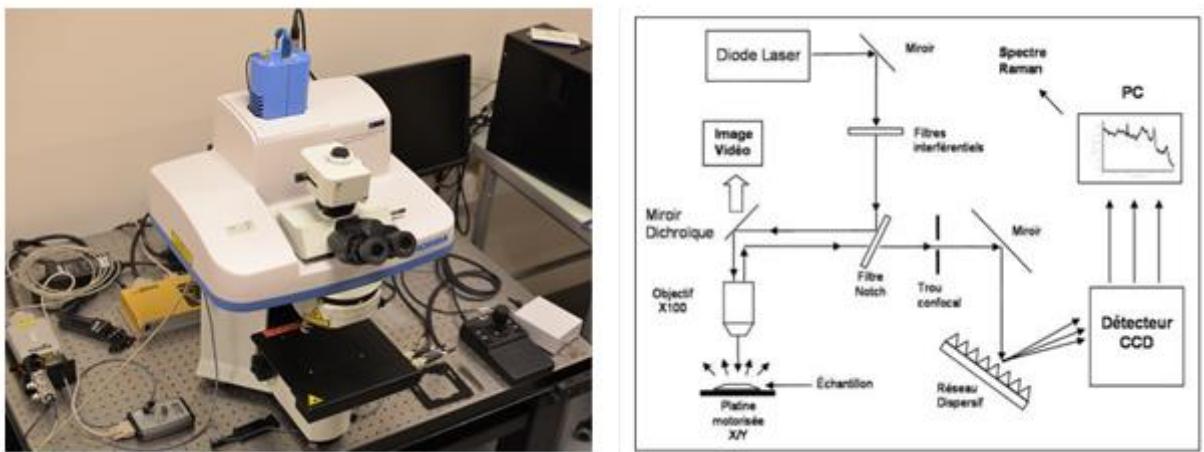
Dans notre étude, des expérimentations ont été réalisées sur la ligne de lumière MIRIAM (*Multimode InfraRed Imaging And Micro-spectroscopy*) exploitant le domaine de l'IR et dont le rayonnement est 100 à 1000 fois plus brillant qu'une source IR conventionnelle. L'acquisition des données spectrales a été réalisée à l'aide d'un microscope

Hyperion 3000 couplé à un spectromètre Vertex 80v IR-TF (Bruker Optics, Allemagne), le tout piloté par le logiciel Opus 7.0. Les images spectrales ont été acquises en mode transmission à l'aide d'un objectif x36 et sur la gamme spectrale 4000-900 cm<sup>-1</sup>.

### ***II.1.2.2. Spectroscopie de diffusion Raman***

- **Micro-spectromètre Raman (XploRA)**

Ce système d'analyse Raman (Horiba Jobin Yvon, France) est illustré en Figure 26 et a permis d'acquérir des données Raman à l'aide du logiciel LabSpec 6 (Horiba Jobin Yvon, France). Ce micro-spectromètre Raman est constitué de plusieurs éléments :



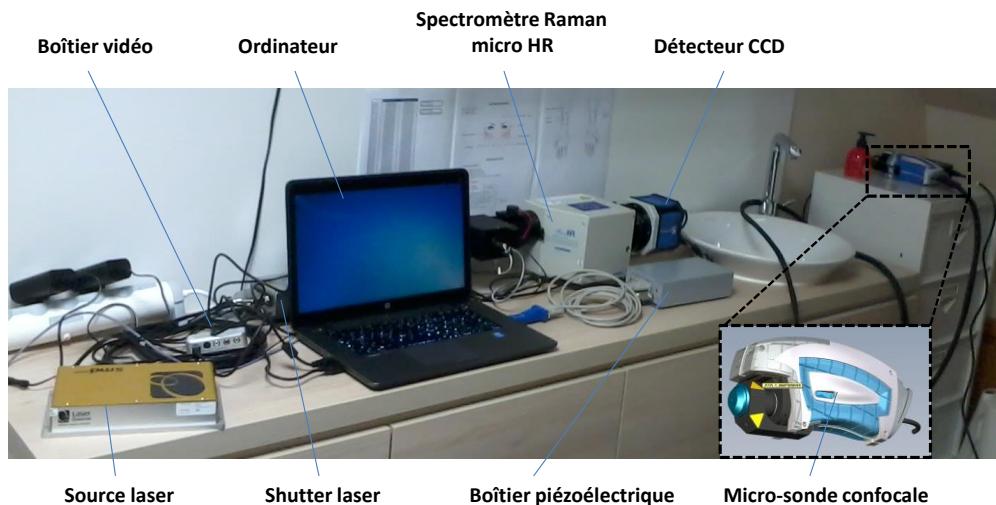
**Figure 26 :** Image photographique du système Raman XploRA (Horiba Jobin Yvon) (*à gauche*) et schéma descriptif du micro-spectromètre Raman (*à droite*).

- Deux sources lasers excitatrices (532 nm et 660 nm). Le choix de la longueur d'onde d'excitation résulte d'un compromis : plus la longueur d'onde d'excitation est basse, plus l'intensité de la diffusion Raman est forte mais avec l'inconvénient de générer une fluorescence parasite importante. De plus, il y a également le risque d'une éventuelle dégradation photothermique de l'échantillon par un laser de longueur d'onde d'excitation basse, et donc fortement énergétique.
- Un filtre passe-bande (ou interférentiel) permet de filtrer les raies parasites.
- Un jeu de filtres atténuateurs (ou de densité ou *ND* pour *Neutral Density*) et la possibilité de moduler la puissance du laser.

- Un filtre edge (filtre passe-haut) permet d'éliminer par réflexion la raie excitatrice du laser et la diffusion Rayleigh.
- Un système dispersif permet par réflexion de séparer les longueurs d'onde de la lumière diffusée par l'échantillon. Plusieurs réseaux de diffraction sont disponibles selon la résolution spectrale souhaitée : 600, 1200, 1800 et 2400 traits/mm. Plus le nombre de traits/mm est élevé, plus on gagne en résolution spectrale mais à défaut de réduire l'étendue spectrale.
- Un détecteur de type CCD (*Charge-Coupled Device*) de 256 x 1024 pixels permet d'enregistrer numériquement les spectres Raman. Ce détecteur de haute sensibilité est refroidi à -65°C par effet Peltier.
- Un microscope optique confocal permet de focaliser le faisceau laser sur l'échantillon à l'aide d'un objectif. Coupler le spectromètre avec un microscope constitue l'une des caractéristiques les plus importantes de la technique, du fait que la résolution spatiale peut atteindre l'ordre du micromètre. De plus, l'objectif utilisé permet de récolter le signal de diffusion Raman émis par l'échantillon.
- Un trou confocal permet de sélectionner le signal émis par un point particulier de l'échantillon. Le signal sélectionné est ensuite focalisé sur la fente d'entrée du spectromètre.
- Une fente dont la largeur permet de définir la résolution spectrale de l'appareil. Plus l'ouverture de la fente est réduite, plus on gagne en résolution spectrale mais plus l'intensité du signal à analyser sera également réduite.
- Une platine motorisée permet d'enregistrer des cartographies Raman avec un pas minimal de déplacement de 0,1 µm en X et Y.

- Micro-sonde confocale Raman

Afin de réaliser des analyses *in vivo* au niveau de la peau, un système de spectroscopie Raman (Figure 27), intégrant une micro-sonde confocale, a été développée par Horiba Scientific (Villeneuve d'Ascq, France). Cet appareil, facilement maniable, permet de réaliser des analyses Raman *in vivo* sur différents sites anatomiques. Ce système comprend :



**Figure 27 :** Image photographique représentant le système de la micro-sonde confocale Raman (Horiba Jobin Yvon).

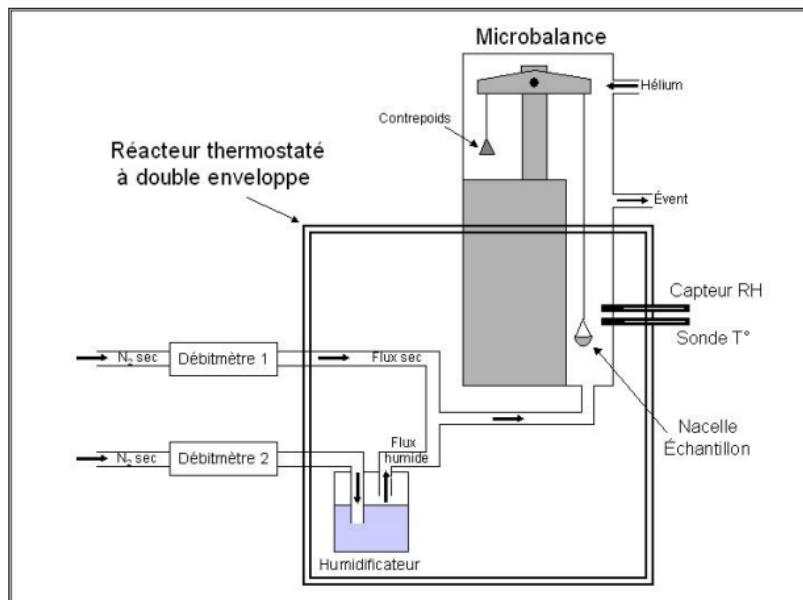
- Le spectromètre Raman de type micro-HR (Haute Résolution) équipé d'un détecteur CCD de haute sensibilité et refroidi à -70°C par effet Peltier. Ce spectromètre présente un réseau dispersif fixé à 830 traits/mm.
- La micro-sonde confocale contenant une fibre optique monomode de 5 µm de diamètre. Cette fibre, utilisée pour véhiculer le laser, assure une confocalité de l'ordre de 3 µm (dans notre cas, en utilisant un objectif x100 MPlanFLN). De plus, une caméra a été intégrée à la sonde afin de pouvoir visualiser la surface de l'échantillon.
- Une bague de focalisation, à l'extrémité de l'objectif, permettant de se positionner à une distance de travail optimale en ajustant la distance entre la peau et l'objectif. Cet embout indépendant de l'objectif présente une ouverture de 1 mm.
- Un système piézoélectrique permettant un mouvement en Z de  $\pm 100 \mu\text{m}$  avec la possibilité d'ajuster des pas d'incrémentation.
- La source laser à 660 nm dont la puissance est de 25 mW en sortie d'objectif. Le laser est bridé de telle sorte à respecter les normes de protection (normes oculaires).
- Un système d'autofocus ultrarapide permet de focaliser le laser à la surface de la peau quasiment en temps réel.

Ce système a été utilisé lors de campagnes de mesures Raman *in vivo* sur des volontaires de différents âges, afin d'étudier les bases moléculaires du vieillissement cutané.

## **II.2. Autres méthodes analytiques appliquées à l'étude de la peau**

### **II.2.1. Caractérisation *ex vivo* de l'hydratation de la peau par gravimétrie d'adsorption de vapeur d'eau (ou DVS pour *Dynamic Vapor Sorption*)**

La méthode DVS est une technique gravimétrique permettant de mesurer la variation de masse d'un échantillon en fonction de la pression de la vapeur d'eau (59, 60). Elle a été utilisée dans cette étude (*cf.* Chapitre III.5) afin d'évaluer l'interaction des molécules d'eau avec le substrat d'intérêt (*i.e.* blocs de peau excisée). Les expérimentations de désorption-sorption de vapeur d'eau sont réalisées à l'aide d'une microbalance de vapeur d'eau de type IGA (*Intelligent Gravimeter Analyzer*) et de marque Hiden Isochema (Figure 28).



**Figure 28 :** Schéma conceptuel de la microbalance de sorption d'eau.

Cette microbalance IGA ultra-sensible est équipée d'un fléau, le tout maintenu sous un flux d'hélium et une température de 55°C pour une meilleure stabilité dans les mesures. De chaque extrémité du fléau sont suspendus un contrepoids en inox et une nacelle tressée en inox contenant l'échantillon. Un capteur d'humidité relative (ou *RH* pour *Relative Humidity*) et une sonde de température sont localisés près de l'échantillon. La partie échantillon est coiffée

d'un réacteur à double enveloppe relié à un bain d'eau thermostatée. Un double flux d'azote (un flux humide et un flux sec, contrôlés par des débitmètres) se mélange pour donner une RH désirée, à un flux constant de 400 mL/min. Le flux humide est obtenu par bullage dans un réservoir d'eau.

Au début de l'expérimentation, l'échantillon est épongé très rapidement avec du papier absorbant afin d'enlever l'excès d'eau. Puis, après avoir chargé l'échantillon dans la nacelle en inox, des séquences de désorption, de sorption et de séchage sont effectuées :

- Tout d'abord, une séquence de mise à l'équilibre de l'échantillon à une RH de 95% est lancée pendant plusieurs heures.
- Puis, une séquence de désorption est démarrée afin de décroître l'humidité intrinsèque de l'échantillon jusqu'à une RH de 0% avec un pas de 10%. Chaque pas de désorption dure entre 4 h et 6 h.
- Ensuite, une séquence de sorption est lancée afin de croître l'humidité propre à l'échantillon jusqu'à une RH de 90% avec un pas de 10%. Chaque pas de sorption dure également entre 4 h et 6 h.
- Enfin, l'échantillon subit sous un flux d'azote sec une étape de séchage en étant chauffé à 40°C pendant 4h, puis refroidi à 20°C pendant 8h. Par la suite, cette étape permet de calculer les teneurs en eau en se basant sur la masse sèche de l'échantillon précédemment enregistrée.

Les isothermes de désorption/sorption sont ensuite tracés (Figure 29). Ces derniers représentent l'évolution de la teneur en eau (exprimée en pourcentage massique par rapport à la masse de matière sèche) de l'échantillon en fonction de l'humidité relative (exprimée en pourcentage) de l'air à l'équilibre pour une température donnée.

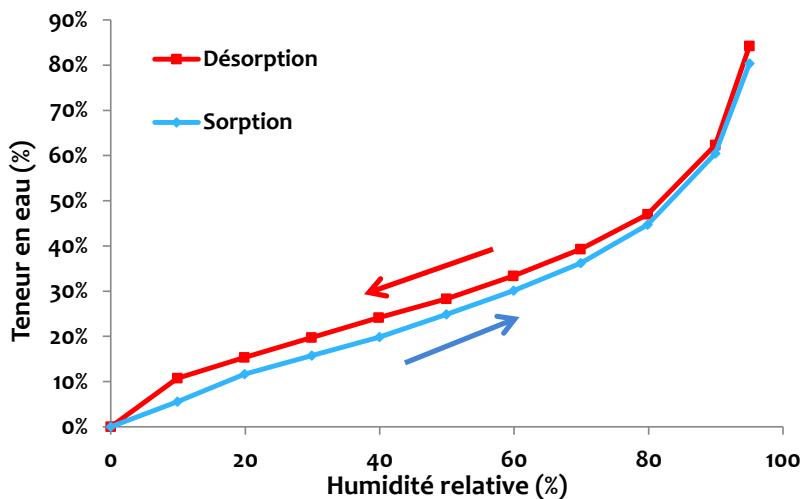


Figure 29 : Exemple d’isothermes de désorption (en rouge) et de sorption (en bleu).

Comme on peut le voir sur l'exemple ci-dessus, les isothermes de désorption et de sorption ne se superposent pas, montrant ainsi un comportement d'hystérésis en relation avec l'état d'hydratation de l'échantillon. Ce phénomène témoigne d'une irréversibilité des propriétés physico-chimiques de l'échantillon à revenir à leur état initial.

### II.2.2. Mesure *in vivo* de la perte insensible en eau au niveau de la peau

Une fonction barrière intacte est essentielle au maintien d'une peau souple, bien hydratée et sans squames. La barrière cutanée est souvent vue comme un obstacle à la pénétration de substances à travers la peau, mais elle joue surtout un rôle majeur visant à limiter la diffusion de l'eau hors de l'organisme. C'est une barrière imperméable qui permet la restriction des mouvements d'eau. Lors d'altérations importantes, une déshydratation marquée peut apparaître. Cette barrière limite également la pénétration de substances potentiellement dangereuses provenant du milieu extérieur. Etant donnée la finesse de la barrière cutanée (quelques micromètres d'épaisseur), même une lésion d'apparence peu profonde peut altérer cette barrière et entraîner une perte d'eau à travers cet épiderme lésé.

De nombreuses études réalisées *in vivo* sur l'homme concluent que la mesure de la perte insensible en eau (PIE) est un bon moyen pour quantifier l'état de la barrière cutanée. Il est important de préciser que la PIE n'est pas une mesure de la quantité d'eau, mais une mesure du flux de densité en eau (quantité d'eau par unité d'aire par unité de temps). La transpiration est nécessaire pour mesurer la PIE puisque la mesure est réalisée dans l'air au-dessus de la peau. Par conséquent, la PIE est le flux d'eau diffusant à travers la peau, de

l'intérieur du corps jusqu'à la surface cutanée. Ce processus de diffusion peut être décrit par la loi de Fick :

$$J = -D \cdot \frac{dc}{dx} \quad (\text{Eq.7.})$$

Avec : J flux de diffusion ( $\text{g.m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )

D coefficient de diffusion ( $\text{m}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ )

c concentration de l'eau ( $\text{g. m}^{-3}$ )

x distance entre la surface de peau et le point de mesure (m)

$\frac{dc}{dx}$  gradient de concentration de l'eau ( $\text{g.m}^{-4}$ )

Des études ont pu montrer qu'une diminution de la PIE reflète une restauration de la fonction barrière, ceci pouvant être due à une amélioration de la cohésion entre les cornéocytes, ou bien même à un effet occlusif au niveau de la surface de la peau (61). A l'inverse, une augmentation de la PIE démontre une altération de la fonction barrière pouvant être liée à la sécheresse cutanée, ou même à une mauvaise cohésion des cellules (62, 63).

Bien qu'elle soit une méthode de référence largement utilisée, la mesure de la PIE peut néanmoins donner des résultats contradictoires en fonction des études menées, et cela peut s'expliquer par une variabilité importante des conditions opératoires. Les techniques les plus utilisées pour mesurer la PIE peuvent être divisées en deux catégories :

- La méthode à chambre ouverte, utilisant un capteur d'humidité relative et de température. Ce capteur étant exposé à l'atmosphère, il est ainsi sensible aux changements d'humidité relative ou aux courants d'air. Ainsi, la variabilité des résultats de PIE peut se révéler importante.
  
- La méthode à chambre fermée, permettant de réduire la variabilité des lectures et d'améliorer la reproductibilité des mesures de la PIE. Cependant, certains appareils peuvent entraîner un effet occlusif au niveau de la peau. Pour lutter contre ce problème à l'intérieur de la chambre de mesure, certains appareils à chambre fermée sont pourvus d'une chambre de condensation (63, 64). C'est le cas de l'Aquaflux AF200 (Biox Systems Ltd, Angleterre) qui a été utilisée dans notre étude.

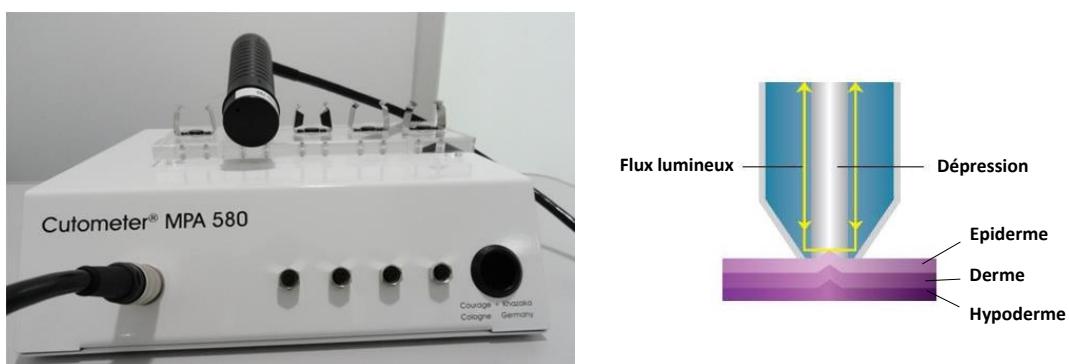


**Figure 30 :** Image photographique de la sonde Aquaflux AF200 (Biox Systems Ltd) (*à gauche*) et schéma de la chambre fermée équipée d'un condensateur (*à droite*).

Comme l'illustre la Figure 30, la présence d'un condensateur permet ainsi de contrôler l'humidité du micro-climat au sein de la chambre de mesure, et cela indépendamment de l'humidité ambiante. De plus, l'eau s'évaporant de la peau est transformée en glace. L'humidité à proximité de la glace, étant plus faible que celle de l'eau, permet de créer un gradient d'humidité. La mesure de ce gradient d'humidité permet ainsi de calculer le flux de diffusion.

### II.2.3. Mesure *in vivo* des propriétés mécaniques de la peau par succion

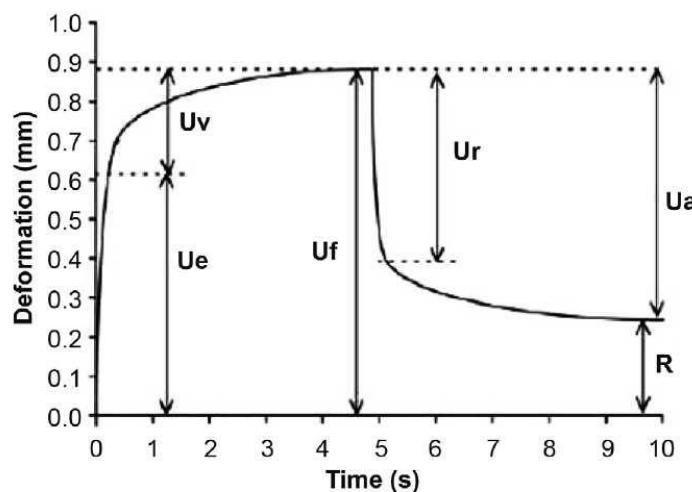
La mesure des propriétés viscoélastiques de la peau est cruciale pour permettre d'avoir une indication de l'âge biologique de la peau. Dans notre étude, nous avons utilisé le Cutomètre® MPA580 (Courage & Khazaka Electronic, Allemagne), illustré en Figure 31.



**Figure 31 :** Image photographique du Cutomètre® MPA580 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Allemagne) (*à gauche*) et schéma de la sonde de mesure (*à droite*).

Ce dispositif permet de mesurer l'élasticité et autres propriétés biomécaniques de la peau à l'aide d'une dépression déformant la peau de façon mécanique : le principe de la mesure est basé sur la succion de la peau. La dépression, relativement constante, est créée par l'appareil afin d'attirer la peau au sein de l'ouverture de la sonde. La sonde de mesure présente une ouverture pouvant varier en fonction du site de la peau mesuré : plus la peau sera épaisse, plus le diamètre d'ouverture de la sonde devra être important. La profondeur de pénétration est déterminée par un système optique à l'intérieur de la sonde. Ce système de mesure sans contact consiste en deux prismes se faisant face l'un l'autre afin de projeter un flux lumineux du transmetteur au récepteur. La résistance de la peau à la dépression (ou fermeté), et sa capacité à retourner à sa forme initiale (ou élasticité) sont représentées sous la forme de courbes en temps réel au cours de la mesure. Ces courbes représentent des cycles alternant succion et relaxation de la peau à intervalles constants. Différents paramètres peuvent être mesurés à partir de ces courbes, comme l'illustre la Figure 32.

Ces paramètres mesurés peuvent être utilisés pour déterminer d'autres paramètres tels que celui de l'élasticité de la peau, le paramètre  $R7$  ( $R7 = U_r/U_f$ ) qui permet de renseigner sur la capacité élastique de la peau. Le Cutomètre® est un appareil reconnu comme une technique standard en cosmétologie, de par sa précision et sa facilité d'utilisation.



**Figure 32 :** Courbe de déformation de la peau obtenue à l'aide du Cutomètre®. Les paramètres mesurés sont  $U_e$  (extensibilité immédiate),  $U_v$  (extensibilité retardée),  $U_f$  (extensibilité maximale de la peau ou fermeté),  $U_r$  (récupération immédiate après relâchement de la peau),  $U_a$  (récupération maximale après relâchement de la peau), et  $R$  (déformation résiduelle à la fin du cycle de mesure) (65).

### **II.3. Application des spectroscopies IR et Raman dans l'étude du vieillissement cutané**

Comme nous venons de le décrire précédemment, les spectroscopies optiques vibrationnelles sont des techniques non-invasives et permettent d'évaluer des changements d'états vibrationnels des molécules. Ces méthodes d'analyse permettent de sonder la composition moléculaire de l'échantillon analysé, et cela sans marquage préalable. De ce fait, cette approche biophotonique a été adoptée pour évaluer l'impact du vieillissement sur les caractéristiques moléculaires et structurales des constituants de la peau à travers une analyse multi-échelle.

Dans les années 80, des études ont pu mettre en évidence par micro-spectroscopie IR des altérations structurales des GAGs dermiques subies au cours du vieillissement chronologique (39, 66). Les résultats obtenus ont pu montrer une désacétylation de l'acide hyaluronique et du dermatane sulfate avec l'âge. Bien que des différences inter-âge aient été trouvées dans ces études, la méthodologie n'en était pas moins fastidieuse. En effet, les GAGs devaient subir de longues étapes d'extraction et de purification avant de pouvoir être analysés par micro-spectroscopie IR. De plus, l'eau possède une forte capacité à absorber le rayonnement IR, ce qui fait de la micro-spectroscopie IR une technique inadaptée pour des analyses *ex vivo* ou *in vivo* de biopsies de peaux.

A l'inverse de la spectroscopie d'absorption IR, la spectroscopie de diffusion Raman constitue une technique de choix pour analyser des échantillons biologiques en milieu aqueux dû à la faible diffusion de l'eau. Ainsi des analyses *ex vivo* peuvent être réalisées afin d'évaluer au mieux les effets du vieillissement sur le derme et le SC. Les effets des vieillissements intrinsèque et extrinsèque ont pu être évalués micro-spectroscopie FT-Raman sur la composition moléculaire de blocs de peaux excisées (67). Alors que des changements mineurs ont été observés dans la conformation des protéines au cours du vieillissement chronologique, de fortes altérations dans la structure des protéines et dans le contenu en eau liée ont été constatées dans des peaux photo-âgées. De plus, des marqueurs spectroscopiques associés à l'hydratation du collagène ont pu être déterminés dans des coupes de peaux d'âges différents (68). Il a été montré que le nombre de molécules d'eau liée dans le derme réticulaire augmentait avec l'âge. Récemment, l'utilisation d'une micro-sonde confocale Raman a permis de montrer des résultats similaires en quantifiant *in vivo* le contenu en eau dans le derme papillaire (69). En parallèle, des travaux portant sur l'impact du vieillissement chronologique sur la fonction barrière de la peau ont pu être également réalisés à l'échelle du

vivant. Il a été montré de subtils changements dans l'organisation latérale des lipides (70) et une augmentation de l'épaisseur du SC (71) avec l'âge.

Ces études illustrent les potentialités des micro-spectroscopies vibrationnelles en caractérisant les altérations moléculaires et structurales de la peau au cours des vieillissements intrinsèque et extrinsèque. Alors que d'importantes modifications spectrales ont pu être décelées dans la peau photo-âgée, ces changements peuvent être très subtils dans une peau naturellement âgée. Aussi a-t-on eu recours à des méthodes statistiques multivariées et des algorithmes de classification pour identifier les informations spectrales d'intérêt.

## **II.4. Analyse des données spectrales**

Les données spectrales acquises contiennent des informations sur la composition biomoléculaire de l'échantillon analysé, mais aussi divers bruits dus à l'instrumentation, aux phénomènes optiques et à la nature intrinsèque de l'échantillon. Des méthodes de pré-traitement sont donc appliquées à ces spectres afin d'en extraire les informations pertinentes et d'en éliminer le bruit. De plus, les différences spectrales existant entre des structures biologiques différentes peuvent être très subtiles. C'est pourquoi des outils mathématiques tels que les algorithmes de classification et les méthodes d'analyses statistiques multivariées doivent donc être mises en œuvre afin de discriminer et d'interpréter les données spectrales obtenues.

### **II.3.1. Pré-traitements**

Afin de pouvoir comparer les données spectrales entre elles, les spectres bruts doivent être prétraités. Ces prétraitements constituent une étape cruciale car ils présentent l'avantage d'augmenter la robustesse des classifications. De plus, les données aberrantes, ou appelées également « outliers », sont supprimées au cours de ces prétraitements. On peut distinguer différentes étapes auxquelles sont soumises les données spectrales brutes :

#### ***II.3.1.1. Elimination des spectres aberrants***

Des tests qualité sont en général réalisés afin de détecter et de supprimer les données aberrantes. Appliqués en amont des étapes de prétraitement, ces tests permettent de

s'affranchir de certaines données peu informatives notamment à cause du bruit parasite. L'exemple de test qualité le plus communément utilisé est le calcul d'un rapport signal sur bruit (S/B ou *SNR* pour *signal-to-noise ratio*). Plus précisément, le test qualité permet de calculer le ratio entre une gamme spectrale informative, et une gamme connue sans contribution de l'échantillon. Ainsi, une valeur minimale de ce ratio permet de ne garder que les informations spectrales présentant les plus fortes intensités.

#### ***II.3.1.2. Lissage***

Ce type de prétraitement est réalisé afin d'éliminer le bruit lié à la mesure des données spectrales. Le lissage doit rester modéré pour ne pas supprimer de l'information en tronquant les raies de vibration les plus fines. Pour réaliser ce type de correction, il existe plusieurs types de filtres dont celui de Savitzky-Golay, largement utilisé en spectroscopie vibrationnelle. A la fois efficace et simple d'utilisation, ce filtre présente l'avantage d'éliminer le bruit tout en préservant les caractéristiques des spectres telles que les extrema et les largeurs de pics. Le principe de ce lissage consiste à faire glisser une fenêtre le long du spectre, et de réaliser une estimation locale par une fonction polynomiale. La valeur de ce polynôme au point central de la fenêtre va constituer la valeur lissée du spectre en ce point. Ce processus est ensuite répété pour chaque point du spectre.

#### ***II.3.1.3. Correction de la ligne de base***

Il est possible d'observer une dérive de la ligne de base causée par des facteurs propres aux instruments ou du fait de la nature intrinsèque de l'échantillon. C'est le cas en spectroscopie d'absorption IR où des effets de diffusion, peuvent donner lieu à une ligne de base. En spectroscopie de diffusion Raman, certains échantillons présentent une fluorescence intrinsèque qui engendre une ligne de base, pouvant même masquer le signal Raman. La correction de cette ligne de base est réalisée dans la majorité des cas par une approximation polynomiale, mais d'autres alternatives existent.

#### ***II.3.1.4. Normalisation***

La normalisation est employée pour ramener les spectres à une échelle d'intensité commune, les rendant ainsi comparables entre eux. Ainsi, ce prétraitement permet de s'affranchir des

variations d'intensités résultant de différences d'épaisseurs de l'échantillon, ou bien même de variations de focalisation. Il existe plusieurs types de normalisation dont la normalisation vectorielle ; cette dernière centre le spectre, puis divise chaque intensité par la racine carrée de la somme du carré de toutes les intensités de façon à ce que cette somme soit égale à 1.

#### ***II.3.1.5. Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC)***

La présence de signaux parasites peut se révéler gênante lors de l'analyse spectrale de l'échantillon. Afin de neutraliser l'influence de ces facteurs, une méthode appelée EMSC (*Extended Multiplicative Signal Correction*) a été développée avec pour première application, le déparaffinage numérique en spectroscopie IR (72, 73, 74). Etant une extension de la méthode MSC (*Multiplicative Signal Correction*) (75), cette technique permet de décomposer les données en une combinaison linéaire de signaux pondérés. Plus précisément, chaque spectre est représenté par la somme d'un spectre représentatif (ou moyen) de l'échantillon, de plusieurs spectres de contaminants, d'une fonction polynomiale (permettant d'estimer la ligne de base), et d'un résidu. Outre la correction des interférences spectrales, cette méthode permet aussi de normaliser les spectres, et d'éliminer les « outliers » (spectres sans intérêt). De ce fait, les spectres des données aberrantes seront modélisés par un faible coefficient par rapport au spectre représentatif et un fort résidu (erreur), et seront ainsi exclus.

#### **II.3.2. Classifications non supervisées des spectres**

La classification multivariée a pour but de classer les données spectrales dans des groupes séparés. Cela est réalisé de telle sorte que les spectres appartenant à la même classe présentent une forte similarité entre eux, et que ceux provenant de classes différentes soient les plus distincts possibles. De manière générale, on représente une classe (ou cluster) par son spectre moyen (ou centroïde), ce qui permet d'étudier les différences spectrales existant entre chaque classe, et donc entre chaque structure biologique (76). Les résultats sont représentés visuellement par l'attribution d'une couleur à chaque classe, créant ainsi des images dites pseudo-couleur. Nous présenterons par la suite différentes méthodes de classification non supervisées qui ont été utilisées au cours de nos études.

### ***II.3.2.1. Analyse hiérarchique ascendante (HCA)***

La méthode HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) consiste en un regroupement séquentiel des données spectrales en classe selon leur ressemblance statistique. L’HCA procède tout d’abord au calcul de la distance spectrale entre tous les spectres pris deux à deux. Les deux spectres les plus proches (ayant donc une forte similarité) sont fusionnés dans une nouvelle classe à l’aide d’une méthode de regroupement. Ce processus de regroupement continue jusqu’à ce que tous les spectres soient regroupés dans une seule classe. Dans notre cas, nous avons utilisé la distance euclidienne comme distance inter-spectrale, et l’algorithme de Ward (77) comme méthode de regroupement des spectres. Le résultat de l’HCA est typiquement représenté sous la forme d’un arbre hiérarchique (ou dendrogramme) sur lequel est représenté le regroupement successif des spectres en clusters (sous forme de branches) en fonction du degré de similarité. Cependant, le temps de calcul de la distance inter-spectrale reste l’inconvénient majeur de cette méthode, limitant ainsi le traitement des données spectrales en grande quantité.

### ***II.3.2.2. K-means***

Cette technique de classification non supervisée (78) permet le regroupement automatique des  $N$  spectres en  $K$  classes (fixé par l’opérateur) sur un critère de distance minimale entre chaque spectre et le centroïde le plus proche. Dans notre cas, la distance euclidienne a été utilisée. La technique K-means est un processus en trois étapes :

- Tout d’abord, l’algorithme débute par une initialisation aléatoire des centroïdes des classes. Ainsi,  $K$  spectres sont choisis aléatoirement pour modéliser les  $K$  centroïdes.
- Par la suite, les distances euclidiennes entre le premier spectre et les  $K$  centroïdes sont calculées. Le premier spectre est attribué à la classe dont le centroïde lui est le plus proche. Cette opération est ensuite répétée pour chacun des  $N-1$  spectres acquis restants, ce qui permet ainsi d’affecter une classe à chaque spectre.
- Enfin, le centroïde de la première classe est recalculé comme la moyenne de tous les spectres affectés à la première classe. Ce processus est ainsi répété pour les  $C-1$  centroïdes restants.

L'algorithme réitère les deuxième et troisième étapes, tant que plus aucun spectre ne change d'affectation de classe, ou jusqu'à un nombre prédéfini d'itérations (habituellement, ce nombre est fixé à  $10^5$ ). Ainsi, la classification K-means a pour but de minimiser la somme intra-classe des distances entre les spectres d'une classe et son centroïde. Cette méthode de classification non supervisée constitue un bien meilleur choix par rapport à la technique HCA, du fait que le temps de calcul nécessaire est relativement court, acceptant les jeux de données de grande taille (76, 79, 80, 81, 82). Cependant, la méthode K-means présente certains inconvénients : les résultats de classification dépendent fortement de l'initialisation aléatoire des centres de classe. De plus, l'opérateur doit fixer lui-même un nombre de classes introduisant une certaine subjectivité dans l'analyse. Enfin, l'attribution des pixels des images hyperspectrales ne présente aucune nuance : cela peut se révéler problématique pour des pixels localisés par exemple à l'interface de structures tissulaires. Ainsi considère-t-on la classification K-means comme une classification « dure » (83), du fait que la probabilité d'appartenance d'un spectre à une classe ne peut être que 0 ou 1.

#### ***II.3.2.3. Fuzzy C-means (FCM)***

A la différence des méthodes de classification dites « dures » qui affectent chaque spectre d'un jeu de données à une classe unique, la classification Fuzzy C-means (ou FCM) dite « floue » permet d'associer chaque spectre à toutes les classes selon des degrés d'appartenance spécifiques. Ce type d'association est basé sur la distance, également appelé fonction d'appartenance (84), entre un spectre et tous les centroïdes (ou centres de classe).

Le premier algorithme de classification floue a été développé par Dunn (85), puis a été amélioré par Bezdek (86) qui y a incorporé le paramètre de flou  $m$  ( $1 < m < \infty$ ). Le but de la classification FCM est de minimiser la fonction objectif suivante :

$$J(U, K) = \sum_{l=1}^N \sum_{i=1}^K (u_{i,l})^m \|x_l - v_i\|^2 \quad (\text{Eq.8.})$$

Avec : U matrice des degrés d'appartenance

K nombre de classes (fixé par l'opérateur)

N nombre de spectres

$u_{i,l}$  degré d'appartenance du spectre  $x_l$  ( $\forall l = 1, 2, \dots, N$ ) au centre de classe  $v_i$  ( $\forall i = 1, 2, \dots, K$ )

$\|\cdot\|$  distance euclidienne entre le spectre  $x_l$  et le centre de classe  $v_i$

Les degrés d'appartenance  $u_{i,l}$  doivent satisfaire les deux règles suivantes :

- $u_{i,l} \in [0,1], \forall i = 1, 2, \dots, K \text{ et } \forall l = 1, 2, \dots, N$  (Eq.9.)

- $\sum_{l=1}^N u_{i,l} = 1$  (Eq.10.)

Pour minimiser la fonction objectif (Eq.8.), Bezdek a proposé un algorithme itératif et convergent, décrit par les étapes suivantes :

1. Détermination du nombre de classes  $K$  par l'opérateur ( $2 \leq K \leq N$ ).
2. Initialisation des degrés d'appartenance  $u_{i,j}$  avec des valeurs aléatoires, tels qu'ils respectent les deux conditions (Eq.9.) et (Eq.10.).
3. Calcul des centres de classes  $v_j$ , en utilisant la relation suivante :

$$v_i = \frac{\sum_{l=1}^N (u_{i,l})^m \cdot x_l}{\sum_{l=1}^N (u_{i,l})^m} \quad \forall i = 1, 2, \dots, K \quad (\text{Eq.11.})$$

4. Mise à jour des degrés d'appartenance selon la formule suivante :

$$u_{i,l} = \frac{1}{\sum_{j=1}^K \left( \frac{d_{i,l}}{d_{j,l}} \right)^{\frac{2}{m-1}}} \quad \forall i = 1, 2, \dots, K \text{ et } \forall l = 1, 2, \dots, N \quad (\text{Eq.12.})$$

Avec :  $d_{i,l}$  distance euclidienne entre l'objet  $x_l$  et le centre de classe  $v_i$  ( $\|x_l - v_i\|^2$ )

$d_{j,l}$  distance euclidienne entre l'objet  $x_l$  et le centre de classe  $v_j$  ( $\|x_l - v_j\|^2$ )

5. Calcul de la fonction objectif  $J$  (selon Eq. 8.).
6. Répétition des étapes 3 à 5, jusqu'à ce qu'un des critères d'arrêt soit atteint.

Le premier critère d'arrêt consiste à comparer les valeurs de la fonction objectif  $J$  obtenues après chaque itération. Si la différence de deux valeurs consécutives est inférieure à un seuil prédéfini, alors la classification est considérée comme convergente. Cependant, il se peut que ce critère d'arrêt soit difficilement atteint en raison d'un temps de calcul relativement long.

C'est pourquoi il est possible d'utiliser, bien que rarement, le second critère d'arrêt consistant à imposer un nombre d'itérations limité.

D'une manière globale, l'algorithme FCM se présente comme une méthode de classification idéale, tant par sa rapidité d'exécution que par la simplicité des calculs mathématiques effectués. Contrairement aux classifications « dures », la classification floue permet de mettre en évidence une hétérogénéité intra- et inter-classes, ayant pour conséquence de rendre l'imagerie spectrale beaucoup plus informative. Il est ainsi possible pour des objets à la frontière entre deux classes d'être individualisés et que des zones de transition ou de chevauchement entre ces classes puissent apparaître. Cependant, l'algorithme présente l'inconvénient du choix empirique des paramètres  $K$  (nombre de classes) et  $m$  (paramètre de flou). En effet, à l'instar des classifications HCA et K-means, il y a nécessité de choisir le nombre de classes  $K$  par l'opérateur. Il en est également de même pour le paramètre de flou  $m$  (*cf.* Eq.8.) : ce paramètre influe sur le degré de flou, *i.e.* le degré d'appartenance de chaque spectre de l'ensemble aux classes. Avec  $m = 1$ , la classification FCM donne des résultats comparables à ceux obtenus par la classification K-means. Lorsque  $m$  augmente, les degrés d'appartenance aux classes deviennent de plus en plus flous, jusqu'à ce que chaque spectre obtienne des degrés d'appartenance uniformément répartis entre toutes les classes ( $m$  tendant vers  $\infty$ ) ; avec pour conséquence de donner lieu à des classes redondantes. Ainsi, il est crucial de choisir de façon optimale le nombre de classes  $K$  et le degré de flou  $m$  afin de pouvoir exploiter efficacement l'information contenue dans les images spectrales.

C'est dans cette optique qu'a été développé, au sein de notre laboratoire, un nouvel algorithme nommé RBA (*Redundancy-Based Algorithm*) qui a été appliqué pour la première fois sur des données d'imagerie spectrale infrarouge de cancers cutanés (87). Cet algorithme innovant permet d'estimer automatiquement les paramètres optimaux de la classification FCM : le nombre de classes  $K_{opt}$ , et le paramètre de flou  $m_{opt}$ . Ainsi, l'algorithme ne donne pas de classes redondantes. Dans le cas où le nombre de classes  $K$  est inférieur à  $K_{opt}$ , une même classe peut regrouper des structures histologiques différentes. A l'inverse, si le nombre de classes  $K$  est supérieur à  $K_{opt}$ , des classes redondantes représentant la même information biologique apparaissent.

Pour éviter l'obtention de classes redondantes, un coefficient d'intercorrélation  $\mathbf{R}_{ij}$  est calculé, pour les deux classes  $i$  et  $j$ , par la formule suivante:

$$\mathbf{R}_{ij} (K, m) = \frac{\mathbf{C}(i,j)}{\sqrt{\mathbf{C}(i,i)\mathbf{C}(j,j)}} \quad (\text{Eq. 13.})$$

Avec:  $\mathbf{C}(i,j)$  covariance entre les degrés d'appartenance de classes  $i$  et  $j$

$\mathbf{C}(i,i)$  variance entre les degrés d'appartenance de classe  $i$

$\mathbf{C}(j,j)$  variance entre les degrés d'appartenance de classe  $j$

La covariance et les variances sont calculées par les relations suivantes :

$$\mathbf{C}(i,j) = \frac{1}{N-1} \sum_{l=1}^N (u_{i,l} - \bar{u}_i)(u_{j,l} - \bar{u}_j)$$

$$\mathbf{C}(i,i) = \frac{1}{N-1} \sum_{l=1}^N (u_{i,l} - \bar{u}_i)^2$$

$$\mathbf{C}(j,j) = \frac{1}{N-1} \sum_{l=1}^N (u_{j,l} - \bar{u}_j)^2$$

Avec :  $\bar{u}_i$  valeur moyenne des degrés d'appartenance de classe  $i$  : ( $\bar{u}_i = \frac{1}{N} \sum_{l=1}^N u_{i,l}$ )

$\bar{u}_j$  valeur moyenne des degrés d'appartenance de classe  $j$  : ( $\bar{u}_j = \frac{1}{N} \sum_{l=1}^N u_{j,l}$ )

L'algorithme RBA est composé de trois étapes :

- La première étape de ce processus comprend trois boucles imbriquées afin de réduire le nombre de classes pour  $N$  valeurs différentes du paramètre de flou  $m$  (uniformément réparties autour de la valeur par défaut  $m = 2$  et composant l'ensemble  $\mathbf{m} = \{m_1, \dots, m_n, \dots, m_N\}$ ) et pour  $P$  valeurs différentes du seuil de coefficient de corrélation  $s$  (uniformément réparties dans la gamme élevée des coefficients de corrélation entre 50 et 95% et formant l'ensemble  $\mathbf{s} = \{s_1, \dots, s_l, \dots, s_P\}$ ). De plus, un nombre maximal de classes  $K_{max}$  sera fixé par l'opérateur lors de l'initialisation de l'algorithme.
- Puis, la seconde étape de l'algorithme réalise une estimation de la valeur optimale du nombre de classes  $\hat{K}_{opt}$  par rapport aux différents seuils  $s$ .
- Et enfin, la dernière étape consiste à estimer le paramètre de flou optimal  $\hat{m}_{opt}$  pour le nombre de classes obtenu précédemment.

Ainsi, la classification FCM, exécutée à l'aide des paramètres optimisés par l'algorithme RBA, a été définie sous le nom de classification RBA-FCM.

### **II.3.3. Analyses statistiques multivariées**

Les méthodes d'analyses statistiques multivariées utilisent la relation entre les variables pour exprimer de façon quantitative ou qualitative des résultats. Cette démarche peut se réaliser au sein même d'un spectre, en observant un nombre d'onde par rapport à un autre, ou bien même entre différents spectres, en observant le même nombre d'onde mais dans des échantillons différents. De plus, en analysant un ensemble de données spectrales, des motifs répétés (ou patterns) peuvent être isolés et corrélés entre eux lorsque ceux-ci apparaissent dans de nombreux spectres. Ainsi, ces techniques d'analyse permettent de synthétiser et de visualiser en un temps très court une grande quantité d'informations.

#### ***II.3.3.1. Sélection de variables sur les données spectrales par Randfeatures***

La fonction *Randfeatures* permet l'identification des variables (dans notre cas, les nombres d'ondes) les plus discriminants entre deux groupes de données. Elle procède de la manière suivante :

- Un sous-ensemble de  $p$  variables est tout d'abord choisi aléatoirement ( $p \in [1, 2, \dots, D]$ ).
- La dimension des  $N$  objets (ici, tous les nombres d'onde d'un spectre) est réduite à ces  $p$  variables précédemment sélectionnées.
- Un algorithme de classification linéaire et supervisée (type LDA pour *Linear Discriminant Analysis*) est par la suite appliqué.
- Après avoir classé, chaque spectre présentera une valeur d'appartenance à chacune des 2 classes. Un spectre sera considéré comme bien classé si sa plus grande valeur d'appartenance est attribuée à la bonne classe, et si cette valeur est supérieure au seuil de confiance (*ConfidenceThreshold*) fixé par l'opérateur.
- Le sous-ensemble des  $p$  variables aléatoirement sélectionnées est considéré comme efficace pour faire la distinction entre différents groupes de spectres si la proportion de spectres bien classés est supérieure à la valeur du seuil de performance (*PerformanceThreshold*), également fixé par l'opérateur. Ainsi, un score est attribué pour chacune des  $p$  variables.

Ce processus est ainsi répété jusqu'à ce qu'un nombre minimum de tirages (*PoolSize*), fixé par l'utilisateur, soit atteint. Il est important que le nombre de tirages soit suffisamment grand pour permettre à une variable d'être choisie plusieurs fois. A la fin de ce processus itératif, les variables sont classées selon leur score : plus haut sera le score, plus pertinente sera la variable.

#### ***II.3.3.2. Analyse en composantes principales (ACP)***

Cette méthode mathématique a pour but de réduire le nombre de variables d'un ensemble complexe de données en une somme de données simplifiées, appelées composantes principales. Ces composantes principales comprennent ainsi moins de variables et conservent la plus grande partie de la variance de l'échantillon initial. L'ACP va projeter un ensemble de spectres dans un repère multidimensionnel avec autant de dimensions que de fréquences : un nuage de points va donc être obtenu. Par la suite, un changement de repère va être effectué par l'algorithme et une nouvelle origine sera placée au centre du nuage de points. La plus grande variabilité du nuage de points va définir la première composante principale, représentant le premier axe du repère. Il en va de même pour la seconde composante principale qui représente le second axe du repère, perpendiculaire au premier, et qui comporte la seconde plus grande variance du nuage de points. Ainsi, autant de composantes principales que de dimensions peuvent être extraites ; cependant, seules les premières composantes principales contiennent la plus grande part de l'information et les dernières ne représentent en général que le bruit. Ainsi, en plus de simplifier la représentation, la modélisation et l'interprétation des données spectrales, l'ACP permet aussi de supprimer une certaine redondance de l'information et le bruit contenu dans le signal spectral. En pratique, on utilise deux composantes principales afin de visualiser les spectres sous la forme d'un nuage de points dans un espace bidimensionnel. Des groupes peuvent être définis au sein de la carte factorielle (ou « score plots ») en observant quels sont les spectres les plus proches (donc les plus similaires). Il est ainsi donc possible de discriminer différentes classes au sein d'un ensemble de spectres.

### **II.3.3.3. Régression par moindres carrés partiels (PLS)**

Bien que l'ACP permette d'explorer et de visualiser une matrice de données dite «  $X$  », la principale limite de cette technique est que la décomposition de ces données d'entrée  $X$  n'est basée seulement que sur l'explication de la variance. En effet, les composantes principales sélectionnées seront celles qui expliqueront le plus la variance spectrale, mais pas nécessairement celles qui expliqueront l'information la plus utile dans la modélisation des changements de concentration d'une biomolécule donnée. Pour pallier à cette limitation, la méthode de régression des moindres carrés partiels (ou *PLS* pour *Partial Least Squares*) apparaît intéressante en corrélant l'information d'une matrice de données  $X$  (ou variables explicatives) à une autre information provenant d'une autre matrice de données dite «  $Y$  » (ou appelée données de sortie ou variables réponses). A l'origine, la PLS a été développée en chimie analytique par Herman Wold vers la fin des années 60. Elle a connu de nombreuses évolutions jusqu'à atteindre sa forme actuelle vers les années 80 (88, 89). Cette technique a pu être appliquée dans de nombreuses études en spectroscopie vibrationnelle pour diverses applications telles que la quantification de caroténoïdes dans les tomates (90), l'identification des champignons filamenteux (91, 92), ou bien même l'efficacité de médicaments anti-cancéreux (93).

Le principe de cette méthode d'analyse statistique multivariée consiste à construire un modèle de régression linéaire pour expliquer une ou plusieurs observations  $Y$  en fonction d'un jeu de données  $X$ . Dans notre étude sur la peau, les variables explicatives correspondent aux spectres Raman et les variables réponses correspondent aux mesures biométriques.

Le modèle PLS est développé à partir d'un jeu d'entraînement de  $N$  observations avec des X-variables dénotées par  $\mathbf{x}_k$  ( $k = 1, \dots, K$ ), et des Y-variables dénotées par  $\mathbf{y}_m$  ( $m = 1, \dots, M$ ). Ces jeux d'entraînements forment les deux matrices  $X$  et  $Y$  aux dimensions respectives ( $N*K$ ) et ( $N*M$ ). De manière générale, la méthode PLS maximise la covariance entre  $X$  et  $Y$  en décomposant la matrice  $X$  en variables dites latentes (ou *LVs* pour *Latent Variables*). Ces LVs sont également appelées X-scores et sont indiquées par  $t_a$  ( $a = 1, 2, \dots, A$ ). Les X-scores sont estimés comme des combinaisons linéaires des variables d'origine  $x_k$  avec leurs poids  $w_{ka}$ .

Les formules sont montrées ci-dessous à la fois sous forme d'éléments et sous forme de matrice (cette dernière étant montrée entre parenthèses).

$$t_{ia} = \sum_k w_{ka} x_{ik} \quad (\mathbf{T} = \mathbf{X} \cdot \mathbf{W}') \quad (\text{Eq.14.})$$

Les X-scores modélisent  $X$  et permettent la prédition de  $Y$ , comme l'indiquent les équations ci-dessous :

$$x_{ik} = \sum_a t_{ia} p_{ak} + e_{ik} \quad (\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}' + \mathbf{E}) \quad (\text{Eq.15.})$$

$$y_{im} = \sum_a c_{ma} t_{ia} + f_{im} \quad (\mathbf{Y} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{C}' + \mathbf{F}) \quad (\text{Eq.16.})$$

Avec :  $p_{ak}$  poids (ou « loadings) de  $X$

$e_{ik}$  résidus de  $X$

$c_{ma}$  poids de  $Y$

$f_{im}$  résidus de  $Y$

Aussi, il est possible, grâce à l'Eq. 14, d'écrire l'Eq. 16. d'une autre manière :

$$y_{im} = \sum_a c_{ma} \sum_k w_{ka} x_{ik} + f_{im} = \sum_a b_{mk} x_{ik} + f_{im} \quad (\mathbf{Y} = \mathbf{X} \cdot \mathbf{W}' \cdot \mathbf{C}' + \mathbf{F} = \mathbf{X} \cdot \mathbf{B} + \mathbf{F}) \quad (\text{Eq.17.})$$

Comme l'indique la formule ci-dessus, les coefficients de régression  $b_{mk}$  (ou  $\mathbf{B}$  pour la matrice des coefficients de régression) peuvent être écrit comme suit :

$$b_{mk} = \sum_a c_{ma} w_{ka} \quad (\mathbf{B} = \mathbf{W}' \cdot \mathbf{C}') \quad (\text{Eq.18.})$$

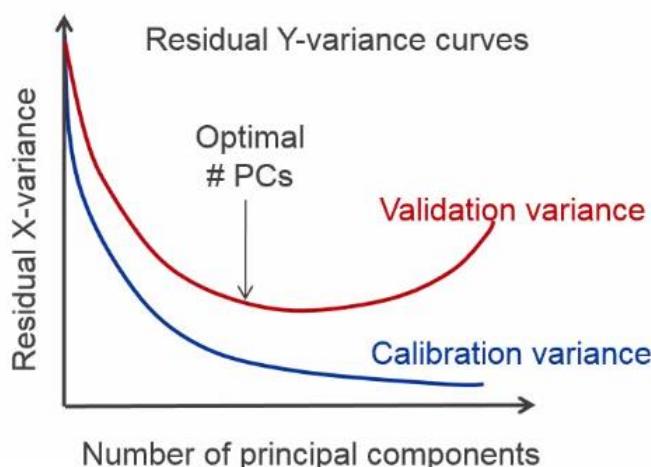
Après que les 1<sup>ers</sup> scores et les 1<sup>ers</sup> poids aient été calculés pour la 1<sup>ère</sup> LV, les matrices des résidus  $E_1$  et  $F_1$  (provenant des matrices  $X$  et  $Y$ , respectivement) sont également calculées :

$$E_1 = X - t_1 \cdot p_1 \quad (\text{Eq.19.})$$

$$F_1 = Y - t_1 \cdot c_1 \quad (\text{Eq.20.})$$

Par la suite, les 2<sup>nd</sup>s poids et les 2<sup>nd</sup>s scores sont calculés en remplaçant simplement  $X$  et  $Y$  par  $E_I$  et  $F_I$ . La procédure est ainsi répétée jusqu'à ce que le nombre maximum de LVs soit atteint.

Avant d'être utilisé pour la compréhension et la prédiction de nouvelles données, le modèle de régression doit passer par une étape de validation : la plus commune étant la validation croisée « leave-one-out » (94). Cette technique a été utilisée pour tester la signification prédictive des modèles de régression. De manière générale, tous les spectres du jeu de données  $X$  servent à la fois à la calibration et à la validation des modèles de régression. L'avantage de cette méthode repose sur sa capacité à déterminer le nombre optimal de variables à utiliser. Etant un facteur primordial dans la construction d'un modèle de prédiction précis, le nombre optimal de LVs correspond à celui donnant un minimum d'écart entre les variables  $X$  et  $Y$  (Figure 33).



**Figure 33 :** Choix du nombre de variables latentes (LVs) utilisé par la méthode de validation croisée. Lorsque le nombre de LVs augmente, la variance résiduelle de validation de  $X$  diminue jusqu'à atteindre le nombre optimal de LVs. Ensuite, la variation résiduelle de validation augmente à cause de la sur-information (ou « *overfitting* »).

Lorsque le nombre de LVs sélectionné est trop faible, toute l'information de la matrice  $X$  nécessaire pour prédire les variables  $Y$  n'est pas prise en compte : on parle alors de sous-information (ou « *underfitting* »). Dans le cas contraire, lorsque le nombre de dimensions choisi est trop élevé, de l'information non explicative et contenant du bruit risque d'être prise en compte dans le calcul des valeurs à expliquer. On parle dans ce cas de sur-information (ou

« *overfitting* »). Afin d'éviter ces phénomènes, un nombre de 200 itérations a été fixé pour la validation croisée. Par la suite, les résultats de validation sont moyennés. Pour estimer la précision des modèles PLS, l'erreur quadratique moyenne de validation croisée (ou *RMSECV* pour *Root Mean Square Error of Cross-Validation*) est utilisée.

#### **II.3.3.4. Corrélation bidimensionnelle (2D)**

Le concept de base de l'analyse de corrélation 2D a été développé initialement pour la résonnance magnétique nucléaire (ou *NMR* pour *Nuclear Magnetic Resonance*). L'application de cette technique d'analyse a été introduite par la suite par Isao Noda dans le domaine de la spectroscopie vibrationnelle (95). Suite aux nombreux développements de cette méthode (96, 97, 98, 99, 100, 101, 102) et son utilisation de plus en plus fréquente en spectroscopie vibrationnelle (103, 104), la spectroscopie de corrélation 2D permet de visualiser la relation entre les changements d'intensités dans des spectres en réponse à une perturbation externe. Cette technique d'analyse est plus couramment utilisée sur un spectre dynamique  $\tilde{y}(v, t)$ , qui est défini pour chaque valeur de la variable de perturbation  $t$  sur son intervalle entre  $T_{min}$  et  $T_{max}$ :

$$\tilde{y}(v, t) = \begin{cases} y(v, t) - \bar{y}(v) & \text{si } T_{min} \leq t \leq T_{max} \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \quad (\text{Eq.21.})$$

Avec :  $\tilde{y}(v, t)$  spectre dynamique du système affecté par la perturbation

$\bar{y}(v)$  spectre de référence

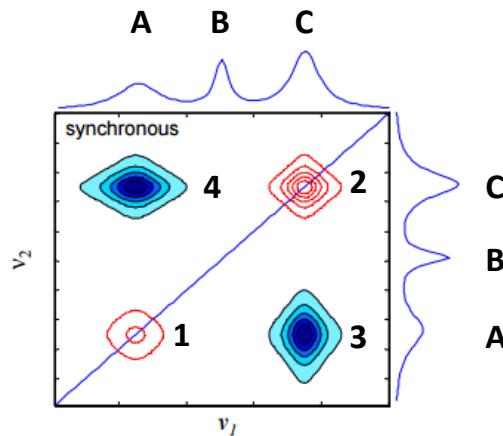
Pour un ensemble de  $m$  spectres collectés au cours de l'intervalle  $[T_{min} - T_{max}]$ , l'intensité de corrélation 2D synchrone entre deux fréquences  $v_1$  et  $v_2$  est donnée par l'équation suivante :

$$\Phi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \tilde{y}_j(v_1) \cdot \tilde{y}_j(v_2) \quad (\text{Eq.22.})$$

$$\tilde{y}_j(v_i) = \tilde{y}_j(v_i, t_j) \quad i = 1, 2 \quad (\text{Eq.23.})$$

Avec :  $\tilde{y}_j(v_i)$  intensité spectrale à un point de la variable  $t$

L'intensité d'un spectre de corrélation 2D synchrone  $\Phi(v_1, v_2)$  représente les changements simultanés des variations d'intensité spectrales mesurées à  $v_1$  et  $v_2$  au cours de l'intervalle de mesure. La figure 34 montre un exemple d'un spectre de corrélation 2D synchrone schématisé sous la forme de carte. Un spectre synchrone est un spectre symétrique par rapport à une ligne diagonale réalisée sur la carte et correspondant à  $v_1 = v_2$ ; les pics de corrélation sont à des positions à la fois sur et en dehors de cette ligne diagonale.



**Figure 34 :** Exemple d'une carte de corrélation 2D synchrone. Ici, les contours des pics de corrélation en rouge (#1 et #2) sont positifs, alors que ceux en bleu (#3 et #4) sont négatifs. Un exemple de spectre présentant trois bandes spectrales (A, B et C) est présenté de chaque côté de la carte. Les autopics #1 et #2 en rouge, localisés sur la diagonale, sont uniquement visibles sur les positions des bandes A et C. Les pics croisés #3 et #4 en bleu, localisés en dehors de la diagonale, indiquent que l'intensité spectrale de la bande A diminuera alors que celle de la bande C augmentera en réponse à une perturbation externe (105).

Les pics localisés à des positions sur la diagonale présente une intensité correspondant à la fonction d'autocorrélation des variations d'intensités spectrales observées au cours de l'intervalle entre  $T_{min}$  et  $T_{max}$ : ces pics sont appelés autopics (ou « *autopeaks* »). Un autopic, dont le signe est toujours positif, représente l'amplitude globale de la variation de l'intensité spectrale observée à une variable spectrale  $v$  spécifique. Ainsi, une région spectrale présentera de forts autopics dans le cas d'importants changements d'intensité sous une perturbation donnée. A l'inverse, les régions spectrales présenteront peu ou pas d'autopics s'il n'y a aucune variation d'intensité spectrale.

Les pics de corrélation localisés à des positions en dehors de la diagonale sont appelés pics croisés (ou « *crosspeaks* »), dont le signe peut être soit positif, soit négatif. Le signe devient positif si les intensités spectrales aux variables spectrales  $v_1$  et  $v_2$  augmentent ou diminuent

simultanément en fonction de la variable externe  $t$ . A l'inverse, un pic croisé synchrone de signe négatif indique que l'une des intensités spectrales augmente alors que l'autre diminue. En résumé, les signes positifs et négatifs des pics croisés synchrones montrent que les changements dans les intensités spectrales à  $v_1$  et  $v_2$  se produisent, respectivement, dans des directions identiques et opposées en réponse à la perturbation externe.

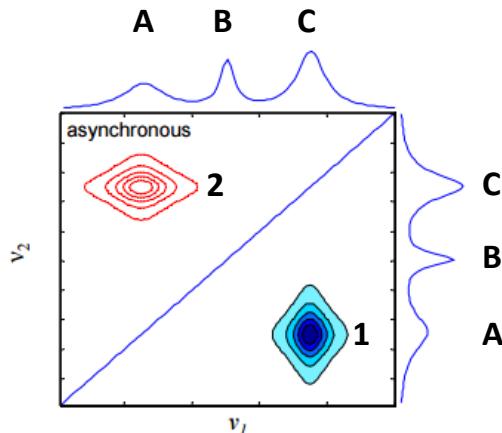
Suite à des perturbations, des changements d'intensités au niveau des variables spectrales  $v_1$  et  $v_2$  peuvent tendre à retarder (« *lag* »), ou à l'inverse accélérer (« *lead* ») une variable par rapport à l'autre. Cela se produit lorsque, par exemple, la formation d'une espèce moléculaire donnée est nécessaire pour une réaction particulière se produise. Par conséquent, la caractérisation de corrélation 2D dite « *asynchrone* » peut se révéler très utile pour identifier les changements spectraux se déroulant de façon séquentielle. L'intensité de tels changements entre deux fréquences  $v_1$  et  $v_2$  est calculée par la formule suivante :

$$\Psi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \tilde{y}_j(v_1) \cdot \sum_{k=1}^m N_{jk} \cdot \tilde{y}_k(v_2) \quad (\text{Eq.24.})$$

Avec:  $N_{jk}$  j-ième ligne et k-ième colonne de la matrice de transformation d'Hilbert-Noda (95)

$$N_{jk} = \begin{cases} 0 & \text{si } j = k \\ \frac{1}{\pi(k-j)} & \text{sinon} \end{cases} \quad (\text{Eq.25.})$$

La figure 35 illustre un exemple de spectre de corrélation 2D asynchrone  $\Psi(v_1, v_2)$ . Contrairement à la carte synchrone, une carte asynchrone est antisymétrique par rapport à la ligne diagonale et ne présente aucun autopic : seul des pics croisés sont localisés en dehors de la ligne diagonale. Un pic croisé asynchrone est formé seulement si les intensités de deux caractéristiques spectrales changent de phase l'un l'autre, *i.e.* si une des deux caractéristiques spectrales est retardée (« *lag* ») ou accélérée (« *lead* ») par rapport à l'autre. Tout comme pour la carte de corrélation 2D synchrone, les signes des pics croisés asynchrones peuvent être soit positifs, soit négatifs. Plus exactement, le signe d'un pic croisé asynchrone devient positif si le changement d'intensité à  $v_1$  se produit avant celui de  $v_2$  ( $v_1$  « *leads* »  $v_2$ ), et cela dans l'ordre séquentiel de la perturbation externe  $t$ .



**Figure 35 :** Exemple d'une carte de corrélation 2D asynchrone. Ici, les contours des pics de corrélation en bleu (#1) est négatif, alors que celui en rouge (#2) est positif. Un exemple de spectre présentant trois bandes spectrales (A, B et C) est présenté de chaque côté de la carte. Le pic croisé #1 en bleu indique que le changement de l'intensité spectrale de la bande A se produira après celui de la bande C (A « lags » C) (105).

A l'inverse, si le signe du pic croisé asynchrone devient négatif, ce changement se produira après celui de  $v_2$  ( $v_1 \ll lags \gg v_2$ ). Cependant, cette règle, établie par Isao Noda (95), est inversée en présence de pics croisés synchrones de signes négatifs [ $\Phi(v_1, v_2) < 0$ ].

$\Phi(v_1, v_2)$	$\Psi(v_1, v_2)$	Interprétation
+	+	$v_1 \ll leads \gg v_2$
+	-	$v_1 \ll lags \gg v_2$
-	-	$v_1 \ll leads \gg v_2$
-	+	$v_1 \ll lags \gg v_2$

**Tableau 2 :** Règles d'Isao Noda pour l'ordre séquentiel des variables spectrales ( $v_1 > v_2$ ). Le terme « leads » signifie que le changement d'intensité de la bande spectrale à  $v_1$  se produit avant celui de  $v_2$ . Le terme « lags » signifie que le changement d'intensité de la bande spectrale à  $v_1$  se produit après celui de  $v_2$ .

Comme le résume le tableau ci-dessus, si les signes des pics croisés synchrones et asynchrones sont identiques, le changement d'intensité à  $v_1$  se produira avant celui de  $v_2$  ( $v_1 \ll leads \gg v_2$ ) ; à l'inverse, si les signes des pics croisés synchrones et asynchrones sont différents, ce changement se produira après celui de  $v_2$  ( $v_1 \ll lags \gg v_2$ ).

**CHAPITRE III :**

**EVALUATION *EX VIVO* DES ALTERATIONS  
STRUCTURALES DU RESEAU DE COLLAGENE  
ET DE LEUR RELATION AVEC LES INTERACTIONS  
COLLAGENE/EAU AU COURS DU VIEILLISSEMENT  
CUTANE PAR MICRO-SPECTROSCOPIES  
VIBRATIONNELLES**

### **III. 1. Préambule du chapitre III**

Ce chapitre comprend les résultats obtenus dans l'étude des modifications structurales du réseau de collagène de type I au cours du vieillissement chronologique de la peau au moyen de technique de spectroscopie vibrationnelle. Il se présente sous la forme de trois articles scientifiques et d'une étude complémentaire dans lesquels les résultats sont discutés.

L'**article #1** porte sur la mise en œuvre de la micro-imagerie IR en mode polarisé comme méthodologie pour la caractérisation structurale du réseau de collagène de type I dans la peau. Le potentiel de cette méthode constitue une bonne approche pour évaluer les différentes orientations des fibres de collagène dans des coupes de peaux humaines.

L'**article #2** présente une analyse de coupes de peaux d'âges différents par micro-imagerie IR en mode polarisé. En se basant sur la méthodologie présentée dans l'article #1, des modifications structurales du réseau de collagène de type I au cours du vieillissement ont pu ainsi être mises en évidence.

L'**article #3** expose les résultats portant sur les interactions entre le collagène de type I et les molécules d'eau, ainsi que leur relation avec les modifications structurales du réseau de collagène au cours du vieillissement. En combinaison à la micro-imagerie IR en mode polarisé, une approche basée sur la substitution des molécules d'eau liée au collagène ( $H_2O$ ) par des molécules d'eau deutérée ( $D_2O$ ) a été adoptée.

L'**étude complémentaire** présente des résultats préliminaires sur l'impact du vieillissement cutané sur les interactions collagène/eau par gravimétrie et micro-spectroscopie Raman. Contrairement aux études présentées dans les articles précédents, des blocs de dermes d'âges différents ont été analysés afin d'évaluer la teneur en eau liée au collagène et son évolution avec l'âge.

**III. 2. Article #1**

**Interest of polarized FT-IR imaging to characterize  
the collagen network in human skin**

*Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 3 (2014), pp. 281-286

- Préambule à l'article #1

## **Contexte et objectif de l'étude**

La peau constitue l'un des plus grands organes du corps humain et présente de nombreuses fonctions importantes pour l'organisme, telles que la protection contre les contraintes mécaniques. La capacité de la peau à pouvoir résister à de telles agressions repose sur la composition moléculaire de la couche dermique, riche en collagène de type I. En effet, l'organisation en réseau du collagène de type I va contribuer fortement à la souplesse de la peau. Des techniques telles que la microscopie à lumière polarisée (PLM) peuvent être utilisées pour caractériser la structure du collagène de type I dans la peau, mais ne peuvent cependant pas apporter d'informations moléculaires. Dans cette optique, nous avons évalué le potentiel de la micro-imagerie IR-TF (Infrarouge à Transformée de Fourier) en mode polarisé afin d'évaluer la composition moléculaire de la peau tout en accédant à des informations structurales sur l'orientation des fibres de collagène.

## **Matériels et Méthodes**

Des coupes fines ont été réalisées à partir d'un échantillon de peau humaine. Par la suite, des images spectrales de  $300 \times 700 \mu\text{m}^2$  ont été acquises en mode conventionnel (radiation IR non-polarisée) et en mode polarisé (radiation IR polarisée perpendiculairement à la surface de la peau). Les images spectrales IR ont été reconstruites à partir du ratio des aires intégrées des bandes Amide I ( $1590-1720 \text{ cm}^{-1}$ ) / Amide II ( $1480-1590 \text{ cm}^{-1}$ ). Enfin, des classifications K-means et FCM (Fuzzy C-Means) ont été réalisées sur les données spectrales afin de caractériser la structure du réseau de collagène de type I dans la peau.

## **Résultats**

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence différentes orientations des fibres de collagène : parallèle (cluster #1) dans le derme papillaire, oblique (clusters #3 et #4) dans les dermes papillaire et réticulaire, et perpendiculaire à la surface de la peau (clusters #2 et #6) dans le derme réticulaire.

## **Conclusions et Perspectives**

La micro-imagerie IR-TF en mode polarisé apparaît être une méthodologie adéquate pour caractériser la structure du réseau de collagène de type I dans la peau. Cette approche pourrait également appliquée à l'étude des modifications moléculaires et structurales de la peau au cours du vieillissement chronologique.

# Interest of polarized FT-IR imaging to characterize the collagen network in human skin

Christophe Eklouh-Molinier<sup>a,b</sup>, The Thuong Nguyen<sup>a,b</sup>, David SebisKveradze<sup>a,b</sup>, Jezabel Feru<sup>c</sup>, Nicole Bouland<sup>d</sup>, Christine Terryn<sup>e</sup>, Michel Manfait<sup>a,b</sup>, Sylvie Brassart-Pasco<sup>c</sup> and Olivier Piot<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, Equipe MéDIAN-Biophotonique et Technologies pour la Santé, UFR de Pharmacie, Reims, France

<sup>b</sup> CNRS UMR 7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, Reims, France

<sup>c</sup> Laboratoire de Biochimie Médicale et de Biologie Moléculaire, CNRS UMR 7369 MEDyC, SFR Cap-Santé, UFR Médecine, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

<sup>d</sup> Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, UFR Médecine, Reims, France

<sup>e</sup> Plate-forme Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

\*Corresponding author: Olivier Piot, UFR Pharmacie, 51096 Reims, France. Tel.: +33 3 26 91 81 28; E-mail: olivier.piot@univ-reims.fr.

## Abstract

**BACKGROUND:** During pathological and/or physiological processes, such as tumoral progression or aging, human skin undergoes molecular and structural changes mainly due to alterations of dermal structural proteins such as type I collagen. These modifications in dermis are probably due to collagen fibers rearrangement and reorientation which have not been thoroughly studied up to now. FT-IR (Fourier transform infrared) micro-spectroscopy associated to polarization measurement appears as an interesting method to determine *in situ* the alignment of type I collagen fibers.

**OBJECTIVE:** In this paper, two different clustering algorithms were applied to determine different layers in human skin. Besides, we used polarized-FT-IR imaging to evaluate the molecular organization of dermal collagen.

**METHODS:** To do this, a cryosection of skin from a 48 year-old woman was analyzed. Acquired FT-IR images were firstly processed using K-means and fuzzy C-means (FCM). FCM was chosen on polarized-FT-IR images in order to highlight the molecular orientation of dermal collagen fibrils. The ratio of Amide I / Amide II bands integrated intensities was computed in order to assess the orientation of collagen fibrils.

**RESULTS AND CONCLUSION:** This methodology permitted to reveal the potential of polarized-FT-IR micro-spectroscopy for the characterization of type I collagen network in human skin. Our approach could help to find innovative applications in dermatology as well as in cosmetics.

**Keywords:** Polarized-FT-IR imaging, type I collagen, collagen orientation, clustering methods

## **1. Introduction**

Skin is a dense and irregular connective tissue due to its structure in three layers (epidermis, dermis, and hypodermis). The dermis is particularly important since it is composed of fibrous proteins such as collagen and elastic fibers. This collagenous layer consists of two sub-layers: the papillary dermis, characterized by a thin extracellular matrix and a high cell density, and the reticular dermis, a dense connective tissue comprising fiber components and few cells.

Making up about 80% and 15% respectively of dry weight, type I and III collagens give strength and resilience to the skin. To our knowledge, type I and III collagen contents, assessed by measuring hydroxyproline content [2, 12] or by immunohistochemistry [4, 15], decrease with age in the different dermis layers of the human skin. Although some techniques

such as X-ray diffraction [9] and polarized light microscopy (PLM) [1, 10] permit to evaluate collagen orientation in articular cartilage and skin, it is still difficult to evaluate the organization of dermal collagen fibers in the skin structure at a molecular level. The FT-IR technique, based on the absorption of infrared light by the sample material, is an interesting label-free tool not only to probe the intrinsic molecular composition of a sample, but also to access some structural information by preserving the sample integrity [5, 6, 14]. Some studies on skin tissue demonstrated that FT-IR imaging could successfully characterize cutaneous melanoma [3, 7, 13]. Associated with light polarization measurements, FT-IR micro-spectroscopy is a potential technique to access structural informations on orientated and/or ordered molecules such as type I collagen in articular cartilage [1]. The aim of our study was to investigate the orientation of dermal collagen fibers by using polarized FT-IR micro-imaging. The potential of this biophotonic approach was evaluated on skin specimens from human donors.

## **2. Materials and methods**

### **2.1.1 Sample preparation**

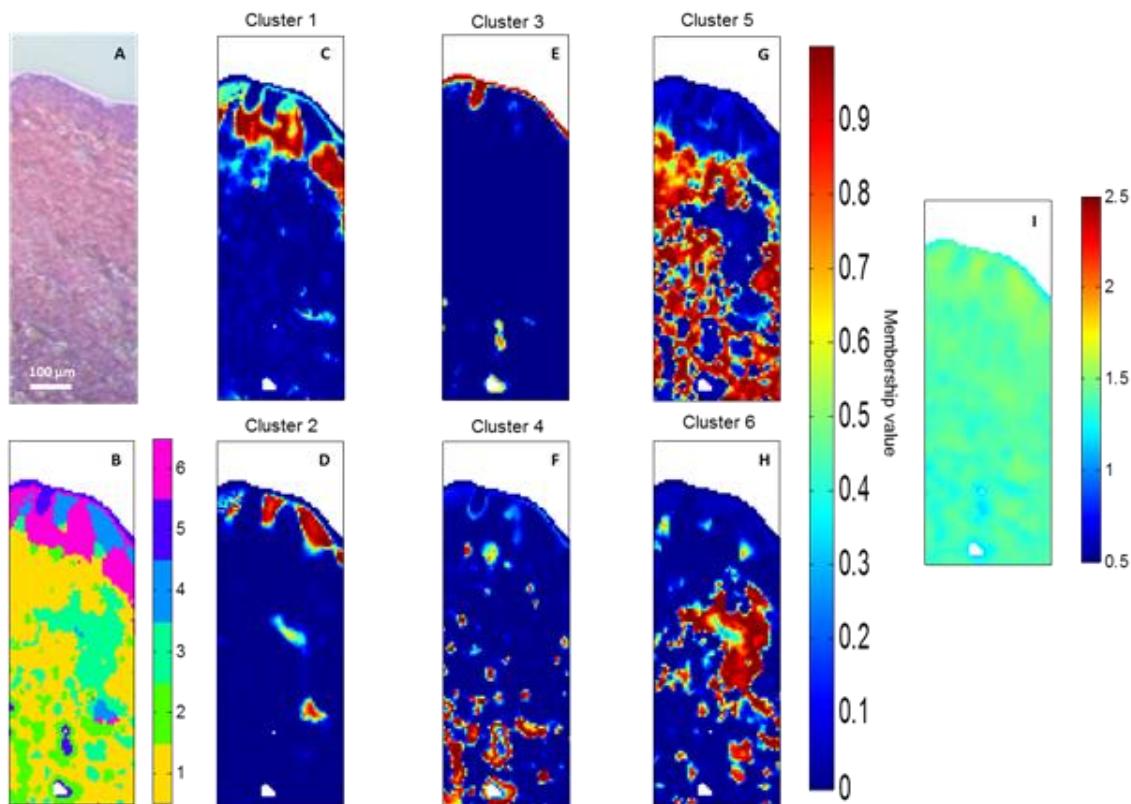
A 48 year-old woman skin sample was analyzed in this study. This patient was operated for breast cancer resection. The skin specimen taken at distance from the breast tumor was identified as normal (no skin pathology) by a collaborating pathologist. Thin tissue sections (10 µm) were deposited on CaF<sub>2</sub> windows and with the skin surface oriented parallel to the direction of the electric vector of the IR radiation (x-axis direction). An area of about 300 x 700 µm<sup>2</sup>, from the *stratum corneum* to the reticular dermis, was mapped by FT-IR micro-imaging in conventional (non-polarized radiation) and polarized modes. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used as standard staining on adjacent sections (5 µm) to those dedicated to FT-IR analysis.

### **2.1.2 Instrumentation details and data analysis**

Polarized FT-IR data samples were collected in transmission mode by using the Spectrum Spotlight 300 FT-IR Imaging System (Perkin Elmer, France). Polarization measurements were performed to determine the spatial distribution of the collagen orientation, as in previous studies on tendon and articular cartilage [1] by inserting a polarizer in the incident infrared beam. For each section, spectral images were acquired in non-polarized mode and with incident IR radiation polarized perpendicular ( $\perp$ ) to the skin surface axis (x-axis direction). The data were recorded from  $900\text{ cm}^{-1}$  to  $3800\text{ cm}^{-1}$  with a spectral resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  and using 16 scans per pixel. The projected area size of the sample onto each detector pixel is  $6.25 \times 6.25\text{ }\mu\text{m}^2$ . MatLab 8.0 software (The Mathworks, Natick, USA) was used to process the FT-IR data, such as reconstruction of images based on the ratio of Amide I and Amide II integrated intensities. For data classification, spectral images were then pre-processed by an automated method based on Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC) algorithm for baseline-correction and normalization. K-means [6] and fuzzy C-means [11] clusterings were used for data processing in order to highlight the different structures of the human skin sample. The spectral range was used from  $900\text{ cm}^{-1}$  to  $1800\text{ cm}^{-1}$  for these clusterings. Color-coded K-means and FCM images were then constructed on the basis of a selected number of clusters. For each image, K-means clustering was performed with a defined number of iterations ( $10^4$ ) and processed several times ( $n > 10$ ) in order to retain a result independent of the initialization step of the clustering. FCM images were constructed with redundancy-based algorithm (RBA)-optimized parameters (number of non-redundant clusters  $K$  and fuzziness index  $m$ ) [11]. The distances between the centroids (cluster mean spectra) can be visualized in a dendrogram according to a heterogeneity scale that gives an estimation of the spectral differences between the formed spectra groups.

### 3. Results and discussion

The H&E-stained histological image of the skin section is presented in Fig. 1A. Multivariate K-means and FCM clustering techniques were applied to the FT-IR data acquired in non-polarized mode (Fig. 1B and Fig. 1C-1H respectively).

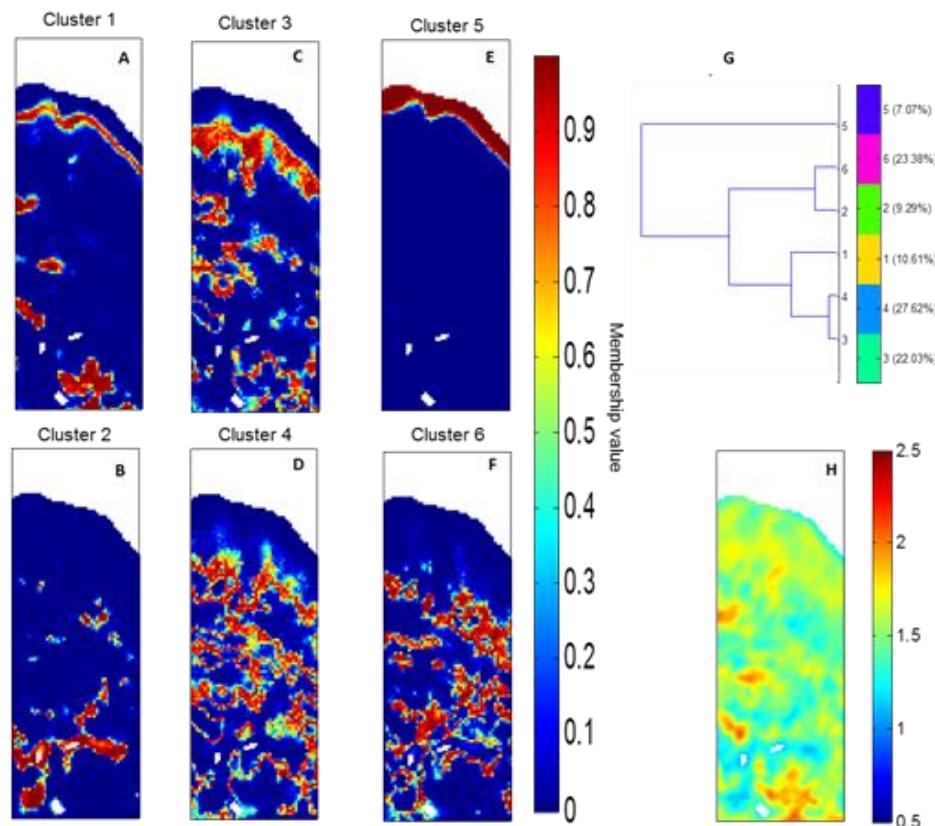


**Fig. 1: K-means and fuzzy C-means (FCM) clustering color-coded images on the Fourier Transform infrared (FT-IR) non-polarized data of a 48-year-old human skin sample.** (A) H&E staining of a 5  $\mu\text{m}$ -section of 48-year-old-human skin. (B) Color-coded clustered image constructed by K-means clustering. (C-H) Fuzzy C-means (FCM) clustering on FT-IR images of 48-year-old-human skin sections constructed with redundancy-based algorithm (RBA)-optimized parameters.  $K_{\text{opt}} = 6$  (optimal number of clusters) and  $m_{\text{opt}} = 1.7$  (optimal fuzziness index). Assignment of the clusters: cluster 1 (papillary dermis); clusters 2 and 3 (epidermis); clusters 4, 5 and 6 (reticular dermis). The membership value is represented by the color bar for each pixel. (I) Non-polarized FT-IR image created from the Amide I/Amide II ratio.

Six clusters appeared to be optimal to recover the different histological skin structures. For both clustering methods, four clusters (#1, 2, 3 and 6 for K-means; #1, 4, 5 and 6 for FCM) were found to be representative of the dermis. Interestingly, the cluster #6 for K-means (#1 for FCM) represents the superficial papillary layer; and the clusters #1, 2 and 3 for K-means (#4, 5 and 6 for FCM) are associated to the deep reticular layer of the dermis. Unlike K-means clustering, FCM permits each pixel to be attributed to every cluster with an associated membership value varying between 1 (highest degree of cluster membership) and 0 (no class membership). This fuzzy clustering method is particularly interesting to study the interconnection between neighboring tissular structures.

Spectral images were constructed using the Amide I/Amide II integrated intensities ratio for the conventional mode (Fig. 1I), and for the perpendicular polarization (Fig. 2H). By comparing the images collected in non-polarized mode and with polarization, it is noteworthy that the polarization of IR signal increased markedly the Amide I/Amide II ratio, permitting to enhance the image contrast and to reveal an orientation of the peptidic bonds of the protein components (*i.e.* mainly collagen) of the skin. The color-scale was adjusted from 0.5 (blue) to 2.5 (red) and three categories of orientation could be determined according to the Amide I/II: values  $\geq 2.2$  correspond to collagen fibrils orientated parallel to the skin surface and  $\leq 1$  to perpendicular fibrils. A ratio of between 1 and 2.2 is associated to an intermediary orientation. FCM was performed on infrared images collected with the perpendicular polarization (Fig. 2A-2F) with the same number of clusters than previously. Compared to non-polarized images, the analysis in polarized mode permits to better recover the epidermis (cluster #5), the dermal-epidermal junction (cluster #1), and the papillary dermis (cluster #3). In addition, distinctive parts of the reticular dermis (cluster #2, 4 and 6) can be revealed. When these clustered images were compared to the polarized FT-IR image created from the Amide I/II area ratio, it appears that clusters from dermis match to different categories of collagen

orientation. Thus, the clusters #2 and #6 from reticular dermis would correspond to collagen fibrils orientated perpendicular to the skin surface. On the contrary, collagen fibrils orientated parallel to the skin surface would be in the cluster #1. Collagen fibrils oriented obliquely could be found in the clusters #3 and #4. Having a low collagen density and thin collagen fibrils compared to the deep reticular layer, it is likely that the papillary dermis could contain random oriented collagen fibrils. The dendrogram in Fig. 2G permits to visualize the spectral distance between FCM centroids spectra (representative spectra of the clusters).



**Fig. 2: FCM clustering color-coded images on the Fourier Transform infrared (FT-IR) polarized data of a 48-year-old human skin sample.** (A-F) FCM clustering on polarized FT-IR images of skin section constructed with RBA-optimized parameters.  $K_{opt} = 6$  (optimal number of clusters) and  $m_{opt} = 1.65$  (optimal fuzziness index). Assignment of the clusters: clusters 1 and 2 (dermal-epidermal junction and reticular dermis); clusters 3 and 4 (papillary dermis and reticular dermis); cluster 5 (epidermis); 6 (reticular dermis). The membership value is represented by the color bar for each pixel. (G) Dendrogram of hierarchical analysis of FCM clustering. (H) Perpendicular polarized FT-IR image created from the Amide I/Amide II ratio.

In summary, this study showed that polarized-FT-IR micro-imaging is a promising tool to investigate changes of collagen fibrils orientation involved in tissue integrity and function. A study showed the potential interest of polarized Raman spectroscopy, another vibrational spectroscopic technique, could analyze collagen fibers changes induced in basal cell carcinoma [8]. It will be also interesting to use polarized IR spectral analysis in order to shed light on collagen modifications associated to the chronological aging or photoaging of the skin.

### **Acknowledgements**

C. Eklouh-Molinier is a recipient of a doctoral fellowship of the Region Champagne-Ardenne (projet VITALITE). The project VITALITE is co-funded by the European Union. The Europe is committed in Champagne-Ardenne through the European Funds for Regional Development (FEDER). The authors would like to thank the Région Champagne-Ardenne (projet VITALITE) and the Platform of Cellular and Tissular Imaging (PICT) are also grateful acknowledged for the equipment availability.

### **References**

- [1] X. Bi, G. Li, S. B. Doty and N. P. Camacho, A novel method for determination of collagen orientation in cartilage by Fourier transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS), *Osteoarthritis Cartilage* **13** (2005), 1050-1058.
- [2] W. Cheng, R. Yan-Hua, N. Fang-Gang, and Z. Guo-An, The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury, *Afr J of Biotech.* **10** 2011, 2524-2529.
- [3] Z. Hammody, S. Argov, K. Sahu, E. Cagnano, R. Moreha and S. Mordechai, Distinction of malignant melanoma and epidermis using IR micro-spectroscopy and statistical methods. *Analyst* **133** (2008), 372-378.

- [4] D. G. Janson, G. Saintigny, A. van Adrichem, C. Mahé, and A. El Ghalbzouri, Different gene expression patterns in human papillary and reticular fibroblasts, *J Invest Dermatol.* **132** (2012), 2565-2572.
- [5] C. Krafft, G. Steiner, C. Beleites, and R. Salzer, Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy, *J Biophotonics* **2** (2009), 13-28.
- [6] P. Lasch, W. Haensch, D. Naumann and M. Diem, Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR micro-spectroscopy and cluster analysis, *Biochim Biophys Acta* **1688** (2004), 176-186.
- [7] E. Ly, N. Cardot-Leccia, J. P. Ortonne, M. Benchetrit, J. F. Michiels, M. Manfait and O. Piot, Histopathological characterization of primary cutaneous melanoma using infrared microimaging: a proof-of-concept study, *Br J Dermatol* **162** (2010), 1316-1323.
- [8] E. Ly, A. Durlach, F. Antonicelli, P. Bernard, M. Manfait, and O. Piot, Probing tumor and peritumoral tissues in superficial and nodular basal cell carcinoma using polarized Raman micro-spectroscopy, *Exp Dermatol.* **19** (2010), 68-73
- [9] C. Muehleman, S. Majumdar, A. S. Issever, F. Arfelli, R. H. Menk, L. Rigon, G. Heitner, B. Reime, J. Metge, A. Wagner, KE. Kuettner and J. Mollenhauer, X-ray detection of structural orientation in human articular cartilage, *Osteoarthritis Cartilage* **12** (2004), 97-105.
- [10] J. F. Ribeiro, E. H. dos Anjos, M. L. Mello, and B. de Campos Vidal, Skin collagen fiber molecular order: a pattern of distributional fiber orientation as assessed by optical anisotropy and image analysis, *PLoS One* **8** (2013), e54724.
- [11] D. Sebiskveradze, V. Vrabie, C. Gobinet, A. Durlach, P. Bernard, E. Ly, M. Manfait, P.

Jeannesson and O. Piot, Automation of an algorithm based on fuzzy clustering for analyzing tumoral heterogeneity in human skin carcinoma tissue sections, *Lab Invest* **91** (2011), 799-811.

[12] S. Shuster, M. M. Black, and E. McVitie, The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density, *Br. J. Dermatol.* **93** (1975), 639-643.

[13] G. Tosi, C. Conti, E. Giorgini, P. Ferraris, M. G. Garavaglia, S. Sabbatini, S. Staibano, C. Rubini, FTIR micro-spectroscopy of melanocytic skin lesions: a preliminary study, *Analyst*. **135** (2010), 3213-3219.

[14] B. De C. Vidal, and M. L. Mello, Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron* **42** (2011), 283-289.

[15] Q. Zheng, S. Chen, Y. Chen, J. Lyga, R. Wyborski, U. Santhanam, Investigation of age-related decline of microfibril-associated glycoprotein-1 in human skin through immunohistochemistry study, *Clin Cosmet Investig Dermatol.* **6** (2013), 317-323.

**III. 3. Article #2**

**Changes of skin collagen orientation associated  
with chronological aging as probed  
by polarized-FTIR microimaging**

*The Analyst*, 139 (2014), pp. 2482-88

- Préambule à l'article #2

## **Contexte et objectif de l'étude**

Au cours du vieillissement chronologique, la peau humaine subit des modifications moléculaires et structurales entraînant ainsi l'apparition de rides et une perte d'élasticité. Toutes ces altérations affectent le collagène de type I qui confère à la peau sa souplesse. Le potentiel de la micro-imagerie IR-TF en mode polarisé a été évalué dans une étude précédente (*cf.* Article #1) afin de déterminer différentes orientations des fibres de collagène dans le derme. Nous avons utilisé cette approche pour caractériser des changements structuraux du réseau de collagène au cours du vieillissement chronologique de la peau.

## **Matériels et Méthodes**

L'analyse par micro-imagerie IR-TF a été réalisée sur des coupes de peau d'âges différents (41, 48, 53, 58, 62, 74 et 80 ans). Deux modes d'analyse ont été utilisés : mode conventionnel (radiation IR non-polarisée), et mode polarisé (radiation IR polarisée parallèle à la surface de la peau). Une reconstruction des images spectrales à partir du ratio des aires intégrées des bandes Amide I ( $1590\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ ) / Amide II ( $1480\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ ), et une classification HCA ont été réalisées afin d'évaluer les changements d'orientation des fibres de collagène au cours du vieillissement chronologique de la peau.

## **Résultats**

En comparant les résultats obtenus sur l'analyse des échantillons de peau d'âges différents, nous avons montré des altérations structurales du réseau de collagène avec l'âge.

## **Conclusions et Perspectives**

Nous avons démontré la potentialité de la micro-imagerie IR-TF en mode polarisé à détecter des changements d'orientation des fibres de collagène dans la peau avec l'âge. Cette méthodologie s'avère être un outil prometteur pour appréhender les mécanismes impliqués au cours du vieillissement chronologique de la peau.



## Analyst

PAPER

[View Article Online](#)  
[View Journal](#)

Cite this: DOI: 10.1039/c3an00353a

### Changes of skin collagen orientation associated with chronological aging as probed by polarized-FTIR micro-imaging†

The Thuong Nguyen,<sup>‡<sup>a</sup></sup> Christophe Eklouh-Molinier,<sup>‡<sup>a</sup></sup> David Sebisveradze,<sup>a</sup> Jezabel Feru,<sup>b</sup> Christine Terryn,<sup>c</sup> Michel Manfait,<sup>a</sup> Sylvie Brassart-Pasco<sup>b</sup> and Olivier Piot<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup>MéDIAN Biophotonique et Technologies pour la Santé, CNRS FRE 3481 MEDyC, SFR Cap-Santé, UFR Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Biochimie Médicale et de Biologie Moléculaire, CNRS FRE 3481 MEDyC, SFR Cap-Santé, UFR Médecine, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France

<sup>c</sup>Plate-forme Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France.

\*Corresponding author:

Pr. Olivier Piot

FRE CNRS/URCA n° 3481, UFR Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, Reims, France

Tel.: +33 3 26 91 81 28; E-mail: olivier.piot@univ-reims.fr

## Abstract

During chronological skin aging, alterations in dermal structural proteins cause morphological modifications. Modifications are probably due to collagen fibers (type I collagen) rearrangement and reorientation with aging, that have not been researched up to now. FTIR micro-spectroscopy appears as an interesting method to study protein structure in normal and pathological conditions. Associated with a polarizer, this vibrational technique permits to probe collagen orientation within skin tissue sections, by computing the ratio of

integrated intensities of Amide I and Amide II bands. In this study, we used the polarized-FTIR imaging to evaluate molecular modifications of dermal collagen during chronological aging. The data processing of polarized infrared data revealed that type I collagen fibers become parallel to the skin surface in aged skin dermis. Our approach could find innovative applications in dermatology as well as in cosmetics.

**Keywords:** Polarized FTIR imaging, type I collagen, collagen orientation, skin aging.

## **1. Introduction**

Skin is a multifunctional particular organ due to its structure in three layers (epidermis, dermis, and hypodermis). Its main function is a protective role against external aggression. The dermis is particularly important; it is composed of dense connective tissue and contains the vascular system which provides vital nutrients to living cells in the epidermis, as well as nerve fibers and sensory receptors. Among the dermis constituents, type I collagen is the most important since it represents about 90% of dry weight and gives strength and resilience to the skin. Alterations in dermal proteins, especially type I collagen, during aging have been highlighted,<sup>1-5</sup> but it is still difficult for imaging this effect. During the chronological aging, Shuster *et al.* showed that collagen density decreases with age by measuring hydroxyproline content after hydrolyzation of the dermis.<sup>6</sup> The examination of dermal sections from young and old individuals using fluorescence microscopy showed that collagen fiber bundles synthesis and thickness decrease in chronologically aged skin.<sup>7</sup> In photoaged skin analyzed using Raman spectroscopy, collagen fibers appeared to become fragmented, thickened and more soluble.<sup>8</sup> However, to our knowledge, no studies have been performed up to now to evaluate changes in orientation of collagen fibers during skin chronological aging.

The FTIR technique is based on the absorption of infrared light by the sample material. This vibrational approach is an interesting label-free tool not only to probe the intrinsic molecular composition of a sample, but also to access some structural informations by preserving sample integrity. On skin tissue, FTIR micro-spectroscopy has been successfully used to characterize cutaneous melanoma<sup>9</sup> and to establish a differential diagnosis between basal cell and squamous cell carcinoma.<sup>10</sup> At the level of stratum corneum, the infrared approach permitted to measure hydration using ATR mode<sup>11</sup> and to quantify uptake of liposomes.<sup>12</sup> The potential of FTIR micro-spectroscopy, for investigation of normal and acne skin surface lipids, has also been demonstrated.<sup>13</sup> The FTIR micro-spectroscopy showed clearly its advantages for studying pathological skin.

Associated with light polarization measurement, FTIR micro-spectroscopy is a potential technique to access structural informations on orientated and/or ordered molecules. As examples of application, this innovative approach was applied on polymers to study the structure and dynamics of semicrystalline films.<sup>14</sup> Other examples show applications of polarized-FTIR micro-spectroscopy on biomolecules; in particular, structure-property relationships in major ampullate spider silk were investigated by exposing silk to an external mechanical strain.<sup>15</sup> In bacteriorhodopsin membrane protein, alterations of hydrogen-bonding network during light energy conversion were revealed at the level of arginine residues by using polarized-FTIR spectroscopy.<sup>16</sup> In articular cartilage, evaluation of collagen orientation has also been investigated by using the same technique. Bi *et al.* showed the advantage of this technique for imaging of type II collagen orientation in articular cartilage for two different types of pathology.<sup>17</sup> First, the authors highlighted some structural differences between normal and repaired equine cartilages by calculating the amide I/ amide II ratio of polarized-FTIR images; then they showed that the same approach was efficient to differentiate between early and advanced osteoarthritis in cartilage of human tibial plateau. Camacho *et al.* used also polarized-FTIR to obtain some information on the orientation of type II collagen fibrils in

bovine occipital articular cartilage.<sup>18</sup> As illustrated above, polarized-FTIR spectroscopy is a candidate technique for analyzing orientated biological macromolecules. It appears therefore promising to investigate orientation changes of dermal type I collagen with skin chronological aging.

Another biophotonic technique, second harmonic generation (SHG) microscopy, was proven to be efficient to image type I collagen fibers orientation in tissue.<sup>19,20</sup> Its principle is based on two-photon coherent nonlinear phenomenon which arises for molecules which do not show any centro-symmetry. SHG intensity measurements have been developed for imaging the collagen fiber orientation in skin samples, for investigating the effect of age in mouse model<sup>21</sup> or on human skin.<sup>22</sup> In this last study, innovative instrumentation was specially developed for *in vivo* experimentations.

The aim of our study was to investigate dermal collagen alterations associated with chronological skin aging by using polarized-FTIR micro-imaging. The potential of this optical approach was evaluated on skin specimens from human donors of different ages.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Tendon collagen**

Five  $\mu\text{m}$ -thick sections of tail tendon from male rats, aged 2 months, were deposited on  $\text{CaF}_2$  windows (Crystran Ltd., Dorset, UK), suitable for infrared analysis. Such substrates offered a high transmission of the infrared radiation permitting to preserve a high level of radiation energy for probing the tissue. Prior to the spectral acquisition, the tendon was oriented parallel to the direction of the electric vector (corresponding to the x-axis of the motorized plate in our experiments).

## **2.2. Human skin samples**

Eight skin samples from 41 to 80 year-old women were analyzed in this study. These patients were operated for breast cancer resection. The skin specimens taken at distance from the breast tumor were checked as normal (no skin pathology) by a collaborating pathologist. The breast skin is usually a sun-unexposed site, and is considered as a good model for studying chronological aging. All donors were Caucasian and presented the same phototype (type II). Thin tissue sections (5  $\mu\text{m}$ ) were deposited on  $\text{CaF}_2$  windows, and with the skin surface oriented parallel to the x-axis of the motorized plate. For each tissue section, an area of about  $300 \times 600 \mu\text{m}^2$ , from the stratum corneum to the reticular dermis, was mapped by FTIR micro-imaging in conventional (non-polarized radiation) and polarized modes.

## **2.3. Polarized-FT-IR**

Polarized-FTIR data samples were collected in transmission mode by using the Spectrum Spotlight 300 FTIR Imaging System (Perkin Elmer Life Sciences, France) coupled to a Spectrum One spectrometer. For each sample, spectral images were acquired in non-polarized mode and with incident IR radiation polarized parallel ( $\parallel$ ) and perpendicular ( $\perp$ ) to the direction parallel to the skin surface (*stratum corneum*) in our experiments. For the polarization measurements, a polarizer was inserted in the incident infrared beam. The data were recorded from  $900 \text{ cm}^{-1}$  to  $3800 \text{ cm}^{-1}$  with a spectral resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$  and using 16 scans per pixel. The projected area size of the sample onto each detector pixel is  $6.25 \times 6.25 \mu\text{m}^2$ . Prior to each data acquisition, a spectrum from the  $\text{CaF}_2$  substrate (background spectrum) was recorded and subtracted automatically from the tissue data. The obtained spectral images were corrected for the contribution of atmospheric gases by using the Perkin Elmer Spotlight software.

## **2.4. Hierarchical clustering analysis (HCA)**

Spectral images pre-processing consisted to apply EMSC<sup>23</sup> for baseline-correction and normalization. In several studies led in our group, this algorithm has proven to be efficient to process infrared spectral data.<sup>24,25</sup> All recorded spectra of each data set were averaged to compute the mean spectrum. A second-order polynomial function was used to model light-scattering effects. Besides, this automated preprocessing allows removing outliers and poor tissue signal to noise ratio (SNR) spectra from the analysis. In addition, in case of paraffin-embedded tissues, this EMSC pre-processing permits to neutralize the spectral interferences of the paraffin avoiding chemical dewaxing of the tissue.

Spectral images were analyzed using hierarchical cluster analysis (HCA). Data clustering was performed on the 900-3800 cm<sup>-1</sup> spectral range, by using the Euclidian distance for calculation of the spectral similarity and Ward's algorithm for linkage between the spectra. This process results into a tree-like diagram, called dendrogram, permitting to classify the spectra according a degree of similarity represented by a heterogeneity scale. By fixing a threshold to this scale, color-coded HCA images can then be constructed with a selected number of clusters. Colors were randomly attributed to the clusters, but for facilitating the interpretation of the set of HCA images, a common color was assigned to a specific skin structure; i.e the epidermis was colored in violet for all the images. The distances between the centroids (mean spectra of the clusters) can be visualized by forming a new dendrogram from these centroids. The data pre-processing and processing were carried out by using algorithms written in Matlab 7.2 supplied with the PLS toolbox 2.0.

## **2.5. Second harmonic generation microscopy**

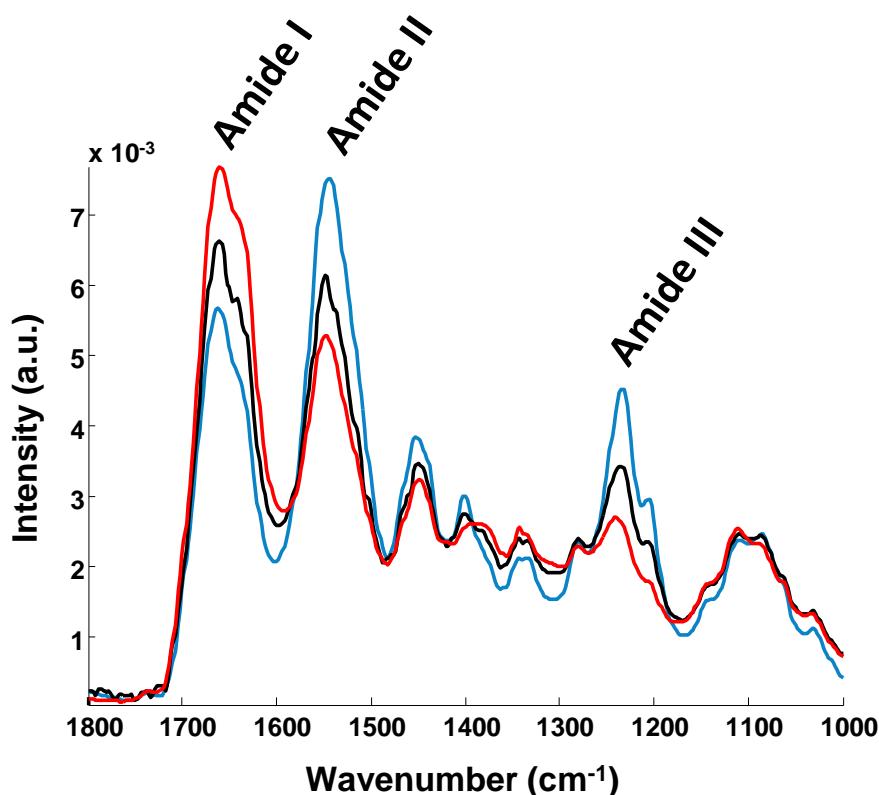
Second-harmonic signal of type I collagen was generated using a Ti:Sapphire laser excitation wavelength at 860 nm (Coherent Chameleon laser, Coherent, USA). The laser was coupled to a confocal microscope (Zeiss LSM 710 NLO, Germany) and focused on the sample by means of a 20X objective (Zeiss, NA=0.8). The SHG signal was calculated from detected light between 420 nm to 440 nm. All images consisted of 512 x 512 pixels, with a size pixel of 0.83 x 0.83  $\mu\text{m}^2$ . The SHG in skin tissue sections was collected with the laser polarization parallel to x-axis of the motorized plate, corresponding also to the orientation of the surface skin (*stratum corneum*). On SHG images, 50x50  $\mu\text{m}^2$  regions of interest (ROI) were defined at two different distances, 150  $\mu\text{m}$  and 300  $\mu\text{m}$  from the skin surface (n=9 for each depth). For each ROI the average SHG intensity was computed.

## **3. Results**

### **3.1. Polarized- FTIR analysis of rat tail tendon**

Prior to analyze skin tissue sections, rat tail tendon was used as a reference sample to measure the effect of polarization on the type I collagen infrared signal. The tendon is mainly composed of collagen fiber; it was aligned along the direction of the electric vector (the x-axis of the motorized plate). Fig. 1 shows the average and standard deviation (n=20) spectra of rat tail tendon in the 900-1800  $\text{cm}^{-1}$  range in non-polarized mode (*in black*), with IR radiation polarized perpendicular ( $\perp$ ) (*in red*) and parallel ( $\parallel$ ) (*in blue*) to the electric vector that corresponds to the collagen fiber direction. On these spectra, characteristic IR vibrations of type I collagen were found, particularly at the level of the amide I ( $1658 \text{ cm}^{-1}$ ) and amide II ( $1550 \text{ cm}^{-1}$ ) bands, and at 1451, 1399, 1339, 1282, 1236, and  $1203 \text{ cm}^{-1}$  attributed to  $\text{CH}_2$  and  $\text{CH}_3$  wagging and deformation, and C–N stretching vibrations.<sup>26</sup> Depending on the polarization mode used, we observed a marked variation of the amide I/amide II ratio. The

ratio value was maximal (~ 4) when the polarized infrared radiation was perpendicular to the collagen fiber orientation (*in red*), probing mainly stretching vibration of the C=O bond of the peptidic bond.<sup>18</sup> It was minimal (~ 0.5) when the polarization was parallel to the collagen fiber orientation (*in blue*). Without polarizer (Fig. 1(b)), the amide I/II ratio presented an intermediary value equal to 2 (*in black*).



**Figure 1:** Average and standard deviation ( $n=20$ ) IR spectra of rat tail tendon in the 900-1800  $\text{cm}^{-1}$  range in non-polarized mode (*in black*), with IR radiation polarized perpendicular ( $\perp$ ) (*in red*) and parallel ( $\parallel$ ) (*in blue*) to the x-axis of the motorized plate. The tendon was aligned along this x-axis direction.

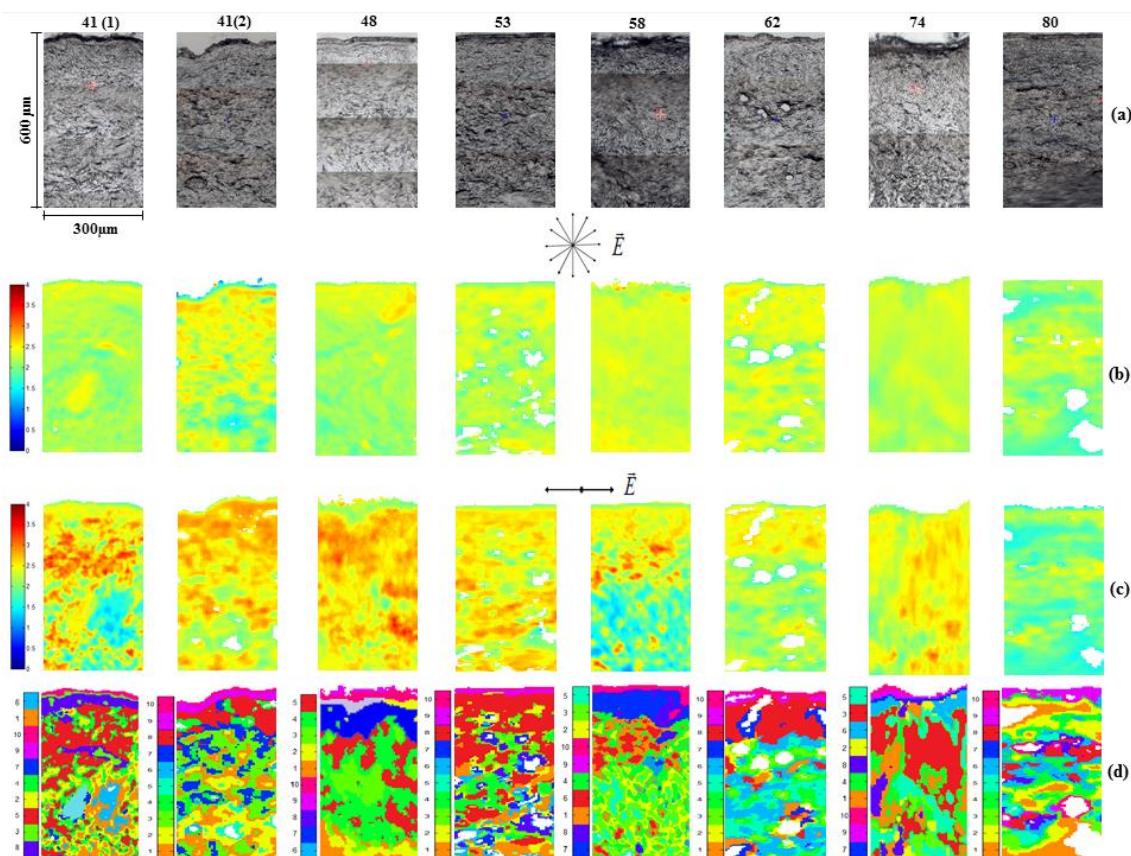
This result showed the high sensitivity of the amide bands with the polarization of the IR light. The amide I/amide II ratio can be used to determine the orientation of the type I collagen fibers by using the polarized-FTIR technique, because the C=O stretching vibration possesses a transition moment preferentially oriented perpendicular to the collagen fibril long

axis,<sup>18</sup> and the amide I and amide II modes have transition moments that extend in approximately perpendicular directions.<sup>18</sup> Consequently, the area of the amide I band (C=O stretching) is maximal and those of the amide II band (C-N stretching) is minimal when the polarization of the IR radiation is perpendicular to the axis of the collagen fibers, and inversely for the orthogonal direction of the polarization. Therefore, the ratio of the areas of amide I/amide I bands in one polarization (parallel or perpendicular to the collagen fibril long axis) is as an indicator of orientation collagen.<sup>18</sup> The C-N and C-C skeletal stretch vibrations<sup>18</sup> at 1240 cm<sup>-1</sup> appeared also to be sensitive to the polarization as shown on Fig. 1.

### **3.2. Polarized-FTIR analysis of skin samples**

On the basis of the results obtained on the rat tail tendon, skin specimens were analyzed using a similar approach. Fig. 2(a) displays visible image of the skin samples, with the corresponding probed areas. Spectral images were constructed using the amide I/amide II area ratio for the conventional mode (Fig. 2(b)), and for the parallel polarization (Fig. 2(c)). The color-scale was adjusted from 0 (blue) to 4 (red) according the values computed for the rat tail tendon. By comparing the images collected in non-polarized mode and with polarization, it is noteworthy that the polarization of IR signal increased markedly the amide I/amide II ratio, permitting to enhance the image contrast and to reveal an orientation of the C=O and C-N bonds of the molecular components of the skin. Within each skin section, a marked variability of the infrared pixels was observed revealing the tissular heterogeneity of the skin at the microscopic scale. The thin superficial layer, corresponding to the stratum corneum, presented a ratio value of about 2, either in the presence or absence of polarization. This observation showed that the molecular composition of the *stratum corneum* (the main molecular constituents of this layer are lipid molecules) is insensitive to the infrared polarization.

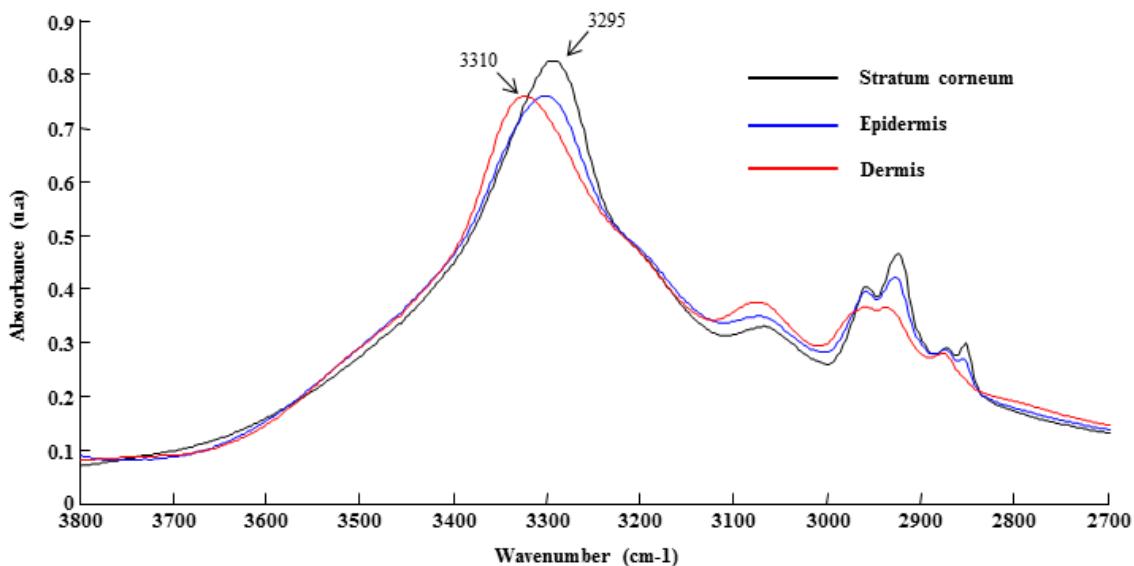
The amide I/amide II ratio-based images did not permit to recover the distinctive cutaneous histological structures. Indeed, no distinction between epidermis and dermis was possible, making it difficult to compare the eight different specimens analyzed in this study. This approach (amide I/amide II ratio calculation) showed differences of the molecular orientation within each sample but it did not permit to distinguish clearly the different skin layers and to consider the tissue variability. To overpass this limitation, a multivariate statistical method was carried out on the infrared data. Hierarchical clustering analysis (HCA) was selected since this processing was proven to be efficient to cluster infrared spectra collected on various tissue types, such as colon, brain, breast and skin.<sup>27-30</sup> HCA presents also the advantage to be independent of the initiation step of clustering, contrary to K-means clustering that is also a widely used data processing method.<sup>31</sup>



**Fig. 2:** Visible images of the skin samples (a); Spectral images constructed using the amide I/amide II ratio in the non-polarized mode (b), for the parallel polarization (c). Color-coded clusterized images constructed using HCA classification method (d).

### **3.3. Hierarchical clustering analysis (HCA) of spectral images**

HCA was performed on infrared images collected with the parallel polarization. Color-coded images were constructed using a number of 10 clusters (Fig. 2(d)). Different numbers of clusters were tested (data not shown); ten clusters appeared to be optimal to cover the different histological skin structures in the set of samples. It permitted also to highlight the tissue heterogeneity, in particular within the dermis, part of skin on which we focused on in the study. A higher cluster number did not lead to any additional and easy exploitable information. As visible on the HCA color-coded images, several clusters were attributed to the dermis. For example, for the 41 year old skin, three clusters (#2, 4 and 5) were found to be representative of the dermis. Interestingly, the cluster #5 corresponded to the pixels with the highest value of the amide I/amide II ratio in Fig.2(c). In addition, *stratum corneum*, epidermis and dermis were clearly distinguished based on their infrared signatures. For the 41 year old skin, the centroids (mean spectra of the clusters) of the clusters #10, 8 and 5 (corresponding to the *stratum corneum*, epidermis and dermis, respectively) were displayed in the 2700-3800 cm<sup>-1</sup> range (Fig. 3). In the highwavenumber spectral range, for dermis spectrum, the maximum of the amide A band was located at 3310 cm<sup>-1</sup>, for the epidermis and the *stratum corneum*, it was at 3295 cm<sup>-1</sup>. These vibrations translated a molecular specificity of these skin layers, *i.e.* keratin and collagen which are the main components of epidermis and dermis respectively.<sup>32</sup> In addition, the spectrum of *stratum corneum* presented higher lipid content, according to the more intense signal observed at the C-H stretching vibration level at 2950 cm<sup>-1</sup>.



**Fig. 3:** Centroids representative of the *stratum corneum*, the epidermis and the dermis in the high-wavenumber spectral region.

In addition, on this skin section, other structures likely to be associated to skin appendages were highlighted on the HCA image (clusters #1, 6 and 9). From these color-coded images, the centroids of HCA clusters corresponding to the dermis were extracted in order to compare their signature between the samples of different ages. The amide I/amide II ratios of the centroids were then computed and presented in the Table 1 for the analyzed samples. The amide I/II ratio presented the highest values for the 41 year old skin (3.6, 3.5 and 3.4). These values decreased with age and were the lowest for the 80 year old skin (2.6, 2.2 and 1.7). These results indicated that the orientation of the collagen fibers is perpendicular to the surface skin for the younger skin and becomes parallel to the surface skin during aging.

In Table 1, the relative contribution of each of these 3 spectral clusters was also indicated in percentage. In a general manner, within the analyzed skin sections, the spectral cluster with the highest amide I/amide II ratio was preferentially highlighted in the papillary dermis.

Age (year-old)	41(1)			41(2)			48			53		
# centroïde	5	4	2	8	7	3	5	4	3	1	5	6
Cluster contribution (%)	46	30	24	23	30	47	30	47	23	20	68	13
Amide I / II ratio	3,6	3,5	3,4	3,4	3,3	3,1	3,2	3,1	2,7	3,1	2,9	2,8
Age (year-old)	58			62			74			80		
# centroïde	6	1	4	6	1	8	3	5	6	7	3	4
Cluster contribution (%)	19	28	53	22	26	52	63	26	11	26	23	50
Amide I / II ratio	3	2,9	2,6	2,9	2,7	2,6	2,6	2,2	2,1	2,6	2,2	1,7

**Table 1:** The Amide I/Amide II ratio of the centroids for 8 different-aged skin samples.

#### 4. Discussion and Conclusion

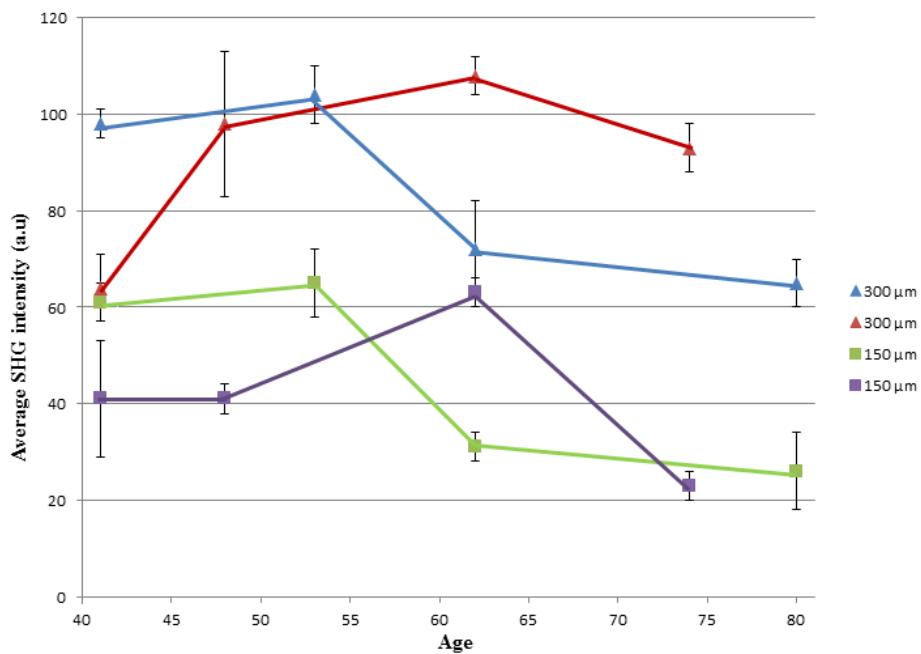
Our study demonstrates that polarized-FTIR is a promising tool to investigate some biophysiological mechanisms involved in skin aging. In the present study, the polarized-FTIR technique was used to highlight changes of collagen orientation between skin samples of different age. Imaging such tissue features is not possible using FTIR micro-spectroscopy in conventional mode. By comparing eight skin specimens of different age from 41 to 80 years, polarized-FTIR imaging associated with statistical multivariate data processing permitted to show that the dermal collagen fibers tend to orientate parallel to the skin surface for the oldest skins. This work has to be considered as a methodological development that has been demonstrated in the framework of a feasibility study led on a limited number of samples.

In our approach, the amide I/amide II ratio values were computed since they reflected the orientation of the C=O and C-N bonds of the collagen peptide links. The presence of other protein constituents of the dermis such as elastin or proteoglycans could interfere in the evaluation of the amide I/amide II ratio.<sup>17</sup> However, collagen corresponds to ~ 90% of the dry

weight of skin,<sup>33</sup> and owns a structural exceptional alignment in comparison with others constituents. Consequently, the amide I/amide II ratio computed from polarized infrared spectra appeared as a sensitive indicator of the collagen orientation. The tendon collagen was employed to illustrate the effect of the polarization on the infrared signal, and also to calibrate the amide I/amide II ratio. In skin dermis, the same type of collagen (*i.e.* type I collagen) was probed, contrary to the study of Bi *et al.* that used the tendon collagen for calibration and investigated type II collagen in cartilage.<sup>17</sup> Differences of ratio between the tendon and the cartilage were thus observed while in our case the tendon appeared as an appropriate reference sample to determine the collagen fiber orientation within skin samples.

Cutaneous chronologic aging is a complex and inevitable process. This phenomenon is genetically programmed and its consequences are morphological changes of the skin, such as wrinkles apparition, which can be evaluated by different techniques. But, as mentioned in the introduction, very few studies on skin collagen orientation were done. To our knowledge, only Lavker *et al.* compared skin from the upper inner arm of old (age 70-85 years) and young (age 19-25 years) individuals using light, transmission electron and scanning electron microscopy.<sup>34</sup> Interestingly, they reported alterations of the three-dimensional arrangement of collagen and elastic fibers and a flattening dermal/epidermal junction for the older population. These findings could be linked with our results revealing changes of collagen orientation in dermis. Rearrangement of collagen fiber network with ageing could also be linked to the flattening of the dermal/epidermal junction since type I collagen fibers in papillary dermis are connected to the junction via the anchoring network of type VII collagen.<sup>35</sup> Furthermore, since the network of collagen fibers plays an important role in the support of the skin, it will be interesting to correlate our spectroscopic results with data on mechanical properties of human skin that are altered during skin aging. Such properties can be probed by using an air flow system.<sup>36</sup>

SHG microscopy was also used as a reference technique<sup>22</sup> to assess collagen orientation within skin dermis. In our experiments, it can be considered that SHG intensity is related to collagen orientation in the x-axis direction since the excitation laser was polarized in this direction. The averages of SHG intensity values were computed for the eight skin samples. No relationship between the SHG intensity and the age was highlighted as visible in Fig. 4.



**Fig. 4:** SHG intensity for the eight skin samples of different age.

This result, which appears to be not correlated with the polarized infrared data, can be explained by the fact that SHG intensity depends not only on the collagen orientation but also on collagen density and other factors such as the glycation process.<sup>37,38</sup> Distinguishing between the contribution of collagen orientation and glycation on the SHG signal is difficult or even impossible, as glycation is a biological phenomenon depending on the age of the body. Therefore, the SHG method does not appear as the more suitable method to analyze collagen orientation.

In conclusion, this current study represents the first report to shed light on collagen modifications with chronological skin aging, using polarized IR spectral analysis. This

biophotonic imaging technique could be of particular interest for future applications in dermatology and cosmetics.

## Acknowledgements

T.T. Nguyen is a recipient of a doctoral fellowship of the Champagne-Ardenne Region. The authors would like to thank the Champagne-Ardenne Region, INSERM PNR Imagerie, and CNRS PIR Longévité et Vieillissement for financial support. The experiments were performed using devices integrated to the IBiSA “Cellular and Tissular Imaging” technological platform.

## References

1. R. M. Lavker, *J. Invest. Dermatol.*, 1979, **73**, 59–66.
2. C. R. Lovell, K. A. Smolenski, V. C. Duance, N. D. Light, S. Young, and M. Dyson, *Br. J. Dermatol.*, 1987, **117**, 419–428.
3. M. Gniadecka, R. Gniadecki, J. Serup, and J. Søndergaard, *J. Invest. Dermatol.*, 1994, **102**, 362–365.
4. E. F. Bernstein, Y. Q. Chen, J. B. Kopp, L. Fisher, D. B. Brown, P. J. Hahn, F. A. Robey, J. Lakkakorpi, and J. Uitto, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1996, **34**, 209–218.
5. J. Varani, M. K. Dame, L. Rittie, S. E. G. Fligiel, S. Kang, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, *Am. J. Pathol.*, 2006, **168**, 1861–1868.
6. S. Shuster, M. M. Black, and E. McVitie, *Br. J. Dermatol.*, 1975, **93**, 639–643.
7. J. Varani, M. K. Dame, L. Rittie, S. E. G. Fligiel, S. Kang, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, *Am. J. Pathol.*, 2006, **168**, 1861–1868.
8. M. Gniadecka, O. F. Nielsen, S. Wessel, M. Heidenheim, D. H. Christensen, and H. C. Wulf, *J. Invest. Dermatol.*, 1998, **111**, 1129–1133.

9. E. Ly, N. Cardot-Leccia, J.-P. Ortonne, M. Benchetrit, J.-F. Michiels, M. Manfait, and O. Piot, *Br. J. Dermatol.*, 2010, **162**, 1316–1323.
10. E. Ly, O. Piot, A. Durlach, P. Bernard, and M. Manfait, *Analyst*, 2009, **134**, 1208–1214.
11. R. O. Potts, D. B. Guzek, R. R. Harris, and J. E. McKie, *Arch. Dermatol. Res.*, 1985, **277**, 489–495.
12. R. Mendelsohn, C. R. Flach, and D. J. Moore, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 923–933.
13. R. A. Runkel, D. E. Wurster, and G. A. Cooper, *J. Pharm. Sci.*, 1969, **58**, 582–585.
14. O. Urakawa, F. Kaneko, and H. Kobayashi, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 14461–14469.
15. P. Papadopoulos, J. Sölter, and F. Kremer, *Eur. Phys. J. E.*, 2007, **24**, 193–199.
16. T. Tanimoto, M. Shibata, M. Belenky, J. Herzfeld, and H. Kandori, *Biochemistry*, 2004, **43**, 9439–9447.
17. X. Bi, G. Li, S. B. Doty, and N. P. Camacho, *Osteoarthr. Cartil.*, 2005, **13**, 1050–1058.
18. N. P. Camacho, P. West, P. A. Torzilli, and R. Mendelsohn, *Biopolymers*, 2001, **62**, 1–8.
19. J. Xie, J. Ferbas, and G. Juan, *Curr. Protoc. Cytom.*, 2012, **Chapter 6**, Unit 6.33.
20. S. Bancelin, C. Aimé, T. Coradin, and M.-C. Schanne-Klein, *Biomed. Opt. Express*, 2012, **3**, 1446–1454.
21. S. Wu, H. Li, H. Yang, X. Zhang, Z. Li, and S. Xu, *J. Biomed. Opt.*, 2011, **16**, 040502–040502.
22. T. Yasui, M. Yonetsu, R. Tanaka, Y. Tanaka, S. Fukushima, T. Yamashita, Y. Ogura, T. Hirao, H. Murota, and T. Araki, *J. Biomed. Opt.*, 2013, **18**, 31108.
23. A. Kohler, C. Kirschner, A. Oust, and H. Martens, *Appl. Spectrosc.*, 2005, **59**, 707–716.
24. E. Ly, O. Piot, R. Wolthuis, A. Durlach, P. Bernard, and M. Manfait, *Analyst*, 2008, **133**, 197–205.
25. J. Nallala, O. Piot, M.-D. Diebold, C. Gobinet, O. Bouché, M. Manfait, and G. D. Sockalingum, *Cytometry. A*, 2013, **83**, 294–300.

26. K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou, and C. Petibois, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **395**, 829–837.
27. C. Krafft, G. Steiner, C. Beleites, and R. Salzer, *J. Biophotonics*, 2009, **2**, 13–28.
28. B. Bird, M. Miljkovic, M. J. Romeo, J. Smith, N. Stone, M. W. George, and M. Diem, *BMC Clin. Pathol.*, 2008, **8**, 8.
29. A. Kallenbach-Thielges, F. Großerüschkamp, A. Mosig, M. Diem, A. Tannapfel, and K. Gerwert, *J. Biophotonics*, 2013, **6**, 88–100.
30. P. Lasch, M. Diem, W. Hänsch, and D. Naumann, *J. Chemom.*, 2007, **20**, 209–220.
31. J. A. Hartigan and M. A. Wong, *J. Roy. Statist. Soc. Ser. C*, 1979, **28**, 100–108.
32. A. Tfayli, O. Piot, A. Durlach, P. Bernard, and M. Manfait, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1724**, 262–269.
33. G. J. Fisher, S. Datta, Z. Wang, X. Y. Li, T. Quan, J. H. Chung, S. Kang, and J. J. Voorhees, *J. Clin. Invest.*, 2000, **106**, 663–670.
34. R. M. Lavker, P. S. Zheng, and G. Dong, *J. Invest. Dermatol.*, 1987, **88**, 44s–51s.
35. R. Timpl, *Eur. J. Biochem.*, 1989, **180**, 487–502.
36. G. Boyer, C. Pailler Mattei, J. Molimard, M. Pericoi, S. Laquieze, and H. Zahouani, *Med. Eng. Phys.*, 2012, **34**, 172–178.
37. V. Lutz, M. Sattler, S. Gallinat, H. Wenck, R. Poertner, and F. Fischer, *Skin. Res. Technol.*, 2012, **18**, 168–179.
38. B. M. Kim, J. Eichler, K. M. Reiser, A. M. Rubenchik, and L. B. Da Silva, *Lasers. Surg. Med.*, 2000, **27**, 329–335.

**III. 4. Article #3**

**Investigating the relationship between changes  
of collagen fiber orientation during skin aging  
and collagen/water interactions  
by polarized-FTIR micro-imaging**

*The Analyst*, 140 (2015), pp. 6260-68

- Préambule à l'article #3

## **Contexte et objectif de l'étude**

Le processus du vieillissement cutané engendre des modifications structurales au niveau du réseau de collagène de type I, provoquant ainsi une perte d'élasticité de la peau. La stabilité de la structure du collagène est assurée par des molécules d'eau, jouant un rôle primordial dans l'architecture du réseau de collagène de type I dans la peau. Nous avons mis en évidence l'importance des molécules d'eau dans les changements d'orientation des fibres de collagène avec l'âge. Une approche combinant la micro-imagerie IR-TF en mode polarisé et la substitution, thermodynamiquement favorable, des molécules d'eau liées au collagène ( $H_2O$ ) par des molécules d'eau deutérée ( $D_2O$ ) a été adoptée dans cette étude.

## **Matériels et Méthodes**

Des échantillons de peaux jeunes (35 et 38 ans) et de peaux âgées (60 et 66 ans) ont été traités ou non avec du  $D_2O$  afin de remplacer l'eau liée au collagène. Des coupes fines ont été ensuite réalisées et analysées par micro-imagerie IR-TF en mode conventionnel (radiation IR non-polarisée) et en mode polarisé (radiation IR polarisée perpendiculairement à la surface de la peau). Une reconstruction des images spectrales IR à partir du ratio des aires intégrées des bandes Amide I ( $1590-1720\text{ cm}^{-1}$ ) / Amide II ( $1480-1590\text{ cm}^{-1}$ ) et une classification RBA (Redundancy-Based Algorithm)-FCM ont été réalisées afin d'évaluer les différences moléculaires et structurales. Enfin, des marqueurs spectroscopiques associés à l'eau liée dans le derme ont été déterminés à l'aide de la méthode Randfeatures.

## **Résultats**

Le traitement des échantillons de peaux jeunes au  $D_2O$  a permis de montrer une augmentation de la proportion des fibres de collagène à l'orientation perpendiculaire par rapport à la surface de la peau ; et une diminution de la proportion des fibres de collagène orientées parallèlement. Cependant, aucun changement n'a été observé pour des échantillons de peaux âgées lors de la substitution  $H_2O/D_2O$ , et cela quel que soit l'orientation des fibres de collagène. Des vibrations spectrales associées aux protéines ont été identifiées lors du traitement des deux

groupes d'âges au D<sub>2</sub>O. De plus, des vibrations supplémentaires ont été mises en évidence dans la gamme spectrale des carbohydrates (1000-1150 cm<sup>-1</sup>), uniquement dans des échantillons de peaux jeunes.

### **Conclusion**

D'un point de vue structural et moléculaire, nous avons montré que les échantillons de peaux jeunes sont plus affectés par la substitution H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O que les échantillons de peaux âgées. Cette étude permet une meilleure compréhension de la relation des molécules d'eau avec le réseau de collagène dont l'architecture est altérée au cours du vieillissement cutané.



## Analyst

PAPER

[View Article Online](#)  
[View Journal](#) | [View Issue](#)



Cite this: Analyst, 2015, 140, 6260

### Investigating the relationship between changes in collagen fiber orientation during skin aging and collagen/water interactions by polarized-FTIR microimaging†

Christophe Eklouh-Molinier,<sup>a,b</sup> Teddy Happillon,<sup>a,b</sup> Nicole Bouland,<sup>b,c</sup>  
Caroline Fichel,<sup>b,c</sup> Marie-Danièle Diébold,<sup>b,c</sup> Jean-François Angiboust,<sup>a,b</sup>  
Michel Manfait,<sup>a,b</sup> Sylvie Brassart-Pasco<sup>b,d</sup> and Olivier Piot<sup>\*a,b,e</sup>

<sup>a</sup>Equipe MéDIAN-Biophotonique et Technologies pour la Santé, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

<sup>b</sup>CNRS UMR7369 MEDyC, SFR Cap-Santé, Reims, France

<sup>c</sup>Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, UFR Médecine, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

<sup>d</sup>Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, CNRS UMR7369 MEDyC, SFR Cap-Santé, UFR Médecine, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

<sup>e</sup>Platform of Cellular and Tissular Imaging (PICT), Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

\*Corresponding author:

Pr. Olivier Piot

UMR CNRS/URCA n° 7369, UFR Pharmacie, 51 rue Cognac q-Jay, Reims, France

Tel.: +33 3 26 91 81 28; E-mail: olivier.piot@univ-reims.fr

## Abstract

Upon chronological aging, human skin undergoes structural and molecular modifications, especially at the level of type I collagen. This macromolecule is one of the main dermal structural proteins and presents several age-related alterations. It exhibits a triple helical structure and assembles itself to form fibrils and fibers. In addition, water plays an important role in stabilizing collagen triple helix by forming hydrogen-bonds between

collagen residues. However, the influence of water on changes of dermal collagen fiber orientation with age is not been yet understood. Polarized-Fourier Transform Infrared (P-FTIR) imaging is an interesting biophotonic approach to determine *in situ* the orientation of type I collagen fibers, as we have recently shown by comparing skin samples of different ages. In this work, P-FTIR spectral imaging was performed on skin samples from two age groups (35- and 38-year-old on one hand, 60- and 66-year-old on the other hand); and our analyses were focused on the effect of H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O substitution. Spectral data were processed with fuzzy C-means (FCM) clustering in order to distinguish different orientations of collagen fibers. We demonstrated that the orientation was altered with aging, and that D<sub>2</sub>O treatment, affecting primarily highly bound water molecules, is more marked for youngest skin samples. Collagen-bound water-related spectral markers were also highlighted. Our results suggest a weakening of water/collagen interactions with age. This non-destructive and label-free methodology allows to understand better the importance of bound water in collagen fiber orientation alterations occurring with skin aging. Obtaining such structural information could find benefits in dermatology as well as in cosmetics.

**Keywords:** P-FTIR imaging, skin aging, collagen, water, hydrogen-deuterium exchange

## **Introduction**

Skin is the largest organ of the human body and has many important functions such as protection against external aggressions and thermoregulation. This cutaneous structure is composed of three layers: the epidermis, the dermis and the hypodermis. The dermis is made up of two sub-layers: the superficial or papillary dermis, and the deep or reticular dermis. This dense conjunctive tissue is constituted of fibrous proteins like collagen and elastic fibers, and of non-fibrous components like proteoglycans (PGs) and cells. Type I collagen represents about 80% of skin dry mass and confers to the skin its strength and its resilience. Type I

collagen fibers are responsible of tensile properties of the skin; they are thin and poorly organized in the papillary dermis while thicker and well organized in the reticular dermis<sup>1</sup>.

During aging, skin undergoes several structural and molecular changes such as the appearance of wrinkles and the loss of elasticity. That is why it is the subject of much attention in dermatology as well as in cosmetology. Some studies reported an accelerated degradation and a decreased synthesis of type I collagen with age and that this loss of collagen leads to a dermal atrophy<sup>2, 3, 4</sup>. Furthermore, it has been demonstrated that the elastic fibers network was altered with aging<sup>5, 6</sup>. A loss of hydration due to changes in PGs content and localization was observed upon aging<sup>7</sup>.

Playing an important role in stabilizing collagen triple helix, water molecules form hydrogen-bonds between collagen residues<sup>8, 9</sup>. Xia et al. hypothesized that interactions between water molecules and PGs could influence the orientation of collagen fibers in the articular cartilage<sup>10</sup>. Besides, several recent studies using magnetic resonance imaging demonstrated that the articular cartilage presents a well-distinct anisotropy closely connected to collagen ultrastructure and, also that the interaction between water molecules and PGs could modulate the orientation of collagen fibers *via* the influence of bound water modifications<sup>11, 12</sup>. Indeed, water bound to collagen behaves differently than the bulk water and is involved in the formation of hydrogen bonds and water bridges between collagen triple helix residues<sup>13-15</sup>. Thus, it has been suggested that water molecules could have a crucial role in the stabilization of the conformation and the packing of collagen fibers in the articular cartilage<sup>16, 17</sup>.

Biophotonic techniques are potential tools to assess the orientation of collagen fibers. Polarized light microscopy (PLM) is one of the first developed techniques allowing morphology studies on collagen-rich tissues<sup>18-20</sup>. Some studies on skin have employed polarization sensitive-optical coherent tomography (PS-OCT) to reveal the molecular orientation of collagen fibers exhibiting some anisotropic properties such as birefringence<sup>21-24</sup>.

Second harmonic generation (SHG) technique is another emerging technique to investigate collagenous tissues by exploiting the specificity of collagen SHG signal. In addition, polarization-resolved imaging measurements permitted to determine the spatial distribution of the orientation of collagen fibers<sup>25-27</sup>. Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy is a vibrational technique which allows obtaining some structural information on oriented molecules like type I collagen when this biophotonic approach is combined to polarization measurements. Compared to previous techniques, FTIR has the advantage to probe the entire molecular composition of a complex sample such as cutaneous tissue. Indeed, some studies have shown the efficiency of this technique to compare collagen fiber orientation in normal and pathological articular tissue<sup>28-33</sup>. Recently, our group highlighted some changes in the orientation of dermal collagen with age by using polarized-FTIR (P-FTIR) imaging<sup>34</sup>. However, to the best of our knowledge, no studies have yet investigated the importance of water in collagen fiber orientation with skin aging.

In this work, skin samples from thirty- and sixty-years-old women were treated with deuterium oxide ( $D_2O$ ) to determine the influence of the bound water molecules in changes of collagen fiber orientation. Untreated and treated skin cryosections were analyzed by P-FTIR imaging. Spectral data were processed by fuzzy C-means (FCM) clustering to define the different layers of the skin and the different types of collagen fiber orientation within the dermis. Moreover, discriminant vibrations related to collagen/water interactions were highlighted for the two different-age skin samples by using discriminant wavenumber selection algorithm.

## **Materials & Methods**

### *Sample preparation*

Frozen abdominal skin samples were obtained from female Caucasian subjects in their thirties (35- and 38-year-old) and in their sixties (60- and 66-year-old), through BIOPREDIC International (Rennes, France) and were treated as described by Zhang et al. for H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O substitution<sup>9</sup>. Briefly, skin samples were immersed into 1 mL of distilled water for 24h and then into 1 mL of deuterium oxide (D<sub>2</sub>O, 99,9% isotopic purity, Sigma-Aldrich, France) for 24h. The first period in water aims at saturating all the interaction sites of the skin samples. Skin samples from the same age groups were also immersed into distilled water for 48h as controls. Control and deuterated samples were embedded in Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, France) and were immediately snap-frozen in liquid nitrogen. Five thin serial tissue cryosections (5 µm) were deposited on calcium fluoride (CaF<sub>2</sub>) windows. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was used as standard staining on adjacent skin sections (5 µm) to those dedicated to FTIR analysis. Three 5 µm-thick sections of rat-tail tendons (Sprague-Dawley rats aged 2 months) were prepared according to the same protocol than skin samples.

### *Polarized-FTIR imaging*

Spectral data were collected by using a Vertex 70 FTIR spectrometer coupled to a HYPERION 3000 FTIR microscope (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) controlled by the Opus 7.2 software and equipped with a 64x64 pixel Focal Plane Array (FPA) detector. FTIR spectral acquisitions were realized in transmission mode with a x15 Cassegrain objective and matching condenser lens. Cryosections of rat-tail tendon were aligned along the direction of x-axis of the motorized plate and spectral maps of 175x175 µm<sup>2</sup> were acquired in non-polarized mode and with IR radiation polarized perpendicular to the tendon orientation (*i.e.*,

x-axis direction). In such material, the collagen fibers are arranged and aligned longitudinally to the tendon length. For each skin cryosections, a final measuring area of 175x350  $\mu\text{m}^2$  mapped from the *stratum corneum* to the reticular dermis with a resolution of 2.7  $\mu\text{m}^2/\text{pixel}$ . It took about 3 minutes to record 8192 spectra. Polarization measurements were performed by inserting a polarizer in the incident IR beam. FPA imaging maps (n=5) were acquired for each tissue section whose the skin surface was oriented parallel to the x-axis of the motorized plate. To determine the spatial distribution of the collagen orientation, the polarization was chosen perpendicular to the skin surface. Each spectrum was recorded with 64 scans at a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ , on the 900-3800  $\text{cm}^{-1}$  spectral range. A background spectrum was recorded with 128 scans of accumulation on a blank part of the same CaF<sub>2</sub> window prior to spectral acquisitions. Each spectrum was rationed to the background spectrum in order to reduce any atmospheric effects and to obtain chemical features from the analyzed sample.

#### *Data analysis*

Spectral data were preprocessed by an automated method based on Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC) algorithm<sup>35</sup> implemented in the MATLAB 8.3 software (The Mathworks, USA). Briefly, EMSC allows to eliminate low signal/noise ratio spectra and to realize a baseline correction and normalization in order to compare spectra each other<sup>36, 37</sup>.

Subsequently, FCM clustering was used as statistical multivariate processing. FCM allows to assign each spectrum to every clusters with associated membership values comprised between 0 (no class membership) and 1 (highest degree of cluster membership)<sup>38</sup>. Consequently, a spectrum could belong to several clusters contrary to “hard” clustering techniques such as K-Means<sup>39</sup>. FCM images were constructed with redundancy-based algorithm (RBA) that presents the advantage to determine automatically the number of clusters<sup>38-40</sup>. FCM clustering were performed using home-made algorithms written in the MATLAB 8.3 software.

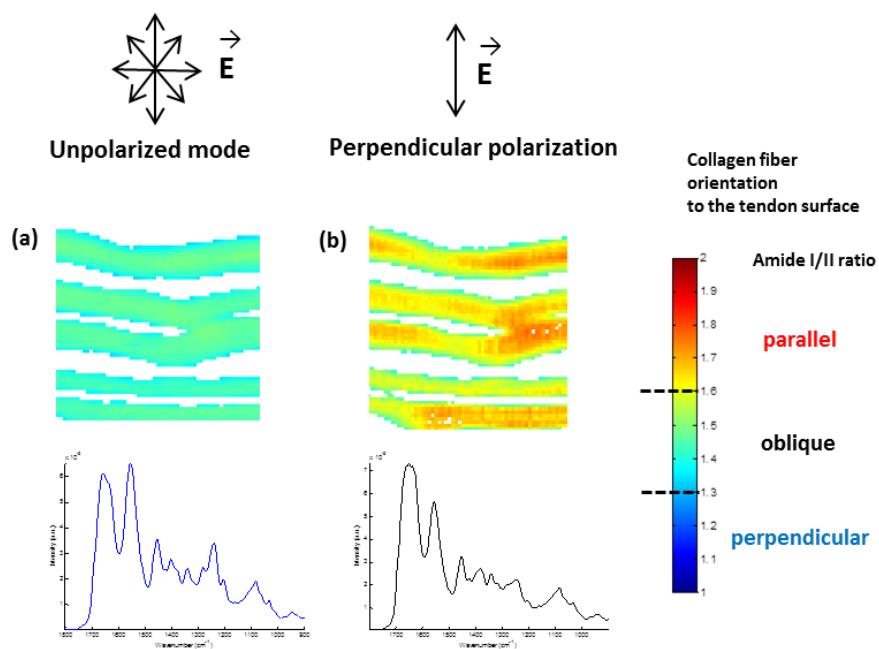
The randfeatures function was used to identify the most discriminant wavenumbers between 2 groups of spectral data<sup>42-44</sup>. This algorithm, based on a random selection of a pool of 15 wavenumbers, reduces the spectra dimension (751 wavenumbers in our case) to the 15 wavenumbers previously selected. Then, each spectrum is mean-centered by the subtraction of the mean spectrum of its group. A linear and supervised classification algorithm is then applied and returns, for each spectrum, a membership value towards each spectral group. A spectrum will be considered as well classified if its biggest membership value is attributed to the good category and if this value is over a Confidence Threshold (fixed in our case to 95%). The last step deals with the number of spectra well classified, according to the previous conditions. If this classification is over a Performance Threshold (fixed here to 95%), the subset of 15 wavenumbers randomly selected is considered as efficient for the distinction between the two spectral groups, and thus a corresponding score is incremented by one for each wavenumber. This procedure is then repeated with another random selection of 15 wavenumbers. It must be noted that a wavenumber can be chosen several times. The randfeatures function stops when 1000 subsets are retained. Finally, the scores of every wavenumbers can be analyzed by the user. Higher is a score, the more discriminant is the corresponding wavenumber. This discriminant wavenumber selection algorithm was written in the MATLAB 8.3 software.

## **Results**

### *P-FTIR spectral data analysis on rat-tail tendons*

As previously realized in other studies<sup>18, 34</sup>, rat-tail tendon was used as a reference sample to measure the effect of polarization on type I collagen IR signal. Reconstructed images and mean spectra revealed a change in the Amide I/Amide II ratio as a function of the polarization mode used. The Amide I/Amide II ratio presented a value of 1.4 without polarization, and

between 1.6 and 2 when the polarized IR radiation was perpendicular to the collagen fiber orientation probing mainly stretching vibration of C=O bands as shown in Fig. 1.



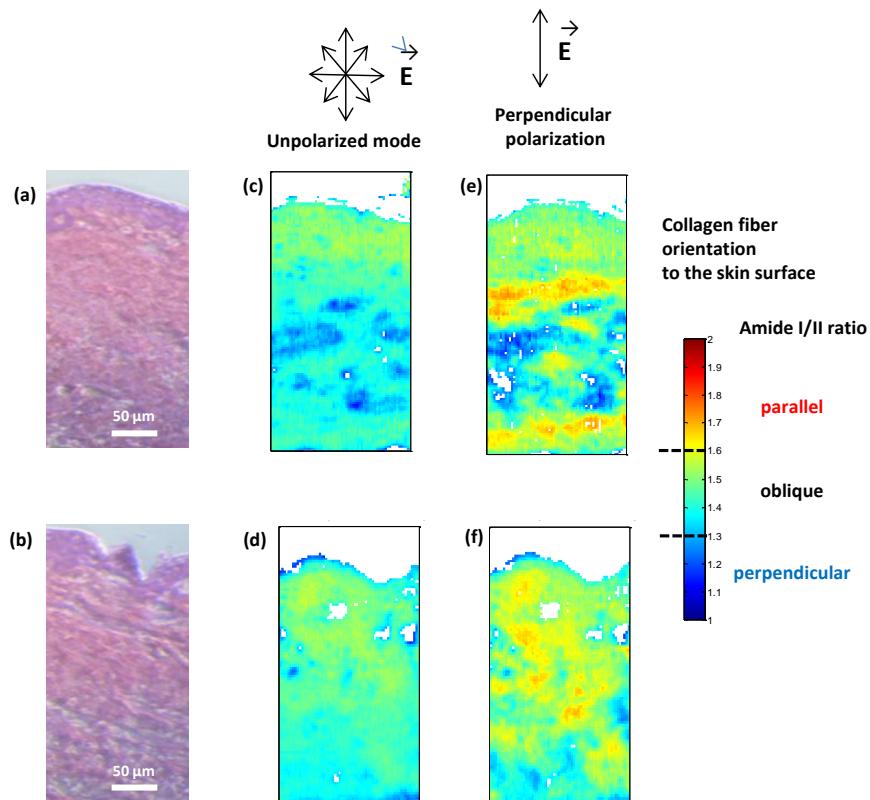
**Fig. 1:** FTIR imaging on rat-tail tendon section. Amide I/Amide II ratio-based reconstructed FTIR images and mean spectra in the non-polarized mode (a) and with the perpendicular polarization (b).

Indeed, the C=O stretching, the major vibration of the Amide I band, displays a transition moment preferentially oriented perpendicular to the collagen fiber long axis. Also, the C-N stretching and the N-H bending, which contribute to the Amide II band, possess a transition moment preferentially oriented parallel to the collagen fiber long axis. Thus, the Amide I/Amide II ratio is a potential indicator of the orientation of collagen fibers, as probed by P-FTIR, and was used for next analyses on skin samples.

#### *P-FTIR spectral data analysis on human skin samples*

Fig. 2(a) and 2(b) display H&E stained histological sections of the 35-year-old human skin sample, untreated and treated with D<sub>2</sub>O respectively. These morphological images permitted to visualize the main skin structures which are the epidermis and the dermis. Adjacent

sections were analyzed by FTIR imaging in a label-free manner. The presence of the  $1338\text{ cm}^{-1}$  vibration referred to the collagen integrity, showed that collagen were not degraded during treatment for all skin samples (data not shown)<sup>45, 46</sup>. Corresponding spectral FTIR images were constructed using the Amide I/Amide II integrated intensities ratio for the non-polarized [Fig. 2(c) and 2(d)] and for the perpendicular polarization [Fig. 2(e) and 2(f)].



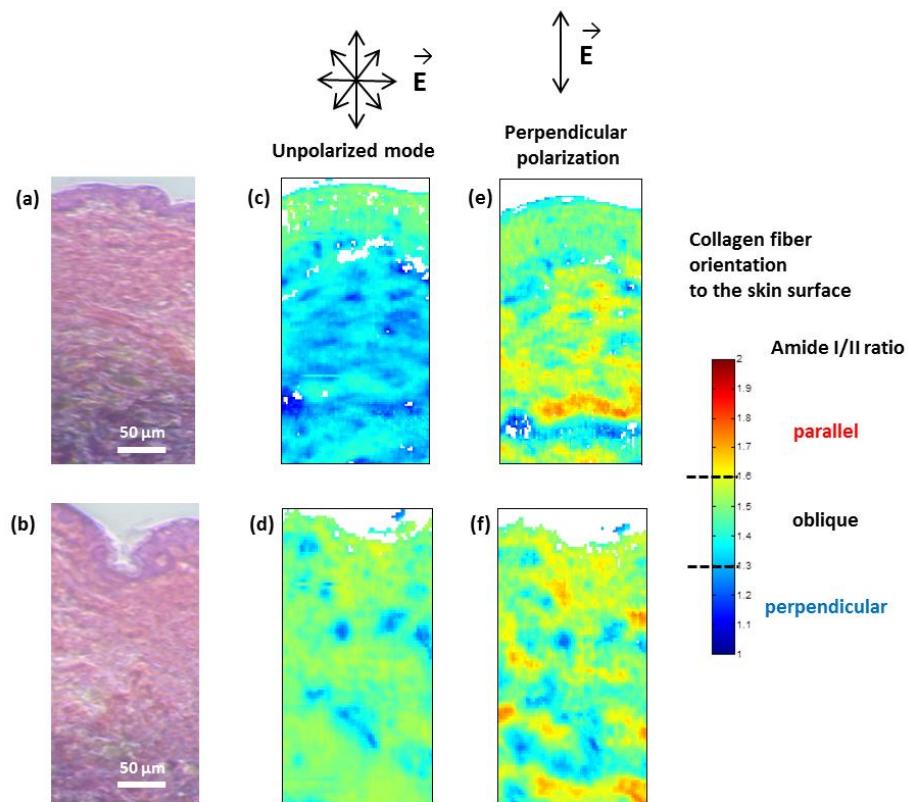
**Fig. 2: FTIR imaging on 35-year-old skin sections treated or not with  $\text{D}_2\text{O}$ .**

H&E stained adjacent tissue sections from untreated (a) and treated (b) skin sample. Corresponding Amide I/Amide II (integrated intensities:  $1590\text{-}1720\text{ cm}^{-1}/1480\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ ) ratio-based reconstructed FTIR images in the non-polarized mode (c, d) and with the perpendicular polarization (e, f). Scale bar =  $50\text{ }\mu\text{m}$ .

By comparing the images collected in non-polarized mode with those acquired in perpendicular polarization, it is noteworthy that the polarization of IR signal increased markedly the Amide I/Amide II ratio, permitting to enhance the image contrast and to reveal an orientation of the peptide bonds of the protein components (*i.e.*, mainly collagen) of the

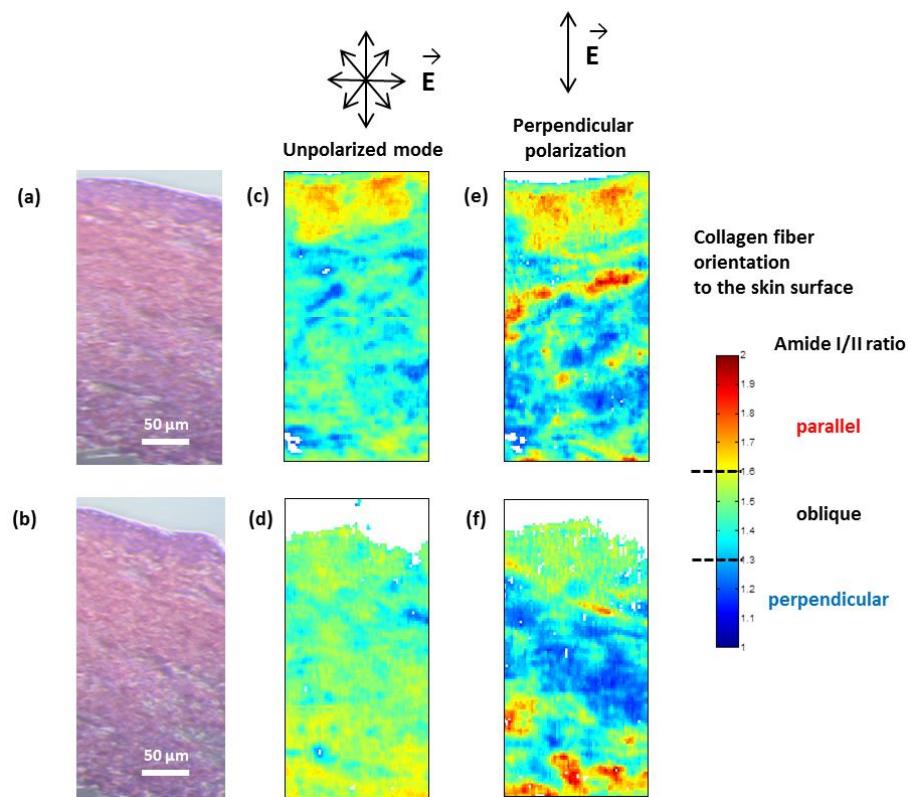
skin. Compared to the values obtained from tendon analyses, the color-scale was adjusted from 1 (blue) to 2 (red). Three categories of orientation can be distinguished: Amide I/Amide II ratio  $\geq 1.6$  corresponds to collagen fibers oriented parallel to the skin surface, and  $\leq 1.3$  to those oriented perpendicular to the skin surface. A value between 1.3 and 1.6 could be associated to an oblique orientation of collagen fibers.

The same methodology was also applied for the 38-, 60- and 66-year-old human skin samples, untreated [Fig. 3(a, c, e), Fig. 4(a, c, e) and Fig. 5(a, c, e)] and treated with D<sub>2</sub>O [Fig. 3(b, d, f), Fig. 4(b, d, f) and Fig. 5(b, d, f)].



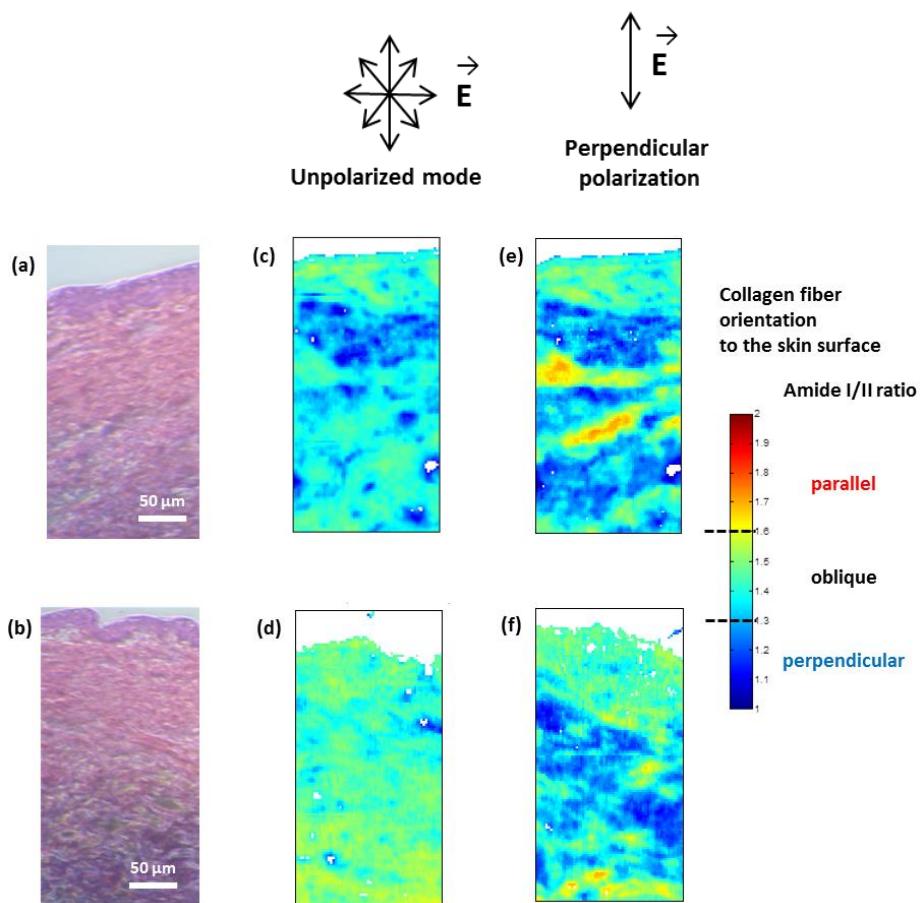
**Fig. 3: FTIR imaging on 38-year-old skin sections treated or not with D<sub>2</sub>O.**

H&E stained adjacent tissue sections from untreated (a) and treated (b) skin sample. Corresponding Amide I/Amide II (integrated intensities:  $1590\text{-}1720\text{ cm}^{-1}/1480\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ ) ratio-based reconstructed FTIR images in the non-polarized mode (c, d) and with the perpendicular polarization (e, f). Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 4: FTIR imaging on 60-year-old skin sections treated or not with  $\text{D}_2\text{O}$ .**

H&E stained adjacent tissue sections from untreated (a) and treated (b) skin sample. Corresponding Amide I/Amide II (integrated intensities:  $1590\text{-}1720 \text{ cm}^{-1}/1480\text{-}1590 \text{ cm}^{-1}$ ) ratio-based reconstructed FTIR images in the non-polarized mode (c, d) and with the perpendicular polarization (e, f). Scale bar =  $50 \mu\text{m}$ .

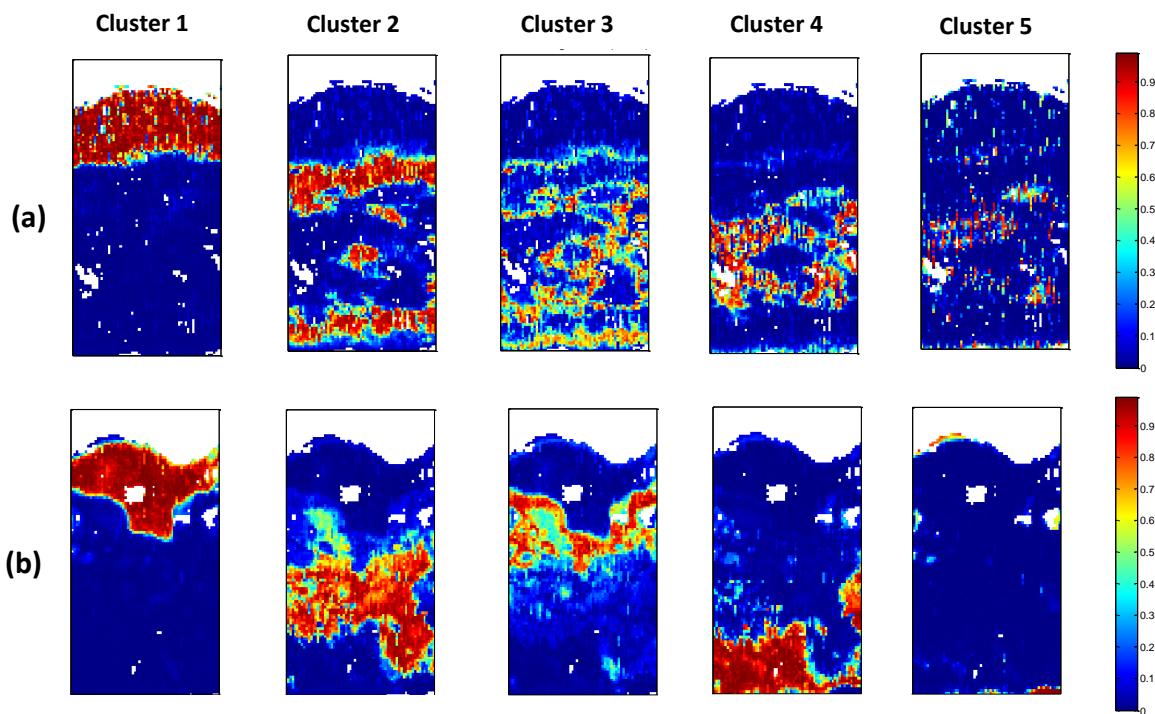


**Fig. 5: FTIR imaging on 66-year-old skin sections treated or not with D<sub>2</sub>O.**

H&E stained adjacent tissue sections from untreated (a) and treated (b) skin sample. Corresponding Amide I/Amide II (integrated intensities:  $1590\text{-}1720\text{ cm}^{-1}/1480\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$ ) ratio-based reconstructed FTIR images in the non-polarized mode (c, d) and with the perpendicular polarization (e, f). Scale bar = 50 µm.

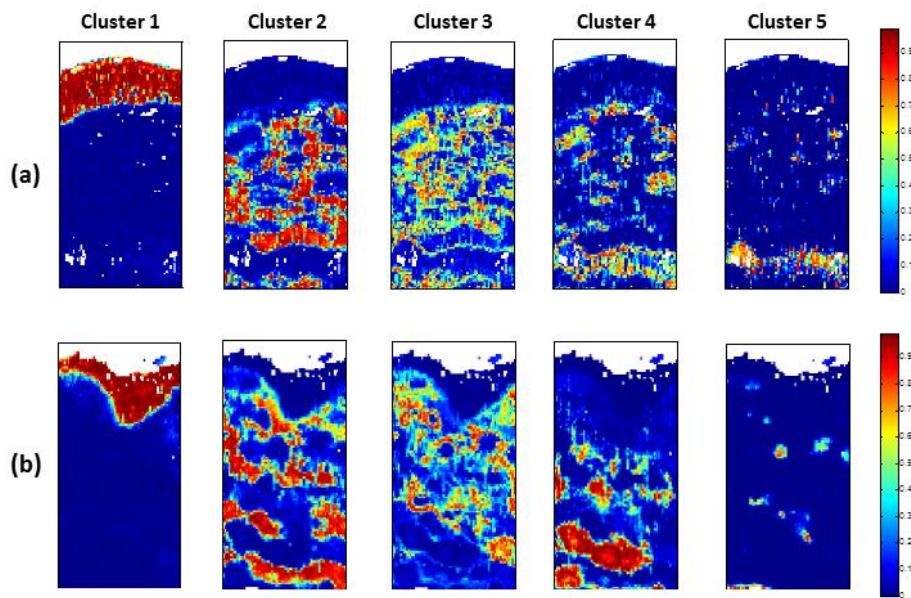
*Redundancy-based algorithm (RBA)-fuzzy C-means (FCM) clustering on FTIR spectral images*

In order to distinguish more precisely the different regions of the dermis, RBA-FCM clustering was performed to the perpendicular polarized FTIR data acquired from 35-year-old human skin sections, untreated and treated with D<sub>2</sub>O (Fig. 6).

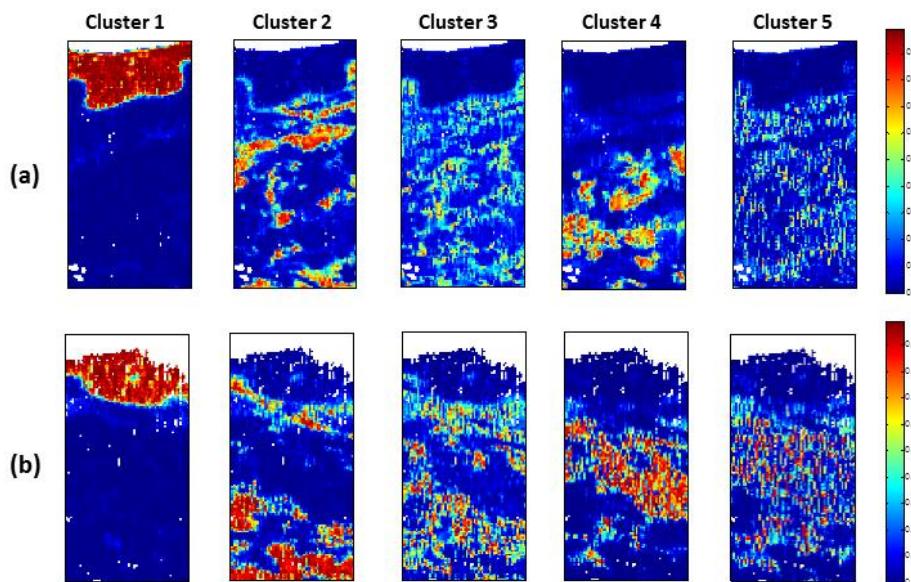


**Fig. 6:** FCM clustering on perpendicular polarized FTIR images from untreated (a) and treated with D<sub>2</sub>O (b) 35-year-old skin section. Assignment of the clusters: cluster 1 (epidermis); clusters 2, 3, 4 and 5 (dermis).

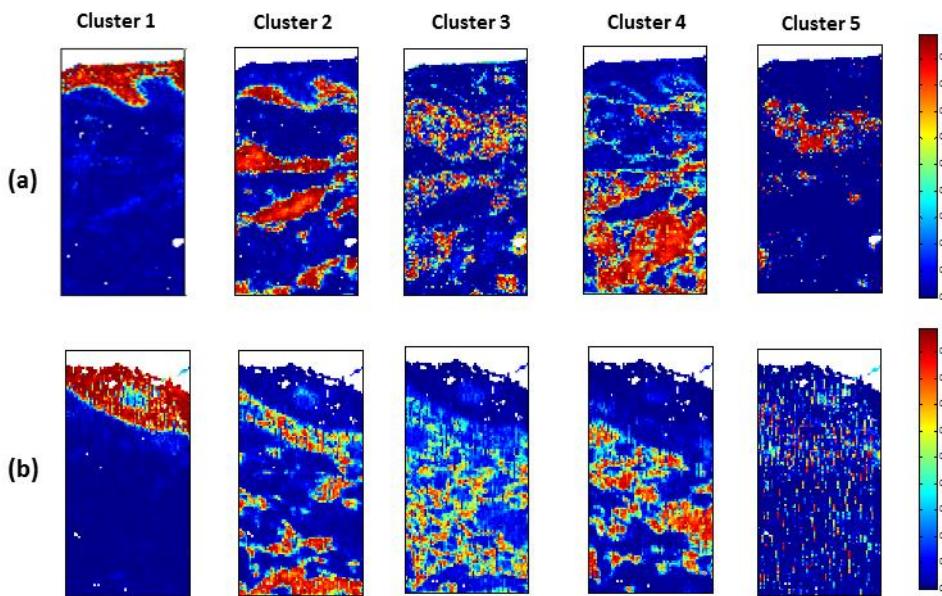
The same processing was applied on 38-, 60- and 66-year-old human skin sections, treated or not with D<sub>2</sub>O (Fig. 7, 8 and 9). With this automatic clustering, the cluster #1 represents the epidermis and clusters #2, 3, 4 and 5 are associated to the dermis. By comparing these latter images with those created from the Amide I/Amide II ratio, it appears that the clusters corresponding to dermis match quite well to different categories of collagen orientation. Thus, the cluster #2 can be associated to collagen fibers oriented parallel to the skin surface and, conversely, collagen fibers oriented perpendicular to the skin surface correspond to the cluster #4. Collagen fibers with an oblique orientation are found in the cluster #3. Presenting a marked spatial dispersion of pixels for all skin sections, having a low signal-to-noise ratio and being minority with regard to other clusters, the cluster #5 was not considered in the following results.



**Fig. 7:** FCM clustering on perpendicular polarized FTIR images from untreated (a) and treated with  $D_2O$  (b) 38-year-old skin section. Assignment of the clusters: cluster 1 (epidermis); clusters 2, 3, 4 and 5 (dermis).



**Fig. 8:** FCM clustering on perpendicular polarized FTIR images from untreated (a) and treated with  $D_2O$  (b) 60-year-old skin section. Assignment of the clusters: cluster 1 (epidermis); clusters 2, 3, 4 and 5 (dermis).



**Fig. 9:** FCM clustering on perpendicular polarized FTIR images from untreated (a) and treated with D<sub>2</sub>O (b) 66-year-old skin section. Assignment of the clusters: cluster 1 (epidermis); clusters 2, 3, 4 and 5 (dermis).

Table 1 summarizes the spatial repartition (in terms of relative proportion of pixels) of each orientation (parallel, perpendicular and oblique) of collagen fibers for different-age human skin samples, treated or not with D<sub>2</sub>O. Values were averaged on 5 cryosections for each skin sample.

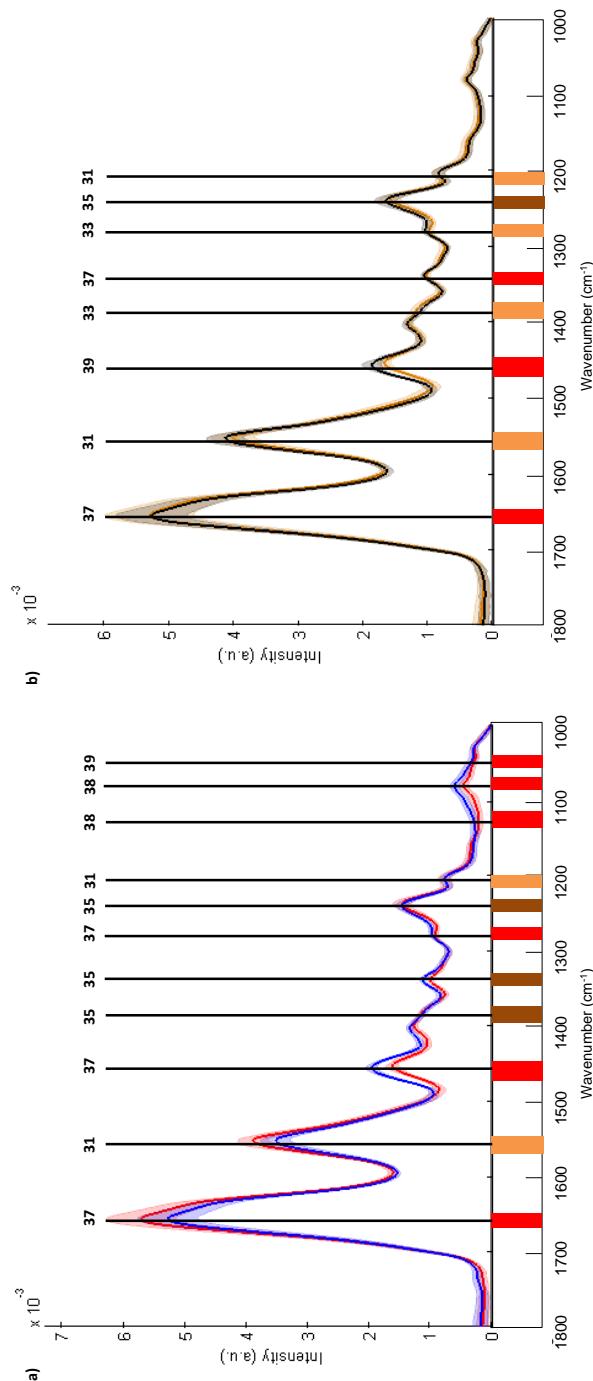
Collagen fiber orientation	Young skin samples (35- and 38-year-old)		Old skin samples (60- and 66-year-old)	
	- D <sub>2</sub> O		+ D <sub>2</sub> O	
	Parallel	Oblique	Parallel	Oblique
Parallel	36.7 ± 1.6 %	38.2 ± 2.2 %	39.7 ± 1.2 %	39.4 ± 2.1 %
Oblique	38.2 ± 1.9 %	27.5 ± 1.2 %	27.1 ± 2.7 %	26.4 ± 1.7 %
Perpendicular	25.1 ± 2.5 %	34.3 ± 1.6 %	33.2 ± 2.1 %	34.3 ± 1.2 %

**Table 1:** Quantitative analysis of different orientations (parallel, oblique and perpendicular) of collagen fibers in the different-age skin samples, untreated (- D<sub>2</sub>O) and treated (+ D<sub>2</sub>O) with D<sub>2</sub>O. The percentages were calculated from the number of pixels in the clusters associated to the different orientations. Standard deviations were obtained after averaging data collected on 5 analyzed sections for each skin sample.

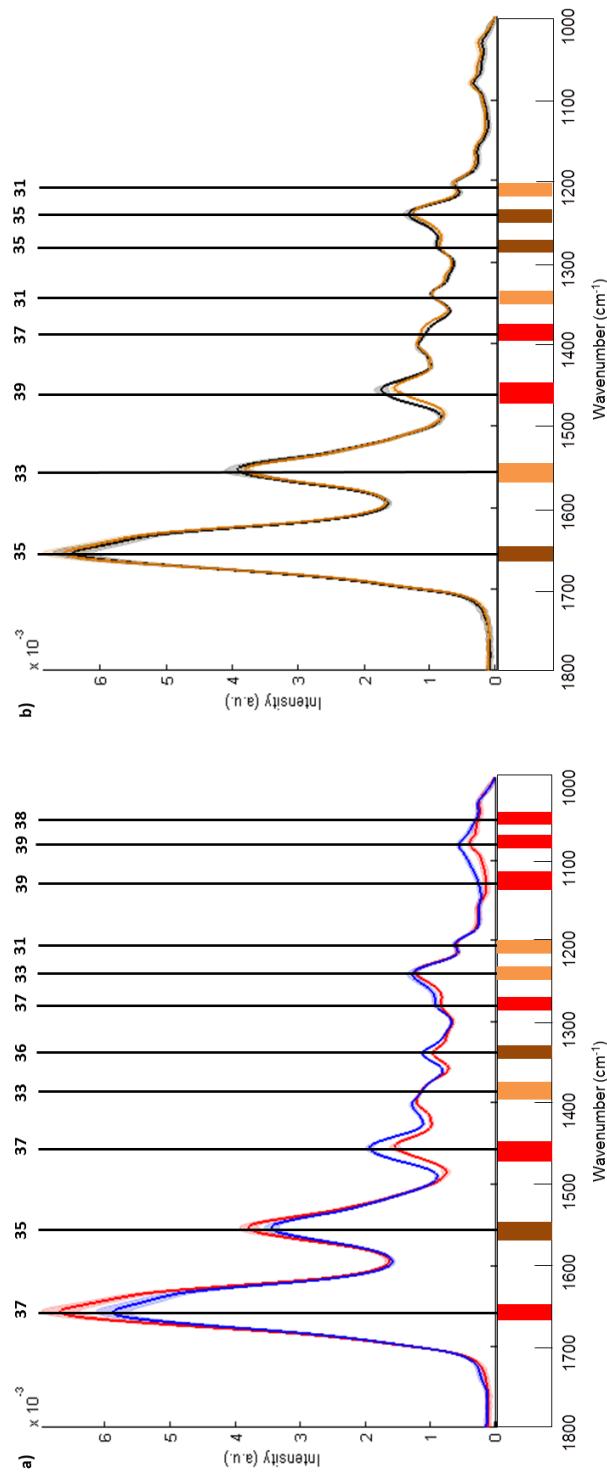
For the 35- and 38-year-old skin samples, results show an increase (from 25.1% to 34.3%) of the proportion of perpendicular orientations of collagen fibers (cluster #4), a decreasing trend (38.2% to 27.5%) of the proportion of oblique orientations (cluster #3), and no significant changes for parallel orientations (cluster #2) with D<sub>2</sub>O treatment. For the 60- and 66-year-old skin samples, no significant changes associated to the D<sub>2</sub>O treatment are noticed for any orientation of collagen fibers.

*Collagen-bound water-related spectral markers from different-age skin samples*

In order to identify vibrations associated to changes of collagen fiber orientation, extracted spectra from the cluster #4 (perpendicular oriented collagen fibers) of different-age and – treatment of skin samples were compared using the randfeatures algorithm. Due to significant differences as previously presented in Table 1, only the cluster #4 was considered in this analysis. A selection of 3000 spectra, extracted from the 5 different cryosections for each skin sample and equally distributed between the untreated and the D<sub>2</sub>O-treated skin samples, was performed. Fixing a score > 30, 11 and 8 most discriminant wavenumbers were retained respectively for the 35-year-old [Fig. 10(a)] and for the 66-year-old skin samples [Fig. 10(b)], and were arranged in the form of spectral color barcode according to the discrimination level of the scores.



**Fig. 10:** Discriminant wavenumbers identified by using randfeatures algorithm in perpendicular oriented collagen fibers, (a) between D<sub>2</sub>O-untreated (in red) and treated (in blue) 35-years-old dermal skin samples and (b) D<sub>2</sub>O-untreated (in orange) and treated (in black) 66-years-old dermal skin samples. Respective scores are indicated above color-coded discriminant wavenumbers according to their discrimination level (30-33: orange; 34-36: brown;  $\geq 37$ : red).



**Fig. 11:** Discriminant wavenumbers identified by using randfeatures algorithm in perpendicular oriented collagen fibers, (a) between D<sub>2</sub>O-untreated (in red) and treated (in blue) 38-years-old dermal skin samples and (b) D<sub>2</sub>O-untreated (in orange) and treated (in black) 60-years-old dermal skin samples. Respective scores are indicated above color-coded discriminant wavenumbers according to their discrimination level (30-33: orange; 34-36: brown;  $\geq 37$ : red).

The same procedure was also applied on 38- and 60-year-old human skin sections, giving similar results (Fig. 11). The color codes were used as followed: *orange* for the less discriminant wavenumbers (scores between 30 and 33); *brown* for the intermediate discriminant (scores between 34 and 36); and *red* for the most discriminant (scores  $\geq 37$ ). It can be noted that 8 wavenumbers in  $1650\text{ cm}^{-1}$ ,  $1555\text{ cm}^{-1}$ ,  $1455\text{ cm}^{-1}$ ,  $1390\text{ cm}^{-1}$ ,  $1330\text{ cm}^{-1}$  and between  $1300$  and  $1200\text{ cm}^{-1}$ , were found common to the skin types. They correspond mainly to the vibrations specific of proteins. Besides, three additional discriminant wavenumbers in  $1120\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080\text{ cm}^{-1}$  and  $1050\text{ cm}^{-1}$ , corresponding to carbohydrates vibrations, were found exclusively in the young skin sample. Their peak position and molecular attribution are summarized in Table 2.

Peak position ( $\text{cm}^{-1}$ )	Possible vibrations	Assignments
1650	Amide I (C=O stretch)	Proteins
1550	Amide II (C-N stretch, N-H bend)	Proteins
1455	C-H bend	Proteins
1390	C-H and N-H bend	Proteins
1340	$\text{CH}_2$ wagging	Proteins
1280	Amide III (C-N stretch, N-H bend)	Proteins
1240	Amide III (C-N stretch, N-H bend)	Proteins
1205	Amide III (C-N stretch, N-H bend)	Proteins
1115	C-O stretch, C-O bend	Carbohydrates
1080	C-O stretch, C-O bend	Carbohydrates
1030	C-O stretch, C-O bend	Carbohydrates

**Table 2:** FTIR spectral peak attributions.

## Discussion

Understanding the interaction between dermal collagen network and its surrounding environment is of interest to gain insight on molecular and functional changes undergone by

the cutaneous tissue during aging. Type I collagen is the main macromolecule of the dermis able to form a fibrous network and is strongly involved in the mechanical properties of the skin as well as in its hydration. Indeed, water plays a crucial role for maintaining the assembly formed by collagen macromolecules. Most of water molecules are tightly bound to proteins and consequently intervene in the skin microstructure. Apart these interacting water molecules, there are water molecules, called bulk or tetrahedron water, not bound to proteins but more likely bound to each other<sup>47</sup>. Treatment by heavy water is a way to investigate the water/collagen interactions as previously used to observe changes of the collagen model peptides stability and to highlight hydration forces between collagen triple helices<sup>48, 49</sup>. More recently, other groups realized H/D exchange on different tissues such as skin, pericardium and bone in order to remove primarily water molecules bound to collagen fibers<sup>9, 50, 51</sup>. Substitution of bound water molecules by D<sub>2</sub>O is possible due to the respective thermodynamic properties of water and heavy water. Indeed, although these two molecules have a similar size, deuterium bonds are stronger than hydrogen bonds with dissociation energies of 6.53 kJ mol<sup>-1</sup> and 5.52 kJ mol<sup>-1</sup>, respectively, according to theoretical models<sup>52, 53</sup>. In our study, the effect of H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O substitution was considered by studying the collagen fibers orientation, structural information that can be probed within skin specimens by exploiting the polarization of the IR radiation<sup>34, 41</sup>. Such changes of behavior of collagen network observed between skins of different ages are very likely to be linked with a degradation of the mechanical properties, whose one of the visible signs is the appearance of wrinkles. Our approach relies on a quantification of the effect of H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O substitution on collagen orientation by comparing skins from two different age groups.

A particular statistical clustering method (RBA-FCM) was used to overcome the inconvenient of more classical techniques such as K-Means which the result is highly dependent of the number of the clusters chosen by the operator. In RBA-FCM processing, the number of clusters is automatically determined facilitating the comparison of samples since it

is not subject to the operator interpretation. Thus, distinct parts associated to different orientations of collagen fibers were highlighted in the dermis: parallel (cluster #2), oblique (cluster #3), and perpendicular (cluster #4) to the skin surface. It is worth noting that pixel spatial distributions of parallel and perpendicular orientations appear to be packed, whereas that of the oblique orientation seems to be sparse. Concerning the cluster associated to the parallel oriented collagen fibers, the quantitative results were obtained by taking into account both the papillary dermis and a part of the reticular dermis. The examination of the FCM images (cluster #2) showed that the part corresponding to the papillary dermis decreases in the samples of the oldest group, which is consistent with the loss of papillary dermal compartment observed during aging<sup>54</sup>.

Thereafter, regarding the impact of D<sub>2</sub>O treatment, in the youngest skins, the H/D exchange led to favor perpendicular orientation of collagen fibers at the expense of oblique orientation. On the contrary, the D<sub>2</sub>O treatment appears to not affect significantly the proportions of different orientations of collagen fibers in the old skin samples. These observations could reflect differences between the age groups in the number of water molecules bound to collagen and also in their interaction strength. It is hard to study in details the involved molecular mechanisms; additional experimental approaches would be required to assess thermodynamics behaviors of water molecules interacting with macromolecular proteins by using for example dynamic vapor sorption and scanning electron microscopy to study simultaneously the organization of collagen network at the nanoscale<sup>9, 55</sup>. Here, our objective was humbly to show the sensitivity of FTIR imaging in highlighting specific behaviors for skin samples of different ages. We focused our interpretation on the collagen that is by far the main component of the dermis. We demonstrated from reference tendon samples that P-FTIR is a very sensitive to probe collagen fibers orientation. However, another macromolecular component, elastin, is known to be affected by ageing and also to be directly involved in the skin mechanical properties<sup>56</sup> even though the elastic fiber network represents

only 5% of the dermis dry mass. By analyzing nuchal bovine ligament, we checked that FTIR signal of elastin appeared to be much less sensitive to the polarization of the incident beam than collagen (data not shown). Consequently, elastic fibers were not considered in our data interpretation but it would deserve to bring attention to it, possibly by investigating their spatial distribution thanks to their intrinsic fluorescent properties by using multiphoton microscopy<sup>57</sup>.

In addition, to determine the relative proportion of the different collagen fiber orientations, infrared wavenumbers affected by the D<sub>2</sub>O treatment were identified using statistical processing. Obviously, protein vibrations are pinpointed for the two age groups. But interestingly, vibrations were highlighted in the 1000-1150 cm<sup>-1</sup> range for the youngest skin samples. This latter spectral region is often associated to sugars originating from advanced glycation end-products<sup>40, 58</sup>, from PGs<sup>29, 32</sup>, and in a much less extent to nucleic acids<sup>59, 60</sup>. As PGs represent the major part of carbohydrates in the dermis, their interaction with collagen fibers is very probably altered during the H/D exchange. These results are consistent with the involvement of GAG in collagen hydration. Indeed, GAGs from PGs have a key-role in skin regarding to their ability to bind up to 1000 times their volume in water, due to their high polarity. Therefore, skin hydration is highly correlated to the content and distribution of dermal GAGs<sup>61</sup>. Recently, Li et al. demonstrated that the size of GAG chain of decorin, the most abundant PGs in human dermis, was reduced in sun-protected old skin compared to young skin<sup>62</sup>. Alterations of this GAG entity of decorin could explain the lack of interaction between water molecules and GAGs in old dermis skin and could contribute to skin fragility of elderly people. Playing a crucial role in the hydration of collagen fibers, PGs could therefore affect the structure but also the orientation of the collagen fibers in young skin. PGs may less interact with collagen with age and consequently lead to a decrease in the hydration of collagen fibers. This latter could be related to the changes of orientation of collagen fibers demonstrated in our study.

In this study, various methodological approaches of sample preparation (heavy water substitution), of data acquisition (polarization mode) or of data processing (automatic clustering and discriminant wavenumbers selection), were applied to investigate alterations of the dermis associated to the chronological aging at the molecular level. Similar approaches could be used in other issues without complicated adaptation, such as in the context of photoaging where water structure and interactions with proteins and GAGs were demonstrated by Gniadecka et al.<sup>63</sup> to be altered in photo-aged skins; and also in more medical issues such as age-related diseases like diabetes. In addition, they could be of interest the characterization of skin cancer, as shown in a recent study reporting that the *in vivo* determination of water content by using vibrational Raman spectroscopy may contribute to differentiate between tumor and healthy tissue<sup>64</sup>.

## **Conclusion**

This study exhibits the potential of P-FTIR microimaging associated to advanced statistical clustering methods to probe changes of collagen fibers orientations between skin samples of different ages. Recent devices equipped with FPA matricial detectors make feasible in routine use of the technique by reducing considerably the acquisition time of tissue samples. D<sub>2</sub>O treatment affects significantly only the youngest skin samples, quite possible *via* PG involvement. This methodology is promising for a better insight on relationship between water molecules and collagen fiber organization upon chronological aging, bringing a potential added value as well in cosmetics as in dermatology.

## **Acknowledgements**

C. Eklouh-Molinier is a recipient of a doctoral fellowship of the Region Champagne-Ardenne (projet VITALITE). The project VITALITE is co-funded by the European Union. The Europe

is committed in Champagne-Ardenne through the European Funds for Regional Development (FEDER). The authors would like to thank the Région Champagne-Ardenne (projet VITALITE) and the Platform of Cellular and Tissular Imaging (PICT) are also grateful acknowledged for the equipment availability.

## References

1. F. H. Silver, J. W. Freeman, and D. DeVore, *Skin Res. Technol.*, 2001, **7**, 18–23.
2. S. Shuster, M. M. Black, and E. McVitie, *Br J Dermatol.*, 1975, **93**, 639–643.
3. C. Escoffier, J. de Rigal, A. Rochefort, R. Vasselet, J. L. Leveque, and P. G. Agache, *J Invest Dermatol*, 1989, **93**, 353–357.
4. L. Rittié, and G.J. Fisher, *Ageing Res Rev*, 2002, **1**, 705-720.
5. I. Pasqueli-Ronchetti, and M. Baccarani-Contri, *Microsc Res Tech*, 1997, **38**, 428-435.
6. S. Imayama, and I.M. Braverman, *Am J Pathol*, 1989, **134**, 1019-25.
7. D.A. Carrino, J.M. Sorrell, and A.I. Caplan, *Arch Biochem Biophys*, 2000, **373**, 91-101.
8. J. Bella, B. Brodsky, and H.M. Berman, *Structure*, 1995, **3**, 893-906.
9. Q. Zhang, K. L. Andrew Chan, G. Zhang, T. Gillece, L. Senak, D. J. Moore, R. Mendelsohn, and C. R. Flach, *Biopolymers*, 2011, **95**, 607–615.
10. Y. Xia, J. B. Moody, N. Burton-Wurster, and G. Lust, *Osteoarthr. Cartil.*, 2001, **9**, 393–406.
11. Y. Xia, *Magn. Reson. Med.*, 1998, **39**, 941–949.

12. M. T. Nieminen, J. Töyräs, J. Rieppo, J. M. Hakumäki, J. Silvennoinen, H. J. Helminen, and J. S. Jurvelin, *Magn. Reson. Med.*, 2000, **43**, 676–681.
13. J. Bella, M. Eaton, B. Brodsky, and H. M. Berman, *Science*, 1994, **266**, 75–81.
14. R. Z. Kramer, L. Vitagliano, J. Bella, R. Berisio, L. Mazzarella, B. Brodsky, A. Zagari, and H. M. Berman, *J. Mol. Biol.*, 1998, **280**, 623–638.
15. G. Melacini, A. M. Bonvin, M. Goodman, R. Boelens, and R. Kaptein, *J. Mol. Biol.*, 2000, **300**, 1041–49.
16. I. G. Mogilner, G. Ruderman, and J. R. Grigera, *J. Mol. Graph. Model.*, 2002, **21**, 209–213.
17. L. V. Krasnosselskaia, G. D. Fullerton, S. J. Dodd, and I. L. Cameron, *Magn. Reson. Med.*, 2005, **54**, 280–288.
18. X. Bi, G. Li, S. B. Doty, and N. P. Camacho, *Osteoarthr. Cartil.*, 2005, **13**, 1050–8.
19. S. K. de Visser, J. C. Bowden, E. Wentrup-Byrne, L. Rintoul, T. Bostrom, J. M. Pope, and K. I. Momot, *Osteoarthr. Cartil.*, 2008, **16**, 689–697.
20. J. F. Ribeiro, E. H. M. dos Anjos, M. L. S. Mello, and B. de Campos Vidal, *PLoS One*, 2013, **8**, 54724.
21. C. E. Saxer, J. F. de Boer, B. H. Park, Y. Zhao, Z. Chen, and J. S. Nelson, *Opt. Lett.*, 2000, **25**, 1355–7.
22. M. C. Pierce, J. Strasswimmer, B. H. Park, B. Cense, and J. F. de Boer, *J. Invest. Dermatol.*, 2004, **123**, 458–463.

23. S. Sakai, M. Yamanari, A. Miyazawa, M. Matsumoto, N. Nakagawa, T. Sugawara, K. Kawabata, T. Yatagai, and Y. Yasuno, *J. Invest. Dermatol.*, 2008, **128**, 1641–47.
24. S. Sakai, M. Yamanari, Y. Lim, N. Nakagawa, and Y. Yasuno, *Biomed. Opt. Express*, 2011, **2**, 2623.
25. R. M. Williams, W. R. Zipfel, and W. W. Webb, *Biophys. J.*, 2005, **88**, 1377–86.
26. I. Gusachenko, G. Latour, and M.-C. Schanne-Klein, *Opt. Express*, 2010, **18**, 19339–52.
27. I. Gusachenko, V. Tran, Y. G. Houssen, J. M. Allain, and M. C. Schanne-Klein, *Biophys. J.*, 2012, **102**, 2220–29.
28. N. Ramakrishnan, Y. Xia, and A. Bidthanapally, *Phys. Med. Biol.*, 2007, **52**, 4601–14.
29. Y. Xia, N. Ramakrishnan, and A. Bidthanapally, *Osteoarthr. Cartil.*, 2007, **15**, 780–788.
30. X. Bi, X. Yang, M. P. G. Bostrom, D. Bartusik, S. Ramaswamy, K. W. Fishbein, R. G. Spencer, and N. P. Camacho, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **387**, 1601–12.
31. N. Ramakrishnan, Y. Xia, and A. Bidthanapally, *J. Orthop. Surg. Res.*, 2008, **3**, 48.
32. J. H. Yin, Y. Xia, and N. Ramakrishnan, *Vib. Spectrosc.*, 2011, **57**, 338–341.
33. J. H. Lee, and Y. Xia, *Microsc. Res. Tech.*, 2013, **76**, 625–632.
34. T. T. Nguyen, C. Eklouh-Molinier, D. Sebisveradze, J. Feru, C. Terryn, M. Manfait, S. Brassart-Pasco, and O. Piot, *Analyst*, 2014, **139**, 2482–8.

35. A. Kohler, C. Kirschner, A. Oust, and H. Martens, *Appl. Spectrosc.*, 2005, **59**, 707–716.
36. E. Ly, O. Piot, R. Wolthuis, A. Durlach, P. Bernard, and M. Manfait, *Analyst*, 2008, **133**, 197–205.
37. J. Nallala, O. Piot, M.-D. Diebold, C. Gobinet, O. Bouche, M. Manfait, and G. D. Sockalingum, *Cytometry. A*, 2013, **83**, 294–300.
38. D. Sebiskveradze, V. Vrabie, C. Gobinet, A. Durlach, P. Bernard, E. Ly, M. Manfait, P. Jeannesson, and O. Piot, *Lab. Investig.*, 2011, **91**, 799–811.
39. S. M. Ali, F. Bonnier, K. Ptasiński, H. Lambkin, K. Flynn, F. M. Lyng and H. J. Byrne, *Analyst*, 2013, **138**, 3946–56.
40. M. Guilbert, C. Eklouh-Molinier, K. Wehbe, J. Sulé-Suso, Y. Yang, G. Cinque, P. Jeannesson, and G. D. Sockalingum, *J. Biomed. Opt.*, 2014, **19**, 111612.
41. C. Eklouh-Molinier, T. T. Nguyen, D. Sebiskveradze, J. Feru, N. Bouland, C. Terryn, M. Manfait, S. Brassart-Pasco, and O. Piot, *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 2014, **3**, 281–286.
42. H. Liu, and H. Motoda, Feature Selection for Knowledge Discovery and Data Mining, Kluwer Academic Publishers: Norwell, MA, USA, 1998.
43. D. T. Ross, U. Scherf, M. B. Eisen, C. M. Perou, C. Rees, P. Spellman, V. Iyer, S. S. Jeffrey, M. Van de Rijn, M. Waltham, A. Pergamenschikov, J. C. Lee, D. Lashkari, D. Shalon, T. G. Myers, J. N. Weinstein, D. Botstein, and P. O. Brown, *Nat Genet*, 2000, **24**, 227–235.

44. T. T. Nguyen, T. Happillon, J. Feru, S. Brassart-Passco, J. F. Angiboust, M. Manfait, and O. Piot, *J. Raman Spectrosc.*, 2013, **44**, 1230–37.
45. M. Jackson, L.P. Choo, P.H. Watson, W.C. Halliday, and H.H Mantsch, *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1270**, 1-6.
46. P.A. West, P.A. Torzilli, C. Chen, P. Lin, and N.P. Camacho, *J Biomed Opt.*, 2005, **10**, 14015.
47. M. Gniadecka, O. F. Nielsen, D. H. Christensen, and H. C. Wulf, *J. Invest. Dermatol.*, 1998, **110**, 393–398.
48. K. Mizuno, and H. P. Bächinger, *Biopolymers*, 2010, **93**, 93–101.
49. S. Leikin, V. A. Parsegian, W. Yang, and G. E. Walrafen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 11312–17.
50. M. Jastrzebska, R. Wrzalik, A. Kocot, J. Zalewska-Rejdak, and B. Cwalina, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2003, **14**, 185–197.
51. M. Unal, S. Yang, and O. Akkus, *Bone*, 2014, **67**, 228–236.
52. G. Nemethy, and H. A. Scheraga, *J. Chem. Phys.* 1962, **36**, 3382.
53. G. Nemethy, and H. A. Scheraga, *J. Chem. Phys.*, 1964, **41**, 680-689.
54. D. G. Janson, G. Saintigny, A. van Adrichem, C. Mahé, and A. El Ghalbzouri, *J. Invest. Dermatol.*, 2012, **132**, 2565–72.
55. C.R. Lovell, K.A. Smolenski, V.C. Duance, N.D. Light, S. Young, and M. Dyson, *Br. J. Dermatol.*, 1987, **117**, 419-428.

56. V.L. Chen, R. Fleischmajer, E. Schwartz, M. Palaia, and R. Timpl, *J. Invest. Dermatol.*, 1986, **87**, 334-337
57. J.-C. Pittet, O. Freis, M.-D. Vazquez-Duchêne, G. Périé and G. Pauly, *Cosmetics*, 2014, **1**, 211–221.
58. G. Birarda, E. Holman, S. Fu, and K. Weikel, *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 2013, **2**, 301–315.
59. S. E. Holton, M. J. Walsh, A. Kajdacsy-Balla, and R. Bhargava, *Biophys. J.*, 2011, **101**, 1513–21.
60. D. R. Whelan, K. R. Bambery, P. Heraud, M. J. Tobin, M. Diem, D. McNaughton, and B. R. Wood, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **39**, 5439–48.
61. E. F. Bernstein, C. B. Underhill, P. J. Hahn, D. B. Brown, and J. Uitto, *Br. J. Dermatol.*, 1996, **135**, 255–262.
62. Y. Li, Y. Liu, W. Xia, D. Lei, J. J. Voorhees, and G. J. Fisher, *Sci. Rep.*, 2013, **3**, 2422.
63. M. Gniadecka, O. F. Nielsen, S. Wessel, M. Heidenheim, D. H. Christensen, and H. C. Wulf, *J. Invest. Dermatol.*, 1998, **111**, 1129–33.
64. E. M. Barroso, R. W. H. Smits, T. C. Bakker Schut, I. Ten Hove, J. a Hardillo, E. B. Wolvius, R. J. Baatenburg de Jong, S. Koljenović and G. J. Puppels, *Anal. Chem.*, 2015.

### **III. 5. Etude complémentaire**

## **Analyse de l'impact du vieillissement cutané sur les interactions collagène/eau par gravimétrie et micro-spectroscopie Raman**

Précédemment, nous avons pu mettre en évidence des changements structuraux dans le réseau de collagène au sein de coupes de peau d’âges différents par micro-imagerie infrarouge en mode polarisé. Cette approche nous a également permis d’évaluer les relations entre les changements d’orientation des fibres de collagène et les interactions entre les fibres de collagène et les molécules d’eau. Cependant, le réseau de collagène observé dans les coupes congelées de peau ne constitue qu’une projection de la distribution des fibres de collagène dans un plan. Pour une analyse plus complète, il est nécessaire de travailler directement sur des blocs de peau excisée. Dans ce travail, nous avons employé la micro-spectroscopie de diffusion Raman et la gravimétrie d’adsorption de vapeur d’eau (*DVS* pour *Dynamic Vapor Sorption*) afin de quantifier la teneur en molécules d’eau liées au collagène dans des explants de peaux d’âges différents.

#### **III. 5. 1. Introduction**

Comme nous l’avons décrit précédemment (*cf.* Chapitre I.1.3.2.1.), l’eau fait partie intégrante de la structure en triple hélice du collagène. Jusqu’à maintenant, la structure de l’eau environnante du collagène a été étudiée par différentes techniques telles que la calorimétrie différentielle et la résonnance magnétique nucléaire. Or, il existe deux principaux types d’eau dans le derme : l’eau liée, répartie en eau fortement liée (eau liée primaire ou structurale du collagène) et en eau partiellement liée (eau liée secondaire du collagène) ; et l’eau non liée (eau libre) (106, 107). Outre la quantification de l’eau totale, la possibilité de différencier l’eau liée au collagène de l’eau libre apparaît importante pour une évaluation précise du rôle fonctionnel de l’eau dans la peau.

Dans cette étude, des blocs de peaux excisées d’âges différents ont été tout d’abord analysés par DVS. L’obtention des isothermes par cette technique nous a permis de mettre en évidence des différences entre les types d’eau interagissant avec le tissu dermique. Par la

suite, les échantillons ont été incubés dans des différents mélanges H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O et analysés par micro-spectroscopie Raman. Le D<sub>2</sub>O permet de remplacer l'eau liée au collagène pour des raisons thermodynamiques. Cette substitution a déjà été utilisée dans différents tissus tels que le péricarde, l'os et la peau (58, 108, 109). Cette méthodologie nous a permis de suivre le taux de chaque type d'eau dans les échantillons de peau d'âges différents avec une concentration croissante en D<sub>2</sub>O.

### **III. 5. 2. Matériels et méthodes**

#### ***III. 5. 2. 1. Préparation des échantillons***

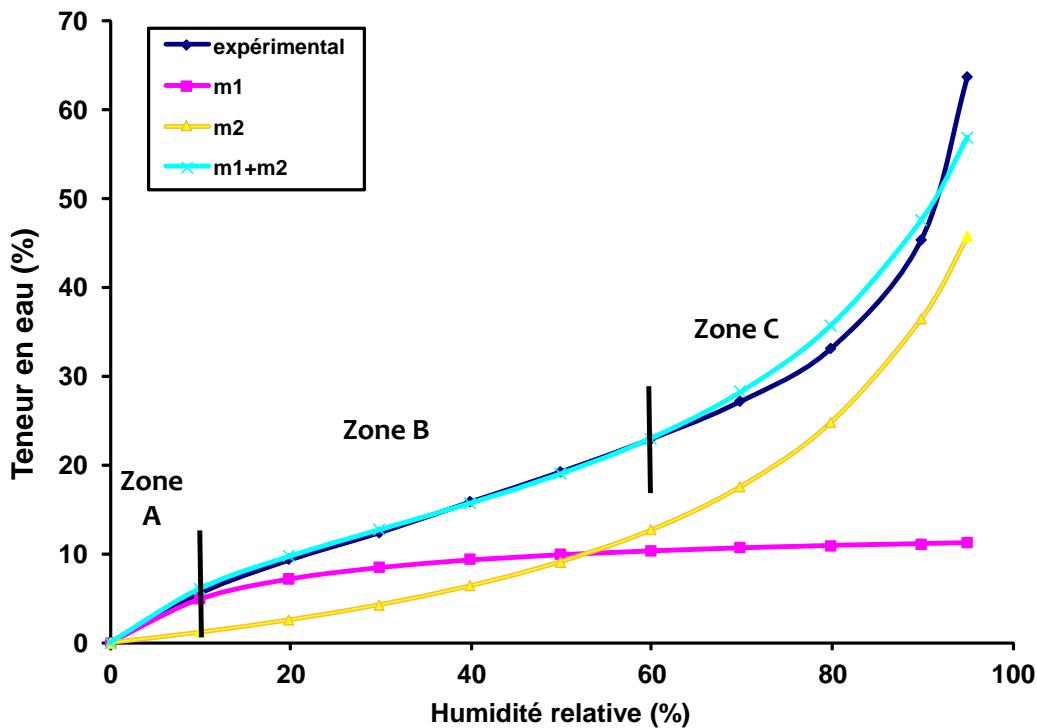
Les échantillons de peaux abdominales étaient obtenus auprès de donneuses d'âges différents (35, 38, 39, 60, 61 et 66 ans) ayant subies une chirurgie esthétique. Des tests de diagnostics virologiques et une décontamination des blocs de peaux excisées à l'aide d'un antiseptique local ont été réalisés par un laboratoire (Bioprédic International, Rennes, France), spécialisé dans l'obtention, le traitement et l'exportation de matériels biologiques dérivés de la peau.

Les échantillons de peaux ont été ensuite plongées dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. L'épiderme a été retiré des blocs de peaux congelées à l'aide d'une lame de scalpel. Enfin, les échantillons de dermes d'âges différents ont été découpés de telle sorte à avoir les mêmes dimensions et la même masse. Ces blocs de peaux ont été incubés pendant 24 h dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour les futures analyses en DVS et en micro-spectroscopie Raman. Cette incubation dans du NaCl était nécessaire afin de saturer tous les sites d'interaction de l'eau avec les constituants du derme.

#### ***III. 5. 2. 2. Analyse des échantillons de peaux d'âges différents par DVS***

Les isothermes de désorption/sorption de vapeur d'eau ont été obtenus à l'aide de la microbalance de vapeur d'eau décrite dans le Chapitre II.2.3. Les courbes de désorption ont ensuite été analysées en utilisant la modélisation d'Hailwood-Horrobin (H-H) pour définir les différents types d'eau au sein des échantillons dermiques. Brièvement, ce modèle permet de tracer deux asymptotes m<sub>1</sub> et m<sub>2</sub>, correspondant à la monocouche d'eau et aux multicouches

d'eau respectivement (110). La combinaison des deux asymptotes ( $m_1 + m_2$ ) permet d'obtenir une courbe théorique, modélisant au mieux la courbe expérimentale (Figure 36).



**Figure 36 :** Comparaison de la monocouche d'eau ( $m_1$ ; *en rose*) et des multicouches d'eau ( $m_2$ ; *en orange*) calculées en utilisant le modèle d'Hailwood-Horrobin. La somme de la monocouche d'eau et des multicouches d'eau ( $m_1 + m_2$ ; *en bleu cyan*) ajuste au mieux l'isotherme de désorption (*en bleu foncé*).

Ainsi, la modélisation H-H permet de définir les différents types d'eau selon trois zones:

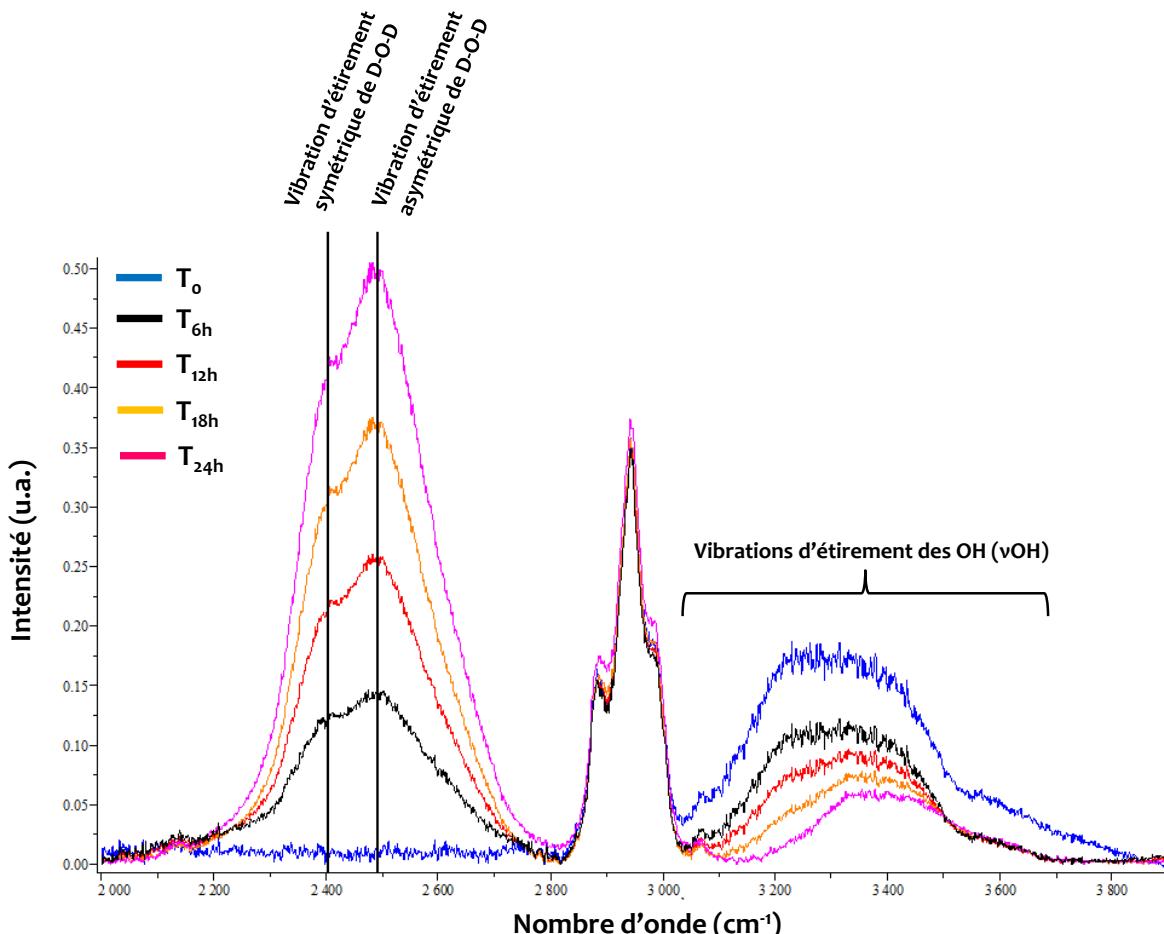
- **La zone A** définit la monocouche d'eau adsorbée au substrat dermique.
- **La zone B** correspond aux multicouches d'eau, interagissant avec la monocouche d'eau et avec quelques constituants du derme.
- **La zone C** comprend les clusters d'eau, également appelée eau de surface ou non liée.

### **III. 5. 2. 3. Substitution des molécules d'eau ( $H_2O$ ) par les molécules d'eau deutérée ( $D_2O$ )**

Pour les analyses Raman, différents mélanges de  $H_2O/D_2O$  de concentrations connues (0%, 25%, 50%, 75% et 100%) ont été réalisés à partir de  $D_2O$  (99.9% de pureté isotopique,

Sigma-Aldrich, France). Pour chaque âge, les échantillons de dermes ( $n = 3$ ) ont été incubés dans chacun de ces différents mélanges pendant 24 h.

Afin de s'assurer de l'efficacité de l'échange  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ , un échantillon contrôle de derme, âgé de 35 ans, a été incubé dans une solution pure de  $\text{D}_2\text{O}$  pendant 24h. Puis, des mesures Raman ont été effectuées toutes les 6 h (Figure 37).



**Figure 37 :** Spectres Raman acquis sur un échantillon de derme âgé de 35 ans et incubé dans une solution de  $\text{H}_2\text{O}$  (en bleu) puis dans une solution pure (100%) de  $\text{D}_2\text{O}$  pendant différents temps d'incubation (6h : en noir ; 12h : en rouge ; 18h : en orange ; 24h : en rose).

### **III. 5. 2. 4. Analyse des échantillons de peaux d'âges différents par micro-spectroscopie Raman**

Les données spectrales Raman ont été acquises à l'aide du micro-spectromètre XploRA (Horiba Jobin Yvon, France), décrit dans le Chapitre II.1.2.2., équipé du logiciel LabSpec 5 (Horiba Jobin Yvon, France). Un objectif X100 à immersion, une source laser à

660 nm et un réseau dispersif de 1200 traits/mm ont été utilisés. Des spectres points ( $n = 20$ ) ont été acquis avec un temps d’acquisition de 30 s chacun et sur une gamme spectrale de 700-3800  $\text{cm}^{-1}$ .

### **III. 5. 2. 5. Pré-traitement et traitement des données spectrales**

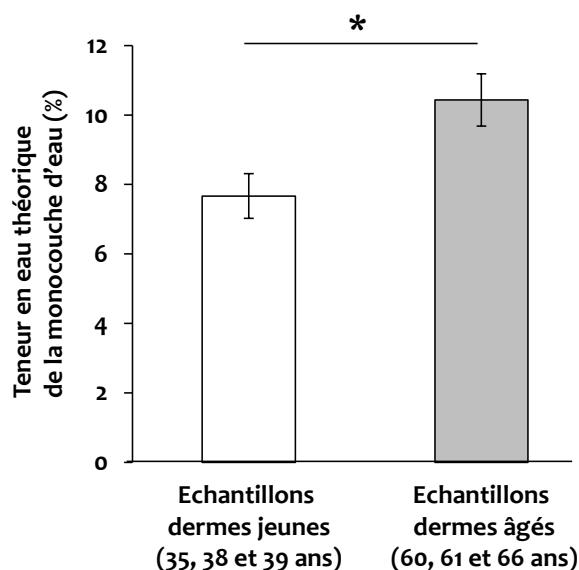
En ce qui concerne le pré-traitement des données, les spectres ont été lissés et leurs lignes de base ont été corrigées par approximation polynomiale. Enfin, les données spectrales ont été normalisées sur la vibration d’étirement des  $\text{CH}_3$  des protéines et des lipides ( $\nu\text{CH}_3$ ) afin de rendre les spectres comparables entre eux. Il a été vérifié que la vibration  $\nu\text{CH}_3$  n’était pas affectée lors de la substitution des molécules d’ $\text{H}_2\text{O}$  par celles de  $\text{D}_2\text{O}$ .

A l’aide du logiciel LabSpec 5, une méthode d’ajustement de courbe, appelée également « curve fitting », a été appliquée sur la région spectrale (3100-3700  $\text{cm}^{-1}$ ) correspondant principalement à des vibrations d’étirement OH des molécules d’eau ( $\nu\text{OH}$ ). Cette approche permet d’identifier un ensemble de vibrations constitutives non résolues spectralement. Pour cela, une dérivée seconde a été réalisée sur cette région spectrale et six sous-bandes ont pu être ainsi déterminées : 3160  $\text{cm}^{-1}$ , 3210  $\text{cm}^{-1}$ , 3280  $\text{cm}^{-1}$ , 3375  $\text{cm}^{-1}$ , 3470  $\text{cm}^{-1}$  et 3600  $\text{cm}^{-1}$ . Des études (107, 111, 112) ont pu montrer que les vibrations à 3160  $\text{cm}^{-1}$  et 3210  $\text{cm}^{-1}$  correspondaient aux molécules d’eau liée (ou monocouche d’eau); celles à 3280  $\text{cm}^{-1}$  et 3375  $\text{cm}^{-1}$  aux molécules d’eau partiellement liée (ou multicouches d’eau); et enfin les sous-bandes à 3470  $\text{cm}^{-1}$  et 3600  $\text{cm}^{-1}$  aux molécules d’eau non liée (ou eau libre). Par la suite, la combinaison de ces 6 sous-bandes a été ajustée au signal expérimental en les modélisant par des fonctions gaussiennes et lorentziennes. La qualité du « fitting » est estimée par l’erreur résiduelle ( $\chi^2$ ) entre la courbe expérimentale et la courbe modélisée ; cette dernière doit atteindre une valeur de  $10^{-6}$  pour indiquer un bon ajustement du « fitting ». Le décalage maximal de la position de la sous-bande et les largeurs des pics à mi-hauteur ont été respectivement fixés à  $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$  et à  $15 \text{ cm}^{-1}$ . Afin de quantifier les contributions respectives des différentes vibrations, l’aire de chaque sous-bande a été déterminée puis a été divisée par la somme des aires de l’ensemble des sous-bandes. Pour chaque groupe d’âge (jeune et âgé), les valeurs ont été moyennées et leur écart-type a été calculé.

### **III. 5. 3. Résultats et discussion**

#### ***III. 5. 3. 1. Quantification de la monocouche d'eau dans les échantillons de dermes d'âges différents à partir des isothermes de désorption***

Les zones A, B et C, déterminées à l'aide du modèle H-H sur les isothermes de désorption, ont permis de quantifier les différents types d'eau présents dans les échantillons de dermes d'âges différents. Afin d'évaluer la teneur en molécules d'eau liées dans nos échantillons dermiques, nous nous sommes uniquement intéressés à la zone A correspondant à la monocouche d'eau, interagissant fortement avec le substrat dermique.



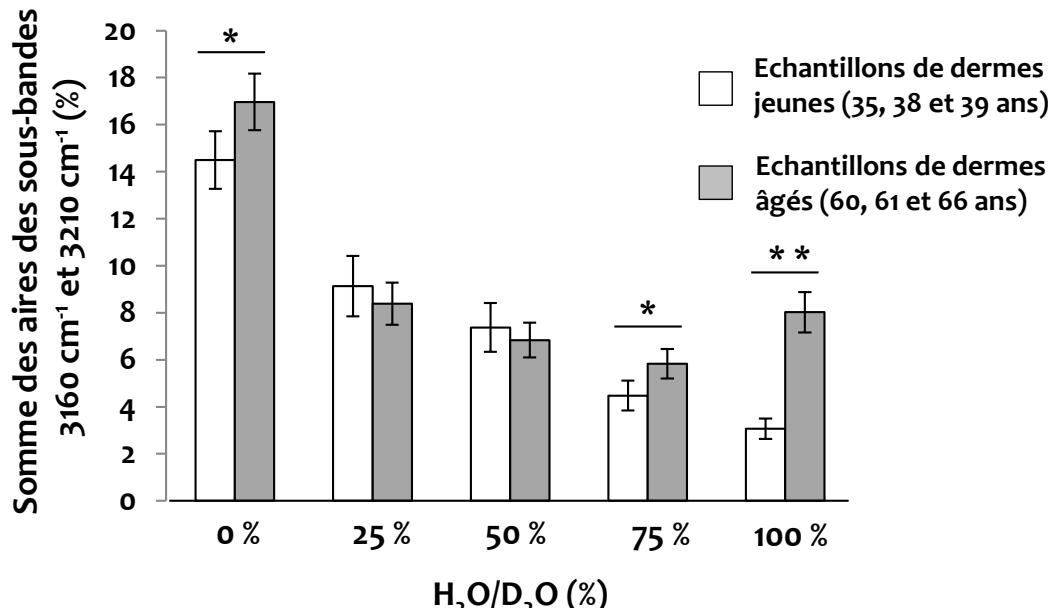
**Figure 38 :** Comparaison des teneurs en eau de la monocouche d'eau provenant des échantillons de dermes jeunes (*barre blanche*) et de dermes âgés (*barre grise*).

L'astérisque (\*) indique une significativité des résultats obtenus ( $p < 0.05$  ; test t de Student).

Les résultats montrent une différence significative entre les teneurs en eau de la monocouche d'eau des échantillons de dermes jeunes et celles des échantillons de dermes âgés (Figure 38) ; avec un nombre de molécules d'eau fortement liées au substrat dermique plus important avec l'âge.

**III. 5. 3. 2. Analyse par micro-spectroscopie Raman des échantillons de dermes d'âges différents incubés dans différents mélanges H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O**

Suite aux résultats obtenus en DVS, nous avons acquis des spectres Raman sur des échantillons de dermes d'âges différents incubés dans différents mélanges H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O. Puis nous avons calculé les aires des sous-bandes correspondant aux molécules d'eau liée (ou monocouche d'eau).



**Figure 39 :** Calcul des aires intégrées des sous-bandes correspondant aux molécules d'eau liées dans des échantillons de dermes jeunes (*barre blanche*) et de dermes âgés (*barre grise*), incubés dans différents mélanges de H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (0%, 25%, 50%, 75% et 100%).

Les astérisques (\*) et (\*\*) indiquent respectivement une significativité des résultats obtenus avec  $p < 0.05$  et  $p < 0.01$  (test *t* de Student).

Ces résultats montrent une diminution de la teneur en eau liée dans les échantillons de dermes jeunes et âgés en fonction de la concentration en D<sub>2</sub>O (Figure 39). A 0% en D<sub>2</sub>O, la teneur en eau liée est significativement plus importante dans les échantillons de dermes âgés que celle dans les échantillons de dermes jeunes, ce qui conforte les résultats obtenus en DVS. A 75% en D<sub>2</sub>O, une différence significative est également observée entre les deux groupes d'âges. Etonnamment, cet écart semble se creuser davantage entre ces deux groupes d'âges

lorsque les échantillons ont été incubés dans une solution pure de D<sub>2</sub>O (100%). Ce résultat tend à montrer que, dans un milieu de plus en plus enrichi en D<sub>2</sub>O, les échantillons de dermes âgés auraient tendance à retenir de plus en plus les molécules d'eau liée, à l'inverse des échantillons de dermes jeunes.

### **III. 5. 4. Conclusions et perspectives**

Les techniques utilisées permettent de quantifier la teneur d'eau liée au collagène dans des explants de peaux d'âges différents, soit globalement (DVS), soit de manière semi-quantitative (Raman).

La technique DVS présente néanmoins des inconvénients :

- Cette méthode est **chronophage** : en effet, pour un échantillon de 2 mm<sup>3</sup> et pesant entre 4 et 5 mg, l'expérimentation dure entre 8 et 10 jours.
- De plus, la technique est **destructive** pour les échantillons. Les étapes de désorption et de sorption ont permis d'observer un phénomène d'hystérisis, indiquant l'irréversibilité des propriétés physico-chimiques des échantillons à revenir à leurs états initiaux. De plus, bien que nécessaire pour les calculs de teneur en eau, la séquence de séchage contribue également à la destruction des échantillons.

A l'inverse, la micro-spectroscopie de diffusion Raman est une technique **non-destructive** et relativement **rapide**. La combinaison de cette approche biophotonique avec l'utilisation de différentes concentrations en D<sub>2</sub>O s'avère utile pour étudier le comportement des constituants dermiques en réponse à la substitution de l'eau normale (H<sub>2</sub>O) par de l'eau deutérée (D<sub>2</sub>O). Cette étude permettra par la suite de progresser dans l'identification des marqueurs spectroscopiques associés à l'hydratation du collagène (58, 69, 109) et au vieillissement chronologique de la peau. De plus, il serait intéressant de traiter les données Raman par la technique de corrélation 2D (*cf.* Chapitre II.3.3.4) afin de pouvoir déterminer l'ordre séquentiel dans lequel interviennent les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hydratation du derme.

**CHAPITRE IV :**

**ETUDES *IN VIVO* SUR LE VIEILLISSEMENT  
CUTANE. CORRELATION ENTRE LES MESURES  
SPECTRALES RAMAN ET LES MESURES  
BIOMETRIQUES DE LA PEAU**

## **IV. 1. Préambule du chapitre IV**

Ce chapitre expose les résultats obtenus *in vivo* sur des peaux de volontaires d'âges différents à l'aide d'une micro-sonde confocale Raman. Il se présente sous la forme d'un article scientifique et d'une étude complémentaire dans lesquels les résultats sont discutés.

**L'article #4** porte sur la mise en évidence de marqueurs spectroscopiques associés aux modifications des propriétés mécaniques de la peau avec l'âge. Dans cette étude, la micro-spectroscopie Raman est couplée au traitement PLS afin de rechercher des corrélations entre les données spectrales et les mesures biométriques mécaniques, et ce à différentes profondeurs du *stratum corneum* (*SC*).

**L'étude complémentaire** se base sur la même approche méthodologique utilisée dans l'Article #4, afin de corréler les données spectrales aux mesures de perte insensible en eau (PIE), reflétant l'état de la fonction barrière de la peau.

**IV. 2. Article #4**

***In vivo confocal Raman micro-spectroscopy  
of the human skin: highlighting of spectral  
markers associated to aging via a research  
of correlation between Raman and  
biometric mechanical measurements***

*Analytical Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015), pp. 8363-72

- Préambule à l'article #4

## **Contexte et objectif de l'étude**

Le *stratum corneum* (*SC*) joue un rôle défensif contre les agressions extérieures telles que les contraintes mécaniques. Le *SC* subit des altérations moléculaires et structurales avec l'âge, affectant ainsi la fonction barrière de la peau et les autres couches sous-jacentes. Des techniques biométriques de référence permettent d'évaluer les propriétés mécaniques cutanées telles que l'élasticité et la fatigabilité de la peau, mais ne peuvent fournir d'informations moléculaires. Dans cette optique, nous avons combiné la micro-spectroscopie Raman à la méthode de régression des moindres carrés partiels (PLS) afin de mettre en évidence des marqueurs spectroscopiques associés au vieillissement cutané.

## **Matériels et Méthodes**

Les mesures Raman et biométriques ont été acquises au niveau de l'avant-bras (zone photo-protégée) de femmes volontaires âgées entre 20 et 70 ans. Par la suite, des corrélations ont été recherchées entre les données spectrales et les mesures mécaniques biométriques à l'aide du traitement PLS, et en fonction de la profondeur de peau (3, 9, 15 et 30 µm). Les vecteurs de régression obtenus ont permis de déterminer les vibrations spectrales sensibles aux propriétés mécaniques de la peau. Par la suite, les caractéristiques spectrales ont été comparées pour des conditions où le vieillissement présente un impact faible, modéré, ou important sur les propriétés mécaniques de la peau. Enfin, des fonctions de standardisation ont été mises en place pour vérifier la transférabilité des modèles de prédiction entre deux campagnes de mesures *in vivo*.

## **Résultats**

Les modèles de régression obtenus ont mis en évidence que des spectres Raman acquis à 3 µm et à 9 µm permettaient d'obtenir des résultats de prédiction relativement corrects. Les vecteurs de régression et les spectres de différence obtenus ont montré que les vibrations d'étirement CH et C=O, attribuées aux lipides et aux protéines, sont corrélées à une forte élasticité et une faible fatigabilité de la peau. A l'inverse, des propriétés mécaniques telles

qu'une faible élasticité et une forte fatigabilité seraient corrélées aux vibrations de déformation CH et d'étirement OH, attribuées respectivement aux protéines et aux molécules d'eau. Enfin, il a été mis en évidence que les modèles de prédiction obtenus peuvent être transférés d'une campagne de mesures *in vivo* à une autre.

### **Conclusions et Perspectives**

Le couplage de la micro-spectroscopie Raman à la méthode PLS a permis de corréler les mesures spectrales et les données mécaniques biométriques en identifiant des vibrations spectrales sensibles aux propriétés mécaniques de la peau, et cela à différentes intensités de l'impact du vieillissement sur ces caractéristiques cutanées. Cette démarche méthodologique pourrait s'étendre à des études portant sur l'évaluation de topiques sur les propriétés mécaniques des couches superficielles de la peau.

## **In vivo confocal Raman microspectroscopy of the human skin: highlighting of spectral markers associated to aging via a research of correlation between Raman and biometric mechanical measurements**

**Christophe Eklouh-Molinier<sup>1,2</sup> • Vincent Gaydou<sup>1,2</sup> • Emmanuel Froigneux<sup>3</sup> •  
Pascale Barlier<sup>4</sup> • Virginie Couturaud<sup>4</sup> • Michel Manfait<sup>1,2</sup> • Olivier Piot<sup>1,2,5</sup>**

Received: 6 May 2015 / Revised: 29 July 2015 / Accepted: 5 August 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

<sup>1</sup>Equipe MéDIAN-Biophotonique et Technologies pour la Santé, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

<sup>2</sup>CNRS UMR7369 MEDyC, SFR Cap-Santé, Reims, France

<sup>3</sup>Jobin Yvon SA, Raman division, Villeneuve d'Ascq, France

<sup>4</sup>Centre d'Etudes et de Recherche en Cosmétologie (CERCO), Paris, France

<sup>5</sup>Platform of Cellular and Tissular Imaging (PICT), Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

\*Address all correspondence to: Olivier Piot, Université de Reims Champagne-Ardenne, Equipe MéDIAN-Biophotonique et Technologies pour la Santé, Unité MEDyC CNRS UMR7369, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France; Tel: +33 3 26 91 81 28; E-mail: olivier.piot@univ-reims.fr

### **Abstract**

Skin plays a protective role against the loss of water and external aggressions including mechanical stresses. These crucial functions are ensured by different cutaneous layers, particularly the *stratum corneum* (*SC*). During aging, the human skin reveals some apparent modifications of functionalities such as a loss of elasticity. Our investigations aimed at demonstrating that Raman micro-spectroscopy, as a label-free technique with a high molecular specificity, is efficient to assess *in vivo* the molecular composition of the skin and the alterations underwent during aging. Our approach was based on a search of correlation between Raman data collected on healthy female volunteers of different ages (from 21 to 70 year-old) by the mean of a remote confocal Raman, and skin firmness measurements used as a

reference method. Raman and biometric data were then submitted to a Partial Least Square (PLS)-based data processing. Our experiments demonstrated the potential of Raman micro-spectroscopy to provide an objective *in vivo* assessment of the skin “biological age”, that can be very different from the “chronological age” of the person. In addition, Raman features sensitive to the elasticity and the fatigability of the *SC* were highlighted. Thereafter, calibration transfer functions were constructed to show the possibility to compare the results obtained during two distinct measurement campaigns conducted with two Raman probes of the same conception. This approach could lead to several interesting prospects, in particular by objectifying the effects of dermo-cosmetic products on the superficial layers of the skin, and by accessing some underlying molecular mechanisms.

**Keywords:** skin aging, *in vivo* confocal Raman probe, Partial Least Square regression, biometric mechanical measurements, calibration transfer functions.

## **Introduction**

Skin represents about 17% of the human body and exhibits several protective functions. External aggressions such as sun exposure or pollution are mostly stopped by this first defensive line. More precisely, the epidermis constitutes a barrier against external factors and the loss of water [1]. This epidermal barrier is mainly due to the outermost layer, the *stratum corneum (SC)*, undergoing primarily structural and molecular changes by different exogenous factors [2-4].

Skin allows also a protection against physical stressors. It is admitted that the mechanical properties of the skin depend mainly on the structural elements of the dermis. More precisely, the elastic fibers network allow to the skin to return to this initial position after deformation, whereas the collagen fibers are crucial for the tensile strength of the skin [5, 6]. However, the *SC* presents also a significant contribution in the skin mechanical properties. In particular, the

mechanical properties of isolated corneocytes have been investigated in order to better understand the role of the *SC* in the protection against mechanical stressors [7]. As such analyses are difficult to be carried out *in vivo*, some recent studies attempted to overcome this problem by developing numerical models. It has been shown that, despite of its small thickness, the *SC* markedly influences the mechanical properties of the skin [8, 9].

Skin undergoes important alterations during the aging process, failing to act as an effective barrier against all types of aggression. Thus, the cutaneous aging affects the quality of the *SC* barrier function relying on physiological parameters such as *SC* thickness, intercellular lipid content and structure [10, 11]. Besides visible signs of aging such as the appearance of wrinkles, the aged skin shows a loss of elasticity due to the degradation of the collagen and elastic fibers network with subjects' chronological age [5, 12-16]. Determined from the birth, the chronological age of an individual does not correspond necessarily to its skin aging. Indeed, especially for the skin, significant differences may exist between the perceived age, also called biological age, and the chronological age in consequence of the aggressions to which the skin could be submitted or at contrast in benefit of the care that could be brought. Thus, to investigate the cutaneous aging, it is crucial to have techniques permitting to assess the biological age of the skin based on intrinsic molecular and/or structural alterations underwent over the years.

Non-invasive techniques are commonly used to detect modifications in the mechanical properties of the skin. For example, suction chamber devices allow measuring the skin firmness by applying a certain pressure on the skin and by observing the elastic recovery [17-21]. These biometric techniques are currently employed in the dermocosmetic field and are considered as reference methodologies to evaluate the global mechanical characteristics of the skin. Besides, a biophotonic approach based on Raman micro-spectroscopy allows to probe *in vivo* the molecular information of the skin in a non-invasive and a non-destructive manner. In addition, the confocality coupled to this technique permits to obtain depth-resolved

information within the skin. Several studies were able to determine depth profiles of water concentration in the skin [22-24]. This approach was used in a few *in vivo* studies on skin aging [11, 24, 25]. Raman spectroscopy is able to probe some subtle spectral changes associated to a physiological or physiopathological alteration. To highlight such spectral differences, statistical multivariate analysis methods have been extensively developed to study and visualize a large amount of spectral information in a short time. Among these methods, the Partial Least Squares (PLS) processing is appropriate to explore correlation between two series of variables, and to predict one variable from the knowledge of the other [26, 27].

Besides, coupling Raman micro-spectroscopy to PLS processing is of great interest to determine the spectral vibrations sensitive to a specific parameter, such as mechanical strains applied to isolated SC or lipidic components involved in barrier function [28, 29]. To the best of our knowledge, no studies have yet determined the relationship between the molecular alterations associated to the aging and the skin elasticity.

In this work, Raman measurements were collected on the forearm skin of female volunteers selected to present a chronological age range spreading from 20- to 70- year-old. For each person, the elasticity and the fatigability of the skin, determined by calculating R7 and R8 Cutometer<sup>®</sup> parameters respectively, were used as reference data to assess the “molecular” age of the skin. A search of correlation between the Raman spectra, and the R7 and R8 parameters was performed through PLS processing. This approach aims at demonstrating the potential of Raman micro-spectroscopy as a candidate technique to investigate *in vivo* skin aging. In addition, the exploitation of PLS regression coefficients offers the possibility to relate the elasticity and the fatigability of the skin to vibrational Raman features. Besides to these main objectives, calibration standardization functions were determined to verify the transferability of the Raman methodology between two distinctive campaigns of *in vivo* measurements.

## **Materials and methods**

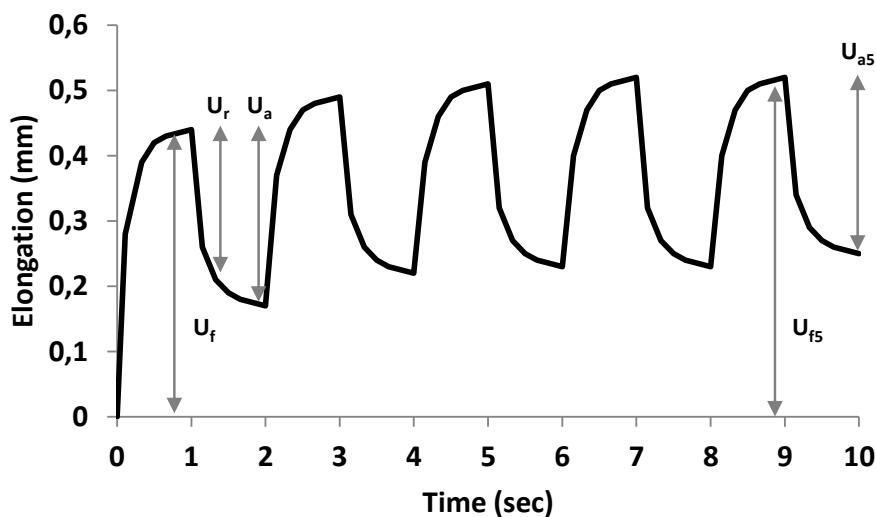
### *Subjects*

A first group of 32 healthy female volunteers (G1), with no dermatological conditions, participated in this study after giving written informed consent. Subjects were evenly distributed into three age groups (group I: 20-35 years; group II: 36-50 years; group III: 51-70 years) and presented Fitzpatrick's skin types II or III. None of the volunteers presented skin diseases or particular dermatological conditions. Exclusion criteria were long-term UV exposure (sun and tanning beds) for at least 1 month before measurements. Subjects with strong smoking habits were also excluded from this study. Washing skin, application of topical were prohibited at least 48 h before the measurements. Non-invasive measurements were performed on the sun-protected arm site (volar forearm) following 15 min of acclimatization under controlled room conditions (22 +/- 2°C, 40% relative humidity). A second group of 32 volunteers (G2) was determined in the same way than the first group (equal distribution into age groups, same selection and exclusion criteria) and had allowed to perform subsequently the "instrument-to-instrument" standardization.

### *Biometric measurements*

Mechanical properties of the skin were evaluated by using a Cutometer® MPA580 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany). The probe with an aperture size of 6 mm permits to apply vertical deformations on the skin with a controlled vacuum of 300 mbar. A total of five consecutive cycles of a suction application of 1 s followed by a relaxation period of 1 s was performed in a time/strain mode. Each measurement was repeated three times to take into account physiological variations. The parameters  $U_f$  (skin distensibility),  $U_r$  (immediate recovery),  $U_a$  (maximum recovery),  $U_{f5}$  (skin distensibility of the last curve), and  $U_{a5}$  (maximum recovery of the last curve) were determined as shown in Fig. 1. These

measured parameters were also used for the calculation of skin elasticity parameters: elastic recovery or firmness ( $R_7 = U_r/U_f$ ). The calculation of skin fatigability was based on the difference between the residual skin deformation after release of the last suction ( $U_{f5} - U_{a5}$ ) and that of the first suction ( $U_f - U_a$ ). Thus, the skin fatigability parameter was calculated as followed:  $R_8 = [(U_{f5} - U_{a5}) - (U_f - U_a)]$ . It is worth noticing that the maximum recovery of the last curve ( $U_{a5}$ ) was considered distinct from that of the first curve ( $U_a$ ), contrary to Krueger et al. which did not take into account these factors [18].



**Fig. 1:** Skin deformation curve obtained with Cutometer®. The following parameters were analyzed:  $U_f$  (skin distensibility),  $U_r$  (immediate recovery),  $U_a$  (maximum recovery),  $U_{f5}$  (skin distensibility of the last curve), and  $U_{a5}$  (maximum recovery of the last curve).

#### *Statistical analysis*

Values obtained from biometric measurements were averaged to assess linear correlations. Coefficients of determination  $R^2$  and the significance level of correlation  $p$  were calculated for each biometric parameter by using Pearson's correlation coefficient test. Values of  $p < 0.05$  were accepted as statistically significant.

*In vivo Raman measurements*

*In vivo* Raman experiments were carried out on a first *in vivo* confocal Raman microprobe (Horiba Jobin Yvon, Villeneuve d'Ascq, France) that has been described in detail elsewhere [29]. A 660 nm Nd-YLF laser source was used. A power of 25 mW was delivered and was complying with safety standards. The collected signal was filtered through an edge filter and dispersed with a  $3 \text{ cm}^{-1}$  spectral resolution using an 830 grooves/mm holographic grating. A second *in vivo* Raman microprobe, from the same manufacturer and with the same technical characteristics, was used to perform spectral acquisitions on the second group of 32 female volunteers in order to realize subsequently the “instrument-to-instrument” standardization.

Spectral acquisitions and data preprocessing were performed by using LabSpec 5.17 software (Horiba Scientific, Lille, France). Three different points were analyzed for each subject in order to take into account the intra-individual variability of the skin. For each analyzed point, Raman profiles were taken at depths through SC from 0 to 30  $\mu\text{m}$  with a 3  $\mu\text{m}$  step. The measurement time was 4 s per spectrum and with single accumulation. Spectra were smoothed using a Savitzky-Golay filter (second order, nine points). All spectral data were baseline corrected by using a polynomial function to correct physical light-scattering effects, and were vector normalized to compare spectral data between them.

*PLS analysis*

By means of the Beer-Lambert law, a proportionality relation exists between the concentrations of the different chemical bonds present in samples and the Raman spectral absorption. The regression method used to observe this relation is the Partial Least Squares (PLS).

The PLS regression is a model that links a property variable, such as concentrations, to a set of explanatory variables, numerical or categorical [30]. The algorithm is based on the ability to mathematically maximize the variance-covariance between the explanatory variable

matrix and the property variable matrix. To maximize this covariance, the multivariate PLS algorithm builds by iterating many regression vectors (orthogonal to each other) that can explain the sample properties (in the vectorial space) with the minimum of approximation. This approximation represents the distance or error between the reference property matrix and the prediction of regression vectors. Thus, the Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP) is typically used to estimate the accuracy of the PLS models. A lower RMSEP indicates better prediction capacity of the regression model.

In our study, the Raman spectral data (X-matrix) were used to predict skin characteristics. Spectral data from the X-matrix were smoothed, baseline corrected and vector normalized; the Y-matrix contained R7 and R8 parameters values. Spectral data were split into a 3:1 ratio: 75 % of the data were used for the calibration of the models, and the remaining 25 % of the data to evaluate the performance of the models.

For the PLS regression, the number used of latent variables is an essential parameter and it must be optimized in order to reduce the under and over fitting. Prior to establishing the PLS models, the optimal number of latent variables was determined by leave-one-out cross-validation [31, 32]. More precisely, the lowest Root Mean Square Error (RMSE) permits to select the optimal number of latent variables during the cross-validation. These computing were performed with the Matlab 8.3 software (The Mathworks, USA) and the PLS algorithms used was developed by Dominique Bertrand and Christophe Cordella, INRA, France [33].

#### *“Instrument-to-instrument” calibration transfer functions*

To transfer the predicting method from an instrument to another, two different Calibration Transfer Functions (CTFs) were established and used to predict skin characteristics from Raman spectra acquired from the second instrument ( $Inst_2$ ). Biometric measurements were performed with the same devices and in the same experimental conditions. Spectral data were

collected by using the same acquisition parameters and were pre-processed in the same way than Raman spectra from the first instrument ( $\text{Inst}_1$ ).

The first calibration transfer function ( $\text{CTF}_1$ ) [34] was calculated as shown in Equation 1.

$$\text{CTF}_1(x) = x + [\text{median}(X_1) - \text{median}(X_2)] \quad (1)$$

Where:

$x$  = current spectra of the instrument n°2

$\text{CTF}_1(x)$  = calibrated current spectra of the instrument n°2

$X_1$  = data matrix containing the spectra of each volunteer analyzed with the instrument n°1

$X_2$  = data matrix containing the spectra of each volunteer analyzed with the instrument n°2

A second calibration transfer function ( $\text{CTF}_2$ ) was determined from multivariate PLS (m-PLS) regression modeling.  $X_1$  and  $X_2$ -data matrices were used to build a m-PLS regression model to predict the calibrated “ $x$  spectra” from instrumental “ $x$  spectra”. The obtained m-PLS model represents the second calibration transfer function.

For each of the two CTFs, two distinct calibrated matrices were computed and used to predict skin characteristics. Thus, two distinct predicting results were given for each biometric measurement. “Instrument-to-instrument” CTFs were performed by using home-made algorithms written in the MATLAB 8.3 software.

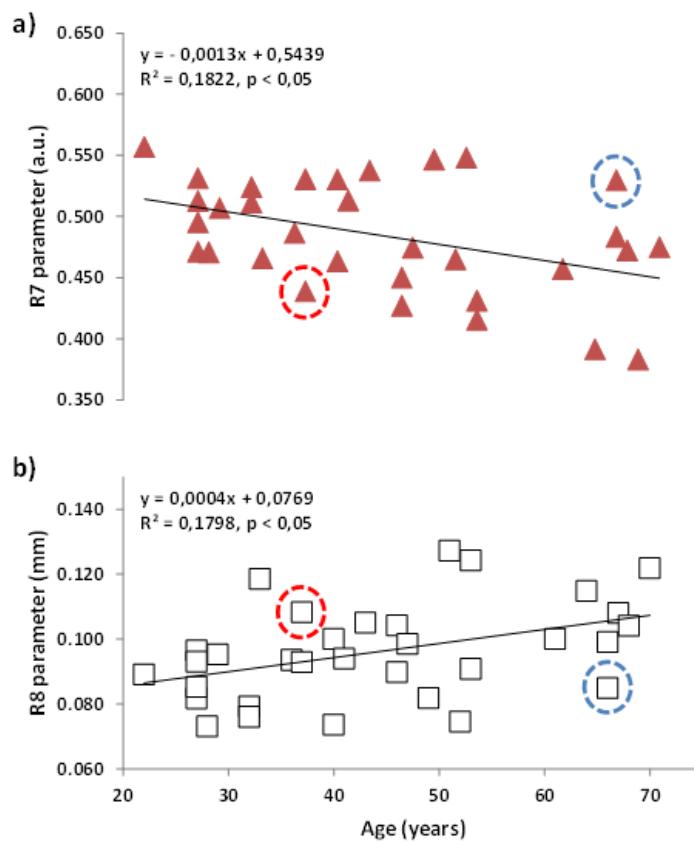
## **Results & Discussion**

### *Biometric measurements vs chronological age*

Figure 2 shows the evolution of Cutometer® parameters (R7 and R8) as a function of the subject’s age. Also called “biological elasticity” [17, 18], the Cutometer® R7 parameter allows to measure the ability of the skin to recover to its initial shape after stretching. Our

results showed a significant correlation between the R7 parameter and the subjects' age ( $R^2 = 0.182; p < 0.05$ ), as depicted in Figure 2(a). Thereafter, the Cutometer® R8 parameter was calculated in order to assess the skin fatigability. While previous studies showed a low correlation of the skin fatigability with age [17, 18], the analysis of our data demonstrated a significant correlation ( $R^2 = 0.179; p < 0.05$ ) with age [Figure 2(b)].

Although biometric measurements are generally reference methods to evaluate the aging of the skin, our results showed moderate correlations with age. Also, it is important to underline that these observations are based on the chronological age of the subjects that may be different from the biological age of their skin. For instance, a 66-year-old subject (*blue dotted circle* in Figure 2) appeared to have a strong skin elasticity (R7 parameter of 0.530 a.u.) and a weak skin fatigability (R8 parameter of 0.085 mm), despite of her advanced age. Conversely, the same observation was occurred for a 37-year-old volunteer (*red dotted circle* in Fig. 2) who presented a weak skin elasticity (R7 parameter of 0.439 a.u.) and a strong skin fatigability (R8 parameter of 0.108 mm). Thus, these two particular examples show that the mechanical properties of the skin may be totally different from those expected from subjects having the same chronological age. This could hinder to truly evaluate the evolution of the skin mechanical properties over lifetime. It should be more judicious to disregard the chronological age by using Raman micro-spectroscopy through PLS processing to identify the molecular components responsible of the skin mechanical properties.



**Fig. 2:** Evolution of R7 (a) and R8 (b) parameters with the subjects' chronological age from the first group of volunteers. The 37- and 66-year-old subjects, represented by a red and a blue dotted circle respectively, were selected by their particular biometric mechanical characteristics, totally different from those expected from subjects having the same chronological age.

#### *PLS modeling of different biometric parameters using SC Raman spectra*

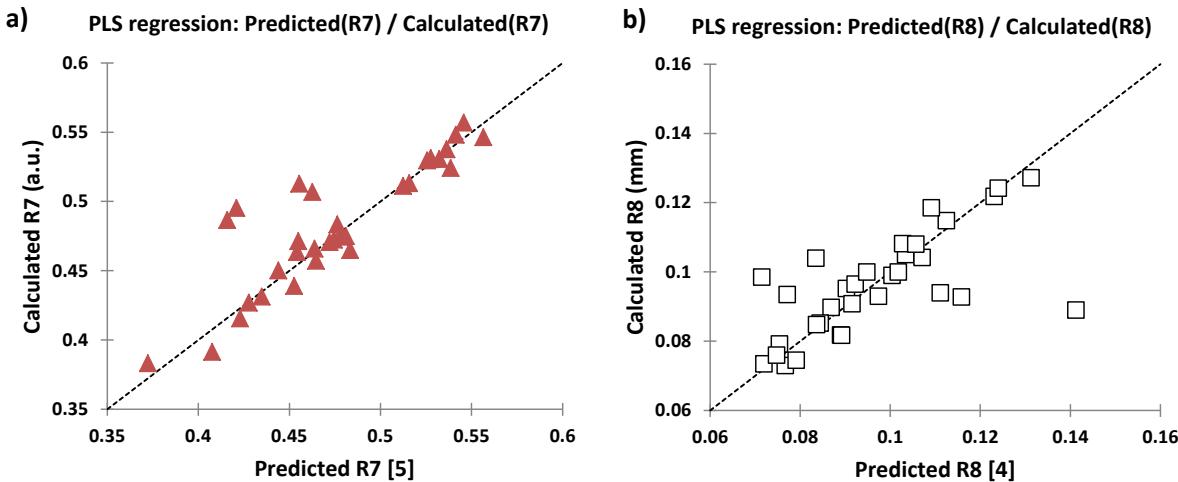
*In vivo* confocal Raman microscopy has been used to attempt to quantify indirectly Cutometer® parameters (R7 and R8) from different volunteers. To do so, the first Raman microprobe (Inst1) was used to collect Raman spectra from the three outermost micrometers of the skin. Thereafter, a PLS supervised model was built for each skin parameter. The regression results of each optimized model were shown in Table 1 and the discriminant

Raman vibrations sensitive to each biometric parameter were highlighted in Fig. 4 and Table 2.

Biometric measurement	Mean ( $\bar{y}$ )	Standard deviation ( $\sigma_y$ )	Min - Max	Depth	Latent variables	RMSEC	RMSEP	$R^2$
R7	0.484	0.0456	0.383 – 0.557	3 $\mu\text{m}$	5	0.00739	0.00966	0.973
				9 $\mu\text{m}$	7	0.00767	0.0101	0.739
				15 $\mu\text{m}$	6	0.00641	0.00816	0.322
				30 $\mu\text{m}$	5	0.00677	0.0100	0.213
R8	0.0962	0.0148	0.073 – 0.127	3 $\mu\text{m}$	4	0.00241	0.00262	0.940
				9 $\mu\text{m}$	3	0.00244	0.00255	0.838
				15 $\mu\text{m}$	4	0.00227	0.00289	0.545
				30 $\mu\text{m}$	6	0.00226	0.00272	0.170

**Table 1:** Number of latent variables, RMSEC, RMSEP, and  $R^2$  values for each biometric measurement (R7 and R8 parameters), and for each skin depth (3  $\mu\text{m}$ , 9  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$  and 30  $\mu\text{m}$ ).  $\bar{Y}$  (mean) and  $\sigma_y$  (standard deviation) were obtained for each biometric measurement analyzed from the first group of volunteers.

A PLS regression model was realized for the Cutometer® R7 parameter as shown in Fig. 3(a).

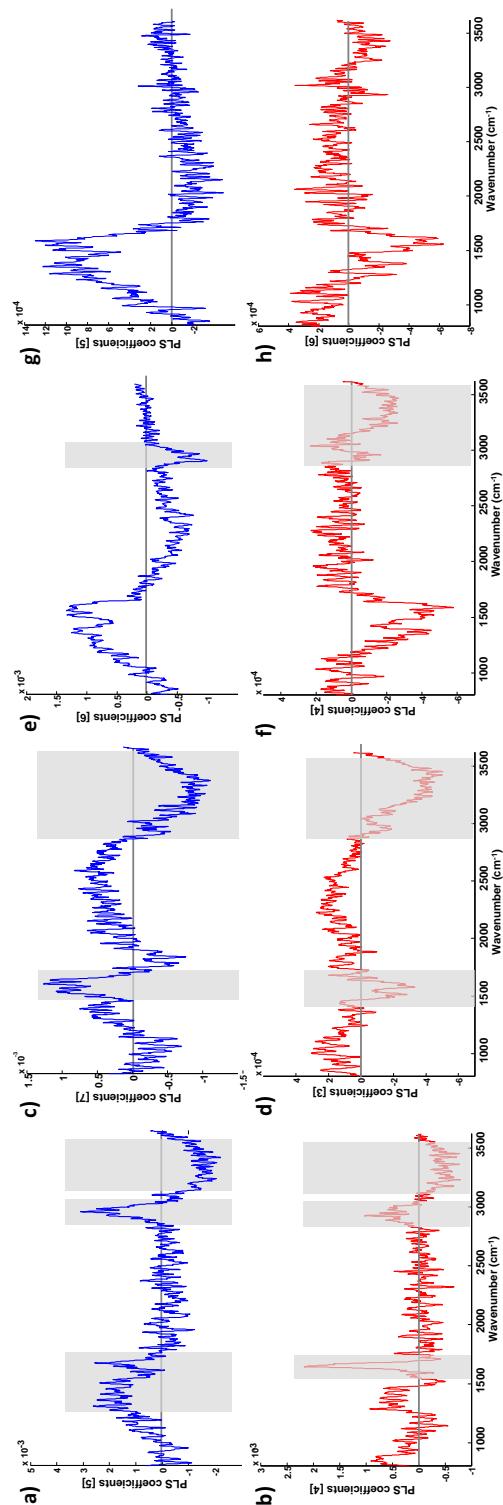


**Fig. 3:** PLS regression of R7 (a) and R8 (b) parameters. Spectral data were split into a ratio 3:1 calibration and validation respectively. The number of latent variables used is in brackets on x-axis for each biometric parameter analyzed from the first group of volunteers.

To predict the R7 parameter related to the skin elasticity, the calibration and the validation of the PLS model permitted to obtain  $\text{RMSEC} = 0.00487 \text{ a.u.}$  and  $\text{RMSEP} = 0.0654 \text{ a.u.}$ , and with a  $R^2$  value of 0.973 demonstrating a good predicting ability of the model. Following the PLS modeling, the coefficient regression plot was obtained in Fig. 4(a). This result showed vibrations between 1300 and 1500  $\text{cm}^{-1}$  (CH-deformation vibrations of proteins), in 1656  $\text{cm}^{-1}$  (C=O-stretching vibrations of proteins), between 2890 and 3050  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_3$ -stretching vibrations of lipids and proteins), and between 3100 and 3600  $\text{cm}^{-1}$  (corresponding to OH-stretching vibrations of water). Despite the low intensities of these revealed Raman features, it would appear that this model could detect subtle spectral changes related to the skin elasticity. Yet, Raman spectra were collected within the SC, whereas the R7 parameter was determined from measurements on the entire skin. Indeed, it is well known that the elasticity of the skin is

mainly due to the elastic and collagen fibers of the dermis [12-16]. As in this study, the dermis cannot be probed by using Raman micro-spectroscopy; the spectral data may be not able to be correlated to the elasticity of the dermis. Consequently, it appears unlikely at first glance that the *SC* alone could have a crucial role in the overall skin elasticity. However, several studies showed that the Young's modulus of the *SC* was 20 to 100 times higher than this of the dermis [8, 35, 36]. The outermost layer of the skin presents some remarkable mechanical properties and appears to have a non-negligible impact on the mechanical properties of the entire skin [9]. By considering the non-negligible mechanical properties of the *SC*, it could be assumed that Raman spectra could predict the elasticity of the *SC*. By the support of other studies [28, 37, 38], our results showed that all structural elements of the *SC* could be involved in the age-related changes of the *SC* mechanical properties. Among these spectral features sensitive to the *SC* elasticity, the presence of the OH bands indicate that water molecules play a role in the *SC* mechanical properties. Although our results showed that it might be possible to quantify indirectly the skin elasticity from spectral data, our PLS model specific to the R7 parameter should be used with due care in the assessment of skin aging.

Subsequently, Raman spectra were then used to attempt to predict the R8 parameter, reflecting the skin fatigability during aging. Fig. 3(b) showed the PLS regression model obtained for the R8 parameter. RMSEC and RMSEP values were found to be 0.00604 and 0.0374 mm respectively, and a  $R^2$  value of 0.940 reflecting a good linear fitting of the model. Regarding the coefficient regression plot for R8 [Figure 4(b)], an intense vibration in 1656  $\text{cm}^{-1}$  was showed as being sensitive to the R8 parameter. This spectral feature is mainly to the keratin ( $\alpha$ -helix form) from corneocytes and appears to be highly involved in the *SC* fatigability with age. In addition, low intensities of the  $\text{CH}_3$ -stretching vibrations of lipids and proteins (2890-3050  $\text{cm}^{-1}$ ) and the OH-stretching vibrations of water (3100-3600  $\text{cm}^{-1}$ ) were also detected as sensitive to the skin fatigability.



**Fig. 4:** Plot of regression coefficients for R7 (a, c, e, g) and R8 (b, d, f, h) parameters. Spectral features sensitive to the biometric parameters for the depths of 3 μm (a, b), 9 μm (c, d), 15 μm (e, f) and 30 μm (g, h) were highlighted by the grey bars. The number of latent variables used is in brackets on y-axis for each biometric parameter analyzed from the first group of volunteers.

*Evolution of the predicting PLS models with depth*

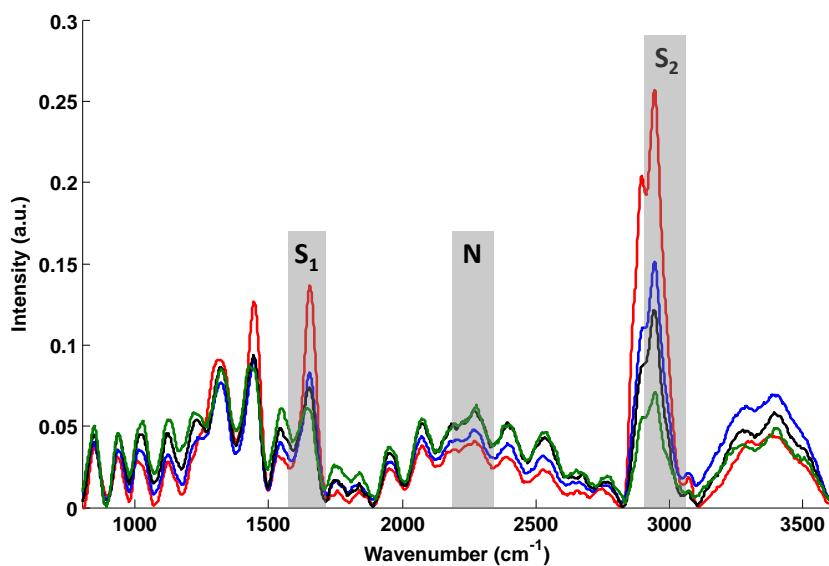
Overall, it is possible to establish PLS models having a good predicting ability and to determine spectral vibrations sensitive to the biometric measurements by using acquired Raman spectra in the upper part of the *SC*. In order to assess the evolution of the predicting capacity from the PLS models according to the depth, spectral measurements were collected deeper in the skin of volunteers with the same confocal Raman probe ( $\text{Inst}_1$ ). As mentioned above, Table 1 and Table 2 summarized the different characteristics of the PLS models and the discriminant Raman vibrations sensitive to each biometric measurement for each depth.

As previously, the PLS processing was performed on collected Raman spectra at a depth of 9  $\mu\text{m}$  to forecast the Cutometer<sup>®</sup> R7 and R8 parameters. The obtained PLS models for R7 and R8 presented  $R^2$  values of 0.739 and 0.838 respectively. The coefficient regression plots in Fig. 4(c) and Fig. 4(d), corresponding to the R7 and R8 parameters respectively, reveal common Raman characteristics such as OH-stretching vibration of water (3100-3600  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{CH}_3$ -stretching vibrations of lipids and proteins (2890-3050  $\text{cm}^{-1}$ ), and C=O-stretching vibrations of proteins (1500-1700  $\text{cm}^{-1}$ ). An increase of water vibrations intensities was observed in the regression coefficients of R7 and R8 parameters, indicating that water content increases gradually as a function of depth. Being not visible in the regression coefficients plot for R8 parameter, the vibration in 1656  $\text{cm}^{-1}$  seems to be not sensitive to this parameter at a depth of nine micrometers, suggesting that the  $\alpha$ -helix form of keratin might not be implied in the *SC* fatigability at this depth. In addition, Vyumuuhore et al. [39] demonstrated the proteins underwent an unfolding process with increasing depth. This could explain why the proteins do not play a role anymore in the fatigability of the *SC* in this depth because of their conformation changes.

		Raman vibrations from regression coefficients				
Cutometer® parameter (units)	Depth	CH <sub>3</sub> -bending of proteins (1300-1500 cm <sup>-1</sup> )	C=O-stretching of proteins (β sheet, β turn, random coil) (1620 cm <sup>-1</sup> , 1678 cm <sup>-1</sup> , 1690 cm <sup>-1</sup> )	C=O-stretching of proteins (α helix) (1656 cm <sup>-1</sup> )	CH <sub>3</sub> -stretching of lipids and proteins (2895 cm <sup>-1</sup> , 2954 cm <sup>-1</sup> )	OH-stretching of water (3100-3600 cm <sup>-1</sup> )
R7 (a.u.)	3 µm	X	X	X	X	X
	9 µm		X		X	X
	15 µm				X	X
	30 µm					
R8 (mm)	3 µm			X	X	X
	9 µm		X		X	X
	15 µm				X	X
	30 µm					

**Table 2:** Regression coefficients-related Raman vibrations sensitive to each biometric measurement (R7 and R8 parameters), and for each skin depth (3 µm, 9 µm, 15 µm and 30 µm).

Thereafter, collected Raman spectra at depths of 15 and 30  $\mu\text{m}$  were coupled to the PLS processing for the prediction of the biometric parameters. The PLS models for R7 and R8 have yielded  $R^2$  values of 0.322 and 0.545 respectively for spectra acquired at a depth of 15  $\mu\text{m}$ . At a depth of 30  $\mu\text{m}$ , the obtained PLS models for R7 and R8 presented  $R^2$  values of 0.170 and 0.213 respectively. The coefficient regression plots were obtained for a depth of 15  $\mu\text{m}$  [Figure 4(e, f)]. Considering the low signal-to-noise ratios of the Raman spectra on the 800-1750  $\text{cm}^{-1}$  spectral range, only OH- and CH<sub>3</sub>-stretching vibrations appear to be sensitive to the two biometric parameters. Given the low signal-to-noise ratios of the Raman spectra from a depth of 30  $\mu\text{m}$  on the entire spectral range, it could be assumed that no discriminant vibrations were still sensitive to the biometric parameters at this depth, as showed in Figure 4(g, h). Not surprisingly, these results demonstrated that the predicting ability of the PLS models decreases with depth due to the degradation of the Raman signal. To support this, signal-to-noise ratios ( $S_1/N$  and  $S_2/N$ ) were calculated from Raman spectra averaged for each skin depth, as depicted in Fig. 5 and Table 3. It appears that  $S_1/N$  (calculated by using the Amide I (1590-1710  $\text{cm}^{-1}$ ) and the noise (2200-2330  $\text{cm}^{-1}$ ) integrated areas) decreases drastically until 15  $\mu\text{m}$ , indicating that spectral information in the 800-1750  $\text{cm}^{-1}$  is not exploitable at this depth.  $S_2/N$  (calculated by using the CH<sub>3</sub>-stretching vibrations of proteins (2910-3040  $\text{cm}^{-1}$ ) and the noise (2200-2330  $\text{cm}^{-1}$ ) integrated areas) highly decreases until to obtain a low S/N at a depth of 30  $\mu\text{m}$ . Overall, it would appear that the  $\alpha$ -helix form of keratin and the lipids play a key-role in the skin fatigability in the upper part of the SC exclusively. This could strongly suggest that the SC presents multiple compartments having their own mechanical properties.



**Fig. 5:** Mean Raman spectra acquired at depths of 3  $\mu\text{m}$  (red), of 9  $\mu\text{m}$  (blue), of 15  $\mu\text{m}$  (black), and of 30  $\mu\text{m}$  (green). The signal-to-noise ratio  $S_1/N$  was calculated by using the Amide I (1590-1710  $\text{cm}^{-1}$ ) and the noise (2200-2330  $\text{cm}^{-1}$ ) integrated areas. The signal-to-noise ratio  $S_2/N$  was calculated by using the CH<sub>3</sub>-stretching vibrations of proteins (2910-3040  $\text{cm}^{-1}$ ) and the noise (2200-2330  $\text{cm}^{-1}$ ) integrated areas.

Depth	Signal-to-noise ratios	
	$S_1/N$	$S_2/N$
	(1580-1710 $\text{cm}^{-1}$ ) / (2200-2330 $\text{cm}^{-1}$ )	(2910-3040 $\text{cm}^{-1}$ ) / (2200-2330 $\text{cm}^{-1}$ )
3 $\mu\text{m}$	1.814	4.057
9 $\mu\text{m}$	1.071	2.101
15 $\mu\text{m}$	0.798	1.296
30 $\mu\text{m}$	0.767	0.805

**Table 3:** Signal-to-noise ratios determined for each mean Raman spectra at different depths (from 3  $\mu\text{m}$  to 30  $\mu\text{m}$ ). The signal-to-noise ratio  $S_1/N$  was calculated by using the Amide I (1590-1710  $\text{cm}^{-1}$ ) and the noise (2200-2330  $\text{cm}^{-1}$ ) integrated areas. The signal-to-noise ratio  $S_2/N$  was calculated by using the CH<sub>3</sub>-stretching vibrations of proteins (2910-3040  $\text{cm}^{-1}$ ) and the noise (2200-2330  $\text{cm}^{-1}$ ) integrated areas.

*Evolution of the spectral markers sensitive to the SC mechanical properties during aging*

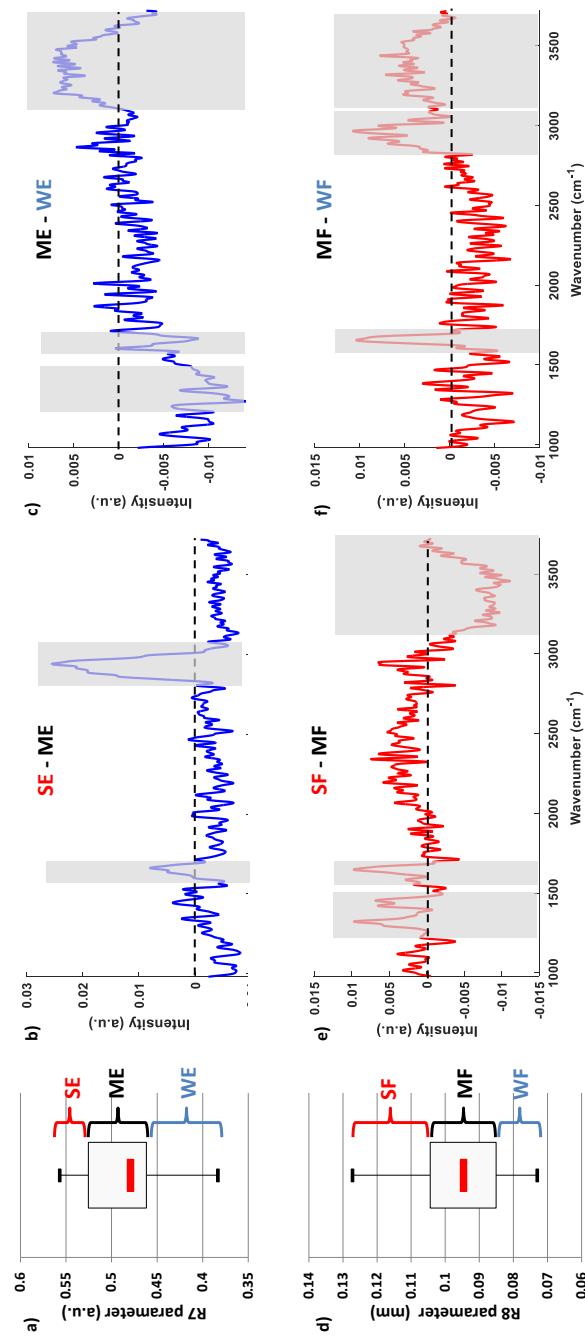
Thus, it might be possible to determine spectral vibrations sensitive to the SC mechanical properties. Thereafter, Raman features were identified as sensitive to different degrees of the SC mechanical properties. These different degrees reflect the impact of aging either weak, moderate or strong on the mechanical properties of the SC. The maximum (Max), the first (Q1) and third (Q3) quartiles, the median (Med) and the minimum (Min) values were defined within the biometric measurements dataset. These values allowed to define sub-datasets according to different degrees of skin mechanical characteristics (elasticity and fatigability), as depicted in Table 2: weak (between the Min and Q1 values), moderate (between the Q1 and Q3 values), and strong (between the Q3 and Max values).

Cutometer® parameter (units)	Dataset values				
	Min	Q1	Med	Q3	Max
R7 (a.u.)	0.383	0.462	0.479	0.525	0.557
Elasticity	Weak		Moderate		Strong
R8 (mm)	0.073	0.085	0.095	0.104	0.127
Fatigability	Weak		Moderate		Strong

**Table 4:** Minimum (Min), 1<sup>st</sup> (Q1) and 3<sup>rd</sup> (Q3) quartiles, and maximum (Max) values for each biometric parameter (R7 and R8) dataset. Different groups of mechanical characteristics (elasticity and fatigability) were defined: weak (between the Min and Q1 values), moderate (between the Q1 and Q3 values), and strong (between the Q3 and Max values).

Raman sub-datasets were also obtained on the basis of the repartition of the subjects' biometric data into each group of SC mechanical characteristics. Only Raman spectra

acquired at a depth of 3 µm within the skin were selected due to their high signal-to-noise ratio. Thereafter, the difference spectra were obtained by subtracting the spectra collecting on subjects presenting a particular degree of a mechanical characteristic (*e.g.* moderate elasticity), from those acquired on subjects presenting a superior degree of the same mechanical characteristic (*e.g.* strong elasticity). Thus, these difference spectra displayed the spectral features sensitive to a moderate-strong elasticity [Fig. 6(b)], weak-moderate elasticity [Fig. 6(c)], moderate-strong fatigability [Fig. 6(e)], weak-moderate fatigability [Fig. 6(f)]. For a moderate-strong elasticity of the *SC*, the difference spectrum shows a sensitivity to the CH<sub>3</sub>-stretching vibrations from lipids and proteins, and to the C=O-stretching vibrations from proteins. Concerning the weak-moderate *SC* elasticity, the OH- and C=O-stretching, and CH-deformation vibrations were noticed. Then, the OH- and C=O-stretching, and the CH-deformation vibrations were observed for a moderate-strong fatigability of the *SC*. The vibration in 1656 cm<sup>-1</sup> (C=O-stretching vibrations from  $\alpha$ -helix forms of proteins, followed by the CH<sub>3</sub>- and OH- stretching vibrations seem to contribute to a weak-moderate fatigability. Overall, these difference spectra show that CH<sub>3</sub>-stretching vibrations (from lipids and proteins) could be sensitive to a *SC* having a moderate-strong elasticity and a weak-moderate fatigability, whereas the CH-deformation vibrations (from proteins) could be sensitive to a *SC* having a weak-moderate elasticity and a moderate-strong fatigability. It is worth noticing that strong intense OH-stretching vibrations (from water molecules) appeared to be sensitive to a *SC* having a weak elasticity and a strong fatigability. Thus, it could be assumed that a very important hydration could alter the mechanical properties of the *SC*.



**Fig. 6:** Box plots representing the dataset values of the R7 (a) and R8 (d) parameters. Different groups of mechanical characteristics (elasticity and fatigability) were defined: WE and WF (between the Min and Q1 values), ME and MF (between the Q1 and Q3 values), and SE and SF (between the Q3 and Max values). Difference spectra were calculated by subtracting ME from SE (b), WE from ME (c), MF from SF (e), and WF from MF (f). Spectral features sensitive to a moderate-strong elasticity (b), weak-moderate elasticity (c), moderate-strong fatigability (e), weak-moderate fatigability (f) were highlighted by the gray bars.

*“Instrument-to-instrument” calibration transfer functions*

Thereafter, *in vivo* analyses coupled to PLS processing were performed on the second group of volunteers with another Raman probe ( $\text{Inst}_2$ ) of the same conception. Two CTFs were computed and assessed to verify the transferability of the predicting methods from  $\text{Inst}_1$  to  $\text{Inst}_2$ . This step of our study was carried out by considering the R7 parameter since it appeared for this biometric parameter that the coefficient of determination revealed to have the highest value. As predicting results, RMSEP values were obtained for the prediction of R7 values. The RMSEP is 0.00966 a.u. for  $\text{Inst}_1$ , whereas the RMSEP is 0.0250 a.u. for  $\text{Inst}_2$ . Showing a large difference between the predicting results obtained for each instrument, the CTFs were applied in order to address this issue. Interestingly, the RMSEP highly decreased for each tested CTF (0.0150 and 0.0143 a.u. for  $\text{CTF}_1$  and  $\text{CTF}_2$ ), getting closer to that of  $\text{Inst}_1$ . Overall, the predicting methods appear to be able to be transferred from one campaign to the other.

## **Conclusion**

This present work highlights the influence of aging on the barrier function and the biomechanical properties of the human skin by using non-invasive biophysical techniques. Combining *in vivo* confocal Raman micro-spectroscopy with PLS processing gives the opportunity to predict different skin characteristics such as the elasticity and the fatigability of the skin and to identify spectral vibrations sensitive to these skin mechanical characteristics. Although the predicting results become less relevant with skin depth, these latter show that the *stratum corneum* could have different compartments having their own characteristics. Thereafter, it has been shown that the presence of the main components of the SC ( $\alpha$ -helix form of proteins and lipids) and a moderate hydration is crucial to obtain very satisfying

mechanical characteristics, i.e. a strong elasticity and a low fatigability of the SC. Finally, using calibration transfer functions demonstrated the possibility to transfer predicting methods from a campaign to another led with a distinct Raman microprobe. This pilot study investigated the relationship between the age-related changes of the skin molecular composition and the different skin characteristics. This promising methodology could be of a great interest for a better understanding of the skin aging both in medical and dermo-cosmetic fields.

## **Acknowledgments**

C. Eklouh-Molinier is a recipient of a doctoral fellowship of the Region Champagne-Ardenne (projet VITALITE). The project VITALITE is co-funded by the European Union. The Europe is committed in Champagne-Ardenne through the European Funds for Regional Development (FEDER). The authors would like to thank O. Darner, M. Essendoubi, M. Fétré, and C. Ruelens for excellent technical assistance. The Région Champagne-Ardenne (projet VITALITE) and the Plateform of Cellular and Tissular Imaging (PICT) are also grateful acknowledged for the equipment availability.

## **Conflict of Interest**

The authors have declared no conflicting of interest.

## **References**

1. Friberg S, Kayali I, Beckerman W (1990) Water permeation of reaggregated stratum corneum with model lipids. J Invest Dermatol 94:377-380

2. Schreiner V, Gooris G (2000) Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J Invest Dermatol* 114:654–660
3. Madison K (2003) Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121:231–241
4. Elias P (2005) Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J. Gen. Intern. Med.* 125:183-200
5. Oxlund H, Manschot J, Viidik A (1988) The role of elastin in the mechanical properties of skin. *J Biomech* 21:213–218
6. Doillon CJ, Dunn MG, Bender E, Silver FH (1985) Collagen Fiber Formation in Repair Tissue: Development of Strength and Toughness. *Coll Relat Res* 5:481–492
7. Leveque J, Poelman M, Rigal J De, Kligman A (1988) Are corneocytes elastic? *Dermatology* 176:65-69
8. Hara Y, Masuda Y, Hirao T, Yoshikawa N (2013) The relationship between the Young's modulus of the stratum corneum and age: a pilot study. *Skin Res Technol* 19:339–45
9. Leveque JL, Audoly B (2013) Influence of Stratum Corneum on the entire skin mechanical properties, as predicted by a computational skin model. *Skin Res Technol* 19:42–46
10. Tagami H (2008) Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *Int J Cosmet Sci* 30:413–434

11. Boireau-Adamezyk E, Baillet-Guffroy A, Stamatas GN (2014) Age-dependent changes in stratum corneum barrier function. *Skin Res Technol* 20:409–415
12. Farage M, Miller K (2008) Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosmet Sci* 30:87–95
13. Escoffier C, Rigal J de (1989) Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. *J. Invest Dermatol* 93:353-357
14. Rittié L, Fisher G (2002) UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 1:705-720
15. Braverman I, Fonferko E (1982) Studies in cutaneous aging: I. The elastic fiber network. *J Invest Dermatol* 78:434-443
16. Frances C, Branchet M, Boisnic S (1990) Elastic fibers in normal human skin. Variations with age: a morphometric analysis. *Arch Gerontol Geriatr* 10:57–67
17. Ryu HS, Joo YH, Kim SO, Park KC, Youn SW (2008) Influence of age and regional differences on skin elasticity as measured by the Cutometer. *Skin Res Technol* 14:354–358
18. Krueger N, Luebberding S, Oltmer M, Streker M, Kerscher M (2011) Age-related changes in skin mechanical properties: a quantitative evaluation of 120 female subjects. *Skin Res Technol* 17:141–148
19. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M (2013) Skin physiology in men and women: in vivo evaluation of 300 people including TEWL, SC hydration, sebum content and skin surface pH. *Int J Cosmet Sci* 35:477–483

20. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M (2013) Age-related changes in skin barrier function - quantitative evaluation of 150 female subjects. *Int J Cosmet Sci* 35:183–190
21. Luebberding S (2014) Mechanical properties of human skin *in vivo*: a comparative evaluation in 300 men and women. *Skin Res Technol* 20:127–135
22. Caspers P, Lucassen G (2001) In vivo confocal Raman micro-spectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol* 116:434–442
23. Egawa M, Hirao T, Takahashi M (2007) In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles obtained with Raman spectroscopy. *Acta Derm Venereol* 87:4–8
24. Egawa M, Tagami H (2008) Comparison of the depth profiles of water and water-binding substances in the stratum corneum determined *in vivo* by Raman spectroscopy between the cheek and volar forearm skin: effects of age, seasonal changes and artificial forced hydration. *Br J Dermatol* 158:251–260
25. Gniadecka M, Nielsen O, Wessel S, Heidenheim M, Christensen D, Wulf H (1998) Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *J Invest Dermatol* 111:1129–1133.
26. Wold S, Sjöström M, Eriksson L (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom Intell Lab Sys* 58:109–130
27. Bro R (1996) Multiway calibration. Multilinear PLS. *J Chemom* 10:47–61

28. Vyumuuhore R, Tfayli A, Duplan H, Delalleau A, Manfait M, Baillet-Guffroy A (2013) Raman spectroscopy: a tool for biomechanical characterization of Stratum Corneum. *J Raman Spectrosc* 44:1077–1083
29. Vyumuuhore R, Tfayli A, Piot O, Le Guillou M, Guichard N, Manfait M, Baillet-Guffroy A (2014) Raman spectroscopy: in vivo quick response code of skin physiological status. *J Biomed Opt* 19:111603
30. Garthwaite, PH (1994) An interpretation of partial least squares. *J Amer Statist Assoc* 89:122-127
31. Arlot S, Celisse A (2010) A survey of cross-validation procedures for model selection. *Statistics Surveys* 4: 40-79
32. Stone M (1974) Cross-Validatory Choice and Assessment of Statistical Predictions. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 36: 111-147
33. Cordella C, Bertrand D (2014) SAISIR: A new general chemometric toolbox. *Trends Anal Chem* 54:75–82
34. Lecellier A, Gaydou V, Mounier J, Hermet A, Castrec L, Barbier G, Ablain W, Manfait M, Toubas D, Sockalingum GD (2015) Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiol* 45:126–134
35. Christensen M, Hargens C (1977) Viscoelastic properties of intact human skin: instrumentation, hydration effects, and the contribution of the stratum corneum. *J. Invest Dermatol* 69:282-286

36. Hendriks FM, Brokken D, Oomens CWJ, Bader DL, Baaijens FPT (2006) The relative contributions of different skin layers to the mechanical behavior of human skin in vivo using suction experiments. *Med Eng Phys* 28:259–266
37. Wildnauer R, Bothwell J, Douglass A (1971) Stratum corneum biomechanical properties I. Influence of relative humidity on normal and extracted human stratum corneum. *J Investig Dermatol* 56:72-78
38. Lundström A, Serre G, Haftek M, Egelrud T (1994) Evidence for a role of corneodesmosin, a protein which may serve to modify desmosomes during cornification, in stratum corneum cell cohesion and desquamation. *Arch Dermatol Res* 286:369–375
39. Vyumuuhore R, Tfayli A, Duplan H, Delalleau A, Manfait M, Baillet-Guffroy A (2013) Effects of atmospheric relative humidity on Stratum Corneum structure at the molecular level: ex vivo Raman spectroscopy analysis. *Analyst* 138:4103–111

## **IV. 3. Etude complémentaire**

### **Mise en évidence de marqueurs spectroscopiques associés à la fonction barrière de la peau par corrélation des données spectrales Raman et des mesures de la perte insensible en eau.**

L'étude précédente nous a permis de mettre en évidence des corrélations entre les données spectrales Raman et les mesures des propriétés mécaniques de la peau au moyen de la combinaison de la micro-spectroscopie Raman avec la méthode de régression PLS (Partial Least Squares). Ainsi, cette méthodologie s'est avérée intéressante pour mieux évaluer les altérations moléculaires et structurales que subit la fonction barrière du *stratum corneum* (*SC*) au cours du vieillissement chronologique. En plus d'être de moins en moins efficace contre les agressions mécaniques, le *SC* est moins à même de protéger convenablement l'organisme contre la perte en eau. Dans cette étude, nous allons adopter la même démarche méthodologique que celle utilisée dans l'Article #4 afin de déterminer la relation entre la composition moléculaire du *SC* et la capacité de sa fonction barrière à se prémunir contre la perte en eau.

#### **IV. 3. 1. Introduction**

Comme cela a été décrit dans l'Introduction (cf. Chapitre I.1.1), le *SC* constitue la première ligne de défense contre les agressions extérieures. Néanmoins, le *SC* subit des modifications moléculaires et structurales au cours du vieillissement, rendant ainsi sa fonction barrière moins efficace. L'une des plus importantes fonctions de la peau est de prévenir la perte en eau par évaporation et de protéger le corps contre la pénétration de molécules exogènes (113). Caractérisant le taux d'eau perdue au travers de la peau, la perte insensible en eau (PIE) (cf. Chapitre I.1.1) est un processus physiologique considéré comme l'un des paramètres les plus importants pour évaluer la fonctionnalité et le statut barrière de la peau. Ainsi, l'altération de la fonction barrière conduirait à une évaporation plus importante de l'eau à travers la peau (114). Bien que de nombreuses pathologies affectent la fonction barrière de

la peau, l'impact du vieillissement chronologique sur cette dernière demeure encore à l'heure actuelle un sujet à controverse.

Dans ce travail, nous avons réalisé *in vivo* des mesures de PIE sur la peau de volontaires féminins d'âges différents. Des corrélations entre les spectres Raman et les données de PIE ont pu être effectuées par la méthode de régression PLS. Les spectres Raman sont identiques à ceux utilisés dans l'Article #4. Le traitement des données spectrales et biométriques donne également accès aux coefficients de régression, permettant d'associer la fonction barrière de la peau à certaines vibrations spectrales Raman, et ce à différentes profondeurs du SC.

#### **IV. 3. 2. Matériels et méthodes**

##### ***IV. 3. 2. 1. Recrutement des volontaires***

Un nombre de 32 volontaires féminins a été sélectionné pour participer à cette étude après avoir donné leur consentement sous forme écrite. Les sujets ont été équitablement distribués en trois groupes d'âges différents (groupe I : 20-35 ans ; groupe II : 36-50 ans ; groupe III : 51-70 ans). Les volontaires présentaient une peau de phototype II ou III, et aucune d'entre elles ne présentaient de pathologies cutanées particulières. Les sujets ayant été exposées aux UV pendant une période inférieure à un mois avant la prise des mesures et ayant de fortes habitudes tabagiques ont été exclues de cette étude. Les volontaires ne devaient appliquer ni de produits cosmétiques ni autres topiques au niveau de leur peau au moins 48h avant la prise des mesures. La peau des sujets était acclimatée sous des conditions ambiantes contrôlées (température de 22 +/- 2°C, humidité relative de 40%). Les mesures Raman et de PIE ont été effectuées sur le côté intérieur de l'avant-bras. Ce site anatomique a été choisi pour être peu exposé aux rayonnements UV.

##### ***IV. 3. 2. 2. Acquisition des mesures de PIE et analyse statistique***

Afin d'évaluer la fonction barrière de la peau, la PIE a été mesurée à l'aide de la sonde Aquaflux AF200, qui a été décrite précédemment (*cf. Chapitre II.2.2*). Les mesures de PIE ont été répétées deux fois pour chaque volontaire.

Les valeurs obtenues ont été moyennées pour chaque volontaire et ont été confrontées avec l'âge chronologique des sujets afin de vérifier une corrélation du type régression linéaire.

Le coefficient de détermination  $R^2$  et le taux de significativité de corrélation  $p$  ont été déterminés en utilisant le test du coefficient de corrélation de Pearson. Toute valeur de  $p$  inférieure à 0.05 ( $p < 0.05$ ) a été considérée comme statistiquement significative.

#### **IV. 3. 2. 3.    *Acquisition et pré-traitement des données spectrales Raman***

Les données spectrales Raman ont été acquises à l'aide d'une micro-sonde confocale Raman (*cf.* Chapitre II.1.2.2). Les acquisitions et le pré-traitement des données spectrales ont été effectués à l'aide du logiciel LabSpec 5 (Horiba Jobin-Yvon, Villeneuve d'Ascq, France). Afin de prendre en compte la variabilité intra-individuelle au sein de la peau, les mesures ont été réalisées à trois différentes positions espacées de quelques millimètres pour chaque volontaire. Pour chaque position, des profils spectraux Raman ont été acquis à différentes profondeurs de la peau, allant de la surface (0  $\mu\text{m}$ ) à 15  $\mu\text{m}$  de profondeur, et ce avec un pas de 3  $\mu\text{m}$ .

Pour limiter le bruit, les données spectrales ont été lissées à l'aide d'un filtre de Savitzky-Golay. La ligne de base a été corrigée pour chaque spectre en utilisant une approximation polynomiale. Enfin, les spectres ont subi une normalisation vectorielle afin de permettre une comparaison des données spectrales entre elles.

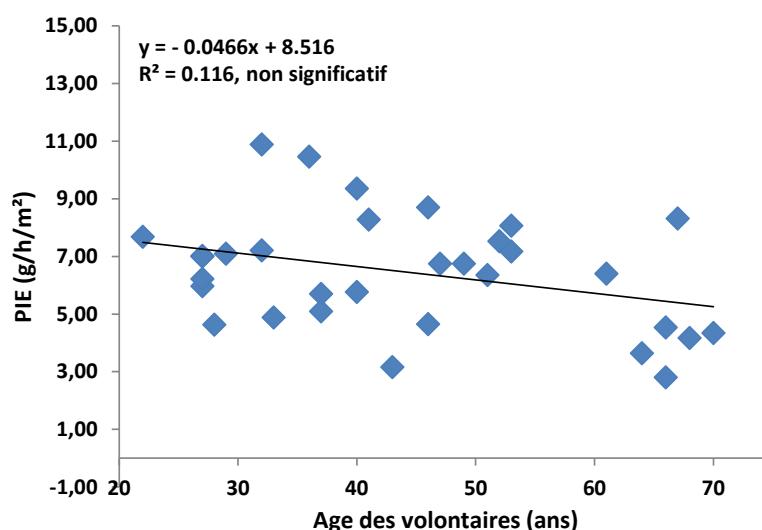
#### **IV. 3. 2. 4.    *Traitements des données par la méthode PLS***

Comme cela a été expliqué dans le Chapitre II.3.3.3, le principe de la méthode PLS consiste à construire un modèle de régression linéaire pour expliquer une observation  $Y$  en fonction d'un jeu de données  $X$ . Dans notre cas, les spectres Raman ( $X$ ) ont été utilisés pour prédire les données de PIE ( $Y$ ). Le jeu de données  $X$  a été divisé de la manière suivante : 75 % des données ont été utilisées pour la calibration des modèles, et les 25% restants pour évaluer la performance de ces derniers. Avant de construire les modèles de prédiction, le nombre optimal de variables latentes a été déterminé en minimisant l'erreur RMSE (*Root Mean Square Error*) au cours d'une validation croisée « leave-one-out ». Le traitement par PLS a été réalisé à l'aide du logiciel MatLab 8.3 (The Mathworks, USA) et les algorithmes utilisés ont été développés par Dominique Bertrand et Christophe Cordella (115).

#### **IV. 3. 3. Résultats et discussion**

##### ***IV. 3. 3. 1. Corrélation entre les données de PIE et l'âge chronologique des volontaires***

La figure 40 montre l'évolution de la PIE en fonction de l'âge des sujets. En dépit d'une tendance indiquant une diminution progressive de la PIE avec l'âge, aucune corrélation significative ( $R^2 = 0.116$ ) n'a été trouvée. Ainsi, nos résultats montrent que la capacité du SC à retarder l'évaporation de l'eau à travers la peau ne semble pas décliner avec l'âge chronologique. Dans la littérature, il n'apparaît pas de consensus quant à une corrélation entre la PIE et l'âge chronologique (54, 55, 71, 116, 117).



**Figure 40 : Evolution de la perte insensible en eau (PIE) en fonction de l'âge chronologique des volontaires.**

##### ***IV. 3. 3. 2. Etablissement des modèles de régression PLS en fonction de la profondeur de la peau***

Nous avons utilisé la micro-spectroscopie confocale Raman afin d'acquérir des spectres Raman à différentes profondeurs du SC : 3 µm, 9 µm, et 15 µm. Pour chaque profondeur, un modèle de régression a été construit pour prédire les données de PIE. Les résultats de régression pour chaque modèle PLS sont montrés dans le Tableau 3.

Profondeur SC	Variables latentes	RMSEC	RMSEP	R <sup>2</sup>
3 µm	4	0.313	0.378	0.924
9 µm	5	0.326	0.336	0.850
15 µm	5	0.313	0.389	0.408

**Tableau 3 : Nombre de variables latentes utilisées, RMSEC, RMSEP, et valeurs de R<sup>2</sup> pour la mesure de la PIE et pour chaque profondeur de la peau (3, 9, et 15 µm).**

Pour des spectres acquis à 3 µm de profondeur, le coefficient de détermination R<sup>2</sup> de 0.924 indique que le modèle de régression construit à partir des spectres Raman ajuste correctement les données de PIE. Pour des spectres acquis à 9 µm et à 15 µm, les valeurs de R<sup>2</sup> sont respectivement de 0.850 et de 0.408. Ces résultats montrent ainsi que les capacités prédictives des modèles PLS diminuent avec la profondeur, ceci étant dû à une progressive dégradation de la qualité du signal Raman.

Par la suite, les coefficients de régression ont été utilisés pour décrire les vibrations spectrales Raman sensibles à la mesure de PIE (Tableau 4 et Figure 41). Pour des spectres acquis à 3 µm de profondeur, le vecteur de régression présente des vibrations discriminantes à 1656 cm<sup>-1</sup>, 2895 cm<sup>-1</sup>, et 2954 cm<sup>-1</sup>, attribuées respectivement aux vibrations d'étirement des C=O (vC=O) des protéines, aux vibrations d'étirement des CH<sub>3</sub> (vCH<sub>3</sub>) des lipides, et aux vibrations d'étirement des CH<sub>3</sub> (vCH<sub>3</sub>) des protéines. Il est à noter que la vibration à 1656 cm<sup>-1</sup> est plus précisément attribuée à l'hélice  $\alpha$  de la kératine (112) et que l'intensité de cette vibration est très élevée pour cette caractéristique spectrale. Cela suggère que les protéines sous forme d'hélice  $\alpha$  jouent un rôle dans la résistance de la peau à la diffusion de l'eau. De plus, nos résultats ont pu montrer que les lipides auraient également un rôle important.

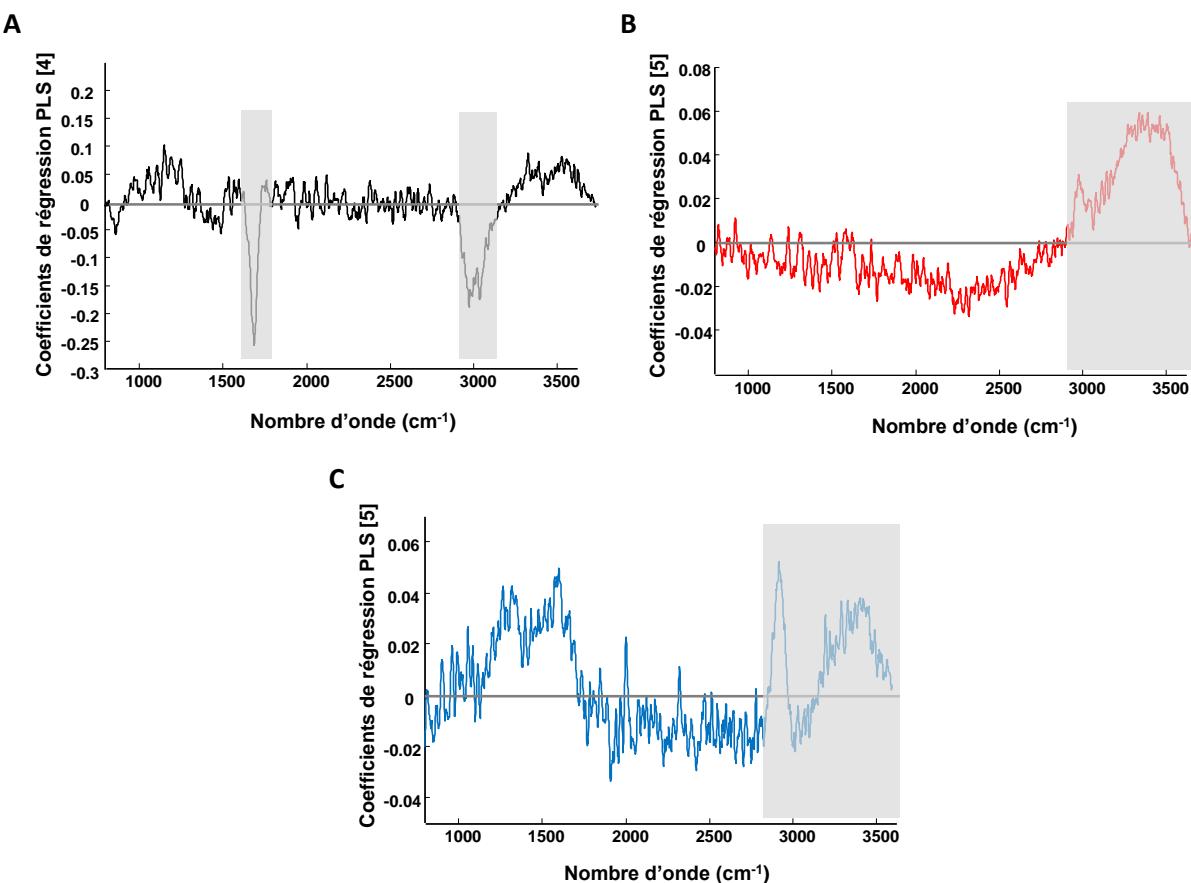
Pour des spectres acquis à 9 µm de profondeur, le vecteur de régression présente des caractéristiques spectrales correspondant aux vibrations d'étirement des CH<sub>3</sub> (vCH<sub>3</sub>) des lipides et des protéines (2890-3050 cm<sup>-1</sup>) et aux vibrations d'étirement des OH (vOH) des molécules d'eau (3100-3600 cm<sup>-1</sup>). L'apparition des vibrations spectrales associées aux molécules d'eau est cohérente avec une augmentation du signal de l'eau en fonction de la profondeur (118, 119). L'absence de la vibration à 1656 cm<sup>-1</sup> indiquerait que la forme  $\alpha$  de la

kératine ne serait pas sensible à la PIE à cette profondeur. Cette observation pourrait être associée au fait que les protéines subissent un processus de dépliement en fonction de la profondeur de la peau (112). Ainsi les protéines ne joueraient plus de rôle dans la PIE à cette profondeur, du fait de leurs changements de conformation.

Enfin, un vecteur de régression a également obtenu pour des spectres acquis à une profondeur de 15 µm. Comme le rapport signal/bruit (S/B) des spectres est faible dans la gamme spectrale 800-1750 cm<sup>-1</sup> (*cf.* Article #4), seules les vibrations vOH et vCH<sub>3</sub> apparaissent sensibles à la mesure de la PIE.

Vibrations spectrales Raman sensibles à la PIE				
Profondeur SC	vC=O des protéines (hélice α) (1656 cm <sup>-1</sup> )	vCH <sub>3</sub> des lipides (2895 cm <sup>-1</sup> )	vCH <sub>3</sub> des protéines (2954 cm <sup>-1</sup> )	vOH de l'eau (3100-3600 cm <sup>-1</sup> )
3 µm	X	X	X	
9 µm		X	X	X
15 µm			X	X

**Tableau 4 : Vibrations spectrales Raman associées aux coefficients de régression et sensibles à la mesure de la PIE pour chaque profondeur de la peau (3, 9, et 15 µm).**



**Figure 41 : Vecteurs de régression mettant en évidence les vibrations spectrales sensibles à la PIE pour des profondeurs de 3 µm (A), de 9 µm (B), et de 15 µm (C) par des barres grisées. Le nombre de variables latentes utilisées est indiqué entre crochets sur l'axe des ordonnées.**

#### IV. 3. 4. Conclusions et perspectives

Cette étude préliminaire nous a permis d'analyser à l'aide de méthodes biophysiques directes et non-invasives la fonction barrière du SC en fonction du vieillissement chronologique. En confrontant les données de PIE avec l'âge des volontaires, il s'est avéré que la fonction barrière du SC n'est pas altérée au cours du vieillissement chronologique. Bien que les mesures aient été effectuées seulement sur un site anatomique particulier (*i.e.* la zone de l'avant-bras non exposée aux rayonnements UV), cela indiquerait que la PIE ne serait pas un bon indicateur du vieillissement chronologique. De plus, les résultats obtenus dans cette étude ont pu montrer que le couplage de la micro-spectroscopie confocale Raman avec le traitement PLS permettrait d'établir des modèles de prédiction des mesures de la PIE. Bien

que les capacités de prédition des modèles diminuent avec la profondeur, il est intéressant de considérer que le *SC* présente plusieurs compartiments ayant leurs propres caractéristiques. En effet, une étude récente a pu démontrer, à l'aide d'un modèle mathématique, que le *SC* était constitué de trois régions bien distinctes (120). La partie inférieure du *SC*, étant la zone de transition entre la couche cornée et la couche granuleuse, contiendrait des éléments structuraux permettant la résistance du *SC* à la diffusion de l'eau. Cette résistance se renforcerait et atteindrait son maximum dans la partie médiane du *SC*, s'apparentant plus au *stratum compactum*. Enfin, cette résistance se dégraderait vers la surface au niveau de la couche desquamante (ou *stratum disjunctum*). Une analyse des mécanismes dynamiques (*i.e.* formation et dégradation de la résistance à la diffusion de l'eau) au sein du *SC* nous permettrait de mieux évaluer l'état de la fonction barrière de la peau.

**CHAPITRE V :**

**LA GLYCATION NON-ENZYMATIQUE : UN  
PHENOMENE CONTRIBUANT AU VIEILLISSEMENT  
CHRONOLOGIQUE**

## **V. 1. Généralités sur la glycation non-enzymatique**

Les mécanismes impliqués dans le vieillissement chronologique sont très variés et souvent liés les uns aux autres. Parmi les différentes causes participant au processus de vieillissement, celle concernant les réactions de glycation fait l'objet d'études récentes montrant l'importance de ce processus.

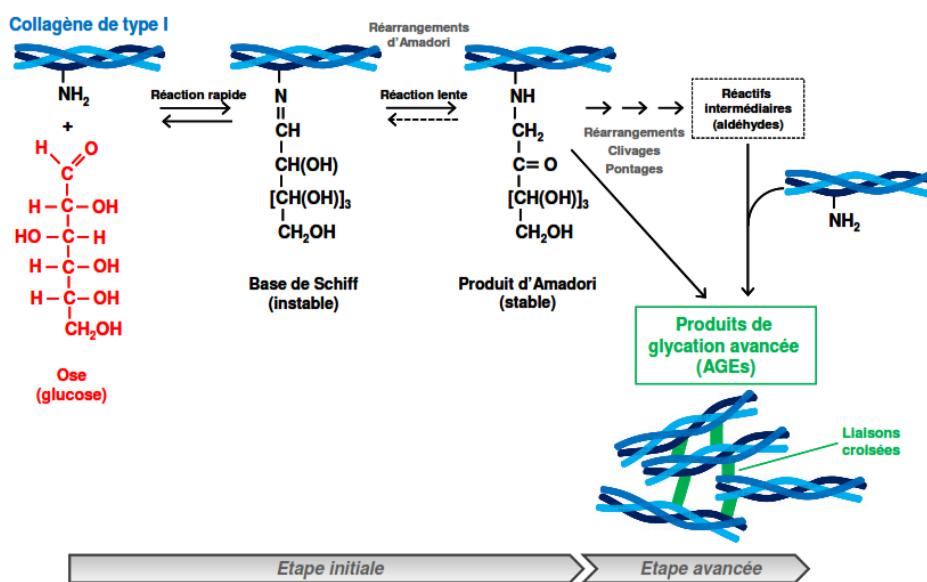
Initialement décrite par Louis-Camille Maillard, la glycation non-enzymatique (ou réaction de Maillard) est une réaction liée au brunissement des aliments lors de leur cuisson (121). Cette modification post-traductionnelle tardive affecte les biomolécules ayant une longue durée de vie et étant en contact prolongé avec les métabolites circulants comme les sucres. L'importance de la glycation non-enzymatique provient de son caractère cumulatif : en effet, la fixation des métabolites sur les biomolécules est généralement irréversible. Par la suite, cette modification peut s'amplifier au cours du temps et ainsi conduire progressivement à l'altération des fonctions des biomolécules. Cependant, certaines pathologies métaboliques telles que le diabète sucré, qui se caractérise par une hyperglycémie, peuvent favoriser ce type de réaction. En effet, le glucose interagit avec les protéines environnantes, ce qui accentue le processus de glycation non-enzymatique : on parle alors de « vieillissement accéléré » des protéines (122).

Parmi les protéines de la MEC, le collagène de type I constitue l'une des cibles préférentielles de la glycation non-enzymatique, du fait de son abondance dans la peau et sa demi-vie relativement longue estimée à 15 ans (123). La glycation du collagène de type I se fait au niveau des résidus lysine (Lys) et arginine (Arg) de la triple hélice (124). Cette réaction non-enzymatique comporte deux étapes (Figure 42) :

- La première étape, dite initiale, consiste à former une liaison covalente entre le groupement carbonyle d'un ose réducteur (*i.e.* glucose, ribose) et le groupement amine libre d'un résidu Lys ou Arg. Cela conduit à la formation d'une base de Schiff qui sera par la suite stabilisée par des réarrangements intramoléculaires pour former des composés dicarbonyles stables et rendant la réaction irréversible : les produits d'Amadori.
- La deuxième étape, dite avancée, conduit les produits d'Amadori à subir des réarrangements complexes, tels que des clivages et/ou des pontages covalents. Ces réactions biochimiques mènent ainsi à la formation d'adduits stables et de liaisons

croisées au sein des protéines : les produits de glycation avancée (*AGEs* pour *Advanced Glycation End-products*).

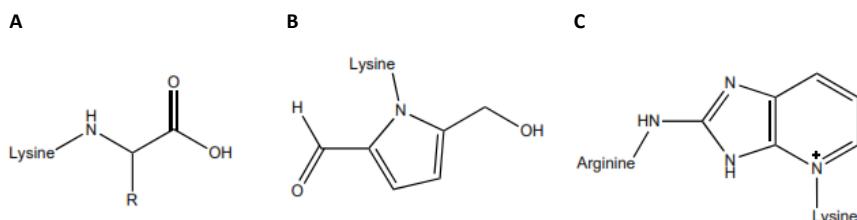
Les liaisons croisées intermoléculaires formées par la glycation non-enzymatique diffèrent complètement des liaisons intermoléculaires de « maturation ». En effet, ces dernières, comme décrit précédemment dans le Chapitre I.1.3.2.1, sont formées par action enzymatique par des lysyl-oxydases au niveau des télopeptides, et ce afin de stabiliser la triple hélice de collagène et de permettre la formation des fibrilles.



**Figure 42 : Les étapes de la réaction de glycation non-enzymatique du collagène de type I (125).**

Du fait de leur accumulation en fonction du temps, les AGEs jouent un rôle-clé au cours du vieillissement chronologique. Le premier AGE à avoir été identifié dans les tissus *in vivo* (126) est la Nε-carboxyméthyl-lysine (ou CML), qui résulte de la réaction entre un sucre et les résidus lysine d'une molécule de collagène (Figure 43). Diverses études ont pu mettre en évidence par immunomarquage une accumulation de la CML dans des coupes de peaux d'âges différents (127) et dans des modèles de peaux reconstruites et glyquées *in vitro* (128, 129). D'autres AGEs, tels que la pyrraline, sont issus de la même réaction et provoquent une augmentation de la masse moléculaire et un encombrement stérique au niveau de la triple hélice de collagène. Cependant, les AGEs les plus impliqués lors du vieillissement sont ceux capables de former des liaisons croisées intermoléculaires. Ces derniers résultent de la

réaction entre deux résidus Lys/Lys ou Lys/Arg, appartenant à deux molécules de collagène adjacentes. Parmi ces AGEs particuliers, la pentosidine a été la plus décrite dans la littérature. Ayant des propriétés d'autofluorescence dues à sa structure, cet AGE participe à l'augmentation de la fluorescence tissulaire observée au cours du vieillissement et chez les patients diabétiques (130).



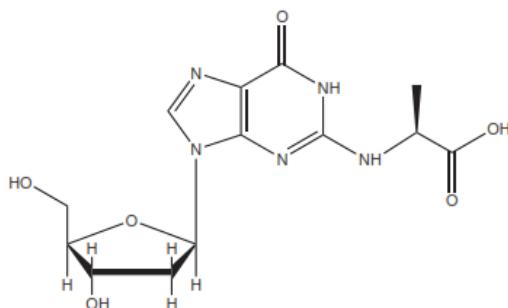
**Figure 43 : Structures chimiques des principaux produits de glycation avancée (AGEs) :**  
**(A) CML (R=H), (B) Pyrraline, (C) Pentosidine (131).**

Comme mentionné plus haut, la formation des AGEs au sein du collagène de type I augmente au cours du vieillissement. Les liaisons croisées formées ont un impact non négligeable sur les propriétés physico-chimiques des fibres de collagène. Devenant moins flexibles et moins solubles, ces dernières présentent une température de dénaturation et une résistance aux dégradations enzymatiques plus importantes. En conséquence, toutes ces altérations vont entraîner une perte de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la MEC et des tissus collagéniques (130). En effet, il a été montré que le réseau de collagène de type I apparaît plus désorganisé et fragmenté au cours du vieillissement de la peau (132). Ainsi, l'augmentation de la rigidité du collagène de type I constitue l'une des composantes majeures dans les altérations tissulaires avec l'âge.

Le processus de glycation constitue également un élément déterminant dans les interactions entre les cellules et la MEC. En effet, la formation d'AGEs sur les résidus Lys et Arg modifie les séquences peptidiques RGD et GFODER du collagène spécifiquement reconnues par les récepteurs d'adhésion cellulaire : les intégrines. La rigidité de la MEC, induite par la réaction de glycation, va pouvoir influencer le comportement cellulaire en inhibant l'adhésion et la migration des kératinocytes (133) et des fibroblastes (134).

Bien que le processus de glycation des protéines ait fait l'objet de nombreuses études, peu de choses sont connues au sujet de la glycation des acides nucléiques. Dans les années 80, il a été démontré que l'incubation *in vitro* de l'ADN avec du glucose et du glucose-6-

phosphate conduisait à des changements de fluorescence de l'ADN, indiquant que l'ADN subissait une glycation non-enzymatique (135). Jusqu'à maintenant, il a été montré que parmi toutes les bases nucléiques de l'ADN, les ROS (*Reactive Oxygen Species*) avaient un fort taux de glycation avec la déoxyguanosine (136). En effet, la N<sup>2</sup>-carboxyethyl-2'-déoxyguanosine (CEdG) (Figure 44) est le principal AGE résultant de la glycation de l'ADN par le méthylglyoxal, un composé dicarbonyl hautement réactif.



**Figure 44 : Structure chimique de la N<sup>2</sup>-carboxyethyl-2'-déoxyguanosine (CEdG) (131).**

Afin d'étudier la pertinence physiologique des AGEs de l'ADN, un modèle a été mis au point afin d'introduire spécifiquement des modifications de CEdG au sein même de l'ADN. Cela a eu pour conséquence de causer des cassures simple brin, des dépurinations et des mutations locales de l'ADN (137, 138). Toutes ces altérations structurales ont un impact sur la fonctionnalité de l'ADN.

De plus, d'autres études ont montré la formation d'AGEs d'ADN dans des conditions de culture cellulaire et *in vivo*. En effet, des bases nucléiques glyquées ont été mesurées dans des échantillons d'urine humaine, des cellules musculaires lisses humaines et des cellules endothéliales bovines par immunomarquage (139, 140). A l'échelle tissulaire, des adduits de CEdG ont été mis en évidence par immunohistochimie dans des reins et des aortes de patients diabétiques et urémiques (141).

Les méthodes employées dans ces études soit nécessitaient un marquage du matériel d'étude (*i.e.* immunomarquage des AGEs au niveau des cellules et des coupes tissulaires de peau), soit étaient destructives pour l'échantillon à analyser (*i.e.* broyage pour une analyse en chromatographie en phase liquide à haute performance (ou HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography*)). Dans ce contexte, nous avons voulu voir la nature des informations qui étaient accessibles par spectroscopie vibrationnelle (Raman dans notre cas).

## V. 2. Résultats & Discussion

### V.2.1. Préambule du chapitre V

Ce chapitre expose les résultats obtenus dans des études portant sur l'impact de la glycation non-enzymatique sur le collagène de type I, en tant que micro-environnement tumoral ; et également sur l'ADN, tant au niveau moléculaire que structural. Il se présente sous la forme de deux articles scientifiques dans lesquels les résultats sont discutés.

L'**article #5** porte sur la caractérisation des zones de transition entre des coatings de collagène de type I d'âges différents et des cellules de fibrosarcomes humains (HT-1080) par micro-imagerie IR utilisant la source synchrotron.

L'**article #6** présente une analyse de solutions d'ADN glyquées *in vitro* par micro-spectroscopie Raman. Cette étude pilote a permis d'évaluer les altérations moléculaires et structurales de l'ADN au cours de la glycation non-enzymatique.

V. 2. 2. Article #5

**Probing single tumor cell interactions with  
different-age type I collagen networks by  
synchrotron-based FTIR micro-spectroscopy**

*Journal of Biomedical Optics*, 19 (2014), pp. 111612(1-6)

- Préambule à l'article #5

## **Contexte et objectif de l'étude**

Le collagène de type I constitue la protéine structurale la plus abondante au sein de la matrice extracellulaire (MEC). Le vieillissement de cette macromolécule entraîne des altérations de ses propriétés physico-chimiques qui affectent le comportement des cellules interagissant avec les protéines de la MEC. Nous avons évalué l'impact des modifications moléculaires du collagène de type I liées au vieillissement sur la capacité des cellules tumorales à interagir avec leur micro-environnement.

## **Matériels et Méthodes**

Les coatings 2D ont été préparés à partir de collagène de type I extraits de tendons de queue de rat d'âges différents (nouveau-nés de quelques jours, jeunes adultes de deux mois, et adultes âgés de deux ans), solubilisés dans de l'acide acétique, et déposés sur des fenêtres de fluorure de calcium ( $\text{CaF}_2$ ). Par la suite, des cellules issus de fibrosarcome humain (HT-1080) ont été ensemencées dans les coatings 2D de collagène de type I d'âges différents. Des images spectrales ont été acquises sur des cellules individuelles par micro-spectroscopie IR à l'aide de la source synchrotron. Les méthodes de classification K-means et RBA-FCM ont été utilisées afin d'analyser les images spectrales et d'évaluer l'effet du vieillissement sur les zones d'interaction entre les cellules et leur substrat collagénique.

## **Résultats**

L'analyse synchrotron-IR-TF des cellules tumorales ensemencées dans les coatings 2D de collagène de type I d'âges différents a permis de différencier l'information spectrale provenant des cellules de celle des substrats collagéniques. Des marqueurs spectroscopiques associés au vieillissement du collagène de type I ont été déterminés lors de l'analyse des coatings 2D de collagène de type I d'âges différents. Nous avons observé une diminution d'intensité de ces marqueurs pour les trois conditions d'âges au niveau des zones de contact cellule/substrat collagénique, indiquant ainsi un masquage des informations biochimiques observées au niveau des spectres.

### **Conclusions**

La micro-imagerie IR est capable de mettre en évidence des différences spectrales liées au vieillissement du collagène de type I et d'évaluer l'interaction des cellules tumorales avec des substrats collagéniques d'âges différents. Cette méthodologie pourrait permettre à l'avenir une meilleure compréhension de l'impact du vieillissement sur les processus de migration tumorale.

Journal of Biomedical Optics 19(11), 111612 (November 2014)

# Probing single-tumor cell interactions with different-age type I collagen networks by synchrotron-based Fourier transform infrared microspectroscopy

**Marie Guilbert,<sup>a,b,†</sup> Christophe Eklouh-Molinier,<sup>a,b,†</sup> Katia Wehbe,<sup>c</sup> Josep Sulé-Suso,<sup>d,e</sup> Ying Yang,<sup>d</sup> Gianfelice Cinque,<sup>c</sup> Pierre Jeannesson,<sup>a,b</sup> and Ganesh D. Sockalingum<sup>a,b,\*</sup>**

<sup>a</sup>Université de Reims Champagne-Ardenne, Equipe MéDIAN-Biophotonique et Technologies pour la Santé, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France

<sup>b</sup>CNRS UMR7369, Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, 51096 Reims, France

<sup>c</sup>Diamond Light Source, Diamond House, Harwell Science and Innovation Campus, Didcot OX11 0DE, United Kingdom

<sup>d</sup>Keele University, Institute for Science and Technology in Medicine, Stoke-on-Trent, ST4 7QB, United Kingdom

<sup>e</sup>University Hospital of North Staffordshire, Cancer Centre, Newcastle Road, Stoke-on-Trent ST4 6QG, United Kingdom

Address all correspondence to:

Ganesh D. Sockalingum, Université de Reims Champagne-Ardenne, Equipe MéDIAN-Biophotonique et Technologies pour la Santé, Unité MEDyC CNRS UMR7369, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France;

Tel: +33 3 26 91 35 53; Fax: +33 3 26 91 35 50; E-mail: [ganesh.sockalingum@univ-reims.fr](mailto:ganesh.sockalingum@univ-reims.fr)

**Abstract.** We report here on a first study using synchrotron radiation-based FTIR microspectroscopy and imaging to investigate HT1080 human fibrosarcoma cells grown onto different-aged type I collagen networks. Spectral images were analyzed with k-means and FCM clustering algorithms. K-means delineated tumor cells from their surrounding collagen networks and the latter as a function of age mainly due to specific changes in the sugar absorption region. FCM analysis gave a better nuance of the spectral images. A progression of the biochemical information was observed upon going from the cellular compartments to the pericellular contact regions and to the intact collagens of the different age groups. Two spectral markers based on sugar and protein bands via the intensity ratio (I1032/I1655) and band area ratio ( $A_{\text{sugar}}/A_{\text{amide II}}$ ), showed an increase in AGEs (Advanced Glycation end-products) with age. A clear-separation of the three age groups was obtained for spectra originating from the peripheral contact areas mainly due to changes in protein band

intensities. The above-described markers decreased to constant levels for the three conditions indicating a masking of the biochemical information. These results hold promises to better understand the impact of age on tumor progression processes, while highlighting new markers of the tumor cell invasion front.

**Keywords:** Synchrotron-FTIR micro-spectroscopy, cancer cells, collagen, aging, image clustering, cell/collagen interactions

## **1      Introduction**

Studying individual cancer cells represents an increasingly area of major interest in the understanding of mechanisms implicated in tumor progression. However, investigating tumor cell migration requires considering the cell microenvironment since *in vivo*, cells develop specific interactions with their counterparts and with extracellular matrix (ECM) proteins to promote cell adhesion, proliferation and migration<sup>1</sup>. Most studies are performed in classical cell culture systems where cells are seeded on plane and rigid substrates, such as plastic or glass, which do not take into account the matrix components. Dynamic interactions between tumor cells and matrix proteins are a key determinant in the tumor progression and metastases dissemination, which represent the main uncontrolled problematic in cancer therapeutics<sup>2</sup>. Among these ECM proteins, type I collagen represents the major component in the body connective tissues, through which tumor cells usually migrate to form metastases, and which can be used as a pre-intravasation microenvironment<sup>3</sup>. In fact, specific sites of type I collagen are recognized by integrins to promote cell attachment to the matrix fibrillar network<sup>4</sup>, allowing to trigger migration cycle of cells.

Due to its particular longevity, this key matrix protein is a preferential target for post-translational modifications during chronological aging; these age-related modifications are cumulative and irreversible<sup>5</sup>, and act on the physical and biomechanical properties of collagen

networks<sup>6</sup>. The main mechanism is the accumulation of the so-called advanced glycation end products (AGEs), which are cross-linking compounds resulting from the well-known non-enzymatic glycation process<sup>7</sup>. As a result, AGEs are responsible for changes in structure and function of collagen networks, which detrimentally affect cancer cell/matrix interactions<sup>8</sup> and are suggested to be associated with cancer development.

In this work, we have analyzed HT1080 human fibrosarcoma cells, known to be highly invasive, grown on 2D coatings of different-aged type I collagens. This coating model has previously been shown as a pertinent cell culture system for studying the proliferative capacity and migratory parameters of tumor cells at the single cell level<sup>9</sup>. Cell/matrix interactions are most often studied by conventional techniques of cellular and molecular biology or biochemistry such as studying regulation of proteases secretion<sup>10</sup> or focal contacts formation<sup>11</sup>. Other approaches based on the dynamic study of cell/matrix contacts use fluorescence lifetime microscopy (FLIM) techniques which however require labeling cells with specific fluorophores<sup>12</sup>. In this study, we investigated the tumor cells grown on different-age collagen networks by synchrotron-based Fourier transform infrared (S-FTIR) micro-spectroscopy with the aim to gain insights into the cell/matrix interactions regions. The different-age collagen matrix models are based on the extraction of native and fibrillar type I collagens from newborn, young-adult and old-adult rats. These models allow analyzing the impact of aging on the cancer cell/collagen interactions.

Using S-FTIR micro-spectroscopy permits a label-free, direct, and rapid analysis of biological samples with high spatial resolution. Furthermore, the IR radiation is not damaging for cells and thus allows studying them while preserving their integrity<sup>13</sup>. Vibrational micro-spectroscopy has already proven its ability to analyze tumor cells at the single cell level. Raman spectral imaging has been used for extracting spectral signals from nucleus and cytoplasm with their biochemical attribution, showing the distribution of cell components at the subcellular scale<sup>14</sup>. In the same way, S-FTIR micro-spectroscopy has been shown to be

able to differentiate cancer cells from their normal counterparts, showing the potential of FTIR methodologies in cancer clinical diagnosis<sup>15</sup>. A recent study by both Raman and FTIR spectroscopies evaluated the effect of substrate coating on molecular and functional changes in adherent cells using analysis of point spectra<sup>16</sup>. Here, we chose to approach the single cell level analysis using a synchrotron source to benefit from its high intrinsic brightness and its ability to provide high-quality spectra at diffraction-limited spot sizes. Although it is possible to obtain reasonable cell spectra with a conventional Globar® source, in this study the use of the IR synchrotron source and small apertures are justified because our aim was to attempt to identify infrared spectral features from specific cell/collagen interaction regions. Thus, with this set-up good signal/noise data could be reached. A spectral data processing *via* clustering methods was used to analyze the spectral maps and to gain insight into spectral features of cell/matrix interaction regions and invasion fronts during the tumor progression process and to evaluate the effect of aged collagen networks on these spectral features.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Cell line**

The HT1080 human fibrosarcoma cell line (CCL-121) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) and cultured in MEM (Minimum Essential Media) with Earle salts and Glutamax (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> (v/v) and cells were routinely passaged at preconfluence using 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (EthyleneDiamineTetraAcétique) (Invitrogen) and screened for the presence of mycoplasma using PCR (Polymerase Chain Reaction) methods.

## **2.2 Preparation of different-age type I collagens**

Native type I collagens were extracted from tail tendons of different-aged Sprague-Dawley rats, newborns (a few days), 2 months (young adults) and 2 years (old adults), following the protocol previously described<sup>17</sup>. Briefly, acid-soluble type I collagens were obtained by 0.5 M acetic acid extraction then purified by dialysis against distilled water and freeze-dried. This preparation without pepsinization provides collagens with intact telopeptides, in contrast with most commercially available type I collagens. The fibrillar, purified, and native type I collagens of different-age were then stored at -80 °C until further use. As the collagen extracted from young-adult animals is commonly used in the field of biology to construct culture models, it will be considered as the control sample of our different-aged collagen range.

## **2.3 Cell culture on different-aged type I collagen coatings**

To prepare collagen coatings, type I collagens of each age were solubilised in 0.018 M acetic acid and deposited on calcium fluoride (CaF<sub>2</sub>) windows (1 x 25 mm) (Crystran, Dorset, UK) according to a concentration of 50 µg of protein per cm<sup>2</sup>. Coated surfaces were dried overnight at room temperature under sterile conditions and rinsed with distilled water before cell seeding. Then, CaF<sub>2</sub> windows were placed in a 6-well plate and HT1080 cells were seeded at a concentration of 5000 cell/ml (3 ml of cell suspension per well) and cells were grown during 48 h. Samples were then fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer during 15 min and rinsed with distilled water. For each condition of collagen age, three different-coated samples were prepared and seeded with HT1080 cells, and then between 10

and 15 individual cells for each collagen age condition were mapped by S-FTIR micro-spectroscopy.

#### **2.4    *Synchrotron-FTIR micro-spectroscopy***

S-FTIR spectral acquisitions were performed with the synchrotron source of the B22-Multimode InfraRed Imaging And Micro-spectroscopy (MIRIAM) beamline at the DIAMOND Light Source synchrotron facilities (Didcot, UK), using a Vertex 80v FT-IR spectrometer coupled to a HYPERION 3000 FT-IR microscope (Bruker Optics, UK) controlled by the Opus 6.5 software. S-FTIR data were collected directly on CaF<sub>2</sub> windows in the transmission mode with a 36X Cassegrain objective using a 10x10 μm<sup>2</sup> aperture (step size of 10 μm for whole cells and 3 μm for parts of the cell including cell/collagen contact areas). Each spectrum was a co-addition of 128 scans at 4 cm<sup>-1</sup> resolution recorded between 4000-1000 cm<sup>-1</sup>. During the acquisition, the system was operating under vacuum and prior to each spectral acquisition, a background spectrum was recorded at 256 scans accumulations on a blank part of the same CaF<sub>2</sub> window and each individual sample spectrum was ratioed to the background spectrum to reduce any atmospheric effects. Cells grown on collagen coatings were mapped individually by selecting a region of about 80 x 90 μm<sup>2</sup>. This allowed analyzing the entire single cell and its surrounding collagen substrate. As a function of the cell size (average size of 40 x 20 μm<sup>2</sup>) and of the acquisition parameters, the time for data collection from one cell to another varied from 60 to 180 minutes. Each cell was mapped individually.

#### **2.5    *Data pre-processing***

S-FTIR spectral data were pre-processed by an automated method based on the classical Extended Multiplicative Signal Correction (EMSC) algorithm implemented in the MatLab 7.2 software (The Mathworks, Natick, USA). Briefly, EMSC allows correcting the spectra for the

physical light scattering effects that are different from the chemical light absorbance effects in order to retain only the spectral variability of the sample<sup>18,19</sup>. This correction algorithm is able to remove outlier spectra or spectra with a low signal-to-noise ratio, and it also allows performing a spectral baseline correction and vector-normalization in order to render them comparable.

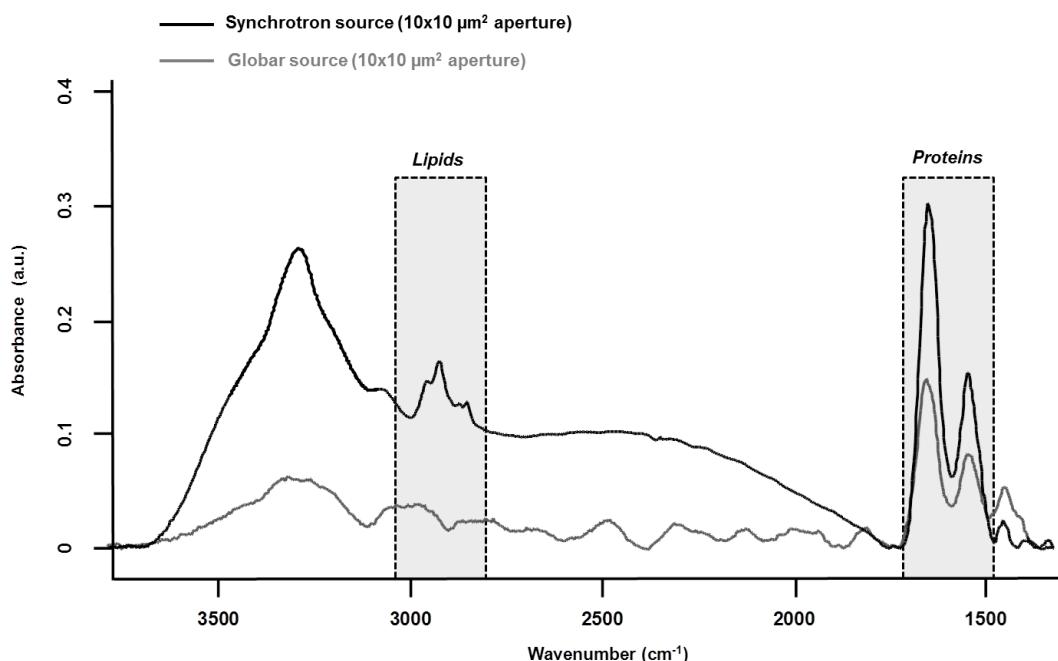
## **2.6 Spectral clustering methods**

Spectral data analyses and clustering were performed using home-made algorithms written in the Matlab 7.2 software. S-FTIR data, recorded on areas showing few cells on different-age collagen coatings, were compared using three-different unsupervised clustering methods applied on the 1800-1000 cm<sup>-1</sup> spectral range: hierarchical clustering analysis (HCA), k-means classification, and fuzzy C-means (FCM) clustering. HCA allows regrouping spectra on a minimal distance criterion using Euclidean distances and Ward's algorithm, and spectra with a high degree of homogeneity are grouped together<sup>20,21</sup>. K-means clustering consists in a non-hierarchical clustering technique partitioning spectra into pre-assigned number of clusters by selecting randomly cluster centers<sup>22,23</sup>. FCM clustering is based on the minimization of the sum of weighted distance measures between each spectrum (pixel) and each centroid, allowing to assign each spectrum to every cluster with an associated membership value comprised between 0 and 1<sup>24</sup>. FCM images were constructed with redundancy-based algorithm (RBA)-optimized parameters (number of clusters  $K$  and fuzziness index  $m$ ). This model, previously developed for tissue spectral classification<sup>25</sup>, allows providing a biologically relevant clustering. For both k-means and FCM classifications of single cell spectral maps, the calculation was performed on at least 12 different cells for each collagen-age condition, applying the same clustering parameters (number of clusters and pseudo-color coding).

### 3 Results

#### 3.1 Comparison of conventional FTIR and S-FTIR spectra at the single cell level

A synchrotron source was used to analyze HT1080 cells grown on coating substrates. Figure 1 displays the mean FTIR spectra from HT1080 cells acquired with a conventional Globar® source (in grey) and a synchrotron source (in dark), with the same aperture size of  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  at the sample. This aperture size was necessary to obtain single cell spectra, and it appeared clear that at this beam size it is important to use a synchrotron source due to the better S/N ratio obtained with the highly collimated and brilliant source.



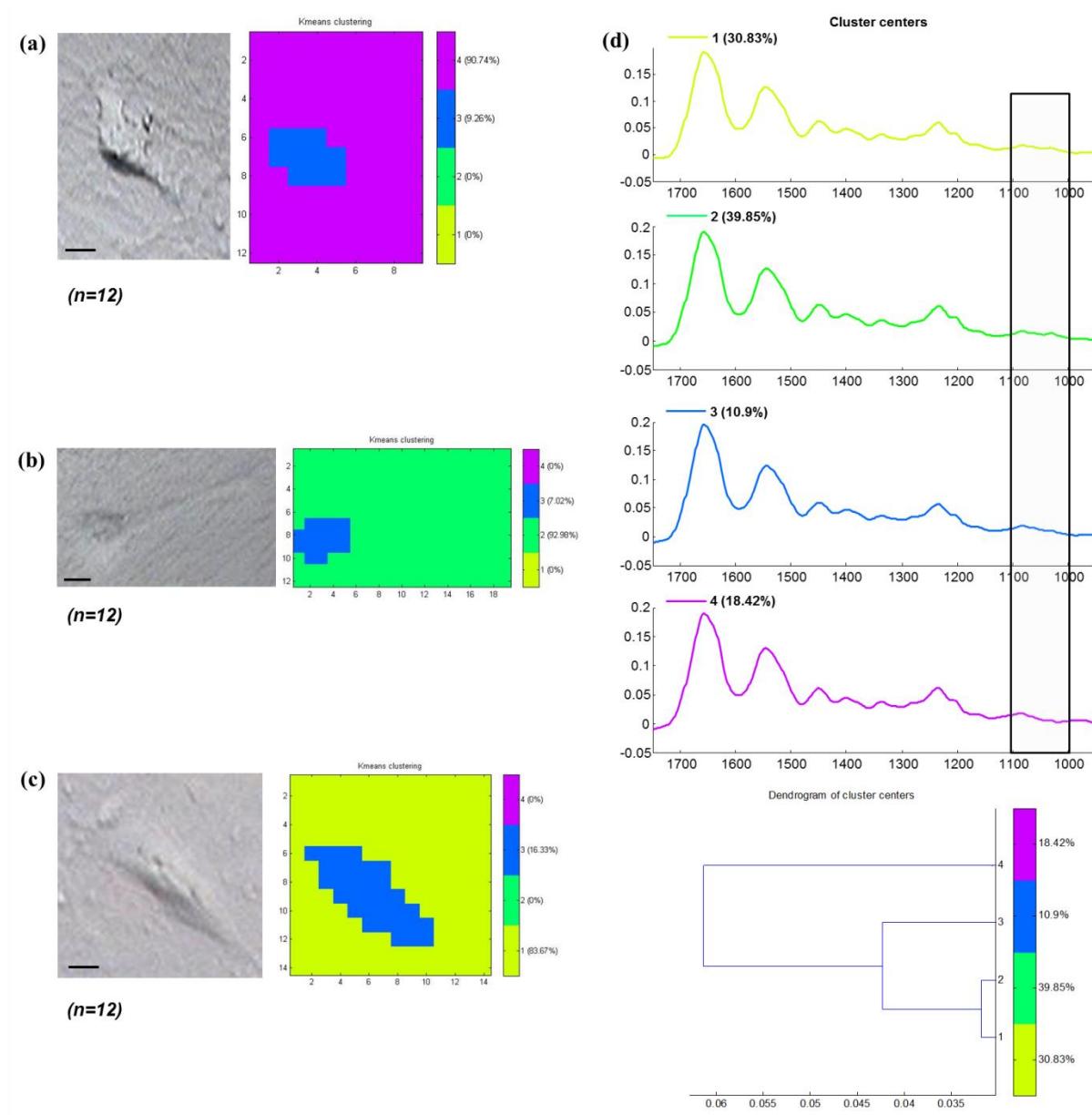
**Fig. 1** Comparison of infrared spectra of HT1080 cells acquired in transmission using a Synchrotron source (in dark) or a Globar source (in grey) with the same aperture size at the sample ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ).

Further, the S-FTIR spectrum exhibited the vibrational modes of lipids ( $3100\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$ ) and proteins ( $1700\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$ ), commonly investigated in biological samples, with a higher intensity. Using a synchrotron source enabled collection of spatially-resolved chemical and informative molecular information from a single cell, as previously established<sup>26</sup>. HT1080

tumor cells in contact with their surrounding collagen substrate were mapped individually, and at least 12 different individual cells per collagen age condition were analyzed. These conditions were sufficient to highlight the weak spectral differences observed in a reproducible way and consistent between cells.

### ***3.2 K-means classification of S-FTIR maps from HT1080 tumor cells grown on different-age collagen coatings***

HT1080 tumor cells were grown on different-age type I collagen substrates used here as a model of increasing-age ECM proteins. S-FTIR spectral maps recorded on these samples were firstly analyzed by a common k-means clustering using 4 clusters, in order to consider the three-different collagen age conditions and the cellular component. K-means clustering data presented in Fig. 2 are representative of results obtained for three individual cells for each age condition. It must be noted here that the three images were processed together with the k-means clustering procedure so as to obtain matching colors when the chemical information is the same (e.g., for cells) or unmatching colors when the chemical information is different (e.g., for different-age collagens). Results are shown as false color maps for cells cultured on collagens from newborns [Fig. 2(a)], young adults [Fig. 2(b)], and old adults [Fig. 2(c)]. Their respective visible images [left panels of Figs. 2(a), 2(b) and 2(c)] show individual HT1080 cells seeded on a non-planar surface of the collagen network. HT1080 cells present the typical fibroblast-like morphology with an elongated cell body.



**Fig. 2** K-means clustering of S-FTIR data from HT1080 cells grown on different-age type I collagens. K-means was applied on the 1800-1000 cm<sup>-1</sup> spectral range according to 4 clusters, on HT1080 cells seeded on newborn collagen (a), young-adult collagen (b) and old-adult collagen (c), with the mean spectra of cluster centers and the corresponding dendrogram of HCA clustering (d). The framed area represents the spectral region specific to the carbohydrates (1100-1000 cm<sup>-1</sup>). Depicted pseudo-color images are representative of results obtained on at least 12 different single cells per collagen-age condition substrate. Scale bar = 10 μm.

The K-means clustering revealed that for each age condition, cellular components were grouped into a single cluster (cluster 3, *in blue*), while the three coating conditions were assigned to three independent clusters as a function of collagen age, i.e., cluster 4 (*in purple*) for the newborn collagen substrate, cluster 2 (*in green*) for the young-adult condition (control), and cluster 4 (*in yellow*) for the old-adult coating. The dendrogram of the cluster centroids with the corresponding spectra displayed in Fig. 2(d) shows that the cluster attributed to the newborn collagen substrate is well separated from the two other collagen ages and from the cellular component. K-means clustering allows a good discrimination of coatings as a function of collagen age and a reproducible assignment of the HT1080 cell spectral fingerprint was achieved. However, one limitation of k-means clustering is that it provides a too uniform representation of collagen substrates.

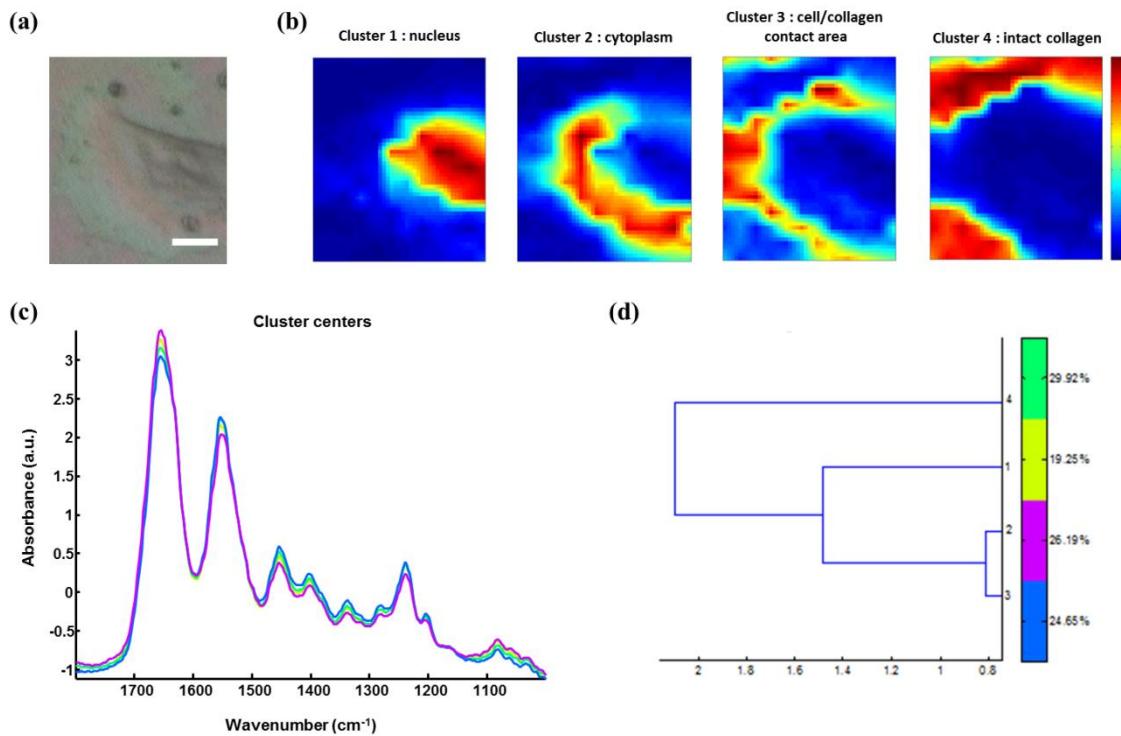
### **3.3 FCM analysis of S-FTIR maps from tumor cells grown on different-aged collagen coatings**

#### **FCM clustering: example of an HT1080 cancer cell grown on old-adult collagen.**

S-FTIR mapping acquisitions from HT1080 cells in contact with different-aged type I collagen were further analyzed by FCM clustering in order to improve the image analysis and try to discriminate cell/collagen interaction areas at the cell's periphery. Here, we have focused on contact areas between cells and collagen coatings [see visible image Fig. 3(a)] with smaller step size (3  $\mu\text{m}$ ) in order to acquire more precise biochemical information. Figure 3(b) displays an example of the FCM pseudo-color images obtained from a single HT1080 tumor cell grown on old-adult collagen. This analysis was based on four clusters after RBA-estimation of the optimal FCM parameters ( $K = 4$  and  $m = 1.83$ ) going from the intracellular compartments to the extracellular microenvironment with cluster 1 assigned to cell nuclear components, cluster 2 to cytoplasmic components, cluster 3 to cell/collagen

contact areas, and cluster 4 to intact collagen. The centroid spectra corresponding to these clusters as well as HCA classification are shown in Figs. 3(c) and 3(d), respectively. The dendrogram exhibits a clear discrimination between the four clusters. Similar results were obtained with the newborn and young adult collagen coatings (data not shown).

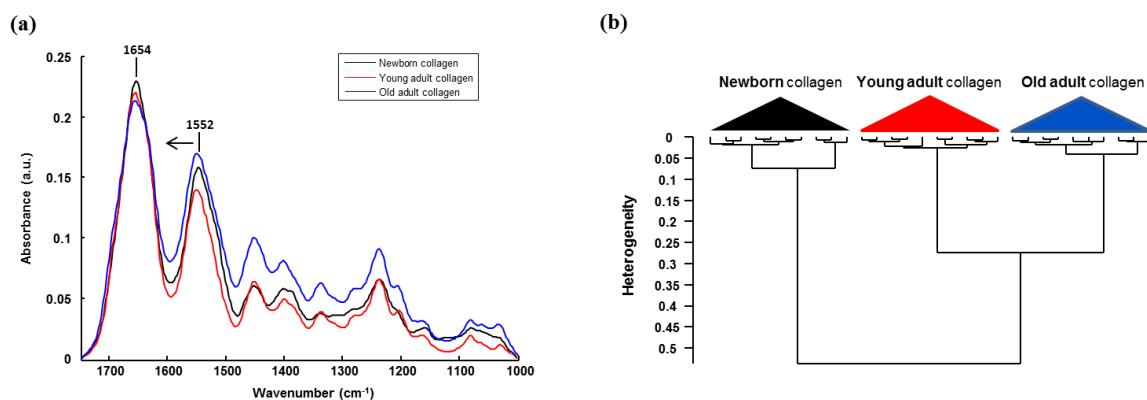
Following these observations, we analyzed spectra originating from the intact collagen areas (cluster 4) and those from the cell/collagen interaction areas (cluster 3). Spectra were extracted after FCM analysis of the spectral maps from three individual cells for each collagen age condition.



**Fig. 3** FCM clustering of S-FTIR from HT1080 cell grown on old-adult type I collagen. RBA FCM ( $K=4$ ;  $m=1.83$ ) was applied on S-FTIR data from a single HT1080 cell seeded on old-adult collagen coating, in the  $1800-1000 \text{ cm}^{-1}$ . Analyses were focused on cell/collagen contact areas: visible image (a), pseudo-color images reconstructed on the four clusters (b), mean spectra of cluster centers (c), and the corresponding dendrogram of HCA clustering (d). Data are representative of results obtained on at least 12 different single cells per collagen age condition. Scale bar =  $10 \mu\text{m}$ .

### Analysis of different-age type I intact collagen coatings.

In order to highlight the spectral changes in the infrared signal of collagen as a function of age, spectra corresponding to cluster 4 that we define as intact collagen (away from the cell/collagen contact areas) were extracted from the FCM images for each age condition, and compared in the  $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  spectral range [Fig. 4(a)].



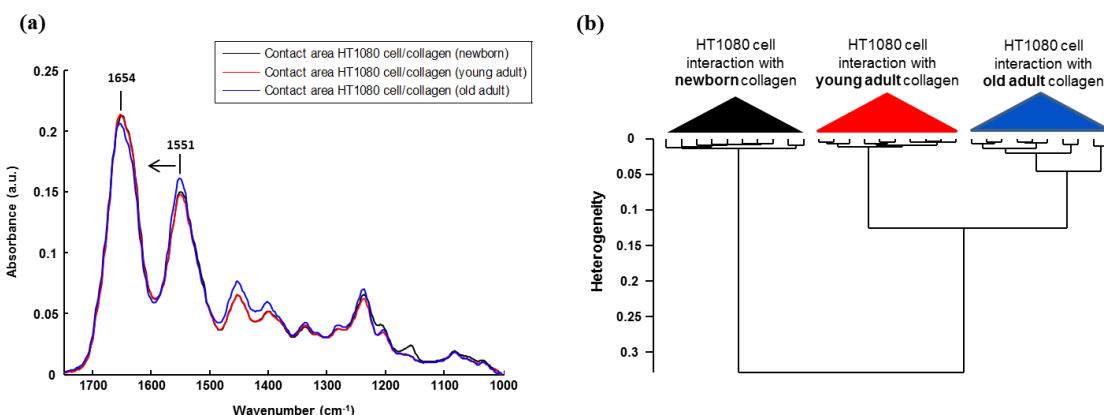
**Fig. 4** Analysis of S-FTIR spectra from different-aged type I collagen coatings with the mean spectra presented in the  $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  spectral range (a). Spectra were extracted from cluster 4 of the FCM images for each collagen age group and defined as “intact collagen spectra”. The difference observed for the peak maximum of the Amide II band as a function of collagen age is indicated by the arrow. Results of HCA clustering (b) are displayed via a dendrogram in which spectra are clustered according to their heterogeneity degree.

The Amide I band profile with a maximum absorbance at  $1653\text{ cm}^{-1}$  did not exhibit any significant changes as a function of the collagen age. An absence of modifications in the Amide III band ( $1300\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ ) can also be noticed. Concerning the Amide II band, an upshift was observed between newborn ( $1547\text{ cm}^{-1}$ ) and, young and old adult ( $1552\text{ cm}^{-1}$ ) collagens. Furthermore, a band profile modification in the sugar region ( $1150\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ),

generally related to the presence of AGEs, can be observed between newborns and adults. Taken together, these spectral modifications, although subtle, could be exploited by HCA to analyze spectra from different-aged type I collagens [Fig. 4(b)]. The generated dendrogram showed a good discrimination with age since all spectra were correctly assigned to their respective age groups. The group corresponding to the newborns is the furthest from the two other age conditions. Furthermore, by inspecting the heterogeneity scale, the old-adult group appeared more homogeneous compared to the newborn and young-adult groups.

### **Analysis of cell/collagen interaction areas.**

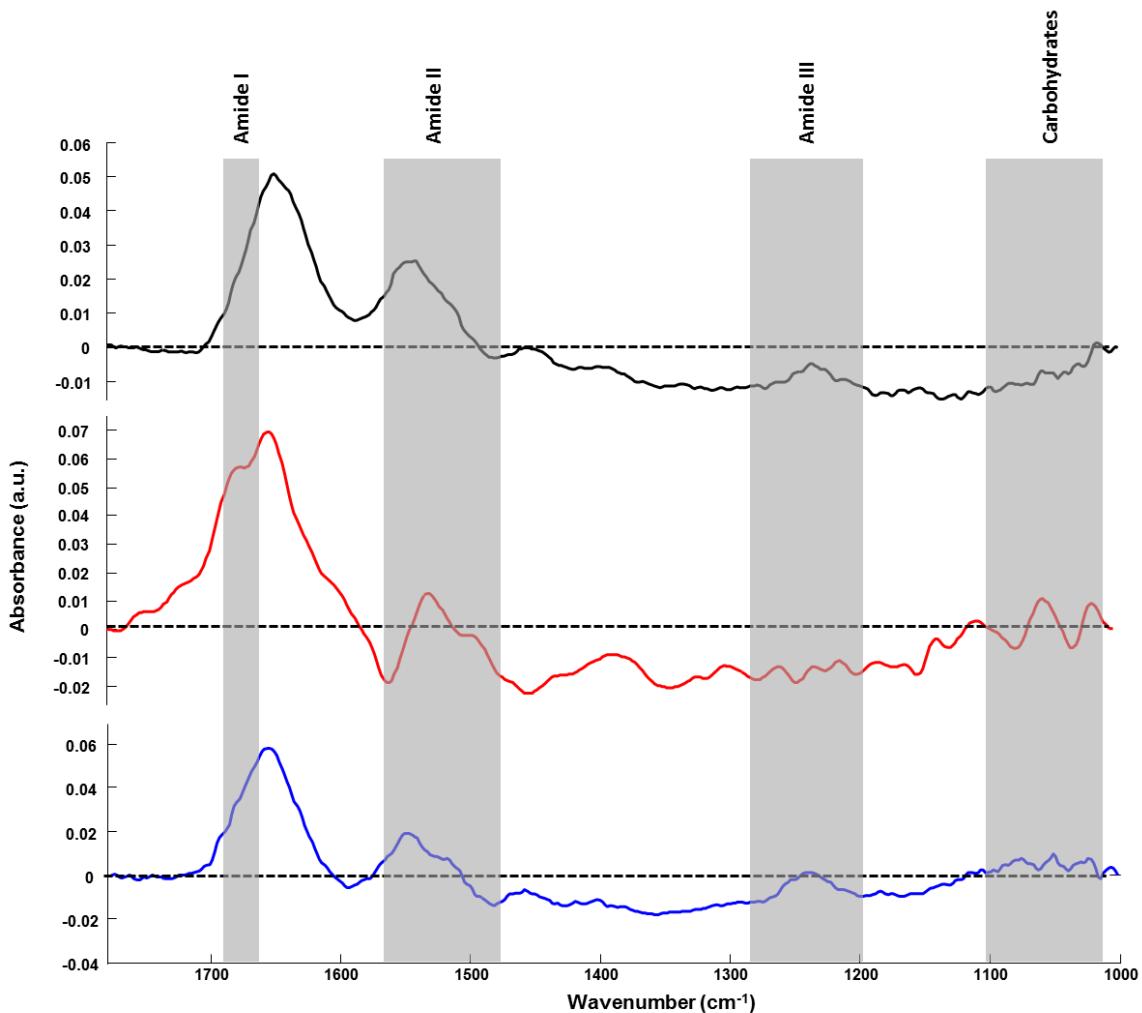
This was performed by considering spectra extracted from the FCM images (cluster 3) for each collagen-age condition. Figure 5(a) depicts the mean spectra corresponding to the interaction areas between HT1080 cells and the three-different age collagens.



**Fig. 5** Analysis of S-FTIR spectra from cell/collagen peripheral areas as a function of collagen-age with the mean spectra presented in the 1800-1000 cm<sup>-1</sup> spectral range (a). Spectra were extracted from the cluster 3 of FCM images for each collagen age group and defined as “cell/collagen contact spectra”. Results of HCA clustering (b) are displayed via a dendrogram in which spectra are clustered according to their heterogeneity degree.

For all conditions, the Amide I band was at  $1654\text{ cm}^{-1}$ , while the Amide II band was observed at  $1551\text{ cm}^{-1}$  for newborns and young adults, and at  $1553\text{ cm}^{-1}$  for old adults. No significant shifts were observed for the Amide III band ( $1300\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$ ) and the sugar region ( $1150\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ) upon comparing the three age conditions. However, the dendrogram obtained by HCA clustering [Fig. 5(b)] showed a discrimination between the three conditions of cell/collagen contact areas. This may be explained by changes in relative intensities of bands, for instance the Amide I, II and III bands, and the lower frequencies.

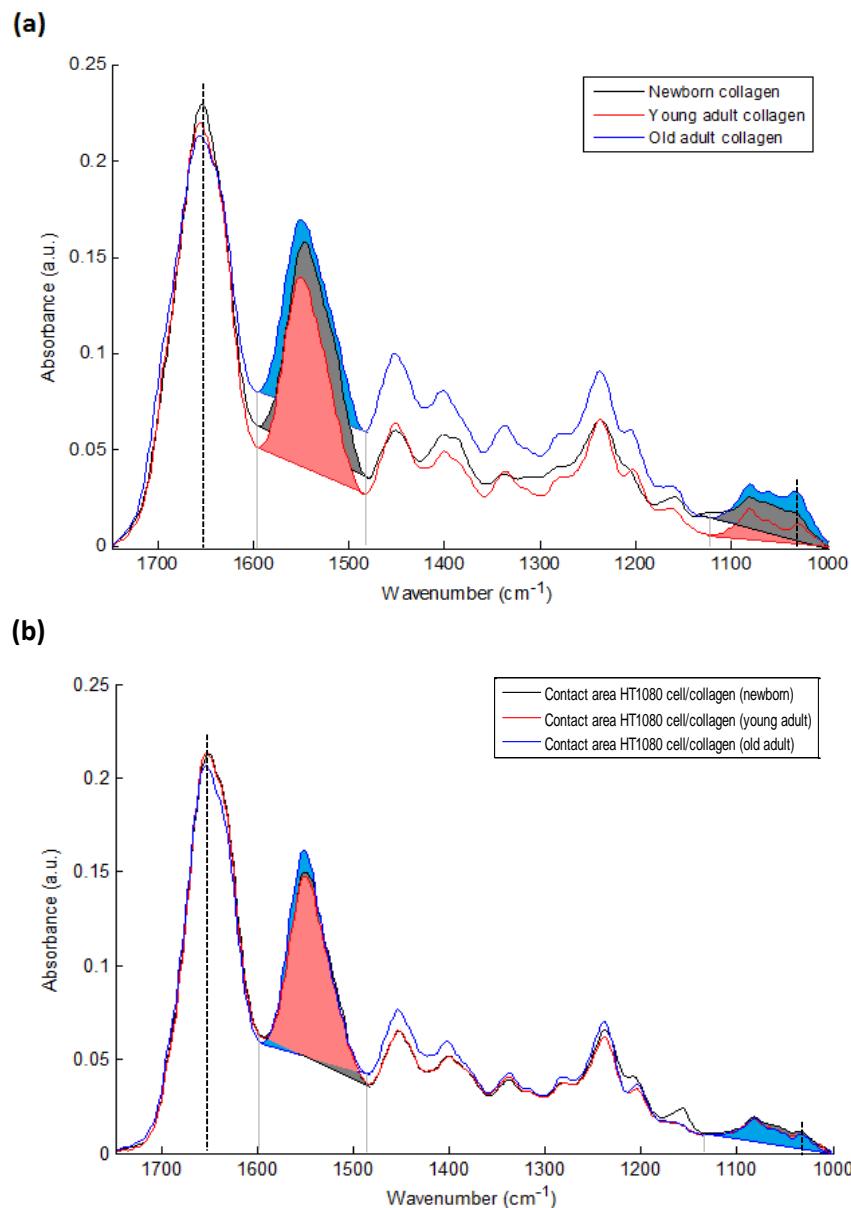
In order to highlight the possible existing age-related differences in cell/collagen contact areas, we have analyzed for each condition, the difference spectra obtained by subtracting the age-corresponding spectrum of intact collagen from that of the cell/collagen contact area. Thus, the contribution of intact collagen was minimized. These difference spectra are displayed in Fig. 6(a), (b), (c), for newborns, young and old adults respectively, and offset for clarity. From this analysis, it can be observed that spectral differences showed a similar profile in the protein absorption bands (Amide I, II, and III) for newborns and old adults, and in the sugar region ( $1150\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ) for young and old adults.



**Fig. 6** Difference spectra calculated by subtracting each corresponding intact collagen spectrum from that of the cell/collagen contact spectrum. This was computed for each collagen age condition: newborn (top), young adult (middle), and old adult (bottom). Spectra were offset for clarity and the regions with higher changes are highlighted by the grey bars.

These two data sets (clusters 3 and 4) were further analyzed by comparing two AGEs-related spectral markers that have been previously reported. These spectral markers are shown in figure 7 where cluster centroid spectra corresponding to different-aged collagens were compared for intact collagen [Fig. 7(a)] and for contact areas [Fig. 7(b)]. The first marker of AGEs,  $I_{1032}/I_{1655}$ , was calculated by ratioing the intensity of the  $1032\text{ cm}^{-1}$  sugar band to that

of the  $1655\text{ cm}^{-1}$  Amide I band<sup>27</sup>. The second AGEs marker,  $A_{\text{sugar}}/A_{\text{amide II}}$ , was based on the work of Birarda *et al.*<sup>28</sup>, where the authors calculated the ratio of the band area of the sugar region ( $1180\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ) to that of the Amide II band ( $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ). An increase of these two markers suggests an increase in AGEs.



**Fig. 7** Analysis of cluster centroid spectra from intact collagens (a) and from cell/collagen contact areas (b) as a function of collagen age. The two filled spectral bands (sugar band between  $1180\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ , and the Amide II band between  $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ) were then used for calculating ratios previously described as AGEs-related spectral markers (*see Table I*).

The results are summarized in Table I where it can be seen that both markers showed a similar tendency for the studied cases. The intensity ratio  $I_{1032}/I_{1655}$  and the band area ratio  $A_{\text{sugar}}/A_{\text{amide II}}$  both increased when the old adult data were compared to those of the newborn and the young adult in the case of intact collagens. In contrast, with intact collagens the two ratios calculated for the contact areas remained constant for the three age groups and exhibited lower values; the latter being more marked (two to three-fold) for old adults.

AGEs-related spectral markers	Collagen networks		
	Newborn	Young-adult	Old-adult
<b>*Band ratio <math>1032 \text{ cm}^{-1}/1655 \text{ cm}^{-1}</math></b>	Intact collagen	0.07	0.06
	Cell/collagen contact	0.05	0.04
<b>**Area ratio <math>\text{sugar}/\text{Amide II}</math></b>	Intact collagen	0.18	0.17
	Cell/collagen contact	0.15	0.13

\*Guilbert M. et al., 2013

\*\*Birarda G. et al., 2013

**Table I** AGEs-related spectral markers as a function of collagen age. The intensity ratio  $I_{1032}/I_{1655}$  and the band area ratio  $A_{\text{sugar}}/A_{\text{amide II}}$  were calculated for both intact collagen and cell/collagen contact data sets, and compared as a function of collagen-age.

## 4 Discussion

Understanding the interactions between cancer cells and their microenvironment constitutes an important step in experimental oncology to gain better insights into key cellular processes such as proliferation, differentiation and invasion. Type I collagen, a major component of the tumor microenvironment, is an ideal candidate for investigating these interactions, while taking into account the process of protein aging. In this study, we employed the S-FTIR micro-spectroscopy to acquire spatially-resolved spectral biomolecular information in a model of single human HT1080 cancer cells interacting with different-aged type I collagen networks. Even if infrared analysis at the cellular level has already been performed with

conventional Globar sources, our aim was to acquire high spatially-resolved chemical information not only from the single cell itself but also from the cell/collagen contact regions and from the intact collagen. This was feasible with small apertures by combining FTIR micro-spectroscopy with the high brightness of the synchrotron source. We also expected the spectral differences to be weak but with this set-up good quality and exploitable spectral maps could be achieved. FTIR micro-spectroscopy of single isolated cells has often been prone to physical effects like the Mie and resonant Mie scattering and dispersive phenomena, causing spectral artifacts that can mislead spectral interpretation. These were previously described for single cells or small samples analyzed directly on infrared substrates<sup>29-31</sup>. In our data these effects were weak or nonexistent because although we analyzed single cells, they were not completely isolated but were surrounded by the collagen matrix. So, our S-FTIR spectra were pre-processed using the conventional EMSC algorithm<sup>18</sup> that did not take into account these artifacts.

The high brightness of the S-FTIR approach has previously been used to analyze proteolytic activity of tumor cells in gelatin matrices<sup>32</sup>. However, this is the first study that focuses on the collagen aging factor in the cell/ECM model. The cell's surrounding microenvironment is indeed an essential criterion that needs to be taken into account for studying tumor processes, and previous works have demonstrated that post-translational modifications of type I collagen occurring during aging or age-related pathological processes have an impact on the behavior of HT1080 cancer cells<sup>9</sup>. The three age groups studied here correspond respectively to physiological states of newborns, young adults and old adults<sup>33</sup>, thus allowing to work on a model representative of a pertinent aging range.

Color-coded spectral images of single cells grown onto different-aged collagen coatings were reconstructed using k-means and FCM clustering methods. The first method allowed discriminating the matrix information from the cellular entity. However, one limitation of the k-means is that each pixel is assigned to only one cluster with the consequence of a lack of

nuance to distinguish between intact collagen and collagen interacting with the cell. This drawback was overcome by using FCM which allowed each pixel to be assigned to every cluster with an associated membership value varying between 0 (no class membership) and 1 (highest degree of cluster membership)<sup>25</sup>. Hence, this approach permitted to obtain a nuance in the cluster images, revealing a progressive variation in the biochemical information upon going from the intracellular region (clusters 1 and 2), to the cell periphery (cluster 3), and to the intact collagen network (cluster 4).

The analysis of intact collagen showed that Amide I and III bands did not exhibit any significant shift as a function of age, indicating that the triple helical structure of the protein was not affected during aging. On the other hand, the upshift observed in the Amide II band (when comparing newborn with young and old adults) suggests weak conformational changes in the tertiary structure of collagen, such as turns of amino-acid exposure, due to an accumulation of cross-linking AGEs with age. We previously reported such spectral differences for *in vitro* glycated collagens<sup>27</sup>. We hypothesize that, with the accumulation of cross-linking compounds such as AGEs, the backbone and the rigidity of the protein increased, leading to changes in the amino-acid exposure. The old adult age-group also exhibited a well distinct cluster in the HCA analysis. This could be explained by the age-related modifications in biomechanical properties due to the AGEs addition, leading to an increase of non-enzymatic cross-links<sup>6,8</sup>. Furthermore, the increase in AGEs with age can be monitored *via* the increase of two spectral indicators, the intensity ratio ( $I_{1032}/I_{1655}$ )<sup>27</sup> and the band area ratio ( $A_{\text{sugar}}/A_{\text{amide II}}$ )<sup>28</sup>. The high ratios obtained in old adults compared to youngest groups correlate well with our recently reported auto-fluorescence and electrophoresis data that support an increase of AGEs with age<sup>34</sup>. Another previous study confirmed that modifications in the infrared band of sugars ( $1150-1000 \text{ cm}^{-1}$ ), especially the increase of the carbohydrate peak intensity, are directly and proportionally linked to the glycation level<sup>35</sup>. All these observations clearly highlight that the sugar band constitutes a good and semi-

quantitative infrared marker of the AGEs accumulation occurring during aging and age-related processes. The clustering results showed that the highest spectral distances were observed for the newborn collagen I group; it could be explained by the natural history of collagen from gestation to childhood periods during which collagen fibers are not yet mature and present a defect of their alignment in spite of a high content in type I collagen<sup>36,37</sup>.

The use of the S-FTIR label-free biophotonic method constitutes an approach complementary to the conventional biochemical techniques for investigating the impact of ECM proteins on the tumor cell behavior. Here, we focused on the peripheral contact zones between HT1080 cancer cells and type I collagen networks.

Our data show that the calculation of the two AGEs indicators described above was leveled to constant values for the contact zones of the three age-groups. In addition, in the case of the old adult contact zone, a 2- to 3-fold drastic reduction of these indicators was observed compared to the intact collagen age-groups, which tends to suggest a masking of the biochemical spectral information. At the level of the protein structure, from the difference spectra, it appears that the old adult and newborn collagen contact zones exhibit a quite similar profile in the corresponding bands while for the young adult, a perturbation of its secondary structure is noticed as witnessed by the changes observed at the level of the Amide I, II, and III bands. These findings reveal to be interesting and to the best of our knowledge have not been reported previously. The mechanisms of interaction at the level of these contact zones and as a function of age appear quite complex and requires other complementary investigations for understanding them. Methods like Raman micro-spectroscopy could bring complementary vibrational information and other biophotonic approaches like polarized second harmonic generation could help to image the cell/collagen contact zones and inform on morphological parameters such as the molecular order, the degree of orientational freedom, the molecular constraint, and rigidity of the collagen fibers<sup>38</sup>. Indeed, these should be supported by conventional biochemical analysis.

## **5 Conclusion**

This study demonstrates the potential of synchrotron-based infrared micro-spectroscopy to map single tumor cells grown on a matrix substrate, in a direct, label-free, and non invasive way. For the different collagen age-groups, it helped to provide specific information on the cell/collagen peripheral contact zones, where key processes take place during tumor progression. The application of image clustering techniques allowed differentiating the spectral information of the collagen coatings from that of the cell and further providing a gradation in the cluster images that revealed a progressive variation in the biochemical information upon going from the intracellular region, to the cell periphery, and to the intact collagen network. Two indicators based on sugar/protein absorption bands either *via* the ratio of band intensities or *via* that of band areas showed a net increase of AGEs accumulation in the old-adult intact collagens. This tendency disappeared in the presence of the HT1080 cells due to a masking of the biochemical information. Such S-FTIR data are reported for the first time and necessitates complementary biochemical and morphological investigations to have a better insight into the modifications that take place in the contact zones of the different-aged collagens. This approach holds promises for single live cell studies with FTIR micro-spectroscopy and minimizes at the same time undesired optical effects like scattering and dispersion artifacts. This feasibility study therefore opens the way for further investigations on FTIR imaging of single tumor cells and at the same time integrating the age-related modifications of ECM components. It appears interesting to apply the approach to study single cells growing on more complex culture models such as 3D matrices which can better mimic the cell microenvironment<sup>39</sup>.

### *Acknowledgements*

M.G. and C.E. are recipients of doctoral fellowships from Région Champagne-Ardenne. We acknowledge Diamond Light Source for time on B22-MIRIAM beamline, cell culture and peripheral lab07 facilities under the proposals 8422-1 and 8878-1. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 226716 via the French Embassy in London, UK. This study was also supported by grants of the Cancéropôle Grand-Est and FEDER/CEPER Champagne-Ardenne.

### *References*

1. D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: the next generation”, *Cell* **144**(5), 646-674 (2011).
2. N. E. Sounni and A. Noel, “Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy”, *Clin. Chem.* **59**(1), 85-93 (2013).
3. I. Serebriiskii, R. Castelló-Cros, A. Lamb, E. A. Golemis and E. Cukierman, “Fibroblast-derived 3D matrix differentially regulates the growth and drug-responsiveness of human cancer cells”, *Matrix Biol.* **27**(6), 573-585 (2008).
4. R. G. Paul and A. J. Bailey, “The effect of advanced glycation end-product formation upon cell-matrix interactions”, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**(6), 653-660 (1999).
5. D. G. Dyer, J. A. Dunn, K. E. Bailie, T. J. Lyons, D. R. McCance and J. W. Baynes, “Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging”, *J Clin. Invest.* **91**(6), 2463-2469 (1993).

6. A. Bruel and H. Oxlund, "Changes in biomechanical properties, composition of collagen and elastin, and advanced glycation end-products of the rat aorta in relation to age", *Atherosclerosis* **127**(2), 155-165 (1996).
7. R. G. Paul and A. J. Bailey, "Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes", *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**(12), 1297-1310 (1996).
8. N. C. Avery and A. J. Bailey, "The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen", *Pathol. Biol.* **54**(7), 387-395 (2006).
9. G. Said, M. Guilbert, E. Millerot-Serrurot, L. Van Gulick, C. Terryn, R. Garnotel and P. Jeannesson, "Impact of carbamylation and glycation of collagen type I on migration of HT1080 human fibrosarcoma cells", *Int. J. Oncol.* **40**(6), 1797-1804 (2012).
10. N. Rucci, P. Sanità and A. Angelucci, "Roles of metalloproteases in metastatic niche", *Curr. Mol. Med.* **11**(8), 609-622 (2011).
11. M. Luo and J. L. Guan, "Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis", *Cancer Lett.* **289**(2), 127-139 (2010).
12. P. Provenzano, K. W. Eliceiri and P. J. Keely, "Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to monitor metastasis and the tumor microenvironment", *Clin. Exp. Metastasis* **26**(4), 357-370 (2009).
13. H. Y. Holman, K. A. Bjornstad, M. P. McNamara, M. C. Martin, W. R. McKinney and E. A. Blakely, "Synchrotron infrared spectromicroscopy as a novel bioanalytical microprobe for individual living cells: cytotoxicity considerations", *J. Biomed. Opt.* **7**(3), 417-424 (2002).
14. F. Draux, P. Jeannesson, A. Beljebbar, A. Tfayli, N. Fourre, M. Manfait, J. Sulé-Suso and G. D. Sockalingum, "Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary study", *Analyst* **134**(3), 542-548 (2009).

15. J. Pijanka, G. D. Sockalingum, A. Kohler, Y. Yang, F. Draux, G. Parkes, K. P. Lam, D. Collins, P. Dumas, C. Sandt, D. G. van Pittius, G. Douce, M. Manfait, V. Untereiner and J. Sulé-Suso, “Synchrotron-based FTIR spectra of stained single cells. Towards a clinical application in pathology”, *Lab. Invest.* **90**(5), 797-807 (2010).
16. A. D. Meade, F. M. Lyng, P. Krief and H. J. Byrne, “Growth substrate induced functional changes elucidated by FTIR and Raman spectroscopy in in-vitro-cultured human keratinocytes”, *Anal. Bioanal. Chem.* **387**(5), 1717– 1728 (2007).
17. R. Garnotel, L. Rittie, S. Poitevin, J. C. Monboisse, P. Nguyen, G. Potron, F. X. Maquart, A. Randoux and P. Gillery, “Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95)”, *J. Immunol.* **164**(11), 5928-5934 (2000).
18. A. Kohler, C. Kirschner, A. Oust and H. Martens, “Extended multiplicative signal correction as a tool for separation and characterization of physical and chemical information in Fourier transform infrared microscopy images of cryo-sections of beef loin”, *Appl. Spectrosc.* **59**(6), 707-716 (2005).
19. J. Nallala, C. Gobinet, M. D. Diebold, V. Untereiner, O. Bouché, M. Manfait, G. D. Sockalingum and O. Piot, “Infrared spectral imaging as a novel approach for histopathological recognition in colon cancer diagnosis”, *J. Biomed. Opt.* **17**(11), 116013 (2012).
20. J. H. Ward, “Hierarchical grouping to optimize an objective function”, *J. Am. Stat. Assoc.* **58**(301), 236–244 (1963).
21. F. Draux, P. Jeannesson, C. Gobinet, J. Sulé-Suso, J. Pijanka, C. Sandt, P. Dumas, M. Manfait and G. D. Sockalingum, “IR spectroscopy reveals effect of non-cytotoxic doses of anti-tumour drug on cancer cells”, *Anal. Bioanal. Chem.* **395**(7), 2293-2301 (2009).

22. J. B. MacQueen, “Some methods for classification and analysis of multivariate observations”. *Proc 5th Berkeley Symp Math Stat Prob* **1**, 281–297, University of California Press, Berkeley (1967).
23. P. Lasch, W. Haensch, D. Naumann and M. Diem, “Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR micro-spectroscopy and cluster analysis”, *Biochim. Biophys. Acta* **1688**(2), 176-186 (2004).
24. J. C. Bezdek, “Pattern recognition with fuzzy objective function algorithms”, *Plenum Press, New York* (1981).
25. D. Sebisikveradze, V. Vrabie, C. Gobinet, A. Durlach, P. Bernard, E. Ly, M. Manfait, P. Jeannesson and O. Piot, “Automation of an algorithm based on fuzzy clustering for analyzing tumoral heterogeneity in human skin carcinoma tissue sections”, *Lab. Invest.* **91**(5), 799-811 (2011).
26. P. Dumas, G. D. Sockalingum and J. Sulé-Suso, “Adding synchrotron radiation to infrared micro-spectroscopy: what's new in biomedical applications?”, *Trends Biotechnol.* **25**(1), 40-44 (2007).
27. M. Guilbert, G. Said, T. Happillon, V. Untereiner, R. Garnotel, P. Jeannesson and G. D. Sockalingum, “Probing non-enzymatic glycation of type I collagen: A novel approach using Raman and infrared biophotonic methods”, *Biochim. Biophys. Acta* **1830**(6), 3525-3531 (2013).
28. G. Birarda, E. A. Holman, S. Fu, K. Weikel, P. Hu, F. G. Blankenberg, H. Y. Holman and A. Taylor, “Synchrotron infrared imaging of advanced glycation end-products (AGEs) in cardiac tissue from mice fed high glycemic diets”, *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, **2**(4), 301-315 (2013).
29. C. Matthaus, B. Bird, M. Miljkovic, T. Chernenko, M. Romeo and M. Diem, “Infrared and Raman microscopy in cell biology”, *Methods Cell Biol.* **89**, 275-308 (2008).

30. P. Bassan, H. J. Byrne, F. Bonnier, J. Lee, P. Dumas and P. Gardner, “Resonant Mie scattering in infrared spectroscopy of biological materials--understanding the 'dispersion artefact'”, *Analyst* **134**(8), 1586-1593 (2009).
31. P. Bassan, A. Kohler, H. Martens, J. Lee, H. J. Byrne, P. Dumas, E. Gazi, M. Brown, N. Clarke and P. Gardner, “Resonant Mie scattering (RMieS) correction of infrared spectra from highly scattering biological samples”, *Analyst* **135**(2), 268-277 (2010).
32. S. Federman, L. M. Miller and I. Sagi, “Following matrix metalloproteinases activity near the cell boundary by infrared micro-spectroscopy”, *Matrix Biol.* **21**(7), 567-577 (2002).
33. R. Quinn, “Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years?”, *Nutrition* **21**(6), 775-777 (2005).
34. S. L. Wilson, M. Guilbert, J. Sulé-Suso, J. Torbet, P. Jeannesson, G. D. Sockalingum and Y. Yang, “A microscopic and macroscopic study of aging collagen on its molecular structure, mechanical properties, and cellular response”, *FASEB J.* **28**(1), 14-25 (2014).
35. R. Roy, A. Boskey and L. J. Bonassar, “Processing of type I collagen gels using nonenzymatic glycation”, *J. Biomed. Mater Res. A.*, **93**(3), 843-851 (2010).
36. Y. Ito and I. Tamura, “Age-related changes in collagen, laminin and tenascin in the infant rat submandibular gland”, *J. Osaka Dent. Univ.* **31**(1-2), 19-27 (1997).
37. E. Aikawa, P. Whittaker, M. Farber, K. Mendelson, R. F. Padera, M. Aikawa and F. J. Schoen, “Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering”, *Circulation* **113**(10), 1344-1352 (2006).
38. D. Aït-Belkacem, M. Guilbert, M. Roche, J. Duboisset, P. Ferrand, G. Sockalingum, P. Jeannesson and S. Brasselet S, “Microscopic structural study of collagen aging in

- isolated fibrils using polarized second harmonic generation”, *J. Biomed. Opt.* **17**(8), 080506-1 (2012).
39. E. Millerot-Serrurot, M. Guilbert, N. Fourré, W. Witkowski, G. Said, L. Van Gulick, C. Terryn, J. M. Zahm, R. Garnotel and P. Jeannesson, “3D collagen type I matrix inhibits the antimigratory effect of doxorubicin”, *Cancer Cell Int.* **13**, 10-26 (2010).

V. 2. 3. Article #6

## **Probing *in Vitro* ribose induced DNA-glycation by using Raman micro-spectroscopy**

*Analytical Chemistry*, 87 (2015), pp. 2655-64

- Préambule à l'article #6

## **Contexte et objectif de l'étude**

L'ADN constitue une cible préférentielle pour la glycation non-enzymatique, entraînant ainsi la formation des AGEs (*Advanced Glycation End-products*) responsables des cassures simple brin de l'ADN. De telles modifications moléculaires vont ainsi affecter les fonctions biologiques de l'ADN. Nous avons caractérisé l'impact de la glycation *in vitro* sur la structure de l'ADN au moyen de la micro-spectroscopie Raman.

## **Matériels et Méthodes**

Des solutions d'ADN de thymus de veau ont été incubées avec différentes concentrations de ribose (0.1, 0.5, 1 et 2 mol.L<sup>-1</sup>) à 37°C pendant 24 h. Les échantillons ont été ensuite précipités afin de retirer le ribose en excès, séchés à température ambiante, puis solubilisés dans de l'eau distillée. Les différentes solutions ont été analysées par spectroscopie d'absorption UV et par micro-spectroscopie Raman. Des méthodes d'analyses statistiques multivariées telles que l'ACP (Analyse en Composantes Principales) et la corrélation 2D ont été utilisées pour analyser les données Raman obtenues à partir des différentes solutions d'ADN natif et glyquées à différentes concentrations en ribose.

## **Résultats**

Les mesures d'absorption UV ont montré une augmentation de l'absorbance à 260 nm de l'ADN à des concentrations croissantes en ribose. L'analyse par ACP a permis de révéler une séparation des spectres Raman acquis sur les échantillons d'ADN natif de ceux acquis sur des échantillons d'ADN glyqués (pour des concentrations de 0.5, 1 et 2 M en ribose). La corrélation 2D a fourni des informations sur le mécanisme de glycation affectant la structure de l'ADN de façon séquentielle en commençant par des modifications structurales des bases nucléiques, puis en altérant le squelette carboné. De plus, nos résultats ont démontré des changements conformationnels de l'ADN, résultant en une forme moins compacte de l'ADN au cours de la glycation *in vitro*.

## **Conclusions**

Cette étude préliminaire a démontré le potentiel de la micro-spectroscopie Raman à évaluer les modifications moléculaires et structurales de l'ADN au cours de la glycation *in vitro*. L'utilisation de la micro-spectroscopie Raman permettra d'étendre l'analyse sur des kératinocytes basaux dans le but de mettre en évidence l'atteinte de leur matériel génétique par le processus de glycation.

## **Probing *in Vitro* Ribose Induced DNA-Glycation Using Raman Microspectroscopy**

Goutam Kumar Chandra,<sup>†</sup> Christophe Eklouh-Molinier,<sup>†</sup> Michael Fere, Jean-François Angiboust, Cyril Gobinet, Laurence Van-Gulick, Pierre Jeannesson, and Olivier Piot\*

MéDIAN Biophotonique et Technologies pour la Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 7369 MEDyC, UFR de Pharmacie, SFR CAP Santé, 51096 Reims Cedex, France

\*Corresponding author at:

Email: [olivier.piot@univ-reims.fr](mailto:olivier.piot@univ-reims.fr);

Tel.: +33 3 26 91 81 28; Fax: +33 3 26 91 35 50

## **ABSTRACT**

To identify and characterize glycation induced modifications of DNA are crucial towards understanding their functional significance due to significant role in the long term control of aging and age-related diseases. In this study we present the ability of Raman microspectroscopy as a novel analytical technique for a rapid and reliable identification of glycated DNA in a reagent-free manner. We have demonstrated that this technique has potential to provide very small conformational modifications. The combination of principal component analysis (PCA) and two-dimensional (2D) correlation spectroscopy has assisted us to explore *in vitro* DNA-glycation and provide more insights into the dynamics of DNA-glycation process in an easier fashion. PCA analysis of Raman spectra shows a clear discrimination between native and glycated DNA samples. On the other hand, 2D correlation Raman analysis provides sequential order of the mechanism of DNA-glycation process and most likely, it occurs in the following sequence: Structural modifications of individual nucleobases ( $G > A > C$ ) → DNA backbone modifications → Partial transition of DNA conformations (A- to B-form). Our observations clearly suggest that the structure of DNA is altered, i.e., a partial transition of DNA backbone conformation from A- to B-form when glycated, but does not

induce any final transition in DNA double helix conformation and eventually, DNA presents in an intermediate A-B form with more towards B-form.

## **INTRODUCTION**

The biological action of native DNA solely depends on their three-dimensional folded structure. Several conditions which can change their folded structure, among these glycation is the most common and well known. Glycation is a non-enzymatic reaction between reducing sugar and amino group containing biomolecules, including amino acids,<sup>1-2</sup> proteins,<sup>3-9</sup> nucleobases,<sup>10</sup> nucleosides,<sup>11-13</sup> nucleotides,<sup>14-16</sup> DNA<sup>17-32</sup> and amino-lipids<sup>33</sup> *in vitro* and *in vivo* conditions. It is reported that DNA-glycation *in vivo* leads to similar changes in the structure and function of DNA as observed for *in vitro* DNA-glycation.<sup>20</sup> Several evidences of *in vivo* DNA-glycation are found in the literature.<sup>17,19-21,23,31</sup> DNA interacts with reducing sugars (glucose, ribose, fructose, aldehydes, etc.) and leads to the formation of several DNA-bound irreversible complexes known as advanced glycation end-products (AGEs).<sup>34-35</sup> Among these AGEs, N<sup>2</sup>-carboxyethyl-2'-deoxyguanosine (CEdG), is the stable and major product formed upon reaction with variety of glycating agents.<sup>12-13,18,20-21,35-36</sup> AGEs are stable covalent adducts and their accumulation in long lived biomolecules have dramatic consequences in several diseases such as diabetes, atherosclerosis, chronic renal failures, including cancer.<sup>21,25,29,31,36-38</sup>

With recent progresses in the fields of biology, to identify and characterize these glycation induced modifications in DNA are crucial towards understanding their functional significance. Being the most abundant sugar in almost all living organisms, glucose got ultimate recognition in studying DNA-glycation but shows less reactivity compared to other sugars such as ribose, fructose or glyceraldehydes.<sup>10-11,26,31,39</sup> Concerning this, ribose turns out to be most reactive amidst all naturally existing sugars.<sup>39</sup> Also, D-ribose used by all cells is

produced in the body and is an essential compound in energy metabolism.<sup>40-41</sup> It has been shown that DNA-glycation leads to destabilize the N-glycosidic bond that link DNA bases to the sugar-phosphate backbone followed by depurination, phosphate backbone cleavage and mutations.<sup>18,32,42</sup> This can produce further damage and local distortion in the double helix.<sup>43-44</sup> It has also been showed that DNA-glycation results in cross-linking of nucleotides.<sup>45</sup> Studies have been performed in more details to see the effect of glycation on the stability and dynamics of DNA and reveals that glycation leads to partial unwinding and/or fragmentation of the double helical structure.<sup>22</sup> Therefore, it is expected that such glycation induced alterations significantly lessen the biological functions of DNA. Although the mechanisms of glycation of DNA with D-ribose are not well known, the accumulation of this reducing monosaccharide may be responsible of *in vivo* DNA-glycation. Therefore, ribose induced glycation could be able to raise the level of DNA-AGEs. Recently, few studies has been investigated the non-enzymatic *in vitro* glycation of calf thymus DNA (ct-DNA) by D-ribose.<sup>24,28</sup> Currently, all DNA-glycation studies are determined and characterized by routine methods such as gel electrophoresis, chromatography, high-performance liquid chromatography, spectrometry, specific reagent-based colorimetric and immunoassay.<sup>18-25,27-32,34-36,45</sup>

In this regard, spectroscopic approaches provide a label-free detection method almost with no sample preparation. Although optical spectroscopic techniques are useful to determine the fluorescence specific to certain AGEs, the hyperchromicity or the ellipticity of DNA molecules, vibrational spectroscopic methods are non-invasive potential approaches to probe the molecular composition of a sample by preserving the integrity of the sample. These techniques are sensitive to conformation changes and have provided useful information on dynamic build-up of glycated samples.<sup>4</sup> Several research groups employed drop coating deposition Raman (DCDR) spectroscopy-based technique providing strong and reproducible Raman signals for different bio-analytes in order to characterize glycated samples using subtle

changes in spectral features.<sup>4-5,9,46-48</sup> Particularly, the Raman spectroscopy allows the study in aqueous environments, such as body fluids, cells, tissues.

In this study, we have introduced for the first time the Raman microspectroscopic measurements to study the ribose induced *in vitro* DNA-glycation and try to explore the dynamics of DNA-glycation process. Herein, we have used DCDR technique for sensitive determination of glycated DNA. This method aims to identify spectral markers related to DNA-glycation at the nucleobase level. Two well known analytical techniques, PCA and 2D correlation spectroscopy are employed for the analysis of Raman spectral data obtained from DNA of different glycation conditions. The former distinguishes the most prominent changes in spectra while the later monitors the evolution of Raman bands during glycation and provides the valuable insight into the dynamics of DNA-glycation process.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of DNA Samples

Two mg of ct-DNA (Sigma-Aldrich, France) were solubilized in 1 mL of distilled DNase/RNase-free water for 24 hrs in a cold room with a very slow stirring. A native DNA solution (100 µg/mL) was incubated at 37 °C with 0.1, 0.5, 1 and 2 M D-ribose (Sigma-Aldrich, France) for 1 day. The basic steps of precipitation of DNA were similar to a method described by Wang et al.<sup>49</sup> Following incubation, DNA was precipitated from the reaction mixture by the addition of 1 mL of 3 M ammonium acetate and 0.5 mL of cold pure ethanol and cooled at -20°C. The mixture was centrifuged at 10<sup>4</sup> g for 15 min and the supernatant was removed. The recovered DNA was washed with 0.5 mL of cold 70% ethanol, centrifuged as described above, and the supernatant was removed. The same washing step was repeated. The DNA was then dried at room temperature, solubilized in distilled DNase/RNase-free water.

As control, a native DNA solution of same concentration incubated at 37 °C for 1 day was used. Finally, the solutions were stored at 4° C until the analysis.

DNA solutions were analyzed by UV optical absorption spectroscopy and Raman micro-spectroscopy. For this, 10 µl of each solution was deposited on a calcium fluoride ( $\text{CaF}_2$ ) window suitable for Raman analysis. The solutions were dried at controlled room temperature during 60 min before spectral analysis. This drying time ensures a complete bulk water evaporation (data not shown) in order to prevent a likely effect of various degrees of dehydration on DNA conformational changes as demonstrated by Whelan et al.<sup>50</sup>. For absorption measurements the samples were kept in a microcuvette with an optical path length of 1 cm.

## **UV Measurements**

The UV absorption profile of native and glycated DNA were recorded in the wavelength range of 200 – 400 nm on a Shimadzu UV-1700 spectrophotometer.

## **Raman Measurements**

Raman measurements were performed on an XploRA Raman microscope (Horiba Jobin-Yvon, France) in normal ambient conditions. Raman spectrometer comprises a laser of excitation wavelength at 532 nm. In addition, an edge filter eliminates spurious reflection of the laser and elastic Rayleigh scattering. The intensity of the different wavenumbers of the spectrum is measured by a CCD (Charged-coupled device) detector. The dispersing system is ensured by a grating of 1200 lines/mm. A set of attenuator filters were used to reduce the intensity of the incident laser to avoid degradation of the DNA samples during measurements.

For dried drop analysis, acquisitions were performed in point mode and the Raman spectra were recorded at the periphery of the drop (called as “coffee ring”) in the spectral

range from 600 to 1750 cm<sup>-1</sup> at twenty different positions. The LabSpec 5 software (Horiba Jobin-Yvon, France) was used to acquire and process spectra. This software enables the calculation of average spectra, making the individual pre-processing of the spectra (baseline correction, smoothing and normalization). The absolute intensity of the Raman signal from a sample is generally non-reproducible due to the high number of influencing factors including focal position, sample absorbency. To compare the spectra collected at different conditions of glycation, it is necessary to normalize the spectral intensity to an internal frequency standard. In our study, the 1371 cm<sup>-1</sup> vibration (mainly, assigned to in-plane ring vibration of thymine in DNA) was chosen since its intensity is relatively high and it was also referred that the thymine base is unaffected due to complex formation with sugar molecule during the glycation process.<sup>10-11</sup>

The curve-fitting procedure was applied on the Raman data in order to determine the exact position of the Raman modes. In our case, curve fitting of the different Raman bands were performed with LabSpec 5 software. Spectra were smoothed using Savitzky-Golay filter (2<sup>nd</sup> order, 3 points), baseline corrected using the minima points (600, 705, 940, 1154, 1545 and 1750 cm<sup>-1</sup>). The constituent peaks of the different bands were selected from the second-order derivative of the spectra. Mixed Gaussian/Lorentzian mathematical functions were employed to fit the experimental data; the fitting procedure ran iteratively until the residual error between experimental and modeled curves reached a value ( $\chi^2$  as indicated in LabSpec) of 10<sup>-6</sup>. The peak widths at half-height of the elementary peaks were adjusted during curve fitting within an authorized range.

## **PCA Analysis**

Spectral data were analyzed using programs written in MatLab (Mathworks, USA). Prior to the data analysis, Raman spectra were smoothed using a Savitzky-Golay filter (2<sup>nd</sup>

order, 7 points) in LabSpec 5. Also, in order to correct spectra for physical light-scattering effects and for a better comparison of data set, a baseline correction and a vectorial normalization were performed on Raman spectra.

## **2D Correlation Spectroscopic Analysis**

2D correlation spectroscopy is a very powerful analytical technique that can be employed to both visualize the relationship between intensity changes at different spectral points as a result of external perturbation and also interpret the phenomena causing the spectral change.<sup>51</sup> This technique is based on the quantitative examination of spectral intensity changes as a function of the external perturbation, observed at two different spectral variables,  $v_1$  and  $v_2$ . Generally, it is applied to a set of one-dimensional (1D) data representing the response of a sample to a specific perturbation. The intensity changes at distinct spectral variables tend to delay (accelerate) one another when, for example, formation of a given species is necessary for a subsequent reaction to occur. Therefore, it is useful to characterize asynchronous 2D correlations to identify spectral changes that occur sequentially.

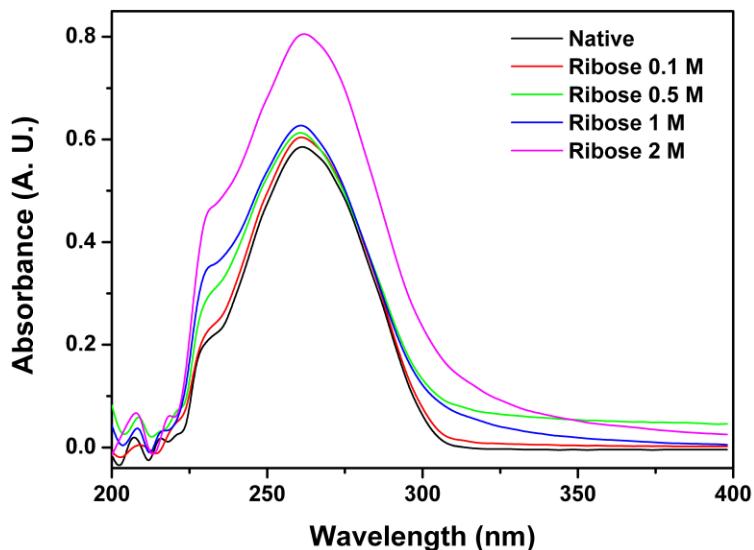
The synchronous 2D correlation map  $\Phi(v_1, v_2)$  represents the simultaneous or coincidental changes of spectral intensities measured at  $v_1$  and  $v_2$ , two different spectral variables as a result of the perturbation. In a synchronous map, the intensities of the auto peaks located at the diagonal ( $v_1 = v_2$ ) represent the total amplitude of the intensity variation in response to the perturbation and the presence of the cross peaks in the off-diagonal position corresponding to  $v_1$  and  $v_2$ , indicating that the change in these two peaks occurs simultaneously. The positive and negative sign of the cross peaks indicate the change in spectral intensity at  $(v_1, v_2)$  occur in the same and opposite direction, respectively in response to the perturbation. By contrast, the 2D asynchronous map  $\Psi(v_1, v_2)$  consisting only cross peaks which develops only if the intensities of two spectral features become out of phase with

each other (i.e., if one feature is delayed or accelerated) during the external perturbation and provides useful information about interaction dynamics. The intensity of an asynchronous 2D correlation map represents sequential, or successive, changes of spectral intensity measured at  $\nu_1$  and  $\nu_2$ . If the signs of synchronous and asynchronous cross peaks are the same, the intensity change at  $\nu_1$  occurs before  $\nu_2$ ; but, if the signs of synchronous and asynchronous cross peaks are different, the intensity change at  $\nu_1$  occurs after  $\nu_2$ .<sup>51</sup> The synchronous and asynchronous 2D Raman correlation maps were obtained from mean-centered spectra using the Matlab R2013a (The Mathworks Inc., Natick, MA).

## RESULTS AND DISCUSSION

### UV Spectral Analysis

The UV measurements were utilized as a reference measurement to assess the degree of glycation and to check the purity of DNA samples. The UV absorption spectra of DNA in native and glycated conditions in buffer (pH 7.0) are shown in the Fig. 1.

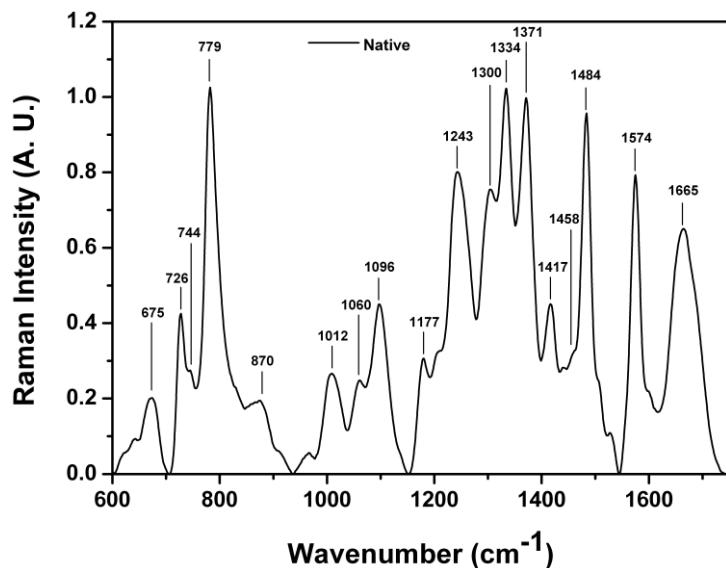


**FIG. 1:** UV absorption spectra of native DNA (black), glycated DNA incubated for 1 day with 0.1 M (red), 0.5 M (green), 1 M (blue) and 2 M (magenta) of D-ribose. Data shown are representative of three independent experiments.

The peak at 260 nm corresponds to the characteristic absorption peak of native DNA. Due to the glycation, a hyperchromicity was observed at 260 nm with increasing D-ribose concentration. A remarkable increase in the absorbance at 260 nm was observed for the glycated DNA incubated with 2 M of D-ribose. Increments were not significant in case of lower concentrations of D-ribose. Hyperchromicity at 260 nm indicates an increase of exposure of DNA bases which might be due to strand breaks<sup>27</sup> and to double-to-single strands transitions<sup>52</sup>.

## Raman Spectral Analysis

In order to get a more detailed insight into the interaction between DNA and D-ribose molecules, Raman microspectroscopic measurements were performed on the above mentioned native and glycated DNA samples. The normalized mean Raman spectrum of native DNA is shown in the Fig. 2.



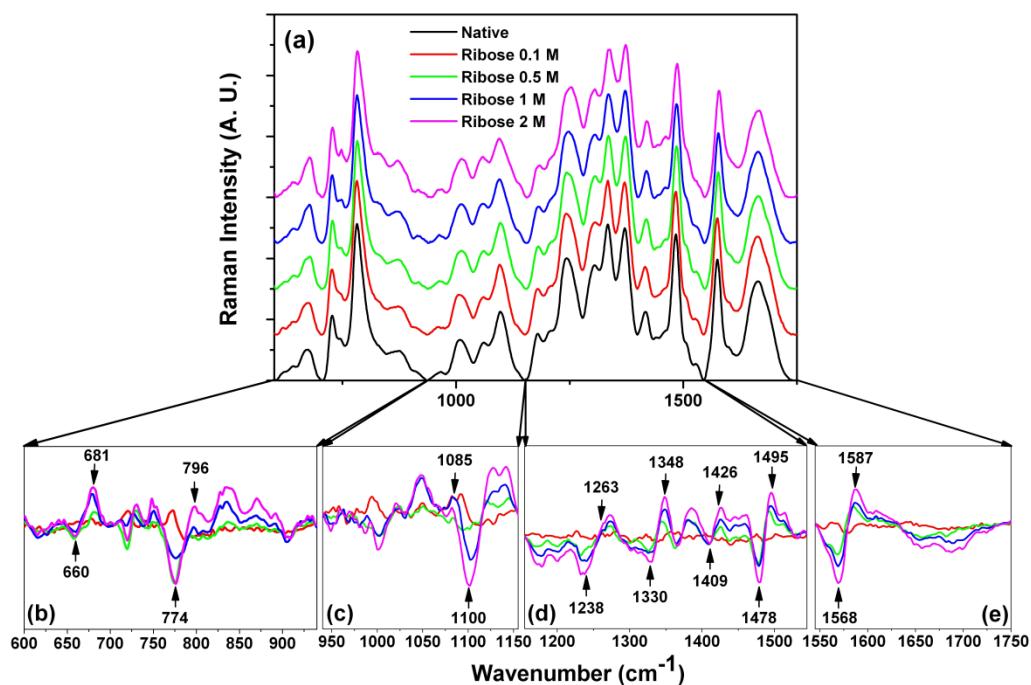
**FIG. 2:** Normalized mean Raman spectra of native DNA. This spectrum represents the means of 20 spectra for same condition. Data shown are representative of three independent experiments. All prominent Raman modes marked in the figure are tabulated in Table 1.

The Raman spectrum of DNA is mostly dominated by the vibrations of purines (Adenine (A), Guanine (G)) and pyrimidines (Cytosine (C), Thymine (T)) nucleobases. All prominent bands are marked in the figure and unambiguously assigned to vibrational modes of DNA nucleobases<sup>53-58</sup> as shown in Table 1.

Peak position (cm <sup>-1</sup> )	Assignment	Peak position (cm <sup>-1</sup> )	Assignment
675	Ring breathing – G-dRib	1243	Ring mode – C, T
726	Ring breathing – A	1300	Ring mode – A, C
744	Ring breathing – T	1334	$\nu(C_2N_3)$ – A, G
779	Ring breathing – C	1371	Ring mode $\delta_s(C_5H_3)$ – T, A, C
870	$\nu(CO)$ – dRib-P	1417	$\delta(2'CH_2)$ - dRib
1012	T, G, C, dRib	1458	$\delta(5'CH_2)$ - dRib
1060	$\nu(CO_5')$ – dRib	1484	Ring mode N7 – G, A
1096	$\nu_s(PO_2^-)$ -bk	1574	$\nu(C_4C_3)$ , $\nu(C_5C_4)$ – G, A
1177	G, T, C	1665	$\nu(C_4=O)$ – T, G, C

**TABLE 1:** Assignment of vibrational bands for native DNA Raman spectrum. Abbreviations: A – Adenine; C - Cytosine; G - Guanine; T - Thymine; dRib - deoxyribose-sugar moiety; bk – Phosphate backbone.

The normalized mean Raman spectra of DNA in native and glycated conditions are shown in the Fig. 3(a). The Raman difference spectra are obtained by subtracting native DNA spectrum from complex spectrum to make sure that the observed changes (change in intensity and shift in peak position) in DNA are due to interaction with D-ribose molecule [Fig. 3(b)-(e)]. These changes are essential to understand the conformational changes, structural rearrangements, and interactions between DNA and sugar molecules of the DNA-sugar complex. The positive difference peak and negative difference trough indicates increased and decreased Raman intensity in the spectrum of the complex, respectively. Several peaks and troughs features provide valuable information related to spectral changes caused by DNA-sugar complex formation which in turn help us to understand *in vitro* DNA-glycation.



**FIG. 3:** (a) Normalized mean Raman spectra of native DNA (black), glycated DNA incubated for 1 day with 0.1 M (red), 0.5 M (green), 1 M (blue) and 2 M (magenta) of D-ribose. These spectra represent the means of 20 spectra for each condition. Data shown are representative of three independent experiments. Raman difference spectra of glycated DNA for four conditions in the region of (b) 600-940, (c) 940-1155, (d) 1155-1545 and (e) 1545-1750  $\text{cm}^{-1}$ .

It has been shown that during glycation process, reducing sugars can non-enzymatically react with purine and pyrimidine bases and consequently alter the structure and conformation of DNA molecules.<sup>10-11,14,42</sup> All the prominent spectral changes due to DNA-glycation are categorized and summarized in the Table 2 and discussed below in detail.

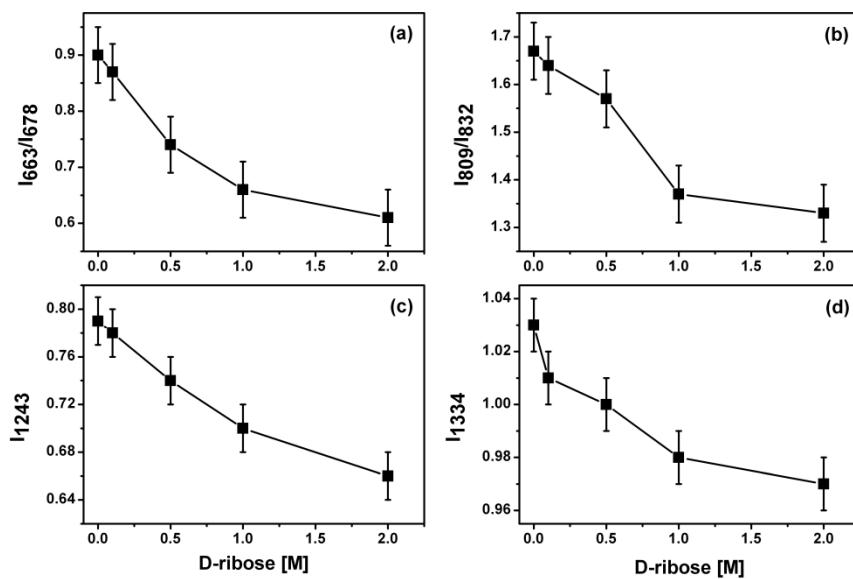
Raman vibrations ( $\text{cm}^{-1}$ )		Assignment	
Conformational changes			
663	Dec/Shift	668	G-dRib (A-form)
678	Inc/Shift	681	G-dRib (B-form)
809	Dec/Shift	811	Phosphodiester (A-form)
832	Inc/Shift	838	Phosphodiester (B-form)
1243	Dec/Shift	1253	C
1334	Dec/Shift	1337	A
Individual nucleobase/D-Ribose interactions			
779	Dec/Shift	782	C
1484	Dec/Shift	1487	G, A
1574	Dec/Shift	1578	G, A
1665	Dec/Shift	1668	T, G, C (C=O)
dRibose interactions			
1417	Inc/Shift	1421	dRib
Phosphate backbone modifications			
1096	Dec/Shift	1093	Phosphate-bk

**TABLE 2:** Observed spectral changes due to DNA-sugar interactions. Abbreviations: Inc – Increase in intensity; Dec - Decrease in intensity; Shift – Position change in the peak.

### Conformational Change in DNA

The broad Raman line at  $675 \text{ cm}^{-1}$ , assigned to ring breathing vibration of G coupled with dRib vibration (G-dRib) is composed of two main features at 663 and  $678 \text{ cm}^{-1}$ , marker of A- and B-form of DNA, respectively.<sup>53-56</sup> DNA molecules are known to adopt one of two major conformations, A- or B-form. The B-form is thermodynamically most stable and is therefore the standard structure of reference in any study of the properties of DNA. Presence of both these two bands in native and glycated DNA suggest that DNA exists in a mixture of conformations during the time-scale of Raman scattering process.<sup>57</sup> A trough/peak feature near  $660/681 \text{ cm}^{-1}$  [Fig. 3(b)] in the difference spectrum indicates perturbations at G as well as changes in DNA conformation. It is also clear that the intensity of A-form marker band decreases and B-form increases simultaneously. In order to see the variation of these two

vibrations in detail with the DNA-sugar complex formation, the ratio between the maximum intensities ( $I_{663}/I_{678}$ ) of these two vibrations was calculated. The variation indicates that the intensity ratio decreases as the D-ribose concentration increases [Fig. 4(a)]. Decrease in intensity ratio along with shift towards higher wavenumber (663 to 668 and 678 to 681  $\text{cm}^{-1}$ ) is observed on interaction, which indicates local perturbation in DNA conformation.



**FIG. 4:** Variation in intensity ratio (a)  $I_{663}/I_{678}$ , (b)  $I_{809}/I_{832}$  and intensity (c)  $I_{1243}$ , (d)  $I_{1334}$  as a function of D-ribose concentration. Error bars calculated as standard deviation from the three replicate measurements.

From curve-fitting procedure, a peak was observed near 809  $\text{cm}^{-1}$  (which is not clearly detected due to broad envelope of the peak around 780  $\text{cm}^{-1}$ ) corresponding to the phosphodiester A-form marker.<sup>54-55,58</sup> Due to interaction of sugar molecules with DNA molecules, this band shifts towards higher wavenumber (809 to 811  $\text{cm}^{-1}$ ) region. An additional spectral marker of B-form<sup>54-58</sup> is the 832  $\text{cm}^{-1}$  peak that shows a clear increase in intensity associated with high wavenumber shift (832 to 838  $\text{cm}^{-1}$ ) due to DNA-sugar complex formation. Existence of these two 809 and 832  $\text{cm}^{-1}$  bands again indicates the presence of a mixture of A- and B-form DNA. To understand the detail about the change, the

intensity ratio ( $I_{809}/I_{832}$ ) between these two bands was calculated and it shows that the intensity ratio decreases as the D-ribose concentration increases [Fig. 4(b)]. Decrease in intensity ratio associated with shift towards higher wavenumber (809 to 811 and 832 to 838  $\text{cm}^{-1}$ ) suggests a distortion of the DNA backbone conformation upon sugar interaction.

Again, the broad Raman feature around 1243  $\text{cm}^{-1}$  is mainly assigned to ring mode of C.<sup>53-54,56</sup> Due to the DNA-sugar complex formation, this Raman mode of pyrimidines change its position along with intensity which could give information related to structural alterations in the ring of C.<sup>53</sup> To understand the detail about the change, the variation of the intensity of this vibration was calculated and it also shows a decrease with increase in D-ribose concentration [Fig. 4(c)]. Along with the decrease in intensity, the maximum of this band shift towards higher wavenumber (1243 to 1253  $\text{cm}^{-1}$ ) is observed as the D-ribose concentration increases. This shift associated with intensity variation is clear from the trough/peak feature near 1238/1263  $\text{cm}^{-1}$  in the difference spectra [Fig. 3(d)]. It indicates the interaction of sugar molecules with C during the DNA-sugar complex formation. However, the reduction in intensity is due to dissimilar growing of the pyrimidine components implies a preferable unstacking of C upon sugar interaction.<sup>52</sup>

The Raman mode at 1334  $\text{cm}^{-1}$  is assigned mainly to ring vibrations of A.<sup>53-54</sup> In A-form DNA, the 1334  $\text{cm}^{-1}$  band of A is more intense than T band near 1371  $\text{cm}^{-1}$ . The relative intensities of this two marker bands are reversed in B-form DNA.<sup>55</sup> The variation of the intensity of this vibration with the D-ribose concentrations shows a clear decrease with increase in D-ribose concentration [Fig. 4(d)]. Along with the decrease in intensity, the band shifts towards higher wavenumber (1334 to 1337  $\text{cm}^{-1}$ ) was observed as the D-ribose concentration increases. This shift accompanied with intensity variation is clear from the trough/peak feature near 1330/1348  $\text{cm}^{-1}$  in the difference spectra [Fig. 3(d)]. The shift accompanied with the decrease in intensity indicates the interaction of sugar molecules with A during the DNA-sugar complex formation and also unstacking of A upon glycation.

DNA-glycation induced changes observed in the Raman marker vibrations indicate damages and local distortions in the DNA structure associated with preferable unstacking of purine and pyrimidine nucleobases followed by partial unfolding or unwinding of DNA double helix.<sup>18,22,32,42-45</sup> Furthermore, these spectral changes provide evidences for a partial transition from A- to B-form of DNA.<sup>58</sup>

### **Nucleobase-Sugar Interactions**

One of the most intense Raman feature at  $779\text{ cm}^{-1}$  in the Raman spectra of DNA is assigned to ring breathing mode of C.<sup>53-56,58</sup> An additional characteristic band of B-form around  $792\text{ cm}^{-1}$  assigned to a stretching vibration of backbone phosphodiester groups<sup>54</sup> is also observed (from curve fitting procedure) in all the Raman spectra of DNA. Normally, this  $792\text{ cm}^{-1}$  B-form marker band is masked due to presence of  $779\text{ cm}^{-1}$  ring breathing mode of C and difficult to detect in the spectrum. In general, these two bands overlap and give rise to an intense  $780\text{ cm}^{-1}$  peak. A trough/peak feature is observed in the region  $774/796\text{ cm}^{-1}$  [Fig. 3(b)] in the difference spectra which indicates the change in intensity and shift in the position of the band. The decrease in intensity of the peak associated with shift towards higher wavenumber ( $779$  to  $782\text{ cm}^{-1}$ ) indicates unstacking of C due to the DNA-glycation.

The Raman mode appeared at  $1484\text{ cm}^{-1}$  is mainly assigned to purine ring vibration of G N7 in DNA molecule.<sup>53-54,56-58</sup> An additional contribution of purine ring vibration of A N7 to this band is also discussed in the literature. Any small modification in hydrogen bonding environment of these two residues results in frequency shift of this band. Another Raman peak centered at  $1574\text{ cm}^{-1}$  is assigned to purine ring modes (stretching vibration) of G and A in DNA molecule.<sup>53-54,56-58</sup> Prominent trough/peak features are observed in the region  $1478/1495$  and  $1568/1587\text{ cm}^{-1}$  [Fig. 3(d) and 3(e)] in the difference spectra which indicates the change in intensity and shift in the position of the purine ring mode of G and A. The decrease in intensity of these two peaks associated with shift towards higher wavenumber

(1484 to 1487 and 1574 to 1578 cm<sup>-1</sup>) clearly suggests the interaction of sugar molecules with purine rings of G and A associated with unstacking of these nucleobases upon DNA-glycation.

The Raman band around 1665 cm<sup>-1</sup> is assigned to the carbonyl (C=O) group stretching vibration of T, G and C, respectively.<sup>53-54,56-57</sup> These bands are very sensitive to any modification in the base as well as hydrogen bonding in the A-T, G-C base pairs. The shift (1665 to 1668 cm<sup>-1</sup>) associated with the decrease intensity [Fig. 3(e)] in this band clearly indicates nucleobases modification and changes in the hydrogen bonding in the DNA base pairs. However, minor changes in the spectral profiles of the vibrational modes corresponding to T are not entirely excluded. Indeed, slight changes in the spectral profiles of these modes are observed and are explained to indicate changes in the conformation, hydrogen bonding in the DNA base pairs and local electrostatic environment.

### **dRib Interactions and Phosphate Backbone Modifications**

In most of the cases, compared to the intense bands of DNA bases, the Raman vibrations of sugar-phosphate backbone are less pronounced. The Raman peak centered at 1417 cm<sup>-1</sup>, is assigned to dRib stretching vibration in double stranded DNA (dsDNA).<sup>53-54,58</sup> A small trough/peak feature observed in the region 1409/1426 cm<sup>-1</sup> [Fig. 3(d)] in the difference spectra indicates the change in intensity and shift in the position of this mode. The variation in the intensity associated with shifts towards higher wavenumber (1417 to 1421 cm<sup>-1</sup>) in this band suggests perturbation in dRib conformation due to DNA-glycation. On the other hand, the Raman band around 1096 cm<sup>-1</sup> corresponds to phosphodiester stretching mode (PO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and is very much sensitive to change in DNA conformation.<sup>53-54,56-58</sup> Peak/trough features around 1085/1100 cm<sup>-1</sup> [Fig. 3(c)] in the difference spectra suggest the change in intensity and shift in the position of this mode. The decrease in intensity associated with shifts toward lower wavenumber (1096 to 1093 cm<sup>-1</sup>) in this band clearly indicates perturbation of

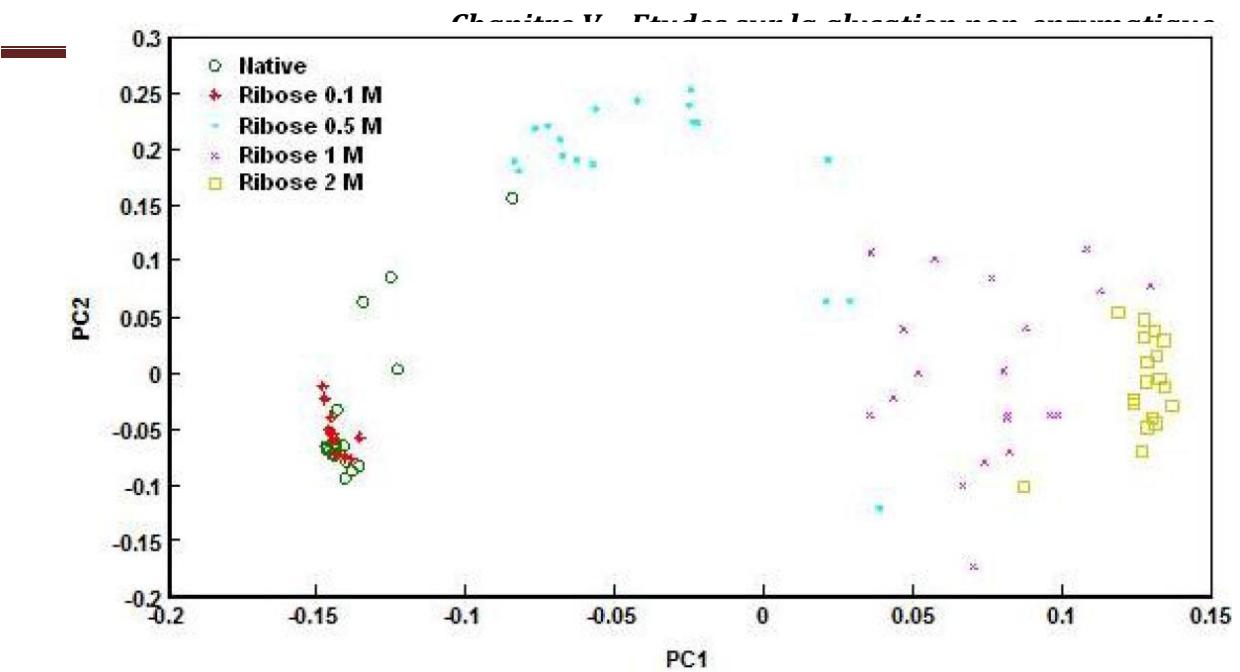
DNA conformation due to interaction with sugar molecules upon glycation. This feature is indicative of strand breakage in DNA due to DNA-glycation process.

The Raman microspectroscopic results of the sugar inducing DNA-glycation provides significant perturbations to the DNA backbone conformations, individual nucleobases and dRib as a consequence of sugar molecule binding to the DNA. These spectral changes (change in intensity and shift in peak position) can be considered as markers of the interaction of sugar molecules with DNA during the DNA-glycation. Interaction with sugar molecules affects the conformation of individual nucleobases (G, C and A). It has been already reported that nucleobases containing amine groups are prone to glycation with guanine and guanine-derivatives being the most reactive of all.<sup>10-11</sup> The above results suggest that interaction of D-ribose with DNA is mostly dominated by intercalation of D-ribose molecules between G-C base pairs compared to A-T base pairs. Undoubtedly, our observations indicate that the DNA structure is perturbed when interacted with sugar during glycation. Possible explanation for the structural modifications in DNA in presence of sugar molecules has been discussed by Sengupta et al.<sup>22</sup> Their study depicts a clear picture of structural modifications in DNA with partial unwinding of the DNA double-helical structure. The observed spectral features are not entirely indicative of either A- or B-form of DNA but a mixture of both conformations. This is probably due to the formation of an intermediate stage during partial transition from A- to B-form of DNA. From the results, it is clear that DNA-glycation does not induce any final transition in DNA double helix conformation and ultimately DNA presents in an intermediate A-B form with more towards B-form. A straightforward measurement on quantitative analysis of partial transition of A- to B-form is not possible due its intricacy of the Raman signals arises because of the overlapping nature of the Raman modes of different nucleobases.<sup>58</sup> Several studies have been performed to investigate the DNA conformational transition in different conditions.<sup>59-63</sup> Still, the A↔B transition mechanism is not clear but the major influences involved in this mechanism are considered to be hydration and electrostatics.<sup>60-61</sup>

Furthermore, the available geometric analysis of DNA structures revealed that on a base-step level many conformers exist that cannot be classified as either A- or B-form, and/or represent an A-to-B transitional state.<sup>64</sup> It has been reported that A-form DNA is an order of magnitude less susceptible to UV radiation damage compared with B-form.<sup>65</sup> Therefore, it is important to mention here that glycation induced partial transition from A- to B-form sensitize DNA more susceptible towards UV damage which leads to skin cancer.<sup>66</sup>

## **PCA Analysis of Raman Spectra**

PCA is an exploratory unsupervised method of multivariate data processing which is widely used in most Raman spectroscopic studies.<sup>4-5,9,48,67</sup> Following to the Raman difference spectra, PCA was used on spectral data from native and glycated DNA samples at different concentrations so as to highlight the variability from the spectral dataset. The first PC accounts for the greatest variance (47%), with the second PC accounting for the second greatest (15%). Fig. 5 displays the corresponding plots for PC1 and PC2 revealing a clear segregation between native and glycated DNA samples. It is noteworthy that native DNA and glycated DNA at 0.1 M are not clearly separated. Thus, this result would infer that an efficient glycation on DNA would be not visible from this sugar concentration during one day of incubation. Otherwise, the other groups are well discriminated. This unsupervised method permits to conclude that signal variability within a condition is limited compared to between the different glycation conditions. However, it is difficult by this method to know which DNA constituents would be affected by the glycation and with which dynamic.

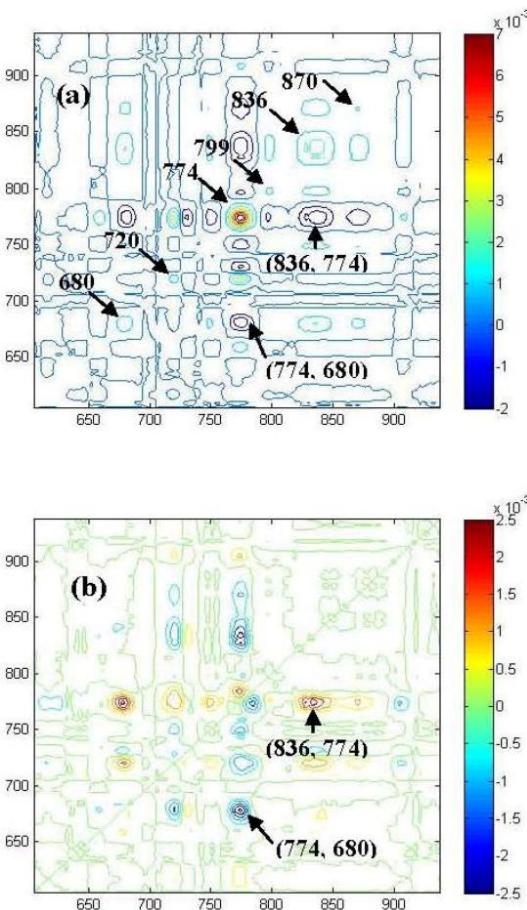


**FIG. 5:** PCA analysis of the spectral dataset. Scores plot of the first two principal components following to the PCA analysis on Raman spectra recorded from native and glycated DNA samples.

## 2D Correlation Analysis of Raman Spectra

To access dynamic information on DNA-glycation mechanism, 2D correlation analysis was applied to the set of Raman spectra of native and glycated DNA. Due to its several advantages, this analytical technique has been extended to diverse areas of spectroscopy, such as, near-infrared, UV, Raman, and so on.<sup>68-70</sup> Initially, 2D correlation analysis was performed on the full spectral window (not shown here), where it was found that the majority of spectral changes were occurring in 600-940 and 1150-1545  $\text{cm}^{-1}$  spectral window.

Fig. 6(a) and 6(b) show the synchronous and asynchronous 2D correlation maps in the region of 600-940  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. The color bar shows the different intensities of the 2D correlation peaks, which indicates the extent of correlation between  $v_1$  and  $v_2$ , the two different spectral variables.



**FIG. 6:** 2D Raman correlation map in the region of 600-940  $\text{cm}^{-1}$ . (a) Synchronous and (b) Asynchronous maps. The color bar shows the different intensities of the 2D correlation peaks, which indicates the extent of correlation between  $v_1$  and  $v_2$ , the two different spectral variables.

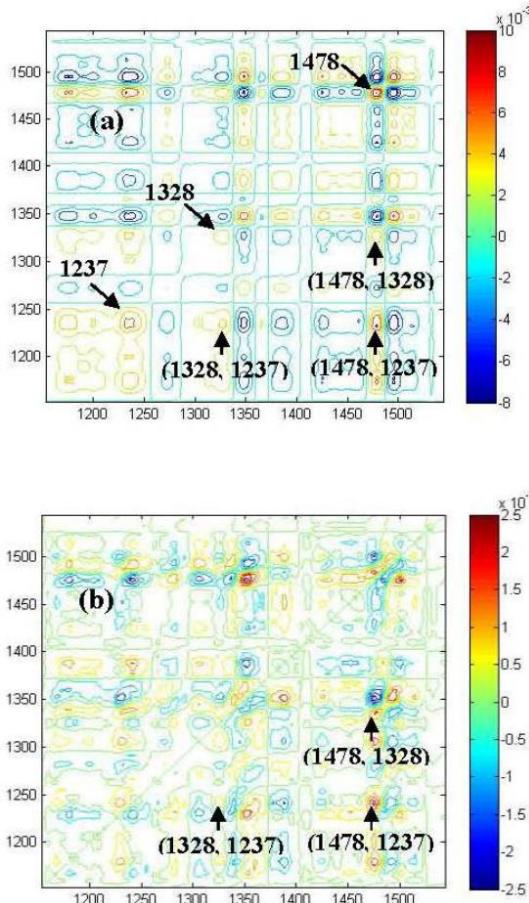
On the diagonal of the synchronous map [Fig. 6(a)], two strong auto peaks located at 774 and 836  $\text{cm}^{-1}$  indicate that the intensities of these two bands change dramatically under the glycation condition. Apart from these two strong auto peaks, there are four comparably weak auto peaks located at 680, 720, 799 and 870  $\text{cm}^{-1}$ , which also indicate that the intensities of these bands change under the glycation condition. The positive and negative synchronous cross peaks are also found at the off-diagonal region of the 2D map. Indeed positive synchronous cross peaks are found at (774, 720), (836, 680), (836, 799), (870, 680) and (870, 836)  $\text{cm}^{-1}$ . The positive synchronous cross peaks at (836, 680), (836, 799), (870, 680) and

(870, 836)  $\text{cm}^{-1}$  illustrate that the intensities of the bands at 680, 799, 836 and 870  $\text{cm}^{-1}$  changed together in the same direction during the glycation. This also suggests that all these four vibrations belong to the same kind of molecular group (related to DNA backbone conformation) vibrations of DNA. Same information can be obtained from the positive synchronous cross peak at (774, 720)  $\text{cm}^{-1}$  which illustrates that the intensities of the bands at 774 and 720  $\text{cm}^{-1}$  changed together in the same direction. It also indicates that these two vibrations belong to the same kind of molecular group (related to ring mode of C and A) vibrations of DNA. On the other hand, the negative synchronous cross peaks are visible at (774, 680), (799, 774), (836, 774) and (870, 774)  $\text{cm}^{-1}$ . The negative synchronous cross peaks illustrate that the change in intensity of the band at 774  $\text{cm}^{-1}$  is in opposite direction with the bands at 680, 799, 836 and 870  $\text{cm}^{-1}$ , i.e., the intensity of the band at 774  $\text{cm}^{-1}$  was decreasing while the intensities of the bands at 680, 799, 836 and 870  $\text{cm}^{-1}$  were increasing during the glycation. This also implies that the vibration at 774  $\text{cm}^{-1}$  does not belong to the same kind of molecular group vibrations at 680, 799, 836 and 870  $\text{cm}^{-1}$  of DNA. However, absence of auto peak near to 740  $\text{cm}^{-1}$  indicates that T is unaffected due to complex formation with sugar molecule during the glycation process.<sup>10-11</sup>

Asynchronous map supplies more information about the sequential order of various features of DNA due to glycation. Strong negative and positive cross peaks are observed in the asynchronous spectrum [Fig. 6(b)] at (774, 680) and (836, 774)  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. According to Noda's rules<sup>51</sup>, the modes responsible for the DNA backbone conformation at 680 and 836  $\text{cm}^{-1}$  underwent subsequent changes of the ring breathing mode of C at 774  $\text{cm}^{-1}$ . Therefore, it is clear that the effect on individual nucleobases occurred before the effect on DNA backbone conformation.<sup>18,32,42</sup> Moreover, the three single peaks, at 680, 720 and 774  $\text{cm}^{-1}$  in the synchronous 2D correlation map [Fig. 6(a)], are clearly resolved to six peaks at 674 and 683, 720 and 728, and 773 and 785  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, in the asynchronous 2D correlation map [Fig. 6(b)]. These features indicate that the modes at 683, 728 and 785  $\text{cm}^{-1}$

begin to show up after the modes at 674, 720 and 773  $\text{cm}^{-1}$ , respectively during glycation process.

Fig. 7(a) and 7(b) show the synchronous and asynchronous 2D correlation maps in the region of 1150-1545  $\text{cm}^{-1}$  of DNA during the glycation process, respectively.



**FIG. 7:** 2D Raman correlation map in the region of 1150-1545  $\text{cm}^{-1}$ . (a) Synchronous and (b) Asynchronous maps. The color bar shows the different intensities of the 2D correlation peaks, which indicates the extent of correlation between  $v_1$  and  $v_2$ , the two different spectral variables.

The synchronous 2D correlation map [Fig. 7(a)] contains auto peaks located at 1237, 1328 and 1478  $\text{cm}^{-1}$ , which indicate that the intensities of these bands change under the glycation condition. These bands at 1237, 1328 and 1478  $\text{cm}^{-1}$  are attributed to the ring modes of C, A and G, respectively. The synchronous map yields positive cross peaks at (1328, 1237), (1478, 1237) and (1478, 1328)  $\text{cm}^{-1}$  indicating that the intensities of these bands changed all together

in the same direction during glycation process. In order to investigate the sequential order of the individual nucleobases affected earlier compared to others during the glycation process more accurately, an asynchronous map was obtained [Fig. 7(b)]. According to Noda's rules<sup>51</sup>, the positive sign of the cross peaks at (1478, 1237) and (1478, 1328) cm<sup>-1</sup> suggests that the ring mode at 1478 cm<sup>-1</sup> of G is affected before the ring modes at 1237 and 1328 cm<sup>-1</sup> of C and A, respectively. On the other hand, positive sign of the cross peaks at (1328, 1237) cm<sup>-1</sup> suggests that the ring mode at 1328 cm<sup>-1</sup> of A changed before the ring mode at 1237 cm<sup>-1</sup> of C. The signs of the 2D Raman asynchronous map suggest the following sequence of the spectral changes: 1478 → 1328 → 1237 cm<sup>-1</sup>. This indicates that, initially, structural modification of G occurs and then subsequent modification occurs in the A and C, respectively during the glycation process.<sup>10-11</sup> Moreover, the two single peaks, at 1237, and 1478 cm<sup>-1</sup> in the synchronous 2D correlation map [Fig. 7(a)], are clearly resolved to four peaks, at 1229 and 1241, and 1475 and 1484 cm<sup>-1</sup>, respectively, in the asynchronous 2D correlation map [Fig. 7(b)]. These features indicate that the modes at 1241 and 1484 cm<sup>-1</sup> begin to show up after the modes at 1229 and 1475 cm<sup>-1</sup>, respectively during glycation process. The results obtained from the 2D Raman correlation analysis are summarized in Table 3.

Synchronous at $\Phi(v_1, v_2)$	Asynchronous at $\Psi(v_1, v_2)$	Glycated DNA (Ribose 2M)
(774, 680) cm <sup>-1</sup> < 0	(774, 680) cm <sup>-1</sup> < 0	lead
(836, 774) cm <sup>-1</sup> < 0	(836, 774) cm <sup>-1</sup> > 0	lag
(1328, 1237) cm <sup>-1</sup> > 0	(1328, 1237) cm <sup>-1</sup> > 0	lead
(1478, 1237) cm <sup>-1</sup> > 0	(1478, 1237) cm <sup>-1</sup> > 0	lead
(1478, 1328) cm <sup>-1</sup> > 0	(1478, 1328) cm <sup>-1</sup> > 0	lead

**TABLE 3:** Order of spectral evolution during DNA-glycation process. The term lead means that the intensity change of the band at  $v_1$  occurs before to  $v_2$  for the asynchronous peak at  $v_1$  and  $v_2$ . The term lag means that the intensity change of the band at  $v_1$  occurs after to  $v_2$  for the asynchronous peak at  $v_1$  and  $v_2$ .

The dynamic of DNA-glycation process was easily confirmed from the signs of the synchronous maps. The order of emergence of the various vibrational modes, related to different ring modes corresponding to individual nucleobases and DNA backbone conformational modes during the glycation process, was determined from the asynchronous maps. Overall, 2D Raman correlation analysis of the selected spectral regions indicates that the structural modification of G occurred earlier in the glycation process, compared to the structural modification of A and C. Also, the structural modification of individual nucleobases occurred before the DNA backbone structural modification during the glycation process. At the microspectroscopic level, our results obtained from 2D Raman correlation analysis mostly confirm the earlier investigations made by several groups using routine methods as mentioned above.<sup>10-11,18,32,42</sup> Most likely, the change appears in these modes (at 683, 728, 785, 1241 and 1484 cm<sup>-1</sup>) might originate from the presence of glycated DNA in the samples and can be considered as the DNA-glycation markers.

## **CONCLUSIONS**

To the best of our knowledge, the present work is the first attempt to demonstrate a novel Raman micro-spectroscopy-based measurement for exploring *in vitro* glycation of DNA, the vital part of all living organisms. This proposed methodology is direct, rapid and label-free. This measurement yields a clear discrimination between native and glycated DNA samples. Employing 2D correlation analysis to the Raman spectra, we have been able to provide valuable insights were able to be provided into the dynamic of DNA-glycation process. It has been also revealed that Raman spectroscopy is much more sensitive to slight conformational modifications compared to any other methods available. We believe that our potential to detect specific spectral marker of glycation will give molecular-level information

of DNA-glycation mechanism. In addition, we hope that this study can be used to more complex biological systems, e.g., to explore *in vivo* DNA-glycation.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors acknowledge the Region Champagne-Ardenne and INSERM (Physicancer Project) for funding. The experiments were performed by means of IBiSA Platform PICT (Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire) of the Champagne-Ardenne Reims University.

## **REFERENCES**

- (1) Maillard, L.-C. *C. R. Acad. Sci.* **1912**, 154, 66.
- (2) Namiki, M.; Hayashi, T.; Kawakishi, S. *Agric. Biol. Chem.* **1973**, 37, 2935.
- (3) Garlick, R. L.; Mazer, J. S. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258 (10), 6142.
- (4) Dingari, N.C.; Horowitz, G.L.; Kang, J.W.; Dasari, R.R.; Barman, I. *PLoS One* **2012**, 7, e32406.
- (5) Barman, I.; Dingari, N.C.; Kang, J.W.; Horowitz, G.L.; Dasari, R.R.; Feld, M.S. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 2474.
- (6) Verzijl, N.; DeGroot, J.; Oldehinkel, E.; Bank, R. A.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W.; Bayliss, M. T.; Bijlsma, J. W.; Lafeber, F. P.; Tekoppele, J. M. *Biochem. J.* **2000**, 350, 381.
- (7) Guilbert, M.; Said, G.; Happilon, T.; Untereiner, V.; Garnotel, R.; Jeannesson, P.; Sockalingum, G. D. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1830, 3525.
- (8) Brady, L. J.; Martinez, T.; Balland, A. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 9403.

- (9) Brewster, V. L.; Ashton, L.; Goodacre, R. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 6074.
- (10) Dutta, U.; Cohenford, M. A.; Guha, M. ; Dain, J. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386, 1633.
- (11) Dutta, U.; Cohenford, M. A.; Dain, J. A. *Anal. Biochem.* **2005**, 345, 171.
- (12) Knerr, T.; Severin, T. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7389.
- (13) Ochs, S.; Severin, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 8, 851.
- (14) Bucala, R.; Model, P.; Cerami, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 105.
- (15) Olsen, R.; Molander, P.; Øvrebø, S.; Ellingsen, D.G.; Thorud, S.; Thomassen, Y.; Lundanes, E.; Greibrokk, T.; Backman, J.; Sjöholm, R.; Kronberg, L. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18, 730.
- (16) Li, Y.; Cohenford, M.A. ; Dutta, U.; Dain, J. A. *Anal Bioanal Chem.* **2008**, 390, 679.
- (17) Lee, A. T. *Age* **1987**, 10, 150.
- (18) Pischetsrieder, M.; Seidel, W.; Münch, G.; Schinzel, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 264, 544.
- (19) Mironova, R.; Niwa, T.; Handzhiyski, Y.; Sredovska, A.; Ivanov, I. *Molecular Microbiology* **2005**, 55(6), 1801.
- (20) Schneider, M.; Georgescu, A.; Bidmon, C.; Tutsch, M.; Fleischmann, E. H.; Popov, D.; Pischetsrieder, M. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, 50, 424.
- (21) Li, H.; Nakamura, S.; Miyazaki, S.; Morita, T. ; Suzuki, M. ; Pischetsrieder, M.; Niwa, T. *Kidney Int.* **2006**, 69, 388.

- (22) Sengupta, B.; Uematsu, T.; Jacobsson, P.; Swenson, J. *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 646.
- (23) Breyer, V.; Frischmann, M.; Bidmon, C.; Schemm, A.; Schiebel, K.; Pischetsrieder, M. *FEBS Journal* **2008**, 275, 914.
- (24) Waris, S.; Pischetsrieder, M.; Saleemuddin, M. *Ind. J. Biochem. Biophys.* **2010**, 47, 148.
- (25) Ahmad, M. I.; Ahmad, S.; Moinuddin. *Ind. J. Biochem. Biophys.* **2011**, 48, 290.
- (26) Voulgaridou, G. -P.; Anestopoulos, I.; Franco, R.; Panayiotidis, M. I. ; Pappa, A. *Mutation Research* **2011**, 711, 13.
- (27) Ashraf, J. M.; Arif, B.; Dixit, K.; Moinuddin; Alam, K. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, 51, 604.
- (28) Akhter, F.; Khan, M. S.; Shahab, U.; Moinuddin; Ahmad, S. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 58, 206.
- (29) Ahmad, S.; Moinuddin; Shahab, U.; Habib, S.; Khan, M. S.; Alam, K.; Ali, A. *Glycobiology* **2014**, 24(3), 281.
- (30) Mustafa, I.; Ahmad, S.; Dixit, K.; Moinuddin; Ahmad, J.; Ali, A. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2012**, 95, 98.
- (31) Levi, B.; Werman, M. *J. Nutr. Biochem.* **2003**, 14, 49.
- (32) Seidel, W.; Pischetsrieder, M. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **1998**, 44, 1165.
- (33) Bucala, R.; Makita, Z.; Koschinsky, T. ; Cerami, A.; Vlassara, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 6434.
- (34) Seidel, W.; Pischetsrieder, M. *Bioorg. Medicin. Lett.* **1998**, 8, 2017.

- (35) Frischmann, M.; Bidmon, C.; Angerer, J.; Pischetsrieder, M. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18, 1586.
- (36) Seidel, W.; Pischetsrieder, M. *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**, 1425, 478.
- (37) Busch, M.; Franke, S.; Müller, A.; Wolf, M.; Gerth, J.; Ott, U.; Niwa, T.; Stein, G. *Kidney Int.* **2004**, 66, 338.
- (38) Del Turco, S.; Basta, G. *Biofactors* **2012**, 38, 266.
- (39) Khalifah, R. G.; Todd, P.; Booth, A. A.; Yang, S. X.; Mott, J. D.; Hudson, B. G. *Biochemistry* **1996**, 35, 4645.
- (40) Sell, D. R.; Monnier, V. M. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 21597.
- (41) Cervantes-Laurean, D.; Jacobson, E. L.; Jacobson, M. K. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 10461.
- (42) Bucala, R.; Model, O.; Russel, M.; Cerami, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 8439.
- (43) Baynes, J. W. *Ann. N Y Acad. Sci.* **2002**, 959, 360.
- (44) Cuniasse, P.; Fazakerley, G. V.; Guschlbauer, W.; Kaplan, B. E.; Sowers, L. C. *J. Mol. Biol.* **1990**, 213, 303.
- (45) Kasai, H.; Iwamoto-Tanaka, N.; Fukada, S. *Carcinogenesis* **1998**, 19, 1459.
- (46) Zhang, D.; Mrozek, M. F.; Xie, Y.; Ben-Amotz, D. *Appl. Spectrosc.* **2004**, 58, 929.
- (47) Ortiz, C.; Zhang, D.; Xie, Y.; Ribbe, A. E.; Ben-Amotz, D. *Anal. Biochem.* **2006**, 353, 157.
- (48) Filik, J.; Stone, N. *Analyst* **2007**, 132, 544.

- (49) Wang, H.; Cao, H.; Wang, Y. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, 23, 74.
- (50) Whelan, D. R.; Bamberg, K. R.; Heraud, P.; Tobin, M. J.; Diem, M.; McNaughton, D.; Wood, B. R. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 5439.
- (51) Noda, I. *Appl. Spectrosc.* **1993**, 47, 1329.
- (52) Duguid, J. G.; Bloomfield, V. A.; Benevides, J. M.; Thomas, G. J. *Biophys. J.* **1996**, 71, 3350.
- (53) Syntytsya, A.; Alexa, P.; Boer, J. de; Loewe, M.; Moosburger, M. ; Würkner, M. ; Volka, K. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, 38, 1406.
- (54) Thomas Jr., G. J.; Benevides, J. M.; Overman, S. A.; Ueda, T.; Ushizawa, K.; Saitoh, M.; Tsuboi, M. *Biophys. J.* **1995**, 68, 1073.
- (55) Nishimura, Y.; Tsuboi, M.; Nakano, T.; Higuchi, S.; Sato, T.; Shida, T.; Uesugi, S.; Ohtsuka, E.; Ikebara, M. *Nucleic Acids Res.* **1983**, 11(5), 1579.
- (56) Duguid, J.; Bloomfield, V. A.; Benevides, J.; Thomas Jr., G. J. *Biophys. J.* **1993**, 65, 1916.
- (57) Ke, W.; Zhou, D.; Wu, J. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, 36, 39.
- (58) Dostál, L.; Chen, C. -Y.; Wang, A. H.-J.; Welfle, H. *Biochemistry* **2004**, 43, 9600.
- (59) Cheatham, T. E.; Kollman, P. A. *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 434.
- (60) Mazur, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7849.
- (61) Rudd, L.; Lee, D. J.; Kornyshev. A. A. *J. Phys.: Condens. Matter* **2007**, 19, 416103 (19 pp).

- (62) Knee, K. M.; Dixit, S. B.; Aitken, C. E.; Ponomarev, S.; Beveridge, D. L.; Mukerji, I. *Biophys. J.* **2008**, 95, 257.
- (63) Lee, O. S.; Cho, V. Y.; Schatz, G. C. *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, 7000.
- (64) Svozil, D.; Kalina, J.; Omelka, M.; Schneider, B. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, 3690.
- (65) Becker, M. M.; Wang, Z. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 4163.
- (66) Ziegler, A.; Jonason, A. S.; Leffell, D. J.; Simon, J. A.; Sharma, H. W.; Kimmelman, J.; Remington, L.; Jacks, T.; Brash, D. E. *Nature* **1994**, 372, 773.
- (67) Varmuza, K. *Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics*. Taylor & Francis Group ed. **2009**, 3, pp.59–102.
- (68) Segtnan, V. H.; Šašić, Š.; Isaksson, T.; Ozaki, Y. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3153.
- (69) Kim, Y. –O.; Jung, Y. M.; Kim, S. B.; Park, S. –M. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5236.
- (70) Brewster, V. L.; Ashton, L.; Goodacre, R. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 3570.

## **Conclusions et perspectives**

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence le potentiel des techniques de spectroscopie optique vibrationnelle afin de mieux caractériser les altérations moléculaires et structurales de la peau au cours du vieillissement chronologique. De par leur caractère non destructif, ces méthodes biophotoniques permettent de sonder la composition biomoléculaire intrinsèque d'un échantillon à une échelle microscopique, et ce de façon rapide et directe. Parmi ces approches d'analyse basées sur l'interaction de la lumière avec la matière, nous avons utilisé les techniques de micro-spectroscopies d'absorption IR et de diffusion Raman afin d'étudier l'impact du vieillissement sur les différents constituants de la peau, et ce à travers une analyse multi-échelle. En effet, l'intérêt de ces méthodes a pu être évalué *ex vivo* (coupes fines de peau et blocs de peau excisée) et *in vivo* (directement sur la peau de volontaires), comme décrit dans les différents travaux présentés au cours de cette thèse.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la micro-imagerie IR en mode polarisé dans le but de caractériser la structure du réseau de collagène de type I dans des coupes congelées de peau d'âges différents. Nous avons ainsi pu observer des changements d'orientation des fibres de collagène dermique au cours du vieillissement de la peau. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'importance des molécules d'eau dans ces changements d'orientation avec l'âge. Ainsi, nous avons employé la même approche biophotonique que précédemment afin de déterminer l'influence des molécules d'eau liée sur les changements structuraux du réseau de collagène au cours du vieillissement cutané. En substituant les molécules d'eau liée au collagène ( $H_2O$ ) par des molécules d'eau deutérée ( $D_2O$ ), nous avons pu mettre en évidence le rôle crucial des molécules d'eau liée dans l'architecture du réseau de collagène. L'effet de la substitution a pu être observé uniquement dans des échantillons de peaux jeunes. Ceci reflèterait que le nombre de molécules d'eau liée serait plus important dans le derme de peau jeune, et que ce nombre diminuerait avec l'âge. Cependant, il convient également tout d'abord de quantifier directement le taux de molécules d'eau liée dans les échantillons dermiques de peaux d'âges différents. Dans la logique de notre démarche, nous avons débuté des analyses complémentaires en DVS (*Dynamic Vapor Sorption*) et en micro-spectroscopie de diffusion Raman pour évaluer la teneur en eau liée dans nos échantillons.

Afin de pouvoir mieux comprendre par la suite les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus du vieillissement cutané, il serait intéressant de pouvoir évaluer la distribution tridimensionnelle (3D) des fibres de collagène dans le derme et déterminer les changements d'orientation de ces fibres avec l'âge. Pour cela, la micro-spectroscopie confocale Raman en mode polarisé (142, 143) constituerait un excellent moyen pour obtenir des informations à la fois structurales et moléculaires sur des blocs de peaux excisées d'âges différents.

Dans un deuxième temps, nous sommes passés à l'échelle du vivant afin de pouvoir mettre en évidence *in vivo* des marqueurs spectroscopiques associés au vieillissement cutané à l'aide d'une micro-sonde confocale Raman. Dans cette optique, des volontaires sains d'âges différents ont été recrutés dans le but d'effectuer des mesures Raman et biométriques (*i.e.* mesure des propriétés mécaniques et la PIE) sur la peau de leur avant-bras (zone protégée des rayonnements UVs). L'utilisation de la micro-spectroscopie confocale Raman combinée au traitement PLS nous a permis de rechercher des corrélations entre les données spectrales et les données biométriques, ces dernières servant de référence. Les résultats obtenus ont abouti à l'identification de vibrations spectrales sensibles aux différentes caractéristiques de la peau. Plus précisément, nous avons pu déterminer les vibrations associées aux composants biomoléculaires du SC qui seraient responsables de ses caractéristiques physico-chimiques, plus précisément en ce qui concerne les propriétés mécaniques et la résistance de la peau à la diffusion de l'eau. D'autres outils biophotoniques peuvent être également employés de manière complémentaire dans des études *in vivo* sur le vieillissement cutané. C'est le cas de la tomographie par cohérence optique à haute définition (HD-OCT) (144, 145, 146), technique non-invasive qui permet de réaliser des images 3D de la peau, en temps réel et avec une résolution de quelques  $\mu\text{m}$ . Cette approche peut fournir des informations précises sur l'organisation des fibres de collagène dans des blocs de peaux excisées (147). L'HD-OCT permettrait ainsi d'évaluer avec une bonne résolution les changements morphologiques liés au vieillissement chronologique de la peau. De plus, la spectroscopie par réflectance diffuse (DRS) est une technique prometteuse dans la caractérisation des paramètres optiques d'absorption et de diffusion de la peau (148, 149). Ainsi, la DRS permet d'extraire des informations intéressantes telles que le taux de mélanine (150), la concentration en hémoglobine (151), ou encore les propriétés optiques du réseau de collagène<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Guilbert M, Roig B, Terryn C, et al., Highlighting the impact of aging on type I collagen: label-free investigation using confocal reflectance microscopy and diffuse reflectance spectroscopy in 3D matrix model, Submitted in *Aging Journal*, Sept 2015.

Enfin, la dernière partie de cette thèse a porté sur l'étude du processus de glycation non-enzymatique, principale cause du vieillissement chronologique. *In vivo*, la glycation non-enzymatique est un phénomène touchant aussi bien les protéines que l'ADN, résultant en la formation des produits de glycation avancée (AGEs). Tandis que les protéines glyquées gagnent en rigidité et perdent en solubilité, l'ADN glyqué présente des cassures simple brin et des mutations locales. Dans une de nos études portant sur le collagène « vieilli », nous avons pu caractériser des zones de transition entre des coatings de collagène de type I d'âges différents et des cellules de fibrosarcomes humains (HT-1080) par des techniques de micro-imagerie IR avec la source synchrotron. Cette approche a permis de mettre en évidence une influence des AGEs dans l'interaction des cellules avec leur micro-environnement ; démontrant ainsi l'impact du vieillissement sur le processus de progression tumorale. Il serait intéressant d'étendre ces études à des modèles matriciels plus complexes tels que des matrices 3D de collagène de type I. En effet, il est désormais possible de réaliser des impressions 3D de matrices de collagène par le procédé de pontage croisé multiphotonique (152). Une telle méthodologie permettrait de mimer le micro-environnement cellulaire de façon plus réaliste.

En parallèle, nous avons pu montrer que la glycation *in vitro* de l'ADN pouvait être évaluée par micro-spectroscopie de diffusion Raman. Nos résultats ont révélé que le mécanisme de glycation affecte la structure de l'ADN de façon séquentielle, en commençant par des modifications des bases nucléiques puis en altérant le squelette carboné. De plus, la glycation induit un changement de conformation de l'ADN. De telles modifications structurales pourraient rendre l'ADN, dans un contexte cellulaire, plus vulnérable aux dégradations enzymatiques. Cette étude permet d'ouvrir de nouvelles perspectives d'investigations au niveau des kératinocytes basaux. En effet, ces cellules souches sont vitales pour le renouvellement de l'épiderme et une atteinte de leur matériel génétique par le processus de glycation pourrait compromettre le processus de régénération de l'épiderme.

Les approches biophotoniques que nous avons utilisées permettent de révéler certains mécanismes impliqués dans le vieillissement cutané ; à la fois à l'échelle microscopique, tissulaire, et *in vivo* directement sur l'organisme. Ces outils sont particulièrement intéressants pour une évaluation objective d'actifs en dermatologie et en cosmétologie.

## **Références bibliographiques**

1. Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther.* 2004; 17 Suppl 1:6-15.
2. Janssens M, van Smeden J, Gooris GS, et al. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res.* 2012; 53(12):2755-66.
3. Pearse AD, Marks R. Response of human skin to ultraviolet radiation: dissociation of erythema and metabolic changes following sunscreen protection. *J Invest Dermatol.* 1983; 80(3):191-4.
4. Pearse AD, Gaskell SA, Marks R. Epidermal changes in human skin following irradiation with either UVB or UVA. *J Invest Dermatol.* 1987; 88(1):83-7.
5. Corsini E, Sangha N, Feldman SR. Epidermal stratification reduces the effects of UVB (but not UVA) on keratinocyte cytokine production and cytotoxicity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1997; 13(4):147-52.
6. Zenisek A, Kral JA, Hais IM. Sun-screening effect of urocanic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1955; 18(4):589-91.
7. Wefers H, Melnik BC, Flür M, et al. Influence of UV irradiation on the composition of human stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol.* 1991; 96(6):959-62.
8. Regnier M, Caron D, Reichert U, et al. Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. *J Pharm Sci.* 1993; 82(4):404-7.
9. Visscher MO, Tolia GT, Wickett RR, et al. Effect of soaking and natural moisturizing factor on stratum corneum water-handling properties. *J Cosmet Sci.* 2003; 54(3):289-300.
10. Potts RO, Francoeur ML. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J Invest Dermatol.* 1991; 96(4):495-9.
11. Lovell CR, Smolenski KA, Duance VC, et al. Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *Br J Dermatol.* 1987; 117(4):419-28.

12. Utto J. Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-associated alterations in collagen and elastin. *Clin Geriatr Med.* 1989; 5(1):127-47.
13. Pearce RH. Proteins of the ground substance of human dermis. *Biochem Pharmacol.* 1968; Suppl:156-7.
14. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(1):a004978.
15. Woolfson DN, Ryadnov MG. Peptide-based fibrous biomaterials: Some things old, new and borrowed. *Curr Opin Chem Biol.* 2006; 10(6):559-67.
16. Beck K, Brodsky B. Supercoiled protein motifs: the collagen triple-helix and the alpha-helical coiled coil. *J Struct Biol.* 1998; 122(1-2):17-29.
17. Bella J, Brodsky B, Berman HM. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure.* 1995; 3(9):893-906.
18. Wood GC. The formation of fibrils from collagen solutions. 2. A mechanism of collagen-fibril formation. *Biochem J.* 1960; 75:598-605.
19. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78:929-58.
20. Yamauchi M, Shiiba M. Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. *Methods Mol Biol.* 2008; 446:95-108.
21. Elbjeirami WM, Yonter EO, Starcher BC, et al. Enhancing mechanical properties of tissue-engineered constructs via lysyl oxidase crosslinking activity. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 66(3):513-21.
22. Cotta-Pereira G, Guerra Rodrigo F, Bittencourt-Sampaio S. Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol.* 1976; 66(3):143-8.
23. Gillard GC, Reilly HC, Bell-Booth PG, et al. A comparison of the glycosaminoglycans of weight-bearing and non-weight-bearing human dermis. *J Invest Dermatol.* 1977; 69(2):257-61.
24. Sidgwick GP, Bayat A. Extracellular matrix molecules implicated in hypertrophic and keloid scarring. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012; 26(2):141-52.

25. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990; 345(6274):458-60.
26. Applegate LA, Noël A, Vile G, et al. Two genes contribute to different extents to the heme oxygenase enzyme activity measured in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: implications for protection against oxidant stress. *Photochem Photobiol*. 1995; 61(3):285-91.
27. Iwai I, Ikuta K, Murayama K, et al. Change in optical properties of stratum corneum induced by protein carbonylation in vitro. *Int J Cosmet Sci*. 2008; 30(1):41-6.
28. Archer DF. Postmenopausal skin and estrogen. *Gynecol Endocrinol*. 2012;28 Suppl 2:2-6.
29. Verdier-Sévrain S. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of selective estrogen receptor modulators. *Climacteric*. 2007; 10(4):289-97.
30. Garmyn M, Yaar M, Boileau N, et al. Effect of aging and habitual sun exposure on the genetic response of cultured human keratinocytes to solar-simulated irradiation. *J Invest Dermatol*. 1992; 99(6):743-8.
31. Sandby-Møller J, Poulsen T, Wulf HC. Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. *Acta Derm Venereol*. 2003; 83(6):410-3.
32. Ortonne JP. Pigmentary changes of the ageing skin. *Br J Dermatol*. 1990; 122 Suppl 35:21-8.
33. Xu YP, Qi RQ, Chen W, et al. Aging affects epidermal Langerhans cell development and function and alters their miRNA gene expression profile. *Aging (Albany NY)*. 2012; 4(11):742-54.
34. Saint Léger D, François AM, Lévêque JL, et al. Age-associated changes in stratum corneum lipids and their relation to dryness. *Dermatologica*. 1988; 177(3):159-64.
35. Lavker RM, Zheng PS, Dong G. Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *J Invest Dermatol*. 1987; 88(3 Suppl):44s-51s.
36. Lapière CM. The ageing dermis: the main cause for the appearance of 'old' skin. *Br J Dermatol*. 1990; 122 Suppl 35:5-11.

37. Andrew W, Behnke RH, Sato T. Changes with advancing age in the cell population of human dermis. *Gerontologia*. 1964-1965; 10:1-19.
38. Bouissou H, Pieraggi MT, Julian M, et al. The elastic tissue of the skin. A comparison of spontaneous and actinic (solar) aging. *Int J Dermatol*. 1988; 27(5):327-35.
39. Longas MO, Russell CS, He XY. Chemical alterations of hyaluronic acid and dermatan sulfate detected in aging human skin by infrared spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 1986; 884(2):265-9.
40. Mizutari K, Ono T, Ikeda K, et al. Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction. *J Invest Dermatol*. 1997; 108(5):797-802.
41. Tan EM, Stoughton RB. Ultraviolet light induced damage to desoxyribonucleic acid in human skin. *J Invest Dermatol*. 1969; 52(6):537-42.
42. Denning MF, Wang Y, Tibudan S, et al. Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell Death Differ*. 2002; 9(1):40-52.
43. Kim MS, Kim YK, Cho KH, et al. 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.
44. Morita A, Torii K, Maeda A, et al. Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2009; 14(1):53-5.
45. Morita A. Tobacco smoke causes premature skin aging. *J Dermatol Sci*. 2007; 48(3):169-75.
46. Castelo-Branco C, Figueras F, Martínez de Osaba MJ, et al. Facial wrinkling in postmenopausal women. Effects of smoking status and hormone replacement therapy. *Maturitas*. 1998; 29(1):75-86.
47. Wisthaler A, Weschler CJ. Reactions of ozone with human skin lipids: sources of carbonyls, dicarbonyls, and hydroxycarbonyls in indoor air. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(15):6568-75.

48. Valacchi G, Pagnin E, Okamoto T, et al. Induction of stress proteins and MMP-9 by 0.8 ppm of ozone in murine skin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305(3):741-6.
49. Gilchrest BA, Murphy GF, Soter NA. Effect of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans cells in human epidermis. *J Invest Dermatol.* 1982; 79(2):85-8.
50. Dong KK, Damaghi N, Picart SD, et al. UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. *Exp Dermatol.* 2008; 17(12):1037-44.
51. Li Y, Xia W, Liu Y, et al. Solar ultraviolet irradiation induces decorin degradation in human skin likely via neutrophil elastase. *PLoS One.* 2013; 8(8):e72563.
52. Ribeiro JF, dos Anjos EH, Mello ML, et al. Skin collagen fiber molecular order: a pattern of distributional fiber orientation as assessed by optical anisotropy and image analysis. *PLoS One.* 2013; 8(1):e54724.
53. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M. Mechanical properties of human skin in vivo: a comparative evaluation in 300 men and women. *Skin Res Technol.* 2014; 20(2):127-35.
54. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M. Age-related changes in skin barrier function - quantitative evaluation of 150 female subjects. *Int J Cosmet Sci.* 2013a; 35(2):183-90.
55. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M. Skin physiology in men and women: in vivo evaluation of 300 people including TEWL, SC hydration, sebum content and skin surface pH. *Int J Cosmet Sci.* 2013b; 35(5):477-83.
56. Barbillat J, Bougeard D, Buntinx G, et al. Spectrométrie Raman. Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation. 1999; 9(P2865):131.
57. Lau K, Hedegaard MA, Kloepper JE, et al. Visualization and characterisation of defined hair follicle compartments by Fourier transform infrared (FTIR) imaging without labelling. *J Dermatol Sci.* 2011; 63(3):191-8.
58. Zhang Q, Andrew Chan KL, Zhang G, et al. Raman microspectroscopic and dynamic vapor sorption characterization of hydration in collagen and dermal tissue. *Biopolymers.* 2011; 95(9):607-15.
59. Johnsen GK, Norlen L, Martinsen ØG, et al. Sorption properties of the human stratum corneum. *Skin Pharmacol Physiol.* 2011; 24(4):190-8.

60. Albèr C, Brandner BD, Björklund S, et al. Effects of water gradients and use of urea on skin ultrastructure evaluated by confocal Raman micro-spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1828(11):2470-8.
61. Chou TC, Lin KH, Wang SM, et al. Transepidermal water loss and skin capacitance alterations among workers in an ultra-low humidity environment. *Arch Dermatol Res.* 2005; 296(10):489-95.
62. Simpson E, Böhling A, Bielfeldt S, et al. Improvement of skin barrier function in atopic dermatitis patients with a new moisturizer containing a ceramide precursor. *J Dermatolog Treat.* 2013; 24(2):122-5.
63. Voegeli R, Rawlings AV, Doppler S, et al. Increased basal transepidermal water loss leads to elevation of some but not all stratum corneum serine proteases. *Int J Cosmet Sci.* 2008; 30(6):435-42.
64. Imhof RE, De Jesus ME, Xiao P, et al. Closed-chamber transepidermal water loss measurement: microclimate, calibration and performance. *Int J Cosmet Sci.* 2009; 31(2):97-118.
65. Krueger N, Luebberding S, Oltmer M, et al. Age-related changes in skin mechanical properties: a quantitative evaluation of 120 female subjects. *Skin Res Technol.* 2011; 17(2):141-8.
66. Longas MO, Russell CS, He XY. Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. *Carbohydr Res.* 1987; 159(1):127-36.
67. Gniadecka M, Nielsen OF, Wessel S, et al. Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *J Invest Dermatol.* 1998; 111(6):1129-33.
68. Nguyen TT, Happillon T, Féru J, et al. Raman comparison of skin dermis of different ages: focus on spectral markers of collagen hydration. *J Raman Spectrosc.* 2013; 44(9):1230-37.
69. Nakagawa N, Matsumoto M, Sakai S. In vivo measurement of the water content in the dermis by confocal Raman spectroscopy. *Skin Res Technol.* 2010; 16(2):137-41.
70. Tfayli A, Guillard E, Manfait M, et al. Raman spectroscopy: feasibility of in vivo survey of stratum corneum lipids, effect of natural aging. *Eur J Dermatol.* 2012; 22(1):36-41.

71. Boireau-Adamezyk E, Baillet-Guffroy A, Stamatas GN. Age-dependent changes in stratum corneum barrier function. *Skin Res Technol.* 2014; 20(4):409-15.
72. Kohler A, Kirschner C, Oust A, et al. Extended multiplicative signal correction as a tool for separation and characterization of physical and chemical information in Fourier transform infrared microscopy images of cryo-sections of beef loin. *Appl Spectrosc.* 2005; 59(6):707-16.
73. Kohler A, Sulé-Suso J, Sockalingum GD, et al. Estimating and correcting mie scattering in synchrotron-based microscopic Fourier transform infrared spectra by extended multiplicative signal correction. *Appl Spectrosc.* 2008; 62(3):259-66.
74. Nallala J, Lloyd GR, Stone N. Evaluation of different tissue de-paraffinization procedures for infrared spectral imaging. *Analyst.* 2015; 140(7):2369-75.
75. Kirsch JD, Drennen JK. Near-infrared spectroscopic monitoring of the film coating process. *Pharm Res.* 1996; 13(2):234-7.
76. Lasch P, Haensch W, Naumann D, et al. Imaging of colorectal adenocarcinoma using FT-IR micro-spectroscopy and cluster analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1688(2):176-86.
77. Ward Jr JH. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American statistical association.* 1963; 58(301):236-44.
78. MacQueen J. Some methods for classification and analysis of multivariate observations. *Proceedings of the fifth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability;* 1967: California, USA.
79. Ly E, Piot O, Wolthuis R, et al. Combination of FTIR spectral imaging and chemometrics for tumour detection from paraffin-embedded biopsies. *Analyst.* 2008; 133(2):197-205.
80. Travo A, Piot O, Wolthuis R, et al. IR spectral imaging of secreted mucus: a promising new tool for the histopathological recognition of human colonic adenocarcinomas. *Histopathology.* 2010; 56(7):921-31.
81. Nguyen TN, Jeannesson P, Groh A, et al. Development of a hierarchical double application of crisp cluster validity indices: a proof-of-concept study for automated FTIR spectral histology. *Analyst.* 2015; 140(7):2439-48.

82. D'Inca H, Namur J, Ghegediban SH, et al. Automated Quantification of Tumor Viability in a Rabbit Liver Tumor Model after Chemoembolization Using Infrared Imaging. *Am J Pathol.* 2015; 185(7):1877-88.
83. Steinley D. K-means clustering: a half-century synthesis. *Br J Math Stat Psychol.* 2006; 59(Pt 1):1-34.
84. Zadeh LA. Fuzzy sets. *Information and Control.* 1965; 8:338-53.
85. Dunn JC. A fuzzy relative of the ISODATA process and its use in detecting compact well-separated clusters. *J Cybernetics.* 1973; 3:32-57.
86. Bezdek JC. Pattern recognition with fuzzy objective function algorithms: Kluwer Academic Publishers; 1981.
87. Sebisveradze D, Vrabie V, Gobinet C, et al. Automation of an algorithm based on fuzzy clustering for analyzing tumoral heterogeneity in human skin carcinoma tissue sections. *Lab Invest.* 2011; 91(5):799-811
88. Gerlach RW, Kowalski BR, Wold HOA. Partial least-squares path modelling with latent variables. *Analytica Chimica Acta.* 1979;112:417-421.
89. Wold H. Systems analysis by partial least squares (PLS), Laxenburg, 1983.
90. Pedro AM, Ferreira MM. Nondestructive determination of solids and carotenoids in tomato products by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Anal Chem.* 2005; 77(8):2505-11.
91. Lecellier A, Mounier J, Gaydou V, et al. Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *Int J Food Microbiol.* 2014; 168-169:32-41.
92. Lecellier A, Gaydou V, Mounier J, et al. Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiol.* 2015; 45(Pt A):126-34.
93. Keating ME, Nawaz H, Bonnier F, et al. Multivariate statistical methodologies applied in biomedical Raman spectroscopy: assessing the validity of partial least squares regression using simulated model datasets. *Analyst.* 2015; 140(7):2482-92.

94. Stone M. Cross-validation choice and assessment of statistical predictions. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol.* 1974; 36:111–47.
95. Noda I. Two-Dimensional Infrared (2D IR) Spectroscopy: Theory and Applications. *Appl. Spectrosc.* 1990; 44:550-561.
96. Yu ZW, Noda I. On the normalization method in two-dimensional correlation spectra when concentration is used as a perturbation parameter. *Appl Spectrosc.* 2003; 57(2):164-7.
97. Jung Mee Y, Kim Bin S, Noda I. Application of two-dimensional correlation spectroscopy to chemometrics: self-modeling curve resolution analysis of spectral data sets. *Appl Spectrosc.* 2003; 57(11):1376-80.
98. Jung YM, Kim SB, Noda I. New approach to generalized two-dimensional correlation spectroscopy. II: Eigenvalue manipulation transformation (EMT) for noise suppression. *Appl Spectrosc.* 2003; 57(5):557-63.
99. Jung YM, Kim SB, Noda I. New approach to generalized two-dimensional correlation spectroscopy. III: Eigenvalue manipulation transformation (EMT) for spectral selectivity enhancement. *Appl Spectrosc.* 2003; 57(5):564-70.
100. Wu Y, Noda I. Quadrature orthogonal signal corrected two-dimensional correlation spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 2006; 60(6):605-10.
101. Shinzawa H, Morita SI, Awa K, et al. Multiple perturbation two-dimensional correlation analysis of cellulose by attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 2009; 63(5):501-6.
102. Chen J, Zhou Q, Noda I, et al. Quantitative classification of two-dimensional correlation spectra. *Appl Spectrosc.* 2009; 63(8):920-5.
103. Popescu MC, Vasile C, Craciunescu O. Structural analysis of some soluble elastins by means of FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. *Biopolymers.* 2010; 93(12):1072-84.
104. Tian Z, Wu K, Liu W, et al. Two-dimensional infrared spectroscopic study on the thermally induced structural changes of glutaraldehyde-crosslinked collagen. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015; 140:356-63.

105. Smirnova D, Application of two-dimensional correlation analysis to explosives detection and polymer crystallization, 304 pages, Th.: Biophysics: Pasadena: 2009
106. Chapman GE, Danyluk SS, McLauchlan KA. A model for collagen hydration. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1971; 178(1053):465-76.
107. Leikin S, Parsegian VA, Yang W, et al. Raman spectral evidence for hydration forces between collagen triple helices. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(21):11312-7.
108. Jastrzebska M, Wrzalik R, Kocot A, et al. Raman spectroscopic study of glutaraldehyde-stabilized collagen and pericardium tissue. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2003; 14(2):185-97.
109. Unal M, Yang S, Akkus O. Molecular spectroscopic identification of the water compartments in bone. *Bone.* 2014; 67:228-36.
110. Hill CAS, Norton A, Newman G. The water vapor sorption behaviour of natural fibers. *J Appl Pol Sci.* 2009; 112(3):1524-37.
111. Sun Q, The Raman OH stretching bands of liquid water. *Vibrational Spectroscopy.* 2009; 51:213-217.
112. Vyumvuhore R, Tfayli A, Duplan H, et al. Effects of atmospheric relative humidity on Stratum Corneum structure at the molecular level: ex vivo Raman spectroscopy analysis. *Analyst.* 2013;138(14):4103-11.
113. Roskos KV, Guy RH. Assessment of skin barrier function using transepidermal water loss: effect of age. *Pharm Res.* 1989; 6(11):949-53.
114. Elias PM, Choi EH. Interactions among stratum corneum defensive functions. *Exp Dermatol.* 2005; 14(10):719-26.
115. Cordella CBY, Bertrand D. SAISIR: A new general chemometric toolbox. *Trends in Anal Chem.* 2014; 54:75-82.
116. Wilhelm KP, Cua AB, Maibach HI. Skin aging. Effect on transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and casual sebum content. *Arch Dermatol.* 1991; 127(12):1806-9.

117. Cua AB, Wilhelm KP, Maibach HI. Frictional properties of human skin: relation to age, sex and anatomical region, stratum corneum hydration and transepidermal water loss. *Br J Dermatol.* 1990; 123(4):473-9.
118. Caspers PJ, Lucassen GW, Carter EA, et al. In vivo confocal Raman micro-spectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol.* 2001; 116(3):434-42.
119. Egawa M, Hirao T, Takahashi M. In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles obtained with Raman spectroscopy. *Acta Derm Venereol.* 2007; 87(1):4-8.
120. van Logtestijn MD, Domínguez-Hüttinger E, Stamatas GN, et al. Resistance to water diffusion in the stratum corneum is depth-dependent. *PLoS One.* 2015; 10(2):e0117292.
121. Tessier FJ. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol Biol (Paris).* 2010; 58(3):214-9.
122. Paul RG, Bailey AJ. Glycation of collagen: the basis of its central role in the late complications of ageing and diabetes. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996; 28(12):1297-310.
123. Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2000; 275(50):39027-31.
124. Jaission S, Gillary P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin Chem.* 2010; 56(9):1401-12.
125. Guilbert M, Approche multimodale par biophotonique pour l'étude des modifications du collagène de type I au cours du vieillissement, Th. : Biologie-Biophysique : Reims : 2012
126. Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem.* 1986; 261(11):4889-94.
127. Crisan M, Taulescu M, Crisan D, et al. Expression of advanced glycation end-products on sun-exposed and non-exposed cutaneous sites during the ageing process in humans. *PLoS One.* 2013; 8(10):e75003.
128. Pageon H, Zucchi H, Rousset F, et al. Skin aging by glycation: lessons from the reconstructed skin model. *Clin Chem Lab Med.* 2014; 52(1):169-74.

129. Pennacchi PC, de Almeida ME, Gomes OL, et al. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. *Tissue Eng Part A*. 2015; 21(17-18):2417-25.
130. Avery NC, Bailey AJ. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol Biol (Paris)*. 2006; 54(7):387-95.
131. Breyer V, Intracellular glycation of nuclear DNA, mitochondrial DNA, and cytosolic proteins triggered by endogenous oxidative stress, Th. : Biology: Dachau : 2011
132. Wu S, Li H, Yang H, et al. Quantitative analysis on collagen morphology in aging skin based on multiphoton microscopy. *J Biomed Opt*. 2011; 16(4):040502.
133. Morita K, Urabe K, Moroi Y, et al. Migration of keratinocytes is impaired on glycated collagen I. *Wound Repair Regen*. 2005; 13(1):93-101.
134. Francis-Sedlak ME, Uriel S, Larson JC, et al. Characterization of type I collagen gels modified by glycation. *Biomaterials*. 2009; 30(9):1851-6.
135. Bucala R, Model P, Cerami A. Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984; 81(1):105-9.
136. Dutta U, Cohenford MA, Dain JA. Nonenzymatic glycation of DNA nucleosides with reducing sugars. *Anal Biochem*. 2005; 345(2):171-80.
137. Seidel W, Pischetsrieder M. Immunochemical detection of N2-[1-(1-carboxyethyl]guanosine, an advanced glycation end product formed by the reaction of DNA and reducing sugars or L-ascorbic acid in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1998a; 1425(3):478-84.
138. Seidel W, Pischetsrieder M. DNA-glycation leads to depurination by the loss of N2-carboxyethylguanine in vitro. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1998b; 44(7):1165-70.
139. Schneider M, Thoss G, Hübner-Parajsz C, et al. Determination of glycated nucleobases in human urine by a new monoclonal antibody specific for N2-carboxyethyl-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol*. 2004; 17(10):1385-90.

140. Schneider M, Georgescu A, Bidmon C, et al. Detection of DNA-bound advanced glycation end-products by immunoaffinity chromatography coupled to HPLC-diode array detection. *Mol Nutr Food Res.* 2006; 50(4-5):424-9.
141. Li H, Nakamura S, Miyazaki S, et al. N2-carboxyethyl-2'-deoxyguanosine, a DNA glycation marker, in kidneys and aortas of diabetic and uremic patients. *Kidney Int.* 2006; 69(2):388-92.
142. Galvis L, Dunlop JW, Duda G, et al. Polarized Raman anisotropic response of collagen in tendon: towards 3D orientation mapping of collagen in tissues. *PLoS One.* 2013; 8(5):e63518.
143. Daniel A, Prakasara A, Dornadula K, et al. Polarized Raman spectroscopy unravels the biomolecular structural changes in cervical cancer. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015; 152:58-63.
144. Boone M, Jemec GB, Del Marmol V. High-definition optical coherence tomography enables visualization of individual cells in healthy skin: comparison to reflectance confocal microscopy. *Exp Dermatol.* 2012; 21(10):740-4.
145. Boone MA, Norrenberg S, Jemec GB, et al. High-definition optical coherence tomography imaging of melanocytic lesions: a pilot study. *Arch DermatolRes.* 2014; 306(1):11-26.
146. Boone MA, Suppa M, Marneffe A, et al. High-definition optical coherence tomography intrinsic skin ageing assessment in women: a pilot study. *Arch Dermatol Res.* 2015; 307(8):705-20.
147. Boone M, Draye JP, Verween G, et al. Real-time three-dimensional imaging of epidermal splitting and removal by high-definition optical coherence tomography. *Exp Dermatol.* 2014; 23(10):725-30.
148. Roig B, Koenig A, Perraut F, et al., Biophotonics of skin: method for correction of deep Raman spectra distorted by elastic scattering, *Proceedings of SPIE* Vol. 9318, 93180L (2015).
149. Koenig A, Roig B, Le Digabel J, et al., Accessing deep optical properties of skin using diffuse reflectance spectroscopy, *Proceedings of SPIE* Vol. 9537, 95370E (2015).

150. González FJ, Martínez-Escanamé M, Muñoz RI, et al. Diffuse reflectance spectrophotometry for skin phototype determination. *Skin Res Technol.* 2010; 16(4):397-400.
151. Tseng SH, Hsu CK, Yu-Yun Lee J, et al. Noninvasive evaluation of collagen and hemoglobin contents and scattering property of in vivo keloid scars and normal skin using diffuse reflectance spectroscopy: pilot study. *J Biomed Opt.* 2012; 17(7):077005.
152. Bell A, Kofron M, Nistor V. Multiphoton crosslinking for biocompatible 3D printing of type I collagen. *Biofabrication.* 2015; 7(3):035007.

## Productions scientifiques

### *Publications internationales*

- ❖ **In vivo confocal Raman micro-spectroscopy of the human skin: highlighting of spectral markers associated to aging via a research of correlation between Raman and biometric mechanical measurements.**  
Eklouh-Molinier C, Gaydou V, Froigneux E, Barlier P, Couturaud V, Manfait M, Piot O.  
*Analytical Bioanalytical Chemistry* 2015; 407(27):8363-72.
- ❖ **Investigating the relationship between changes in collagen fiber orientation during skin aging and collagen/water interactions by polarized-FTIR micro-imaging.**  
Eklouh-Molinier C, Happillon T, Bouland N, Fichel C, Diébold M-D, Angiboust J-F, Manfait M, Brassart-Pasco, Piot O.  
*Analyst* 2015; 140(18): 6260-6268.
- ❖ **Probing *in vitro* ribose induced DNA-glycation using Raman micro-spectroscopy.**  
Chandra GK\*, Eklouh-Molinier C\*, Fére M, Angiboust J-F, Gobinet C, Van Gulick L, Jeannesson P, Piot O.  
*Analytical Chemistry* 2015; 87(5): 2655-2664.
- ❖ **Interest of polarized FT-IR imaging to characterize the collagen network in human skin.**  
Eklouh-Molinier C, Nguyen TT, Sebiskveradze D, Féru J, Bouland N, Terryn C, Manfait M, Brassard-Pasco S, Piot O.  
*Biomedical Spectroscopy and Imaging* 2014 ; 3(3): 281-286.
- ❖ **Probing single-tumor cell interactions with different-age type I collagen networks by synchrotron-based Fourier transform infrared micro-spectroscopy.**  
Guilbert M\*, Eklouh-Molinier C\*, Wehbe K, Sulé-Suso J, Yang Y, Cinque G, Jeannesson P, Sockalingum GD.  
*J Biomed Opt* 2014, 19(11): 111612.
- ❖ **Changes of skin collagen orientation associated with chronological aging as probed by polarized-FTIR micro-imaging.**  
Nguyen TT\*, Eklouh-Molinier C\*, Sebiskveradze D, Féru J, Terryn C, Manfait M, Brassart-Pasco S, Piot O.  
*Analyst* 2014; 139(10): 2482-2488.

## *Communications orales*

- ❖ **Highlighting of age-related changes of collagen-bound water in dermal tissue by using Raman micro-spectroscopy and dynamic vapor sorption.**  
Eklouh-Molinier C, Pernes M, Essendoubi M, Manfait M, Beaugrand J, Piot O.  
ECSBM, 6 au 10 Septembre 2015, Bochum, Allemagne.
- ❖ **Intérêt de l'imagerie IR-TF en mode polarisé pour la mise en évidence de modifications structurales du réseau de collagène associées au vieillissement cutané.**  
Eklouh-Molinier C, Happillon T, Bouland N, Fichel C, Manfait M, Brassart-Pasco S, Piot O.  
GFSV, 17 au 19 juin 2015, Reims, France.
- ❖ **Mise en évidence de marqueurs spectroscopiques sensibles aux mesures biométriques au cours du vieillissement cutané au moyen d'une micro-sonde confocale Raman.**  
Eklouh-Molinier C, Fére M, Gaydou V, Essendoubi M, Froigneux E, Ruelens C, Barlier P, Couturaud V, Manfait M, Piot O.  
JJC, 20 mars 2015, Reims, France.
- ❖ **Corrélation entre les mesures Raman et biométriques au cours du vieillissement cutané par micro-spectroscopie confocale Raman.**  
Eklouh-Molinier C, Fére M, Gaydou V, Essendoubi M, Froigneux E, Ruelens C, Barlier P, Couturaud V, Manfait M, Piot O.  
SF2IC, 29 au 30 janvier 2015, Lyon, France.
- ❖ ***In vivo investigation of skin aging by using a remote confocal Raman probe.***  
Eklouh-Molinier C, Fére M, Essendoubi M, Manfait M, Froigneux E, Piot O.  
ICORS, 10 au 15 janvier 2014, Jena, Allemagne.
- ❖ **Intérêt de l'imagerie IR-TF en mode polarisé pour la caractérisation du réseau de collagène dans la peau humaine.**  
Eklouh-Molinier C, Nguyen TT, Sebisveradze D, Féru J, Terryn C, Manfait M, Brassart-Pasco S, Piot O.  
OptDiag, 14 au 16 mai 2014, Paris, France.

## *Communications affichées*

- ❖ **Interest of polarized-FTIR imaging to highlight structural modifications of collagen network associated with skin aging.**  
Eklouh-Molinier C, Nguyen TT, Sebiskveradze D, Féru J, Terryn C, Manfait M, Brassart-Pasco S, Piot O.  
SPEC, 17 au 22 août 2014, Cracovie, Pologne.
- ❖ **Synchrotron-based FTIR micro-spectroscopy of single-tumor cells grown on different-age type I collagen networks.**  
Guilbert M, Eklouh-Molinier C, Wehbe K, Sulé-Suso J, Yang Y, Cinque G, Jeannesson P, Sockalingum GD.  
SPEC, 17 au 22 août 2014, Cracovie, Pologne.
- ❖ **Probing the impact of aging on type I collagen organization in rat tail tendon using polarized FT-IR imaging.**  
Eklouh-Molinier C, Guilbert M, Wehbe K, Gobinet C, Cinque G, Jeannesson P, Sockalingum GD.  
Synchrotron Radiation User Meeting, 4 au 5 Septembre 2013, Didcot, Angleterre.
- ❖ **Interest of polarized FT-IR imaging to characterize the collagen network in human skin.**  
Eklouh-Molinier C, Nguyen TT, Sebiskveradze D, Féru J, Terryn C, Manfait M, Brassart-Pasco S, Piot O.  
ECSBM, 25 au 30 août 2013, Oxford, Angleterre.
- ❖ **Approach by multimodal vibrational imaging of the interactions between single-tumor cells and different-age type I collagen networks.**  
Eklouh-Molinier C, Guilbert M, Frédéric J, Dumas P, Jeannesson P, Sockalingum GD.  
OptDiag, 9 au 11 Mai 2012, Paris, France.

---

## **RESUME en français**

La peau assure la protection de l'organisme contre les agressions extérieures. Pourtant, la peau n'est pas à l'abri des effets inéluctables du vieillissement chronologique. En effet, ce processus a pour conséquence d'altérer la structure des différentes couches cutanées au point d'en affecter leurs caractéristiques fonctionnelles. Ce travail de thèse a pour but de caractériser les modifications moléculaires et structurales de la peau au cours du vieillissement chronologique à l'aide de méthodes non-invasives que sont les spectroscopies optiques vibrationnelles. Ainsi avons-nous pu mettre en évidence des altérations structurales du réseau de collagène dans des échantillons de peaux d'âges différents à l'aide d'une approche basée sur l'imagerie IR-TF (Infrarouge à Transformée de Fourier) en mode polarisé. Par la suite, nous avons démontré l'influence des molécules d'eau sur les changements d'orientation des fibres de collagène avec l'âge en adoptant une méthodologie basée sur la substitution, thermodynamiquement favorable, des molécules d'eau liée au collagène ( $H_2O$ ) par des molécules d'eau deutérée ( $D_2O$ ). Lors d'études réalisées *in vivo*, nous avons établi des corrélations entre les propriétés physiques (mécanique et statut d'hydratation) et les informations moléculaires du *stratum corneum* (SC) en traitant les données Raman et biométriques par la méthode des moindres carrés partiels (PLS). En s'appuyant sur la complémentarité des techniques biophysiques employées, ces différentes études ont permis d'illustrer le potentiel des spectroscopies vibrationnelles pour évaluer le vieillissement cutané et en déterminer certaines bases moléculaires.

---

## **TITRE en anglais**

Molecular and structural characterization of the skin aging by the means of the infrared micro-imaging and Raman micro-spectroscopy.

---

## **RESUME en anglais**

The skin protects the body against external aggressions. However, the skin is not immune to the inevitable effects of the chronological aging. Indeed, this process leads to several structural alterations of the different cutaneous layers to the point of affecting their functional characteristics. This thesis work aims to assess the molecular and structural changes of the skin during chronological aging by using non-invasive methods such as optical vibrational spectroscopies. To do this, we highlighted the structural modifications of the collagen network in different-aged skin samples by using an approach based on FT-IR imaging (Fourier Transform Infrared) in polarized mode. Subsequently, we demonstrated the influence of water molecules on the changes of collagen fibers with age by adopting a methodology based on the substitution, thermodynamically favorable, of the collagen-bound water molecules ( $H_2O$ ) by deuterated water molecules ( $D_2O$ ). In *in vivo* studies, we have established correlations between physical and molecular properties of the *stratum corneum* (SC) by analyzing the Raman and biometric measurements with the Partial Least Squares (PLS) processing. Based on the complementarity of the biophysical techniques employed, these studies permitted to evaluate the impact of the chronological aging on the skin and could open some interesting prospects in both cosmetology and dermatology.

---

## **DISCIPLINE**

Physique, spécialité Biologie-Biophysique

---

## **MOTS-CLES**

Vieillissement cutané, micro-imagerie infrarouge en mode polarisé, micro-spectroscopie confocale Raman, réseau de collagène dermique, échange  $H_2O/D_2O$ , *stratum corneum*, propriétés biométriques mécaniques.

## **KEYWORDS**

Skin aging, infrared micro-imaging in polarized mode, confocal Raman micro-spectroscopy, dermal collagen network,  $H_2O/D_2O$  exchange, *stratum corneum*, biometric mechanical properties.

---

## **INTITULE ET ADRESSE DE L'UNITE DE RECHERCHE**

MÉDIAN-Biophotonique et Technologies pour la Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR CNRS 7369 MEDyC, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 REIMS Cedex, France.