



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par :

Pauline LARROQUE-CARDOSO

Le 23 septembre 2014

ROLE ET PREVENTION DU « STRESS CARBONYLE » AU COURS DU VIEILLISSEMENT DE LA PEAU

Ecole doctorale

Biologie, santé et biotechnologies : Spécialité Innovation pharmacologique

Unité de recherche

Inserm/UPS UMR 1048 I2MC

Directrice de thèse

Dr Anne Nègre-Salvayre – Université Paul Sabatier, Toulouse

Jury

Pr Josiane Cillard - Université de Rennes - Président

Pr François Xavier Maquart - Université de Reims - Rapporteur

Dr Mustapha Rouis - Université Pierre et Marie Curie, Paris - Rapporteur

Pr Robert Salvayre - Université Paul Sabatier, Toulouse - Invité

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement Anne Nègre Salvayre. Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail, d'avoir eu confiance en moi en me laissant une grande liberté dans la pratique de mon travail de recherche, tout en prenant le temps de me guider, de répondre à mes questions, me booster quand cela était nécessaire. J'ai beaucoup apprécié toutes nos discussions que ce soit comprendre les résultats et y trouver des interprétations scientifiques rigoureuses, mais aussi toutes les autres. Je garde aussi de très bons souvenirs de ces congrès à Londres, Paris et Zagreb. Je vous remercie pour vos conseils, vos encouragements, votre soutien, et finalement votre amitié tout au long de ces belles années de thèse.

Je remercie aussi Robert Salvayre. Merci d'avoir toujours eu du temps à me consacrer pour mes questions, merci pour vos remarques pertinentes qui m'ont beaucoup fait avancer, et pour votre soutien tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier Mme Josiane Cillard, Mr François Xavier Maquart, Mr Mustapha Rouis pour l'intérêt porté à mon manuscrit et pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Vos remarques et vos critiques ont permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit.

Un grand merci à Cécile Vindis. Je te remercie très chaleureusement pour ton amitié, ton soutien et ton apport scientifique. C'est grâce à toi que je suis entrée dans la cours des grands, que j'ai découvert la rigueur scientifique, l'amour de la recherche bien faite. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir conseillée, soutenue et critiquée dans mon travail, mais aussi pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble depuis que nous nous connaissons (et d'avoir prêté tant de jolies choses pour Lou !).

Merci à toute l'équipe 10 pour ces belles années passées à vos côtés ! Nathalie, Sandra Marie-Hélène, Corinne, Christophe, Nassera, Nancy, Myriam, Françoise, Audrey, Julien, vous m'avez beaucoup apporté que ce soit pour la manips, les conseils, et les bons moments passés au café, les discussions et autres anecdotes récréatives !

Merci à tous les étudiants de cette équipe (Christel, Caroline, Sylvain, Sandra, Cécile, Samuel, Carole, Raphael...) des autres équipes (Romain, Céline). C'est grâce à vous que ces années se sont passées dans une bonne ambiance, il était bon de savoir que l'on pouvait à tout moment se retrouver, demander des conseils, prendre des pauses goûter,

avoir des discussions fructueuses ou non, râler sur les manips qui ne marchent pas ou au contraire s'extasier devant des Western Blot magnifiques et des test de student significatifs ! Que les années à venir vous apportent toute la réussite possible dans tous les aspects de vos vies.

Et bien sur Elodie, Magali, Daniela, je vous remercie pour votre amitié ! Merci pour tous les bons moments passés ensemble que ce soit pendant le master, la thèse et après. Vous avez été à mes cotés pour les grands moments. Votre soutien, votre écoute pour mes projets les plus fous m'ont beaucoup apporté. Pourvu que cela dure encore et encore ! Vous comptez énormément pour moi. J'espère que nous trouverons toujours le temps de nous retrouver malgré la distance qui nous sépare, même si vous le savez je suis nulle en communication !!

Chloé, évidemment, je ne t'oublie pas ! Nous ne partions pas sur de bonnes bases et pourtant en dépit de tout nous voilà amies et encore après nos thèses ! Tu as été une de mes plus belles surprises pendant ces quelques années à l'I2MC. Entre les régimes trouvés dans les pages de magazines, les listes d'achat chez Ikéa, le comité des étudiants, les pauses repas chez H&M, nos projets les plus fous (quelques uns réalisés depuis), les pauses thés, les brunchs nous avons vu grandir une belle et folle amitié... Tu es quelqu'un de merveilleux, saches que tu pourras toujours compter sur moi.

Enfin merci à mes parents, Hélène et Bernard sans vous je ne serai évidemment pas là ! Mais merci bien sur à Marie-jo et François aussi. Je suis ce que je suis grâce à vous tous, chacun m'ayant apporté pour devenir l'adulte accomplie que je suis aujourd'hui. Il en a fallu du temps mais votre soutien et votre accompagnement, votre amour et votre confiance tout au long de ces années d'études m'ont permis d'aller au bout des choses ! Je vous aime.

Je tiens à remercier enfin le reste de ma famille :Bon Papa, Bonne Maman, Mamie, Tonton, Tatie, Nadège, Clément, Marine, Antoine, la famille Moutarde, mes amis de toujours Anaïs, Thomas, et Laura, Julie, SophieP. et Sophie G., Perrine, Angélique et Jérôme mais aussi tous les « nouveaux » Marie, Hugues, Vincent, Aurore, Mélissa. Vous restez pour toujours mes ancrages. Vous avez beaucoup ri de la longueur de mes études, et bien ce n'est pas fini !

Et merci à la famille Cardoso. Carlos et Fanny bien sur, merci de m'avoir ouvert les bras pour m'accueillir au sein de votre famille mais aussi Candida, Joaquim et Geoffrey.

Et enfin Mickael. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu es et ce que tu as fait pour moi depuis que l'on se connaît. Merci pour ton amour, ta patience, ta gentillesse, ton attention, ta compréhension, merci de me supporter depuis presque toujours et de continuer à croire en moi, si fort et sans jamais douter. Merci pour tous tes encouragements, ta confiance, ton soutien et ton aide.

Et merci de m'avoir fait ce magnifique cadeau qu'est Lou. Ma douce petite fille tu m'apportes tellement de joie et de bonheur ! Beaucoup disent que tu me ressembles, alors je te souhaite de te sentir aussi bien entourée que moi et d'aller au bout de tes rêves, je ferai tout pour que tu y arrives! Je vous aime.

Résumé

Le vieillissement est un phénomène naturel, lent et complexe, caractérisé par une perte progressive des fonctions physiologiques et des capacités physiques et mentales des êtres vivants, en particulier chez l'homme. Le vieillissement est au cœur des préoccupations de chaque société, de par ses conséquences biologiques, psychologiques et sociétales.

Une meilleure connaissance des processus physiologiques impliqués dans le vieillissement permettrait de mettre en place des approches thérapeutiques permettant de ralentir l'apparition de certains effets du vieillissement.

Sur un plan biologique, le stress oxydant joue un rôle important dans les mécanismes impliqués dans le vieillissement tissulaire et cellulaire. Parmi les conséquences du stress oxydant, la peroxydation des acides gras polyinsaturés génère des produits d'oxydation lipidique, de type aldéhyde, qui s'accumulent dans les tissus âgés et photoexposés. Ces aldéhydes forment des adduits sur les protéines tissulaires, ce qui entraîne une perte progressive de leur propriétés (stress carbonyle). L'implication du stress carbonyle dans le mécanisme du vieillissement tissulaire n'est pas clarifiée, mais pourrait participer aux processus de dégénérescence.

Notre travail de thèse a été axé sur l'implication du stress carbonyle dans le mécanisme du vieillissement physiologique et du photovieillissement de la peau.

Dans la première partie de ce travail nous montrons que l'exposition chronique de souris hairless à des UVA (modèle animal de vieillissement cutané accéléré), s'accompagne d'une accumulation de matériel élastotique (élastine anormale), en partie modifié par les aldéhydes (4-hydroxynonénal ou 4-HNE, acroléine). Le taux de ces aldéhydes, normalement très peu présents dans la peau non exposée, est fortement augmenté après exposition aux UVA. L'application chronique d'un piègeur de carbonyle, la L-carnosine, utilisée à 1% dans du propylène-glycol, permet de réverser l'accumulation des aldéhydes et de restaurer un matériel élastique normal dans les peaux. Nous avons mis en évidence que l'élastine soluble ou insoluble modifiée *in vitro* par l'acroléine n'est progressivement plus dégradée par l'élastase, ce qui peut contribuer à l'accumulation de matériel élastotique dans le derme. La carnosine permet de réverser *in vitro* et *in vivo* la modification de l'élastine par l'acroléine. Ces résultats nous permettent de confirmer le rôle important des produits de peroxydation lipidique dans le photovieillissement.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous étudions l'impact du stress carbonyle sur la signalisation du TGF- β dans le cadre du vieillissement chronologique. Nous avons montré, que le vieillissement chronologique conduit à une augmentation de 4-HNE, dans la peau et les artères. Cet aldéhyde altère le renouvellement d'élastine induite par le TGF- β , en modifiant et activant la voie EGFR /ERK/TGIF.

Enfin des résultats précédemment publiés par le laboratoire ainsi que d'autres expérimentations nous ont permis de montrer que le 4-HNE, inhibe la prolifération des fibroblastes, les cellules responsables de la synthèse de matrice extracellulaire.

L'ensemble de nos résultats nous permet de dire que le vieillissement physiologique et le photovieillissement s'accompagnent de la génération de produits de peroxydation lipidique. Ces aldéhydes agissent sur la matrice extracellulaire en inhibant d'une part la prolifération des fibroblastes, en formant des adduits sur l'élastine empêchant ainsi sa dégradation et favorisant son accumulation sous forme fragmentée, et en inhibant son renouvellement par l'activation de la voie EGFR/ERK/TGIF. L'ensemble de ces mécanismes conduit à une perte de fonction progressive de l'élastine participant aux effets classiquement observés au cours du vieillissement.

Abstract

Aging is a complex and multifactorial process characterized by physical, psychological, and social changes. The place of aging in all human societies is very important because it reflects the biological, cultural and societal conventions as well, while it is also the largest known risk factor for most human diseases. The aging process is characterized by a progressive loss of biological functions and abilities to manage metabolic, functional and esthetic changes. These changes may result from both intrinsic genetically programmed processes and from environmental factors. Among these extrinsic factors involved in aging, the continuous exposure to ultraviolet solar radiations generates the characteristic modifications of the skin, also called photoaging. Because of the general importance of aging, it is important to investigate and understand the physiological mechanisms involved in this natural process, in order to develop new approaches allowing to slow down the onset of some aging's effects.

Oxidative stress plays an important role in the mechanisms involved in cellular and tissular aging. Among the consequences of oxidative stress, lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids generates lipid oxidation products, aldehydes, which accumulate in aged and photoexposed tissues. These aldehydes form adducts on proteins, which causes a progressive loss of their properties (carbonyl stress). The involvement of carbonyl stress in aging is not well clarified, but could contribute to the process of cell degeneration. This thesis is focused on the role of carbonyl stress in some aspects of physiological and skin photoaging.

In the first part of this work we show that the chronic exposure of hairless mice to UVA radiations, generates an accumulation of elastotic material (abnormal elastin), partly modified by aldehydes (4-hydroxynonenal, acrolein). The presence of these aldehydes, in the unexposed skin is usually low, but it is greatly increased upon exposure to UVA. We show that elastin modified *in vitro* by acrolein becomes progressively resistant to leukocyte elastase, which could contribute to the accumulation of elastotic material in the dermis. A daily topical application of a carbonyl scavenger, L-carnosine, used at 1% in propylene glycol, protects against the accumulation of aldehydes on elastin, and restores a normal elastic material in skins. We show that L-carnosine also reverses *in vitro* the modification of elastin by acrolein. These results highlight a role for aldehydes in photoaging.

In the second part of this work, we show that carbonyl stress (4-HNE) exerts an inhibitory effect on the elastogenic activity of TGF- β signaling, leading to tropoelastin synthesis. This effect involves the formation of 4-HNE adducts on the EGF receptor (EGFR) which, once activated, stimulates the EGFR/ERK/TGIF signaling which inhibits the TGF- β -induced expression of tropoelastin messengers. That chronological aging in C57/BL6 mice, is correlated with a strong increase in 4-HNE adducts formation in vessels and in unexposed skin, as well as an overexpression and increased modification of EGFR by 4-HNE. Furthermore, we show that 4-HNE inhibits the proliferation of fibroblasts, which secrete the extracellular matrix in the dermis, *via* a modification of both EGFR and the PDGF receptor.

All these results indicate that lipid peroxidation products are generated during physiological aging and are strongly increased during photoaging. These aldehydes alter the composition of the extracellular matrix in the skin i/ by inhibiting the proliferation of fibroblasts, ii/by forming adducts on elastin, thereby preventing its degradation by elastase, that contributes to the accumulation of elastotic material, and iii/ by inhibiting elastin renewal *via* the activation of the EGFR/ERK/TGIF pathway, which inhibits TGF- β signaling. All of these effects may contribute to the progressive loss of elastin properties, a key-event in the process of aging.

Sommaire

SOMMAIRE	1
ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	7
PARTIE 1 : REVUE GENERALE	9
I. INTRODUCTION	11
II. TISSU CONJONCTIF	12
1) Cellules	12
2) Matrice extra cellulaire	13
a - Protéoglycanes et glycoprotéines de structure	14
b - Collagènes	15
• Composition	15
• Cellules productrices	16
• Synthèse	17
• Différents types de collagènes	20
• Cytokines pro- et anti-fibrosantes	21
• Répartition des différentes formes de collagènes en fonction des tissus	22
c - Élastine	24
• Cellules productrices	24
• Synthèse	24
• Cytokines élastogènes	29
• Cytokines anti élastogènes	30
• Répartition /tissus	31
III. VIEILLISSEMENT DU TISSU CONJONCTIF ET MEC	33
1) Différents types de vieillissement	33
a - Chronologique	33
• Vieillessement intrinsèque cutané	33
• Vieillessement intrinsèque vasculaire	35
b - Photovieillessement	38
2) Mécanismes du vieillissement de la matrice extracellulaire	40
a - Génétique	40
b - Formation des cross-links - Glycation	41
c - Signalisations impliquées dans le processus du vieillissement	42

d - Stress oxydant et stress carbonyle	43
IV. STRESS CARBONYLE ET VIEILLISSEMENT	47
1) Définition et génération	47
2) Peroxydation lipidique	47
• MDA.....	49
• Les 4 hydroxyalkenals.....	49
• Acroléine.....	50
3) Formation des adduits.....	50
4) Rôle des adduits (signalisation et conséquences en physiopathologie).....	52
5) Implication dans le vieillissement.....	55
PARTIE 2 : OBJECTIFS DE THESE	57
PARTIE 3 : MATERIELS ET METHODES	61
I. CULTURE CELLULAIRE.....	63
• Types cellulaires	63
• Transfection des siRNA.....	63
II. TEST DE VIABILITE CELLULAIRE	63
• Test d'incorporation du MTT	63
• SYTO13 / Iodure de propidium (IP).....	64
III. MESURE D'INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE	64
IV. RT-PCR QUANTITATIVE.....	64
V. MESURE DE L'A-ELASTINE.....	65
VI. ELISA 4-HNE.....	65
VII. TBARS (THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES).....	66
VIII. DETERMINATION DES ERO INTRACELLULAIRES.....	66
IX. WESTERN BLOT ET DOT BLOT	67
• Extraction et dosage des protéines cellulaires	67
• SDS-PAGE et Western Blot (WB).....	67
• Dot Blot.....	67
X. IMMUNOFLUORESCENCE SUR CELLULES.....	68
XI. IMMUNOHISTOCHEMIE ET FLUORESCENCE	68
• Immunofluorescence (co-marquages).....	68
• Immunohistochimie.....	68
XII. ELASTINE-ORCEINE	69
XIII. ANIMAUX.....	69

• Souris Hairless.....	69
• Souris C57/bl6.....	69
XIV. ANALYSES STATISTIQUES	70
PARTIE 4 : RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	75
I. ROLE DU 4-HNE INDUIT PAR LES UVA DANS LE PHOTOVIEILLISSEMENT.....	77
1) Introduction.....	77
2) Publication.....	79
3) Conclusion.....	102
II. EFFET ANTI-ELASTOGENE DU 4-HNE	105
1) Introduction.....	105
2) Publication.....	108
3) Conclusion - Discussion.....	121
PARTIE 5 : CONCLUSION ET DISCUSSION.....	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	131
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	147
COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES.....	149

Abréviations

4-HNE : 4-hydroxynonenal
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
ADNc : ADN complémentaire
AGE : Advanced glycation end-products
AGPI : Acides gras polyinsaturés
ALE : Advanced lipid end-products
AP-1 : Activator protein 1
ARN : Acide Ribo-Nucléique
ARNm : ARN messenger
bFGF : Basic fibroblast growth factor
CAT : Catalase
DEJ : Jonction dermo-épidermique
EBP : Elastin binding protein
EGF : Facteur de croissance épidermique (Epithelial Growth Factor)
EGFR : EGF récepteur
Erk : Extracellular signal-regulated kinase
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
FGF : Facteur de croissance fibroblastique (Fibroblast Growth Factor)
GAG : Glycosaminoglycanes
GSH : Glutathion
HB-EGF : Heparin binding EGF like growth factor
HBSS : Hank's balanced salt solution
IGF-1 : Insulin growth factor 1
IL : Interleukine
JNK : c-Jun N-terminal kinases
LAP : Latency associated peptide
LPO : Lipid peroxydation products
LTBP : Latent TGF- β binding protein
kDa / kD : Kilo Daltons
MAGP : Microfibrils associated glycoproteins
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MDA : Malondialdéhyde
MEC : Matrice extracellulaire
MEK : MAPK-ERK kinase
miRNA : Micro ARN
MMP : Métalloprotéases matricielles
NAC : N-acetyl L-cysteine
NF- κ B : Nuclear factor- κ B
pb : Paire(s) de bases
PBS : Phosphate buffered saline
PDGFR : Platelet derived growth factor recepteur
PDI : Protein disulfide isomerase

PG : Protéoglycanes
PKC : Protéine kinase C
RE : Réticulum endoplasmique
RT : Reverse Transcription
RTK : Récepteurs à tyrosines kinases
SDS : Dodécylsulfate de sodium
siARN : Small interfering ARN
SOD : Super oxyde dismutase
SVF : Sérum de veau foetal
TGF : Transforming Growth Factor
TGIF : TG-interacting factor
TNF : Tumor necrosis factor
UPR : Unffolded protein response
UV : Rayons ultra-violets
UV-A : Rayons ultra-violets A

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

- Figure 1 : Représentation schématique d'un protéoglycane (PG).
- Figure 2 : Triple Hélice du collagène : assemblage des trois chaînes α
- Figure 3 : Représentation schématique de la synthèse d'une molécule de collagène
- Figure 4 : Structure moléculaire d'un collagène fibrillaire
- Figure 5 : Formation des fibres de collagène
- Figure 6 : Structure du collagène de type IV
- Figure 7 : Structure de la tropoélastine humaine
- Figure 8 : Schéma récapitulatif de synthèse et de dépôt d'élastine
- Figure 9 : Structure et voie de synthèse des desmosines et isodesmosines
- Figure 10 : Représentation de la tropoélastine imaginée en fonction des connaissances récentes
- Figure 11 : Cascades de signalisation influençant l'élastogénèse
- Figure 12 : Marquage van Gieson de l'élastine dans des vaisseaux humains
- Figure 13 : Immunomarquage de l'élastine dans la peau humaine adulte
- Figure 14 : Marquage Verhoeff des fibres élastiques dans des poumons humains adultes
- Figure 15 : Composants cellulaires et extracellulaires de la peau humaine jeune.
- Figure 16 : Remodelage intra et extracellulaire au cours du vieillissement chronologique de la peau
- Figure 17 : Structure de la paroi vasculaire saine
- Figure 18 : Schéma de la modification artérielle au cours du vieillissement
- Figure 19 : Classification macroscopique des anévrismes.
- Figure 20 : remodelage intra et extracellulaire au cours du photovieillissement de la peau
- Figure 21 : Principaux produits de glycation (AGEs).
- Figure 22 : Mécanismes activés au cours du vieillissement intrinsèque et photoinduit
- Figure 23 : Schéma descriptifs de la formation et détoxification des EROs
- Figure 24 : Sources et réponses cellulaires des espèces réactives de l'oxygène
- Figure 25 : Aldéhydes issus de la peroxydation lipidique
- Figure 26 : Michael addition du 4-HNE sur une protéine
- Figure 27 : Formation de bases de Schiff du 4-HNE
- Figure 28 : Les différentes voies modulées par le 4-HNE
- Figure 29 : Structure de la Carnosine

Figure 30 : Processus de sécrétion du TGF- β et voie des Smads associée

Figure 31: Diminution de l'expression de tropoélastine induite par le TGF- β par la voie de signalisation EGFR/Mek/Erk/TGIF

Figure 32 : Schéma récapitulatif de nos résultats

Figure 33 : Effet du 4-HNE sur la prolifération de fibroblastes murins induite par du PDGF

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différents types de tissus conjonctifs

Tableau 2 : Récapitulatif des différents types de collagènes

Tableau 3 : Produits utilisés

Tableau 4 : Anticorps utilisés

PARTIE 1

REVUE GENERALE



I. Introduction

Le tissu conjonctif est l'un des tissus les plus abondant et les plus répandus dans le corps humain. Il est impliqué dans les fonctions de liaison, de soutien, de renfort, de protection, de réponse immunitaire, de transport et de stockage.

Il est composé de cellules séparées par de la matrice extracellulaire. La matrice est constituée de substance fondamentale et de fibres très variées (majoritairement élastine, collagènes) qui forment un réseau en étroite relation avec les cellules.

Il existe plusieurs sortes de tissus conjonctifs dont les fonctions et compositions diffèrent selon le tissu considéré.

Au cours du vieillissement, les composants des tissus conjonctifs s'altèrent, se modifient, subissent des lésions provoquant des pertes structurelles. La matrice extracellulaire devient moins souple, moins résistante et moins élastique, on observe alors une perte d'élasticité de la peau et des vaisseaux. (Pinel, 2007).

Au cours de ce travail nous nous intéressons particulièrement au devenir des fibres de la matrice extracellulaire et plus particulièrement de l'élastine au cours du vieillissement, qu'il soit chronologique ou photo induit.

II. Tissu conjonctif

Le tissu conjonctif est l'un des tissus les plus abondant du corps humain. Il est impliqué dans les fonctions de liaison, de soutien, de compartimentation, de renfort, de protection, de réponse immunitaire, de transport et de stockage.

Il existe plusieurs types de tissus conjonctifs (cf tableau 1) qui pour la plupart sont fortement vascularisés.

Les tissus conjonctifs se composent essentiellement de cellules (variables selon le type de tissu) et de matrice extracellulaire (MEC).

Tissus conjonctifs embryonnaires	Mésenchyme (à la base de la formation de tous les autres types de tissus conjonctifs)	
	Tissu conjonctif muqueux (cordon ombilical du fœtus)	
Tissus conjonctifs matures	Tissu conjonctif lâche	<ul style="list-style-type: none"> ▪ aréolaire (derme papillaire, autour des vaisseaux, des nerfs, des organes...) ▪ adipeux (couche sous cutanée, autour du cœur, des reins, ...) ▪ réticulaire (stroma du foie, de la rate, moelle osseuse rouge ...)
	Tissu conjonctif dense	<ul style="list-style-type: none"> ▪ régulier (tendons, ligaments, aponévroses) ▪ irrégulier (fascia, derme réticulaire, périoste, péricarde, valves cardiaques...) ▪ élastique (tissu pulmonaire, artères, trachée, bronches...)
	Cartilage	
	Osseux	
	Tissu conjonctif liquide	<ul style="list-style-type: none"> ▪ sang ▪ lymphe

Tableau 1 : Différents types de tissus conjonctifs

1) Cellules

Les cellules des tissus conjonctifs proviennent toutes du mésoderme embryonnaire. Dans chaque grand type de tissu conjonctif on trouve des cellules immatures (-blastes) qui vont sécréter la matrice extracellulaire et ont la capacité de se diviser, et des cellules matures (-cytes) qui servent essentiellement au maintien de la matrice.

On peut trouver différents types de cellules dans ces tissus conjonctifs : des macrophagocytes, des plasmocytes, des mastocytes, des adipocytes, des leucocytes mais aussi des ostéocytes, des chondrocytes et surtout des fibroblastes. Ces derniers sont des cellules fusiformes issues de cellules souches mésenchymateuses qui synthétisent les

macromolécules protéiques et polysaccharidiques de la MEC et sont aussi capables de sécréter de nombreuses autres molécules (cytokines, facteurs de croissance, enzymes). Cela leur permet de jouer un rôle important dans les processus de maintien physiologique des tissus, de réparation tissulaire ou dans l'entretien des réactions inflammatoires.

Les cellules du tissu conjonctif ne sont pas étroitement associées contrairement à celles des épithéliums puisqu'elles sont entourées de matrice extracellulaire.

2) Matrice extra cellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle extrêmement important. Longtemps considérée à tort comme un matériau inerte, la MEC a un rôle fonctionnel dans la régulation des cellules, ce qui détermine les propriétés des tissus conjonctifs.

Sa première fonction est de doter les tissus de leurs propriétés mécaniques (rigidité, élasticité), structurales (porosité, solubilité, ...) et biochimiques spécifiques (elle filtre le passage des molécules).

La matrice extracellulaire va également former un microenvironnement protecteur et interagir avec les cellules du tissu par des liaisons et des récepteurs spécifiques pour participer aux fonctions cellulaires et à l'expression des gènes (Gelse et al, 2003).

Il faut également ajouter que la MEC influence le métabolisme cellulaire car elle agit comme un réservoir de molécules actives. En effet certains composants dont la capacité de se lier à des facteurs de croissance permettant leur stockage puis leur relargage.

La matrice extracellulaire est formée de fibres, essentiellement collagènes et élastines, et d'une substance fondamentale qui occupe l'espace entre les cellules et les fibres.

La substance fondamentale peut être selon le tissu de liquide, semi-liquide, gélatineuse ou calcifiée. Elle contient de l'eau, des protéines d'adhésion et des associations de protéines et de polysaccharides matriciels (ou glycosaminoglycanes – GAG) formant ainsi des complexes appelés protéoglycanes.

On considère qu'il existe 4 grands types de macromolécules extracellulaires : protéoglycanes, glycoprotéines de structures, collagènes et élastine qui vont lier entre elles les cellules et organiser les tissus que nous allons décrire ci-après.

Ce sont donc les types cellulaires mais également la composition, l'organisation et l'abondance des macromolécules de matrice extracellulaire qui vont définir les différents types de tissus.

a - Protéoglycanes et glycoprotéines de structure

Protéoglycanes (PG) (Mecham, 2012)

Ce sont des complexes protéine-polysaccharides présents en grande quantité dans les matrices et à la surface des cellules, qui vont jouer un rôle important dans la relation cellule-matrice.

Ils sont formés d'une protéine centrale sur laquelle vont se lier de façon covalente des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) pour former des complexes de taille variable. Les GAG sont des chaînes polysaccharidiques plus ou moins longues, non ramifiées, composées de répétitions de disaccharides.

On trouve 4 grandes familles de GAG :

- Sulfate d'héparane
- Sulfate de chondroïtine et sulfate de dermatane
- Sulfate de keratane
- Hyaluronate ou acide hyaluronique

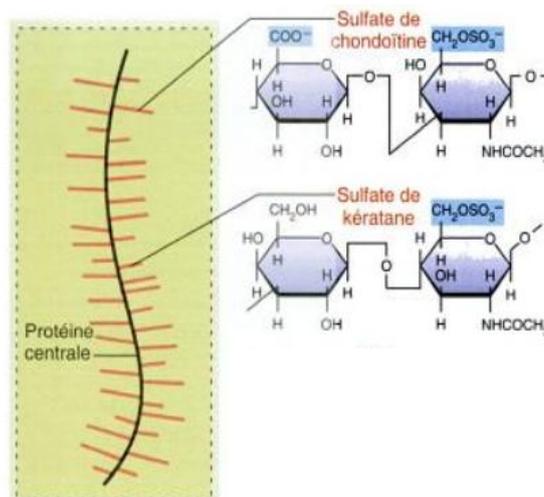


Figure 1 : Représentation schématique d'un protéoglycane (PG).

Un PG est composé d'une protéine centrale à laquelle sont attachées des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG en rouge). À droite, représentation de 2 types de disaccharides composants les GAG. (Karp, 2010)

Ces GAG de différentes natures (sulfatés, déacétylés ...) peuvent se lier à un même « cœur protéique » et former des protéoglycanes très variables tant par leur nature que par leur taille et leur localisation dans les tissus. L'acide hyaluronique est l'exception car il n'est ni sulfaté, ni attaché à une protéine. Dans le cartilage, les protéines centrales des PG peuvent s'y associer et ainsi former un énorme complexe.

Les GAG portent de nombreuses charges négatives grâce aux groupements carboxylates et sulfates présents sur les disaccharides (cf figure 1), qui permettent aux PG de fixer des cations, attirant ainsi un grand nombre de molécules d'eau. Ces molécules d'eau vont alors être piégées dans l'espace extracellulaire et conférer aux matrices extracellulaires une solidité et une résistance à la déformation.

Les protéoglycanes jouent aussi un rôle important dans le développement et la réparation tissulaire puisqu'ils contrôlent les gradients et la biodisponibilité de facteurs de croissance, chemokines, cytokines (Couchman and Pataki, 2012).

Glycoprotéines de structure (GPS)

Les macromolécules de la matrice extracellulaire interagissent avec des protéines de liaison à la surface des cellules.

Ces protéines de structures sont des glycoprotéines, auxquelles s'ajoutent de courtes chaînes glucidiques (Jacob, 2006). Elles se distinguent des protéoglycanes car les chaînes d'oligosaccharides sont courtes et ramifiées contrairement aux GAG des protéoglycanes.

Ces GPS, bien que très variables en taille, structure, localisation vont toutes posséder plusieurs sites de fixation aux cellules (*via* les intégrines ou autres récepteurs membranaires) et plusieurs sites d'interaction avec les autres macromolécules extracellulaires. Ces protéines sont généralement trouvées sous forme de multimères dans la matrice extracellulaire.

Parmi les principales glycoprotéines de structure on trouve la fibronectine (ubiquitaire) et la laminine (au niveau des lames basales) qui permettent la fixation des cellules à d'autres éléments de la MEC tels que les collagènes et protéoglycanes (Aumailley et al. 2003).

b - Collagènes

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères (environ 30 % en masse des protéines de l'organisme). De par leur capacité à former des fibres, les collagènes sont des protéines résistant aux forces mécaniques; ils apportent solidité aux tissus et sont peu extensibles, contrairement à l'élastine.

- **Composition**

Tous les collagènes possèdent une structure commune, la présence d'un domaine en triple hélice droite composée de trois chaînes de polypeptides associées, les chaînes α .

Du fait de l'épissage alternatif, on compte 38 chaînes α différentes composant les 28 formes de collagènes connues à ce jour.

C'est la répétition du triplet (Gly-X-Y) $_n$ dans la séquence d'acides aminés des chaînes α ((X étant fréquemment la proline ou lysine et Y l'hydroxyproline) qui permet la formation de la triple hélice (cf figure 2).

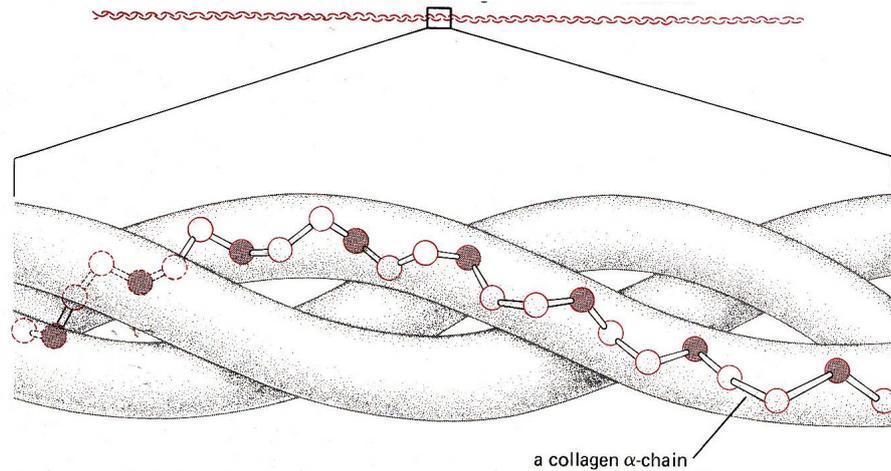


Figure 2 : Triple Hélice du collagène : assemblage des trois chaînes α (Molecular biology of the cell, Alberts et al.)

- **Cellules productrices**

Au cours de la vie embryonnaire, la synthèse de collagènes est assez forte, et ralentit beaucoup après la naissance. Au cours de la vie adulte ce renouvellement de collagènes est assez lent, sauf aux cours de processus particuliers tels que la cicatrisation de tissus, ou de pathologies fibrosantes (Rossert et al, 2003).

Les collagènes sont synthétisés essentiellement par les fibroblastes. Cependant d'autres types cellulaires peuvent également synthétiser du collagène, en fonction du tissu donné. Par exemple, le collagène I, présent dans la quasi-totalité des organes est synthétisé par les fibroblastes, mais également par les ostéoblastes ou encore les odontoblastes dans les tissus conjonctifs osseux (Rossert et al, 2003 ; Rosso et al, 2003).

Les cellules mésenchymateuses sont présentes dans la peau et dans les vaisseaux (fibroblastes, cellules musculaires lisses).

- **Synthèse (cf figure 3)**

Les ARNm des chaînes α des collagènes s'associent aux ribosomes qui les traduisent en chaînes peptidiques et sont adressés au réticulum endoplasmique (RE). Le processus de maturation commence dès cette étape car au fur et à mesure que la chaîne pro- α est synthétisée, la proline hydroxylase et la lysine hydroxylase transforment immédiatement le nombre (précisément déterminé) des résidus de proline et de lysine en hydroxyproline, voire en hydroxylysine. Ce n'est qu'après la terminaison de ces hydroxylations suivies de N- et O- glycosylations d'une partie des hydroxylysines que la chaîne pro- α peut quitter les complexes ribosomiaux (polysomes). Chaque chaîne α forme elle-même une hélice gauche avec un pas de 18 acides aminés par tour et porte à ses deux bouts les extensions C-propeptide et N-propeptide terminales caractéristiques du procollagène.

Grâce aux séquences C-propeptides des chaînes α , celles-ci vont s'autoassembler en quinconces pour que les structures Gly-X-Y de chaque chaîne soient au même niveau, et sont super-enroulées autour d'un axe central de façon à former une super hélice droite comportant aux deux extrémités des extensions plus ou moins globulaires (propeptide N- et C terminaux). On parle d'un assemblage des chaînes α en fermeture éclair (zipper-like).

Tous les résidus glycines (qui sont les plus petits acides aminés) sont positionnés au centre de la triple hélice car l'axe central est tellement encombré que seul l'hydrogène du résidu glycine y contient. Les liaisons hydrogènes établies entre les résidus glycines vont permettre la formation de cette superhélice propre aux collagènes (van der Rest, 1991). Les chaînes latérales plus volumineuses et généralement plus réactives des autres acides aminés occupent les positions extérieures ce qui permet les différentes interactions et modifications conduisant à la création des fibres de collagène matures dans la matrice extracellulaire. Les hydroxyprolines sont essentielles quant à la stabilisation de la triple hélice.

C'est sous cette forme, nommée procollagène, que la molécule est envoyée vers l'appareil de Golgi pour être internalisée dans des vésicules d'exocytoses. Ces vésicules sont adressées à la membrane plasmique puis sont sécrétées dans l'espace extracellulaire (cf figure 3).

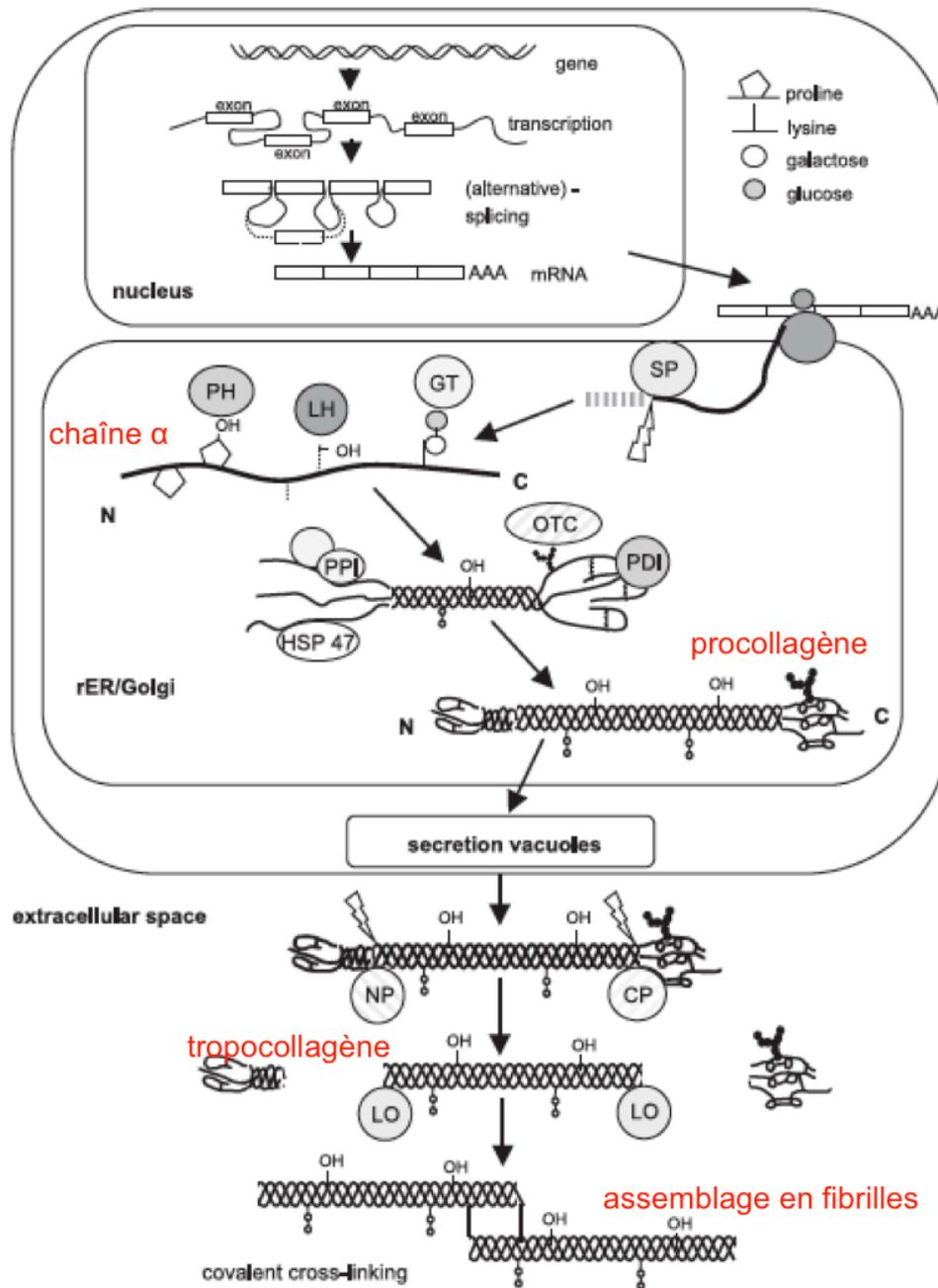


Figure 3 : Représentation schématique de la synthèse d'une molécule de collagène de la transcription nucléaire des gènes de collagènes, à la formation finale des fibrilles en passant par la synthèse de la protéine et les modifications post-traductionnelles. (Gelse et al, 2003)

(SP: signal peptidase; GT: hydroxylysyl galactosyltransferase and galactosylhydroxylysyl glucosyltransferase; LH: lysyl hydroxylase; PH: prolyl hydroxylase; OTC: complexe oligosaccharyl transferase; PDI: protein disulphide isomerase; PPI: peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase; NP:procollagen N-proteinase; CP: procollagen C-proteinase; LO: lysyl oxidase; HSP47: heat shock protein 47, collagen1)

Après clivage protéolytique des peptides C- et N- terminaux par des protéases spécifiques (N- et C- propeptidases), la forme mature de la triple hélice, appelée tropocollagène est obtenue (avec ses télépeptides N- et C- terminaux flanqués à ses

extrémités) (cf figure 4). Cette étape est essentielle car il a été décrit qu'une absence de clivage des propeptides altère le processus de fibrillogénèse (Fleischmajer, 1987).

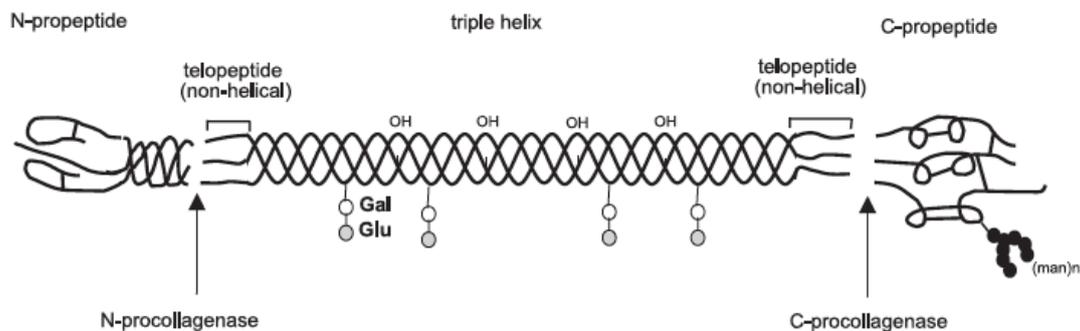


Figure 4 : Structure moléculaire d'un collagène fibrillaire illustrant les sites de clivages des propeptides N- et C- terminaux et les sites de glycosylation (Gelse, 2003)

Suite à la perte des propeptides, les molécules de tropocollagènes sont moins solubles, ce qui provoque leur agrégation. Dans le cas des collagènes fibrillaires, les molécules de tropocollagènes ainsi libérées s'assemblent parallèlement avec un léger décalage d'un quart de leur longueur les unes par rapport aux autres et liées par la lysyl oxydase entre leurs résidus lysines et hydroxylysines au niveau des télopectides (cf figure 5). Ceci permet aux molécules de tropocollagènes de s'assembler en fibrilles ayant un aspect strié, qui par la suite pourront s'agréger en fibrilles d'ordre supérieur de 500 nm de diamètre. Ces fibrilles en s'associant à d'autres protéines de la matrice extracellulaire (protéoglycanes) forment à leur tour une fibre de collagène visible au microscope optique (de l'ordre du micron).

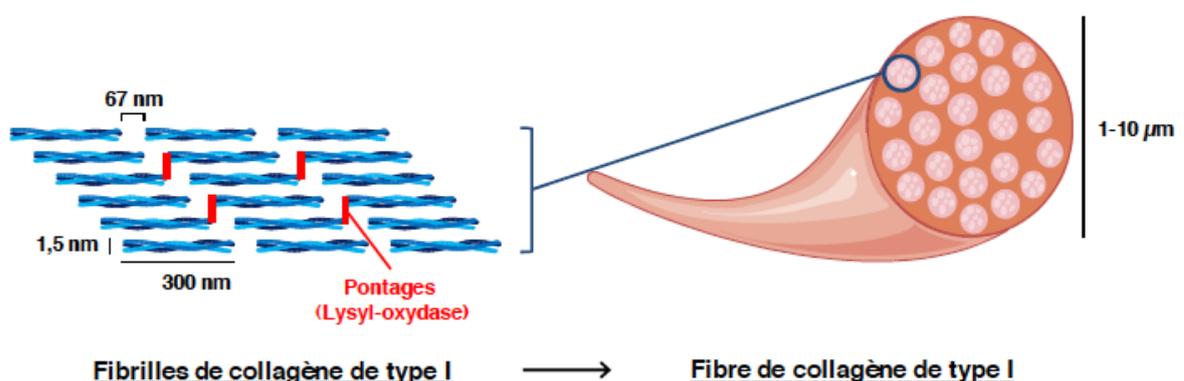


Figure 5 : Formation des fibres de collagènes par alignement et pontage des fibrilles grâce à la lysyl oxydase (Thèse Marie Guilbert d'après Shoulders, 2009)

Ce sont ces collagènes fibrillaires qui confèrent la résistance mécanique aux tissus de par cette organisation bien particulière.

Les autres collagènes peuvent, grâce à leurs segments non hélicoïdaux, être plus flexibles.

C'est notamment le cas du collagène de type IV qui se trouve au niveau des lames basales. En effet sa structure en triple hélice est interrompue en de nombreux points et ses propeptides N- et C- terminaux ne sont pas clivés, ce qui ne lui permet pas de s'associer en fibrilles mais plutôt de s'associer en un filet qui sert de charpentes aux protéines de la lame basale (Kalluri, 2003).

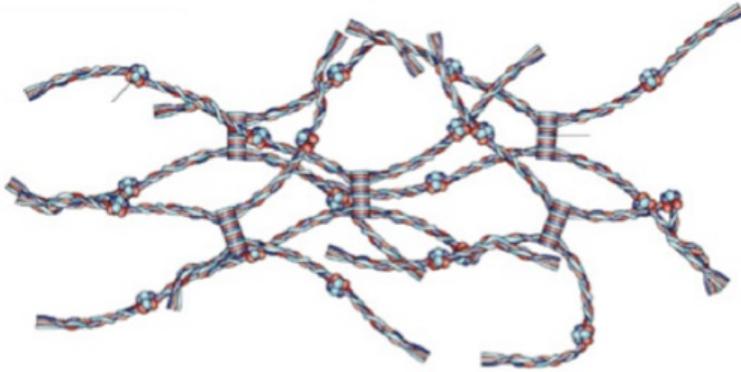


Figure 6: Structure du collagène de type IV (Kalluri, 2003)

- **Différents types de collagènes**

On dénombre actuellement 28 types de collagènes (Ricard-blum, 2011) qui sont nommés en chiffres romains et classés en plusieurs sous-familles que l'on distingue en fonction de leur structure, de leur conformation, de leurs fonctions.

On distingue :

- les collagènes fibrillaires (I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII) : ils contiennent un domaine triple hélice majeur. Ils représentent 90% des collagènes présents dans l'organisme.
- les collagènes associés aux fibrilles (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII): ils ont des domaines triples hélices interrompus (FACIT = fibril-associated collagens with interrupted triple helices).
- les collagènes non fibrillaires parmi lesquels les collagènes membranaires (XIII, XVII, XXIII, XXV), les multiplexines (XV, XVIII)...

Ces molécules de collagènes peuvent être des homotrimères ou des hétérotrimères.

Exemple : Le collagène I est composé d'un hétéro-trimère de chaînes $\alpha 1(I)$ et $\alpha 2(I)$ et sa dénomination est : $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$. Le collagène III est pour sa part composé d'un homotrimère $\alpha 1(III)$.

- **Cytokines pro- et anti-fibrosantes**

On trouve parmi les facteurs pro-fibrosants le TGF- β , qui augmente la transcription des gènes par l'activation de la voie Smad, et stabilise des ARNm des collagènes (Sato et al, 2004 ; Stefanovic et al, 1999 ; Maatta and Pettinen, 1995). Il inhibe la synthèse des métalloprotéinases matricielles (MMP-1, MMP-2, MMP-9) et augmente la synthèse des inhibiteurs des métalloprotéases (TIMPs) ((Edwards et al, 1987 ; Zeng et al, 1996 ; Papakonstantinou et al, 2003, Rossert et al, 2003).

Des études ont également montré le rôle profibrosant du CTGF bien qu'on connaisse mal son mode d'action. Il a été décrit qu'il possède de multiples domaines, qui lui permettent de s'associer aux molécules de la MEC. Il peut se lier à différents récepteurs à la membrane cellulaire (intégrines β , récepteurs aux LDL, récepteur au NGF...). Son mode d'action semble aussi dépendant de son interaction avec d'autres facteurs (TGF- β , VEGF, IGF) (Brigstock, 2010).

L'IL-4 augmente elle aussi la production et la sécrétion de collagènes I, III et IV dans des fibroblastes par l'activation de la voie STAT6 (Aoudjehane et al, 2008 ; McGaha et al, 2003) en augmentant la transcription et la stabilisation des ARNm (Gillery et al., 1992).

A l'inverse, l'Interféron γ serait une cytokine inhibitrice. En effet, il joue un rôle inhibiteur de la prolifération cellulaire et de la synthèse de matrice extracellulaire et notamment du collagène de type I *via* l'activation de la voie Jak Stat, une déplétion en CBP /p300, d'où une inhibition de la la transcription des gènes et une diminution de la stabilité des ARNm. L'Interféron γ peut également augmenter l'expression de Smad 7, une protéine inhibitrice de la voie du TGF- β (Ulloa et al, 1999).

Le bFGF diminue également la quantité d'ARNm du collagène I (Hong and Trackman, 2002).

Le TNF α (Tumor necrosis factor α) est aussi un inhibiteur de la production de collagènes puisqu'il s'oppose aux effets du TGF- β directement au niveau transcriptionnel, mais aussi en interférant avec la voie Smad 3 induite par le TGF- β et en activant Smad 7 *via* NF- κ B. Enfin le TNF α , tout comme l'IL-1, augmente la production de prostaglandine E2 (PGE2) conduisant à une inhibition de la prolifération cellulaire, une augmentation de production des MMPs et une inhibition de la transcription des gènes. (Rossert et al, 2003).

- **Répartition des différentes formes de collagènes en fonction des tissus**

La distribution des différents types de collagènes varie d'un tissu à l'autre (cf tableau 2). Cette hétérogénéité est expliquée par la programmation des cellules d'un tissu à synthétiser un collagène dont les caractéristiques sont adaptées aux contraintes mécaniques qui lui sont imposées.

Dans la peau, les principaux types de collagènes trouvés sont les collagènes I et III. Ce sont des collagènes fibrillaires qui vont se co-polymériser pour former des fibrilles de collagènes plus ou moins bien organisées (par rapport à d'autres tissus tels que les artères ou encore la cornée) qui permettront de conférer au derme sa force, et sa résistance (pour le collagène I) et sa souplesse (pour le collagène III).

Ces fibrilles sont ensuite associées au collagène VII qui lui est orienté perpendiculairement aux fibrilles pour les ancrer au niveau de la jonction dermo-épidermique, où on retrouve alors le collagène de type IV. (Naylor et al, 2011).

On retrouve également au niveau de la peau, mais de façon moins importante les collagènes VI, XIV, XIII, XVII (Gelse et al, 2003).

Dans les vaisseaux, les composants varient selon les types de vaisseaux considérés. Dans les artères on retrouve les collagènes fibrillaires de type I, II et III, ainsi que les collagènes IV, V et VI. Dans les veines, s'ajoute également le collagène XIV. En revanche dans les artérioles, veinules, capillaires et vaisseaux lymphatiques on trouve essentiellement du collagène IV. (Bou-Gharios et al, 2004).

L'organisation des collagènes dans les vaisseaux est plus structurée que dans la peau.

Type	Molecular composition	Genes (genomic localization)	Tissue distribution
<i>Fibril-forming collagens</i>			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	bone, dermis, tendon, ligaments, cornea
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11–q13.2)	cartilage, vitreous body, nucleus pulposus
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	skin, vessel wall, reticular fibres of most tissues (lungs, liver, spleen, etc.)
V	$\alpha 1(V),\alpha 2(V),\alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2–q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)	lung, cornea, bone, fetal membranes; together with type I collagen
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3–COL2A1	cartilage, vitreous body
<i>Basement membrane collagens</i>			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV); \alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36–q37) COL4A4 (2q36–q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	basement membranes
<i>Microfibrillar collagen</i>			
VI	$\alpha 1(VI),\alpha 2(VI),\alpha 3(VI)$	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	widespread: dermis, cartilage, placenta, lungs, vessel wall, intervertebral disc
<i>Anchoring fibrils</i>			
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1 (3p21.3)	skin, dermal–epidermal junctions; oral mucosa, cervix,
<i>Hexagonal network-forming collagens</i>			
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	COL8A1 (3q12–q13.1) COL8A2 (1p34.3–p32.3)	endothelial cells, Descemet's membrane
X	$[\alpha 3(X)]_3$	COL10A1 (6q21–q22.3)	hypertrophic cartilage
<i>FACIT collagens</i>			
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33–p32.2)	cartilage, vitreous humor, cornea
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	COL12A1 (6q12–q13)	perichondrium, ligaments, tendon
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	COL9A1 (8q23)	dermis, tendon, vessel wall, placenta, lungs, liver
XIX	$[\alpha 1(XIX)]_3$	COL19A1 (6q12–q14)	human rhabdomyosarcoma
XX	$[\alpha 1(XX)]_3$		corneal epithelium, embryonic skin, sternal cartilage, tendon
XXI	$[\alpha 1(XXI)]_3$	COL21A1 (6p12.3–11.2)	blood vessel wall
<i>Transmembrane collagens</i>			
XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$	COL13A1 (10q22)	epidermis, hair follicle, endomysium, intestine, chondrocytes, lungs, liver
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	COL17A1 (10q24.3)	dermal–epidermal junctions
<i>Multiplexins</i>			
XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	COL15A1 (9q21–q22)	fibroblasts, smooth muscle cells, kidney, pancreas,
XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	COL16A1 (1p34)	fibroblasts, amnion, keratinocytes
XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	COL18A1 (21q22.3)	lungs, liver

Given are the molecular composition, the genomic localization of the different chains as well as the basic tissue distribution.

Tableau 2 : Récapitulatif des différents types de collagènes, leur distribution tissulaire et leur famille de collagène. (Gelse et al, 2003)

c - Élastine

L'élastine ne représente qu'une faible partie des protéines de la matrice extracellulaire (2 à 4%), mais elle joue un rôle extrêmement important dans la flexibilité et l'extensibilité des tissus chez les vertébrés. En effet elle participe à la formation de fibres élastiques qui permettent de maintenir la fonction des tissus en permettant une forte résistance aux déformation et une grande élasticité.

Les fibres élastiques sont composées en majorité d'élastine (à 90%) qui va former le cœur interne de ces fibres, et de microfibrilles : fibrillines, MAGP (microfibril associated glycoprotein), ostéopontine, emiline, fibuline-1 ,...(Vrohski and Weiss 1998)

L'élastine est un biopolymère insoluble dans tout solvant, caractérisée par une durée de vie très longue (environ 70 ans). Elle résulte de l'association de plusieurs molécules de tropoélastine, le précurseur soluble de l'élastine.

- **Cellules productrices**

L'élastine est synthétisée par différents types cellulaires notamment les cellules musculaires lisses, les fibroblastes mais aussi les cellules endothéliales, les chondroblastes et les cellules mésothéliales. (Mithieux and Weiss, 2006).

- **Synthèse**

L'élastogénèse a lieu essentiellement au cours des étapes précoces du développement jusqu'à la puberté chez les humains (Sproul and Argraves, 2012).

Une des particularités de l'élastine est qu'elle possède une très longue durée de vie et une forte résistance aux contraintes. En effet des études ont décrit que les molécules d'élastine sont capables de supporter jusqu'à 10^9 cycles d'élongation avant de présenter les premières fractures de fatigue, soit environ le nombre de battements cardiaques en 40 ans (O'Rourke and Nichols, 2005). Donc, après son dépôt dans l'espace extracellulaire, sa synthèse reste très faible durant la vie adulte. Cependant dans le cas de blessures, ou de pathologies particulières une néosynthèse peut alors rapidement se remettre en place (Davidson, 2002 ; Sproul and Argraves, 2012).

- de régions très hydrophobes riches en acides aminés non polaires : valine (V), glycine (G), proline (P) et alanine (A) qui se présentent généralement sous forme de séquences répétées de type GVGVP, GGVP et GVGVP. Ces domaines sont essentiels à l'alignement des monomères de tropoélastines et confèrent également aux molécules d'élastines leur capacité d'extensibilité grâce à leur entropie. (Vrhovski and Weiss 1998)

Au niveau post transcriptionnel, la régulation est très importante. Dans des poumons de rats, on retrouve un grand nombre de pré-ARN de tropoélastine à l'âge adulte mais très peu d'ARNm (Swee et al, 1995), ce qui démontre l'existence de mécanismes de déstabilisation des ARNm, (Hsu-Wong et al, 1994 ; Johnson et al, 1995)

L'ARNm mature de tropoélastine est exporté hors du noyau et sa traduction s'effectue à la surface du réticulum endoplasmique rugueux, donnant un polypeptide de 70kDa possédant une séquence signal de 26 acides aminés en N-terminal. Ce peptide est clivé lors de l'entrée de la protéine dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux pour enfin être transportée au Golgi.

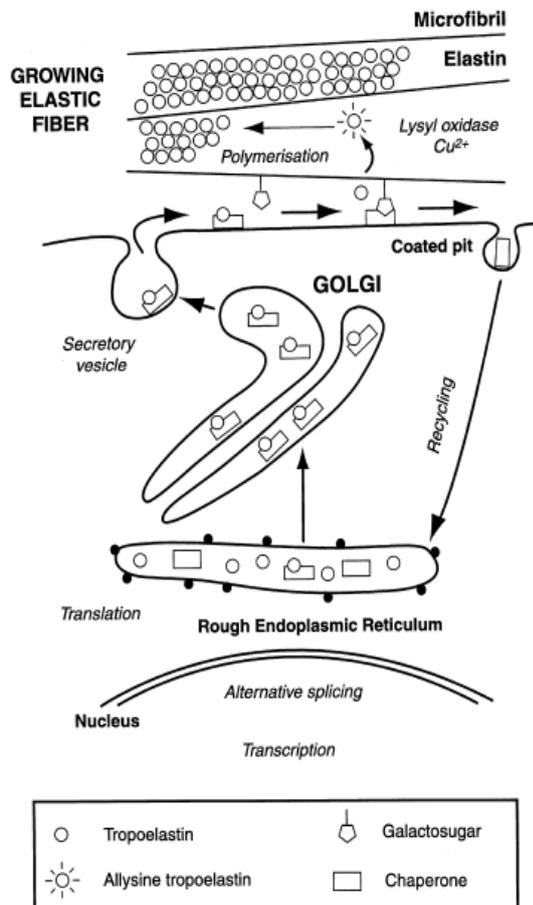


Figure 8 : Schéma récapitulatif de synthèse et de dépôt d'élastine. (Debelle and Tamburro, 1997)

Dans la cellule, la tropoélastine est prise en charge par une protéine chaperonne de 67kDa, EBP (Elastine Binding Protein) qui prévient de l'autoaggrégation et de la dégradation prématurée. EBP prend en charge la tropoélastine à l'intérieur de la cellule en se fixant aux domaines hydrophobes et permet sa sécrétion hors de la cellule. En effet EBP, qui est aussi une sous-unité du récepteur à l'élastine, s'associe alors aux autres sous-unités du récepteur et aux galactosyls des microfibrilles, diminuant ainsi son affinité pour la tropoélastine conduisant à son dépôt d'élastine mature (Mithieux and Weiss, 2006). EBP est ensuite recyclée dans les compartiments intracellulaires pour être à nouveau réassociée avec d'autres monomères de tropoélastine nouvellement synthétisés.

L'alignement des monomères est une étape essentielle à la formation du polymère mature.

Ils peuvent former des cross-link spécifiques avec la fibrilline-1, fibrilline-2 et MAGP-1 notamment au niveau du domaine C-terminal très conservé de la tropoélastine (Brown-Augsburger, et al 1996) pour ainsi être stabilisés sur le maillage de microfibrilles et alignés aux polymères d'élastine mature (Kielty et al, 2002). Il semble que les monomères soient capables de s'autoaligner grâce à leurs régions hydrophobes. En effet, ce processus appelé coacervation, montre que dans des conditions particulières de température et d'hydratation, les domaines hydrophobes sont libres et interagissent entre eux, permettant un alignement des monomères de tropoélastine. Cet alignement est stabilisé par des cross-links covalents au niveau des domaines de réticulation riches en alanine, suite à des modifications post-traductionnelles dues à la lysyl oxydase. (Mithieux and Weiss, 2006)

La lysyl oxydase catalyse la désamination oxydative des résidus lysines de tropoélastine, en présence de cuivre, pour former l'allysine.

Ces allysines vont spontanément se condenser entre elles ou avec d'autres résidus lysines non modifiés pour former des cross-links covalents non enzymatiques pouvant impliquer de 2 à 4 résidus issus de différents monomères de tropoélastine.

Les cross-links les plus souvent rencontrés sont la desmosine ou isodesmosine, ce sont des cross-links tétravalents (qui lient 4 chaînes latérales des résidus lysines ou allysines) spécifiques de l'élastine (Partridge et al, 1964).

L'ensemble de ces liaisons permet de polymériser les molécules de tropoélastine soluble de façon à constituer un réseau de fibres d'élastine mature insoluble appelé le « core » d'élastine amorphe.

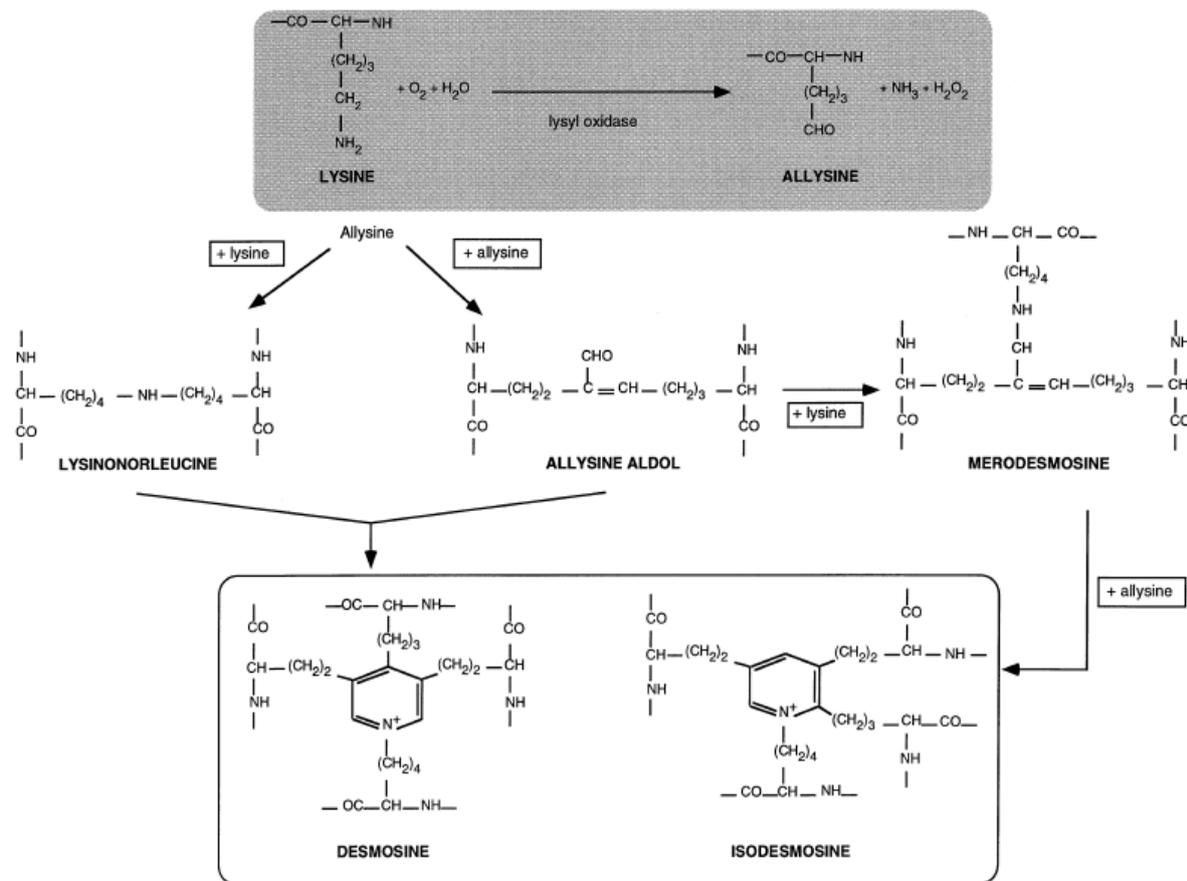


Figure 9 : Structure et voie de synthèse des desmosines et isodesmosines catalysée par la lysyl oxidase (Vrhovski et Weiss, 1998).

Tandis que les régions de cross-linking sont très rigides, les régions hydrophobes confèrent leur grande mobilité aux polymères d'élastine. En dépit de cette nature hydrophobe très importante, l'élastine mature nécessite une grande hydratation pour conférer des propriétés élastiques aux tissus.

Des travaux récents montrent que la structure secondaire de l'élastine (cf figure 10) serait, une alternance

- de structures en coudes et en feuillets β , de structures non organisées et de type polyproline II, qui confèrent la flexibilité et l'extensibilité aux molécules.
- les domaines de cross-linking rigides en hélice α (ce qui facilite la formation des cross-links en rapprochant les résidus lysines à la même face de l'hélice) (Mithieux and Weiss, 2006 ; Tamburro et al, 2006).

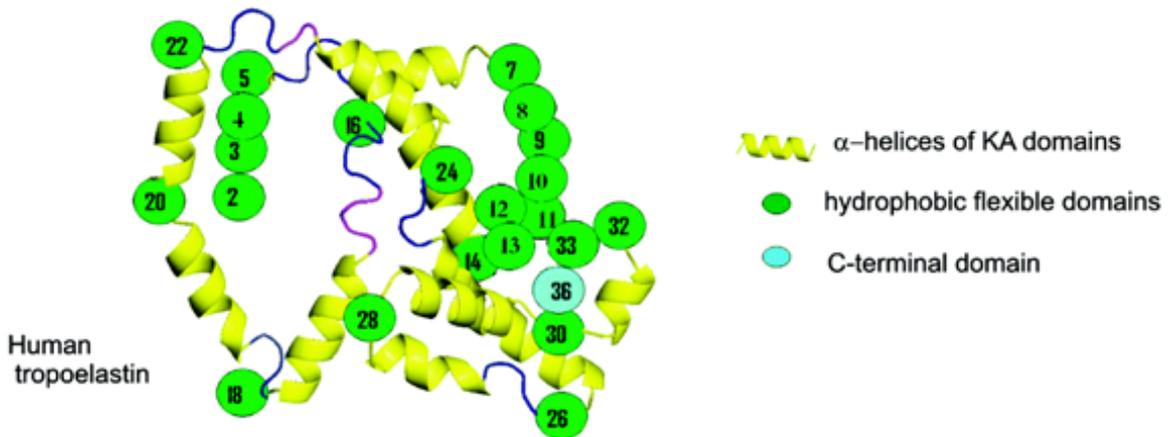


Figure 10 : Représentation de la tropoélastine imaginée en fonction des connaissances récentes. (Tamburro et al 2006)

- **Cytokines élastogènes**

Parmi les cytokines qui induisent la formation d'élastine, le TGF- β a largement été décrit comme inducteur de la synthèse d'élastine en augmentant la quantité d'ARNm de la tropoélastine (Liu et Davidson, 1988), en modulant l'activité du promoteur du gène de la tropoélastine, la stabilité des ARNm et la dégradation d'élastine, d'où une augmentation de la quantité d'élastine (Mc Gowan and Mc Namer, 1990).

Ces effets du TGF- β s'expliquent par une modulation de l'activité de promoteur du gène de la tropoélastine, dépendante du type cellulaire considéré et de la maturité du sujet (Sproul and Argraves, 2012).

Le TGF- β peut également agir au niveau post-transcriptionnel en stabilisant les transcrits ARNm de tropoélastine (Kâhàri et al, 1992 ; Kucich et al, 2002). Cet effet semble impliquer la voie des Smad, la voie phosphatidylcholine / Phospholipase C / PKC δ ou encore la voie TAK/p38 (Kucich et al, 2002). Ces voies conduiraient à la formation et à la liaison de protéines cytosoliques à des domaines spécifiques dans la région 3' non traduite de tropoélastine qui stabiliseraient le messenger (Zhang et al, 1999). Le TGF- β agirait également en synergie avec les oligomères d'acide hyaluronique pour augmenter l'expression d'élastine (Kothapalli et al, 2009).

Des études récentes ont pu montrer que la stabilisation des ARNm de tropoélastine peut également passer par la réduction par le TGF- β de l'expression de microARN (Ott et al, 2011 ; Zhang et al, 2012).

Enfin le TGF- β peut également agir sur la quantité d'élastine en limitant sa dégradation par les métalloprotéases (Sprouls and Argraves, 2011).

L'insulin-like growth factor 1 (IGF-1) est un autre facteur de croissance, connu pour réguler positivement l'élastogénèse. IGF-1 agit *via* l'activation de facteurs de transcription notamment Sp1, qui se fixent dans la région promotrice du gène de la tropoélastine (Conn et al, 1996).

- **Cytokines anti élastogènes**

Un certain nombre de cytokines inhibent la synthèse d'élastine, parmi lesquelles le bFGF (basic fibroblast growth factor) qui diminue l'expression des ARNm de la lysyl oxydase (Hong and Trackman, 2002). bFGF active AP-1 *via* la voie MEK/Erk1/2, qui se fixe au niveau de son promoteur (Rich et al, 1999 ; Carreras et al, 2001). Le TNF α exerce aussi un effet inhibiteur en activant le facteur de régulation AP-1, et en augmentant l'expression des métalloprotéases élastolytiques (Kothapalli and Ramamurthi, 2010).

L'EGF (epidermal growth factor), l'HB-EGF (heparin binding epidermal growth factor), et le TGF- α (transforming growth factor α) agissent quant à eux en inhibant l'expression des ARNm de tropoélastine par l'activation de la voie de signalisation EGFR/MEK/ERK qui induit une déstabilisation de ces ARNm (Liu et al, 2003 ; DiCamillo et al, 2006).

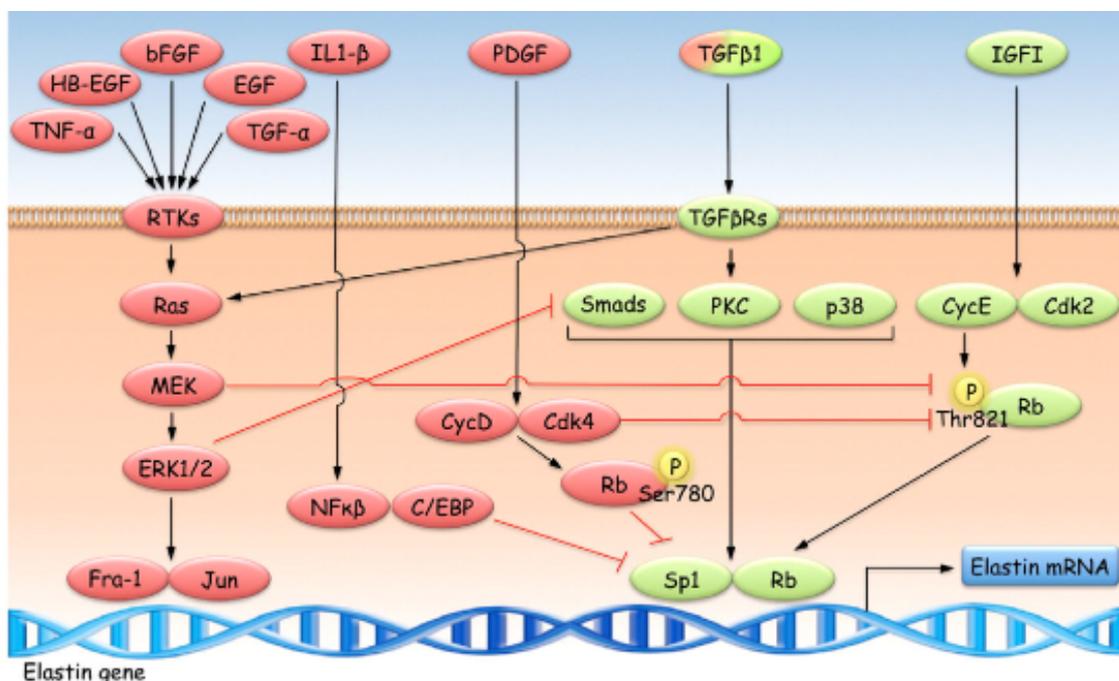


Figure 11 : cascades de signalisation influençant l'élastogénèse. En rouge les cytokines anti-élastogéniques, en vert les pro-élastogéniques. (RTK = Récepteurs à tyrosines kinases) (Sproul and Argraves, 2012)

- **Répartition /tissus**

La structure et l'organisation de ces fibres élastiques varient en fonction des tissus (Mithieux and Weiss 2006) ;

Dans les aortes, les fibres élastiques sont organisées en cercles concentriques autour de la lumière du vaisseau et séparées par des couches de cellules musculaires lisses.



Figure 12 : Marquage van Gieson de l'élastine dans des vaisseaux humains (en noir sur les images) (Basu et al 2010)

Dans la peau, ces fibres élastiques sont interconnectées et parallèles à la surface du derme mais de façon moins organisée.

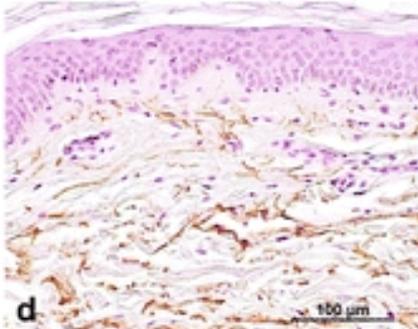


Figure 13 : Immunomarquage de l'élastine dans la peau humaine adulte (Coolen et al, 2010)

Dans les poumons, ces fibres forment un treillage ou encore dans le cartilage sous forme de rayon de miel de ruche.

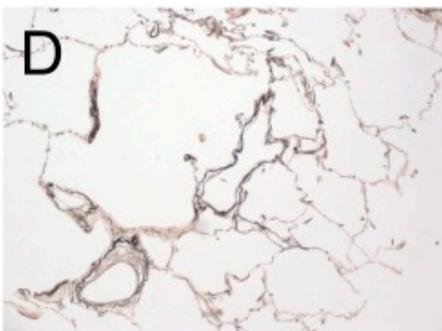


Figure 14 : Marquage Verhoeff des fibres élastiques dans des poumons humains adultes (Booth et al, 2012)

L'élastine représente 30 à 57% de la composition de l'aorte, 50% des ligaments élastiques, 28 à 32% des vaisseaux principaux, 3 à 7% des poumons, 4% des tendons et entre 2 et 5% de la masse sèche de peau (Vrhovski and Weiss, 1998).

III. Vieillessement du tissu conjontif et MEC

Le vieillissement biologique correspond à l'ensemble des processus physiologiques qui conduisent à un dysfonctionnement progressif des structures et des fonctions de l'organisme.

Au cours du vieillissement les différents systèmes cellulaires de réparation et de maintien de l'homéostasie perdent en efficacité, d'où l'accumulation de dommages irréversibles dans les lipides, protéines et acides nucléiques.

C'est un phénomène lent et irréversible, dû à la fois aux facteurs génétiques (vieillessement intrinsèque ou chronologique) et environnementaux (vieillessement extrinsèque) auxquels est soumis l'organisme tout au long de sa vie. Il faut bien distinguer les effets du vieillissement physiologique, des effets résultants de pathologies bien que ce processus naturel augmente la probabilité de développer des maladies (Thorin-Trescases et al, 2010).

Dans cette partie nous nous intéressons essentiellement au vieillissement du tissu conjontif et de la matrice extra-cellulaire dans les vaisseaux et la peau.

1) Différents types de vieillissement

a - Chronologique

Le vieillissement « chronologique » résulte entre autre d'un dysfonctionnement progressif des systèmes cellulaires de réparation et de maintien de l'homéostasie. C'est un mécanisme complexe lié essentiellement à des facteurs génétiques, auxquels s'ajoutent des facteurs tels que le stress oxydant et la glycation.

- **Vieillessement intrinsèque cutané**

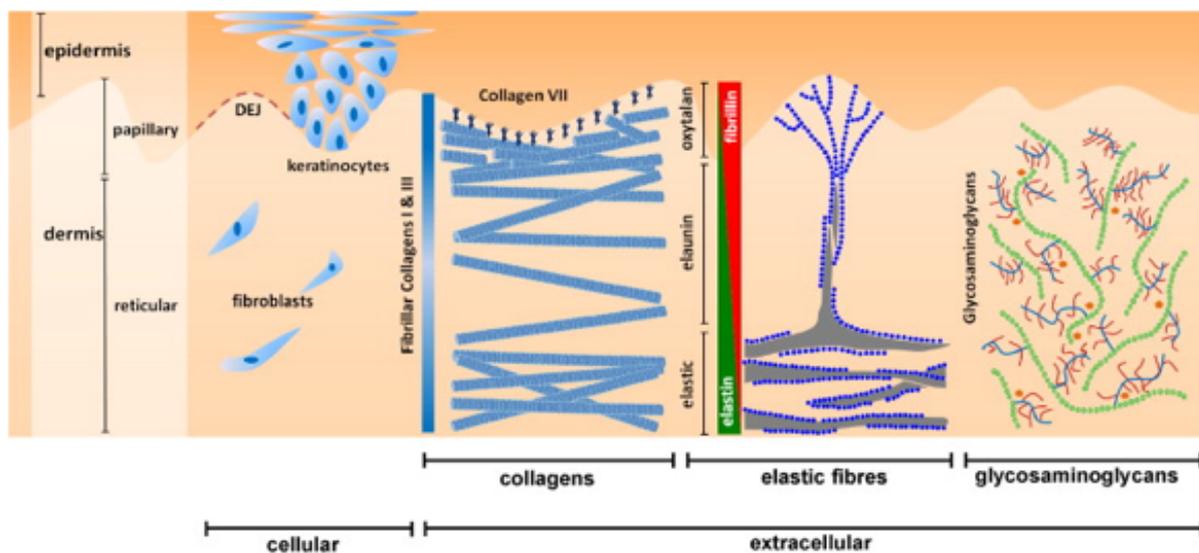
Au niveau de la peau, on distingue le vieillissement intrinsèque qui s'observe dans les zones couvertes, protégées du soleil, du photovieillessement qui intervient sur les parties exposées (visage, mains, cou...).

La peau est composée d'une couche externe, l'épiderme, qui est non vascularisée, pluristratifiée, et formée essentiellement de kératinocytes qui participent à la fonction barrière de la peau en la rendant imperméable. On retrouve aussi des cellules de Langerhans responsables de l'immunité et des mélanocytes, qui participent à la coloration de la peau. (Naylor et al, 2011).

En dessous se trouve le derme qui est très vascularisé mais qui contient peu de cellules, les fibroblastes. Ces derniers sont responsables de la synthèse des molécules de la matrice extracellulaire (collagènes, élastine, fibrillines, protéoglycanes...) qui apportent la résistance et l'élasticité à la peau.

La jonction dermo-épidermique est une zone invaginée entre ces deux couches, qui relie l'épiderme basal au derme grâce notamment aux collagènes de type IV et de type VII.

Enfin l'hypoderme, la couche qui sépare le derme des plans aponévrotiques et musculaires



sous-jacents, est formé par des cellules adipeuses.

Figure 15 : Composants cellulaires et extracellulaires de la peau humaine jeune. L'épiderme (constitué essentiellement de kératinocytes) est supporté par le derme (composé de fibroblastes parsemés), riche en MEC et vascularisation. La jonction dermo-épidermique (DEJ) sépare ces deux couches. La matrice extracellulaire du derme est composée de collagènes, fibres élastiques et protéoglycanes (Naylor et al. 2011).

Le vieillissement physiologique provoque, au niveau de l'épiderme un diminution du renouvellement avec pour conséquence une réduction de l'épaisseur, du nombre de mélanocytes de cellules de Langerhans, et de vaisseaux. Le derme est affiné, avec l'apparition de rides fines, ainsi que dans l'hypoderme.

Le nombre de fibroblastes diminue, indiquant une diminution de la prolifération et de la synthèse de matrice extracellulaire.

De plus les composants présents tels que l'élastine, la fibrilline et les collagènes ainsi que les protéoglycanes sont dégradés entraînant une perte d'élasticité de la peau, et une perte d'hydratation (Naylor et al. 2011).

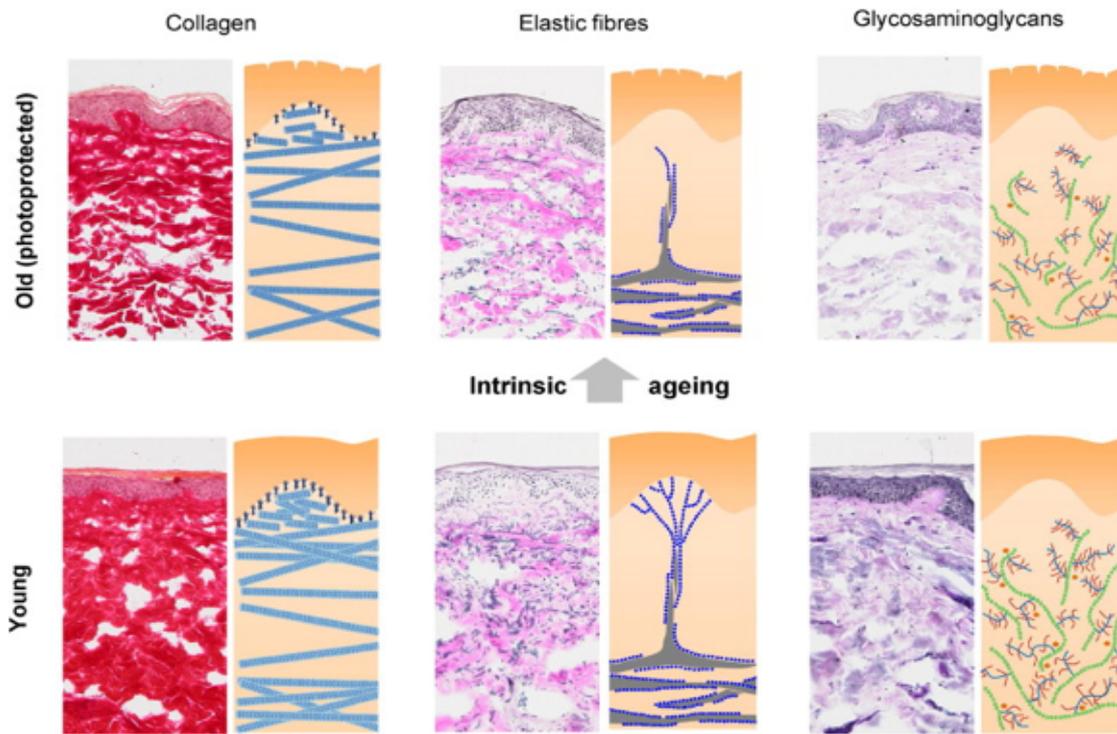


Figure 16 : remodelage intra et extracellulaire au cours du vieillissement chronique de la peau. (Naylor et al, 2011).

- **Vieillissement intrinsèque vasculaire**

La paroi des vaisseaux est formée de trois tuniques concentriques distinctes, de la lumière vers l'extérieur du vaisseau : intima, média et adventice.

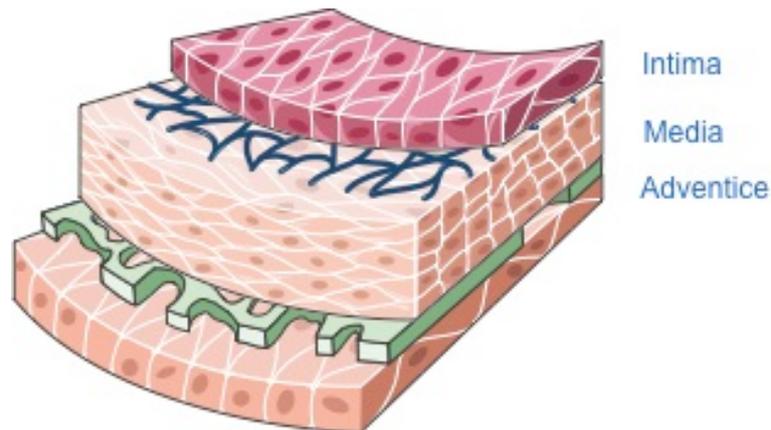


Figure 17 : Structure de la paroi vasculaire saine. (Servier Medical Art)

L'intima, la plus interne, est une monocouche de cellules endothéliales en contact avec le sang, qui repose sur une lame basale et une fine couche de tissu conjonctif composé de collagènes et de fibres élastiques.

La média, la couche la plus épaisse, est constituée de cellules musculaires lisses et de

matrice extracellulaire : élastine, collagènes et protéoglycanes. Elle confère aux artères l'élasticité et la contractilité.

L'adventice, la tunique externe, est composée d'un tissu conjonctif formé de collagènes et d'élastine ainsi que de fibroblastes et d'adipocytes.

Les limitantes élastiques interne et externe séparent la media respectivement de l'intima et de l'adventice.

Le vieillissement provoque, au niveau vasculaire, une dilatation des vaisseaux et un épaissement de la paroi et plus spécialement de l'intima et de la média. En effet cet épaissement intima-média peut être multiplié 2 à 3 fois entre 20 et 90 ans chez l'homme (Lakatta et al. 2003).

L'épaississement résulte principalement de l'accumulation et de la modification structurale de molécules de la matrice extracellulaire mais également de la désorganisation des cellules musculaires lisses. (Lakatta 2003) (Figure 18).

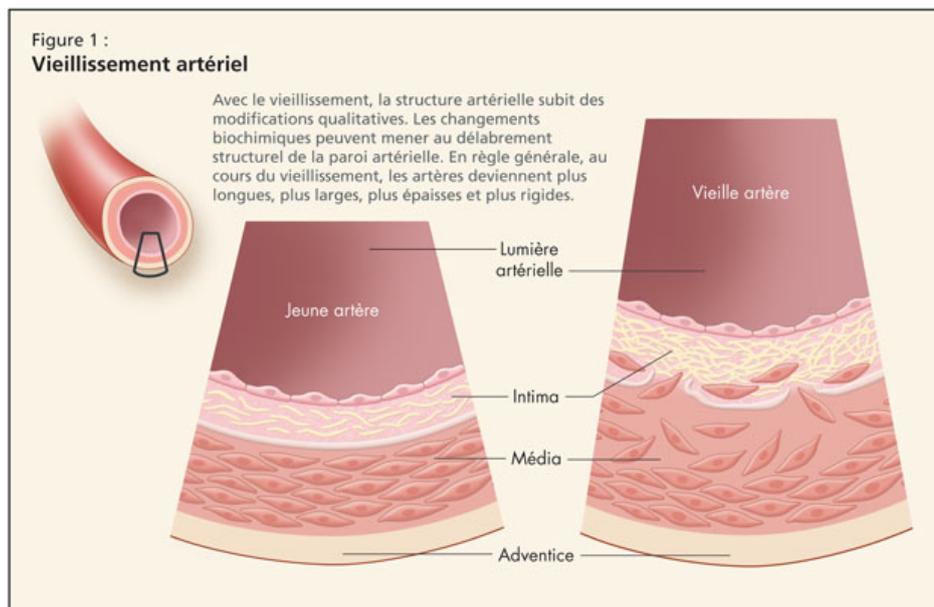


Figure 18 : Schéma de la modification artérielle au cours du vieillissement (Karen Fruetel, 2009)

Au niveau de l'intima, la membrane basale se perméabilise laissant passer les cellules musculaires lisses de la média vers l'intima, alors que dans la média les cellules musculaires lisses s'hypertrophient (Jacob, 2006). Le contenu en collagène augmente à la fois dans l'intima et dans la média. Les fibres de collagènes montrent un arrangement irrégulier dans la média (Tsamis et al, 2013).

Il semble en revanche que la quantité d'élastine ne soit pas modifiée mais vu l'augmentation des collagènes, sa proportion est diminuée, et l'élastine devient désorganisée et

progressivement fragmentée (Tsamis et al, 2013).

Conséquences en pathologies vasculaires

La diminution d'élastine normale et l'augmentation de la proportion des collagènes conduisent à une perte d'élasticité et à une rigidification des artères qui contribuent à la rigidité artérielle ou « arterial stiffness » (Lakatta et al, 2003 ; Zieman et al, 2005). Cela entraîne une perte de capacité des artères à s'étirer et reprendre leur forme initiale en réponse aux changements de pressions sanguines. Bien que le vieillissement ne soit pas la seule cause à l'origine de ce phénomène, le lien a été clairement établi entre vieillissement et rigidification artérielle, pouvant déboucher sur une hypertension artérielle largement observée au cours du vieillissement (Lakatta et al, 2003 ; Cecelja et al, 2012).

Les modifications de structure des parois artérielles au cours du vieillissement peuvent également favoriser l'apparition d'un autre type de pathologie, les anévrismes aortiques (Tsamis et al, 2013). Les anévrismes voient leur incidence augmenter avec l'âge étant donné que la perte et la désorganisation de matériel élastique fragilise les vaisseaux soumis à de fortes pressions, et provoque l'apparition de ces dilatations localisées de la paroi. (Jacob, 2003.) Ils peuvent apparaître sur n'importe quelle artère, mais il est plus commun de les retrouver sur l'aorte et les artères cérébrales.

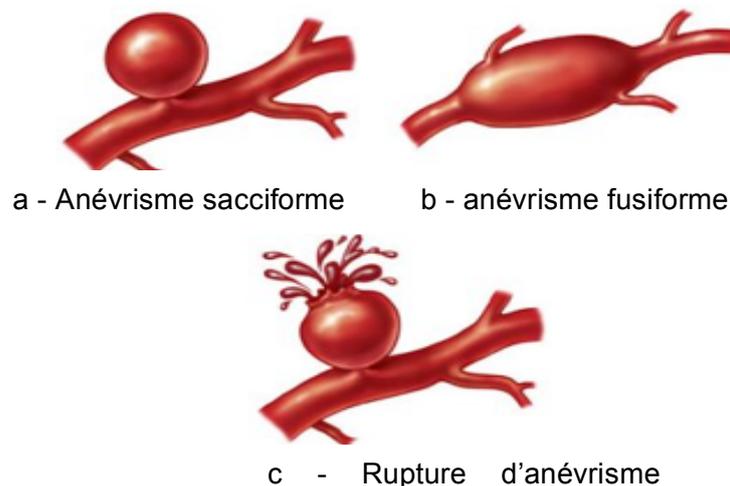


Figure 19 : Classification macroscopique des anévrismes.

a - Les anévrismes sacciformes affectent seulement une partie de la circonférence : ils correspondent à une excroissance dans la paroi artérielle. b - Les anévrismes fusiformes, les plus communs, affectent toute la circonférence du vaisseau en provoquant un endommagement dilaté et diffus. c - rupture d'anévrisme. (<http://www.qualityvascular.com/images/aneurysms>).

Les anévrismes sont d'ailleurs un des syndromes récurrents chez les patients atteints du syndrome de Marfan, dont le gène de la fibrilline 1 est muté conduisant à une altération des fibres élastiques. (Milewicz et al, 2000).

Le risque majeur d'évolution des anévrismes est la rupture d'anévrisme entraînant une hémorragie, qui peut provoquer la mort du patient.

b - Photovieillissement

Le photovieillissement ou vieillissement extrinsèque est un vieillissement accéléré de la peau causé par des expositions répétées aux rayons ultraviolets (UV). Il s'additionne au vieillissement intrinsèque, cependant il ne s'agit pas juste d'un effet cumulatif mais de processus distincts.

Les signes du photovieillissement apparaissent sur les parties « visibles » du corps, qui reçoivent le plus souvent une grande exposition au soleil : essentiellement le visage, le cou, les mains, le décolleté. Les effets observés varient d'un individu à l'autre en fonction des types de peau et de leur vulnérabilité. (Yaar and Gilchrest, 2007) mais on retrouve des effets classiquement observés.

Contrairement au vieillissement intrinsèque où la peau garde un aspect lisse et de fines rides apparaissent dues à une fragmentation progressive des fibres élastiques, le photovieillissement provoque l'apparition de rides profondes, avec une peau d'aspect rugueux dû à une désorganisation totale des fibres élastiques sous formes de dépôts distribués anarchiquement dans le derme (Sherratt, 2009) (cf figure 20).

De plus, le vieillissement extrinsèque génère une accumulation de ce matériel élastique fragmenté (El domyati et al, 2002) aussi appelé élastose solaire ou élastose actinique (Naylor et al, 2011).

De même les protéoglycanes dont le taux diminue au cours du vieillissement intrinsèque, se retrouvent ici sous forme d'agrégats désorganisés

Il y a une réduction très importante dans le derme des collagènes fibrillaires (Domyati et al, 2002) ainsi qu'une perte du collagène VII avec une disparition des invaginations épidermiques dans le derme et un aplatissement de la jonction dermo-épidermique (Naylor et al, 2011).

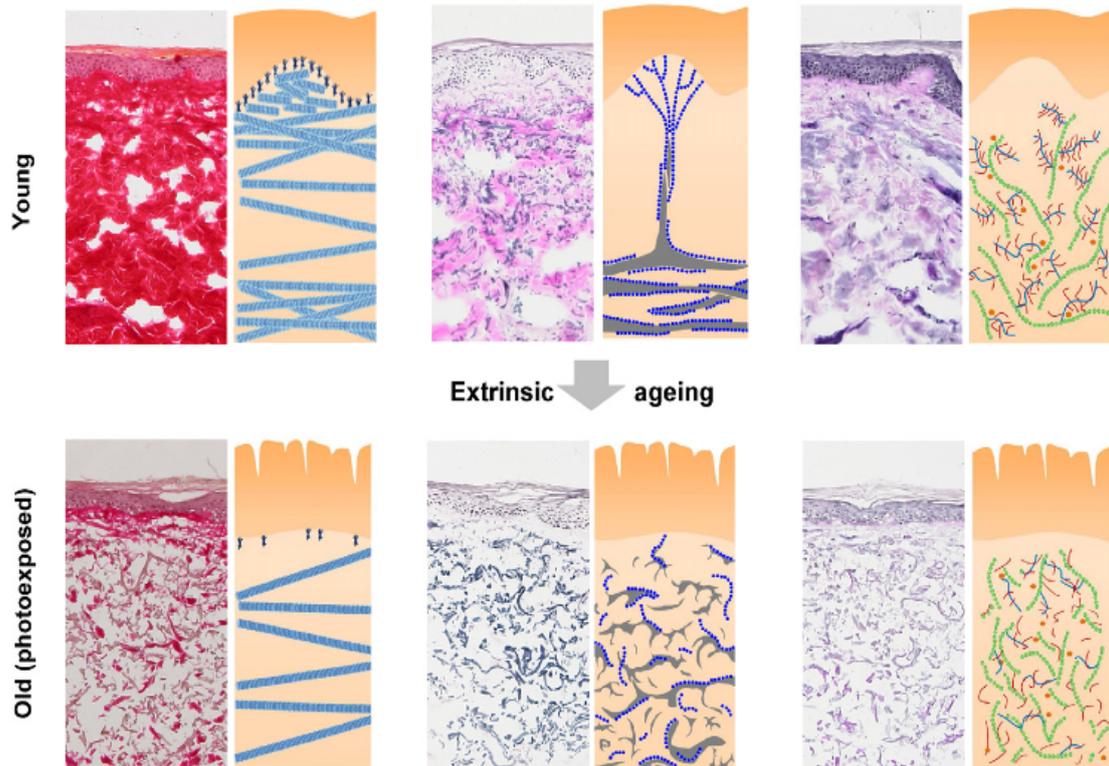


Figure 20 : remodelage intra et extracellulaire au cours du photovieillissement de la peau. (Naylor et al, 2011)

Conséquences en pathologies (Yaar and Ghilcrest, 2007):

La peau photoexposée montre globalement un aspect plus ridé que la peau protégée, plus épais, avec des dépigmentations focales et l'apparition d'épaississements localisés.

- Au niveau épidermique, chez les peaux très claires (phototypes I et II) qui possèdent donc peu de défenses contre les UV on peut observer des épaississements irréguliers (dans les zones photoexposées) appelés kératoses actiniques (ou kératoses solaires). Ces lésions squameuses ou crouteuses sont dites pré-cancéreuses car dans 10% des cas elles peuvent évoluer en carcinome épidermoïde et carcinome basocellulaire. Ces lésions sont très peu observées chez des personnes de phototypes III et IV.
- Dans les peaux photoexposées on observe souvent une élastose actinique qui se manifeste par une peau épaissie, jaunâtre, inélastique, parcourue de rides profondes en particulier sur la nuque (cutis rhomboidalis nuchae). Au niveau histologique les fibres du derme sont partiellement dégradées et forment des amas désorganisés d'élastine et de fibrilline, avec une augmentation de protéoglycanes et glycosaminoglycanes et une diminution de collagènes. Dans

ces lésions peuvent être retrouvées avec des télangiectasies (dilatations de petits vaisseaux sanguins) et la présence de cellules inflammatoires.

- Une des conséquences les plus graves au niveau cutané est le mélanome. Il dérive dans 75% des cas d'une transformation d'un mélanocyte, et dans 25% des cas de l'évolution d'un naevus pré-existant (Bertolotto, 2013). Le mélanome ne représente que 5% des cancers de la peau, mais il est mortel dans 80% des cas. La formation d'un mélanome peut être causée par une exposition trop importante aux UV mais pas seulement puisqu'ils apparaissent également dans des zones non photo-exposées. On parle alors de mélanome familial, dont la cause peut être génétique (Curtin et al, 2005).

On distingue le mélanome d'un naevus bénin par son bord irrégulier et dentelé, sa forme asymétrique, une couleur non homogène, et surtout sa capacité à évoluer. Plus le mélanome progresse et plus il s'étend en profondeur avec une propension à devenir métastatique.

2) Mécanismes du vieillissement de la matrice extracellulaire

Le vieillissement résulte de facteurs environnementaux et intrinsèques. Il existe actuellement plusieurs théories permettant d'expliquer les mécanismes du vieillissement. Les connaissances actuelles permettent de dire que ces mécanismes sont la résultante de plusieurs facteurs. Au cours du vieillissement cutané une perte de cellule et de matrice extracellulaire est observée (Robert et al, 2000).

Nous rapportons plus particulièrement les facteurs responsables du vieillissement des molécules de la matrice extracellulaire

a - Génétique

Les prédispositions génétiques tiennent une place importante dans le vieillissement puisque la longévité de chaque espèce vivante est conditionnée par son patrimoine génétique.

De plus, des études (Hayflick, 1965) montrent que les fibroblastes ont une capacité de synthèse de collagène et d'élastine réduite après une cinquantaine de passages. Cela peut s'expliquer par la réduction des télomères (Harley et al, 1992), l'apparition de mutations ou délétions génétiques au cours de divisions cellulaires ou encore par l'existence de polymorphismes qui peuvent modifier l'expression de gènes et de protéines, et ainsi

participer à la sénescence programmée ou accélérer le vieillissement cellulaire (Ly, 2000). En perturbant le cycle cellulaire ou en altérant directement la synthèse de protéines, ces facteurs vont influencer le renouvellement de la matrice extracellulaire.

b - Formation des cross-links - Glycation

Comme décrit dans les parties précédentes, les molécules de collagènes et d'élastine sont liées entre elles par des cross-links acquérant ainsi leur résistance à la protéolyse et conférant respectivement leur résistance et leur élasticité aux tissus.

La formation de ces cross-links résulte de modifications post traductionnelles des résidus lysines et hydroxylysines par la lysyl oxydase. Cette enzyme dépendante du cuivre va désaminer ces résidus pour former des acides aminés de pontage disponibles pour les cross-links.

Cependant au cours du vieillissement le nombre de cross-links entre les molécules de collagène et d'élastine augmente (Bailey, 2001 ; Tsamis et al, 2013) qu'ils soient dûs à la lysyl oxydase ou à la glycation non enzymatique (au contact du glucose). Cette augmentation des croxx-links a pour conséquences d'augmenter la rigidification entraînant une perte d'élasticité des tissus.

Dans le premier cas, l'augmentation des cross-links par la lysyl oxydase s'explique par une augmentation des acides aminés de pontage.

Dans le cas de la glycation non enzymatique, le glucose (ou des oses) réagit spontanément et de façon irréversible avec les groupements amines des acides aminés (notamment les résidus lysines et arginines) par la réaction de Maillard.

Cela débute par la formation d'une base de Schiff sur les résidus, puis s'ensuit un réarrangement d'Amadori qui conduit à la formation de produits terminaux de glycation, appelés AGE products (advanced glycation end products) tels que la carboxyméthyllysine (CML), la carboxyéthyllysine (CEL) ou encore la pentosidine.

La glycation, en modifiant les propriétés du collagène et de l'élastine les rend moins solubles, favorisant leur accumulation dans les tissus.

Ils deviennent par ailleurs résistants à la dégradation par l'élastase (Yoshinaga et al, 2012).

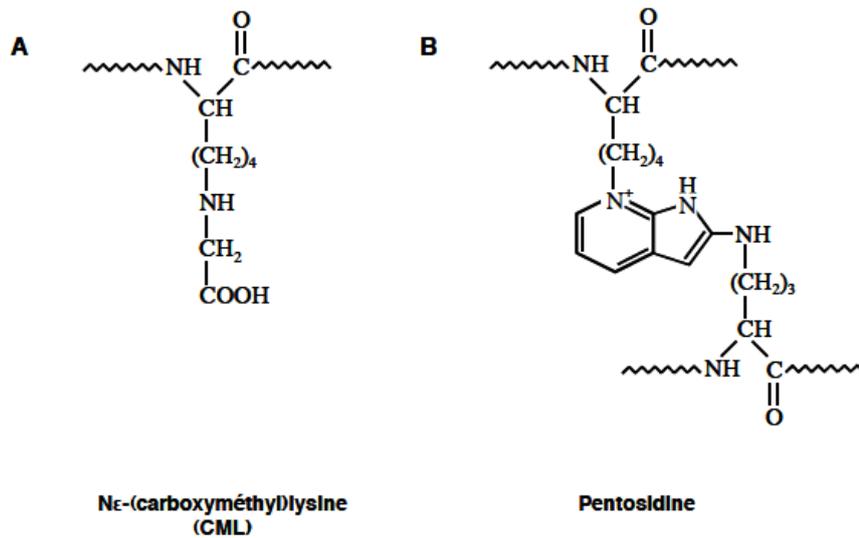


Figure 21 : Principaux produits de glycation (AGEs). Carboxyméthyllysine (A) et pentosidine (B) (Guilbert 2012)

c - Signalisations impliquées dans le processus du vieillissement

L' EGF empêche le renouvellement de l'élastine

Dans le cas du photovieillessement il est décrit que la production des espèces réactives de l'oxygène (EROs), induite par les UV, active les récepteurs de surface de l'epidermal growth factor (EGF), l'interleukine (IL)-1, de l'insuline, du keratinocyte growth factor et du tumour necrosis factor (TNF)- α (Yaar and Gilcrest, 2007).

Les EROs inhiberaient la tyrosine phosphatase qui maintient l'EGFR sous forme inactive (sous sa forme hypophosphorylée), ce qui induit l'activation de la voie mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 et c-Jun amino terminal kinase (JNK) et la transcription du complexe AP-1 (Xu et al, 2006). AP-1 active des métalloprotéases et induit une dégradation de matrice (collagène et élastine), bloque la synthèse de collagène I et III induite par le TGF β -1, et diminue les quantités de récepteurs au TGF β -1 (Fisher et al, 2002).

Les UV eux-mêmes en activant Smad 7, un antagoniste de la voie du TGF β participent à la diminution de production de molécules de la matrice extracellulaire (Quan et al, 2004).

Au cours du vieillissement intrinsèque on retrouve une augmentation progressive des EROs qui peut également activer la voie EGFR/MAPK/JNK/AP-1 et participer à la diminution de synthèse de matrice extracellulaire et à sa dégradation par les MMP (Hwang et al, 2011).

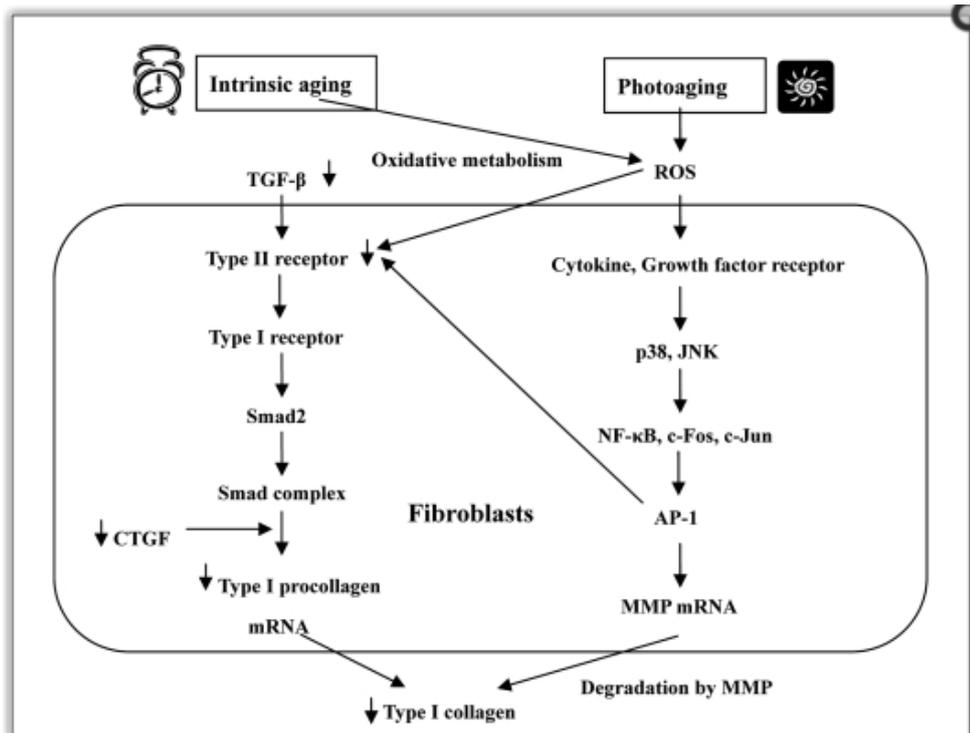


Figure 22 : Mécanismes activés au cours du vieillissement intrinsèque et photoinduit qui induisent une diminution du collagène et des molécules de matrice extracellulaire induits par la voie du TGF- β . (Hwang et al 2011)

d - Stress oxydant et stress carbonyle

La théorie radicalaire du vieillissement (exposée par Harman, 1956) propose que les radicaux, dont les EROs, produits naturellement par les organismes, induisent des dommages oxydatifs sur les biomolécules qui, en s'accumulant, participent au processus de vieillissement.

Au cours du métabolisme de l'oxygène les EROs sont formées et jouent un rôle important dans la communication et la signalisation cellulaire. Ces EROs possèdent un ou plusieurs électrons non appariés qui peuvent réagir avec les constituants cellulaires. Lorsque qu'il capte un électron, le dioxygène donne le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ qui est instable et dismute en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (le plus stable) grâce à la superoxyde dismutase (SOD), ou en peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) en réagissant avec du monoxyde d'azote (NO). H_2O_2 peut générer l'anion hydroxyle ($\cdot OH$) par la réaction de Fenton. $\cdot OH$ est le plus toxique des EROs et le plus réactif.

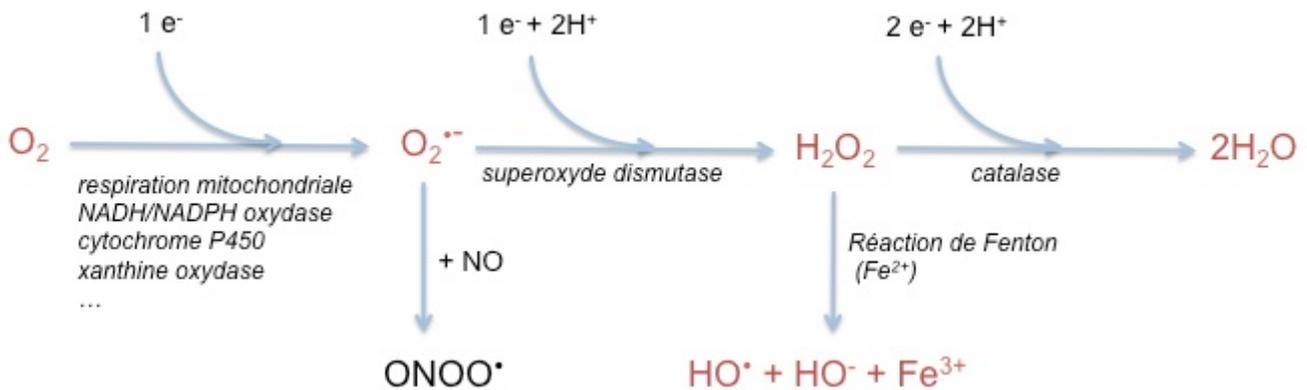


Figure 23 : Schéma descriptif de la formation et détoxification des EROs

Les EROs sont formées de façons physiologiques par divers systèmes biologiques en particulier les mitochondries qui sont le principal lieu de leur production. En effet au cours de la respiration mitochondriale des transporteurs d'électrons (l'ubiquinone et cytochrome C) catalysent le transfert d'électrons vers l'oxygène. La NADH-deshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne permet aussi la formation d'EROs, tout comme le cytochrome P450 au niveau du réticulum endoplasmique, ainsi que la NADPH oxydase, les lipoxygénases, cyclooxygénases, la xanthine oxydase, l'auto-oxydation des catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine), le peroxysome...

Il existe dans l'organisme des systèmes anti-oxydants qui maintiennent un équilibre entre formation d'EROs et détoxification, permettant de réduire les dommages causés par les ERO sur l'ADN, les protéines, les glucides et les acides gras.

Ces anti-oxydants ont une forte affinité avec les EROs et peuvent ainsi les neutraliser.

On trouve des systèmes enzymatiques (cf figure 24) tels que :

- les superoxydes dismutases (SOD) : qui catalysent la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène.
- les catalases (CAT): qui catalysent la dismutation de H_2O_2 en H_2O et O_2 en présence d'ions ferreux.
- la glutathion peroxydase séléno-dépendante (GPx) : qui réduit les radicaux libres oxydés ou les hydroperoxdes en oxydant le glutathion réduit (GSH) en glutathion (GSSG) (Arthur, 2000) en présence de sélénium (Se).

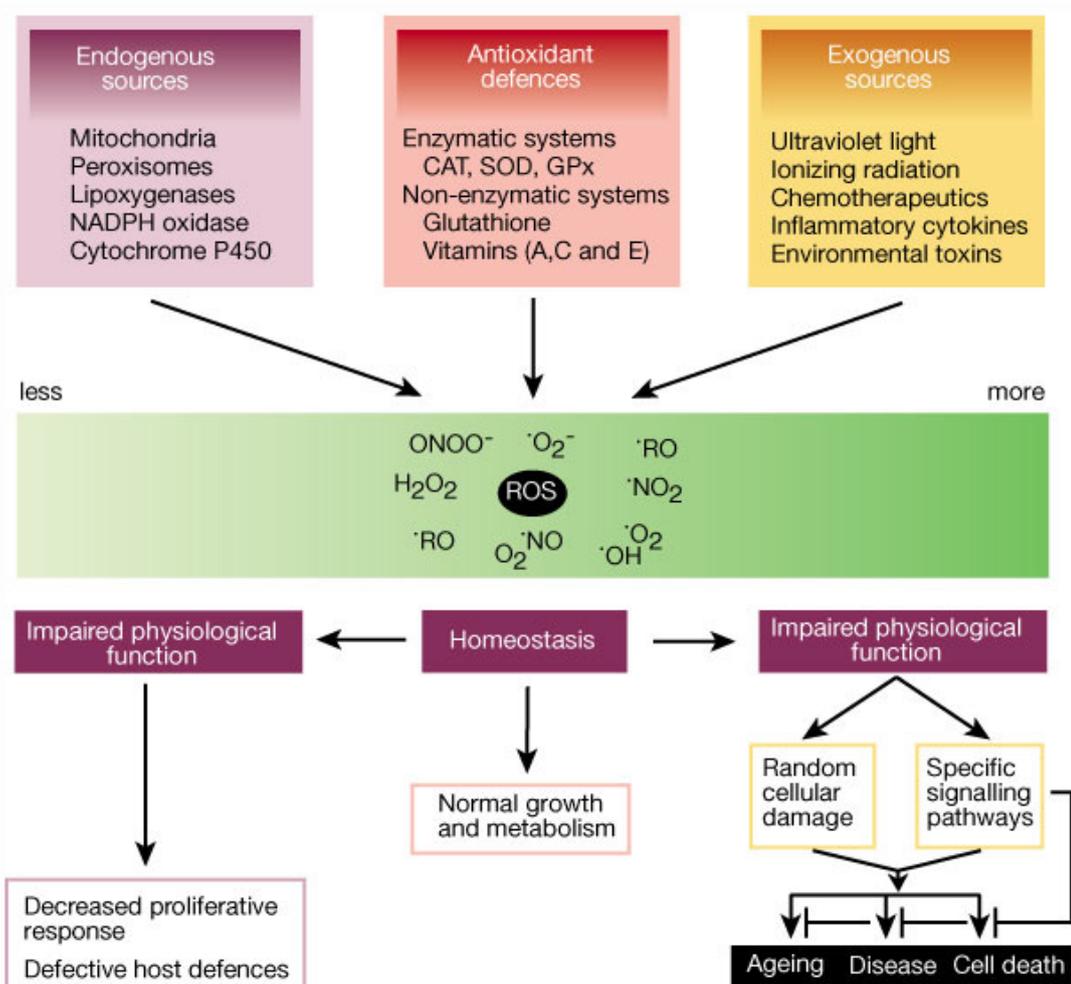


Figure 24 : Sources et réponses cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. (Finkel and Holbrook, 2008).

On trouve également des molécules antioxydantes endogènes ou exogènes (cf figure 24) telles que les vitamines (La Vitamines E ou tocophérol qui agit en synergie avec la vitamine C ou encore la vitamine A), l'acide urique, les antioxydants phénoliques...

Au cours du vieillissement, cet équilibre serait altéré avec d'une part une augmentation de la production de radicaux libres et d'autre part une diminution de l'efficacité des systèmes de protection, on parle de stress oxydant (Barouki, 2006 ; Finkel et al, 2008). Des facteurs exogènes peuvent aggraver ce déséquilibre en favorisant la formation d'EROs comme le tabac, l'alcool, les radiations ionisantes, la pollution ou les UV.

Le stress oxydant induit des dommages irréversibles sur les constituants cellulaires, et notamment sur les molécules de la matrice extracellulaire dont l'élastine (Scherrat, 2009).

Lors d'une exposition chronique des tissus à un stress oxydant, les EROs réagissent avec les lipides pour former des produits de peroxidation lipidique tels que les α,β -aldéhydes. Ces aldehydes dont le 4-hydroxynonenal (4-HNE), sont des composés très réactifs qui forment des adduits sur les protéines et modifient progressivement leurs fonctions (Esterbauer et al, 1991 ; Nègre-Salvayre et al, 2010).

IV. Stress carbonyle et vieillissement

1) Définition et génération

Parmi les constituants cellulaires, les lipides représentent une cible majeure du stress oxydant. La peroxydation lipidique (ou lipo-oxydation) consiste en l'attaque par les EROs des acides gras polyinsaturés (PUFA ou AGPI) libres ou estérifiés. Ces acides gras polyinsaturés possèdent dans leur structure plusieurs doubles liaisons.

Les AGPI les plus abondants dans les organismes sont l'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide α -linoléique (18 :3 n-3), acides gras essentiels que l'on trouve dans l'alimentation (Guéraud et al, 2010). Ces acides gras essentiels, sont cependant très sensibles à l'oxydation, car ils possèdent plusieurs doubles liaisons sur lesquelles se concentrent les attaques radicalaires.

L'attaque oxydative des AGPI, génère des composés carbonylés (4-HNE, acroléine...) qui forment des adduits sur les protéines, en se fixant sur certains acides aminés, d'où la formation de protéines carbonylées ou encore de stress carbonyle.

L'oxydation des AGPI peut être provoquée par des températures élevées, la lumière ou lors d'un contact avec l'oxygène ce qui entraîne leur « rancissement », une perte en vitamine et même un effet toxique (Cillard et al, 2006).

Dans l'organisme, la peroxydation lipidique a pour cible les phospholipides membranaires, de même que les sphingolipides et le cholestérol. L'accumulation de lipides oxydés est associée à de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), le diabète, certains cancers, des maladies inflammatoires... (Cillard et al, 2006)

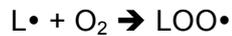
2) Peroxydation lipidique

L'attaque oxydative des lipides insaturés se déroule en 3 étapes (Porter et al 1995):

- Initiation : soustraction d'un hydrogène de la chaîne d'un AGPI (LH) par une ERO ce qui conduit à la formation d'un radical d'acide gras libre. Pour cette étape, un initiateur est nécessaire. Le radical obtenu va être stabilisé par un réarrangement des doubles liaisons qui conduit à la formation de diènes conjugués (isomères de position). La présence de ces diènes peut être mesurée par spectroscopie UV ce qui fait d'eux des marqueurs de stress oxydant.



- Propagation : Le radical précédemment formé peut réagir avec un oxygène formant un lipoperoxy (LOO•) qui réagit avec un autre AGPI pour lui arracher un hydrogène et former ainsi un hydroperoxyde instable (LOOH) et un radical libre qui propage la réaction. LOOH est instable et va se décomposer en produits secondaires (Guéraud et al, 2010).



- Terminaison : C'est la combinaison des espèces radicalaires ou l'intervention d'antioxydants qui va permettre de former une espèce non radicalaire stable qui termine la propagation.



Les hydroperoxydes formés au cours de la peroxydation lipidique peuvent se stabiliser en se décomposant sous forme de produits secondaires, moins instables et qui pourront diffuser et provoquer l'oxydation de biomolécules.

Les produits secondaires sont de type alcanes, cétones, alcools, furanes et aldéhydes, ces derniers peuvent diffuser à travers les membranes par diffusion passive (Guéraud et al, 2010). Ces agents sont les plus toxiques et les plus réactifs et de ce fait ont été les plus étudiés. Parmi les aldéhydes, appelés aussi composés carbonyles réactifs (reactiv carbonyl compounds ou RCC) on retrouve des agents saturés, α,β -insaturés (alkenals: acroléine, heptenal, ...), 4-hydroxy- α,β -insaturés (4-hydroxy-alkenals = 4-HNE, 4-HHE....), les 4-hydroperoxy- α,β -insaturés (4-hydroperoxy-alkenals), les 4-oxo- α,β -insaturés (4-oxo-alkenals), les époxy- α,β -insaturés, les diènes conjugués... Parmi les aldéhydes générés lors de l'attaque oxydative des AGPI, le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonanal (4-HNE), et l'acroléine sont parmi les plus abondants.

Les aldéhydes forment des adduits et des cross-links sur les macromolécules telles que les protéines, l'ADN ou encore les phospholipides : on parle alors de ALE pour advanced lipoperoxidation end-products pour désigner ces adduits.

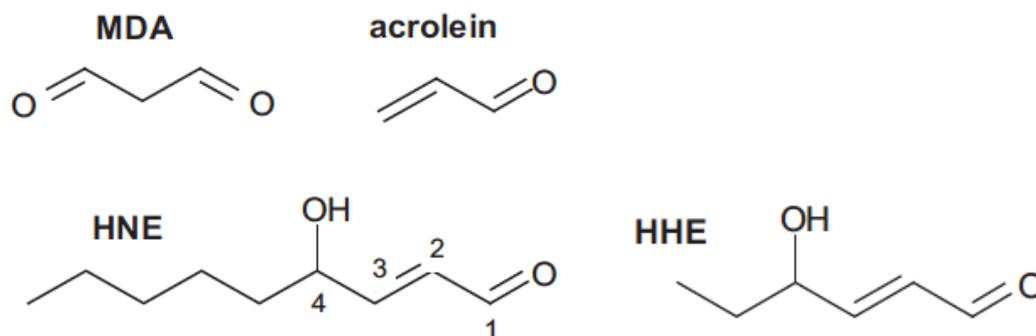


Figure 25 : Aldéhydes issus de la peroxydation lipidique (Guéraud et al, 2010)

- **MDA**

Il est issu de la peroxydation d'AGPI possédant au moins 3 doubles liaisons tels que l'acide arachidonique (20 :4) ou l'acide docosahexaénoïque (22 :6). Il est généré à partir de la plupart des AGPI ce qui fait de lui le produit de peroxydation lipidique majeur en terme de quantité (Guéraud et al, 2010).

Il est le plus mutagène des produits de peroxydation lipidique et est reconnu comme étant un biomarqueur de la peroxydation lipidique (Mateos et al, 2005). Il est classiquement mesuré par le dosage des TBARS : formation d'un produit par sa réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBA) que l'on mesure par spectrophotométrie.

Le MDA est également impliqué dans la formation de pigments fluorescents de type lipofuscines au cours du vieillissement, de par la formation d'adduits de MDA sur les protéines. (Chowdhury et al, 2004 ; Guéraud et al, 2010)

- **Les 4 hydroxyalkenals**

Parmi les 4-hydroxy alkenals on trouve le 4-hydroxyhexenal issu de la peroxydation des n-3 AGPI (Nakamura et al, 1977), le 4-HNE issu de la peroxydation des n-6 AGPI (Benedetti et al, 1980).

Le 4-HHE et le 4-HNE ont en commun 3 groupes fonctionnels : une fonction aldéhyde sur le carbone 1 (CHO), un alkane (double liaison) entre les carbones 2 et 3 et un hydroxyle (alcool) en position 4. Grâce aux groupements aldéhyde et alcool, ces molécules sont miscibles dans l'eau mais également solubles dans les lipides grâce à leur queue hydrophobe.

Nous nous intéressons plus particulièrement au 4-HNE car il est le plus toxique et il est très électrophile. (Uchida, 2003). Il peut être retrouvé dans les membranes à des concentrations allant de 10µM à 5mM en réponse à des dommages oxydatifs (Uchida, 2003).

- **Acroléine**

L'acroléine a d'abord été décrite comme un composé toxique présent dans les polluants environnementaux (fumée de cigarette, gaz d'échappement, combustion de matières organiques, plastiques...) (INRS fiche n°57), mais a ensuite été reconnu également comme un aldéhyde α -insaturé issu de la peroxydation lipidique (Esterbauer et al, 1991 ; Stevens and Maier, 2008). Ce composé est plus hydrophile que le 4-HNE donc plus réactif.

3) Formation des adduits

Les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique sont stables et peuvent diffuser à travers les membranes. Ils attaquent des cibles assez éloignées de leurs sites de formation ce qui les rend donc plus toxiques que les radicaux libres. Leur toxicité vient de leur capacité à former des adduits sur différents types de biomolécules telles que les protéines, lipides, ADN, phospholipides ou tout autre molécule comportant des groupements amines ou thiols (Petersen and Doorn, 2004), mais également à former des cross-links entre les protéines (Negre-Salvayre et al, 2008).

Nous nous intéressons plus particulièrement à la formation d'adduits sur les protéines, ou accumulation de protéines carbonylées et stress carbonyle, ou modification post-traductionnelle non enzymatique des protéines.

Le 4-HNE réagit principalement en formant des adduits Michael et des bases de Schiff.

Les adduits Michael se forment préférentiellement par réaction avec les résidus cystéines mais aussi histidines et lysines (cf figure 26). En effet les aldéhydes vont réagir de façon très

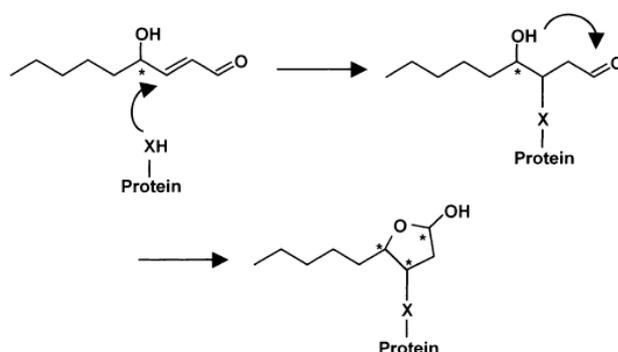


Figure 26 : Michael addition du 4-HNE sur une protéine X possédant soit un groupement thiol (résidus cystéines), soit un groupement imidazole (résidus histidines) soit un groupement amine primaire (résidus lysines) (Uchida, 2003).

réactive avec les groupements thiols des résidus cystéines mais les adduits formés sont moins stables que ceux issus de la réaction avec les groupements imidazoles des histidines (Petersen and Doorn, 2004). La réaction des aldéhydes implique la formation d'une liaison covalente entre le carbone 3 des 4-hydroxy-alkénals et les groupements amines ou thiols des protéines pour donner des adduits de Michael puis vont se cycliser par déshydratation interne pour se stabiliser. (Uchida, 2003 ; Schaur, 2003).

Les bases de Schiff (cf figure 27) consistent en une réaction entre le groupement carbonyle de l'aldéhyde et le groupement amine primaire d'une molécule cible formant une base de Schiff (Guéraud et al, 2010, Dalleau et al, 2013).

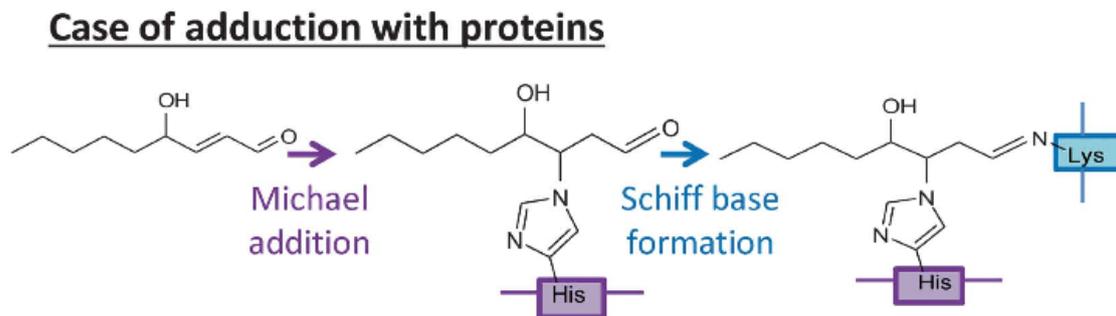


Figure 27 : Formation de bases de Schiff du 4-HNE avec une amine primaire d'une protéine. (Dalleau et al, 2013)

Certains composés permettent de limiter la formation d'adduits à différents niveaux :

- Les antioxydants limitent la formation de produits de peroxydation lipidique, soit en empêchant la formation d'EROs et la génération d'hydroperoxydes, soit en réagissant avec les radicaux peroxydes pour former des espèces non radicalaires (Cillard et Cillard, 2006 ; Nègre-salvayre et al, 2008).

Il existe également des piègeurs de carbonyles qui réagissent avec les aldéhydes pour limiter la formation d'adduits sur des molécules cellulaires (Nègre-Salvayre et al, 2008).

Certains anti-oxydants sont également des piègeurs de carbonyles, en particulier le GSH qui protège les cellules contre le stress oxydant, et est très réactif avec le 4-HNE (Petersen and Doorn, 2004). De même la N-acétyl cystéine permet de limiter la formation d'adduits 4-HNE (Nègre-Salvayre et al, 2008).

- Les piégeurs de carbonyles :

- les dérivés de l'hydrazine (hydrazine, hydralazine, aminoguanidine) favorisent la rupture des liaisons covalentes entre l'aldéhyde et la protéine pour se lier au groupement carbonyle des aldéhydes ou des cétones donnant ainsi un hydrazone (Galvani et al, 2008).
- Les dérivés de la vitamine B6 (pyridoxine) : (vitamine B6, Pyridoxamine, Pyridoxal isonicotinoyl hydrazones). Ils agissent en permettant la réduction du glutathion pour revenir à sa forme GSH, et en favorisant la synthèse de Cys pour la biosynthèse de GSH (Grimble, 1997).
- Les dérivés des acides aminés (Carnosine ou b-alanyl-L-histidine, Histidyl hydrazide N-acétyl cystéine, S-Adenosylmethionine) : ce sont des analogues des acides aminés avec lesquels réagissent les aldéhydes, ce qui leur permet d'entrer en compétition avec les composants cellulaires afin d'en limiter la modification par des adduits) (Nègre-Salvayre et al, 2008).

4) Rôle des adduits (signalisation et conséquences en physiopathologie)

Toxiques à fortes concentrations, les aldéhydes se comportent comme des molécules bioactives à faibles concentrations. De par leur propriété amphiphile, ils diffusent de façon passive à travers les membranes, et peuvent ainsi modifier les protéines des membranes, du cytoplasme et du noyau, loin de leur site de formation initiale. (Pizzimenti et al, 2013). La formation des adduits sur les protéines peut modifier leur structure, entraînant une perte partielle ou totale de leurs fonctions.

Selon leur concentration et le type cellulaire, l'action des aldéhydes porte sur des voies de signalisations différentes, l'expression de gènes, des effets pro- ou anti-prolifératifs mais également pro- ou anti-apoptotiques (Uchida, 2003).

Le 4-HNE est très étudié depuis de nombreuses années cependant les protéines cibles du 4-HNE ne sont pas toutes identifiées.

A doses faibles, dans les tissus et le plasma, le 4-HNE intervient sur la régulation de nombreux processus comme la prolifération et la différenciation, la transduction de signaux. A doses élevées, il est toxique et active l'apoptose.

Le 4-HNE peut s'accumuler dans les membranes et modifier leur structure et leur fluidité en interagissant avec les phospholipides. Il peut également modifier des molécules

membranaires telles que certains récepteurs (Nègre-Salvayre et al, 2008 ; Riahi et al, 2010). Les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) comme l'EGFR et le PDGFR sont des glycoprotéines transmembranaires, qui possèdent une activité tyrosine kinase sur leur domaine cytoplasmique. L'activation de ces récepteurs par un ligand classique ou indépendamment du ligand, induit leur autophosphorylation, et l'activation des voies de signalisation en aval. Le 4-HNE, à doses non toxiques, forme des adduits sur ces molécules, et peut activer ces récepteurs et l'activation des voies associées (ERK)1/2 de même que la prolifération cellulaire (Riahi et al, 2010 ; Suc et al, 1998 ; Escargueil-Blanc et al, 2001). En revanche, à des doses plus élevées de 4-HNE, l'accumulation d'adduits sur les récepteurs de même que des temps d'exposition prolongés, modifient la réponse des récepteurs à leur propre ligand et donc la prolifération (Liu et al., 1999; Vindis et al., 2006). En dehors des récepteurs membranaires, le 4-HNE serait impliqué dans l'activation de kinases telles que les PKC, l'adénylate cyclase, la phospholipase C , et la phospholipase D (Uchida, 2003 ; Leonarduzzi et al, 2004 ; Nègre-Salvayre et al, 2008).

Certains travaux montrent que des doses non toxiques de 4-HNE induisent l'expression de gènes anti-oxydants comme l'hème-oxygénase et la thioredoxine-1 (Chen et al, 2005; Siow et al, 2007) ou encore la glutathione S-transférase (GST) qui catalyse la réaction des aldéhydes avec le GSH réduit. (Fukuda et al, 1997). Les mécanismes impliquent l'activation par le 4-HNE de la voie des MAPK et du facteur de transcription Nrf2.

Les effets toxiques du 4-HNE sur l'apoptose et la mort cellulaire, ont été largement étudiés, en particulier la voie c-Jun-N-terminal kinase (JNK) p38 et AP-1. Cette voie est activée par différentes doses de 4-HNE et donne des résultats divergents sur la prolifération, certaines réponses inflammatoires et l'apoptose (Petersen and Doorn, 2004; Leonarduzzi et al, 2005).

D'autres voies seraient impliquées dans les mécanismes pro-apoptotiques induits par le 4-HNE, telles que l'augmentation d'expression des ARNm et des protéines de la voie de mort cellulaire Fas, Bax ou encore les caspases pro-apoptotiques (de Villier et al, 2007). Le 4-HNE serait apoptotique en altérant les fonctions mitochondriales, en perturbant le métabolisme du GSH en induisant un stress oxydant mitochondrial massif d'où la libération du cytochrome c vers le cytosol et l'activation de caspases pro-apoptotiques (Raza and John, 2006).

Le 4-HNE serait inducteur des voies du stress, du fait de la modification des protéines qui s'accumulent dans le réticulum endoplasmique, et d'une activation de l'UPR (Vladykovskaya al, 2012, Wu et al, 2012).

Il peut également modifier directement les protéines chaperonnes résidentes du réticulum endoplasmique comme la protéine disulfide isomérase (PDI), ou la GRP78 ce qui inhibe leurs fonctions d'aide au repliement des protéines et conduit à un stress du RE et à l'apoptose (Muller et al, 2013 ; Galligan et al, 2014).

Par ailleurs, le 4-HNE peut participer indirectement à la mort cellulaire en induisant des dysfonctions dans les mécanismes de protection tels que l'expression de gènes dépendants du NF- κ B, ou encore dans le renouvellement des protéines par le protéasome. Le nuclear factor- κ B ou NF- κ B est un facteur de transcription qui régule les gènes pro- et anti-inflammatoires, la survie cellulaire et la prolifération. Son activation nécessite la phosphorylation de son inhibiteur I κ B pour être ensuite dégradé. Le 4-HNE inhibe l'activation de NF- κ B en bloquant la phosphorylation d'I κ B (Uchida, 2003).

Le 4-HNE modifie le protéasome. En effet les protéines carbonylées ou agrégées sont de moins bons substrats pour le protéasome (Friguet, 2006 ; Grune and Davies, 2003). Par ailleurs, les aldéhydes peuvent former des adduits directement sur les sous-unités protéolytiques du protéasome (Ferrington and Kappahn, 2004) et empêcher ainsi le renouvellement des protéines cellulaires.

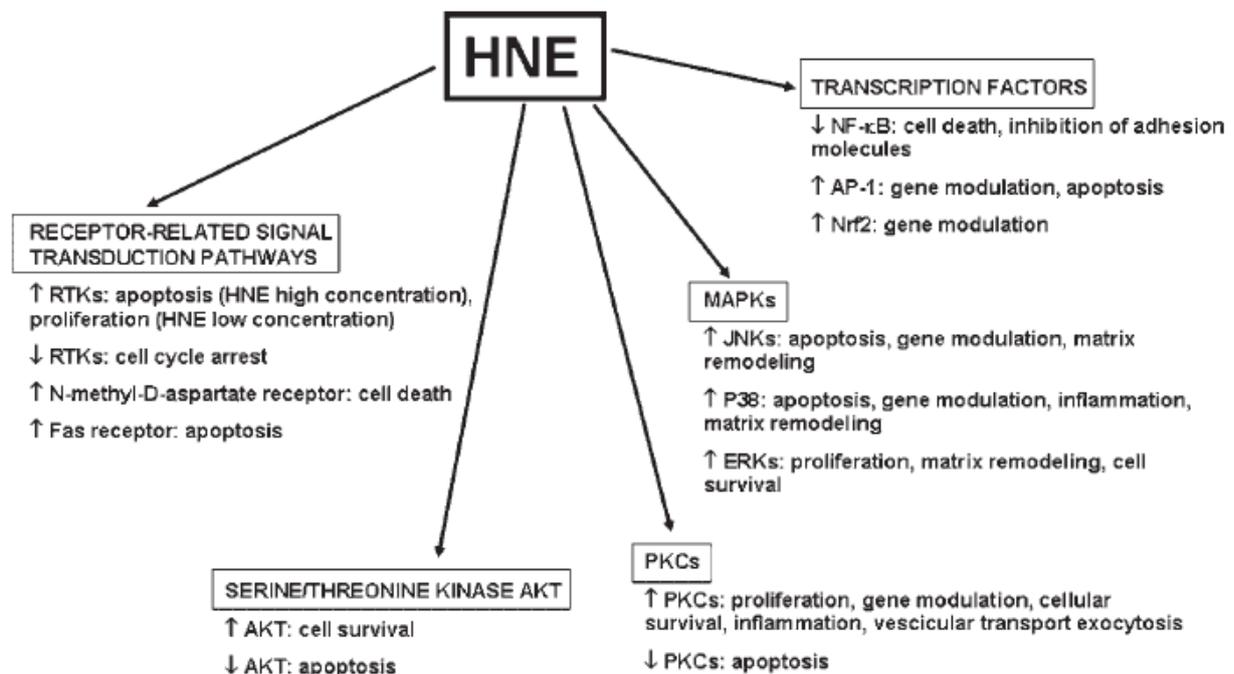


Figure 28 : Les différentes voies modulées par le 4-HNE (Poli et 2007)

De nombreux travaux rapportent la formation et l'implication des adduits dans la physiopathologie de maladies telles que des cancers, les lymphoedèmes, les maladies hépatiques, les dysfonctions vasculaires fœtales dues à des pré-éclampsies (Nègre-Salvayre et al, 2010), le syndrome de détresse respiratoire aigue, la maladie de Crohn ou encore des maladies liés au vieillissement :

- **Maladies neurodégénératives :** Le système nerveux central est très sujet à la peroxydation lipidique car il possède un grand nombre d'AGPI dans les membranes cellulaires (des neurones notamment), un taux élevé de métaux de transition et peu de défenses antioxydantes. Le 4-HNE est retrouvé à des concentrations élevées dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson et de sclérose latérale amyotrophique (Nègre-Salvayre et al, 2010).
- **Athérosclérose :** Les produits de peroxydation lipidiques jouent un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires. Des modifications du flux sanguin ainsi que des agents endogènes ou exogènes peuvent provoquer un stress oxydant dans les parois artérielles. Les produits de peroxydation lipidique formés s'accumulent dans les lésions et participent à l'inflammation, à la migration des cellules, à leur dysfonction et à l'apoptose. (Nègre-Salvayre et al, 2010). Au cours des pathologies cardiovasculaires, on retrouve les produits de peroxydation lipidique à des taux élevés dans les lésions mais également dans le plasma (Torzewski et al, 1998).
- **Diabète :** Les produits de peroxydation lipidique, présents en grande quantité chez les personnes diabétiques peuvent affecter les fonctions des cellules β des îlots de Langerhans et ainsi amener des complication sévères, et inhiber les voies de signalisation métabolique (telle que voie de transduction et de transport du glucose) (Demozay et al, 2008 ; Reagan et al, 2000).

5) Implication dans le vieillissement

Les espèces réactives de l'oxygène participent, à des concentrations physiologiques, aux mécanismes et voies de signalisation cellulaire, expression génique, élimination de pathogènes. (Höhn et al, 2013)

Au cours du vieillissement, un déséquilibre se crée entre production et détoxification de ces EROs, d'où un stress oxydant qui provoque des dommages oxydatifs contribuant eux-mêmes aux processus de vieillissement (mutations de l'ADN, oxydation des protéines, peroxydations lipidiques) (Höhn et al, 2013 ; Finkel ad Hallbrook, 2000).

Cette augmentation du stress oxydant dans les tissus âgés est associée à l'accumulation de produits de peroxydation lipidique (4-HNE, MDA) ainsi que de protéines carbonylées. Ces composés sont connus pour être des marqueurs d'oxydation, et leur formation augmente avec l'âge (Negre-Salvayre et al, 2010). Cependant leur implication propre dans les mécanismes du vieillissement, et des tissus conjonctifs est assez peu connue.

Parallèlement aux ALEs, on retrouve au cours du vieillissement une augmentation des produits de glycation avancés tels la carboxyméthyl-lysine (CML), la pyrroline, et la pentosidine qui sont formés par la glycation non enzymatique et l'oxydation (glycoxydation) des composés cellulaires. Les AGEs tout comme les ALEs sont des produits d'oxydation.

Des études ont montré l'implication des AGEs dans les mécanismes du vieillissement telle que la rigidification artérielle. En effet ils forment des cross-links entre les molécules de collagène et entre celles d'élastine (ou de tropoélastine qui possèdent plus de résidus lysines disponibles) sur les résidus lysines et arginine (Sell and Monnier, 2012).

Une étude portant sur l'analyse des effets de la carboxyméthyl lysine sur l'élastine au cours de l'élastose actinique, a montré que l'élastine est modifiée par des AGEs et devient un moins bon substrat pour l'élastase des ploynucléaires neutrophiles, ce qui participe à son accumulation dans les peaux photoexposées puisqu'elle est alors modifiée et non dégradée. L'utilisation d'aminoguanidine reverse cet effet.

D'après ces données, les modes d'action des ALEs étant comparables à ceux des AGEs (Baynes et al, 2000) nous avons étudié l'effet des ALEs sur les protéines de matrice extracellulaire et notamment l'élastine, afin de déterminer si les adduits peuvent se former directement sur ces molécules comme le font les AGEs, et s'ils participent ainsi aux modifications des tissu conjonctif au cours du vieillissement chronologique et photoinduit.

PARTIE 2

OBJECTIFS DE LA THESE

A decorative graphic element consisting of a horizontal line that tapers to a point on the left and a vertical line on the right, forming an L-shape that underlines the text.

Objectifs de la thèse

Le vieillissement est un processus physiologique multifactoriel à l'origine d'une dégénérescence progressive des divers systèmes de l'organisme, qui peut favoriser le développement de pathologies liées à l'âge. On distingue le vieillissement chronologique et le vieillissement photoinduit, qui présentent des voies communes mais également un processus différent. Le stress oxydant est impliqué dans les deux types de vieillissement. Les espèces réactives de l'oxygène attaquent les composants cellulaires tels que les lipides, et en particulier les acides gras polyinsaturés. La peroxydation lipidique génère des dérivés d'oxydation parmi lesquels des aldéhydes (4-HNE, acroléine, MDA...), dont la réactivité chimique lui permet de réagir avec des groupements thiols et des fonctions amines sur lesquels il forme des adduits.

Le stress carbonyle serait induit par les UV, et pourrait participer au vieillissement intrinsèque et au photovieillissement, *via* la modification des protéines, qui induit des dysfonctionnements cellulaires et des anomalies de la matrice extracellulaire.

Nous avons étudié les effets des aldéhydes et plus particulièrement du 4-HNE sur le devenir de l'élastine au cours du vieillissement.

Dans une première partie nous avons étudié l'effet des aldéhydes (4-HNE) dans le photovieillissement. Nous avons cherché à évaluer si les UV-A génèrent des aldéhydes dans la peau de souris hairless photoexposées, leur effet sur l'élastine (modification), et l'effet protecteur d'agents piègeurs de carbonyle, afin de protéger contre le développement de l'élastose actinique chez des animaux photoexposés.

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons étudié l'effet du 4-HNE sur le renouvellement de l'élastine. En effet le taux d'élastine diminue au cours du vieillissement et son renouvellement est insuffisant. Par ailleurs, les travaux précédents de l'équipe ont montré que le 4-HNE modifie et active les récepteurs à tyrosine kinases, et les voies de signalisation en aval. Nous avons étudié la voie de signalisation du TGF- β qui est élastogénique, et pourrait être modifiée ou altérée par le stress carbonyle dans la peau ou les vaisseaux.

PARTIE 3

MATERIELS ET METHODES



I. CULTURE CELLULAIRE

- **Types cellulaires**

Les fibroblastes humains ont été isolés à partir de peaux d'adultes sains volontaires (AS.2410-07), immortalisés par transfection de l'antigène SV40T avec la Lipofectamine LTX Reagent et le Plus Reagent (Invitrogen Life Technologies).

Les fibroblastes murins sauvages ont été isolés à partir de souris sauvages (strain 129/SV). Les fibroblastes B82L (déficient en EGFR) et B82LK+ (B82L transduits avec de l'EGFR) nous ont été donnés gracieusement par le Dr M. Weber (Charlottesville, Va).

Les fibroblastes murins et humains sont cultivés en milieu de culture DMEM Glutamax® (Invitrogen) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 40 µmol/L de glutamine et antibiotiques (100 U/ml de pénicilline, 100 mg/ml streptomycine) dans un incubateur humidifié à 37°C et 5% de CO₂. 24h avant les expérimentations les cellules sont privées dans un milieu RPMI Glutamax® (Invitrogen) sans SVF. Les pré-incubations des cellules avec le 4-HNE sont effectuées en milieu Hanks' Balanced Salts Solution (HBSS, Invitrogen life Technologies) pour éviter une liaison de 4-HNE libre avec les groupements thiols et amines présents dans les milieux de culture.

- **Transfection des siRNA**

Les fibroblastes murins ont été transfectés avec des siRNA EGFR murins (sc-29302) ou des siRNA contrôlés (sc-37007) de chez Santa Cruz Biotechnology à la concentration finale de 100nm dans l'Hyperfect (QUIAGEN). La transfection est réalisée dans 50% de milieu DMEM Glutamax® 10% SVF et 50% OptiMEM (Invitrogen Life Technologies) pendant 24h.

II. TEST DE VIABILITE CELLULAIRE

- **Test d'incorporation du MTT**

Le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ou MTT est un sel de tétrazolium (jaune, soluble) réduit en formazan (bleu, insoluble) par les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules vivantes. Les cellules sont mises en culture

en plaque 6 puits, traitées 3h aux différentes concentrations de 4-HNE en HBSS puis le milieu est remplacé par du milieu RPMI sans sérum contenant 0.5 mg/ml de MTT. Après 30 minutes d'incubation à 37 °C le milieu est remplacé par 1ml de diméthyl sulfoxyde (DMSO) afin de dissoudre les cristaux de formazan. La lecture se fait par spectrophotométrie à 590nm, les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport au contrôle.

- **SYTO13 / Iodure de propidium (IP)**

Le SYTO-13 et l'iodure de propidium (IP) sont deux agents intercalant de l'ADN. Le SYTO-13 est perméant et colore en vert les noyaux des cellules ne présentant pas de modification de perméabilité membranaire. L'IP est un intercalant non perméant qui colore les noyaux des cellules présentant des modifications de perméabilité membranaire. Ces deux sondes fluorescentes permettent de discriminer les cellules vivantes (chromatine diffuse verte) des cellules apoptotiques (chromatine condensée verte ou orange associée à une fragmentation nucléaire) ou nécrotiques (chromatine condensée rouge). Les cellules sont incubées 30 mn à 37 °C avec un mélange de SYTO-13 (Molecular Probes) et d'IP (Sigma) puis comptées en microscopie à fluorescence.

III. MESURE D'INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIÉE

La synthèse de l'ADN est évaluée par l'incorporation de thymidine tritiée ($[^3\text{H}]$ thymidine). Les cellules sont marquées pendant 12 heures avec 0.5 $\mu\text{Ci/mL}$ de $[^3\text{H}]$ thymidine. Les cellules sont ensuite récupérées et lavées dans du PBS. Après addition d'acide perchlorique 3%, le matériel précipité est dissous dans de la soude 1N avec 1 % de SDS. La radioactivité est mesurée par scintillation liquide (Packard Tricarb 4530) dans un mélange scintillant émulsifiant pour échantillons aqueux (Aquasafe 300 Plus).

IV. RT-PCR QUANTITATIVE

Les cellules sont récupérées dans 1ml de milieu de culture et centrifugées à 4°C. L'extraction des ARN cellulaires se fait par addition de réactif TRIzol (Invitrogen) sur les culots cellulaires. La quantification des ARN est effectuée par dosage à l'aide du NanoDrop ND-1000. 1 μg d'ARN est utilisé pour effectuer la reverse transcription à l'aide du kit « high-capacity cDNA reverse transcription kit » (Applied Biosystems, Life technologies). Le Fast

SYBR green master mix (Applied Biosystems, Life technologies) et le système ABI StepOne+ real-time PCR system (Applied Biosystems, Life technologies) sont utilisés pour quantifier les ARNm de l'élastine et de GAPDH dans les fibroblastes humains. Les primers utilisés sont les suivants : élastine forward CTAAGGCAGCCAAGTATGGA, reverse CCCGTAAGTAGGAATGCCTC, GAPDH forward CCTCCCGCTTCGCTCTCT, reverse GCTGGCGACGCAAAGA.

Les conditions d'incubation sont 95°C pendant 20 s, suivi de 40 cycles de 3 s à 95°C, extension pendant 30 s à 60°C. Chaque échantillon est fait en double et les données sont analysées à l'aide du logiciel StepOne+ v2.2.2. L'expression des ARNm de l'élastine est normalisée par rapport à celle des ARNm de GAPDH.

V. MESURE DE L' α -ELASTINE

Le kit "Fastin Elastin assay kit" (Biocolor) mesure l'élastine soluble et l'élastine insoluble après solubilisation sous forme de polypeptides d' α -élastine. Les cellules sont récupérées dans du PBS, et centrifugées (6000 rpm, 5 minutes). Les culots sont repris dans 400 μ l d'acide oxalique à 0.25M et chauffés à 100°C pendant 2 périodes de 1h pour dégrader tous les composants de la matrice extracellulaire excepté l'élastine. La précipitation de l' α -élastine est obtenue après addition de 300 μ l de « precipitating reagent » (contenant de l'acide trichloracétique et d'acide hydrochlorique) à 50 μ l de chaque extrait, mélange pendant 15min et centrifugation à 10 000 g pendant 10 min. 1ml de réactif de coloration « dye reagent » est ajouté aux précipités et les tubes sont mis sous agitation pendant 90 min pour permettre la réaction entre le colorant et l' α -élastine. Les culots colorés sont repris dans 250 μ L de réactif de dissociation (dye dissociation reagent) puis transférés dans les puits d'une plaque 96 puits pour mesurer l'absorbance de chaque échantillon à 513 nm (lecteur de plaque Tecan). Les absorbances sont comparées à une gamme étalon faite à partir de concentrations connues d' α -élastine.

VI. ELISA 4-HNE

Les concentrations cellulaires et tissulaires de 4-HNE sont déterminées avec le kit OxiSelect™ HNE-His Adduct ELISA (Cell Biolabs'), en suivant les instructions du fournisseur. Les cellules ou les tissus sont lysés dans du tampon de lyse sans Triton X-100 puis dilués dans du PBS pour avoir des concentrations protéiques de 10 μ g/100 μ l.

100 µl de la gamme Reduced/HNE-BSA ou d'échantillons sont déposés dans les puits puis incubés toute la nuit à 4°C.

Après plusieurs rinçages en PBS, 200µl d'Assay diluent sont ajoutés à chaque puits pendant 2h à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés avec le tampon de rinçage fourni, incubés 1h avec l'anticorps primaire anti-His-HNE adduits, suivi de l'anticorps secondaire conjugué à la HRP. Après rinçage, 100µl de substrat sont ajoutés dans chaque puits et incubés à température ambiante pendant 3-5 minutes (suivant la coloration). La réaction est arrêtée 100µl de solution stop. L'absorbance est lue à 450nm (Tecan) et les concentrations sont obtenues en comparant les D.O. à celles de la courbe étalon. Les concentrations en 4-HNE sont rapportées au nombre de cellules en culture ou au poids de tissus.

VII. TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances)

En milieu acide, à 95°C, se forment des complexes entre les produits d'oxydation lipidique (malondialdéhyde ou MDA, 4-hydroxynonal et autres composés aldéhydiques) et le TBA (2-thiobarbituric acid) qui peuvent être dosés en fluorescence (à 535nm) par rapport à une gamme d'étalonnage d'un précurseur du MDA.

VIII. Détermination des ERO intracellulaires

La mesure des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est déterminée grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente carboxy-H2DCFDA diacétoxyméthyl-ester (H2DCFDA-AM).

Les fibroblastes sont mis en cultures, puis pré-incubées dans du milieu de culture RPMI sans SVF, contenant de la carnosine ou de la NAC (1mM). Pour l'exposition aux cinétiques d'UVA le milieu est ensuite rincé et remplacé par de l'HBSS sans agent. Après l'exposition, le milieu de culture est à nouveau remplacé par un milieu RPMI contenant la sonde H2DCFDA-AM (5µM), ainsi que les agents carnosine ou NAC, pendant 30 min à 37°C. A la fin de l'expérimentation, les cellules sont rincées 3 fois en PBS, puis mises en présence de 1 ml de Tris-HCl 50 µM, pH 7.0, et soniquées. La fluorescence des homogénats cellulaires est mesurée (exc/em. 495/525 nm, respectivement). Les résultats sont exprimés en % de fluorescence par mg de protéines du contrôle traité.

IX. WESTERN BLOT ET DOT BLOT

- **Extraction et dosage des protéines cellulaires**

Après stimulation, les cellules sont lavées dans du PBS froid puis lysées et solubilisées dans un tampon d'extraction (50 mM HEPES pH 7.4, NaCl 150 mM, glycerol 10%, deoxycholate de sodium 0.5%, Triton X-100 1%, 1 mM sodium orthovanadate (NaVO₄), 10 mM β-glycerophosphate, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), sodium fluoride (NaF), 5 mM, leupeptin 2 µg/ml, pepstatin 2 µg/ml, aprotinin 10 µg/ml)

L'extrait cellulaire est lysé mécaniquement à la seringue et incubé pendant 30 minutes dans la glace avant centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 minutes. Les protéines présentes dans le surnageant sont dosées par la méthode colorimétrique de Bradford (Biorad).

- **SDS-PAGE et Western Blot (WB)**

Les échantillons (30 à 50µg de protéines) sont repris dans du tampon de dénaturation 4X (Tris 200 mM, pH 6,8 ; SDS 8% ; glycérol 40% ; bleu de bromophénol 0.4%, β-mercaptoethanol 16%) (1 volume de tampon de dénaturation pour 3 volumes d'échantillon), chauffés 10 min à 95°C pour être dénaturés. Ils sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) pour faire migrer les protéines selon leur poids moléculaire (tampon de migration : 25 mM de Tris, 192 M glycine, 0,1 % SDS). Les protéines sont électrotransférées en milieu liquide (tampon de transfert : 50mM Tris, 380 mM glycine, 0,1 % SDS, 20 % de méthanol) sur une membrane PVDF (Millipore). Après saturation des sites de liaison non spécifiques, la membrane est incubée sous agitation pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. Après incubation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, la membrane est révélée à l'aide du kit de chimioluminescence ECL (Amersham). Les anticorps β-actine, tubuline et MAPK total sont utilisés afin de vérifier que les quantités de protéines déposées.

- **Dot Blot**

Cette technique a été utilisée pour montrer la modification de l' α-élastine par le 4-HNE ou l'acroléine. L'α-élastine (1mg) est incubée avec des concentrations variables de 4-HNE ou d'acroléine (1 µM à 1 mM) pendant 48h à 37°C. A la fin, 1 µg d'α-élastine est déposé (spot) sur membrane de nitrocellulose. Après séchage, la membrane est saturée et incubée avec l'anticorps primaire, comme décrit ci-dessus.

X. IMMUNOFLUORESCENCE SUR CELLULES

Les cellules sont cultivées et traitées sur des lamelles de verre puis fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes à 4°C, et perméabilisées avec du PBS 0,1% Triton X100 pendant 10 minutes à température ambiante. Après saturation des liaisons non spécifiques pendant 1h dans du PBS 3% BSA ou 5% lait, les lamelles sont incubées pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire conjugué avec un fluorochrome est déposé pendant 45 min à température ambiante. Un marquage Dapi est réalisé pour colorer les noyaux. Les lamelles sont montées sur lame et la fluorescence est visualisée sur un microscope confocal à fluorescence Zeiss LSM 510.

XI. IMMUNOHISTOCHEMIE ET FLUORESCENCE

Les artères et peaux murines sont prélevées sur des souris (hairless ou C57/bl6) puis fixées en paraformaldéhyde 4% pendant 24h. Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine puis coupés (10µM) et montés sur lames. Les lames sont déparaffinées par 3 passages successifs dans des bains de toluène. Les échantillons sont réhydratés par 3 bains d'éthanol.

- **Immunofluorescence (co-marquages)**

Un démasquage des antigènes est effectué par une solution de citrate pH 6 (chauffé 20min puis refroidi 30 min). Les sites non spécifiques sont bloqués avec du PBS 5% lait. L'échantillon est incubé 60 minutes avec un premier anticorps primaire, et après rinçage avec le 2^{ème} anticorps primaire. Les échantillons sont incubés pendant 30 minutes avec un bain contenant les 2 anticorps secondaires. Un marquage Dapi est réalisé pour colorer les noyaux, les lames sont ensuite montées avec des lamelles et la fluorescence est visualisée sur un microscope confocal à fluorescence Zeiss LSM 510.

- **Immunohistochimie**

Les échantillons sont marqués en hémalum/éosine, ou verhoeff, ou immunohistochimie avec l'anticorps anti 4-HNE michael adduits. Le kit utilisé est le kit DakoCytomation EnVision + Dual Link System-HRP (DAB+). Dans un premier temps, toute activité peroxydase endogène est inhibée en incubant l'échantillon avec du Dual Endogenous Enzyme Block pendant 5 à 10 minutes. Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués avec 10 % de sérum provenant de la même espèce que l'anticorps secondaire. L'échantillon est incubé pendant 30 minutes

avec l'anticorps primaire, puis pendant 30 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La peroxydase est révélée en incubant les échantillons pendant 5 à 10 minutes avec du tampon contenant de la 3',3'-diaminobenzidine. Après contre-coloration à l'hématoxyline, le montage des lames est réalisé, après deshydratation, avec le milieu de montage Eukitt.

XII. ELASTINE-ORCEINE

L'élastine-orcéine est mise en suspension (10 mg/ml) dans un tampon Tris 0,2M, pH 8,0, et incubée (1mg), avec des concentrations variables de 4-HNE ou d'acroléine (1 μ M à 1 mM) pendant 48h à 37°C. L'élastine-orcéine est lavée 3 fois avec du Tris 0,2M pH 8,0, et incubée avec 0,1 U/ml de leukocyte elastase (Sigma) pendant 18h. Après centrifugation à 10 000 trs/mn, la densité optique des surnageants est mesurée (lecteur plaque TECA, 578 nm).

XIII. Animaux

- **Souris Hairless**

Le protocole expérimental (N°12/1048/10/13), est appliqué en accord avec la législation française et a été approuvé par le comité d'éthique local pour l'expérimentation animale.

Des souris Skh: h-1 Hairless (Charles River Laboratories) (10 animaux / état) sont soit non exposées ou exposées quotidiennement aux rayons UV-A (20J/cm²/jour), jusqu'à 600 J/cm². Les animaux des groupes traités, ont été badigeonnés quotidiennement par voie topique de polypropylène glycol (avec 30% d'eau), contenant ou non de la carnosine (1 mM), 30 minutes avant et immédiatement après l'exposition aux UV. Les animaux sont sacrifiés (par dislocation cervicale) après injection de kétamine intraperitoneus (150 mg / kg de poids corporel) et de xylazine (10 mg / kg). Les peaux sont récupérées, une partie a été fixé dans du PFA (4% dans du PBS), et inclus dans la paraffine pour l'analyse histologique. Une autre partie a été conservée congelée à -80 ° C, pour une analyse de l'élastine et des adduits de 4-HNE.

- **Souris C57/bl6**

Le protocole expérimental (N ° 12/1048/10/13), est appliqué en accord avec la législation française et a été approuvé par le comité d'éthique local pour l'expérimentation animale. Les souris C57/BL6 jeunes (6 semaines) et âgées (1 an) (5 animaux par groupe) sont sacrifiées

par dislocation cervicale après injection de kétamine en intraperitonéal (150 mg/kg de poids corporel) et de xylazine (10 mg/kg). Les peaux et les aortes sont récupérées, une partie de la peau et des segments artériels est fixée dans du PFA (4% dans du PBS), et inclus dans la paraffine pour l'analyse histologique. Un autre segment de chaque tissu a été conservé congelé à -80°C, pour une analyse de l'élastine et des adduits de 4-HNE.

XIV. ANALYSES STATISTIQUES

Les données sont exprimées en moyenne +/- SEM ou SD. Les points traités sont comparés à leur point contrôle respectif et les calculs statistiques des différences de moyennes sont réalisés par le t test non apparié (Sigma stat software, San Jose, CA, USA. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée statistiquement significative ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

Tableau 3: Produits utilisés

Nom du produit	Fournisseur	Utilisation, concentrations
Produits		
4-HNE	Merck Calbiochem	Aldéhyde issu de la peroxydation lipidique (2 µM)
Acroléine		
AG1478	Merck Calbiochem	inhibiteurs de EGFR (5 µM)
L-carnosine	Sigma Aldrich	piégeur de carbonyles (1mM)
Elastine-orcéine	Sigma aldrich	
N-acetyl L-cysteine (NAC)	Sigma Aldrich	Anti-oxydant, piégeur de carbonyles (1mM)
PD98059	Sigma Aldrich	inhibiteur des MAPK (10 µM)
SB431542	Sigma Aldrich	inhibiteurs des TGFβ-RI (10 µM)
TGF-β1	Santa Cruz Biotechnology	Cytokine pro-élastogène (1ng/ml)

Tableau 4: Anticorps utilisés

Nom de l'anticorps	Fournisseur	Utilisation, concentrations
Anticorps		
Anti-4HNE (Michael adducts) (lapin polyclonal)	Calbiochem	ICF (1/100) IH (??)
Anti-4HNE (mouse monoclonal)	K. Uchida	IH (1/400)
Anti-acroléine (mouse monoclonal)	K. Uchida	IH (1/400) DB (1/2000)
Anti- β actine (souris monoclonal)	Sigma-Aldrich	WB (1/2500)
Anti-élastine (mouse monoclonal)	Elastin products company	IH (1/200) DB (1/200)
Anti-P-EGFR (lapin polyclonal)	Cell Signaling	WB (1/1000)
Anti-EGFR (lapin polyclonal)	Santa Cruz Biotechnology	WB (1/1000)
Anti-EGFR FITC (mouse monoclonal)	BD Biosciences	ICF et IH (1/12)
Anti-phospho-p42/44 MAPK (Erk1/2)(Thr 202/Tyr204) (lapin polyclonal)	Cell Signaling	WB (1/1000)
Anti-Erk 1/2 total (lapin polyclonal)	Cell Signaling	WB (1/1000)
Anti-MMP12 (lapin polyclonal)	Epitomics	WB (1/1000)
Anti-phospho Smad 3 (lapin monoclonal)	Abcam	WB (1/1000)
Anti-phospho-Smad 2 Ser465/467 (lapin polyclonal)	Millipore	ICF (1/500)
Anti-TGIF (lapin polyclonal)	Santa Cruz Biotechnology	WB (1/500)
Anti-tubuline (souris monoclonal)	Sigma-Aldrich	WB (1/2500)

Anticorps secondaires (couplés à la peroxydase)	Santa Cruz Biotechnology	IH (1/500)
Anticorps secondaires couplés Alexa vert (longueur d'onde d'excitation 488nm)	Molecular Probes	ICF et IF (1/1000)
Anticorps secondaires couplés Alexa rouge (longueur d'onde d'excitation 546nm)	Molecular Probes	IF (1/500)
Anticorps secondaires couplés peroxydase (HRP)	Santa Cruz Biotechnology	WB (anti-lapin 1/10000 anti-souris 1/5000)

WB : Western blot ; IH : Immunohistochimie ; ICF : Immunocytofluorescence
IF:immunofluorescence; DB:Dot blot

PARTIE 4

RESULTATS EXPERIMENTAUX



Résultats expérimentaux

I. Rôle du 4-HNE induit par les UVA dans le photovieillissement

1) Introduction

Le photovieillissement est provoqué par l'exposition au rayonnement solaire et plus précisément les rayons ultra-violet (UV). Il concerne essentiellement la peau dans les zones exposées aux UV (visage, cou, décolleté, mains, avants-bras).

L'élastose actinique est une caractéristique du photovieillissement caractérisée par l'accumulation d'élastine anormale dans le derme et par la diminution du nombre et de l'activité des fibroblastes, les cellules majoritaires dans cette couche cutanée. La peau perd son élasticité, apparaît tannée, relâchée, avec des rides profondes et une pigmentation anormale. Actuellement il est encore difficile de déterminer si l'accumulation de matériel élastique observé au cours de l'élastose provient d'une synthèse de novo de l'élastine ou d'une dégradation partielle et l'accumulation de composants déjà existants (Sellheyer, 2003).

Le rayonnement UV induit un stress oxydant, quelque soit sa nature, UV-C les plus actifs mais retenus par la couche d'ozone, UV-B et UV-A (5% et 95% respectivement du rayonnement solaire). Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) provoquent des dommages directs sur les tissus et les cellules, activent des voies de signalisation inflammatoires, stimulent l'activité des metalloprotéases responsables de la dégradation de l'élastine et du collagène (Burke, 2010), telles que la MMP12 sécrétée par les polynucléaires neutrophiles qui sont attirés dans le derme, et responsables de la dégradation de l'élastine (Hawk, 1988; Cavarra et al, 2002). Toutes ces voies contribuent fortement au développement de l'élastose actinique induite par les UV.

Parmi les cibles de la peroxydation lipidique, les EROs réagissent avec les acides gras poly-insaturés, d'où la formation de composés carbonyles réactifs (aldéhydes, cétones...) tels que le 4-HNE et l'acroléine qui sont des aldéhydes plus stables que les EROs. Ces agents sont formés des adduits sur les protéines et altèrent leurs structures et fonctions.

Des travaux récents montrent que l'élastine peut être modifiée par des produits de glycation avancée (AGEs) comme la Ne-(carboxyméthyl)lysine, ce qui la rend résistante à la dégradation par l'élastase (Yoshinaga et al, 2012). Le mécanisme de modification des

protéines par les AGEs est proche de celui des aldéhydes issus de la peroxydation lipidique. Les aldéhydes pourraient donc inhiber la dégradation de l'élastine par MMP12, en la modifiant (formation d'adduits).

Dans la peau humaine, les produits de peroxydation lipidique sont retrouvés après exposition aux UV (Nicolaou et al, 2011), et l'élastine pourrait être une cible du 4-HNE généré sous l'effet des UV-A (Tanaka et al, 2001)

Dans cette première partie de notre travail, nous avons recherché si les UV-A génèrent du 4-HNE dans la peau de souris soumises aux UV-A, et les conséquences sur l'élastine. Dans ce but, nous avons exposé des souris hairless à des doses quotidiennes d'UV-A, mesuré la génération de 4-HNE dans le derme, et étudié son implication dans la modification et l'accumulation d'élastine anormale (matériel élastotique).

Un certain nombre de molécules sont capables de neutraliser les effets des aldéhydes, tels que les anti-oxydants (NAC, Glutathion) ou les piègeurs de carbonyle. La carnosine est un dipeptide dérivé d'acide aminé (β -alanyl-L-histidine) présent naturellement dans les tissus.

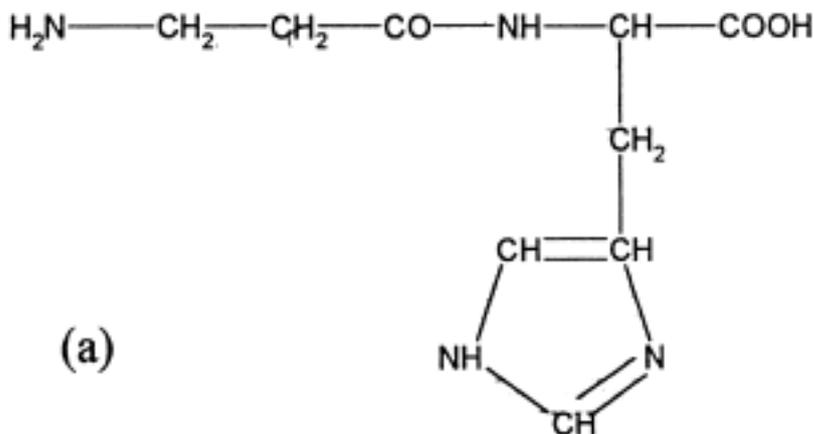


Figure 29 : Structure de la Carnosine (Hipkiss, 1998)

C'est un piègeur de carbonyle qui neutralise le 4-HNE sous forme d'adduits stables et empêche la formation de 4-HNE adduits sur les protéines. En effet les 2 acides aminés qui le constituent vont agir de façon synergique : le résidu β -alanyl catalyse la réaction de Michael qui se passe entre le 4-HNE et le résidu histidine. Nous avons étudié l'effet de la carnosine sur la génération de 4-HNE par les UV-A, et la protection de l'élastine.

2) Publication

Elastin Modification by 4-Hydroxynonenal in Hairless Mice Exposed to UV-A. Role in Photoaging and Actinic Elastosis

Pauline **Larroque-Cardoso**^{1,2}, Caroline **Camaré**^{1,2}, Florence **Nadal-Wollbold**³, Marie-Hélène **Grazide**², Mélanie **Pucelle**^{1,2}, Sandra **Garoby-Salom**^{1,2}, Patrick **Bogdanowicz**³, Gwendal **Josse**³, Anne-Marie **Schmitt**³, Koji **Uchida**⁴, Kamelija **Zarkovic**⁵, Robert **Salvayre**^{1,2} and Anne **Nègre-Salvayre**^{1,2}

¹ Inserm UMR-1048, Toulouse, France

² University of Toulouse, Toulouse, France

³ Centre européen de recherche sur la peau, Pierre Fabre Dermocosmétique, Toulouse, France

⁴ School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Japan

⁵ Division of Pathology, Clinical Hospital Centre, Zagreb, Croatia

SUMMARY

Chronic exposure to ultraviolet (UV) radiations causes photoageing and actinic elastosis. UV radiations induce an oxidative stress that is involved in photoageing. However little is known on the role of aldehydes issued from lipid peroxidation such as 4-hydroxynonenal (4-HNE) or acrolein, which are present in actinic elastosis lesions. The aim of this study was to investigate whether these agents contribute to the pathogenesis of photoageing.

Hairless mice (aged 4-6 weeks) exposed to UV-A radiations (600 J.cm⁻²), exhibited the typical features of photoageing, associated with a significant increase in 4-HNE adduct content and elastotic material deposition in the skin. Immunofluorescence studies indicated an accumulation of 4-HNE and acrolein-adducts on elastin in the dermis of UV-A-exposed mice, which was mimicked *in vitro* by incubating orcein-elastin with acrolein, this generating a resistance to its degradation by leukocyte elastase, a feature possibly involved in the accumulation of elastotic material in the dermis. A daily topical application of carnosine (1% in propylene glycol), to UV-A-exposed hairless mice, completely reversed the development of photoageing alterations, and 4-HNE-adduct formation on elastotic material. These data emphasize a new role for 4-HNE and acrolein in the mechanism of photoageing, and the preventive effect of carbonyl scavengers.

INTRODUCTION

Chronical sun exposure of face, neck, forearms or hands, causes skin photoaging, as a consequence of environmental damages due to UV radiations, (Fisher et al, 2002). It is characterized by deep wrinkles, a leathery aspect of the skin, thickness, reduced recoil capacity and microvascular fragility (Yaar and Gilchrest, 1998 ; Berneburg et al, 2000). Actinic elastosis is a prominent feature of photoaging, as it is not observed in the chronological aging (Berneburg et al, 2000 ; Kang et al, 2001). It is characterized by a basophilic degeneration and desorganization of collagen fibers, a deposition of glycosaminoglycans and by the accumulation of fragmented elastic fibers and of elastin-containing (elastotic) material (Scharffetter-Kochanek et al, 2000; Wlaschek et al, 2001).

Oxidative stress generated by UV radiations, is thought to cause direct damage to cellular components in the skin, associated with inflammatory signalling leading to the activation of redox-activated transcription factors (AP1, HIF-1a, NF-kB) and the expression of metalloproteases involved in collagen proteolysis and elastin degradation (Burke, 2010). However the accumulation of elastotic material in the skin is not fully clarified (Lewis, 2004). It is particularly unclear whether actinic elastosis results from an increased degradation or synthesis (Sellheyer, 2003). Neutrophil elastase, that is involved in elastin degradation (Hawk, 1988; Cavarra et al, 2002), may indirectly contribute to its resynthesis, as mice KO for this enzyme activity, do not develop actinic elastosis lesions (Starcher and Conrad, 1995). Elastosis could result from a decreased degradation of elastic fibers, due to the overexpression in the skin of serine protease and elastase inhibitors such as elafin (Muto et al, 2007), or to transglutaminase-mediated cross-linking on elastin (Schalkwijk et al, 2007). Other hypothesis include the modification of elastin by advanced glycation end products (AGEs) such as Nε-(carboxymethyl)lysines which render it elastase-resistant (Yoshinaga et al, 2012). The mechanism of protein modification by glycation or by AGEs precursors is common with that evoked by aldehydes issued from lipid peroxydation, such as hydroxyalkenals, malondialdehyde, or acrolein, which are generated through the oxidative attack of polyunsaturated fatty acids (Esterbauer et al, 1991; Poli et al, 2008). These lipid oxidation products are more stable than ROS, and form adducts on free amino groups and thiol residues on proteins, this progressively leading to their dysfunction. Several years ago, Tanaka and coll. (2001), reported that 4-hydroxynonenal (4-HNE) and acrolein adducts can be detected on elastin in actinic elastosis lesions in humans, which rises the question of their contribution to the extent of the pathology. However whether UV radiations generate lipid oxidation aldehydes in the skin, and whether these agents contribute to the extent of photoaging lesions is not known.

The aim of this study was to investigate the generation of 4-HNE and acrolein by UV-A in the dermis of hairless mice, their contribution to elastin modification, and the protective effect of carbonyl scavengers on actinic elastosis extent in UV-exposed animals.

RESULTS

UV-A exposure induces 4- HNE adduct formation in the skin of hairless mice

The role of lipid peroxidation products in photoaging induced by the exposure to solar radiation remains hypothetical. We investigated this question on hairless mice, a classical animal model for actinic elastosis (Kligman, 1996). The mice were exposed to UV-A rays, which seem to be mainly responsible for photoaging damage because of their longer wavelength allowing them to deeply penetrate in the dermis (Ichihashi et al., 2009).

Hairless mice (6 weeks old, 10 males per group) were daily exposed to UV-A (20 J.cm⁻², up to 600J.cm⁻²). Under the used conditions, we did not observe any major clinical symptom of acute photo-irritation (sunburn, erythema, oedema, blister, and itching), nor histological sign of phototoxicity (apoptotic keratinocytes, dermal oedema, and leukocyte infiltrate).

In agreement with previous observations (Menter et al.,1996), the skin of mice exposed to UV-A exhibited the classical signs of actinic elastosis, particularly the formation of deep wrinkles, in contrast to non-exposed animals (Figure 1a).

Hematoxylin/eosin histological sections showed the epidermal thickening characteristic of epidermal hyperplasia and the accumulation of basophilic material (Figure 1b and c). Verhoeff's staining showed a moderate increase in blackstained elastin fibers (Figure 1b). The 4-HNE adducts were not or were only faintly detected in the skin of untreated mice but were strongly increased after UV-A exposure, particularly in Verhoeff-stained areas, indicating a possible colocalization with elastin (Figure 1b). The total elastin and 4-HNE-adduct contents were significantly increased in the skin from UVexposed animals, in correlation with their immunohistological staining (Figure 1d and e).

Double-immunofluorescence labeling and confocal analysis indicated that 4-HNE and acrolein adducts were increased in the UV-A-exposed skin of hairless mice and colocalized in part with elastin (Figure 2 and Supplementary Figure S1). However, 4-HNE adducts colocalized with elastin were more abundant compared with acrolein adducts, possibly because the higher hydrophobicity of 4-HNE facilitates its interaction with the hydrophobic domains of elastin

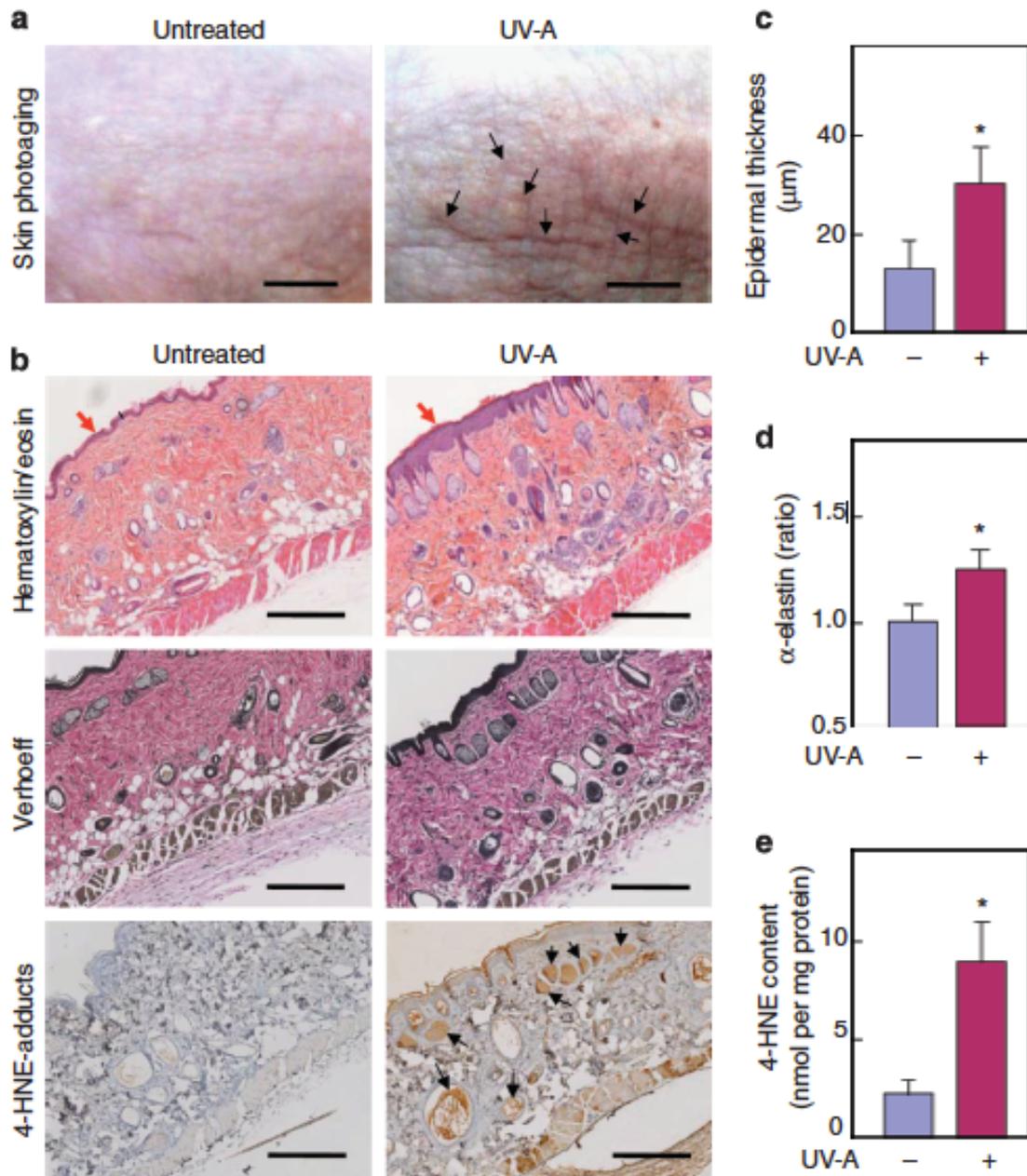


Figure 1 : UV-A exposure of hairless mice generates lipid peroxidation and actinic elastosis

Two groups of ten Skh:hr-1 hairless mice were used, either untreated or daily irradiated on the dorsum by UV-A (20 J.cm^{-2} per day up to 600 J.cm^{-2}), as indicated in Materials and Methods. (a) Macroscopical features of skin photoaging: macrophotographies of the back (bar = 2 mm). Arrows indicate some deep wrinkles on the skin of mice exposed to UV-A for 6 weeks (600 J.cm^{-2}). (b) Microphotographies of histological sections of the dorsal skin (bar= 100 μm). Upper panels, hematoxylin/eosin; middle panels, Verhoeff's elastin stain. Red arrows indicate the epidermis area. Lower panels, immunohistochemical staining of 4-HNE adducts (anti-Michael-adduct 4-HNE primary antibody revealed by a peroxidase-conjugated secondary antibody). (c) Epidermal thickness quantified by Image J. (d) Total elastin content in skin homogenates. The results are expressed as the ratio of α -elastin in UV-exposed/nonexposed animals. (e) 4-HNE-adduct content in skin homogenates, expressed as nmol per mg protein.

Data are mean \pm SD of five separate experiments, * $P_o < 0.05$. 4-HNE, hydroxynonenal; SD, standard deviation.

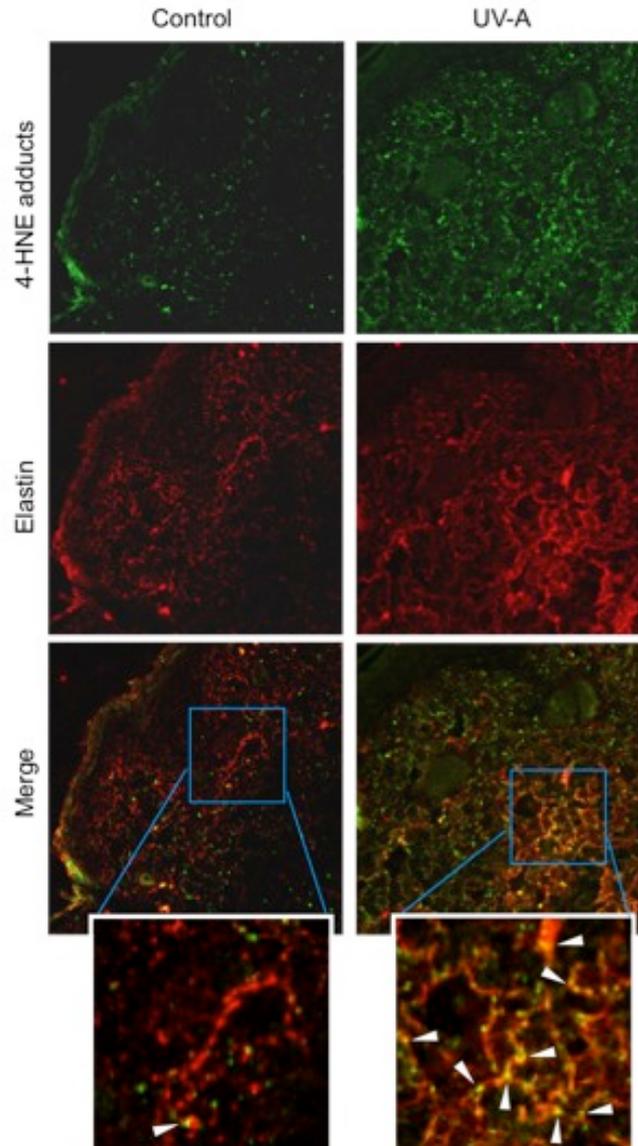


Figure 2. Elastin modification by 4-hydroxynonenal (4-HNE) in UV-treated mice. Immunofluorescence confocal microscopy of skin sections from untreated and UV-treated mice, labeled with anti-4-HNE adduct antibody (Tanaka et al, 2001) and anti-elastin antibody (anti-elastin, EPC, Owensville, MO), as described in the Materials and Methods (top bar = 50 μ m). Inserts indicate area selected for higher magnification shown in the lower panels (bottom, bar = 20 μ m). White arrows show the colocalization of elastin with 4-HNE adducts (yellow areas) on the composite image (merge). Representative pictures of four separate experiments.

These results indicate that (i) repeated sessions of moderate UV-A irradiation induce the formation of lipid peroxidation products (LPPs, including 4-HNE and acrolein) in the skin of hairless mice; (ii) these LPPs form adducts on the proteins of extracellular matrix, including elastin, in the skin of UV-A exposed hairless mice, which could contribute to alter the elastic properties of the skin, as glycating agents do (Yoshinaga et al., 2012).

UV-A trigger the generation of 4-HNE adducts in murine fibroblasts

We verified whether UV-A can induce the formation of 4-HNE adducts independently of any acute cytotoxicity. This issue was investigated on cultured murine skin fibroblasts exposed to increasing doses of UV-A radiations.

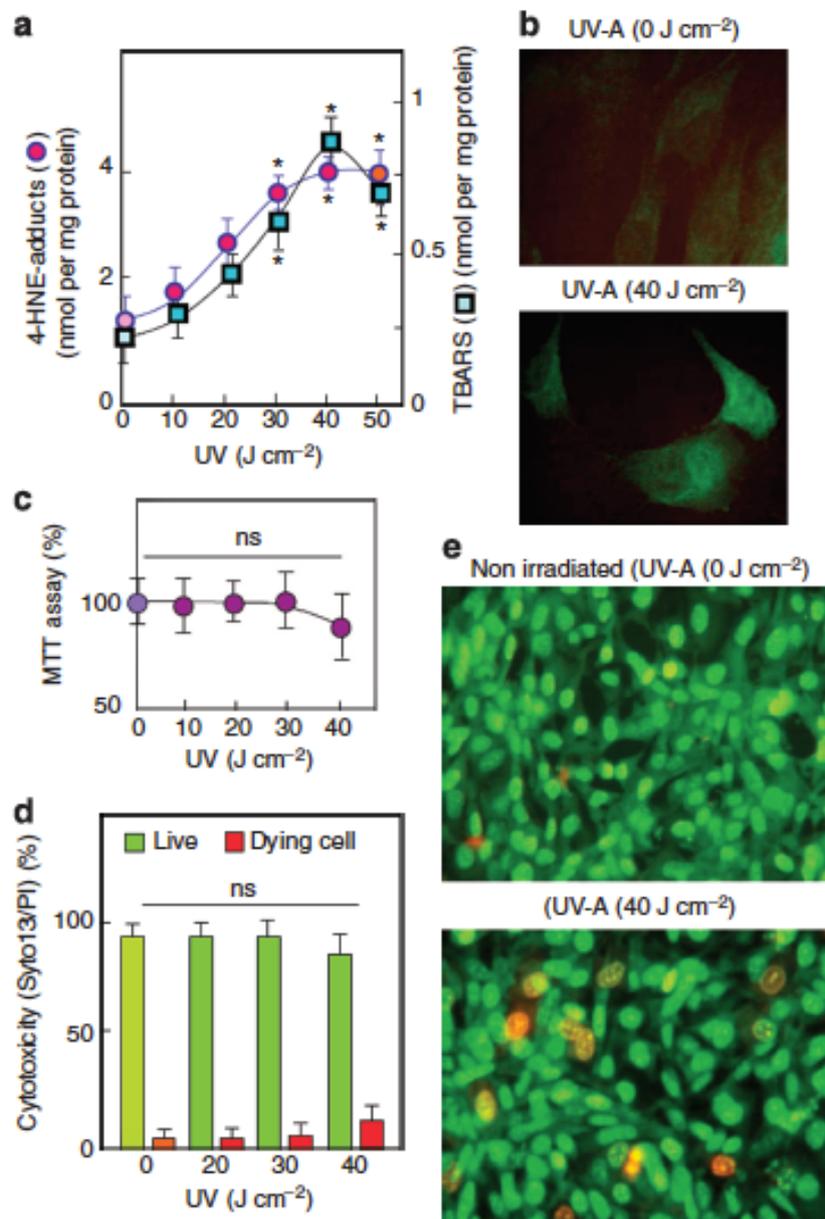


Figure 3. 4-hydroxynonenal (4-HNE) adducts are generated by UV-A in fibroblasts.

Murine fibroblasts cultured in 35mm dishes were exposed to UV-A in the HBSS culture medium, up to 50J.cm⁻². (a) 4-HNE adduct and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) content determination, expressed as nmol per mg cellular protein. (b) Immunofluorescence of 4-HNE anti 4-HNE-Michael adduct antibody (Calbiochem, VWR, FR) adducts in UV-A-exposed fibroblasts (40J.cm⁻²). (d) Kinetics of cell viability on fibroblasts exposed to increasing UV-A doses and evaluated by the MTT test (c) and Syto13/PI labeling (d). (e) Representative picture of syto13/PI-labeled fibroblasts exposed to 40J.cm⁻². Data are expressed as mean ±SEM of five separate experiments, *Po < 0.05. HBSS: Hank's balanced salt solution ; MTT: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; ns: not significant; PI: propidium iodide.

As shown in Figure 3, LPPs (thiobarbituric acid reactive substances and 4-HNE) were dose-dependently generated in murine fibroblasts exposed to increasing UV-A doses as assessed by the formation of thiobarbituric acid reactive substance and 4-HNE adducts in fibroblasts exposed to increasing UV-A dose (Figure 3a). Immunofluorescence experiments indicated the presence of 4-HNE adducts in UV-A-exposed fibroblasts (40 J.cm^{-2}) (Figure 3b).

Under conditions inducing mild lipid peroxidation, UV-A irradiation induced no significant cytotoxic effect (up to 30 J.cm^{-2}), as assessed by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and the syto13/propidium iodide live/dead assays, but the phototoxicity began to rise at higher UV-A dose (40 J.cm^{-2}) (Figures 3c–e). These data show that UV-A can generate a detectable lipid peroxidation in fibroblasts without triggering cell death. This is consistent with the formation of 4-HNE adducts in the skin of hairless mice irradiated by UV-A doses that induce no major symptom of acute phototoxicity.

4-HNE inhibits elastin degradation by elastase

As 4-HNE generated in UV-A-irradiated skin forms protein adducts (and particularly 4-HNE-elastin adducts) and as actinic elastosis is a hallmark of UV-induced photoaging, we explored whether 4-HNE may induce elastin accumulation.

As the high elastin content in actinic elastosis may result from UV-induced elastin neosynthesis (Sellheyer, 2003), we examined whether UV-A stimulates elastin synthesis in fibroblasts. In cultured mouse fibroblasts, UV-A did not stimulate elastin synthesis, under the used conditions, in contrast to the proelastogenic transforming growth factor (TGF)- β 1 (Figure 4a).

We then examined whether elastin degradation by elastase was altered by UV-A or 4-HNE. Two potential mechanisms involved in elastin degradation can be impaired: (i) expression or/and activity of elastase; (ii) degradability of elastin by elastase, which may be altered when elastin is modified by lipid oxidation products.

Under the used conditions of UV-A irradiation of fibroblasts, the expression and activity of elastase were not decreased, but instead UV-A (30 J.cm^{-2}) increased the expression of the three MMP-12 isoforms (Figure 4b) and its enzymatic activity (Figure 4c). Interestingly, the expression of elastase was also increased in UV-A-irradiated skin of hairless mice (Supplementary Figure S2).

Another mechanism potentially implicated in the accumulation of elastotic material is the impaired degradation of elastin modified by lipid oxidation products. Yoshinaga et al. (2012) recently reported that N ϵ -(carboxymethyl)lysine accumulates on elastin in photoaged skin, which impairs elastin degradation and contributes to the accumulation of abnormal elastotic material. We hypothesized that such an event may occur with lipid oxidation products such as 4-HNE and acrolein, as these aldehydes are able to modify proteins and generate protein dysfunction (Guéraud et al., 2010). To test this hypothesis, α -elastin and orcein-elastin were incubated with

increasing concentrations of 4-HNE or acrolein for 48 hours at room temperature. The modification of α -elastin was verified by dot-blot experiment (Figure 4d and Supplementary Figure S3), whereas the digestion of orcein-elastin was monitored by incubation with leukocyteelastase (1 U.ml^{-1}), for 18 hours at 37°C . The formation of 4-HNE and acrolein adducts on elastin dose-dependently inhibited its digestion by leukocyte elastase (Figure 4e and Supplementary Figure S3).

These data indicate that aldehyde-modified elastin becomes resistant to elastase, which may contribute to its accumulation in the skin of mice exposed to UV-A (20 J.cm^{-2} per day, 100 J.cm^{-2} per week, up to 600 J.cm^{-2} in 6 weeks).

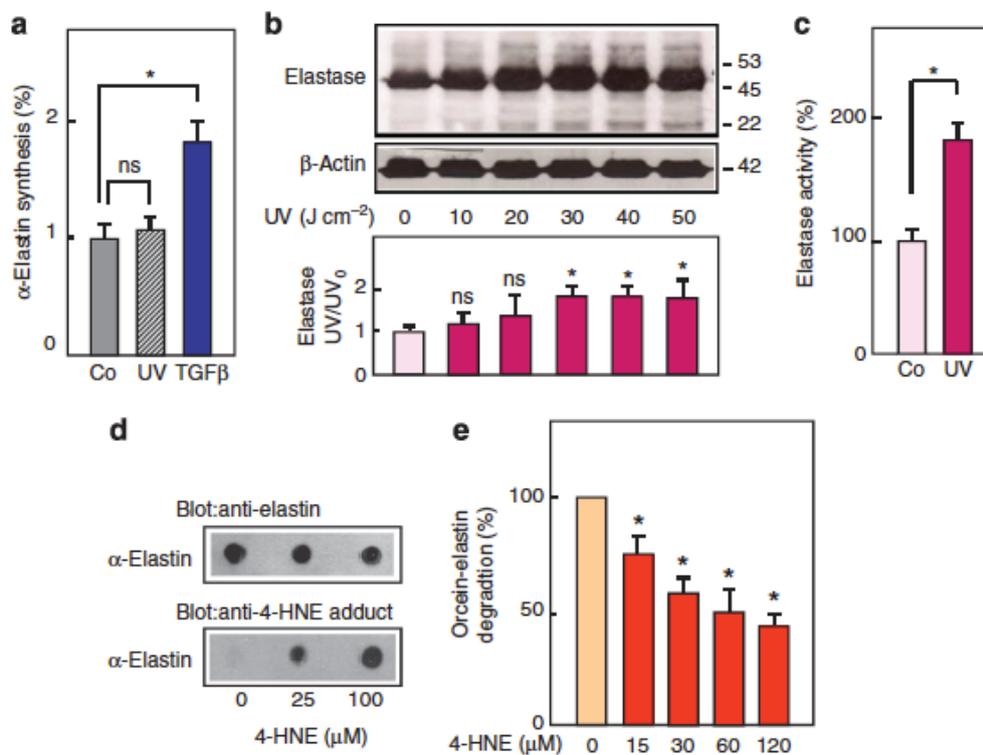


Figure 4. Elastin modification by 4-hydroxynonenal (4-HNE) impairs its degradation by elastase.

(a) Total cell-associated elastin content in fibroblasts, after exposure to UV-A (up to 40 J.cm^{-2}), followed by a 24-hour incubation in serum-free RPMI at 37°C (standard culture conditions). A positive control was performed with TGF- β 1 (1 ng.ml^{-1}). Data are expressed as mean \pm SD of seven separate experiments, *Po < 0.05. (b) Elastase expression in fibroblasts exposed to UV-A (variable doses), with anti β -actin as control. (c) Elastase activity in fibroblasts exposed to UV-A (40 J.cm^{-2}). Data are expressed as mean \pm SD of five separate experiments, *Po < 0.05; ns: non significant. (d) α -Elastin (1 mg.ml^{-1}) was incubated with 4-HNE in PBS for 48 hours at 37°C . Elastin modification was checked by dot-blot and revealed with the anti-4-HNE Michael-adduct and anti-elastin antibodies. (e) Orcein-elastin (1 mg.ml^{-1}) was incubated with 4-HNE for 48 hours at 37°C and digested by leukocyteelastase (1 U per day well) for 24 hours. The absorbance of the supernatant was measured at 590 nm. These data are expressed as mean \pm SEM of four separate experiments. *Po < 0.05; ns: not significant; PBS, phosphate-buffered saline; SD, standard deviation; TGF, transforming growth factor.

Carnosine prevents 4-HNE adduct formation and elastin modification

In vitro, carnosine, a β -alanyl-L-histidine dipeptide with carbonyl scavenger activity (Aldini et al., 2002; 2005; 2014), was able to prevent the modification of elastin by 4-HNE and acrolein (Figures 5a and b and Supplementary Figure S3). Carnosine prevented in part the rise of intracellular reactive oxygen species (ROS) in fibroblasts exposed to UV-A (Figure 5c) and completely inhibited the formation of 4-HNE adducts (Figure 5d). N-acetylcysteine (NAC), an antioxidant with carbonyl scavenger activity, completely inhibited both the increase of intracellular ROS (Figure 5c) and the formation of 4-HNE adducts (Figure 5d) in fibroblasts exposed to UV-A.

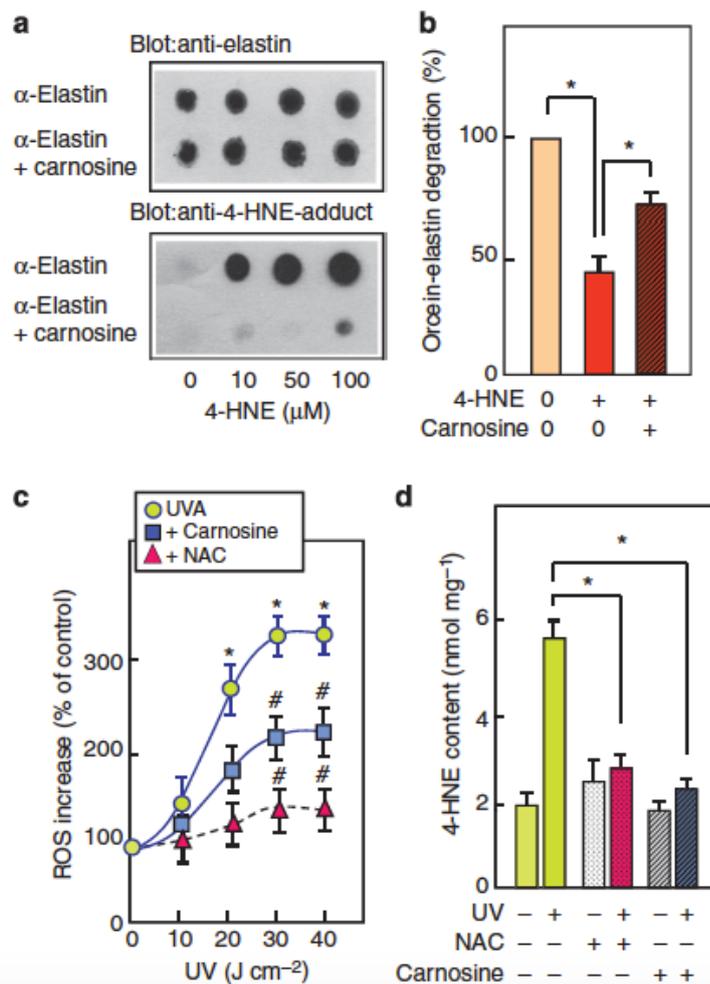


Figure 5. Carnosine and N-acetylcysteine (NAC) prevent elastin modification by 4-hydroxynonenal (4-HNE).

(a) Dot blot experiment of α -elastin modification by 4-HNE and protective effect of carnosine (1mM) revealed as indicated in Figure 4. (b) Modification of orcein-elastin by 4-HNE (120 μ M), and protection by carnosine (1mM), as described in Figure 4. (c) Kinetics of ROS in fibroblasts exposed to UV-A, with or without carnosine (1mM) or NAC (1mM), and measured with the H2DCFDA probe, as described in Materials and Methods. Results are expressed as % of the non-irradiated control. (d) 4-HNE content in fibroblasts exposed to UV-A, after 18-hour pre-incubation w/o carnosine or NAC (1mM each). These values are the means of four separate experiments. *Po: 0.05. ns: not significant; ROS: reactive oxygen species.

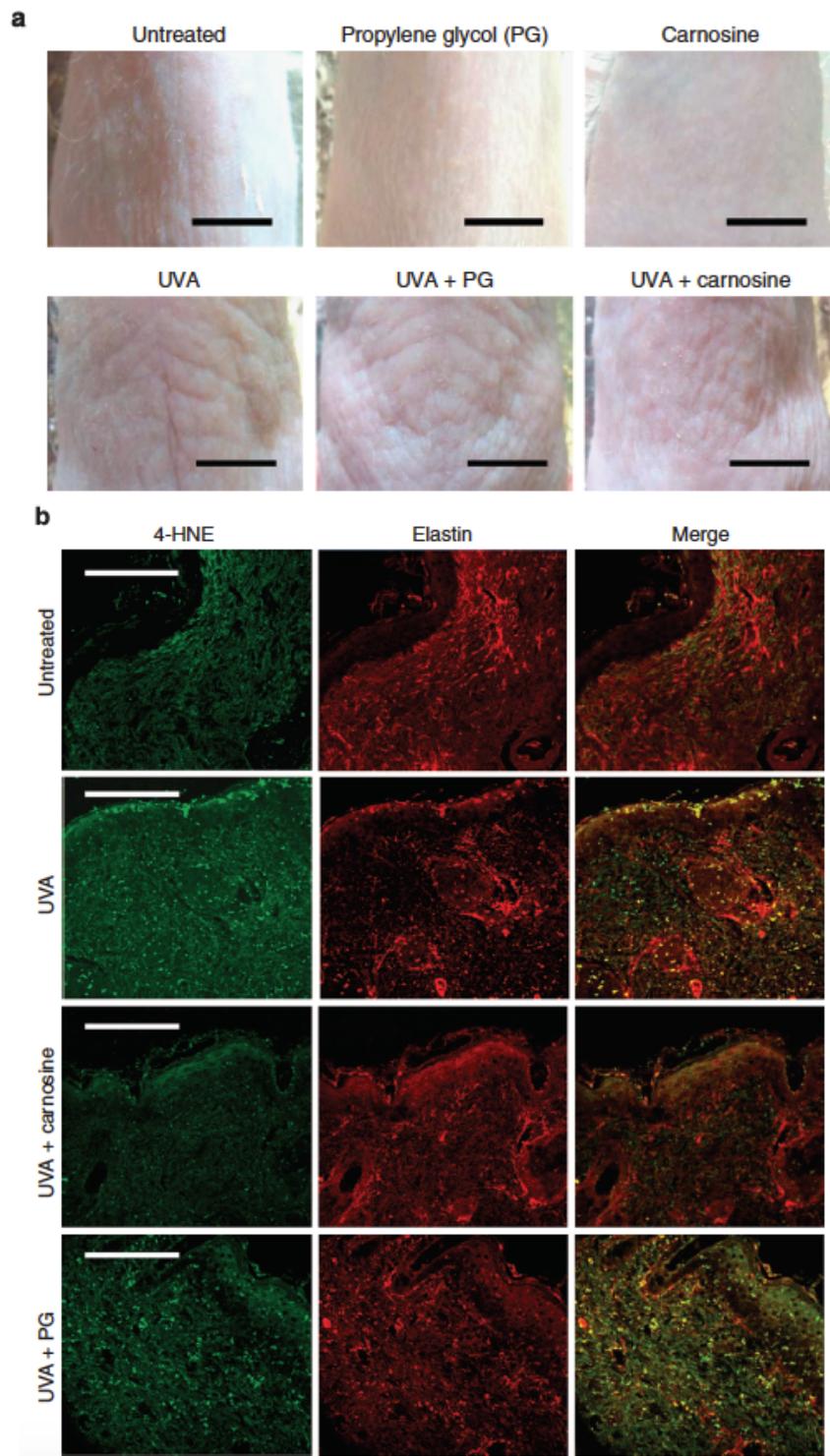


Figure 6. Carnosine suppresses photoaging signs and elastin modification by 4-hydroxynonenal (4-HNE).

Macroscopic and histological representative pictures of dorsal skin of Skh:hr-1 hairless mice either untreated (control) or daily irradiated by UV-A (20 J cm⁻² per day up to 600 J cm⁻²), with or without topical treatment with propylene glycol (PG, 30% in water) containing or not carnosine (1%) applied daily, as indicated in the Materials and Methods section.

(a) Macroscopic pictures showing the protective effect of carnosine on photoaging evoked by UV-A exposure of hairless mice (bar = 4 mm). (b) Immunofluorescence and confocal microscopy showing the protective effect of carnosine on 4-HNE adduct generation and elastin modification in UV-A exposed skins (bar = 50 μm).

As this study was focused on the role of aldehydes in photoaging, we tested the effect of carnosine on elastin modification by 4-HNE in hairless mice exposed to UV-A.

Carnosine (1% in propylene glycol (PG)) was daily and topically applied on the back of hairless mice, after exposure to UV-A irradiation. Carnosine completely inhibited the generation of 4-HNE adducts and the increase in elastin content in the skin (Supplementary Figure S1) and strongly reduced the macroscopical signs of photoaging and the modification of elastin by 4-HNE adducts (Figure 6).

Noteably, the vehicle (PG) had no protective effect against the formation of 4-HNE adducts on elastin modification (Figure 6 and Supplementary Figure S4).

DISCUSSION

This report indicates that aldehydes generated in the skin by UV-A (4-HNE, acrolein) contribute to skin photoaging by modifying elastin and rendering it resistant to elastase digestion. The fact that carnosine prevents elastin modification by 4-HNE, as well as photoaging signs, strongly supports a role for aldehydes issued from lipid peroxidation as an aggravating mechanism in photoaging. In skin exposed to solar radiation, a local oxidative stress is thought to have a key role in the development of actinic elastosis (Burke, 2010).

Several mechanisms have been implicated, including a reduction in antioxidant defences, the activation of inflammatory signaling, and the recruitment of inflammatory mononuclear cells, induction of redox-sensitive transcription factors, and of elastolytic proteases (Tsukahara et al., 2001; Cavarra et al., 2002; Carlsen et al., 2004; Cho et al., 2012; Kwon et al., 2012).

Oxidative stress generates bioactive LPPs, which are present in the skin (Nicolaou et al., 2011). Among LPPs, α,β -unsaturated aldehydes, including acrolein and 4-HNE (Uchida, 1999; Guéraud et al., 2010), are a class of highly reactive compounds with electrophilic properties allowing them to react with nucleophiles (e.g., free amino group of lysine, sulfhydryl group of cysteine and imidazole group in histidine) (Uchida, 1999). The presence of 4-HNE and acrolein adducts in the skin of hairless mice exposed to UVA, and their accumulation on elastin, is in agreement with the observation by Tanaka et al. (2001), who reported the presence of 4-HNE-modified elastin in actinic elastosis lesions in humans. It is likely that elastin modification and its accumulation in photoaging lesions should have consequences on its functional properties, as generally reported for most proteins modified by 4-HNE, particularly in the pathophysiology of oxidative stress and age-related diseases (Negre-Salvayre et al., 2010).

The accumulation of elastotic material in UV-irradiated photoaged skin may result from increased neosynthesis or/and decreased degradation of elastin (Sellheyer, 2003). Elastin biosynthesis is regulated in the skin by a wide array of cytokines and growth factors, TGF β 1 and IGF1 being the most potent (Sproul and Argraves, 2013). Elastin and fibrillin expression is increased in sun-

exposed skin (Bernstein and Utto, 1996). However, under our experimental conditions on cultured fibroblasts, UV-A irradiation did not stimulate elastin synthesis, and the proelastogenic effect of TGF β 1 is inhibited by 4-HNE (Larroque-Cardoso et al., 2014) that is generated during UV-A irradiation of the skin. Moreover, UV irradiation triggers the expression of inflammatory cytokines that inhibit elastin biosynthesis (Sproul and Argraves, 2013). On the other hand, a defect of elastin degradation may participate in the elastotic process. Elastin degradation is a complex process depending on the equilibrium between proteolytic enzymes (e.g., elastase and matrix metalloproteinases), endogenous inhibitors (e.g., tissue inhibitor of matrix metalloproteinases and elafin), and accessibility of the substrate. In our model system, UV-A stimulated both the expression and enzymatic activity of elastase in fibroblasts and in the skin of UV-treated mice, in agreement with Cavarra et al. (2002). However, the action of elastase on dermal elastin is probably more complex, as knockout mice that lack neutrophil elastase do not develop any UV-A/B-induced elastosis (Starcher and Conrad, 1995), which may suggest a role for elastase not only in the breakdown but also in the production of elastic fibers (Schalkwijk, 2007). An additional complexity is the presence of endogenous protease inhibitors, such as secretory leukocyte protease inhibitor (Wingens et al., 1998) and elafin (Muto et al., 2007), that modulate elastase activity.

Muto et al. (2007) reported that UV-A induces the expression of elafin, which forms complexes with elastin, thereby preventing elastin degradation by elastase and eliciting its accumulation in actinic elastosis (Muto et al., 2007).

Likewise, elastin modified by LPPs was partly resistant to elastase degradation, as shown by the low rate of degradation by elastase of orcein-elastin modified by 4-HNE or acrolein, quite consistent with the reduced degradation rate of elastin modified by D-ribose (Yoshinaga et al., 2012). Thus, elastin modification by aldehydes in the dermis of UV-A-treated mice may result in a resistance of elastin to elastase degradation and may explain, at least in part, the accumulation as aldehyde-modified elastotic material.

This hypothesis is supported by the protective effect of carnosine, which prevented elastin modification *in vitro* and *in vivo*. Our results show that carnosine exhibits a mild antioxidant activity, as it inhibits in part the ROS increase evoked by UV-A exposure of fibroblasts, whereas it strongly inhibits the formation of 4-HNE adducts in these cells. By comparison, NAC, a powerful antioxidant exhibiting carbonyl scavenger properties, completely blocked ROS generation and 4-HNE adduct formation in fibroblasts. The mild antioxidant effect of carnosine could result either from a direct neutralization of ROS (less efficient than NAC) or from the formation of 4-HNE-carnosine adducts during UV-A exposure, which in turn protects the consumption of intracellular glutathione by 4-HNE, and the subsequent oxidative stress, as demonstrated by Aldini's group in keratinocytes exposed to UVB and 4-HNE (Aldini et al., 2007). Carnosine is a histidine dipeptide that highly reacts with acrolein or 4-HNE to form nonreactive adducts with its imidazole moiety,

allowing to detoxify LPPs and prevent the process of protein modification (Aldini et al., 2005, 2014).

Thus, it is likely that carnosine forms adducts with 4-HNE in the skin of UV-A-irradiated mice, protecting in turn elastin and the other proteins of the extracellular matrix, as well as keratinocytes as reported (Aldini et al., 2007).

Several studies point out the presence of increased carbonyl (4-HNE, acrolein) protein levels in the stratum corneum of sun-exposed skin area, targeting keratins and cornified envelopes (Hirao and Takahashi, 2005; Aldini et al. 2007; Fujita et al. 2007) and affecting their properties such as the water-holding capacity (Iwai and Hirao, 2008). Our results and the observation of Tanaka et al. (2001) indicate that protein carbonylation induced by UV-A affects not only the epidermal outer layer but also the dermis layer, at least through the modification of elastin fibers and the accumulation of elastotic material. It is to be noted that UV-A generates more 4-HNE adducts compared with acrolein adducts on elastin, pointing out differences in the kinetics of adduct formation, nature of epitopes, and origin of aldehydes in the skin, which were not identified in this work. More studies will be necessary for characterizing how elastin is modified by aldehydes and whether the modification occurs on an intact or partially degraded elastin. Another question is the reversibility of elastin modification by aldehydes in respect to the aging process. Intracellular antioxidants (glutathione and ascorbic acid) or enzymes such as alcohol dehydrogenase, glutathione transferase, or aldehyde dehydrogenase may detoxify and neutralize aldehydes and inhibit the formation of 4-HNE adducts on proteins (LoPachin et al., 2009). Moreover, aldehyde dehydrogenase dysfunction in the process of aging (Chen et al., 2014) could contribute to the progressive accumulation of aldehyde- and advanced glycation end product–modified proteins in tissues and extracellular matrix, including elastin. In all cases, the protective effect of carnosine on UV-induced elastin modification by 4-HNE emphasizes the role of protein carbonylation in skin photoaging.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents.

Cell culture reagents were from Invitrogen Life Technologies (Saint Aubin, France).

The anti-4-HNE Michael adduct antibody was from Calbiochem (VWR, France), the monoclonal anti elastin was from ELN products company Inc. (Owensville, Missouri, USA) or from Abcam, anti MMP12 was from Epitomics (Californie, USA), anti-acrolein adducts antibody was prepared as reported [Tanaka et al, 2001]. Secondary antibodies anti-mouse and anti-rabbit were from Santa Cruz Biotechnology (CliniScience, Nanterre, France).

SYTO-13, propidium iodide, H2-Alexa-Fluor 488 (green) and Alexa-Fluor 546 (red)-conjugated secondary antibodies were from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). 3-(4,5

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), N-acetyl L-cysteine (NAC), L-Carnosine, carboxy-H2DCFDA diacetoxymethyl-ester (H2DCFDA-AM) were from Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France).

Fastin Elastin Assay was from Biocolor life science assay (Carrickfergus County Antrim, United Kingdom).

Oxiselect™ HNE adduct Elisa kit was from Cell Biolabs Inc (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Acrylamide-4X/bisacrylamide-2X solution was from Euromedex (Souffelweyersheim, FR), the ECL chemoluminescence kit was from Amersham Pharmacia (Velizy-Villacoublay, France).

Cell culture and UV-A treatment

Murine fibroblasts isolated from wild-type mouse (strain 129/SV) were grown in the DMEM glutamax culture medium supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (100 U ml⁻¹ penicillin,

100 mg ml⁻¹ streptomycin) in a 5% CO₂-humidified incubator at 37 °C. Twenty-four hours before the experiments, cells were starved in a serum-free medium, as indicated.

Before UV-A exposure, the medium was removed and replaced by 2 ml Hank's balanced salt solution (HBSS). Fibroblasts were exposed to increasing UV-A doses (10–50 J cm⁻²) (Bio-Spectra UV lamp, 365 nm, Vilbert-Lourmat, Torcy, France). When indicated, fibroblasts were preincubated for 18 hours with NAC or carnosine (each 1mM) (Figure 5c and d), and then the medium was discarded and replaced by HBSS before exposing the cells to UV-A. At the end, the HBSS medium was removed and replaced by the DMEM medium containing 10% fetal bovine serum and when indicated NAC or carnosine. After 1 hour, the cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS), recovered, and stored at -80 °C until use.

Immunofluorescence.

Fibroblasts grown on cover glass slides and exposed to UV-A (40 J/cm²), were washed with PBS and fixed in PBS/4% paraformaldehyde for 10 min. After blocking with PBS containing 5% milk for 45 min, cells were incubated with the 4-HNE antibody for 1h and revealed with Alexa Fluor 488-conjugated for 45 min. The same protocol was applied to skin sections labelled with anti 4-HNE Michael adduct, anti acrolein and anti-elastin antibodies. The slides were visualized using a Zeiss LSM 510 fluorescence confocal microscope (Le Pecq, France).

Cell viability and apoptosis

The whole cytotoxicity was evaluated by the MTT assay, on fibroblasts exposed to UV-A radiations, as previously used (Larroque-Cardoso et al, 2014). Apoptosis was checked by the Syto13/PI live dead assay based on the different permeability of cell membranes to two fluorescent DNA intercalating probes, Syto13, a permeant green-colored intercalating probe, entering all the cells, and propidium iodide, a non-permeant red intercalating probe (Larroque-

Cardoso et al, 2014).

Western blot analysis.

Skin samples from control and UV-A treated mice, or fibroblasts were lysed in protein extraction buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM β -glycerophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM sodium fluoride, and antiproteases) for 30 min on ice. After centrifugation (13.000rpm, 10 min), supernatants were used for western-blot experiments. Protein concentration was determined using the Bradford reagent (Biorad)

50 μ g of protein cell extracts were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto PVDF membranes (Millipore). Then membranes were probed with the anti MMP12 antibody (ref) and revealed with the secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase using the ECL chemoluminescence kit (Amersham). β -actin was used to control equal loading of proteins.

Elastin content determination

The elastin assay (Fastin Elastin assay kit, Biocolor Life Science assay, Carrickfergus, County Antrim, UK) allows to determine the soluble tropoelastin and cell-associated elastin after its solubilization into α -elastin polypeptides. Skin samples from control and UV-A-irradiated mice, were suspended in 400 μ l of 0.25M oxalic acid and heated at 100° for two one hour periods to solubilize all matrix components except elastin. After a 10,000 g centrifugation 50 μ l of supernatants were used to precipitate elastin, then allowed to bind the elastin-specific dye for 1.5 h under gentle agitation at room temperature. Bound dye was suspended in a 250 μ l volume and then transferred to a 96-well plate. Absorbance was measured at 513 nm on a plate reader (TECAN, Tecan France S.A.S.U, Lyon, France) and compared to a standard curve generated from known concentrations of alpha-elastin, in the conditions given by the manufacturer. The data are expressed as ratio of the untreated animals.

A similar protocol was used for determining the total elastin content in fibroblasts after 48h following either irradiation by UV-A, or stimulation by TGF- β 1 (1ng.ml⁻¹).

Elastase enzyme activity in fibroblasts

Elastase activity was determined in control and UV-A-treated fibroblasts, using theEnzChek® Elastase Assay Kit, in the conditions given by the manufacturer (Life Technology, Molecular Probes).

Elastin modification by aldehyde and elastase digestion assay

α -elastin (1mg.ml⁻¹ in PBS) was incubated under sterile conditions with variable 4-HNE or acrolein concentrations (0,01 to 1 mM) in a final volume of 100 μ l, at 37°C for 48h. The

modification of elastin was evaluated by dot-blot experiment on nitrocellulose membrane, and revealed with the monoclonal anti-elastin antibody (Abcam), and anti-acrolein monoclonal antibody or anti-4-HNE antibody.

The digestion of insoluble elastin by leukocyte-elastase was performed in the conditions described by Yoshinaga et al. (2012).

Briefly, orcein-labeled insoluble elastin (1 mg ml⁻¹ in PBS) was incubated with 4-HNE or acrolein at the indicated concentrations in a final volume of 100 µl at 37°C for 48 hours. At the end, the mixture was centrifuged (13,000 trs/min, 10 min) and washed twice in PBS. The pellet was re-suspended in 50 µM Tris-HCl pH 7.4 containing 20mM CaCl₂ and leukocyte-elastase (1U per assay) for 24 hours. The mixture was centrifuged, and the optical density of the supernatant was measured at 590 nm on a plate reader (TECAN). The data are expressed as a percent of unmodified elastin degradation.

Intracellular ROS determination

Intracellular reactive oxygen species (ROS) were determined using the fluorescent probe carboxy-H₂DCFDA diacetoxymethyl-ester (H₂DCFDA-AM). Fibroblasts cultured on 60 mm dishes were preincubated in FCS free-RPMI medium containing when indicated carnosine or NAC (1mM each). For the experiments, the medium was discarded and replaced by HBSS, without the molecules and kinetics of UVA irradiation were carried out at the indicated time.

At the end, the medium was discarded and replaced by fresh RPMI culture medium containing H₂DCFDA-AM (5µM), and the agents, carnosine or NAC, for 30 min. at 37°C. At the end, the cells were washed 3 times in PBS, then recovered in 1 ml Tris-HCl 50 µM, pH 7.0, sonicated and the fluorescence of the cell homogenates was measured (exc/em. 495/525 nm, respectively). The results are expressed as % of the fluorescence/mg protein of the untreated control.

4-HNE adduct and TBARS content

Skin samples from control and UV-treated mice were homogenized in protein extraction buffer without triton X100, centrifuged (13 000 rpms/10 min), and the supernatant was used for determining the 4-HNE adduct content by Elisa (Cell Biolabs Inc.), in the conditions of the manufacturer. The data are expressed as nmol of 4-HNE-adduct content/mg total proteins.

The TBARS content was measured in cell homogenates, as reported (Bouguerne et al, 2010)

UV-A irradiation of hairless mice and topical treatment with carnosine

The experimental protocol (No. 12/1048/10/13) was carried out in accordance with French legislation. The medical ethical committee of INSERM and University approved all described studies. Albino hairless mice Skh:hr-1 (Charles River Laboratories, St Germain sur l'Arbresle, France) (10 animals per condition) were either untreated or daily exposed (on the whole back) to UV-A radiation (20 J cm⁻² daily, i.e., 2 hours exposure per day, 5 days a week for 6 weeks, i.e.,

up to 600 J cm⁻² at the end of the experiment). When indicated, the entire back of the animals was daily and topically treated with PG (30% in water) containing or not carnosine (1%), immediately after UV exposure. Mice were killed (by cervical dislocation) after intraperitoneal injection of ketamin (150 mg per kg body weight) and xylazine (10 mg kg⁻¹). The skins were recovered; a sample was fixed in formaldehyde (4% in PBS) and embedded in paraffin for histological analysis, and another sample was kept frozen at -80 °C for elastin and 4-HNE adduct content.

Immunohistochemistry

Formaldehyde-fixed skin segments embedded in paraffin were cut into 10 mm sections. Sections were stained by hematoxylin/eosin or Verhoeff's elastic stain, or labeled with the anti Michael adduct 4-HNE antibody and revealed by a peroxidase-conjugated secondary antibody (immunoperoxidase kit, StrepABComplex/HRP Duet, Dako). Controls were done by omitting the primary antibody to determine nonspecific binding. Nuclei were counterstained with hematoxylin.

Statistical analyses.

Estimates of statistical significance were performed by a t-test or analysis of variance (SigmaStat 3.5, Systat software, San Jose, CA). When tests for normality and equal variance (Kolmogorov–Smirnov) passed, differences between mean values were evaluated by an unpaired t-test (two groups) or by one-way analysis of variance (several experimental groups) followed by multiple comparisons by the Holm–Sidak test, using SigmaStat 3.5 software (Systat Software).

Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Acknowledgments

The authors wish to thank C Bernis and E. Mucher, for their excellent technical assistance

Sources of Funding

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), University Paul Sabatier Toulouse, CERPER (Centre européen de recherche sur la peau) and ANR-Carina (ANR-12-BSV1-0016-01).

REFERENCES

Aldini G, Granata P, Carini M (2002) Detoxification of cytotoxic alpha, betaunsaturated aldehydes by carnosine: characterization of conjugated adducts by electrospray ionization tandem mass spectrometry and detection by liquid chromatography/mass spectrometry in rat skeletal muscle. *J Mass Spectrom* 37:1219–28

Aldini G, Facino RM, Beretta G, Carini M. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. *Biofactors*. 2005;24(1-4):77-87.

Aldini G, Granata P, Marinello C et al. (2007) Effects of UVB radiation on 4-hydroxy-2-trans-nonenal metabolism and toxicity in human keratinocytes. *Chem Res Toxicol* 2007,20, 416–23

Aldini G, Carini M, Yeum KJ, Vistoli G. Novel molecular approaches for improving enzymatic and nonenzymatic detoxification of 4-hydroxynonenal: toward the discovery of a novel class of bioactive compounds. *Free Radic Biol Med*. 2014 Apr;69C:145-156

Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2000 Dec;16(6):239-44.

Bernstein EF, Uitto J (1996) The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clin Dermatol* 14:143–51

Burke KE. Photoaging: the role of oxidative stress. *G Ital Dermatol Venereol*. 2010 Aug;145(4):445-59

Carlsen H, Alexander G, Austenaa LM, et al. Molecular imaging of the transcription factor NF-kappaB, a primary regulator of stress response. *Mutat Res*. 2004 Jul 13;551(1-2):199-211.

Cavarra E, Fimiani M, Lungarella G et al. (2002) UVA light stimulates the production of cathepsin G and elastase-like enzymes by dermal fibroblasts: a possible contribution to the remodeling of elastotic areas in sun-damaged skin. *Biol Chem* 383:199–206

Chen CH, Ferreira JC, Gross ER et al. (2014) Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev* 94:1–34

Cho JL, Allanson M, Reeve VE. Hypoxia inducible factor-1 α contributes to UV radiation-induced inflammation, epidermal hyperplasia and immunosuppression in mice. *Photochem Photobiol Sci*. 2012 Feb;11(2):309-17.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(1):81-128.

Fisher GJ, Kang S, Varani J, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002 Nov;138(11):1462-70.

Fujita H, Hirao T, Takahashi M (2007) A simple and non-invasive visualization for assessment of carbonylated protein in the stratum corneum. *Skin Res Technol* 13:84–90

Gilchrest BA (2013) Photoaging. *J Invest Dermatol* 133:E2–6

Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res.* 2010 Oct;44(10):1098-124.

Hawk JL, Murphy GM, Holden CA (1988) The presence of neutrophils in human cutaneous ultraviolet-B inflammation. *Br J Dermatol* 118:27–30

Hirao T, Takahashi M (2005) Carbonylation of cornified envelopes in the stratum corneum. *FEBS Lett* 579:6870–4

Ichihashi M, Ando H, Yoshida M et al. (2009) Photoaging of the skin. *Anti-Aging Medicine* 6:46–59

Iwai I, Hirao T (2008) Protein carbonyls damage the water-holding capacity of the stratum corneum. *Skin Pharmacol Physiol* 21:269–73

Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Photoaging: pathogenesis, prevention, and treatment. *Clin Geriatr Med.* 2001 Nov;17(4):643-59, v-vi.

Kligman LH. The hairless mouse model for photoaging. *Clin Dermatol.* 1996 Mar-Apr;14(2):183-95.

Kwon MJ, Kim B, Lee YS, et al. Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation. *J Dermatol Sci.* 2012 Aug;67(2):81-7

Larroque-Cardoso P, Mucher E, Grazide MH et al. (2014) 4-Hydroxynonenal impairs transforming growth factor- β 1-induced elastin synthesis via epidermal growth factor receptor activation in human and murine fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 71:427–36

Lewis KG, Bercovitch L, Dill SW, et al (2004) Acquired disorders of elastic tissue. I. Increased elastic tissue and solar elastotic syndromes. *J Am Acad Dermatol* 51:1–21

LoPachin RM, Gavin T, Petersen DR et al. (2009) Molecular mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal and acrolein toxicity: nucleophilic targets and adduct formation. *Chem Res Toxicol* 22:1499–508

Menter JM, Sayre RM, Etemadi AA, et al. Chronic exposure of Sk-1 hairless mice to narrow-band ultraviolet A (320-355 nm). *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1996

Muto J, Kuroda K, Wachi H, Hirose S, Tajima S. Accumulation of elafin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation. *J Invest Dermatol.* 2007 Jun;127(6):1358-66

Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C et al. (2008) Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 153: 6–20

Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, et al. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2010 Oct;44(10):1125-71.

Nicolaou A1, Pilkington SM, Rhodes LE. Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. *Chem Phys Lipids.* 2011 Sep;164(6):535-43.

Poli G, Schaur RJ, Siems WG, et al. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev.* 2008 Jul;28(4):569-631

Schalkwijk J, Wiedow O, Hirose S (1999) The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core. *Biochem J* 340:569–577

Schalkwijk J (2007) Cross-linking of elafin/skalp to elastic fibers in photodamaged skin: too much of a good thing? *J Invest Dermatol* 127:1286–7

Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol.* 2000 May;35(3):307-16.

Sellheyer K (2003) Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation? *J Cutan Pathol* 30:123–127 |

Sproul EP, Argraves WS (2013) A cytokine axis regulates elastin formation and degradation. *Matrix Biol* 32:86–94

Starcher B, Conrad M. A role for neutrophil elastase in the progression of solar elastosis. *Connect Tissue Res.* 1995;31(2):133-40.

Sawabe M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr Gerontol Int.* 2010 Jul;10 Suppl 1:S213-20.

Tanaka N, Tajima S, Ishibashi A, et al. Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein-bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actinic elastosis of photodamaged skin. *Arch Dermatol Res.* 2001 Jul;293(7):363-7.

Tsukahara K, Takema Y, Moriwaki S, et al. Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation. *J Invest Dermatol*. 2001 Sep;117(3):671-7.

Uchida K. Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends Cardiovasc Med*. 1999 Jul;9(5):109-13.

Vistoli G, De Maddis D, Cipak A et al. (2013) Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res* 47(Suppl 1):3–27

Wingens M, van Bergen BH, Hiemstra PS et al. (1998) Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111:996–1002

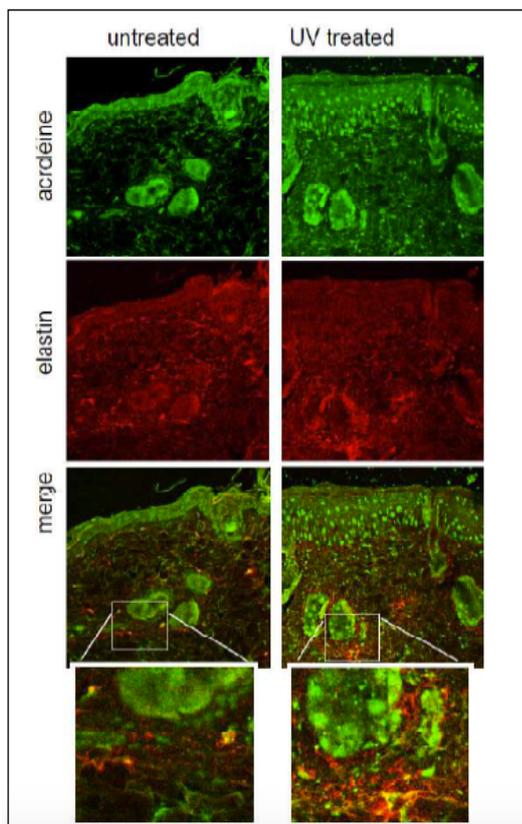
Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Naderi L et al. (2001) Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol* 63:41–51

Yaar M1, Gilchrist BA. Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1998 Aug;3(1):47-51.

Yang S, Nugent MA, Panchenko MP. EGF antagonizes TGF-beta-induced tropoelastin expression in lung fibroblasts via stabilization of Smad corepressor TGIF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Jul;295(1):L143-51.

Yoshinaga E, Kawada A, Ono K, et al. N(ε)-(carboxymethyl)lysine modification of elastin alters its biological properties: implications for the accumulation of abnormal elastic fibers in actinic elastosis. *J Invest Dermatol*. 2012 Feb;132(2):315-23.

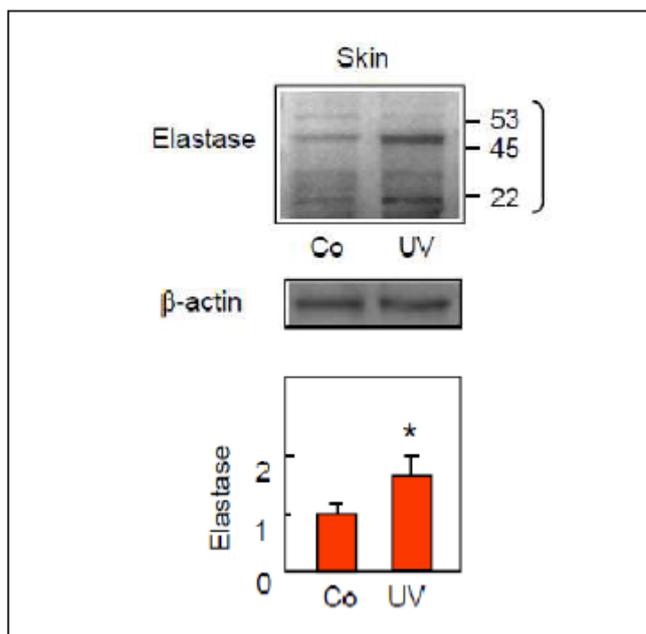
Zarkovic N, Cipak A, Jaganjac M et al. (2013) Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *J Proteomics* 92:239–47



Supplemental Figure S1: Elastin modification by acrolein in UV-treated mice.

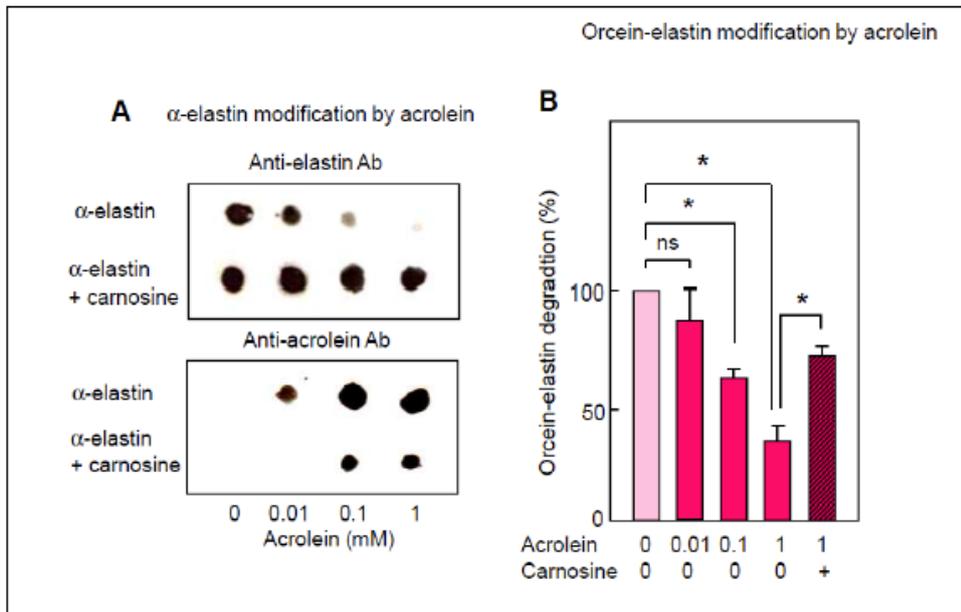
Immunofluorescence confocal microscopy of skins from control and UV-treated mice, labelled with anti-acrolein adduct and anti-elastin monoclonal antibody (Abcam), as described in the legend to Figure 1. The insert (scale bar = 20 μ m) shows the colocalization of elastin with acrolein adducts (yellow areas) on the insert of the composite image (merge).

Representative pictures of 4 separate experiments.



Supplemental Figure S2: Elastase expression in UV-A irradiated skins

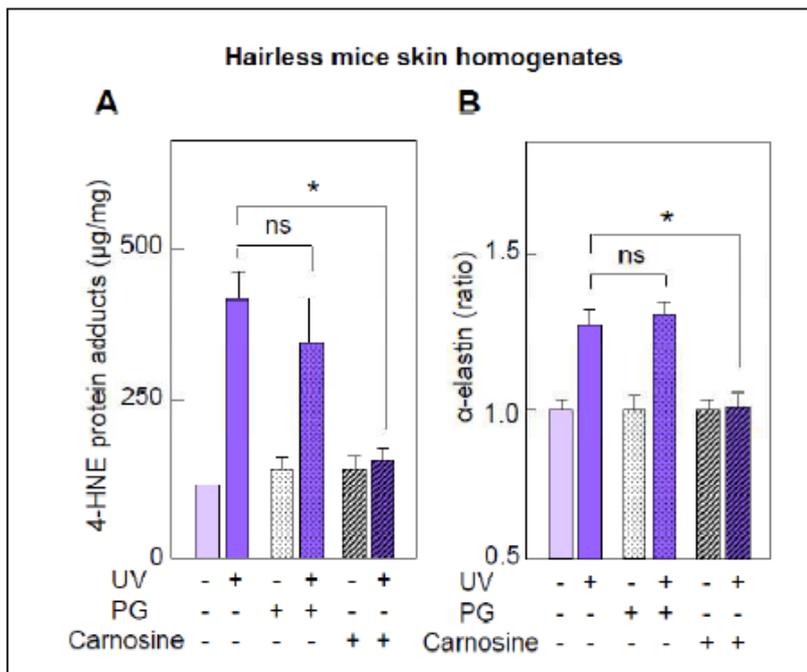
Elastase (MMP12) expression was investigated by western-blot in protein extracts of skin homogenates from control and UV-A exposed hairless mice, using an anti-MMP12 monoclonal mAb (Epitomics), and an anti β -actin as control. These data are representative of 5 separate experiments.



Supplemental Figure S3: Elastin modification by acrolein and prevention by carnosine

A. α -elastin (1 mg/ml) was incubated with acrolein at the indicated concentrations, w/o carnosine (1 mM), in PBS at 37°C. After 48h, the modification of elastin was checked by dotblot, and revealed with the anti-acrolein (lower panel), and anti-elastin antibodies (upper panel).

B. orcein-elastin (1 mg/ml) was incubated with acrolein for 48h at 37°C, and digested by leukocyte elastase (1 U/ml) for 24h. The absorbance of the supernatant was measured at 590 nm. These data are a means of 5 separate experiments. * $p < 0.05$; ns, not significant.



Supplemental Figure S4.

Determination of the 4-HNE adduct (A) and elastin (B) content in skin homogenates from control or UV-A exposed hairless mice and topically treated daily with propylene glycol (PG, 30% in water) containing or not carnosine (1%) (5 mice/group control, PG alone and PG with carnosine 1% respectively). * $p < 0.05$; ns, not significant.

3) Conclusion

Les résultats obtenus montrent que les radiations UV-A induisent un stress oxydant, impliqué dans le développement de l'élastose actinique. En effet le stress oxydant intervient sur différents mécanismes à l'origine du développement de ces lésions, par ses effets propres (diminution des défenses anti-oxydantes, activation de l'inflammation, dommages de l'ADN...), et via la génération de produits de peroxydation lipidiques plus stables que les EROs (4-HNE, acroléine...) qui forment des adduits sur les protéines de la matrice et induisent un stress carbonyle. L'utilisation de piègeurs de carbonyles, tels que la carnosine, permet de limiter le développement des lésions photo-induites.

L'exposition quotidienne des souris skh-1 hairless aux UV-A, jusqu'à une dose totale de 600J/cm², entraîne la formation de lésions d'élastose actinique. En effet on observe chez ces souris exposées un épaissement caractéristique de l'épiderme, la formation de rides profondes et un jaunissement de la peau du dos, que l'on retrouve systématiquement dans l'élastose actinique. Les analyses histologiques et biochimiques montrent une augmentation du taux d'élastine, mais sous une forme anormale, désorganisée (matériel élastotique). Chez les souris photo-exposées, on note une forte augmentation des adduits de 4-HNE, par rapport aux souris contrôle, non exposées. Le co-marquage 4-HNE/élastine permet de confirmer le fait que le 4-HNE et l'acroléine, se fixent sur l'élastine, comme précédemment rapporté par Tanaka et al (2001).

La modification de l'élastine par le 4-HNE, comme observée dans notre modèle de photovieilissement, pourrait participer à son accumulation sous forme anormale dans la peau. Les causes de l'accumulation de matériel élastique au cours du photovieilissement sont mal connues, et pourraient résulter soit d'une néosynthèse soit d'une dégradation partielle (Sellheyer, 2003).

Dans nos conditions expérimentales, l'exposition aux UVA nous n'observons pas de synthèse d'élastine par les fibroblastes exposés aux UVA, contrairement aux cellules stimulées par le TGF- β 1 qui est une cytokine pro-elastogénique (Yang et al, 2008). Nous avons pu également montrer que l'effet proélastogénique de TGF- β 1 est inhibé par le 4-HNE (Larroque-Cardoso et al, 2014) qui est généré sous l'effet de l'exposition aux UV-A. De plus, les UV déclenchent l'expression de cytokines inflammatoires qui inhibent la synthèse d'élastine (Sproul and Argraves, 2013). D'autre part, un défaut de dégradation de l'élastine peut aussi participer à ce processus d'élastose actinique.

Nos résultats montrent également que les UV-A et les produits de peroxydation lipidique stimulent l'expression et l'activité enzymatique de l'élastase (MMP12) dans des fibroblastes en culture et dans la peau de souris exposées aux UV, comme cela avait été proposé par Cavarra et al (2002).

L'équipe de Yoshinaga (Yoshinaga et al, 2012) a récemment rapporté que lors de la glycation de l'élastine par du D-ribose, les AGEs formés la modifient et la rendent résistante à la digestion enzymatique par l'élastase. Les mécanismes de modification des protéines par les AGEs ou le 4-HNE, sont comparables, d'où l'hypothèse que l'élastine modifiée par le 4-HNE (ou l'acroléine), devient résistante à l'élastase. Nos résultats montrent que *in vitro*, l'élastine-orcéine modifiée par l'acroléine devient résistante à la digestion par l'élastase. Cette modification de l'élastine se produit aussi *in vivo*, dans la peau de souris exposée aux UV-A, ce qui suggère une digestion partielle de l'élastine dans la peau, qui associée à sa modification par le 4-HNE, favorise l'accumulation de matériel élastotique.

L'effet protecteur de la carnosine, se traduit par une réversion de la modification de l'élastine et l'inhibition de la génération de 4-HNE, *in vivo*. De plus, *in vitro*, nous observons que la carnosine piège totalement le 4-HNE, ce qui permet de protéger l'élastine. Cet effet protecteur dépend de sa propriété piègeur de carbonyle qui est favorisée par sa structure (dipeptide β -alanyl-histidine) qui piège le 4-HNE et l'empêche de former des adduits sur les protéines (Aldini et al, 2005; 2014).

Plusieurs études ont mis en évidence l'augmentation des taux de protéines carbonyleées (4-HNE, acrolein) dans le stratum corneum des peaux photoexposées, ciblant plus particulièrement la kératine et la couche cornée (Hirao and Takahashi, 2005; Aldini et al. 2007; Fujita et al. 2007). Nos résultats ainsi que les études de Tanaka et al. (2001) indiquent que la carbonylation protéique induite par les UV-A affecte non seulement l'épiderme mais également le derme, via la modification des fibres d'élastines et de l'accumulation de matériel élastotique. Des études supplémentaires permettraient d'évaluer par quel moyen les fibres d'élastines sont modifiées par les aldéhydes.

L'effet protecteur de la carnosine contre l'apparition des signes cliniques du photovieillissement et la modification de l'élastine par le 4-HNE et l'acroléine, est un argument fort pour l'implication de ces aldéhydes dans le développement de l'élastose actinique et le photo-vieillissement.

En ce qui concerne le vieillissement des vaisseaux, contrairement à ce que l'on observe dans la peau photoexposée, des résultats préliminaires indiquent que l'élastine est très faiblement modifiée par le 4-HNE et l'acroléine, alors que le taux de ces aldéhydes augmente fortement avec l'âge (Larroque-Cardoso et al, 2014).

Notre hypothèse est que durant le vieillissement chronologique le stress oxydant intrinsèque et la peroxydation lipidique sont plus lents que le processus de dégradation de l'élastine induit par l'élastase et les autres metalloprotéases matricielles. En revanche, au cours du photovieillissement le stress oxydant généré par les UV induit à la fois la dégradation de l'élastine et sa modification par les produits de peroxydation lipidique ou de glycation, générant ainsi l'accumulation de matériel élastotique. L'effet protecteur de la carnosine contre l'apparition des signes cliniques du photovieillissement et la modification de l'élastine par le 4-HNE et l'acroléine, est un argument fort pour l'implication de ces aldéhydes dans le développement de l'élastose actinique et le photo-vieillissement.

Nous avons ensuite étudié le rôle du 4-HNE dans la signalisation élatogénique du TGF- β .

II. Effet anti-elastogène du 4-HNE

1) Introduction

L'élastine est un composant clef de la MEC puisqu'elle est responsable de la capacité des tissus à s'étirer et revenir en place, caractéristique des tissus « élastiques » (artères, poumons, peau...). L'élastine est une protéine à demi-vie très longue, avec un renouvellement est très faible, et quasi-inexistant au cours du vieillissement (Shapiro, 1991 ; Vrhovski and Weiss, 1998). La synthèse d'élastine a lieu durant la période fœtale et la période post-natale, pendant l'enfance, elle s'arrête à la puberté. Bien qu'elle puisse être réactivée dans des conditions particulières (dans le cas de brûlure par exemple) l'expression des ARNm reste très faible dans les tissus adultes, ce qui explique la perte d'élasticité des tissus conjonctifs due à la fois à la perte d'élastine et à l'absence de son renouvellement (Robert et al, 2000). Les causes de ce phénomène ne sont à ce jour pas bien identifiées.

L'élastogénèse est régulée par une balance entre cytokines pro- et anti-élastogéniques (cf partie 1, II, 2) c) synthèse élastine) *via* des voies de signalisation spécifiques (Sproul and Argraves, 2012).

Le TGF- β 1 est une cytokine élastogénique, qui stimule l'expression et favorise la stabilisation des ARNm de tropoélastine *via* une voie de signalisation dépendante des Smad (Davidson, 2002 ; Shi and Massague, 2003.)

Il appartient à la grande famille des TGF- β qui comprend plus de 60 membres, parmi lesquels 3 TGF- β ont un effet transcriptionnel ou agissent selon le contexte cellulaire et l'environnement physiologique. Ces 3 formes sont actives sur la plupart des types cellulaires, sous une forme mature de 25kDa, consistant en un homodimère de 2 polypeptides. Les 3 formes de TGF- β induisent une inhibition de la croissance cellulaire, un effet anti-inflammatoire et pro-fibrotique.

Les homodimères de TGF- β sont sécrétés sous forme précurseur inactifs : pro-TGF- β qui est clivé dans la partie C terminale (TGF- β mature) et N-terminale appelée aussi LAP (latency associated peptide). LAP reste associé au TGF β mature de façon non covalente et constitue le petit complexe latent. A ce complexe s'associe un troisième composant le latent TGF- β binding protein (LTBP) pour former le grand complexe latent. LTBP est une glycoprotéine nécessaire à la sécrétion du complexe latent et à son association à la matrice extra-cellulaire (Miyazono et al, 1991). Cette formation de complexe permet d'empêcher le TGF- β mature de se lier à des récepteurs ubiquitaires de la surface cellulaire afin de maintenir sa disponibilité dans la matrice extracellulaire. (Gleizes PE et al, 1996; Munger JS et al, 1997).

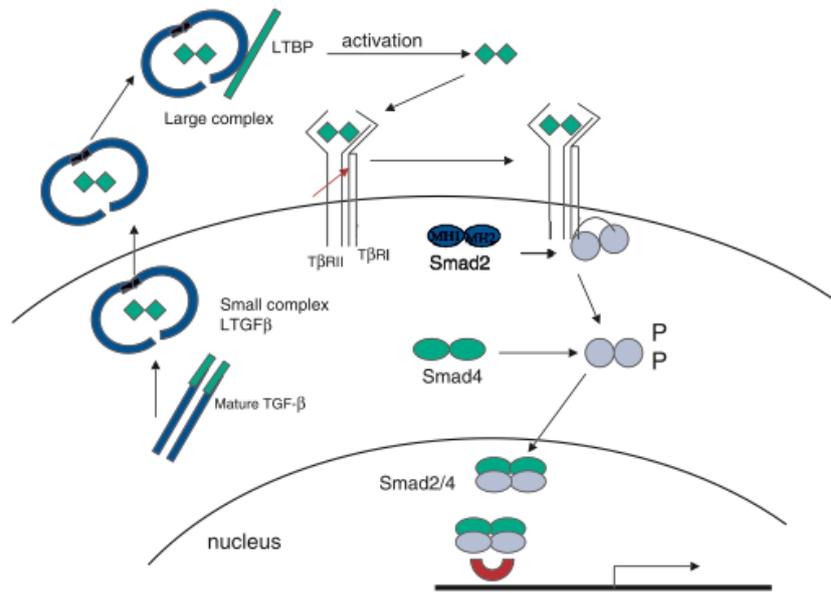


Figure 30 : Processus de sécrétion du TGF- β et voie des Smad associée. (Govinden et al, 2003)

La dissociation du TGF- β actif de LAP et LTBP est provoquée par divers activateurs tels que la thrombospondine, la plasmine, les MMP-2 et 9, et l'intégrine beta6. Ces activateurs se lient au LAP et modifient sa conformation libérant ainsi le TGF- β mature (Annes et al, 2003). L'association des ligands TGF permet la formation d'un complexe stable contenant un récepteur de type I (RI) et un récepteur de type II (RII), qui sont des sérine / thréonine kinases transmembranaires. La liaison du TGF induit l'activation du RII qui va phosphoryler et activer la kinase du RI entraînant l'autophosphorylation du RI et la phosphorylation des protéines R-Smads (Smad et Smad 3 par exemple) (Shi Y et al, 2003 ; Govinden et al, 2003). Les R-Smads phosphorylés subissent un changement conformationnel, se dissocient du RI et s'associent avec Smad 4 (co-Smad) pour former un complexe qui peut alors transloquer dans le noyau et agir comme facteurs de transcription (Ross et al, 2008) Le modèle général de la voie de signalisation du TGF- β est présenté sur la figure 30.

Le système EGF/EGF récepteur (EGFR) antagonise la signalisation TGF- β en inhibant la voie des Smad (Sproul et Argraves, 2012). Cette voie a été décrite dans des fibroblastes de poumons par Yang et al. (2008) dans le cas de l'emphysème. L'EGFR activé induit l'activation de la mitogen-activated kinase kinase (MEK), qui active la protéine extracellulaire signal-regulated kinase (ERK), qui phosphoryle TGIF.

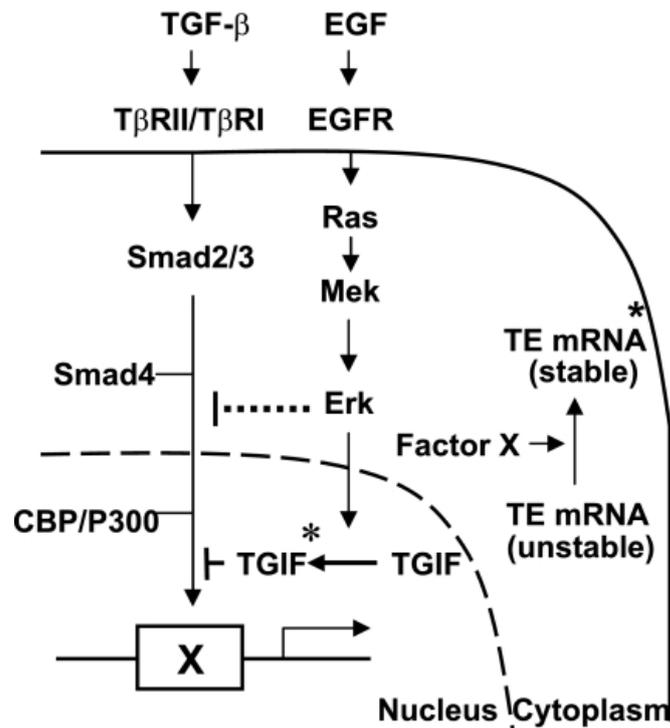


Figure 31: Diminution de l'expression de tropoélastine induite par le TGF-β par la voie de signalisation EGFR/Mek/Erk/TGIF. (Yang et al. 2008)

Le stress oxydant, et le stress carbonyle jouent un rôle majeur dans les processus de vieillissement des tissus conjonctifs (Curtis et al, 2012, Finkel et al 2008), de par l'altération des molécules de la MEC, élastine et collagène (Scherratt, 2009 ; Kielty, 2006, Robert et al, 2000).

Dans notre équipe il a été décrit que le 4-HNE présent dans les LDL oxydées est capable de former des adduits sur l'EGFR et d'activer sa voie de signalisation (Suc et al, 1998).

Nous faisons l'hypothèse que le 4-HNE généré au cours du vieillissement inhibe le renouvellement de l'élastine soit en agissant directement sur la voie de signalisation TGF/Smad, soit en agissant indirectement sur cette voie par une activation de la voie de l'EGF. Les piègeurs de carbonyle pourraient restaurer la signalisation élastogénique du TGF-β.

2) Publication

4-Hydroxynonenal impairs transforming growth factor- β 1-induced elastin synthesis via epidermal growth factor receptor activation in human and murine fibroblasts.

Pauline Larroque-Cardoso, Elodie Mucher, Marie-Hélène Grazide, Gwendal Josse, Anne-Marie Schmitt, Florence Nadal-Wolbold, Kamelija Zarkovic, Robert Salvayre, Anne Nègre-Salvayre

Free Radic Biol Med 2014 Jun 20;71:427-36. Epub 2014 Feb 20.



Original Contribution

4-Hydroxynonenal impairs transforming growth factor- β 1-induced elastin synthesis via epidermal growth factor receptor activation in human and murine fibroblasts

Pauline Larroque-Cardoso^{a,b}, Elodie Mucher^{a,b}, Marie-Hélène Grazide^b, Gwendal Josse^c, Anne-Marie Schmitt^c, Florence Nadal-Wolbold^c, Kamelija Zarkovic^d, Robert Salvayre^{a,b}, Anne Nègre-Salvayre^{a,b,*}

^a INSERM UMR-1048, 31432 Toulouse Cedex 4, France

^b University of Toulouse, Toulouse, France

^c Centre Européen de Recherche sur la Peau, Pierre Fabre Dermocosmétique, Toulouse, France

^d Division of Pathology, Clinical Hospital Centre, Zagreb, Croatia



ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2013

Received in revised form

12 February 2014

Accepted 13 February 2014

Available online 20 February 2014

Keywords:

4-Hydroxynonenal

TGF- β 1

EGF receptor

Tropoelastin

Fibroblasts

Aging

Free radicals

ABSTRACT

Elastin is a long-lived protein and a key component of connective tissues. The tissular elastin content decreases during chronological aging, and the mechanisms underlying its slow repair are not known. Lipid oxidation products that accumulate in aged tissues may generate protein dysfunction. We hypothesized that 4-hydroxynonenal (4-HNE), a highly reactive α,β -aldehydic product generated from polyunsaturated fatty acid peroxidation, could contribute to inhibiting elastin repair by antagonizing the elastogenic signaling of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in skin fibroblasts. We report that a low 4-HNE concentration (2 μ mol/L) inhibits the upregulation of tropoelastin expression stimulated by TGF- β 1 in human and murine fibroblasts. The study of signaling pathways potentially involved in the regulation of elastin expression showed that 4-HNE did not block the phosphorylation of Smad3, an early step of TGF- β 1 signaling, but inhibited the nuclear translocation of Smad2. Concomitantly, 4-HNE modified and stimulated the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and subsequently ERK1/2 activation, leading to the phosphorylation/stabilization of the Smad transcriptional corepressor TGIF, which antagonizes TGF- β 1 signaling. Inhibitors of EGFR (AG1478) and MEK/ERK (PD98059), and EGFR-specific siRNAs, reversed the inhibitory effect of 4-HNE on TGF- β 1-induced nuclear translocation of Smad2 and tropoelastin synthesis. In vivo studies on aortas from aged C57BL/6 mice showed that EGFR is modified by 4-HNE, in correlation with an increased 4-HNE-adduct accumulation and decreased elastin content. Altogether, these data suggest that 4-HNE inhibits the elastogenic activity of TGF- β 1, by modifying and activating the EGFR/ERK/TGIF pathway, which may contribute to altering elastin repair in chronological aging and oxidative stress-associated aging processes.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Elastin, a key component of the extracellular matrix (ECM), confers to connective tissues (arteries, lung airways, skin, bladder, etc.) their ability to stretch and recoil [1–3]. The formation of elastin results from the association of tropoelastin molecules (the soluble form of elastin), via the formation of lysine-derived crosslinks catalyzed by lysyl oxidase, this generating an insoluble, stable, and persistent elastin network in the extracellular matrix [2–4].

Elastin is a long-lived protein that is synthesized during fetal development and in the postnatal period [5]. Then its mRNA level

as well as tropoelastin synthesis progressively decreases and remains low throughout adult life [5,6]. Elastin content gradually decreases with chronological aging [7–9] and may be extensively degraded in pathological situations such as dermal elastosis, pulmonary hypertension, progeria, Marfan syndrome, and moyamoya disease [10–12]. Though elastin biosynthesis can be partly reactivated in pathological conditions, tropoelastin expression in adult tissues remains very low, and elastin loss associated with insufficient elastin repair accelerates the loss of elasticity of connective tissues [13]. The mechanisms underlying the slow elastin repair and regeneration are not known.

Elastogenesis is controlled by an elastogenic regulatory axis implicating a balance between pro- and antielastogenic cytokines, whereas elastolysis is mediated by elastase expressed and secreted

* Corresponding author at: INSERM UMR1048 - CHU Rangueil, Department of Biochemistry, 1, avenue Jean Poulhès-BP84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France. Fax: +33 561 32 29 53.

E-mail address: anne.negre-salvayre@inserm.fr (A. Nègre-Salvayre).

by damaged tissues [14]. Among the cytokines that promote elastin synthesis, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) stimulates the expression of tropoelastin and allows the posttranscriptional stabilization of tropoelastin mRNAs via the Smad signaling pathway [15]. Antielastogenic cytokines include basic fibroblast growth factor, which negatively regulates elastogenesis and the expression of lysyl oxidase; HB-EGF, which reduces tropoelastin mRNA expression and matrix accumulation of elastin; TGF- α , which promotes elastolysis and defective elastin repair in lung emphysema; tumor necrosis factor- α , which suppresses tropoelastin mRNA levels in mesenchymal cells [14], and epidermal growth factor (EGF), which is produced in response to injury, for instance, through the secretion of neutral elastase in lung emphysema [14,16,17]. The EGF/EGF receptor (EGFR) system antagonizes TGF- β 1 signaling, by inhibiting the Smad signaling pathway in lung fibroblasts [17].

Oxidative stress imbalance is a key feature of the multifactorial aging process [18,19], particularly the alteration of elastin properties in connective tissues [9,13]. Increased oxidative stress in aged tissues is associated with the accumulation of lipid oxidation products, such as α,β -aldehydes and lipofuscin pigments that could be partly responsible for the autofluorescence and senescence of elastin and collagen fibers [20]. α,β -Aldehydes such as 4-hydroxynonenal (4-HNE) are highly reactive carbonyl compounds, which accumulate on proteins by forming adducts, this leading to protein dysfunction, apoptosis, and cell degeneration [21,22]. Intracellularly generated 4-HNE, as well as exogenously added 4-HNE, may form adducts on tyrosine kinase receptors [23–25], such as the EGFR, the modification of which triggers its activation and subsequently the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway [24]. This led us to hypothesize that EGFR activation by 4-HNE may contribute to inhibiting elastin repair in aged tissues, by inhibiting the elastogenic signaling triggered by TGF- β 1. In this study, we show that, in human and murine fibroblasts, 4-HNE modifies and activates the EGFR, which signals to inhibit the expression and synthesis of tropoelastin evoked by TGF- β 1. These effects are reversed by antioxidant and carbonyl scavenger agents such as carnosine and *N*-acetylcysteine, which restore the elastogenic signaling of TGF- β 1.

Experimental procedures

Chemicals and reagents

Anti-4-HNE Michael adduct rabbit polyclonal antibody was from Calbiochem (VWR, Fontenay sous Bois, France); anti-p-EGFR rabbit polyclonal antibody, anti-phospho-p44/42 MAPK (p-ERK1/2) (Thr202/Tyr204) rabbit monoclonal antibody, and anti-ERK1/2 rabbit polyclonal antibody were from Cell Signaling Technology (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France); anti-EGFR rabbit polyclonal antibody and anti-TG-interacting factor (TGIF; rabbit polyclonal) antibody were from Santa Cruz Biotechnology (Clinisciences, Nanterre, France); anti-P-Smad2 rabbit polyclonal antibody was from Millipore (Billerica, MA, USA); anti-P-Smad3 rabbit monoclonal antibody was from Abcam (VWR); FITC-anti-EGFR mouse monoclonal antibody was from BD Biosciences (Le-Pont-de-Claix, France); and anti- β -actin monoclonal was from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Secondary antibodies anti-mouse and anti-rabbit were from Santa Cruz Biotechnology.

Cell culture reagents were from Invitrogen Life Technologies (Saint Aubin, France). SYTO-13, propidium iodide, Alexa-Fluor 488 (green)- and Alexa-Fluor 546 (red)-conjugated secondary antibodies were from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy-Pontoise,

France). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), L-carnosine, PD98059 (MAPK inhibitor), and SB431542 (TGF- β RI inhibitor) were from Sigma-Aldrich. siRNA specific to murine EGFR and control siRNA were from Santa Cruz Biotechnology. Fastin Elastin assay was from Biocolor Life Science Assays (Carrickfergus, County Antrim, UK); acrylamide-4 \times /bisacrylamide-2 \times solution was from Euromedex (Souffelweyersheim, France); 4-HNE and AG1478 (EGFR inhibitor) were from Merck Calbiochem (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA). The ECL chemiluminescence kit was from Amersham Pharmacia (Velizy-Villacoublay, France). HiPerfect transfection reagent was from Qiagen (Les Ulis, France).

Cell culture

Human skin fibroblasts isolated from a healthy adult volunteer (AS.2410-07) were immortalized by transfection of SV40T antigen using Lipofectamine LTX reagent and Plus reagent (Invitrogen). Murine wild-type fibroblasts were isolated from wild-type mice (strain 129/SV). The murine B82L parental fibroblasts (EGFR deficient) and B82LK+ cells (transduced with wild-type EGFR) were a generous gift from Dr. M. Weber (Charlottesville, VA, USA) [26]. Human and murine fibroblasts were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and 40 μ mol/L glutamine and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin) in a 5% CO₂ humidified incubator, at 37 °C. Twenty-four hours before the experiments, cells were starved in serum-free medium, as indicated. Preincubation of cells with 4-HNE was performed in Hanks' balanced salt solution (HBSS) to avoid buffering of free 4-HNE by thiols and amino groups present in standard culture medium.

siRNA transfection

Murine fibroblasts were transfected with murine EGFR (sc-29302) or control (sc-37007) siRNA (100 nM final concentration; Santa Cruz Biotechnology) using OptiMEM (Invitrogen) and HiPerfect reagent according to the manufacturer's recommendations (Qiagen).

Quantitative RT-PCR

TRIzol reagent (Invitrogen) was added to cell pellets for RNA extraction according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified using NanoDrop ND-1000. One microgram of RNA was used for reverse transcription with a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Fast SYBR green master mix (Applied Biosystems) and the ABI StepOne+ real-time PCR system (Applied Biosystems) were used to evaluate mRNA levels of elastin according to the manufacturer's recommendations.

The following primers were used: elastin forward, CTAAGG-CAGCCAAGTATGGA, and reverse, CCCGTAAGTAGGAATGCCTC; GAPDH forward, CCTCCCGCTTCGCTCTCT, and reverse, GCTGGCG-ACGCAAAGA.

Incubation conditions were 95 °C for 20 s, followed by 40 cycles of 3 s at 95 °C and annealing/extension for 30 s at 60 °C. Each sample was done in duplicate and data were analyzed using StepOne+ software version 2.2.2. Expression was normalized to GAPDH.

Immunofluorescence

Human vascular smooth muscle cells grown on cover glass slides were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in PBS/4% paraformaldehyde for 10 min. After being blocked

with PBS containing 5% milk for 45 min, the cells were incubated with the FITC–EGFR antibody for 1 h and with the 4-HNE antibody for 1 h and revealed with Alexa-Fluor 546-conjugated secondary antibody for 45 min. The slides were visualized using a Zeiss LSM 510 fluorescence confocal microscope (Le Pecq, France).

Elastin content determination

The elastin assay (Fastin Elastin assay kit) measured soluble tropoelastin and cell-associated elastin that was solubilized into α -elastin polypeptides. The cell layers were scraped in PBS and sedimented by centrifugation (6000 rpm).

The samples were then resuspended in 400 μ l of 0.25 M oxalic acid and heated at 100 °C for 1-h periods to solubilize all matrix components except elastin. An equal volume of the trichloroacetic acid and hydrochloric acid-containing elastin-precipitating reagent was added to 50 μ l of extracts (under the conditions indicated by the manufacturer) and centrifuged at 10,000 g, to precipitate elastin, and then allowed to bind the elastin-specific dye for 1.5 h under gentle agitation at room temperature. Bound dye was suspended in a 250- μ l volume and then transferred to a 96-well plate.

Absorbance was measured at 513 nm on a plate reader (Tecan) and compared to a standard curve generated from known concentrations of α -elastin.

Evaluation of cytotoxicity—MTT assay, Syto13/PI "live/dead" assay

The total cytotoxicity was evaluated by the MTT assay, as previously used [27].

The Syto13/PI live/dead assay is based on the difference in permeability of cell membranes to two fluorescent DNA-intercalating probes, Syto13, a permeative green intercalating probe entering all the cells, and propidium iodide, a nonpermeative red intercalating probe.

Western blot analysis

Cells were lysed in protein extraction buffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM β -glycerophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM sodium fluoride, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ml aprotinin) for 30 min on ice. After centrifugation (13,000 rpm, 10 min) the supernatants were used for Western blot experiments. Protein concentration was determined using the Bradford reagent (Bio-Rad).

Fifty micrograms each of protein cell extracts was resolved by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). The membranes were probed with the indicated primary antibodies and revealed with the secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase using the ECL chemiluminescence kit (Amersham). β -Actin, tubulin, or total MAPKs were used to control for equal loading of proteins.

Mice

The experimental protocol (No. 12/1048/10/13) was carried out in accordance with the French legislation and was approved by the local ethics committee for animal experiments. Young (6 weeks of age) and older (1 year of age) C57BL/6 mice (four animals per group) were sacrificed (by cervical dislocation) after intraperitoneal injection of ketamine (150 mg/kg body wt) and xylazine (10 mg/kg). Skin and aortas were recovered, and part of the arterial or skin segments was fixed in formaldehyde (4% in PBS) and embedded in paraffin for histological analysis. Another

segment of each tissue was kept frozen at -80 °C, for further analysis of elastin and HNE-adduct content.

Statistical analyses

Data are given as means \pm SD. Statistical comparison of the data was performed using the *t* test for comparison between two groups and is explained in the figure legends (Sigma Stat software, San Jose, CA, USA). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

4-HNE inhibits tropoelastin mRNA expression and synthesis evoked by TGF- β 1 in human fibroblasts

Preliminary studies indicated that, under the conditions used here, low 4-HNE concentrations, up to 5 μ M, are not toxic for human and murine fibroblasts (Supplementary Fig. 1), i.e., preincubation for 3 h in HBSS containing 4-HNE and then replacement with normal serum-free and 4-HNE-free medium up to 48 h. Note that cells were preincubated with 4-HNE in HBSS to avoid buffering of free 4-HNE by thiols and amino acids present in the standard culture medium. In this study, we generally used low nontoxic 4-HNE concentrations (1–2 μ M), which are known to activate tyrosine kinase receptors, as previously reported [23–25].

TGF- β 1 is known to upregulate tropoelastin expression by increasing the stability of tropoelastin mRNA [28,29]. Thus, we utilized TGF- β 1 to investigate the effect of 4-HNE on tropoelastin expression in human fibroblasts. TGF- β 1 rapidly stimulated a mild increase in tropoelastin mRNA expression after 1 h of incubation, which was maintained up to 2 h and then decreased progressively (Fig. 1A) and was abolished in cells preincubated for 3 h with 2 μ M 4-HNE (Fig. 1B). Likewise, a significant increase in cellular elastin content (cell-associated elastin and soluble tropoelastin, determined with the Biocolor Fastin kit; Fig. 1C) was observed in cells stimulated by TGF- β 1 alone. In contrast, this TGF- β 1-induced tropoelastin synthesis was abrogated in fibroblasts preincubated for 3 h with 4-HNE (Fig. 1C). Note that the cellular elastin content was similar in untreated control and 4-HNE-pretreated fibroblasts, suggesting that 4-HNE did not stimulate elastin degradation, but rather abolished the elastogenic activity of TGF- β 1.

4-HNE does not alter Smad3 phosphorylation elicited by TGF- β 1, but inhibits the nuclear translocation of Smad2

Similar results were observed in murine fibroblasts, in which TGF- β 1-induced tropoelastin synthesis was completely inhibited by 4-HNE (Fig. 2A). We used murine fibroblasts in the next experiments to investigate cell signaling, because the EGFR-deficient cells used below were of murine origin and because in vivo experiments were performed on mice.

TGF- β 1 signaling involves the phosphorylation and the nuclear translocation of Smad2 and Smad3 transcription factors, which are involved in the stabilization of tropoelastin mRNAs [29,30]. First, we investigated whether 4-HNE could inhibit R-Smad phosphorylation, either by blocking the formation of the TGF- β 1 type II receptor/type I receptor heterocomplex resulting from TGF- β 1 binding at the cell surface or by inhibiting their kinase activity [15]. The 3-h preincubation of murine fibroblasts with 2 μ M 4-HNE did not abrogate the phosphorylation of Smad3 triggered by TGF- β 1 (at 15 min; Fig. 2B), indicating that 4-HNE does not alter the activation of TGF- β type II and type I receptors or their kinase activity involved in Smad3 phosphorylation. In contrast, 4-HNE inhibited the nuclear translocation of Smad2 (Fig. 2C), indicating

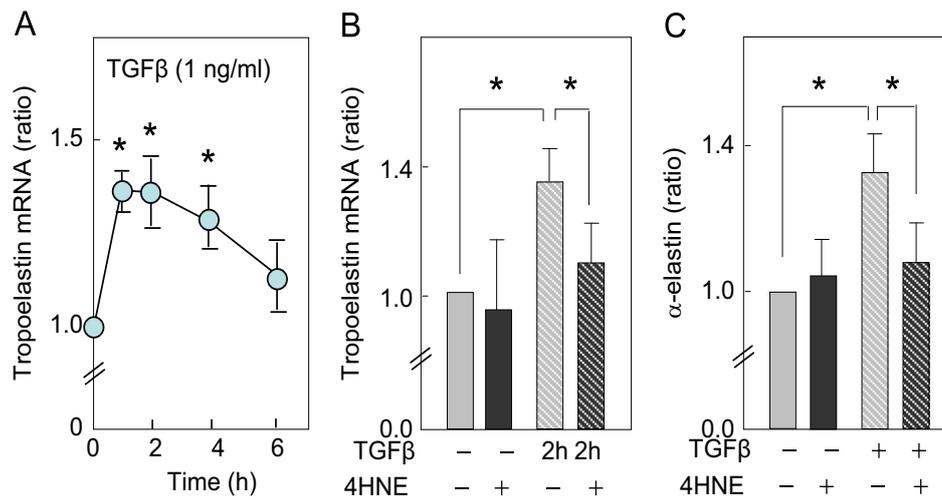


Fig. 1. 4-HNE inhibits the expression of tropoelastin mRNA and tropoelastin synthesis elicited by TGF- β 1 in human fibroblasts. (A, B) Time course of tropoelastin mRNA in human fibroblasts stimulated by TGF- β 1 and inhibitory effect of 4-HNE. Human fibroblasts were preincubated in HBSS culture medium, in the absence or presence of 4-HNE (2 μ M). After 3 h this medium was discarded and replaced by fresh RPMI medium, and TGF- β 1 (1 ng/ml) was added. At the indicated times, fibroblasts were recovered and tropoelastin mRNA level was evaluated by qPCR (normalized to GAPDH). (A) Time course of tropoelastin mRNA elicited by TGF- β 1 (1 ng/ml). (B) Tropoelastin mRNA level upon stimulation by TGF- β 1 (1 ng/ml for 2 h), in fibroblasts preincubated with or without 4-HNE (2 μ M) as above indicated. Unstimulated controls and controls using 4-HNE alone were done concomitantly. Mean \pm SD of six separate experiments, * p < 0.05. (C) Determination of the total cell-associated elastin/tropoelastin content in human fibroblasts and inhibitory effect of 4-HNE. Confluent fibroblasts were preincubated with or without 4-HNE (2 μ M) for 3 h in HBSS medium, then the medium was replaced by RPMI containing TGF- β 1 (1 ng/ml). After 24 h incubation, fibroblasts were harvested and total (soluble and insoluble) elastin was extracted and determined using the Biocolor Fastin kit (as described under Experimental procedures). Data are expressed as the mean \pm SD of seven separate experiments, * p < 0.05.

that 4-HNE may interfere with the transcriptional activity of the R-Smad complex.

HNE induces EGFR-ERK1/2-TGIF signaling that antagonizes TGF- β 1-induced tropoelastin synthesis

Several reports show that EGF and EGF-like growth factors downregulate the tropoelastin expression in lung fibroblasts, through ERK1/2-mediated stabilization of the Smad corepressor TGIF [16,17,30]. As we previously reported that EGFR can be modified and activated by 4-HNE, through a ligand-independent mechanism [24], this led us to hypothesize that the activation of EGFR signaling by 4-HNE could reduce TGF- β 1-induced tropoelastin synthesis. In preliminary experiments, we evaluated at 2 μ M the optimal concentration of 4-HNE required to activate EGFR in fibroblasts under the culture conditions (HBSS) used for preincubation of cells with 4-HNE.

As shown in Fig. 3A EGFR was expressed in untreated cultured fibroblasts and a low staining of 4-HNE adducts was detected in untreated cells (top). In fibroblasts incubated with 2 μ M 4-HNE, the level of 4-HNE adducts was increased and was, in part, associated with EGFR (Fig. 3A, right, merge, and Supplementary Fig. S2), which confirms the formation of 4-HNE adducts on EGFR, in agreement with previously reported data [23,24]. EGFR was activated by 4-HNE (2 μ M) in a time-dependent manner, the maximal activation being observed after 1 and 2 h of incubation (Fig. 3B). Concomitantly 4-HNE stimulated the phosphorylation of ERK1/2 and of TGIF (Fig. 3B). Fibroblasts pretreated with 4-HNE for 3 h and stimulated by TGF- β 1 for 15 min exhibited a sustained ERK1/2 and TGIF phosphorylation (Fig. 3C), whereas TGF- β 1 alone induced no phosphorylation of ERK1/2 and TGIF (Fig. 3C), under the conditions of the experiment.

To investigate whether the reduction of tropoelastin synthesis induced by 4-HNE is mediated by EGFR/ERK/TGIF signaling in our model system, we checked whether EGFR deficiency or inhibition of the EGFR/ERK/TGIF signaling pathway by pharmacological inhibitors can relieve the 4-HNE-induced reduction of tropoelastin synthesis.

As shown in Figs. 4A and B, silencing EGFR with specific siRNAs abrogated the 4-HNE-induced activation of ERK1/2 and TGIF and

the subsequent decrease in tropoelastin synthesis. In EGFR-deficient B82L fibroblasts [28], 4-HNE did not inhibit the TGF- β -induced tropoelastin synthesis (Fig. 4C) and, interestingly, it may be noted that the basal level of tropoelastin synthesis was higher in EGFR-deficient B82L cells than in nondeficient fibroblasts.

Likewise, pharmacological agents, AG1478 (a specific inhibitor of EGFR) and PD98059 (a MEK1 inhibitor that prevents ERK1/2 activation), blocked the EGFR/ERK/TGIF signaling pathway and abrogated the 4-HNE-induced reduction of tropoelastin by TGF- β 1 (Figs. 4D and E).

Carbonyl scavengers prevent 4-HNE-induced inhibition of tropoelastin synthesis by TGF- β 1

To investigate whether carbonyl scavengers were effective at preventing 4-HNE-induced inhibition of tropoelastin synthesis by TGF- β 1, the cells were preincubated with NAC, a classical antioxidant with carbonyl-scavenger activity, and carnosine, a dipeptide with carbonyl-scavenger properties. As shown in Fig. 5A, preincubating cells with NAC (1 mM) and carnosine (1 mM) prevented in part the phosphorylation of both ERK1/2 and TGIF induced by 4-HNE and restored the TGF- β 1-induced elastin synthesis (Fig. 5B). Last, AG1478, NAC, and carnosine reversed the inhibitory effect of 4-HNE on the Smad2 nuclear translocation evoked by TGF- β 1 (Fig. 5C).

Altogether, these data indicate that 4-HNE downregulates the elastogenic signaling of TGF- β 1 in fibroblasts. This effect is mediated, at least in part, by the formation of 4-HNE adducts on EGFR, which subsequently activates the EGFR/ERK/TGIF pathway and inhibits the activity of Smad. The inhibitory effect of 4-HNE on TGF- β 1 signaling can be reversed by the carbonyl scavengers carnosine and *N*-acetylcysteine and by EGFR inhibitors (and EGFR-specific siRNA), which restore the elastogenic activity of TGF- β 1.

EGFR is modified by 4-HNE in vessels from aged mice

During aging the tropoelastin synthesis remains very low in tissues from the elderly, and the elastin content decreases in almost all tissues, although elastin biosynthesis can be partly

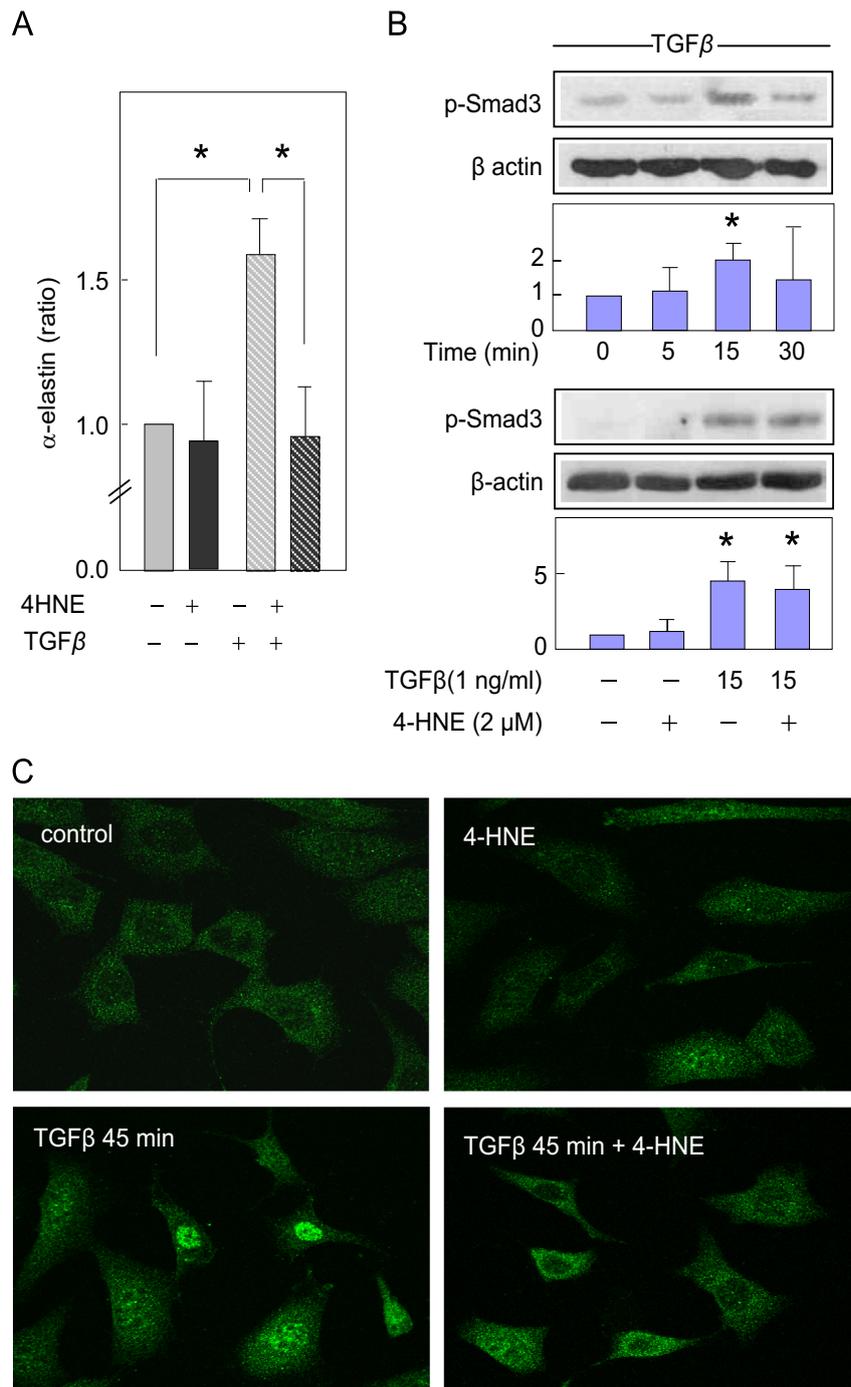


Fig. 2. Effect of 4-HNE on Smad2/3 phosphorylation and nuclear translocation. (A) Effect of 4-HNE on elastin content in murine fibroblasts. Confluent mouse fibroblasts were preincubated with or without 4-HNE (2 μM) in HBSS and stimulated with TGF-β1, and total (soluble and insoluble) elastin was determined under the conditions used for Fig. 1C. Data are expressed as the mean ± SD of five separate experiments, **p* < 0.05. (B) Top: time course of Smad3 phosphorylation by TGF-β1 (1 ng/ml) in murine fibroblasts. At the indicated times, cells were recovered, lysed, and used for immunoblots (as indicated under Experimental procedures), revealed by anti-phospho-Smad3 (Abcam) and anti-β-actin as housekeeping protein (Sigma–Aldrich). Bottom: effect of 4-HNE on Smad3 phosphorylation triggered by TGF-β1. Murine fibroblasts were preincubated for 3 h in HBSS with or without 4-HNE (2 μM), then the medium was replaced by RPMI containing TGF-β1 (1 ng/ml). Smad3 phosphorylation was evaluated by Western blot, as in the top. Representative Western blots are shown. Data are expressed as the mean ± SD of four separate experiments. Comparison to the negative control, either time 0 or unstimulated cells: **p* < 0.05. (C) Inhibitory effect of 4-HNE on the nuclear translocation of Smad2. Fibroblasts grown on glass slides were preincubated for 3 h with or without 4-HNE (2 μM) and stimulated by TGF-β1 (1 ng/ml, 45 min). Cells were incubated with the Smad2 antibody and revealed with Alexa-Fluor 488-conjugated (green) secondary antibodies (1/1000). Representative pictures of three experiments are shown.

reactivated under pathological conditions [13]. At the same time, lipid peroxidation products tend to rise, leading progressively to lipofuscin accumulation [20]. This led us to examine whether EGFR can be an age-dependent target of 4-HNE in vivo, by comparing aortas (an elastin-rich tissue) from young (6 weeks of age) and from 1-year-old C57BL/6 mice.

As expected, the elastin content was lower in aorta and skin from old compared to young mice (Fig. 6A), whereas the content of 4-HNE adducts was three to four times higher in aorta and skin

from old compared to young mice (Fig. 6B). Double-label indirect immunofluorescence of aortas showed that EGFR was mainly expressed in the endothelium and the adventitia of aortas whatever the age. In contrast, 4-HNE adducts were much higher in the endothelium and the adventitia of aortas from aged mice (Fig. 6C). Elastin was not modified by 4-HNE, indicating that under the conditions of chronological aging, elastin is not a target of 4-HNE-adduct modification. In contrast, in some areas of the endothelium and of the adventitia of aortas from old mice, the fluorescence of

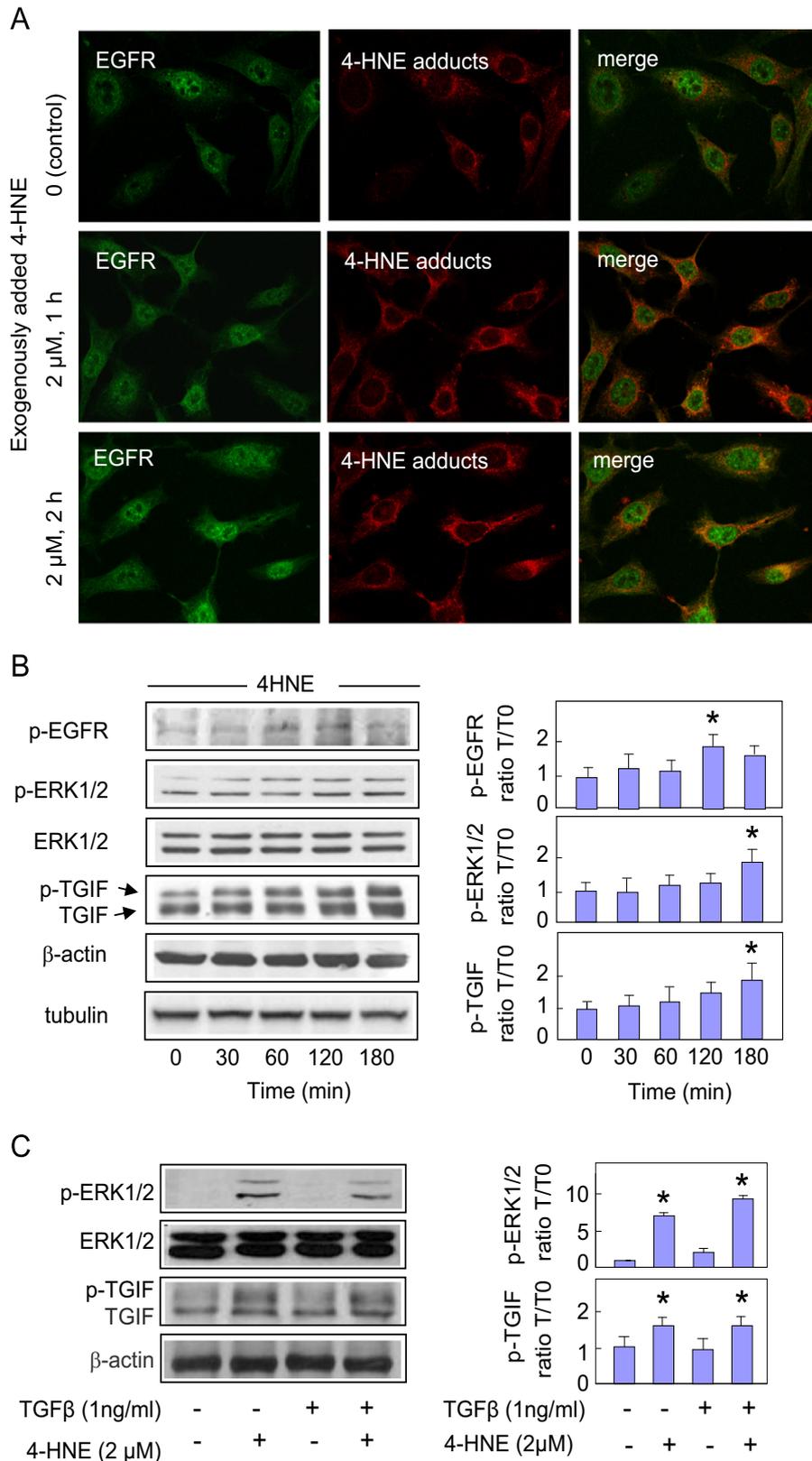


Fig. 3. 4-HNE triggers EGFR phosphorylation and activates ERK1/2 and TGIF. (A) Immunofluorescence confocal microscopy of murine fibroblasts preincubated for 3 h with 4-HNE (2 μ M) and double labeled with anti-4-HNE Michael adducts (Calbiochem) revealed with Alexa-Fluor 546 (red) anti-rabbit secondary antibody and FITC mouse anti-EGFR antibody (BD Biosciences). Representative pictures of four separate experiments. (B) Low 4-HNE concentration (2 μ M) activation of EGFR, ERK1/2, and TGIF. Murine fibroblasts were stimulated by 4-HNE (2 μ M) in HBSS. Cells were recovered at the indicated times, and then cell lysates were prepared and used for immunoblot experiments, using anti-phospho-EGFR and anti-phospho-ERK1/2 (Cell Signaling), anti-TGIF (Santa Cruz Biotechnology), and anti- β -actin as housekeeping protein. (C) TGF- β 1 does not alter 4-HNE-induced TGIF activation. Fibroblasts were preincubated for 3 h with 4-HNE (2 μ M) and then were stimulated with TGF- β 1 for 15 min. Immunoblots for phospho-ERK1/2 and TGIF were performed as for (B). Western blots are representative of three to five separate experiments. Data are expressed as the mean \pm SD of three to five separate experiments, * p < 0.05.

4-HNE adducts was associated with EGFR (Fig. 6C, merge). Interestingly, the same results were observed in aortas from aged human patients, by comparison with younger subjects, with an

accumulation of 4-HNE adducts associated with EGFR in the cells of the media and adventitia (data not shown). These data suggest that the modification in vivo of EGFR by 4-HNE could trigger EGFR

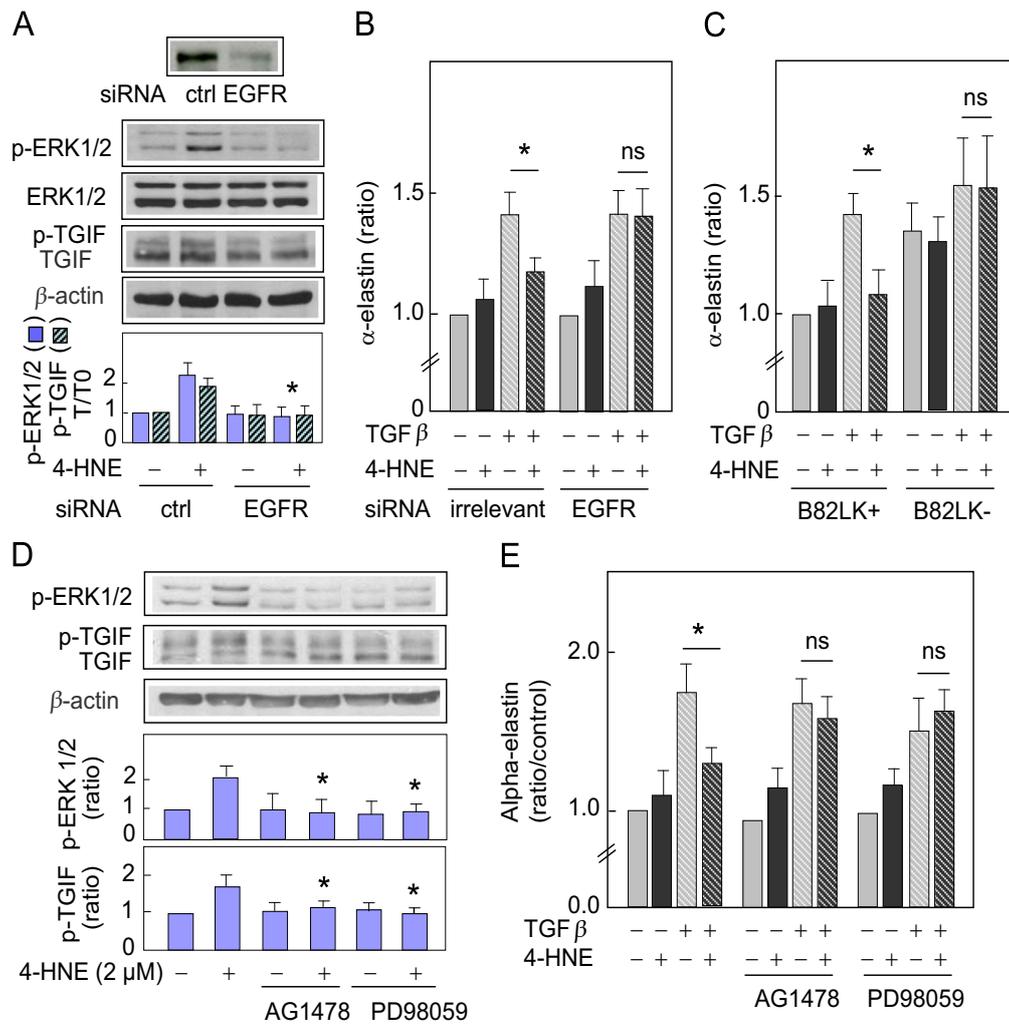


Fig. 4. EGFR deficiency or inhibition prevents the inhibitory signaling of 4-HNE on TGF- β 1 and the subsequent inhibition of elastin synthesis. (A, B) Effects of EGFR siRNA. (A) Murine fibroblasts were transfected with 100 nM scrambled siRNA or 100 nM EGFR siRNA for 24 h as described under Experimental procedures. After 24 h transfection, the cells were treated with 4-HNE (2 μ M) for 3 h and then used for immunoblot experiments using anti-EGFR, anti-phospho-ERK1/2, anti-TGIF, and anti- β -actin antibodies. (B) To evaluate the effect of siRNA on elastin synthesis, fibroblasts were preincubated with EGFR siRNA for 24 h, then incubated for 3 h in HBSS with 4-HNE (2 μ M), and then stimulated by TGF- β 1 (1 ng/ml) for 24 h. At the end, the elastin content was measured, as reported in Fig. 1. (C) Effect of EGFR deficiency. Murine fibroblast cell lines (derived from B82L) expressing an active (B82LK+) or inactive (B82LK-) form of EGFR were preincubated for 3 h in HBSS with 4-HNE (2 μ M) and then stimulated by TGF- β 1 (1 ng/ml) for 24 h. At the end, the elastin content was measured, as reported for (B). (D) Effects of pharmacological inhibitors of EGFR (AG1478, 10 μ M) and MEK (PD98059, 10 μ M) on the ERK1/2 and TGIF phosphorylation evoked by 4-HNE in murine fibroblasts. Cells were incubated in HBSS containing (or not) 4-HNE (2 μ M) and the inhibitors. After 3 h, the cells were recovered and used for immunoblot experiments using anti-phospho-ERK1/2, anti-TGIF, and anti- β -actin antibodies. The data are representative of four experiments. (E) Effects of EGFR and ERK1/2 inhibitors on elastin synthesis. Fibroblasts were preincubated with inhibitor AG1478 (10 μ M) or PD98059 (10 μ M) and 4-HNE (2 μ M) for 3 h in HBSS and then stimulated by TGF- β 1 (1 ng/ml) for 24 h. At the end, the elastin content was measured, as reported in Fig. 1. In (B, C, and E), the data are expressed as the mean \pm SD of four separate experiments; * p < 0.05; ns, not significant.

signaling, contributing to altering in situ the TGF- β 1-induced elastin renewal in aged tissues.

Discussion

In this paper, we show that 4-HNE, a highly reactive α,β -aldehydic end-product generated from polyunsaturated fatty acid peroxidation, antagonizes the elastogenic signaling evoked by TGF- β 1 in human and murine fibroblasts. This inhibitory effect involves the modification of EGFR by 4-HNE and the activation of its downstream signaling, leading to the stabilization of the Smad corepressor TGIF, which inhibits TGF- β 1-induced elastogenic effect. These data report for the first time that aldehydes formed during lipid peroxidation may inhibit elastin renewal in aged tissues.

Elastin is the longest lasting protein in human tissues [5]. Tropoelastin represents its main precursor component and is coded by a unique gene (ELN) in humans that is active before

birth and in the first years of life for the generation of elastin required for body development [4–7]. ELN expression is then turned down, as the connective tissues rely on the persistence and long half-life of elastin [7]. Though elastin synthesis can be theoretically reactivated in pathological situations, elastin renewal is generally not sufficient to compensate for elastin loss [7–9]. The progressive loss of elastin in skin and vessels during aging seems irreversible, together with a lack of efficient reactivation of ELN expression and tropoelastin synthesis, as well as its integration in elastin fibers [9]. Though various attempts aiming at restimulating tropoelastin expression and elastin deposition have been made, using agents such as all-*trans*-retinoic acid, aldosterone, and mineralocorticoid receptor antagonists [31–34] or systems targeting LOXL expression [35], which allows the crosslinking of tropoelastin fibers, the mechanisms explaining why ELN expression and tropoelastin synthesis cannot be reactivated during aging are not so far explained.

Many positive or negative effectors are known to regulate tropoelastin expression, allowing the identification of a cytokine-regulatory

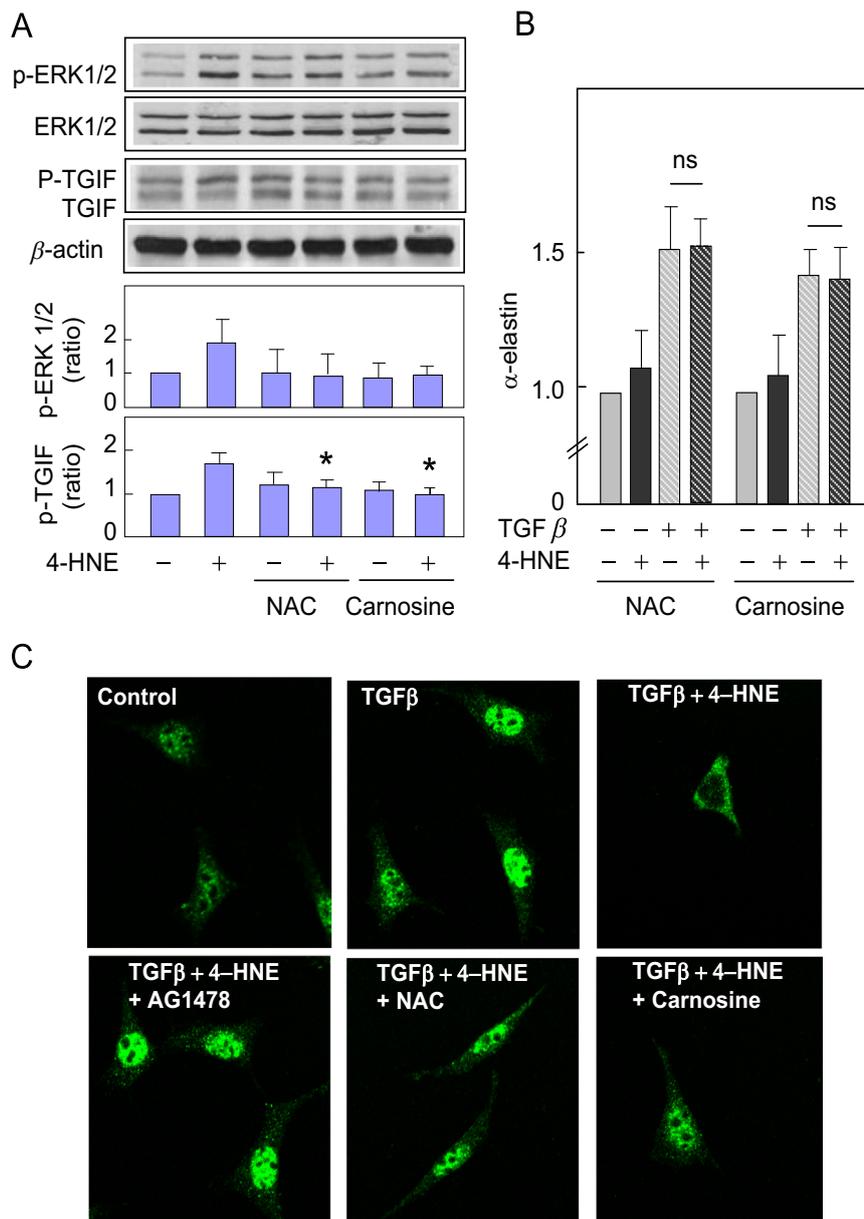


Fig. 5. Carnosine and NAC prevent the inhibitory signaling of 4-HNE on TGF- β 1 and the subsequent inhibition of elastin synthesis. (A) Fibroblasts were incubated for 3 h in HBSS, in the absence or presence of 4-HNE (2 μ M) and carnosine (1 mM) or NAC (1 mM). After 3 h, immunoblot experiments were done as for Fig. 4D. The data are representative of four experiments. (B) The effects of carnosine and NAC (1 mM each) on elastin synthesis were evaluated under the experimental conditions of Fig. 4E. The data are expressed as the mean \pm SD of three separate experiments; * p < 0.05; ns, not significant. (C) AG1478, carnosine, and NAC reverse the inhibitory effect of 4-HNE on the nuclear translocation of Smad2. Fibroblasts were preincubated for 3 h with or without 4-HNE (2 μ M) and with or without AG1478 (10 μ M), carnosine, or NAC (1 mM each); stimulated by TGF- β 1 (1 ng/ml, 45 min); and then treated as described in the legend to Fig. 2C. Representative pictures of three experiments are shown.

axis comprising pro- and anti-elastin cytokines [14]. Among the elastogenic cytokines, TGF- β 1 exerts potent positive effects on tropoelastin transcription and, posttranscriptionally, on tropoelastin mRNA stabilization, via the Smad2/3 pathway [14,28,29]. Moreover, TGF- β 1 could reduce the levels of microRNA miR-29, which is involved in the downregulation of tropoelastin mRNA expression in adults [14,36,37].

At the opposite end, EGF decreases the expression and stability of tropoelastin mRNA elicited by TGF- β 1 and, in turn, elastin repair, with particular implication in pathological situations such as lung asthma, in which the balance between elastogenic/anti-elastogenic cytokines regulates the repair of elastin in damaged lung parenchyma [16,17]. This contrasts with a number of reports pointing out a cooperation between TGF- β 1 and EGF, which may be essential for the expression of TGF- β 1-induced fibrotic target genes [38], a mechanism a priori not conflicting with the anti-elastogenic effect of EGF on TGF- β 1 [39].

We hypothesized that the EGFR-induced inhibitory effect on TGF- β 1-induced elastogenesis in the lung may have a more general implication in elastin renewal, particularly because EGFR can be modified and activated by α,β -unsaturated aldehydes issued from lipid peroxidation [21,22], which accumulate in aged tissues, leading to matrix and tissular protein dysfunction as a consequence of increased oxidative stress [19]. The implication of these aldehydes in the pathophysiology of extracellular matrix aging is still unclear, though their mechanism of protein modification is close to that induced by advanced glycation end-products (AGEs), which are found on elastin and in the elastin environment in diabetes and in aged tissues and could contribute to arterial stiffness and aneurysm [40,41].

4-HNE is known to interact with TGF- β 1 signaling, particularly in tumors, in which the cooperation between both effectors may promote tumoral cell apoptosis [42]. In our system, the preincubation of human fibroblasts with low 4-HNE concentrations,

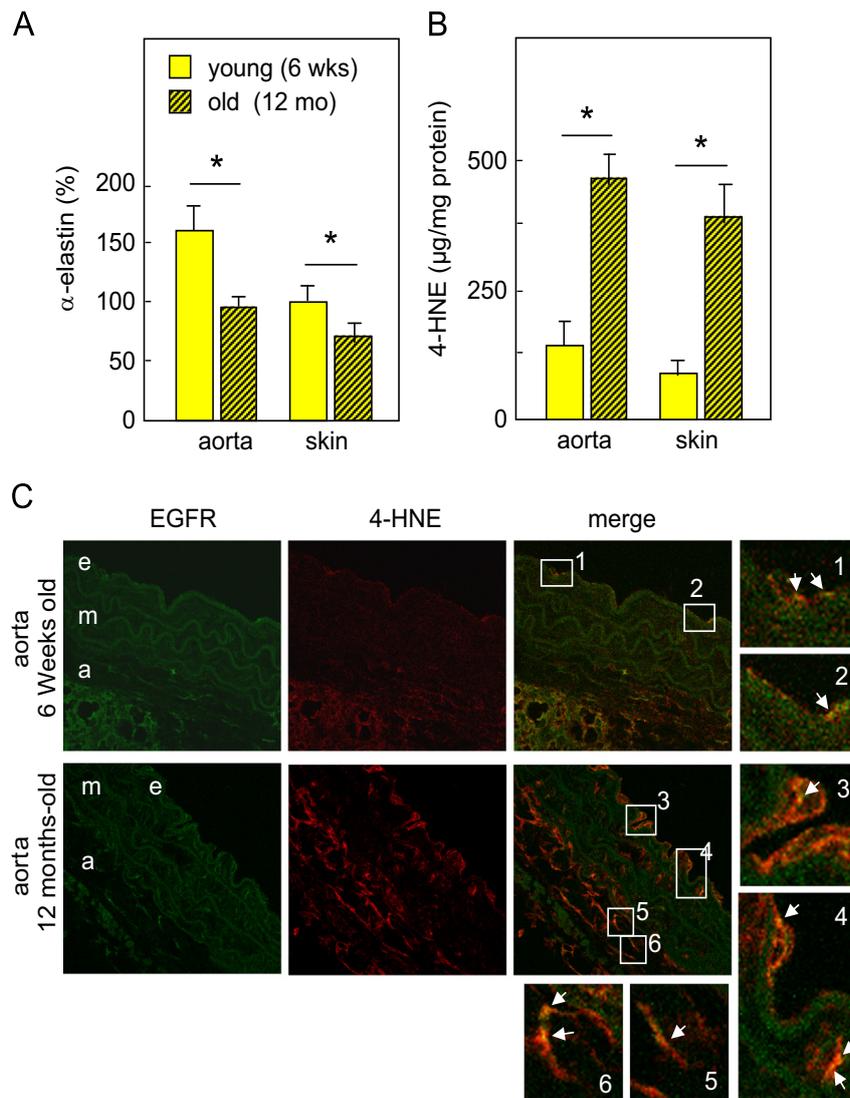


Fig. 6. Increase in HNE adducts and modification of EGFR are associated with elastin decrease in aorta and skin from aged mice. (A, B) Aortas and skin from four aged (12 months of age) and four young (6 weeks of age) C57BL/6 mice were recovered and homogenized as reported under Experimental procedures. (A) Total tissue elastin content was determined as reported in the legend to Fig. 1. (B) 4-HNE adduct content was determined by an ELISA kit (Cell Biolabs, Souffelweyersheim, France). $*p < 0.05$. (C) Immunofluorescence confocal microscopy of aorta sections from young and aged mice, labeled with anti-4-HNE Michael adducts (Calbiochem) and anti-EGFR monoclonal antibody (BD Biosciences). In the insets, higher magnification shows the colocalization of EGFR with 4-HNE adducts (yellow areas indicated by the white arrows) in the composite image (merge), in young (insets 1, 2) and aged (insets 3, 4, 5, 6) mice. Representative pictures of four separate experiments are shown.

followed by their stimulation by TGF- β 1, did not induce apoptosis, but suppressed the expression of tropoelastin mRNAs evoked by TGF- β 1 and subsequently tropoelastin synthesis. However, 4-HNE did not inhibit the phosphorylation of Smad3 by TGF- β 1, thus indicating that the activity of the transmembrane serine/threonine kinase TGF- β type I and type II receptors is not altered by low 4-HNE concentration, in contrast to other transmembrane receptors such as EGFR or PDGFR [24–26]. Likewise, a direct inhibitory effect of 4-HNE on TGF- β 1 itself can be excluded because the 4-HNE-containing culture medium was removed from the fibroblasts at the end of the preincubation period and because fibroblasts normally responded to TGF- β 1 stimulation.

We and others previously reported that EGFR is targeted by 4-HNE, either freely added to the culture medium or brought to the cells via oxidized lipoproteins or generated from intracellular lipid peroxidation [24]. In agreement with these previous reports, 4-HNE rapidly modified EGFR and stimulated its phosphorylation and downstream signaling, which led to the phosphorylation of TGIF, a negative regulator of TGF- β 1 signaling, known to counter Smad2 phosphorylation, nuclear translocation, and transcriptional activity [16,17,43,44]. Our data indicate that TGIF is activated by 4-HNE through EGFR activation as suggested by the EGFR-deficient

B82L cell line, pharmacological inhibitors of EGFR or MEK/ERK1/2, and EGFR silencing by siRNAs. Thus, it is likely that the 4-HNE-induced EGFR/TGIF signaling contributes to inhibiting elastin renewal evoked by TGF- β 1, because all the agents that reverse the inhibitory effect of 4-HNE inhibited both EGFR activation and TGIF phosphorylation.

Interestingly, HNE adducts significantly accumulated in the tissues (vessels and skin) of old mice and colocalized with EGFR, thereby indicating that EGFR is a target of 4-HNE in vitro and in vivo, in the skin and in the vessels of aged animals (this being associated with a disorganization and a decreased content of elastin fibers). It may be noted that the accumulation of 4-HNE adducts in aged mice and the modification of EGFR by 4-HNE are independent of any cholesterol accumulation because C57BL/6 mice do not develop any atherosclerotic lesions.

In the aging process, the accumulation of AGEs may cause inflammation, fibrosis, and elastin disruption [40]. 4-HNE formed from the oxidative stress imbalance in aged tissues accumulates in tissues and may generate various alterations, such as AGEs.

Finally, our data put 4-HNE and other aldehydes from lipid peroxidation at the crossroads of ECM modification and alteration during intrinsic aging. The fact that agents such as carnosine or

NAC prevent the deleterious effects of 4-HNE on tropoelastin synthesis elicited by TGF- β 1 allows us to propose these classical drugs as new antiaging agents to prevent elastin loss in aged tissues.

Acknowledgments

The authors thank C. Bernis and C. Santiago, for their excellent technical assistance. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, University Paul Sabatier Toulouse, Centre Européen de Recherche sur la Peau (Pierre Fabre Dermocosmetique), and ANR-Carina (ANR-12-BSV1-0016-01).

Appendix A. Supplementary Information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.015>.

References

- [1] Mithieux, S. M.; Weiss, A. S. *Elastin. Adv. Protein Chem.* **70**:437–461; 2005.
- [2] Debelle, L.; Alix, A. J. The structures of elastins and their function. *Biochimie* **81**:981–994; 1999.
- [3] Kielty, C. M.; Sherratt, M. J.; Shuttleworth, C. A. Elastic fibres. *J. Cell Sci.* **115**:2817–2828; 2002.
- [4] Wise, S. G.; Weiss, A. S. Tropoelastin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**:494–497; 2009.
- [5] Shapiro, S. D.; Endicott, S. K.; Province, M. A.; Pierce, J. A.; Campbell, E. J. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *J. Clin. Invest.* **87**:1828–1834; 1991.
- [6] Vrhovski, B.; Weiss, A. S. Biochemistry of tropoelastin. *Eur. J. Biochem.* **258**:1–18; 1998.
- [7] Mecham, R. P. Elastin synthesis and fiber assembly. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **624**:137–146; 1991.
- [8] Bruce, M. C.; Honaker, C. E. Transcriptional regulation of tropoelastin expression in rat lung fibroblasts: changes with age and hyperoxia. *Am. J. Physiol.* **274**:L940–L950; 1998.
- [9] Sherratt, M. J. Tissue elasticity and the aging elastic fibre. *Age* **31**:305–325; 2009.
- [10] Baldwin, A. K.; Simpson, A.; Steer, R.; Cain, S. A.; Kielty, C. M. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **15**:e8; 2013.
- [11] Kielty, C. M. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **8**:1–23; 2006.
- [12] Lewis, K. G.; Bercovitch, L.; Dill, S. W.; Robinson-Bostom, L. Acquired disorders of elastic tissue. Part II. Decreased elastic tissue. *J. Am. Acad. Dermatol.* **51**:165–185; 2003.
- [13] Robert, L.; Labat-Robert, J. Aging of connective tissues: from genetic to epigenetic mechanisms. *Biogerontology* **1**:123–131; 2000.
- [14] Sproul, E. P.; Argraves, W. S. A cytokine axis regulates elastin formation and degradation. *Matrix Biol.* **32**:86–94; 2013.
- [15] Shi, Y.; Massague, J. Mechanisms of TGF-signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**:685–700; 2003.
- [16] DiCamillo, S. J.; Yang, S.; Panchenko, M. V.; Toselli, P. A.; Naggar, E. F.; Rich, C. B.; Stone, P. J.; Nugent, M. A.; Panchenko, M. P. Neutrophil elastase-initiated EGFR/MEK/ERK signaling counteracts stabilizing effect of autocrine TGF- β on tropoelastin mRNA in lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **291**:L232–L243; 2006.
- [17] Yang, S.; Nugent, M. A.; Panchenko, M. P. EGF antagonizes TGF- β -induced tropoelastin expression in lung fibroblasts via stabilization of Smad corepressor TGIF. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **295**:L143–L151; 2008.
- [18] Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* **408**:239–247; 2008.
- [19] Curtis, J. M.; Hahn, W. S.; Long, E. K.; Burrill, J. S.; Arriaga, E. A.; Bernlohr, D. A. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**:399–406; 2012.
- [20] Yin, D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic. Biol. Med.* **21**:871–888; 1996.
- [21] Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**:81–128; 1991.
- [22] Negre-Salvayre, A.; Auge, N.; Ayala, V.; Basaga, H.; Boada, J.; Brenke, R.; Chapple, S.; Cohen, G.; Feher, J.; Grune, T.; Lengyel, G.; Mann, G. E.; Pamplona, R.; Poli, G.; Portero-Otin, M.; Riahi, Y.; Salvayre, R.; Sasson, S.; Serrano, J.; Sharni, O.; Siems, W.; Siow, R. C.; Wiswedel, I.; Zarkovic, K.; Zarkovic, N. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* **44**:1125–1111; 2010.
- [23] Negre-Salvayre, A.; Vieira, O.; Escargueil-Blanc, I.; Salvayre, R. Oxidized LDL and 4-HNE modulate tyrosine kinase receptor activity. *Mol. Aspects Med.* **24**:251–261; 2003.
- [24] Suc, I.; Meilhac, O.; Lajoie-Mazenc, I.; Vandaele, J.; Jürgens, G.; Salvayre, R.; Nègre-Salvayre, A. Activation of EGF receptor by oxidized LDL. *FASEB J.* **12**:665–671; 1998.
- [25] Escargueil-Blanc, I.; Salvayre, R.; Vacaresse, N.; Jürgens, G.; Darblade, B.; Arnal, J. F.; Parthasarathy, S.; Nègre-Salvayre, A. Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor beta-receptor pathway. *Circulation* **104**:1814–1821; 2001.
- [26] Wright, J. D.; Reuter, C. W.; Weber, M. J. An incomplete program of tyrosine phosphorylations induced by kinase-defective EGF receptors. *J. Biol. Chem.* **270**:12085–12093; 1995.
- [27] Vindis, C.; Elbaz, M.; Escargueil-Blanc, I.; Augé, N.; Heniquez, A.; Thiers, J. C.; Nègre-Salvayre, A.; Salvayre, R. Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**:639–645; 2005.
- [28] Kahari, V. M.; Olsen, D. R.; Rhudy, R. W.; Carrillo, P.; Chen, Y. Q.; Uitto, J. Transforming growth factor- β up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts: evidence for post-transcriptional modulation. *Lab. Invest.* **66**:580–588; 1992.
- [29] Kucich, U.; Rosenbloom, J. C.; Abrams, W. R.; Rosenbloom, J. Transforming growth factor- β stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, PKC- δ , and p38. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**:183–188; 2002.
- [30] DiCamillo, S. J.; Carreras, I.; Panchenko, M. V.; Stone, P. J.; Nugent, M. A.; Foster, J. A.; Panchenko, M. P.; Elastase-released, EGF recruits EGFR and ERK to down-regulate tropoelastin mRNA in lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **277**:18938–18946; 2002.
- [31] Bergstrom, K. G. Beyond tretinoin: cosmeceuticals for aging skin. *J. Drugs Dermatol.* **8**:674–677; 2009.
- [32] Tajima, S.; Hayashi, A.; Suzuki, T. Elastin expression is up-regulated by retinoic acid but not by retinol in chick embryonic skin fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* **15**:166–172; 1997.
- [33] Mitts, T. F.; Bunda, S.; Wang, Y.; Hinek, A. Aldosterone and mineralocorticoid receptor antagonists modulate elastin and collagen deposition in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **130**:2396–2406; 2010.
- [34] Gkizas, S. I.; Apostolakis, E.; Pagoulidou, E.; Mavrilas, D.; Papachristou, D. J.; Koletsis, E.; Papalouis, A.; Papadaki, H.; Alexopoulos, D. Aldosterone receptor inhibition alters the viscoelastic biomechanical behavior of the aortic wall. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **235**:311–316; 2010.
- [35] Cenizo, V.; André, V.; Reymermier, C.; Sommer, P.; Damour, O.; Perrier, E. LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: a dill extract induces the LOXL gene expression. *Exp. Dermatol.* **15**:574–581; 2006.
- [36] Boon, R. A.; Seeger, T.; Heydt, S.; Fischer, A.; Hergenreider, E.; Horrovoets, A. J.; Vinciguerra, M.; Rosenthal, N.; Sciacca, S.; Pilato, M.; van Heijningen, P.; Essers, J.; Brandes, R. P.; Zeiher, A. M.; Dimmeler, S. MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circ. Res.* **109**:1115–1119; 2011.
- [37] Ott, C. E.; Grunhagen, J.; Jager, M.; Horbelt, D.; Schwill, S.; Kallenbach, K.; Guo, G.; Manke, T.; Knaus, P.; Mundlos, S.; Robinson, P. N. MicroRNAs differentially expressed in postnatal aortic development downregulate elastin via 3' UTR and coding-sequence binding sites. *PLoS One* **6**:e16250; 2011.
- [38] Samarakoon, R.; Dobberfuhr, A. D.; Cooley, C.; Overstreet, J. M.; Patel, S.; Goldschmeding, R.; Meldrum, K. K.; Higgins, P. J. Induction of renal fibrotic genes by TGF- β 1 requires EGFR activation, p53 and reactive oxygen species. *Cell. Signalling* **25**:2198–2209; 2013.
- [39] Starcher, B.; Peterson, B. The kinetics of elastolysis: elastin catabolism during experimentally induced fibrosis. *Exp. Lung Res.* **25**:407–424; 1999.
- [40] Sell, D. R.; Monnier, V. M. Molecular basis of arterial stiffening: role of glycation—a mini-review. *Gerontology* **58**:227–237; 2012.
- [41] Norman, P. E.; Davis, T. M.; Le, M. T.; Golledge, J. Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association. *Connect. Tissue Res.* **48**:125–131; 2007.
- [42] Biasi, F.; Vizio, B.; Mascia, C.; Gaia, E.; Zarkovic, N.; Chiarpotto, E.; Leonarduzzi, G.; Poli, G. c-Jun N-terminal kinase upregulation as a key event in the proapoptotic interaction between transforming growth factor- β 1 and 4-hydroxynonenal in colon mucosa. *Free Radic. Biol. Med.* **41**:443–454; 2006.
- [43] Seo, S. R.; Ferrand, N.; Faresse, N.; Prunier, C.; Abecassis, L.; Pessah, M.; Bourgeade, M. F.; Atfi, A. Nuclear retention of the tumor suppressor cPML by the homeodomain protein TGIF restricts TGF- β signaling. *Mol. Cell* **23**:547–559; 2006.
- [44] Hneino, M.; Bliando, K.; Buard, V.; Tarlet, G.; Benderitter, M.; Hoodless, P.; François, A.; Milliat, F. The TG-interacting factor TGIF1 regulates stress-induced proinflammatory phenotype of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **287**:38913–38921; 2012.

SUPPLEMENTAL DATA

4-Hydroxynonenal impairs Transforming Growth Factor- β 1-induced elastin synthesis *via* Epidermal Growth Factor Receptor activation in human and murine fibroblasts.

Pauline Larroque-Cardoso^{1,2}, Elodie Mucher^{1,2}, Marie-Hélène Grazide², Gwendal Josse³, Anne-Marie Schmitt³, Florence Nadal-Wolbold³, Kamelija Zarkovic⁴, Robert Salvayre^{1,2}, Anne Nègre-Salvayre^{1,2}

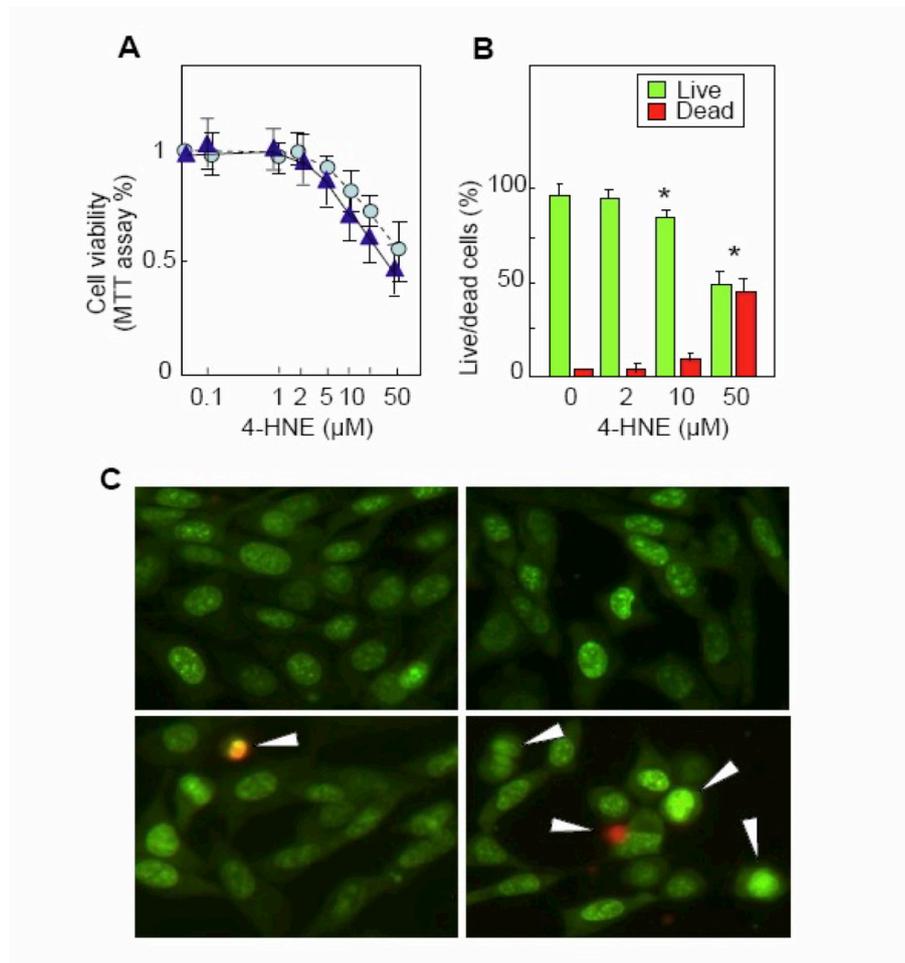
¹ Inserm UMR-1048, Toulouse, France.

² University of Toulouse, Toulouse, France.

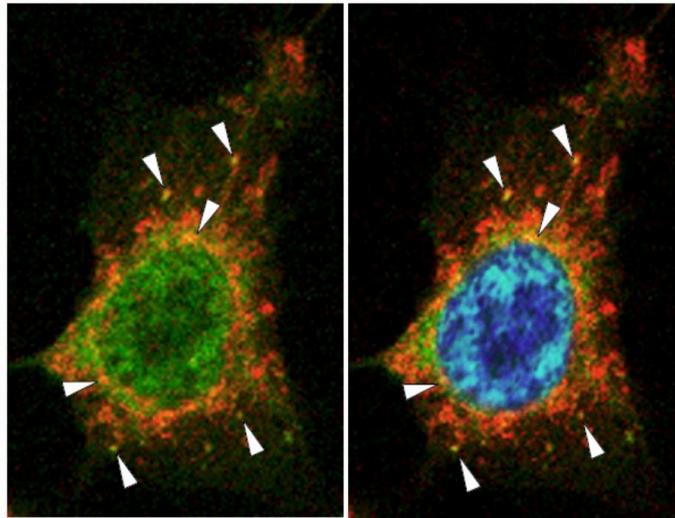
³ Centre Européen de Recherche sur la Peau, Pierre Fabre Dermocosmetique, Toulouse, France.

⁴ Division of Pathology, Clinical Hospital Centre, Zagreb, Croatia.

Supplemental Figures

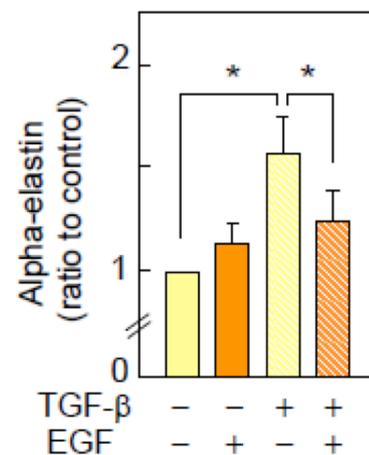


Supplemental Figure S1 : Dose-response of 4-HNE on fibroblast viability. Murine (light blue circles) or human (navy blue triangles) fibroblasts were incubated for 3 h in HBSS containing indicated 4-HNE concentrations. At the end the medium was discarded and replaced by fresh serum-free RPMI. The cell viability was determined after 24 h by the MTT test (A). The type of cell death was determined by labelling the cells with the Syto13/propidium iodide



Supplemental Figure 2 : High magnification of immunofluorescence confocal pictures from Fig.3A, showing fibroblasts preincubated for 3h with 4-HNE (2 μ M), and double labeled with anti-4-HNE Michael adducts revealed with Alexa-Fluor 546 (red) anti-rabbit secondary Ab, and FITC mouse anti-EGFR antibody (BD Biosciences). The high magnification allows to point out the yellow merge labeling indicating the co-localization of 4-HNE adduct and EGFR (indicated by the white arrows). Nucleus is stained with DAPI

Supplemental Figure S3: Effect of EGF on elastin content in murine fibroblasts. Confluent mouse fibroblasts were incubated with EGF (1 ng/ml) and with TGF- β 1, as described in Fig.1, and the total (soluble and insoluble) elastin content was determined under the conditions reported in Fig.1C. Data are expressed as mean \pm S.D. of 5 separate experiments, * $p < 0.05$



Supplemental reference

- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. Nat Cell Biol. 3:802-808;2001

3) Conclusion - Discussion

Ces travaux mettent en évidence l'effet antagoniste du 4-HNE sur la signalisation élastogénique du TGF- β 1 dans des fibroblastes humains et murins.

L'implication des aldéhydes issus de la peroxydation lipidique est peu connue dans la physiopathologie du vieillissement de la matrice extracellulaire. Cependant, le mécanisme de modification des protéines par ces aldéhydes est comparable à celui induit par les produits de glycation (AGEs) qui sont retrouvés sur l'élastine et son environnement dans le diabète, le vieillissement des tissus et qui contribueraient à la rigidification des artères et aux anévrismes. (Sell and Monnier, 2012). En effet l'accumulation d'AGEs peut causer une inflammation, de la fibrose et des modifications de la structure de l'élastine (Sell et Monnier, 2012)

Le 4-HNE formé *via* le stress oxydant dans des tissus âgés s'accumule dans les tissus et peut provoquer, de la même façon que les AGEs, de nombreuses altérations cellulaires et tissulaires.

Nos résultats montrent que cet aldéhyde issu de la peroxydation lipidique, inhibe l'activité élastogénique du TGF- β , en formant des adduits *in vitro* et *in vivo*, sur le récepteur à l'EGF, ce qui induit l'activation de sa voie de signalisation, d'où la phosphorylation et la stabilisation du TGIF, le corépresseur transcriptionnel des Smad.

Nos résultats montrent que la pré-incubation des fibroblastes, humains ou murins avec de faibles doses de 4-HNE ne génère pas de mort cellulaire, mais bloque l'expression d'élastine induite par le TGF- β 1, et sa synthèse.

Le 4-HNE n'inhibe pas la phosphorylation de Smad 3 induite par le TGF- β 1, ce qui indique que l'activité du récepteur sérine/thréonine kinase du récepteur n'est pas altérée par de faibles doses de 4-HNE, contrairement à d'autres récepteurs tels que l'EGFR ou le PDGFR (Suc et al, 1998 ; Escargueil-Blanc 2001).

Un effet direct du 4-HNE sur le TGF- β 1 lui-même est exclu puisque le milieu de culture contenant le 4-HNE-est enlevé avant d'ajouter le TGF- β . De plus, les fibroblastes réagissent normalement à la stimulation par le TGF- β 1.

En revanche, nous retrouvons dans notre modèle une modification de l'EGFR par des adduits de 4-HNE, comme précédemment décrit (Suc et al 1997), ce qui stimule sa phosphorylation et active la voie de signalisation en aval, et la phosphorylation de TGIF. Le TGIF est un régulateur négatif de la voie du TGF- β 1 puisqu'il est un corépresseur des Smad, qui empêche la phosphorylation de Smad 2, donc sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle. (Dicamillo et al, 2006 ; Yang et al, 2008). Nos résultats indiquent que le

TGIF est activé par le 4-HNE *via* la voie de l'EGFR, puisqu' on ne retrouve pas d'activation de TGIF dans des cellules déficientes en activité EGFR (B82L), ni en présence d'inhibiteurs pharmacologiques de cette voie, ou de siRNA dirigés contre l'EGFR. Il semblerait que la signalisation EGFR/TGIF induite par le 4-HNE dans les fibroblastes participe à l'inhibition du renouvellement de l'élastine induit par le TGF- β 1, puisque tous les inhibiteurs de l'EGFR reversent l'effet inhibiteur du 4-HNE sur la synthèse d'élastine.

In vivo, les adduits de 4-HNE s'accumulent de façon significative dans les tissus âgés (peau, vaisseaux), et colocalisent avec l'EGFR, ce qui indique que l'EGFR est une cible du 4-HNE *in vitro* et *in vivo*.

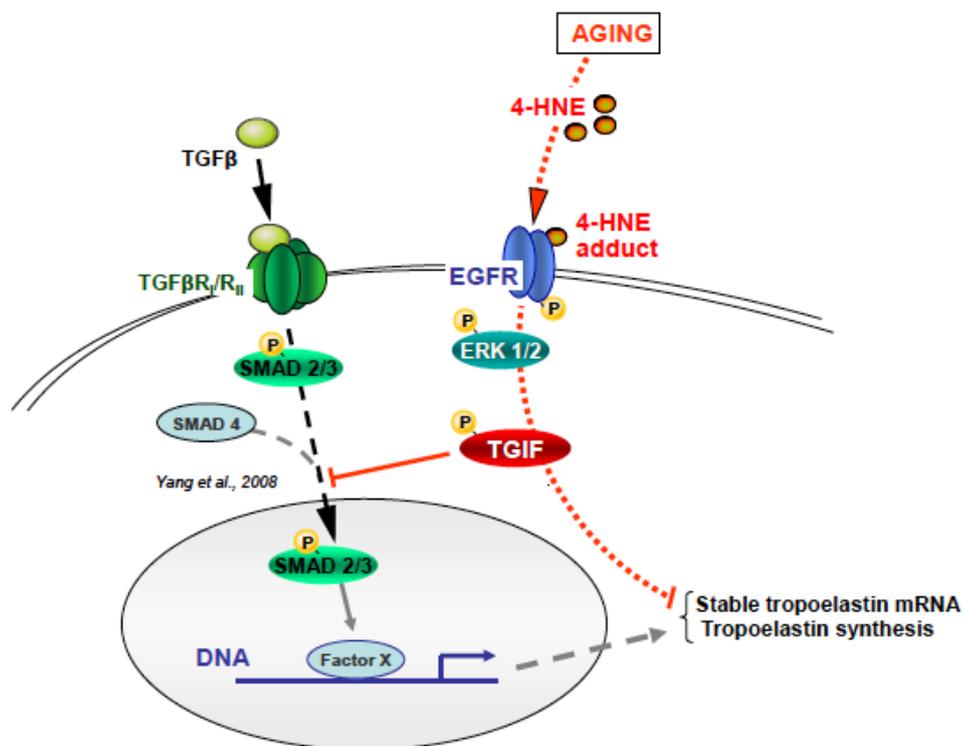


Figure 32 : Schéma récapitulatif de nos résultats (Larroque-cardoso et al, 2014)

Ces résultats montrent que les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique jouent un rôle majeur dans les altérations de l'élastine au cours du vieillissement. Le fait que des agents tels que NAC ou la carnosine protègent de ces effets délétères permet de proposer ces agents comme de nouvelles thérapies pour prévenir la perte d'élastine au cours du vieillissement.

Par ailleurs, l'effet inhibiteur du 4-HNE sur le renouvellement de l'élastine pourrait s'exercer à différents niveaux.

En effet, les travaux précédents de l'équipe ont montré la modification d'autres récepteurs à

tyrosine kinase par le 4-HNE, et notamment le PDGFR, qui est impliqué dans la migration et la prolifération cellulaire (Escargueil-Blanc et al, 2001). Nos résultats montrent que le 4-HNE inhibe la prolifération cellulaire induite par le PDGF, en formant des adduits sur le PDGFR ce qui inhibe sa signalisation sans induire de toxicité.

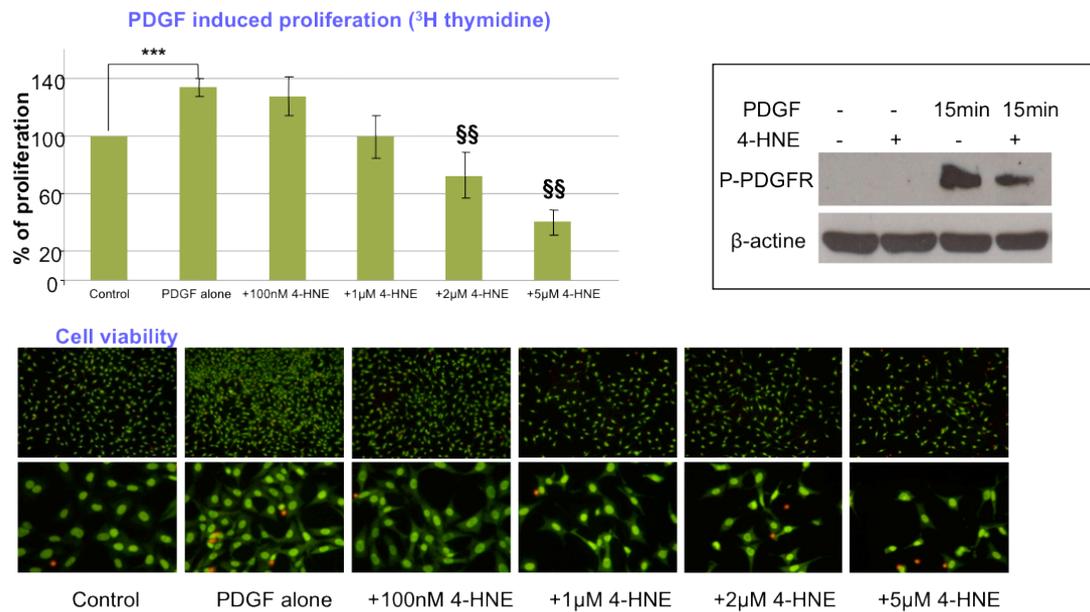


Figure 33 : Effet du 4-HNE sur la prolifération de fibroblastes murins induite par du PDGF.

Ces résultats indiquent que le 4-HNE inhiberait le renouvellement de l'élastine en altérant la voie du PDGF et la prolifération des fibroblastes (qui synthétisent l'élastine dans le derme), et en activant la voie de l'EGFR antagoniste de l'activité élastogénique du TGF-β1.

PARTIE 5

CONCLUSION ET DISCUSSION



Conclusion et discussion

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse, avaient pour objectif d'étudier l'implication du stress carbonyle dans le vieillissement de l'élastine, intrinsèque ou photoinduit.

Nous avons utilisé des approches *in vitro* sur des fibroblastes humains et murins, permettant d'étudier directement l'effet des aldéhydes issus de la peroxydation lipidique (4-HNE), sur la signalisation élastogène du TGF- β 1, ou la prolifération dépendant du PDGF-récepteur, et des approches *in vivo*, avec i/ des souris C57/Bl6 jeunes et âgées d'un an, qui ont permis de comparer le statut de l'élastine et la peroxydation lipidique dans la peau et les vaisseaux, en fonction de l'âge (vieillesse intrinsèque), et ii/ des souris skh-1 hairless soumises aux UVA, qui nous ont permis d'étudier la génération et les conséquences de la peroxydation lipidique au cours du photovieillesse.

Dans la première partie de notre étude nous montrons que l'exposition de souris skh-1 hairless aux UV-A (600J/cm²) induit des lésions d'élastose actinique accompagnées d'une augmentation massive de produits de peroxydation lipidique.

Les UV-A avaient été choisis au départ, car ils représentent plus de 95% des UV reçus lors de l'exposition au rayonnement solaire. De plus leur niveau de pénétration dans la peau est plus profond que celui des UV-B, bien que ces derniers soient considérés comme plus agressifs.

Les UV-A génèrent un stress oxydant et une peroxydation lipidique qui se traduit par la formation d'aldéhydes et de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Au cours de l'exposition répétée aux UV-A, les aldéhydes sont générés et forment des adduits sur l'élastine, ce qui la rend progressivement résistante à l'élastase et favorise son accumulation sous forme anormale dans la peau (matériel élastotique). La carnosine reverse à la fois l'accumulation de 4-HNE et la modification de l'élastine.

En perspective à ce travail, nous pourrions étudier l'effet des aldéhydes sur le devenir du collagène dont la quantité diminue sous l'effet des UV (Quan et al, 2006). En effet, il serait intéressant d'étudier la formation d'adduits de 4-HNE et d'acroléine sur les molécules de collagène, déterminer si ces adduits contribuent à sa dégradation accélérée, stimulent ou inhibent son renouvellement comme nous avons pu le montrer pour l'élastine.

Dans le modèle de photovieillissement que nous utilisons, nous retrouvons également des caractéristiques connues de l'épiderme, tel qu'un épaissement, une déshydratation, un désorganisation de cette couche avec une altération de la prolifération et de la maturation des kératinocytes (Yaar and Gilchrist, 2007).

Les études en immunohistochimie et immunofluorescence des peaux de souris exposées aux UV-A, montrent une forte accumulation de 4-HNE dans l'épiderme, ce qui suggère un rôle possible des aldéhyde dans la prolifération, la migration et la différenciation des kératinocytes au cours du photovieillissement.

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous montrons que le 4-HNE inhibe la signalisation élastogénique du TGF- β 1, via la modification de l'EGFR, qui stimule une signalisation antagoniste du TGF- β 1, sur la synthèse d'élastine. Le 4-HNE modifie certains récepteurs transmembranaires (EGFR, PDGFR), mais n'a pas d'effet sur le TGF- β 1 récepteur. Cependant, le 4-HNE est capable d'inhiber indirectement la signalisation élastogénique du TGF- β 1, en modifiant et en activant l'EGFR.

L'EGFR inhibe l'effet élastogénique du TGF- β 1, mais favorise (agit en co-facteur) du TGF- β 1 sur d'autres voies, en particulier au cours de la synthèse de collagène et la fibrose. Nous faisons l'hypothèse que le 4-HNE a les mêmes effets que l'EGF et l'EGFR sur la synthèse de collagène induite par le TGF- β , et pourrait donc stimuler la synthèse de collagène, tout en inhibant la synthèse d'élastine. Ces effets devraient avoir des conséquences sur le développement de la rigidité artérielle, au cours de laquelle la perte d'élastine est remplacée par du collagène, donc de la fibrose.

En perspective à ce travail, nous pourrions étudier l'effet du 4-HNE sur la synthèse de collagène induite par le TGF- β , et le rôle de l'EGFR dans ce mécanisme. Une autre propriété du 4-HNE concerne l'expression des MMPs qui dégradent la matrice extracellulaire, et dont l'expression augmente avec l'âge et sous l'effet des UV

La carnosine et NAC réversent les effets du 4-HNE. Nous étudierons l'effet d'un traitement chronique en carnosine chez les souris jeunes et âgées, afin de déterminer si l'utilisation de ces agents (piégeur, antioxydant) limite la perte d'élastine au cours du vieillissement et protège des conséquences dans les tissus riches en élastine tels que les artères (développement de rigidité artérielle), ou la peau (vieillissement intrinsèque et photovieillissement).

En conclusion, ces travaux apportent des éléments de réponse sur l'impact de ces aldéhydes issus de la peroxydation lipidique, et leurs conséquences sur la matrice extracellulaire. De plus, l'effet protecteur *in vitro* et *in vivo* des piègeurs de carbonyle (carnosine), ou antioxydant (NAC), sur la modification de l'élastine et les signes du photovieillissement, démontre le rôle majeur des aldéhydes dans le vieillissement de la MEC, et l'intérêt thérapeutique de ces agents, pour prévenir l'apparition de signes et de pathologies liés au vieillissement.

Références bibliographiques

- ALDINI G, CARINI M, YEUM KJ, VISTOLI G.
Novel molecular approaches for improving enzymatic and nonenzymatic detoxification of 4-hydroxynonenal: toward the discovery of a novel class of bioactive compounds.
Free Radic Biol Med. 2014 Apr; 69:145-56 ;
- ALDINI G, FACINO RM, BERETTA G, CARINI M.
Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives.
Biofactors. 2005; 24(1-4):77-87.
- ANNES JP, MUNGER JS, RIFKIN DB.
Making sense of latent TGF β activation.
J Cell Sci. 2003 Jan 15; 116(Pt 2):217-24. Review.
- AOUDJEHANE L, PISSAIA A Jr, SCATTON O, PODEVIN P, MASSAULT PP, CHOUZENOUX S, SOUBRANE O, CALMUS Y, CONTI F
Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway.
Lab Invest. 2008 Sep; 88(9):973-85.
- ARTHUR JR.
The glutathione peroxidases.
Cell Mol Life Sci. 2000 Dec; 57(13-14):1825-35. Review.
- AUMAILLEY M, EL KHAL A, KNÖSS N, TUNGGAL L
Laminin 5 processing and its integration into the ECM.
Matrix Biol. 2003 Mar; 22(1):49-54. Review.
- BABIZHAYEV MA, DEYEV AI, SAVEL'YEVA EL, LANKIN VZ, YEGOROV YE
Skin beautification with oral non-hydrolyzed versions of carnosine and carbinine: Effective therapeutic management and cosmetic skincare solutions against oxidative glycation and free-radical production as a causal mechanism of diabetic complications and skin aging.
J Dermatolog Treat. 2012 Oct; 23(5):345-84
- BAROUKI R.
Stress oxydant et vieillissement
Medecine/Sciences 2006 ; 22 : 266-72
- BASU P, SEN U, TYAGI N, TYAGI SC
Blood flow interplays with elastin: collagen and MMP: TIMP ratios to maintain healthy vascular structure and function.
Vasc Health Risk Manag. 2010 Apr 15;6:215-28.
- BAYNES JW, THORPE SR

Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis.
Free Radic Biol Med. 2000 Jun 15; 28(12):1708-16. Review

BENEDETTI A, COMPORTI M, ESTERBAUER H.
Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids.
Biochim Biophys Acta 1980; 620:281–296.

BERTOLOTTO C.
Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options.
Scientifica (Cairo). 2013; 2013:635203

BOOTH AJ, HADLEY R, CORNETT AM, DREFFS AA, MATTHES SA, TSUI JL, WEISS K, HOROWITZ JC, FIORE VF, BARKER TH, MOORE BB, MARTINEZ FJ, NIKLASON LE, WHITE ES
Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation.
Am J Respir Crit Care Med. 2012 Nov 1; 186(9):866-76.

BOU-GHARIOS G., PONTICOS M., RAIKUMAR V, ABRAHAM D.
Extra-cellular matrix in vascular networks
Cell Prolif. 2004 Jun; 37(3):207-20. Review.

BRIGSTOCK DR.
Connective tissue growth factor (CCN2, CTGF) and organ fibrosis: lessons from transgenic animals
J Cell Commun Signal. 2010 Mar; 4(1):1-4

BROWN-AUGSBURGER P, BROEKELMANN T, ROSENBLOOM, J & MECHAM RP.
Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly
Biochem J. 1996 Aug 15; 318 (Pt 1):149-55.

BURKE KE.
Photoaging: the role of oxidative stress.
G Ital Dermatol Venereol. 2010 Aug; 145(4):445-59. Review.

CARRERAS I, RICH CB, JAWORSKI JA, DICAMILLO SJ, PANCHENKO MP, GOLDSTEIN R, FOSTER JA.
Functional components of basic fibroblast growth factor signaling that inhibit lung elastin gene expression.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001 Oct;281(4):L766-75.

CAVARRA E, FIMIANI M, LUNGARELLA G, ANDREASSI L, DE SANTI M, MAZZATENTA C, CICCOLI L.
UVA light stimulates the production of cathepsin G and elastase-like enzymes by dermal fibroblasts: a possible contribution to the remodeling of elastotic areas in sun-damaged skin.
Biol Chem. 2002 Jan; 383(1):199-206

CECELJA M, CHOWIENCZYK P.

Role of arterial stiffness in cardiovascular disease

JRSM Cardiovasc Dis. 2012 Jul 31;1(4). pii: cvd.2012.012016

CHEN ZH, SAITO Y, YOSHIDA Y, SEKINE A, NOGUCHI N, NIKI E

4-Hydroxynonenal induces adaptive response and enhances PC12 cell tolerance primarily through induction of thioredoxin reductase 1 via activation of Nrf2.

J Biol Chem. 2005 Dec 23;280(51):41921-7.

CHOWDHURY PK, HALDER M, CHOUDHURY PK, KRAUS GA, DESAI MJ, ARMSTRONG DW, CASEY TA, RASMUSSEN MA, PETRICH JW.

Generation of fluorescent adducts of malondialdehyde and amino acids: toward an understanding of lipofuscin.

Photochem Photobiol. 2004 Jan; 79(1):21-5.

CILLARD J, CILLARD P.

Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations.

Oléagineux, Corps gras, lipides. Volume 13, Numéro 1, 24-9, Janvier-Février 2006, Dossier

CONN KJ, RICH CB, JENSEN DE, FONTANILLA MR, BASHIR MM, ROSENBLOOM J, FOSTER JA.

Insulin-like growth factor-I regulates transcription of the elastin gene through a putative retinoblastoma control element. A role for Sp3 acting as a repressor of elastin gene transcription.

J Biol Chem. 1996 Nov 15; 271(46):28853-60.

COOLEN NA, SCHOUTEN KC, MIDDELKOOP E, ULRICH MM.

Comparison between human fetal and adult skin.

Arch Dermatol Res. 2010 Jan;302(1):47-55.

COUCHMAN JR, PATAKI CA.

An introduction to proteoglycans and their localization.

J Histochem Cytochem. 2012 Dec;60(12):885-97.

CURTIN JA, FRIDLAND J, KAGESHITA T, PATEL HN, BUSAM KJ, KUTZNER H, CHO KH, AIBA S, BRÖCKER EB, LEBIT PE, PINKEL D, BASTIAN BC.

Distinct sets of genetic alterations in melanoma

N Engl J Med. 2005 Nov 17; 353(20):2135-47.

CURTIS JM, HAHN WS, LONG EK, BURRILL JS, ARRIAGA EA, BERNLOHR DA

Protein carbonylation and metabolic control systems.

Trends Endocrinol Metab. 2012 Aug; 23(8):399-406.

DALLEAU S, BARADAT M, GUERAUD F, HUC L.

Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance.

Cell Death Differ. 2013 Dec; 20(12):1615-30.

DAVIDSON J.M.

Smad about elastin regulation

Am J Respir Cell Mol Biol. 2002 Feb; 26(2):164-6

DE VILLIERS WJ, SONG Z, NASSER MS, DEACIUC IV, MCCLAIN CJ.

4-Hydroxynonenal-induced apoptosis in rat hepatic stellate cells: mechanistic approach.

J Gastroenterol Hepatol. 2007 Mar; 22(3):414-22.

DEBELLE L, TAMBURRO AM.

Elastin : Molecular description and function

Int J Biochem Cell Biol. 1999 Feb; 31(2):261-72. Review.

DEMOZAY D, MAS JC, ROCCHI S, VAN OBERGHEN E.

FALDH reverses the deleterious action of oxidative stress induced by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes.

Diabetes. 2008 May; 57(5):1216-26.

DICAMILLO SJ, YANG S, PANCHENKO MV, TOSELLI PA, NAGGAR EF, RICH CB, STONE PJ, NUGENT MA, PANCHENKO MP.

Neutrophil elastase-initiated EGFR/MEK/ERK signaling counteracts stabilizing effect of autocrine TGF-beta on tropoelastin mRNA in lung fibroblasts.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2006 Aug; 291(2):L232-43.

DOMINGUEZ LJ., BARBAGALLO M, MORO L.

Collagen overglycosylation: A biochemical feature that may contribute to bone quality

Biochem Biophys Res Commun. 2005 Apr 29; 330(1):1-4

EDWARDS DR, MURPHY G, REYNOLDS JJ, WHITHAM SE, DOCHERTY AJ, ANGEL P, HEATH JK.

Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor.

EMBO J. 1987 Jul; 6(7):1899-904

EL-DOMYATI M, ATTIA S, SALEH F, BROWN D, BIRK DE, GASPARRO F, AHMAD H, UITTO J.

Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin

Exp Dermatol. 2002 Oct; 11(5):398-405

ESCARGUEIL-BLANC I, SALVAYRE R, VACARESSE N, JÜRGENS G, DARBLADE B, ARNAL JF, PARTHASARATHY S, NEGRE-SALVAYRE A.

Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor beta-receptor pathway.

Circulation. 2001 Oct 9; 104(15):1814-21.

ESTERBAUER H, SCHAUR RJ, ZOLLNER H.

Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.

Free Radic Biol Med. 11:81-128; 1991.

FAZIO MJ, MATTEI MG, PASSAGE E, CHU ML, BLACK D, SOLOMON E, DAVIDSON JM, UITTO J;
Human Elastin Gene: New Evidence for Localization to the Long Arm of Chromosome 7
Am J Hum Genet. 1991 Apr; 48(4):696-703

FERRINGTON DA, KAPPAHN RJ
Catalytic site-specific inhibition of the 20S proteasome by 4-hydroxynonenal.
FEBS Lett. 2004 Dec 17; 578(3):217-23.

FINKEL T, HOLBROOK NJ.
Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.
Nature. 2000 Nov 9; 408(6809):239-47. Review.

FISHER GJ, KANG S, VARANI J, BATA-CSORGO Z, WAN Y, DATTA S, VOORHEES JJ.
Mechanisms of photoaging and chronological skin aging.
Arch Dermatol. 2002 Nov;138(11):1462-70. Review.

FLEISCHMAJER R, PERLISH JS, OLSEN BR.
The carboxylpropeptide of type I procollagen in skin fibrillogenesis.
J Invest Dermatol 1987; 89 (2): 212-5.

FRIGUET B
Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress.
FEBS Lett 580: 2910–2916.

FUKUDA A, NAKAMURA Y, OHIGASHI H, OSAWA T, UCHIDA K.
Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal.
Biochem Biophys Res Commun. 1997 Jul 18;236(2):505-9.

GALLIGAN JJ, FRITZ KS, BACKOS DS, SHEARN CT, SMATHERS RL, JIANG H, MACLEAN KN, REIGAN PR, PETERSEN DR.
Oxidative stress-mediated aldehyde adduction of GRP78 in a mouse model of alcoholic liver disease: functional independence of ATPase activity and chaperone function.
Free Radic Biol Med. 2014 Jun 9; 73C:411-420.

GALVANI S, COATRIEUX C, ELBAZ M, GRAZIDE MH, THIERS JC, PARINI A, UCHIDA K, KAMAR N, ROSTAING L, BALTAS M, SALVAYRE R, NEGRE-SALVAYRE A
Carbonyl scavenger and antiatherogenic effects of hydrazine derivatives
Free Radic Biol Med. 2008 Nov 15; 45(10):1457-67.

GELSE K, PÖSCHL Z, AIGNER T.
Collagens-structure, function and biosynthesis
Arthritis Rheum. 2001 Aug; 44(8):1943-53.

GILLERY P, FERTIN C, NICOLAS JF, CHASTANG F, KALIS B, BANCHEREAU J, MAQUART FX.

Interleukin-4 stimulates collagen gene expression in human fibroblast monolayer cultures. Potential role in fibrosis.

FEBS Lett. 1992 May 18;302(3):231-4.

GRIMBLE RF.

Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications.

Int J Vitam Nutr Res. 1997;67(5):312-20. Review.

GRUNE T, DAVIES KJ.

The proteasomal system and HNE-modified proteins.

Mol Aspects Med. 2003 Aug-Oct; 24(4-5):195-204.

GUERAUD F, ATALAY M, BRESGEN N, CIPAK A, ECKL P. M., HUC L, JOUANIN I, SIEMS W & UCHIDA K.

Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products

Free Radical Research, October 2010; 44(10): 1098–1124

HARMAN D.

Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.

J Gerontol. 1956 Jul; 11(3):298-300

HIPKISS A R.

Carnosine, a protective, anti-ageing peptide?

Int J Biochem Cell Biol. 1998 Aug; 30(8):863-8.

HÖHN A, KÖNIG J, GRUNE T.

Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins

J Proteomics. 2013 Oct 30; 92:132-59

HONG HH, TRACKMAN PC.

Cytokine regulation of gingival fibroblast lysyl oxidase, collagen, and elastin.

J Periodontol. 2002 Feb; 73(2):145-52

HSU-WONG S, KATCHMAN SD, LEDO I, WU M, KHILLAN J, BASHIR MM, ROSENBLOOM J, UITTO J.

Tissue-specific and developmentally regulated expression of human elastin promoter activity in transgenic mice.

J Biol Chem. 1994 Jul 8; 269(27):18072-5.

HWANG KA, YI BR, CHOI KC

Molecular mechanisms and in vivo mouse models of skin aging associated with dermal matrix alterations

Lab Anim Res. 2011 Mar; 27(1):1-8.

JACOB M-P

Matrice extracellulaire et vieillissement vasculaire
Medecine/sciences 2006 ; 22 : 273-8

JACOB M-P

Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions
Biomed Pharmacother. 2003 Jul-Aug; 57(5-6):195-202

JOHNSON DJ, ROBSON P, HEW Y, KEELEY FW.

Decreased elastin synthesis in normal development and in long-term aortic organ and cell cultures is related to rapid and selective destabilization of mRNA for elastin.
Circ Res. 1995 Dec; 77(6):1107-13.

JONES DP

Radical-free biology of oxidative stress.
Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Oct; 295(4):C849-68.

KÄHÄRI VM, OLSEN DR, RHUDY RW, CARRILLO P, CHEN YQ, UITTO J.

Transforming growth factor-beta up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts. Evidence for post-transcriptional modulation.
Lab Invest. 1992 May; 66(5):580-8

KALLURI R.

Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis
Nat Rev Cancer. 2003 Jun; 3(6):422-33.

KIELTY C.M., SHERRATT M.J., SHUTTLEWORTH C.A.

Elastic fibres
J Cell Sci. 2002 Jul 15; 115(Pt 14):2817-28. Review.

KOTHAPALLI CR, RAMAMURTHI A.

Induced elastin regeneration by chronically activated smooth muscle cells for targeted aneurysm repair.
Acta Biomater. 2010 Jan; 6(1):170-8.

KOTHAPALLI CR, GACCHINA CE, RAMAMURTHI A.

Utility of hyaluronan oligomers and transforming growth factor-beta1 factors for elastic matrix regeneration by aneurysmal rat aortic smooth muscle cells.
Tissue Eng Part A. 2009 Nov; 15(11):3247-60.

KUCICH U, ROSENBLOOM JC, ABRAMS WR, ROSENBLOOM J.

Transforming growth factor-beta stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, protein kinase C-delta, and p38.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2002 Feb; 26(2):183-8.

LAKATTA EG

Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises Part III: Cellular and Molecular Clues to Heart and Arterial Aging

Circulation. 2003 Jan 28; 107(3):490-7.

LAKATTA E. G., LEVY D.

Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises Part I: Aging Arteries: A "Set Up" for Vascular Disease
Circulation. 2003 Jan 7;107(1):139-46

LAWRENCE DA.

Latent-TGF- β : an overview
Mol Cell Biochem. 2001 Mar; 219(1-2):163-70

LEONARDUZZI G, ROBBESYN F, POLI G.

Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal.
Free Radic Biol Med. 2004 Dec 1; 37(11):1694-702.

LIU JM, DAVIDSON JM.

The elastogenic effect of recombinant transforming growth factor-beta on porcine aortic smooth muscle cells.
Biochem Biophys Res Commun. 1988 Aug 15; 154(3):895-901.

LIU J, RICH CB, BUCZEK-THOMAS JA, NUGENT MA, PANCHENKO MP, FOSTER JA.
Heparin-binding EGF-like growth factor regulates elastin and FGF-2 expression in pulmonary fibroblasts.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003 Nov; 285(5):L1106-15.

LIU W, AKHAND AA, KATO M, YOKOYAMA I, MIYATA T, KUROKAWA K, UCHIDA K, NAKASHIMA I.

4-hydroxynonenal triggers an epidermal growth factor receptor-linked signal pathway for growth inhibition.
J Cell Sci. 1999 Jul;112 (Pt 14):2409-17.

LY DH, LOCKHART DJ, LERNER RA, SCHULTZ PG.

Mitotic misregulation and human aging.
Science. 2000 Mar 31; 287(5462):2486-92.

MÄÄTTÄ A, EKHOLM E, PENTTINEN RP.

Effect of the 3'-untranslated region on the expression levels and mRNA stability of alpha 1(I) collagen gene.
Biochim Biophys Acta. 1995 Feb 21; 1260(3):294-300

MATEOS R, LECUMBERRI E, RAMOS S, GOYA L, BRAVO L.

Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits.

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005 Nov 15;827(1):76-82.

MCGAHA TL, LE M, KODERA T, STOICA C, ZHU J, PAUL WE, BONA CA.
Molecular mechanisms of interleukin-4-induced up-regulation of type I collagen gene expression in murine fibroblasts
Arthritis Rheum. 2003 Aug; 48(8):2275-84.

MCGOWAN SE, MCNAMER R.
Transforming growth factor-beta increases elastin production by neonatal rat lung fibroblasts.
Am J Respir Cell Mol Biol. 1990 Oct; 3(4):369-76.

MECHAM RP
Overview of extracellular matrix
Curr Protoc Cell Biol. 2012 Dec; Chapter 10:Unit 10.1
MILEWICZ DM, URBAN Z, BOYD C.
Genetic disorders of the elastic fiber system.
Matrix Biol 2000; 19:471–80.

MITHIEUX SM, WEISS AS.
Elastin
Adv Protein Chem. 2005; 70:437-61. Review.
MIYAZONO K, OLOFSSON A, COLOSETTI P, HELDIN CH.
A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1.
EMBO J. 1991 May; 10(5):1091-101

MULLER C, BANDEMER J, VINDIS C, CAMARE C, MUCHER E, GUERAUD F, LARROQUE-CARDOSO P, BERNIS C, AUGÉ N, SALVAYRE R, NEGRE-SALVAYRE A.
Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins.
Antioxid Redox Signal. 2013 Mar 1; 18(7):731-42.

NAKAMURA T, TOYOMIZU M, NAGAMOTO T.
Lipid degradation products capable of reacting with amino acid-identification of 4-hydroxy-2-hexenal, 9-formyl methyl-8-nonenoate, and 10-formyl methyl-9-decenoate from autoxidized methyl linolenate.
Bul Japan Soc Sci Fish 1977;43:1097–1104

NAYLOR EC, WATSON RE, SHERRATT MJ.
Molecular aspects of skin ageing.
Maturitas. 2011 Jul; 69(3):249-56.

NEGRE-SALVAYRE A, AUGÉ N, AYALA V, BASAGA H, BOADA J, BRENKE R, CHAPPLE S, COHEN G, FEHER J, GRUNE T, LENGYEL G, MANN GE, PAMPLONA R, POLI G, PORTERO-OTIN M, RIAHI Y, SALVAYRE R, SASSON S, SERRANO J, SHAMNI O, SIEMS W, SIOW RC, WISWEDEL I, ZARKOVIC K, ZARKOVIC N.
Pathological aspects of lipid peroxidation.
Free Radic Res. 44:1125-7111; 2010.

NEGRE-SALVAYRE A, COATRIEUX C, INGUENEAU C AND SALVAYRE R.
Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in

diseases and therapeutic prospects for the inhibitors
British Journal of Pharmacology 2008 153, 6–20

NICOLAOU A, PILKINGTON SM, RHODES LE.
Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids.
Chem Phys Lipids. 2011 Sep; 164(6):535-43.

O'ROURKE MF, NICHOLS WW.
Aortic diameter, aortic stiffness, and wave reflection increase with age and isolated systolic hypertension.
Hypertension. 2005 ; 45:652-8. Review.

O'ROURKE MF, HASHIMOTO J.
Mechanical Factors in Arterial Aging A Clinical Perspective
J Am Coll Cardiol. 2007 Jul 3; 50(1):1-13.

OTT CE, GRÜNHAGEN J, JÄGER M, HORBELT D, SCHWILL S, KALLENBACH K, GUO G, MANKE T, KNAUS P, MUNDLOS S, ROBINSON PN.
MicroRNAs differentially expressed in postnatal aortic development downregulate elastin via 3' UTR and coding-sequence binding sites.
PLoS One. 2011 Jan 31; 6(1):e16250.

PAPAKONSTANTINOOU E, ALETRAS AJ, ROTH M, TAMM M, KARAKIULAKIS G.
Hypoxia modulates the effects of transforming growth factor-beta isoforms on matrix-formation by primary human lung fibroblasts.
Cytokine. 2003 Oct; 24(1-2):25-35.

PARTRIDGE SM, ELSDEN DF, THOMAS J, DORFMAN A, TELSER A and PEI-LEE H.
Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in Elastin
Biochem J. 1964 Dec; 93(3):30C-33C

PIZZIMENTI S, CIAMPORCERO E, DAGA M, PETTAZZONI P, ARCARO A, CETRANGOLO G, MINELLI R, DIANZANI C, LEPORE A, GENTILE F AND BARRERA G.
Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins.
Front Physiol. 2013 Sep 4; 4:242.

POLI G, SCHAUR RJ, SIEMS WG, LEONARDUZZI G.
4-Hydroxynonenal: A Membrane Lipid Oxidation Product of Medicinal Interest
Med Res Rev. 2008 Jul; 28(4):569-631

PORTER NA, CALDWELL SE, MILLS KA.
Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids.
Lipids 1995; 30:277–292.

QUAN T, HE T, KANG S, VOORHEES JJ, FISHER GJ.
Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling.
Am J Pathol 2004; 165:741–51.

REAGAN LP, MAGARINOS AM, YEE DK, SWZEDA LI, VAN BUEREN A, MCCALL AL, MCEWEN BS.

Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress.

Brain Res 2000; 862: 292 – 300.

RIAHI Y, COHEN G, SHAMNI O, AND SASSON S;

Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals

Am J Physiol Endocrinol Metab 2010 ; 299: E879–E886,

RICARD-BLUM S.

The collagen family.

Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Jan 1;3(1):a004978. Review.

RICH CB, FONTANILLA MR, NUGENT M, FOSTER JA.

Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription through an AP1/cAMP-response element hybrid site in the distal promoter.

J Biol Chem. 1999 Nov 19; 274(47):33433-9.

ROBERT L, LABAT-ROBERT J.

Aging of connective tissues:from genetic to epigenetic mechanisms.

Biogerontology 2000 ; 1:123–131.

ROSS S, HILL CS.

How the Smads regulate transcription.

Int J Biochem Cell Biol, 2008; 40: 383-408.

ROSSO F, GIORDANO A, BARBARISI M, BARBARISI A.

From cell-ECM interactions to tissue engineering.

J Cell Physiol 2004; 199 (2): 174-80.

RUEF J, RAO GN, LI F, BODE C, PATTERSON C, BHATNAGAR A, RUNGE MS.

Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal.

Circulation. 1998 Mar 24;97(11):1071-8.

SAHARINEN J, TAIPALE J, AND KESKI-OJA J

Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1

EMBO J. 1996 Jan 15;15(2):245-53.

SATO M, SHEGOGUE D, HATAMOUCHI A, YAMAZAKI S, TROJANOWSKA M.

Lysophosphatidic acid inhibits TGFb-mediated stimulation of type I collagen mRNA stability via an ERK-dependant pathway in dermal fibroblasts.

Matrix Biol. 2004 Oct; 23(6):353-61.

SAWABE M.

Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance.
Geriatr Gerontol Int. 2010 Jul; 10 Suppl 1:S213-20.

SCHAUR R.J.

4-Hydroxynonenal: A Lipid Degradation Product Provided with Cell Regulatory Functions.
Molecular Aspects of Medicine Volume 24, Issues 4–5, August–October 2003, Pages 149–159

SELL DR AND MONNIER VM.

Molecular Basis of Arterial Stiffening: Role of Glycation – A Mini-Review,
Gerontology. 2012; 58(3):227-37.

SELLHEYER K.

Pathogenesis of solar elastosis :synthesis or degradation ?
J Cutan Pathol. 2003 Feb; 30(2):123-7.

SHAPIRO SD, ENDICOTT SK, PROVINCE MA, PIERCE JA, CAMPBELL EJ.

Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon.
J. Clin. Invest. 1991 ; 87:1828–1834.

SHERRATT MJ.

Tissue elasticity and the ageing elastic fibre.
Age (Dordr). 2009 Dec; 31(4):305-25. Review.

SHI Y, MASSAGUE J.

Mechanisms of TGF-signaling from cell membrane to the nucleus.
Cell. 2003 Jun 13; 113(6):685-700.

SLOW RC, ISHII T, MANN GE

Modulation of antioxidant gene expression by 4-hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway.
Redox Rep. 2007; 12(1):11-5.

SPROUL EP, ARGRAVES WS.

A cytokine axis regulates elastin formation and degradation.
Matrix Biol 2013, 32:86–94;.

STARCHER B.C.

Lung Elastin and Matrix
Chest. 2000 May; 117(5 Suppl 1):229S-34S.

STEFANOVIC B, HELLERBRAND C, BRENNER DA.

Regulatory role of the conserved stem-loop structure at the 5' end of collagen alpha1(I) mRNA.
Mol Cell Biol. 1999 Jun; 19(6):4334-42

STEVENS J. F. AND MAIER C.S.

Acrolein: Sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease.

Mol Nutr Food Res. 2008 January ; 52(1): 7–25.

SUC I, MEILHAC O, LAJOIE-MAZENC I, VANDAELE J, JURGENS G, SALVAYRE R

Activation of EGF receptor by oxidized LDL

FASEB J 1998; 12:665–71

SWEE MH, PARKS WC, PIERCE RA.

Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels.

J Biol Chem. 1995 Jun 23; 270(25):14899-906.

TAMBURRO AM, PEPE A, BOCHICCHIO B.

Localizing alpha-helices in human tropoelastin: assembly of the elastin "puzzle".

Biochemistry. 2006 Aug 8; 45(31):9518-30.

TANAKA N, TAJIMA S, ISHIBASHI A, UCHIDA K, SHIGEMATSU T.

Immunohistochemical detection of lipid peroxidation products, protein bound acrolein and 4-hydroxynonenal protein adducts, in actinic elastosis of photodamaged skin.

Arch Dermatol Res. 2001 Jul; 293(7):363-7

THORIN-TRESCASES N, VOGHEL G, FARHAT F, DROUIN A, GENDRON ME, THORIN E

Âge et stress oxydant, Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale

Medecine/sciences 2010 ; 26 : 875-80

TORZEWSKI M, KLOUCHE M, HOCK J, MESSNER M, DORWEILER B, TORZEWSKI J, GABBERT HE, BHAKDI S.

Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18:369 – 378.

TSAMIS A, KRAWIEC JT, VORP DA.

Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review

J R Soc Interface. 2013 Mar 27; 10(83):20121004.

UCHIDA K.

4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress.

Prog Lipid Res, 2003 ; 42, 318-43.

UITTO J, CHRISTIANO AM, KÄHÄRI VM, BASHIR MM, ROSENBLOOM J.

Molecular biology and pathology of human elastin

Biochem Soc Trans. 1991 Nov; 19(4):824-9

ULLOA L, DOODY J, MASSAGUE J.

Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway.

Nature 1999 Feb 25; 397(6721):710-3.

VAN DER REST M, GARRONE R.
Collagen family of proteins.
FASEB J 1991; 5 (13): 2814-23.

VIEIRA O, ESCARGUEIL-BLANC I, JÜRGENS G, BORNER C, ALMEIDA L, SALVAYRE R, NEGRE-SALVAYRE A
Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis.
FASEB J. 2000 Mar; 14(3):532-42.

VINDIS C, ESCARGUEIL-BLANC I, UCHIDA K, ELBAZ M, SALVAYRE R, NEGRE-SALVAYRE A.
Lipid oxidation products and oxidized low-density lipoproteins impair platelet-derived growth factor receptor activity in smooth muscle cells: implication in atherosclerosis.
Redox Rep. 2007;12 (1):96-100.

VLADYKOVSKAYA E, SITHU SD, HABERZETTL P, WICKRAMASINGHE NS, MERCHANT ML, HILL BG, MCCRACKEN J, AGARWAL A, DOUGHERTY S, GORDON SA, SCHUSCHKE DA, BARSKI OA, O'TOOLE T, D'SOUZA SE, BHATNAGAR A, SRIVASTAVA S.
Lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress.
J Biol Chem. 2012 Mar 30; 287(14):11398-409.

VRHOVSKI B, WEISS AS.
Biochemistry of tropoelastin.
Eur J Biochem. 1998 Nov 15;258(1):1-18. Review.

WU M, YANG S, ELLIOTT MH, FU D, WILSON K, ZHANG J, DU M, CHEN J, LYONS T.
Oxidative and endoplasmic reticulum stresses mediate apoptosis induced by modified LDL in human retinal Müller cells.
Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Jul 9;53(8):4595-604.

XU Y, SHAO Y, VOORHEES JJ, FISHER GJ.
Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes.
J Biol Chem. 2006 Sep 15; 281(37):27389-97.

YAAR M. AND GILCHREST B.A.
Photoageing: mechanism, prevention and therapy,
Br J Dermatol. 2007 Nov;157(5):874-87. Review.

YANG S, NUGENT MA, PANCHENKO MP
EGF antagonizes TGF-beta-induced tropoelastin expression in lung fibroblasts via stabilization of Smad corepressor TGIF.
Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol 295:L143–L151;2008.

YOSHINAGA E1, KAWADA A, ONO K, FUJIMOTO E, WACHI H, HARUMIYA S, NAGAI R, TAJIMA S.

N(ϵ)-(carboxymethyl)lysine modification of elastin alters its biological properties: implications for the accumulation of abnormal elastic fibers in actinic elastosis.

J Invest Dermatol. 2012 Feb; 132(2):315-23.

ZENG G, MCCUE HM, MASTRANGELO L, MILLIS AJ.

Endogenous TGF-beta activity is modified during cellular aging: effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression.

Exp Cell Res. 1996 Nov 1; 228(2):271-6

ZHANG M, PIERCE RA, WACHI H, MECHAM RP, PARKS WC

An open reading frame element mediates posttranscriptional regulation of tropoelastin and responsiveness to transforming growth factor beta1.

Mol Cell Biol. 1999 Nov; 19(11):7314-26.

ZHANG P, HUANG A, FERRUZZI J, MECHAM RP, STARCHER BC, TELLIDES G, HUMPHREY JD, GIORDANO FJ, NIKLASON LE, SESSA WC

Inhibition of microRNA-29 enhances elastin levels in cells haploinsufficient for elastin and in bioengineered vessels--brief report.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 Mar; 32(3):756-9.

ZIEMAN SJ, MELENOVSKY V, KASS DA.

Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 May; 25(5):932-43. Review.

.

Autres documents consultés

- **Thèses**

Thèse de Marie Guilbert THESE Université de Reims Champagne-Ardenne, 2012
Approche multimodale par biophotonique pour l'étude des modifications du collagène de type I au cours du vieillissement.

Thèse de Huahua Chen. Université Henri Poincaré, Nancy, 2009
Mécanotransduction et cellules souches mésenchymateuses humaines. Etude de l'effet d'une contrainte d'étirement équilibré sur la voie de TGF β

- **Livres**

Biologie cellulaire et moléculaire 3^{ème} édition, Karp, 2010. Editions De Boeck

Molecular biology of the cell, Alberts Bruce, Bray Dennis, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Watson James D, Garland Publishing, (1983)

ROSSERT J, BRIDEAU G, TERRAZ C, LEJARD V.
Régulation de l'expression des gènes codants pour le collagène de type I
Actualités néphrologiques 2003, Flammarion médecine-sciences.

- **Autres**

Fruetel K. Conférencière, M. Éd., M.D., FRCPC, Division de médecine gériatrique, Université de Calgary, Calgary, AB. Le vieillissement normal – première partie : systèmes cardiovasculaire, respiratoire, gastro-intestinal

INRS, Fiche toxicologique n°57 Acroléine M.T. Brondeau, D. Jargot, F. Pillière, J.C. Protois, M. Reynier, O. Schneider, P. Serre 1999

<http://www.poly-prepas.com/images/files/Chapitre%2010%20Cellules-Matrice%20extracellulaire.pdf>

Productions scientifiques

- **Larroque-Cardoso** P, Mucher E, Grazide MH, Josse G, Schmitt AM, Nadal-Wolbold F, Zarkovic K, Salvayre R, Nègre-Salvayre A.
4-Hydroxynonenal impairs transforming growth factor- β 1-induced elastin synthesis via epidermal growth factor receptor activation in human and murine fibroblasts.
Free Radic Biol Med. 2014 Jun; 71:427-36.
Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.015. Epub 2014 Feb 20.
- **Larroque-Cardoso** P, Swiader A, Ingueneau C, Nègre-Salvayre A, Elbaz M, Reyland ME, Salvayre R, Vindis C.
Role of protein kinase C δ in ER stress and apoptosis induced by oxidized LDL in human vascular smooth muscle cells.
Cell Death Dis. 2013 Feb 28;4:e520.
Doi: 10.1038/cddis.2013.47.
- Muller C, Bandemer J, Vindis C, Camaré C, Mucher E, Guéraud F, **Larroque-Cardoso** P, Bernis C, Auge N, Salvayre R, Negre-Salvayre A.
Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins.
Antioxid Redox Signal. 2013 Mar 1;18(7):731-42.
Doi: 10.1089/ars.2012.4577. Epub 2012 Dec 21.

Communications orales et affichées

COMMUNICATIONS AFFICHEES

- **Pauline Larroque**, Cécile Ingueneau, Mary E Reyland, Robert Salvayre, Anne Nègre-Salvayre and Cécile Vindis
Role of PKC δ in oxidized LDLs-induced vascular smooth muscle cells apoptosis
8th NSFA Congress and 5th Joint meeting of French, German and Swiss Atherosclerosis Societies Avignon, 16-18 juin 2011
- **Pauline Larroque**, Cécile Ingueneau, Audrey Swiader, Anne Nègre-Salvayre and Cécile Vindis, *Role of PKC δ in oxidized LDL-induced pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in vascular smooth muscle cells*
Printemps de la cardiologie 12/13 avril 2012 – Bordeaux
- **Pauline Larroque-Cardoso**, Gwendal Josse, Florence Nadal-Wollbold, Patrick Bogdanowicz, Kamelija Zarkovic, Robert Salvayre and Anne Nègre-Salvayre
Photo-induced modification of elastin by 4-hydroxynonenal adducts: A role in skin photoageing ?
16th SFRRRI Biennial Meeting 6-9 September 2012, London
- OBTENTION D'UN PRIX POSTER -
- **Pauline Larroque-Cardoso**, Elodie Mucher, Gwendal Josse, Florence Nadal-Wollbold, Patrick Bogdanowicz, Robert Salvayre and Anne Nègre-Salvayre
EGF receptor activation by 4-hydroxynonenal alters TGF- β -induced elastogenesis in fibroblasts
5th International Symposium on Nutrition, Oxygen Biology and Medicine, 5-7 June 2013, Paris
- OBTENTION D'UN PRIX POSTER -

COMMUNICATIONS ORALES

- **Pauline Larroque**, Cécile Ingueneau, Audrey Swiader, Anne Nègre-Salvayre and Cécile Vindis, *Role of PKC δ in oxidized LDL-induced pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in vascular smooth muscle cells - Printemps de la cardiologie 12/13 avril 2012 – Bordeaux*
- **Pauline Larroque-Cardoso**, Anne Nègre-Salvayre
Role et prévention du stress carbonyle dans le photovieillessement, Journées de l'école doctorale BSB Toulouse, 25-27 avril 2012 Toulouse.
- **Pauline Larroque-Cardoso**, Elodie Mucher, Gwendal Josse, Florence Nadal-Wollbold, Patrick Bogdanowicz, Robert Salvayre and Anne Nègre-Salvayre
EGF receptor activation by 4-hydroxynonenal alters TGF- β -induced elastogenesis in fibroblasts 5th International Symposium on Nutrition, Oxygen Biology and Medicine, Paris

