



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**  
Rong TANG

**le 27 février 2017**

**Titre :**

Modifications moléculaires et organisationnelles du derme au cours des  
vieillissements intrinsèque et photo-induit

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED SDM : Sciences et génie des matériaux – CO034

**Unité de recherche :**

Physique des Polymères, CIRIMAT

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Dr. Valérie SAMOUEILLAN

**Jury :**

Pr. Nadia CHOUINI-LALANNE (*Présidente*)

Pr. Brigida BOCHICCHIO (*Rapporteur*)

Dr. Alain-Pierre GADEAU (*Rapporteur*)

Pr. Natalio GARCIA-HONDUVILLA

Dr. Florence NADAL-WOLLBOLD

Dr. Patrick BOGDANOWICZ



---

*"Je ne cherche pas à connaître les réponses, je cherche à comprendre les questions."*

*De Confucius*



---

## Remerciements

Cette thèse s'est déroulée au sein de l'équipe Physique des Polymères du CIRIMAT (*Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux*) en partenariat avec le laboratoire du Centre de Recherches sur la peau (Pierre Fabre Dermo-Cosmétique).

J'aimerais remercier chaleureusement le Pr. Nadia CHOUINI-LALANNE, pour avoir présidé mon jury de soutenance de thèse, Pr. Brigida BOCHICCHIO et Dr. Alain-Pierre GADEAU, pour avoir pris le temps de rapporter mon manuscrit, et Pr. Natalio GARCIA-HONDUVILLA, pour avoir examiné avec attention ce travail. L'ensemble des membres de jury, grâce à eux, cette soutenance de thèse restera pour moi un moment de discussion scientifique mémorable.

Ma profonde gratitude va à Valérie Samouillan, ma directrice de thèse tout au long ces trois années. Merci pour les nombreuses discussions, sa pédagogie et ses critiques resteront pour moi un exemple, ainsi que sa patience et son aide à me diriger vers le bon chemin, son soutien, permettant de franchir les moments difficiles.

Je remercie également très vivement à mes encadrants industriels, pour avoir dirigé et mis en relation avec des problématiques à fort enjeu scientifique et économique : Dr. Florence NADAL-WOLLBOLD pour un encadrement exemplaire de ce travail de thèse et des idées proposées, Dr. Patrick BOGDANOWICZ, pour sa relecture rigoureuse du manuscrit et ses réponses pertinentes dans le domaine de la biologie, Dr Aurélie VILLARET et Pascale BIANCHI, pour leur contribution sur ce travail de thèse et leurs efforts sur notre article scientifique.

J'adresse tout mon respect et ma reconnaissance à Collette LACABANNE, pour avoir partagé ses connaissances très riches et pour me permettre d'effectuer ce travail de recherche au sein laboratoire.

Je tiens particulièrement à remercier Jany DANDURANT, pour m'avoir initié à l'ACD et pour son soutien et son aide précieuse tout au long de cette thèse.

Je remercie aussi les autres permanents de laboratoire, Dr Eric DANTRAS, pour m'avoir bien accueilli et permis de préparer cette thèse, Sébastien RACAGEL, pour son expertise et ses dispositifs « faits à maison » permettant de réaliser les analyses vibrationnelles et diélectriques.

A mes collègues doctorants du PhyPol, je voudrais bien dire que ce travail n'aurait pas été facile sans leur soutien, les nombreuses discussions et bons moments partagés. J'adresse mes amitiés aux Jérémie, Laavanya, Geoffrey, Mike et l'ensemble des doctorants et post-doctorants de l'équipe.

Je remercie mes amis pour leur présence de cette soutenance de thèse et l'équilibre qu'ils m'apportent. Enfin, je remercie infiniment tous les membres issus de ma famille, mes parents, mes tantes, mes oncles et mes cousins et cousines, de m'avoir encouragé de faire les études en France et soutenue tout au long de ma vie.

‘哀哀父母，生我劬劳’

感谢我的父亲母亲，不仅仅因为他们赐予我生命，更因为他们对我的培养和教育。



## Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Etude bibliographique .....</b>	<b>3</b>
I. La peau : Organisation et fonction .....	3
I.A. Les différents compartiments de la peau .....	3
I.B. Principales fonctions de la peau .....	4
I.C. Histophysiologie de la peau .....	4
I.C.1. L'épiderme .....	4
I.C.1.1. La couche cornée .....	5
I.C.1.2. L'épiderme viable .....	6
I.C.2. La jonction dermo-épidermique .....	7
I.C.3. Le derme et l'hypoderme .....	8
I.C.3.1. Le matériel cellulaire du derme .....	9
I.C.3.1.1. Les fibroblastes .....	10
I.C.3.1.2. Les cellules du système immunitaire .....	11
I.C.3.2. La matrice extracellulaire du derme .....	11
I.C.3.2.1. Les collagènes et fibres collagéniques .....	12
I.C.3.2.1.1. Les chaînes $\alpha$ et la triple hélice collagénique .....	13
I.C.3.2.1.2. Structure quaternaire et ultrastructure .....	15
I.C.3.2.1.3. Les voies de réticulation des collagènes fibreux du derme .....	16
I.C.3.2.1.4. Propriétés mécaniques des collagènes fibreux du derme .....	19
I.C.3.2.2. L'élastine et les fibres élastiques .....	20
I.C.3.2.2.1. De la structure primaire à l'ultrastructure .....	21
I.C.3.2.2.2. Elasticité de l'élastine .....	21
I.C.3.2.3. Les glycosaminoglycanes .....	22
I.C.3.2.4. Les protéoglycanes .....	25
I.C.3.2.5. Glycoprotéines du derme .....	26

II. Vieillissements intrinsèque et extrinsèque de la peau .....	27
II.A. Le vieillissement intrinsèque : vieillissement chronologique .....	27
II.A.1. La théorie des radicaux libres .....	29
II.A.2. La réticulation de glycosylation non enzymatique (glycation) .....	30
II.A.3. La théorie télomérique du vieillissement .....	34
II.B. Le vieillissement extrinsèque .....	34
II.B.1. Le rayonnement solaire .....	35
II.B.2. Manifestations cliniques et évolution de la MEC .....	35
II.B.2.1. Evolution de la phase collagénique .....	37
II.B.2.2. Evolution de l'élastine .....	39
II.B.2.3. Evolution des GAGs .....	40
II.C. Vieillissement intrinsèque/extrinsèque .....	40
III. Techniques de caractérisation de la peau et des protéines de la MEC .....	42
III.A. Analyses biophysiques .....	42
III.A.1. Comportement mécanique .....	42
III.A.1.1. Caractérisation mécanique in vivo .....	42
III.A.1.2. Caractérisation mécanique in vitro .....	44
III.A.2. Comportement thermodynamique .....	45
III.A.3. Comportement diélectrique .....	47
III.B. Analyses physicochimiques .....	49
III.B.1. Caractérisation de la MEC et des protéines par IRTF .....	49
III.B.2. Caractérisation de la MEC et des protéines par spectroscopie Raman .....	51
<b>Chapitre II : Choix et apport des techniques – validation des protocoles .....</b>	<b>53</b>
I. Adaptation des techniques – obtention des signatures vibrationnelles, thermiques et diélectriques de la peau .....	53
I.A. Explants de peau abdominale .....	53
I.B. Réponse vibrationnelle du derme humain par IRTF .....	54
I.B.1. Contrôle de l'hydratation du derme humain .....	56

I.B.2. Influence de l'hydratation sur la réponse vibrationnelle du derme humain....	59
I.B.3. Assignation des bandes d'absorption du derme hydraté.....	60
I.B.4. Sur-résolution des spectres du derme humain par dérivée seconde et FSD ...	63
I.C. Déshydratation et dégradation du derme abdominal déterminé par ATG/IRTF.....	69
I.D. Réponse thermique de la peau humaine par ACD .....	71
I.D.1. Transitions thermiques de la peau humaine .....	72
I.D.2. Exploitation des transitions thermiques de la peau humaine.....	75
I.D.2.1. Endotherme de fusion de la glace .....	75
I.D.2.2. Endotherme de dénaturation de la phase collagénique .....	77
I.E. Réponse diélectrique de la peau humaine.....	80
I.E.1. Modes de relaxation de la peau à l'état hydraté .....	84
I.E.1.1. Thermogrammes CTS globaux.....	84
I.E.1.2. Etude de la structure fine.....	85
I.E.2. Modes de relaxation de la peau à l'état lyophilisé .....	90
I.E.2.1. Thermogrammes CTS globaux.....	90
I.E.3. Normalisation des thermogrammes CTS complexes .....	93
II. Validation du protocole de conservation - recherche de nouveaux biomarqueurs.....	94
II.A. Biopsies cutanées abdominales .....	94
II.B. Réponse vibrationnelle .....	95
II.B.1. Comparaison des réponses vibrationnelles du derme humain frais et conservé .....	95
II.B.2. Recherche de biomarqueurs de l'intégrité du collagène dans le derme.....	96
II.C. Réponse thermique.....	99
II.C.1. Mesures de thermoporométrie sur les biopsies fraîches et conservées.....	99
II.C.2. Quantification de l'eau dans les biopsies fraîches et conservées .....	101
II.C.3. Dénaturation de la phase collagénique des biopsies fraîches et conservées	103
III. Conclusion .....	107
<b>Chapitre III. Etude clinique .....</b>	<b>109</b>

III.A. Descriptif de l'étude clinique .....	109
III.B. Réponse vibrationnelle de derme humain .....	111
III.B.1. Etude qualitative .....	111
III.B.2. Etude quantitative.....	118
III.C. Réponse thermique de la peau humaine par ACD.....	125
III.C.1. Organisation hydrique.....	125
III.C.2. Mesures de thermoporométrie .....	128
III.C.3. Dénaturation de la phase collagénique .....	129
III.D. Réponse diélectrique de la peau humaine par CTS .....	134
III.D.1. Etude basse température des biopsies hydratées .....	134
III.D.2. Etude basse température des biopsies déshydratées.....	136
III.D.3. Etude haute température des biopsies déshydratées .....	138
III.E. Synthèse et interprétation des principaux résultats issus des analyses IRTF, ACD et CTS.....	142
III.E.1. Organisation hydrique.....	142
III.E.2. Composants macromoléculaires de la MEC.....	143
III.E.3. Tableau récapitulatif des marqueurs des vieillissements intrinsèque et extrinsèque.....	146
<b>Chapitre IV. Effet de l'exposition <i>ex vivo</i> .....</b>	<b>147</b>
IV.A. Descriptif de l'étude de l'exposition aux UVs.....	147
IV.B. Suivi de l'exposition <i>ex vivo</i> du derme abdominal par IRTF .....	147
IV.B.1. Evolution des spectres IRTF moyennés du derme abdominal avec l'exposition aux Uvs .....	147
IV.B.2. Evolution quantitative des bandes d'absorption du derme abdominal avec l'exposition aux UVs .....	149
IV.B.3. Evolution des spectres de dérivée seconde et des spectres FSD du derme abdominal avec l'exposition aux UVs.....	151
IV.C. Suivi de l'exposition <i>ex vivo</i> de la peau abdominale par ACD .....	156

## *Sommaire*

---

IV.C.1. Transitions thermiques de la peau humaine .....	156
IV.C.1.1. Organisation hydrique de la peau abdominale avec l'exposition aux UVs .....	158
IV.C.1.2. Dénaturation de la phase collagénique de la peau abdominale avec l'exposition aux UVs.....	159
IV.C.2. Transitions thermiques du derme abdominal humain .....	160
IV.C.2.1. Organisation hydrique du derme abdominal avec l'exposition aux UVs .....	160
IV.C.2.2. Dénaturation de la phase collagénique du derme abdominal avec l'exposition aux UVs.....	161
IV.D. synthèse et interprétation des principaux résultats d'analyse IRTF et ACD .....	162
 <b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>165</b>
 <b>Références bibliographiques .....</b>	<b>169</b>
 <b>Annexes .....</b>	<b>191</b>



## **Glossaire**

- ACD : Analyse Calorimétrique Diatherme
- AGE : Produits Finaux de Glycation Avancée
- ATG : Analyse Thermogravimétrique
- ATR : Réflexion Totale Atténuée
- CTS : Courants ThermoStimulés
- DeH-HLNL : Dehydro Hydroxylysino Norleucine
- DEM : Dose Érythémale Minimale
- DTG : Dérivée de la perte de masse
- FSD : Auto-Déconvolution de Fourier
- GAG : Glycosaminoglycane
- HisHLNL : Histidino-Hydroxylysino Norleucine
- HA : Acide Hyaluronique
- IRTF : Analyse Infra-Rouge à Transformée de Fourier
- JDE : Jonction Dermo-Épidermique
- LOX : Lysyl Oxydase
- MMP : Métalloprotéinases Matricielles
- MEC : Matrice Extracellulaire
- PG : Protéoglycane
- ROS : Dérivés Réactifs de l'Oxygène
- RX : Rayons X
- TIMP : Inhibiteur Tissulaire de la Métalloprotéinase
- TPM : Thermoporométrie
- UV : Rayonnement Ultraviolet



## **Introduction**

**Le vieillissement de la peau** résulte d'une combinaison de processus chronologiques et de facteurs externes, comme l'exposition cumulative au soleil (UVs). Les rides sont le principal signe macroscopique du vieillissement cutané, causées par la modification moléculaire et ultrastructurale du derme. Les principaux composants de la **matrice extracellulaire du derme**, à savoir les fibres de collagène, les fibres élastiques et les substances amorphes telles que les glycanes et les biomolécules qui leur sont associées (métalloprotéinases et leurs inhibiteurs, hyaluronidases, etc...), peuvent être altérés en terme de concentration, de structure et/ou de répartition. L'organisation hydrique est également perturbée lors de ce phénomène et l'ensemble de ces modifications aboutit à une perte de fonction de la matrice et à l'apparition de manifestations cliniques du vieillissement. A ce jour, un grand nombre d'études cliniques ont été réalisées sur des biopsies cutanées pour comprendre les mécanismes impliqués dans le vieillissement intrinsèque (chronologique) et extrinsèque (photo-vieillessement) par des approches histologiques et ultrastructurales. Cependant, la complexité et la lenteur des processus impliqués dans le vieillissement, conduisant à des changements subtils au niveau de la biochimie, de la fonctionnalité biologique et de la morphologie, nécessite des travaux de recherche multidisciplinaires.

**L'un des objectifs principaux** de ce travail de thèse mené en collaboration avec les Laboratoires Pierre Fabre Dermo-Cosmétique est ainsi d'analyser les modifications du derme humain et de l'organisation hydrique au sein de la matrice, avec l'âge et sous l'effet des UVs, de façon à mieux comprendre les altérations de la peau dans ces conditions.

Les techniques d'analyse thermique et diélectrique sont largement utilisées pour les études structurales et dynamiques des polymères synthétiques. Elles se sont révélées particulièrement bien adaptées pour caractériser des biopolymères et des tissus biologiques ; cependant, les techniques diélectriques en particulier n'ont jamais été utilisées au sein de notre équipe pour étudier des échantillons de surface aussi faible que celle des biopsies cutanées ; de plus, si de nombreuses études ont été entreprises à l'état lyophilisé, afin de s'affranchir de la réponse majeure de l'eau, l'étude de biopsies cutanées à l'état hydraté représente l'un des challenges de ce travail de thèse. Afin d'atteindre l'échelle moléculaire, l'utilisation complémentaire de la spectroscopie Infra-rouge est nécessaire.

**Le premier objectif** de ce travail de thèse est donc de vérifier si l'utilisation combinée de ces techniques sur des biopsies cutanées humaines permet de sonder le derme sur une large

gamme d'échelle, et si ces techniques apportent des informations pertinentes sur les principales macromolécules du derme et sur son organisation hydrique. Il est en particulier important de pouvoir différencier les différents types d'interaction de l'eau et son confinement.

**Le deuxième objectif** consiste à suivre l'évolution des réponses thermiques, diélectriques et vibrationnelles du derme au cours du vieillissement chronologique et du photovieillissement, au travers d'une étude clinique portant sur un nombre relativement important de sujets de deux groupes d'âge (20-30 ans et supérieur à 60 ans).

En parallèle, **le troisième objectif** est d'extraire des marqueurs du vieillissement intrinsèque et extrinsèque afin de mieux comprendre du point de vue fondamental les altérations de la matrice induites par le rayonnement et au cours du vieillissement.

Ce mémoire se divise en quatre chapitres :

Le premier chapitre sera consacré à une mise au point bibliographique sur la peau. Nous nous focaliserons sur les principaux constituants du derme et leur évolution au cours des vieillissements intrinsèque et extrinsèque. Un état de l'art des différentes techniques biophysiques utilisées pour la caractérisation de la peau et de ses constituants clôturera ce premier chapitre.

Dans le second chapitre seront présentées les études de faisabilité menées sur des biopsies cutanées humaines pour vérifier la pertinence de l'utilisation combinée des techniques d'analyse thermique, vibrationnelle et diélectrique. La validation du protocole de conservation des biopsies prélevées pour l'étude clinique ultérieure sera aussi détaillée dans ce chapitre.

L'étude de biopsies cutanées humaines prélevées chez des patientes de deux groupes d'âge et sur des zones protégées ou exposées aux UVs fera l'objet du troisième chapitre.

Enfin dans le quatrième chapitre, nous tenterons de compléter l'étude menée au niveau clinique par une analyse des modifications du derme lors d'une exposition aux UVs *ex vivo*.

---

## *Chapitre I*

---



# Chapitre I. étude bibliographique

## I. La peau : Organisation et fonction

La peau encore appelée tégument (du latin *tegumentum*: couverture) constitue l'enveloppe du corps. Elle est en continuité avec les muqueuses qui tapissent les cavités naturelles de l'organisme. C'est l'organe le plus visible et le plus vaste du corps humain, environ 15% du poids total du corps adulte [1]. Son épaisseur moyenne est de 2mm et sa surface moyenne pour un homme adulte est supérieure à 2 m<sup>2</sup> [2]. Sa structure est complexe, elle est composée de tissus qui se développent, se différencient et se renouvellent constamment.

### I.A. Les différents compartiments de la peau

La peau est schématiquement divisée en 4 régions superposées qui sont de la superficie vers la profondeur : l'épiderme, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme.

On rattache à la peau d'autres éléments : les annexes cutanés tels que les poils, les ongles, les glandes sudoripares, les follicules pilo-sébacés, les papilles nerveuses du derme (cf. Figure 1).

Même si chacune de ces couches possède une structure spécifique définissant des fonctions bien particulières [1,2], elles sont interdépendantes au niveau de la régulation et la modulation moléculaire, cellulaire et tissulaire.

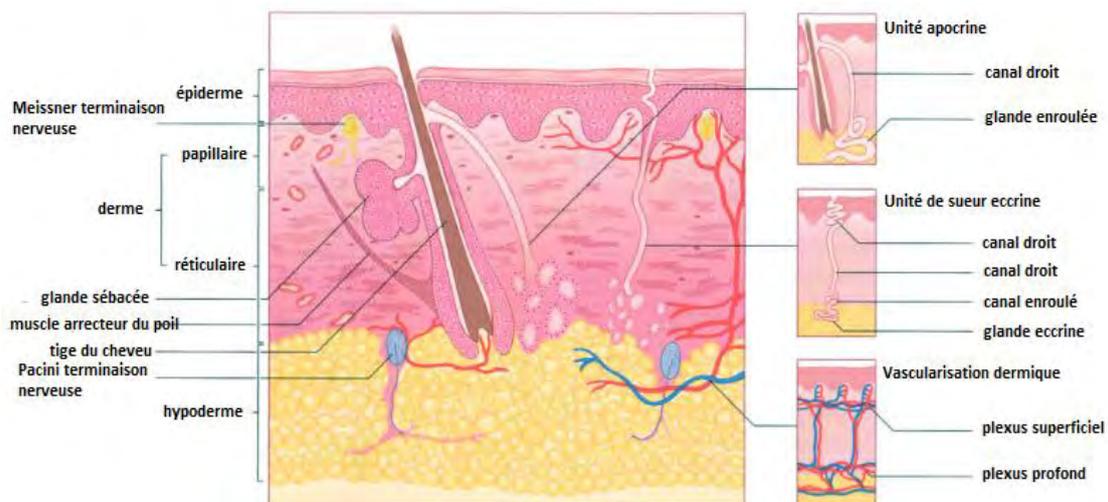


Figure 1 : organisation de la peau [3]

## **I.B. Principales fonctions de la peau**

Son rôle évident est celui de barrière naturelle. Etant en contact direct avec l'environnement extérieur, la peau constitue une barrière dynamique assurant des fonctions d'isolation, de régulation thermique, de protection. Elle régule le passage d'eau et d'électrolytes vers l'extérieur et vers intérieur. La production d'une sécrétion aqueuse par les glandes sudoripares eccrines de la peau, connue sous le nom de sueur, et son évaporation ultérieure, est un mécanisme majeur dans le refroidissement du corps humain [2,4,5]. Elle empêche la pénétration de substances et de micro-organismes étrangers en assurant une fonction de maintien et de résistance mécanique. Elle a un rôle immunitaire en détectant et combattant les infections. Son rôle sensoriel est essentiel en transmettant des informations sur la température, la douleur, le toucher, les stimuli mécaniques en tout point du corps.

## **I.C. Histophysiologie de la peau**

### **I.C.1. L'épiderme**

L'épiderme, en contact avec l'environnement extérieur, est un épithélium pluristratifié, kératinisé, squameux, non vascularisé (Figure 2). Son épaisseur (60 à 100  $\mu\text{m}$ ) varie en fonction de l'emplacement du corps, de l'âge et de l'environnement (exposition aux UVs) [3,6–8], mais aussi des modifications pathologiques [9]. Il est essentiellement composé de couches de kératinocytes (90-95%), cellules épithéliales responsables de la production de kératine). Il contient également des mélanocytes (cellules dendritiques responsables de la synthèse de la mélanine), des cellules de Langerhans (3-6%) (macrophagocytes spécifiques du système immunitaire de la peau [10]) et des cellules de Merkel (cellules du système neuroendocrinien diffus). Le compartiment extracellulaire de l'épiderme est réduit au ciment intercellulaire.

Classiquement, selon la microscopie optique, on distingue 4 couches de kératinocytes de la profondeur à la surface : couche basale, couche épineuse, couche granuleuse et couche cornée (compacte, puis desquamante). Ainsi, les kératinocytes se renouvellent en permanence et migrent en 3 semaines de la membrane basale épidermique vers la surface de la peau, soit de la couche basale à la couche cornée.

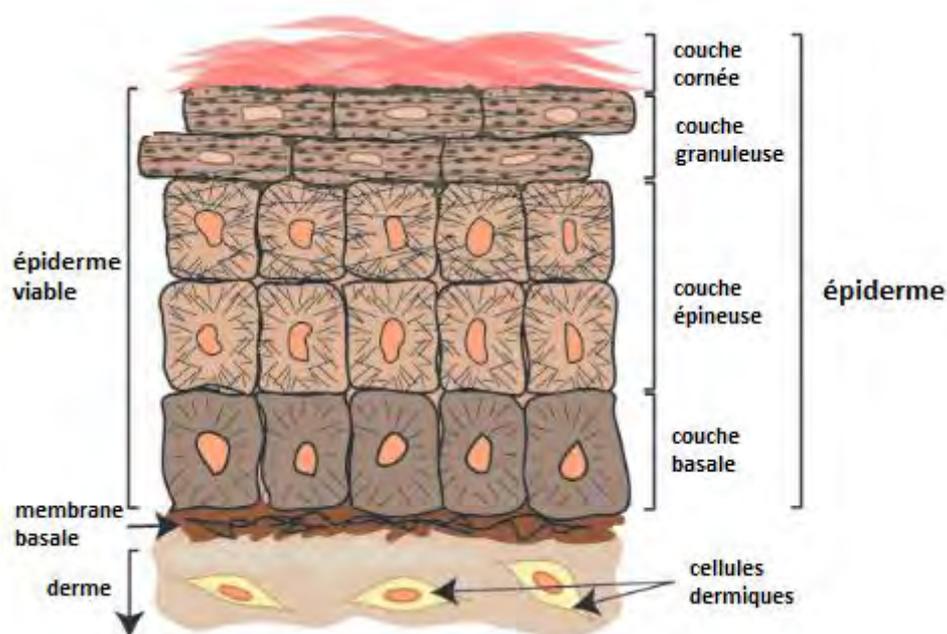


Figure 2 : morphologie de l'épiderme de la peau [5]

Les kératinocytes assurent trois grandes fonctions :

- la cohésion de l'épiderme en rapport avec le cytosquelette et les systèmes de jonction des kératinocytes entre eux,
- une fonction de barrière entre les milieux intérieur et extérieur en rapport avec la différenciation terminale des kératinocytes en cornéocytes,
- la protection contre les radiations lumineuses en rapport avec les mélanosomes de stade IV qu'ils ont phagocyté.

Nous détaillerons la structure de l'épiderme en décrivant l'épiderme viable (constitué des 3 couches profondes (couche basale, couche épineuse, couche granuleuse) et la couche cornée.

### I.C.1.1. La couche cornée ou *stratum corneum*

La partie la plus externe de l'épiderme appelée couche cornée est considérée comme une couche bien séparée à la vue de ses propriétés spécifiques de barrière [1,4,5,8,9]. Compte-tenu de son accessibilité, de très nombreuses études de caractérisation lui sont dédiées. Elle est macroscopiquement très ferme, mais malléable et ridée. Elle est composée de kératinocytes non viables sans noyau (stade de différenciation terminale) dénommés cornéocytes, maintenus par des lipides et des desmosomes (structure de brique-mortier).

Composée de 15 à 25 couches de cornéocytes [11,12], l'épaisseur totale de la couche cornée humaine est de 10 à 25  $\mu\text{m}$ . Les lipides (provenant de la membrane plasmique et des corps lamellaires des kératinocytes) sont principalement des céramides, du cholestérol, du sulfate de cholestérol et des acides gras libres dans un ratio équimolaire, avec de faibles quantités de phospholipides et de glucosylcéramides [6,9]. Ces lipides peuvent coexister en deux phases cristallines lamellaires de périodicité différente (13 ou 6 nm). L'empaquetage latéral des lipides (orthorhombique, hexagonal ou liquide cristal) dépend de leur composition et de leur température [9]. A la température physiologique de la surface de la peau, les lipides de la couche cornée humaine adoptent préférentiellement une structure orthorhombique. Les phases lamellaires et l'empaquetage jouent tous deux un rôle crucial dans la fonction de barrière de la peau [13].

La couche cornée est continuellement renouvelée. Les cellules sont éliminées vers l'extérieur (desquamation) et remplacées par de nouvelles. Les changements dans la structure, la composition et la fonction des cornéocytes se produisent à mesure qu'ils progressent vers la surface extérieure de la peau. L'hydratation de la couche cornée varie de 5 à 10% près de la surface jusqu'à 30% à proximité de l'épiderme viable [9].

Bien que les cornéocytes soient non viables, la couche cornée est considérée comme entièrement fonctionnelle, notamment en terme de propriétés de barrière telles que la perméabilité, la desquamation, l'activité antimicrobienne, l'hydratation, etc. La couche cornée est aussi responsable de la résistance globale de la peau à l'étirement, assurée par la structure en plis et de la filtration des UVs [9,14].

### **I.C.1.2. L'épiderme viable**

L'épiderme viable est une structure stratifiée dont l'épaisseur viable varie approximativement de 30 à 100  $\mu\text{m}$  [7]. Il est composé de trois sous-couches : la couche granuleuse (*stratum granulosum*), la couche épineuse (*stratum spinosum*) et la couche basale (*stratum basal*).

Les kératinocytes changent de forme, de taille et de propriétés physiques lors de leur migration vers la surface de la peau.

La couche granuleuse est le compartiment le plus superficiel de l'épiderme contenant des cellules vivantes. Elle contient en particulier de la kératohyaline et l'éléidine, précurseurs de la kératine molle, ainsi que des enzymes autolytiques intervenant dans le processus de maturation des kératinocytes. C'est la couche où se prépare le processus de « kératinisation » ou de différenciation terminale de l'épiderme [6,8,15].

La couche épineuse (ou couche de Malpighi) contient des kératinocytes, des mélanocytes et la plupart des cellules de Langerhans. Ces dernières expriment un grand nombre de lymphocytes et de macrophages de surface [4,16]. Il est à noter que la fonction immunitaire des cellules de Langerhans est diminuée par de nombreux facteurs intrinsèques ou extrinsèques, et notamment par l'irradiation aux UVB [3,4,8]. La couche la plus profonde de l'épiderme est la couche basale, comprenant des cellules souches épidermique à haut potentiel prolifératif, qui vont migrer et se différencier dans les couches supérieures. Cette couche, principalement composée de kératinocytes, contient environ 10% de mélanocytes. Les mélanocytes sont plus nombreux sur les sites exposés tels que le visage, les avant-bras [17]. Une faible population de cellules de Merkel est aussi retrouvée dans cette couche épidermique. Les cellules de Merkel (MCS) sont des cellules neuroendocrines dans l'épiderme qui reliées aux nerfs cutanés participent aux fonctions sensorielles[18].

### **I.C.2. La jonction dermo-épidermique**

La jonction dermo-épidermique (JDE) constitue l'interface entre l'épiderme et le derme. Elle est synthétisée par les kératinocytes basaux et les fibroblastes dermiques [1]. Sa fonction principale est de faire adhérer l'épiderme au derme et de fournir une résistance aux contraintes de cisaillement externes [8,19]. Elle fait aussi office de barrière semi-perméable, sélective, permettant le contrôle des échanges moléculaires. De plus, la JDE joue un rôle important au cours de la morphogenèse et le développement, la cicatrisation et le remodelage de la peau [20]. Cette membrane basale est principalement constituée de collagènes (40 à 65 %de la quantité totale de protéines), de protéoglycanes et de glycoprotéines structurales comme les laminines [4]. Le collagène de type IV (collagène formant des réseaux) est le principal constituant de *la lamina densa* [21,22] et le collagène de type VII (produit par les kératinocytes et les fibroblastes [3,4]) est le composant structural majeur des fibrilles d'ancrage vers le derme papillaire. Même s'il ne représente que 0,001% des collagènes de la peau, il est crucial pour son intégrité [23].

Les laminines sont les glycoprotéines structurales les plus abondantes des membranes basales ; constituées par l'assemblage de trois chaînes différentes polypeptidiques ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) ces molécules en forme de croix forment une famille de 15 isoformes différentes [24]. Dans la peau humaine normale sont présentes les laminines 5, 6 et 10 [25]. La laminine 5 est le composant clé du complexe d'ancrage de l'épiderme et contribue de façon importante à la stabilité de la membrane basale. La grande importance de cette protéine s'explique par le fait qu'elle forme les structures appelées filaments d'ancrage qui s'attachent aux

hémidesmosomes via l'intégrine  $\alpha_6\beta_4$  et aux fibres d'ancrage constituées de collagène VII en passant au travers de la *lamina lucida* et de la *lamina densa* [26,27]. L'absence de laminine 5 ou l'altération de son expression cause une perte de la cohésion dermo-épidermique importante [28,29].

### I.C.3. Le derme et l'hypoderme

Au-dessous de la jonction dermo-épidermique se trouve le compartiment majeur de la peau appelé derme (Figure 1 et Figure 3) et son compartiment adjacent l'hypoderme. Le derme et l'hypoderme sont des tissus conjonctifs avec tous leurs constituants habituels, richement vascularisés et innervés. Il n'existe pas de limite franche entre le derme et hypoderme.

L'hypoderme est la partie la plus profonde de la peau. Il sépare la peau des tissus sous-jacents et s'étend jusqu'aux plans aponévrotiques ou périostés, (sauf au niveau des paupières, des oreilles et des organes génitaux masculins, où il n'y a pas d'hypoderme). Il est constitué de lobes eux-mêmes subdivisés en petits lobules graisseux séparés par des septums interlobulaires conjonctivo-élastiques servant de passage aux vaisseaux et nerfs destinés au derme. L'abondance du tissu adipeux varie avec les habitudes alimentaires, mais aussi les régions du corps et le sexe.

L'épaisseur moyenne du derme est de 1 à 2 mm [6]. Il confère à la peau sa souplesse, son élasticité et sa résistance à la traction. C'est un assemblage sophistiqué et biologiquement actif qui protège le corps contre les blessures mécaniques, aide à la régulation thermique, permet le stockage de l'eau, apporte les nutriments à l'épiderme et contient des récepteurs de stimuli sensoriels [8,30]. Il joue un rôle important dans le trafic immunitaire cellulaire, la régulation du tonus des vaisseaux et l'hémostase locale.

Le derme est constitué de deux sous couches distinctes en composition et en structure [16,31] qui sont facilement identifiables sur les sections histologiques (Figure 3): le derme papillaire localisé au-dessous de l'épiderme et le derme réticulaire qui borde l'hypoderme.

L'épaisseur du derme papillaire varie de 300 à 400  $\mu\text{m}$  selon l'âge et la localisation anatomique. Le derme papillaire superficiel est agencé dans des structures en forme de crête, et contient les composants micro-vasculaires et neuronaux qui maintiennent l'épiderme [19,31]. Cette forme « conique » du derme papillaire augmente ainsi la surface de contact entre le derme et l'épiderme et permet une meilleure adhérence entre ces couches [1]. Un ensemble de vaisseaux sanguins (plexus vasculaire superficiel, encore appelé *rete*

*subpapillaire*) délimite la zone inférieure du derme papillaire.

Le derme réticulaire, plus dense, forme la majeure partie du tissu dermique (environ 80%). La limite inférieure du derme réticulaire est marquée par un plexus vasculaire profond (plexus cutané ou *rete cutaneum*) avec une transition des tissus fibreux vers les tissus adipeux [4,8].

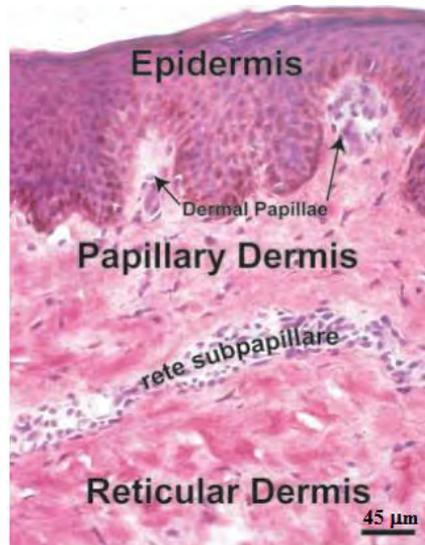


Figure 3 :le derme papillaire et réticulaire séparés par un plexus vasculaire [31]

Le derme est composé de **matériel cellulaire** (représenté par des fibroblastes et des cellules immunitaires) et d'une **matrice extracellulaire** (contenant majoritairement d'eau, de fibres de collagènes multidirectionnelles et d'un réseau de fibres élastiques, de glycoprotéines et de protéoglycanes [32,33]).

### I.C.3.1. Le matériel cellulaire du derme

Les fibroblastes, les macrophages et les mastocytes sont des cellules les plus présentes du derme, leur densité étant la plus importante dans le derme papillaire (cf. Figure 4) [8].

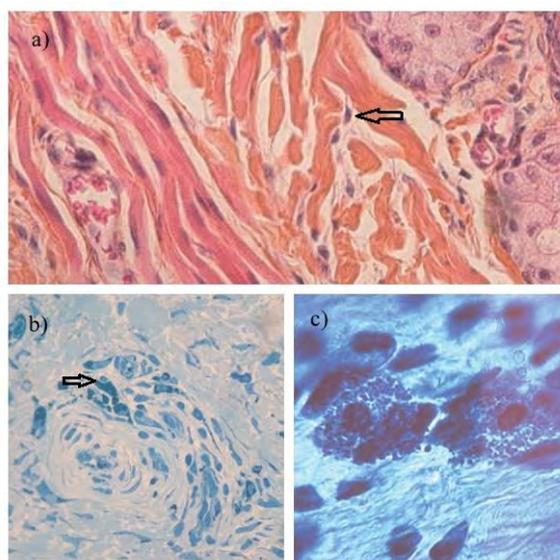


Figure 4: image de microscopie optique de cellules au sein du derme :a)Fibroblastes; b) Macrophages dermiques ; c) Mastocytes [34]

#### I.C.3.1.1. Les fibroblastes

Les fibroblastes constituent la principale population cellulaire dermique. Ces cellules mésenchymateuses à forte activité synthétique non seulement sécrètent tous les types de protéines fibreuses et de substances fondamentales de la matrice extracellulaire, mais aussi interagissent avec les autres cellules en jouant des rôles majeurs dans la réparation des tissus après une blessure [1,19,35]. Ils sécrètent des facteurs de croissance et des enzymes dont des collagénases et des inhibiteurs de protéases matricielles pour dégrader la matrice extracellulaire, la renouveler et la réorganiser.

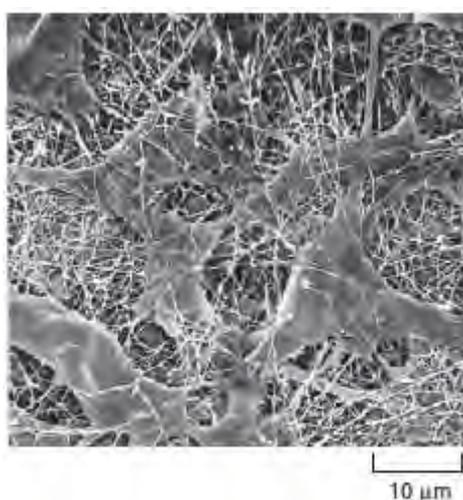


Figure 5 : les fibroblastes dans la matrice extracellulaire [36]

### I.C.3.1.2. Les cellules du système immunitaire

Les macrophages, les dendrocytes dermiques et les mastocytes sont des cellules hétérogènes relevant du système immunitaire de la peau [1,9,15]. Les macrophages ont la capacité de phagocyter les débris cellulaires et les agents pathogènes, de les digérer ou de permettre le déclenchement d'une réponse immunitaire spécifique. Ils sont parfois difficiles à distinguer des fibroblastes de par leur morphologie proche et leur emplacement similaire dans le tissu [1,8].

Les dendrocytes dermiques sont des cellules présentatrices d'antigènes qui permettent le déclenchement de réponses immunitaires.

Les mastocytes sont des cellules intervenant dans la réaction inflammatoires, l'hypersensibilité immédiate, angiogénèse, la cicatrisation parce qu'elles sécrètent beaucoup de médiateurs [3,8,30].

### I.C.3.2. La matrice extracellulaire du derme

Dans le derme papillaire, on retrouve une matrice extracellulaire lâche, composée principalement de fines fibrilles de collagène I et III et de fibres d'élastine orientées perpendiculairement à la JDE.

Le derme réticulaire est composé principalement de fibrilles de collagènes, organisées en grands faisceaux de fibres, entourées par un réseau de fibres élastiques [32,33]. Il contient moins de collagène de type III que le derme papillaire, et la taille des faisceaux de collagène et des fibres élastiques augmente vers l'hypoderme [9].



*Figure 6 : les fibres dermiques de collagène et élastine*

### I.C.3.2.1. Les collagènes et fibres collagéniques

Largement décrit dans la littérature [37–40] et en particulier dans les précédentes thèses réalisées au sein de l'équipe [41–45], nous nous cantonnerons ici à rappeler les principales caractéristiques des collagènes et en particulier des collagènes majeurs du derme.

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères (environ 30% de la masse totale de protéines). Les collagènes se retrouvent non seulement au niveau de la peau, mais aussi dans les tendons, les ligaments, les os, la cornée et les vaisseaux sanguins [8,30,38,46,47]. Le terme collagène regroupe en fait toute une série de protéines comportant un ou plusieurs domaines en triple hélice [40] pouvant former des fibres homotypiques et hétérotypiques. L'utilisation intensive des méthodes de microscopie électronique et de diffraction RX a permis de caractériser très finement leur structure. Actuellement la superfamille des collagènes comprend 28 types [38] codés par des gènes différents et formant des assemblages supramoléculaires distincts comme illustré sur la Figure 7.

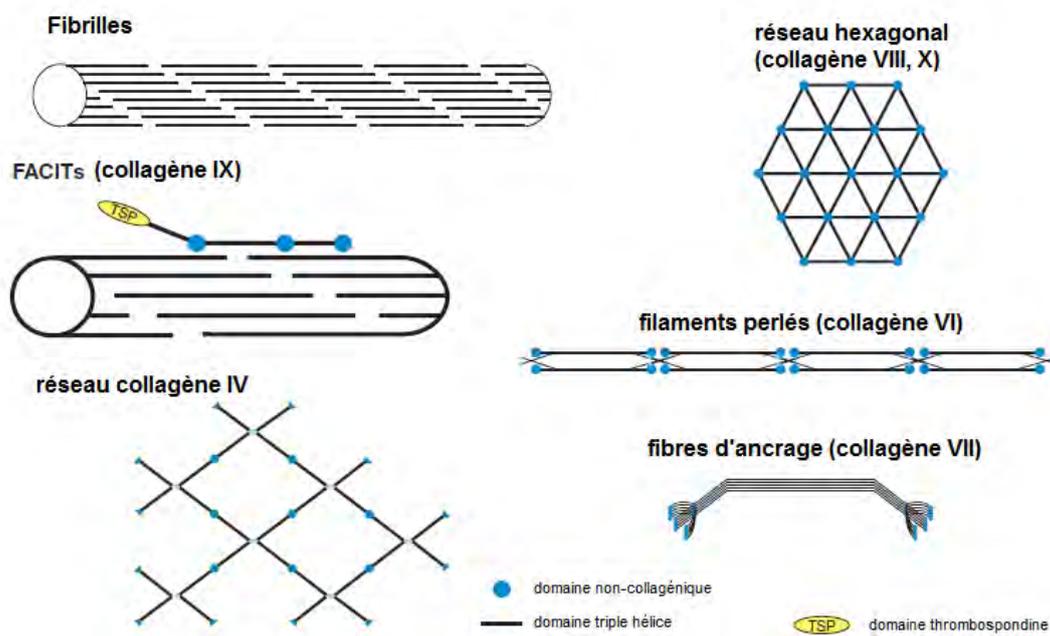


Figure 7 : assemblages supramoléculaires formés par les collagènes [38]

Les collagènes sont des protéines multi-domaines ; ainsi les collagènes fibrillaires contiennent un domaine principal organisé en **triple hélice** (dit domaine collagénique) flanqué de domaines non organisés en triples hélices (dit domaines non collagéniques)

tandis que les autres types de collagènes possèdent des domaines en triples hélices interrompues ou non majoritaires [48].

Dans le derme, les collagènes représentent 80% du poids sec et 90% du matériel protéique. Si 15 types de collagène ont été identifiés dans la peau, les collagènes fibrillaires de type I, III et V [8,16,30,38] sont les plus abondants, dans les proportions indiquées dans le tableau ci-joint.

Type de collagène	Chaînes $\alpha$	Espèces moléculaires	Proportion dans le derme
Collagène I	$\alpha_1(I), \alpha_2(I)$	$[\alpha_1(I)]_2, \alpha_2(I)$	85-90%
Collagène III	$\alpha_1(III)$	$[\alpha_1(III)]_3$	8-11%
Collagène V	$\alpha_1(V), \alpha_2(V), \alpha_3(V),$ $\alpha_4(V)$	$[\alpha_1(V)]_2, \alpha_2(V)$ $[\alpha_1(V)]_3$ $[\alpha_1(V)]_2, \alpha_4(V)$ $\alpha_1(XI), \alpha_1(V), \alpha_3(XI)$	2-4%

*Tableau 1 : principaux collagènes fibreux du derme*

#### I.C.3.2.1.1. Les chaînes $\alpha$ et la triple hélice collagénique

Comme indiqué dans le tableau précédent, les collagènes sont constitués de 3 chaînes polypeptidiques, dénommées chaînes  $\alpha$ , dont la taille varie de 662 à 3152 acides aminés selon les types de collagène chez l'homme.

Le tropocollagène, unité de base du collagène fibrillaire, est constitué de trois chaînes  $\alpha$  d'un millier d'acides aminés, assimilables à une succession de triplets Gly-X-Y, avec le plus souvent la proline en position X et l'hydroxyproline en position Y. Cette répétition particulière confère à chaque chaîne une conformation en hélice gauche de type polyproline II stabilisée par liaisons hydrogène, aboutissant à une triple hélice droite. Les enzymes membranaires suppriment 30% à 40% des extrémités peptidiques C et N-terminales de la molécule pour donner l'unité de base du collagène (Figure 8).

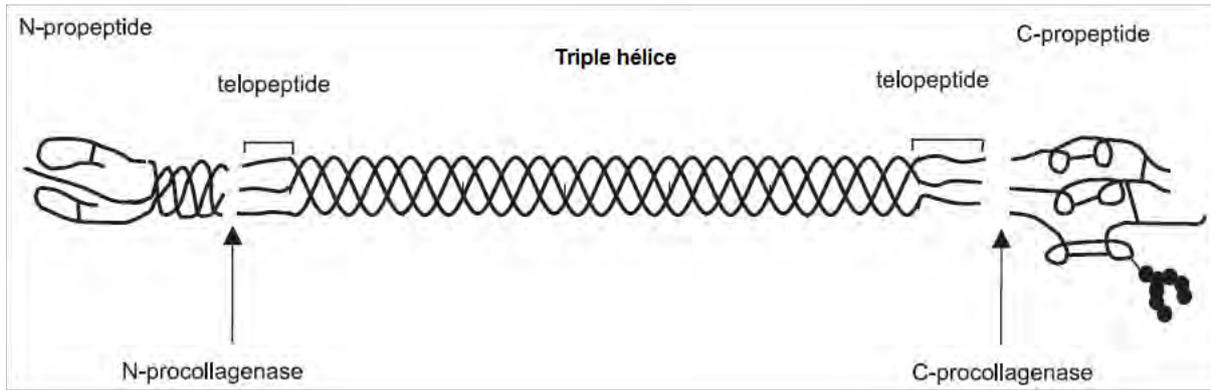


Figure 8 : superhélice collagénique avec ses divers sous-domaines ainsi que les sites de clivage des N- et C-procollagénases [49]

La stabilité de la triple hélice est assurée par divers facteurs [48], comme les interactions électrostatiques entre résidus ionisables, les interactions hydrophobes de type Van der Waals entre les résidus apolaires, les liaisons hydrogène entre résidus de chaînes voisines, liaisons directes [50] ou réalisées par l'intermédiaire de molécules d'eau (eau structurale) [51–53].

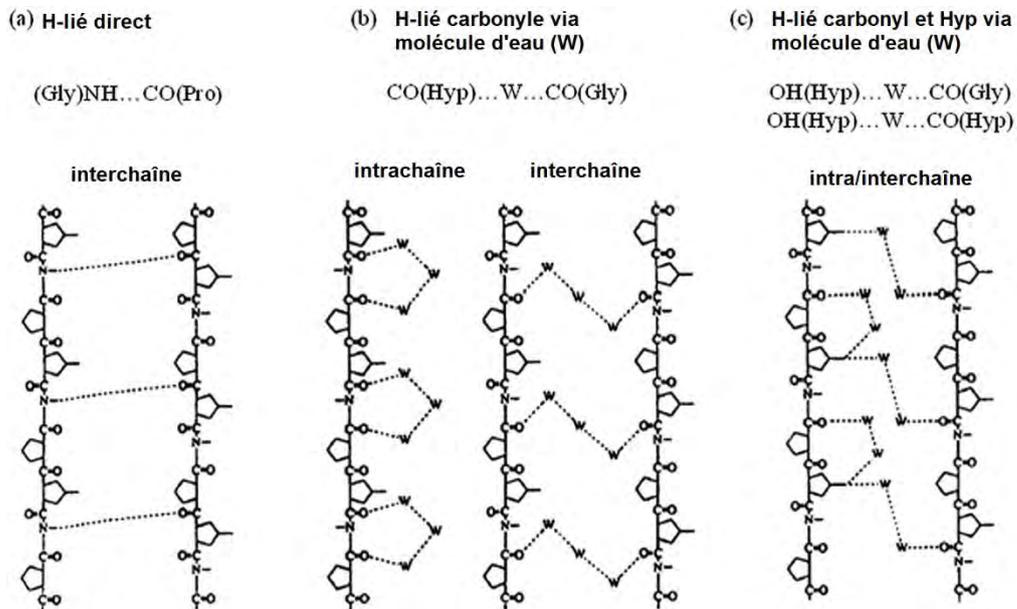


Figure 9 : illustration schématique des liaisons hydrogène intra et interchaînes dans les chaînes  $\alpha$  de collagène [54]

Les unités de tropocollagène de **type I** de masse moléculaire 300000 g/mol se présentent ainsi comme des bâtonnets rigides, de 280 nm de longueur et de 1,4 nm de diamètre [55].

Le collagène de **type III** est majoritaire dans le derme papillaire et augmente au cours de la cicatrisation [15,16,19]. Exprimé précocement et tout au long de l'embryogenèse [56], il joue un rôle très important dans l'élasticité et de l'intégrité tissulaire [57]. Au contraire du collagène de **type I**, les séquences  $\alpha(\text{III})$  possèdent des résidus de cystéine qui participent à la formation de ponts disulfure intramoléculaires. Une instabilité localisée de la triple hélice, due à une proportion légèrement différente en 4-hydroxyproline et glycine augmenterait la susceptibilité au clivage protéolytique et au turn-over plus rapide des fibrilles de collagène **III** [58] par rapport au collagène **I**.

La longueur du domaine en triple hélice du collagène de type **III** est légèrement plus élevée que celle du collagène de type **I**, alors que les extrémités télopeptidiques sont légèrement plus courtes [59].

L'isoforme la plus commune du collagène de **type V** est  $\alpha_1(\text{V})_2\alpha_2(\text{V})$  [48,60]. Le domaine en triple hélice du collagène **V** est de même longueur que celui du collagène **I**, mais seule une partie des propeptides est clivée lors du processus de transformation du procollagène en collagène ; une fraction significative de domaines non hélicoïdaux demeure donc dans le collagène de **type V** [61].

#### **I.C.3.2.1.2. Structure quaternaire et ultrastructure**

Une des principales caractéristiques structurale du collagène est sa capacité à former des assemblages supramoléculaires hautement organisés dans l'espace extracellulaire, variant selon la fonctionnalité requise du tissu.

Le tropocollagène est une molécule réactive qui subit une fibrillogenèse spontanée conduite par un processus entropique pour créer des structures supramoléculaires [37]. Les molécules de tropocollagène s'associent latéralement et longitudinalement pour former des fibrilles de 10 à 500 nm de diamètre [62] par des liaisons transversales covalentes. A une échelle supérieure, ces fibrilles se rassemblent en fibres de 1 à 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, donnant naissance à des faisceaux de collagène dans le derme [3,6,15].

La figure suivante présente cet assemblage multi-échelle du collagène.

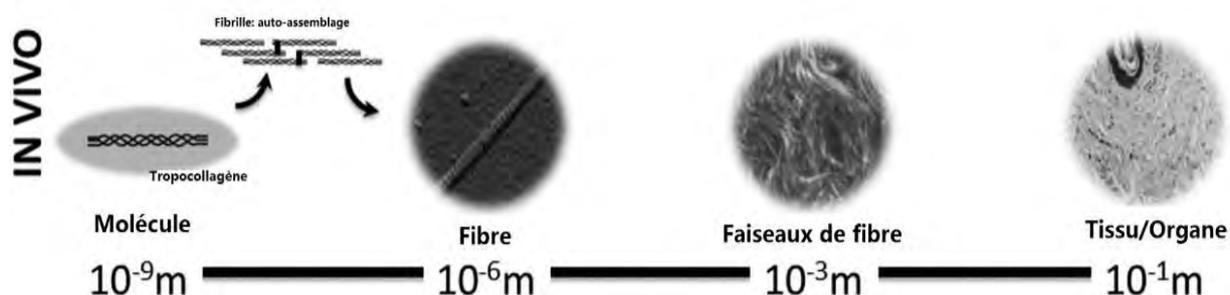


Figure 10: organisation hiérarchique du collagène de type I [63]

Au niveau du derme, on retrouve des faisceaux de fibrilles de collagène **I** ayant une dimension latérale qui varie de quelques dizaines à quelques centaines de microns et orientés en trois dimensions de façon aléatoire [64].

Au contraire des fibrilles de collagène **I** qui peuvent développer des diamètres de 10 à 500 nm selon les tissus, les fibrilles de collagène **type III** ne développent pas de diamètre supérieur à 60 nm [62,65]. Les fibrilles de collagène de **type III** se trouvent souvent en association avec des fibrilles de collagène de **type I** pour former des fibres hétérotypiques par réticulation intermoléculaire dans la plupart des organes, à l'exception des os et de la cornée [66–69]. En régulant le diamètre des fibrilles de collagène de **type I**, le collagène de **type III** a un rôle critique dans la fibrillogenèse. Un défaut de collagène de **type III** implique un développement défectueux et un défaut de fonctionnement des organes tels que le système cardio-vasculaire, l'intestin et la peau [56].

Le collagène de type **V** forme typiquement des hétérofibrilles avec le collagène type **I** [60,70,71]. Etant nucléateur de la fibrillogenèse de collagène **I** [48,72], il est suggéré que le collagène **V** a une fonction de régulation de ce processus. Le collagène **V** a non seulement une fonction de contrôle du diamètre des hétérofibrilles, mais assure aussi un rôle dans la normalité de l'architecture tissulaire [70]. *Kobayasi et al.* suggère que les fibres de collagène **V** forment un réseau reliant les autres collagènes fibrillaires, les fibres élastiques et les protéoglycanes pour la cohésion des composants du tissu fibrillaire du derme [73].

### I.C.3.2.1.3. Les voies de réticulation des collagènes fibreux du derme

L'organisation fibrillaire des collagènes du derme, essentiellement due à des liaisons hydrogène à l'état initial [74], est stabilisée lors de la maturation par la réticulation chimique intra et intermoléculaire des molécules de tropocollagène [75,76].

Les propriétés mécaniques des fibres collagéniques vont ainsi être dépendantes de la formation de ces liaisons covalentes qui inclut différents mécanismes.

### Les voies de réticulation enzymatique

#### - la réticulation enzymatique par la lysyl oxydase (LOX) qui concerne les collagènes de type I, III et V.

La lysyl-oxydase catalyse la désamination oxydative des résidus lysine et hydroxylysine en allysine et hydroxyallysine respectivement [77]. Ces aldéhydes vont réagir avec un autre aldéhyde pour former un produit de condensation aldol (réticulation intramoléculaire) [78] ou un résidu lysine ou hydroxylysine non modifié (réticulation intermoléculaire).

Au contraire des réticulations intramoléculaires qui ne semblent pas jouer un rôle essentiel dans la résistance physique de la fibre collagénique, les réticulations intermoléculaires ont une importance capitale pour les propriétés mécaniques des fibres collagéniques [75].

Ces réticulations interviennent à la fois entre chaînes  $\alpha$  dans une même molécule de tropocollagène et entre chaînes  $\alpha$  de molécules de tropocollagène distinctes. Elles peuvent intervenir entre collagènes de même type ou de type différent (I/III, I/V). Il est à noter que la réticulation des collagènes est plutôt spécifique au type de tissu qu'au type de collagène impliqué.

Les pontages intermoléculaires formés vont dépendre de la présence de résidus lysine et hydroxylysine dans les télopeptides [79]. La voie « lysine » (cf. Figure 1, annexe A) prédomine dans la peau adulte tandis que la voie « hydroxylysine » prédomine dans la peau embryonnaire et la plupart des tissus comme les os, les tendons, le cartilage [80,81].

Le pontage réductible prédominant du derme adulte est le pontage intermoléculaire aldimine (dehydro hydroxylysino norleucine (DeH-HLNL) [81,82], obtenu par la réaction (2) de la voie lysine (cf. Figure 2, annexe A).

Ces pontages divalents des collagènes néosynthétisés sont labiles ou réductibles. Ils diminuent fortement avec la maturation des tissus, donnant lieu à des réticulations tri ou tétra-fonctionnelles [83,84]. Dans les tissus collagéniques matures, les réticulations sont principalement trivalentes.

Dans le derme, la voie particulière et majoritaire de réticulation concerne la réaction de la

DeH-HLNL avec l'histidine pour former l'histidino-hydroxylysinonorleucine (HisHLNL) [85,86]. La quantité de HHL augmente la résistance mécanique de la fibre collagénique et la rend moins soluble [85,87].

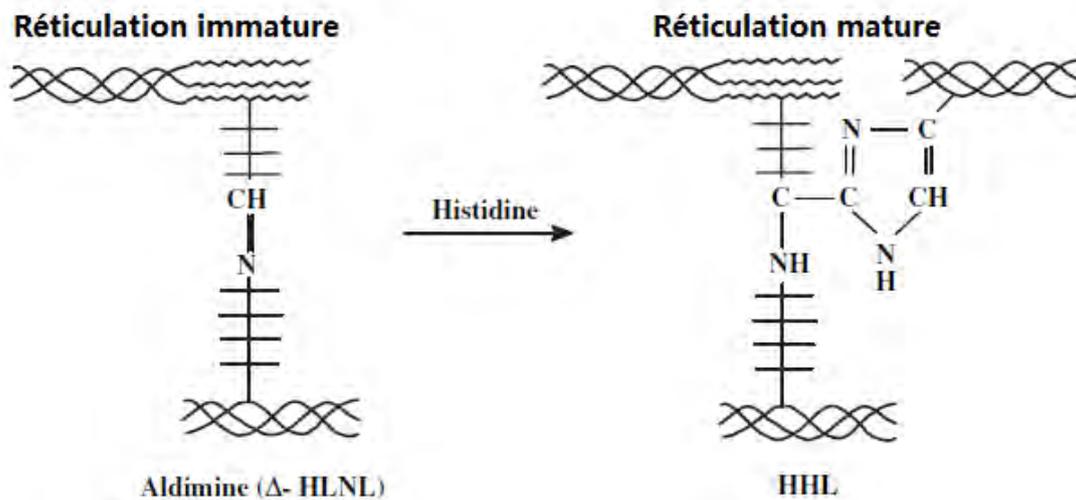


Figure 11: formation du pontage His-HLNL trivalent mature et stable [87]

#### - La réticulation par la transglutaminase (collagènes I, III, V)

La transglutaminase (TG2) catalyse la formation d'un pontage entre l'acide glutamique et la lysine selon le schéma joint pour former un pontage  $N\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$  [87]\_(cf. Figure 3, annexe A).

Ces pontages situés entre les résidus des domaines en triple hélice de fibres adjacentes améliorent les propriétés mécaniques de la fibre collagénique [88].

#### - La réticulation par la disulfure isomérase (collagène III)

Dans la séquence terminale Gly-Pro-Cys-Cys du collagène III, les résidus cystéine sont oxydés par l'enzyme disulfure isomérase, ce qui conduit à la liaison covalente des chaînes  $\alpha(\text{III})$  par des ponts-disulfures intra et intermoléculaires [89] (Figure 4, annexe A).

Ces liaisons disulfures introduisent des contraintes conformationnelles dans chaînes polypeptides, améliorant leur stabilité thermodynamique [90]. Il est à noter que le collagène de type IV, non fibrillaire, présent dans la membrane basale de la JDE est aussi réticulé par des ponts disulfures qui sont peut-être dans ce cas la seule source de liaisons covalentes intra et inter-liaisons moléculaires [80].

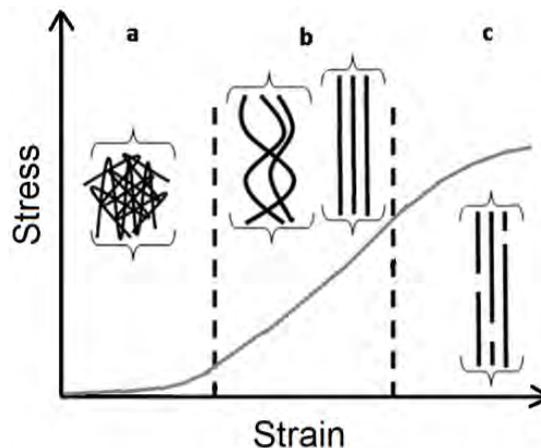
## Les voies de réticulation non enzymatiques : la glycation

La glycation non enzymatique est un processus naturel par lequel les sucres réducteurs et les protéines interagissent pour produire une matrice extracellulaire réticulée dans les tissus biologiques [91]. Associée au vieillissement physiologique de l'organisme, et du derme en particulier, ce processus sera détaillé dans le paragraphe traitant du vieillissement du derme.

### I.C.3.2.1.4. Propriétés mécaniques des collagènes fibreux du derme

Les fibres de collagène de type I confèrent au derme sa résistance à la traction et jouent un rôle majeur dans la stabilité du derme [1,3,15,92]. Le module de Young de la peau mesuré par des tests de traction *in vitro* entre 4 et 40 MPa [93], est ainsi à rapprocher de celui du collagène dermique de type I, avec une valeur de l'ordre de 32 MPa [94].

Les propriétés mécaniques des fibres de collagène sont étroitement corrélées aux différents niveaux d'organisation. A l'échelle nanométrique, les mécanismes de déformation clés sont l'étirement des molécules en triple hélice torsadée à petites déformations, suivi par étirage axial et déroulage moléculaire [95], comme présenté sur la Figure 12.



*Figure 12: relation contrainte-déformation de la peau est associée à l'orientation du collagène [96]*

Le comportement mécanique au niveau submicronique et/ou fibrillaire (rigidité, extensibilité et non linéarité à grande déformation) n'est pas totalement élucidé.

Des modélisations moléculaires ont mis en évidence que la longueur de la molécule de tropocollagène (300 nm) et la densité de réticulation étaient optimisées. En maximisant la robustesse et en fournissant une grande dissipation d'énergie lors de la déformation, cette longueur conduit à la formation de fibres collagéniques aux propriétés mécaniques les plus favorables. Une densité de réticulation trop importante entraîne une diminution de la dissipation d'énergie [97].

*Silver et al.* [98] ont montré que les tissus plus riches en collagène de type I (tels que les tendons) sont constitués de réseaux de collagène fibrillaire alignés et ont une extensibilité limitée. En revanche, les tissus avec une teneur élevée en collagène de type III tel que la peau du fœtus et l'arc aortique sont plus extensibles et ont tendance à subir des déformations plus importantes avant de présenter une plus grande rigidité. Ils ont également proposé que l'origine de cette flexibilité était associée à l'alternance de domaines rigides (séquences riches en proline et hydroxyproline) et flexibles (séquences pauvres en proline et hydroxyproline) [99] dans le collagène de type III, les domaines flexibles étant conservés dans l'arrangement en "quarter-stagger" retrouvés dans les fibrilles de collagène III. Il apparaît aussi que le diamètre des fibrilles est inversement proportionnel à la souplesse du collagène (le collagène de type III forme des fibrilles fines, inférieures à 60 nm). Des fibrilles collagéniques de flexibilité accrue peuvent occuper des zones plus grandes, limitant ainsi la fusion entre fibrilles et le diamètre de croissance [98].

#### **I.C.3.2.2. L'élastine et les fibres élastiques**

Avec le besoin de flexibilité des tissus et la nécessité de résister à l'étirement, l'évolution a permis aux êtres vivants de sécréter des protéines, telle que l'élastine chez les mammifères [100], pour satisfaire à cette exigence. La morphologie de fibres élastique est très distincte dans les différentes parties de notre corps. Les fibres élastiques du derme sont fines et de longueur variable, s'interconnectant en réseaux (cf. Figure 6).

L'élastine, composant amorphe, est le principal constituant des fibres élastiques (plus de 90%) qui confère les propriétés mécaniques de résistance et d'élasticité essentielle à la fonction des tissus élastiques tel que le derme [101]. Les microfibrilles riches en glycoprotéines acides et organisées en fibrilles de 10 à 12 nm [2] sont des composants minoritaires mais pourtant essentiels des fibres élastiques, jouant le rôle d'échafaudage pour le dépôt, l'orientation et l'assemblage des monomères de tropoélastine lors de la formation des fibres élastiques. Ces microfibrilles non ramifiées (fibrillines majoritaires) sont réparties de façon homogène [102]. Elles restent liées à l'élastine en début d'assemblage mais leur proportion diminue graduellement lorsque la fibre atteint la maturité [103].

Largement détaillée dans les thèses précédentes de l'équipe [43,44,104], nous nous cantonnerons ici à rappeler les principales caractéristiques de cette protéine.

#### **I.C.3.2.2.1. De la structure primaire à l'ultrastructure**

La tropoélastine humaine est constituée d'une chaîne polypeptidique de 786 acides aminés, d'un poids moléculaire de  $72000 \text{ g.mol}^{-1}$  [105].

Sa composition particulièrement élevée en résidus apolaires lui confère un caractère hydrophobe. Les résidus fonctionnels tels que la lysine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et l'arginine sont peu nombreux ; la lysine et ses dérivées en constituent la grande partie et servent à la formation de liaisons croisées [106]. La tropoélastine est ainsi constituée par une alternance de domaines hydrophobes et de domaines servant à la réticulation.

Contrairement aux collagènes organisés en grande partie en triple hélice, plusieurs structures secondaires (hélices  $\alpha$ , tours  $\beta$ , feuillets  $\beta$  et structures désordonnées) (cf. Figures 5-7, annexe A) coexistent au sein de la tropoélastine [107,108].

Comme les molécules de tropocollagène, les molécules de tropoélastine ont la capacité de s'auto-assembler pour former des fibres. Ce processus complexe de fibrillogénèse initialement mené par des interactions hydrophobes est encore en cours d'étude [109,110]. La réticulation des molécules de tropoélastine dans les régions riches en alanine stabilise chimiquement ce réseau tridimensionnel pour donner l'élastine mature.

Comme dans le cas du collagène, la réaction initiale de réticulation est une désamination oxydative des résidus lysine. Les réactions suivantes sont spontanées et impliquent la condensation de résidus lysine et allysine proches pour former des ponts de réticulation tels que l'allysine aldol (bifonctionnel), la lysinonorleucine (bifonctionnel), la merodesmosine [111] (trifonctionnel) et les liaisons croisées tétrafonctionnelles uniques à l'élastine : la desmosine et l'isodesmosine [112].

Le résultat de la réticulation est un réseau tridimensionnel, comportant des nœuds de pontage tous les 65-70 résidus. Compte-tenu de cette structure, c'est une protéine avec une durée de vie extrêmement longue (environ 70 ans de demi-vie) [113], insoluble et très résistante aux agents chimiques. Nous verrons dans le paragraphe sur le vieillissement comment elle peut être dégradée par la voie de l'élastose [114,115].

#### **I.C.3.2.2.2. Elasticité de l'élastine**

Avec un module de Young de 0,3 à 0,6 MPa et une élongation maximale à la rupture de 100 à 150%, l'élastine possède une élasticité de type caoutchoutique.

Contrairement aux collagènes, l'élastine ne possède pas d'ordre à longue distance et de

nombreux modèles ont été proposés pour expliquer l'origine de son élasticité : pendant longtemps se sont opposés les modèles dans lesquels l'élastine était considérée comme isotrope et dépourvue de structure, et ceux dans lesquels l'élastine était considérée anisotrope avec des régions d'ordre à courte distance [116]. *Tamburro et al.* [117–119] ont procédé à une sorte de « dissection » de l'élastine humaine par l'analyse méthodique de la conformation de séquences polypeptidiques codées par les exons individuels de la tropoélastine humaine. Ils ont pu démontrer la présence de conformations labiles, comme la poly-proline II et les coudes  $\beta$ , dont la stabilité dépend fortement du milieu, les structures périodiques, telles que l'hélice  $\alpha$ , étant présentes seulement dans les séquences poly-alanine des domaines de réticulation. Ces travaux ont contribué à la compréhension du mécanisme moléculaire de l'élasticité de, que l'on peut brièvement résumer dans le tableau joint.

Etat relaxé	Etat étiré
plus hydraté	moins hydraté
peu structuré	plus structuré
mouvements chaotiques	mouvements de type "soliton"
haute entropie	entropie plus faible
système fractal	système euclidien

*Tableau 2 : description du système élastine/eau [120]*

### I.C.3.2.3. Les glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont une famille de polysaccharides complexes, linéaires et non ramifiés. Ils partagent une organisation structurale commune, basée sur la répétition d'une unité disaccharidique comprenant une hexosamine (N-acétyl-glucosamine ou N-acétyl-galactosamine) et un acide uronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique) ou un sucre neutre (galactose) et pouvant être variablement sulfatés.

La nature des sucres formant ces unités disaccharidiques, ainsi que les types des liaisons glycosidiques impliquées, permettent de définir 6 types de glycosaminoglycanes classés en deux sous familles (glucosaminoglycanes et galactosaminoglycanes), comme illustré dans le Tableau 3 et la Figure 13.

**Chapitre I. étude bibliographique**

---

Glycosaminoglycanes	unité disaccharidique	Sous famille	degré de sulfatation
Acide hyaluronique (HA)	Acide D-glucuronique, N-Acétyleglucosamine	glucosaminoglycanes	0
Héparane sulfate/ héparine	Acide glucuronique et Acide uronique, N-Acétyleglucosamine	glucosaminoglycanes	2.0-3.0
Sulfate de chondroïtine (CS)	Acide D-glucuronique, N-Acétylegalactosamine	galactosaminoglycanes	0.2-2.3
Sulfate de dermatane (DS)	Acide L-iduronique N-Acétylegalactosamine	galactosaminoglycanes	1.0-2.0

---

*Tableau 3: description des GAGs du derme*

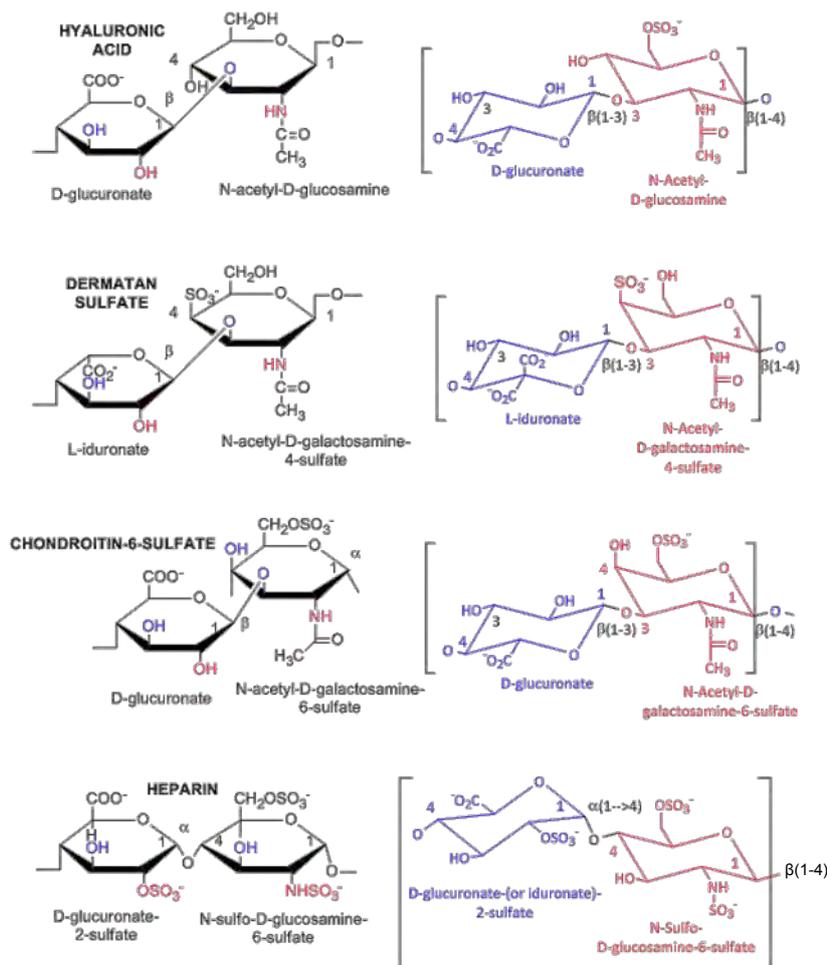


Figure 13 : les principaux GAGs de la peau [121]

L'acide hyaluronique (HA) est le composant le plus abondant des GAG dans le derme (50% dans la peau adulte). Il se distingue des autres GAGs car il n'est pas sulfaté, il n'est jamais retrouvé associé à un squelette protéique (il n'existe donc pas d'HA-PG) et il se présente sous forme de chaînes individuelles de taille considérable (pouvant atteindre une longueur de 50000 unités disaccharidiques). En solution physiologique, l'HA est polyanionique et possède une structure aléatoirement coudée donnant des solutions de forte viscosité. Ces macromolécules peuvent aussi s'auto-assembler pour former des régions possédant une structure hélicoïdale. Compte-tenu de son caractère hydrophile et de l'enchevêtrement des molécules individuelles, l'HA forme alors un gel d'élasticité considérable. L'HA joue un rôle essentiel dans le maintien de l'hydratation, et est impliqué dans un certain nombre de processus physiologiques et pathologiques (adhésion cellulaire, migration, croissance

tumorale...), notamment de par son interaction avec son récepteur cellulaire CD44 [122].

#### **I.C.3.2.4. Les protéoglycanes**

Les protéoglycanes (PG) font partie de la famille des glycoprotéines. Leur point commun est la présence de chaînes de GAG attachées de façon covalente à un squelette protéique lors d'une modification post-translationnelle.

Bien que les protéoglycanes soient présents en bien moindre quantité que les collagènes dans le derme, leur importance dans la physiologie de la peau a été mise en évidence.

Ce sont des molécules de haut poids moléculaire (60000-250 000 g/mol) qui peuvent absorber jusqu'à 1000 fois leur volume propre en eau, régulant ainsi l'affinité du derme avec l'eau, son volume et sa compressibilité. Les protéoglycanes lient aussi les facteurs de croissance et les cytokines, et connectent les cellules avec la matrice fibrillaire. Ils influencent la prolifération, la différenciation, la réparation des tissus et la morphogénèse.

La décorine et le versicane sont les protéoglycanes majoritaires extraits du derme [123–125]. La décorine est un PG de petite taille (60 000 g/mol) constitué par un cœur protéique de 30 000 g/mol auquel sont attachés 2 ou 3 oligosaccharides et une unique chaîne GAG de 16 à 18000 g/mol, principalement du DS dans la peau. Le cœur de la protéine se lie au collagène I de façon à ce que la chaîne latérale de DS soit localisée dans la zone de trou de l'arrangement en quarter-stagger du collagène. La décorine joue un rôle dans la régulation du diamètre des fibrilles de collagène. Par exemple, la rupture ciblée de la décorine conduit à la formation de fibrilles de collagène aberrantes.

Le versicane (Figure 14) est un PG de haut poids moléculaire contenant 2 longues chaînes de CS ; présent dans le derme fœtal et adulte, il interagit avec les microfibrilles et l'HA et pourrait ainsi conférer des propriétés viscoélastiques aux microfibrilles cutanées. Des variations dans la composition en protéoglycanes apparaissent typiquement autour de 40 ans.

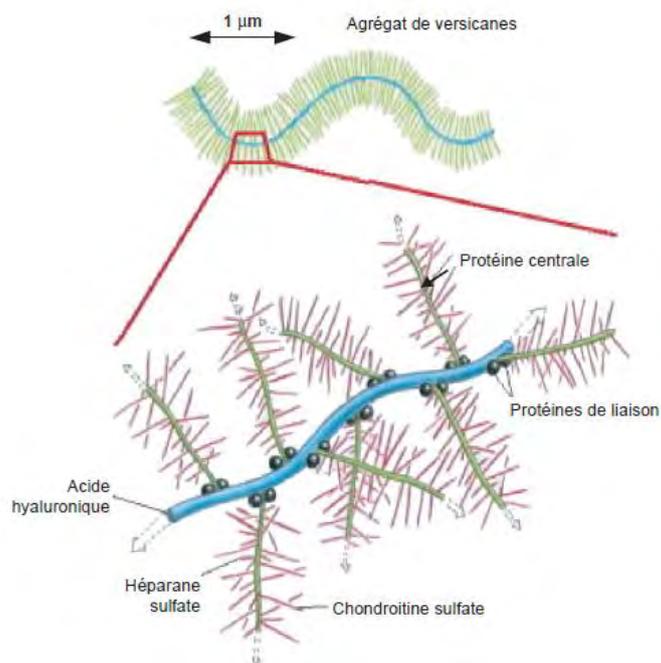


Figure 14 : agrégats de versicanes [34]

#### I.C.3.2.5. Glycoprotéines du derme

Comme les GAGs et PGs, les glycoprotéines interagissent avec les autres composants de la matrice et les cellules via des récepteurs intégrines spécifiques. Elles sont impliquées dans l'adhésion, la migration, la morphogénèse et la différenciation.

Dans le derme, se retrouvent en particulier les glycoprotéines telles que la fibronectine, et l'entactine. La fibronectine joue un rôle clé dans l'adhésion, la migration, la croissance et la différenciation des cellules à la matrice extracellulaire [126]. Quant à la laminine, elle peut réagir avec le collagène du type IV et VII et joue un rôle crucial pour l'assemblage de la membrane basale [126].

## II. Vieillessement intrinsèque et extrinsèque de la peau

Le vieillissement cutané est un phénomène biologique complexe qui affecte les différents constituants des diverses couches de la peau ; les changements principaux concernent majoritairement le derme [127]. Le vieillissement de la peau est souvent associé à une augmentation des rides, au relâchement des tissus et de la laxité [128]. Lors du vieillissement cutané, un remodelage de la MEC conduit à l'altération de sa fonctionnalité. Il est ainsi important de suivre l'évolution des collagènes fibrillaires, des fibres élastiques et des protéoglycanes/glycosaminoglycanes/acide hyaluronique, nécessaires pour conférer en particulier résistance à la traction, élasticité et hydratation [129].

Le vieillissement cutané est la juxtaposition de deux phénomènes distincts :

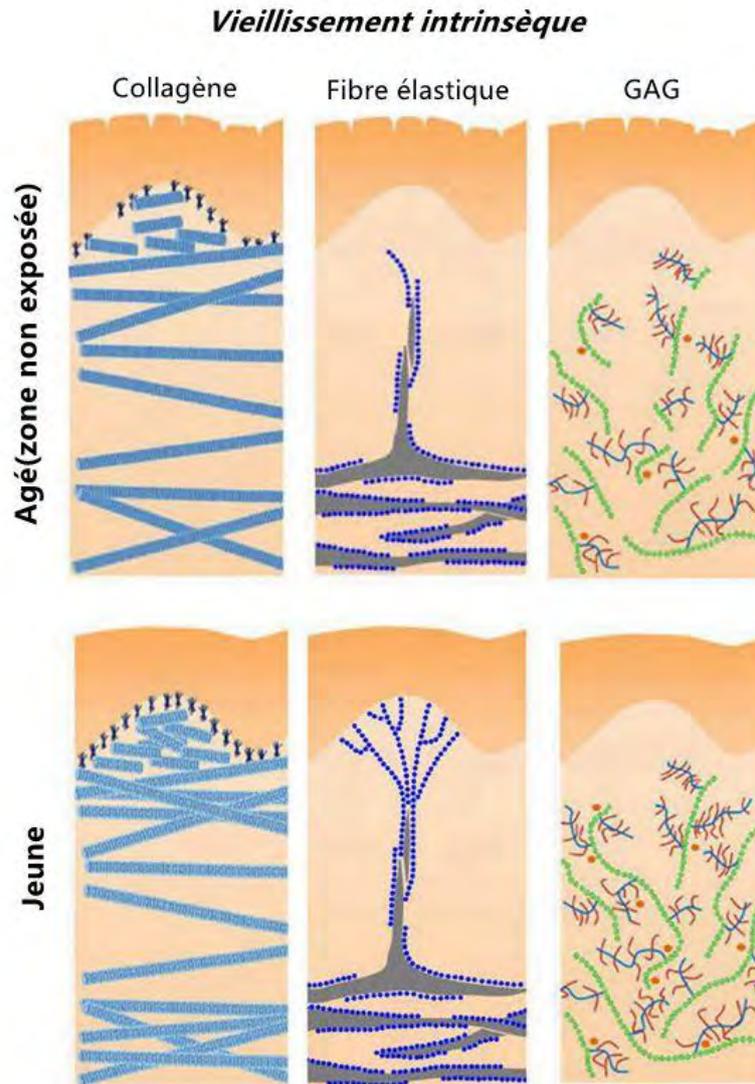
- le vieillissement intrinsèque (chronologique, génétique, endocrinologique)
- le vieillissement extrinsèque (environnemental). Les effets du vieillissement extrinsèque sont souvent plus prononcés [130].

### II.A. Le vieillissement intrinsèque : vieillissement chronologique

Le vieillissement cutané intrinsèque est un processus physiologique progressif et irréversible de la dégradation du tissu qui commence dès que la maturation physique est accomplie [127,131]. Le vieillissement intrinsèque reflète notamment les caractéristiques génétiques et dépend du temps. Au niveau macroscopique, une perte nette de l'épaisseur cutanée est mise en évidence chez les personnes âgées. On retrouve aussi une altération des fonctions mécaniques et de la fonction barrière de la peau [132,133], ainsi qu'une sécheresse accrue et la formation de rides [134]. L'amincissement du derme en particulier est accompagné d'une diminution de sa cellularité, avec une diminution du nombre de fibroblastes [135].

La Figure 15 illustre l'effet du vieillissement intrinsèque sur les principaux composants du derme avec :

- une atrophie du collagène, notamment des types I et III (dans le derme réticulaire en particulier), due à la réduction du nombre de fibroblastes et à leur capacité biosynthétique [64,136,137],
- la diminution des fibres élastiques (dans le derme papillaire en particulier) [138,139],
- la fragmentation/dégradation des GAGs [140].



*Figure 15: remodelage de la MEC dans la peau âgée non exposée aux Uvs [129]*

Dans la peau âgée, il est noté une augmentation de la densité de réticulation des collagènes fibrillaires, associée à une perte des fibres élastiques, des GAGs et des PGs [64]. Ainsi la structure de la MEC se trouve profondément modifiée : alors que dans le derme jeune les faisceaux de collagène sont ordonnés et étroitement serrés, avec un diamètre relativement uniforme en coupe transversale, avec l'âge les fibres de collagène deviennent moins nombreuses mais plus épaisses [137,141]. Les fibres de collagène forment des agrégats de fibres moins ondulées, augmentant la rigidité [64]. Il est aussi important de noter que le rapport de collagène III/collagène I est augmenté avec le vieillissement intrinsèque, avec une diminution irréversible de la teneur totale en collagène [142,143]. Cette diminution s'explique par la diminution de la synthèse et l'augmentation de l'activité des protéases [144].

Les fibres élastiques présentent aussi de nombreux changements lors du vieillissement intrinsèque ; une dégradation lente et irréversible associée à l'accumulation de fibres partiellement dégradée [133]. Les fibres élastiques plus fines du derme papillaire disparaissent [139]. Ces modifications expliquent en grande partie la perte de fonction l'élasticité de la peau avec l'âge [135].

Il est aussi important de noter que les interactions entre les fibres de collagène et le système élastique sont absentes dans la peau âgée [140]. Cette perte d'interactions pourrait expliquer la facilité à la déchirure entraînant des lacérations de la peau [145].

Au niveau des GAG, dans la peau humaine, c'est principalement l'acide hyaluronique qui diminue en fonction de l'âge, avec une perte de l'eau liée associée [140]. Ces variations des niveaux d'acide hyaluronique dans le derme pourraient jouer un rôle dans les modifications morphologiques de la peau âgée, telles que l'apparition des rides et la perte d'élasticité [140].

Plusieurs mécanismes/théories ont été proposés afin d'expliquer le vieillissement intrinsèque, que nous allons détailler ci-après.

- A. La théorie du vieillissement par les radicaux libres (ROS)
- B. La réticulation de glycosylation non enzymatique : la glycation
- C. La sénescence cellulaire et le raccourcissement des télomères.

### **II.A.1. La théorie des radicaux libres**

Cette théorie, proposée par Harman [146] en 1956, est encore appelée théorie mitochondriale du vieillissement, car c'est le site mitochondrial qui possède le *turnover* le plus élevé dans la cellule [147,148]. Les radicaux libres d'oxygène, y compris le radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le radical hydroxyle ( $\cdot OH^{\circ}$ ), ainsi que les dérivés non-radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) [149] sont englobés dans le terme générique de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). La présence d'un ou plusieurs électrons non appariés dans les orbitales extérieures rend ces espèces, en particulier l'espèce ( $\cdot OH^{\circ}$ ), extrêmement réactive [150].

Les ROS sont générés en continu lors de la dernière étape du processus visant à transformer l'ADP et le groupement phosphate en ATP dans la mitochondrie en consommant l'oxygène par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire [130,151,152]. Selon l'observation de Harman, une partie de l'oxygène consommé est réduite chimiquement dans les mitochondries par l'addition d'électrons célibataires, qui sont successivement convertis en ROS [147]. Les ROSs

en excès sont ainsi générés par les activités métabolisme oxydatives, qui entraînent des détériorations irréversibles des constituants et cellules de la MEC [153].

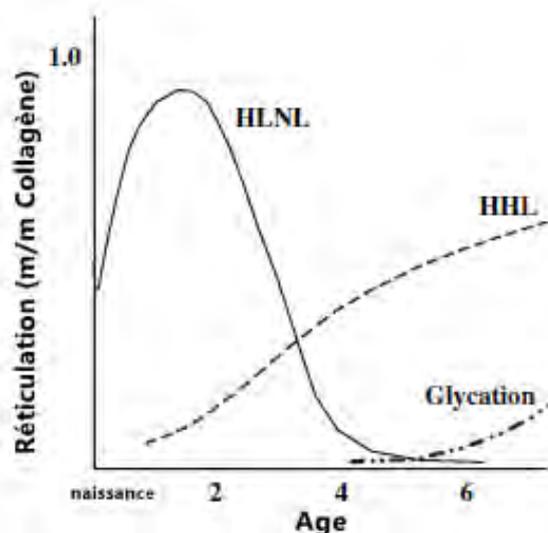
Dans l'organisme, il existe des antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques [154] permettant de neutraliser ces ROS. Cependant, la diminution de la production de ces antioxydants est observée à un rythme croissant avec l'âge [155,156]. Le déséquilibre entre oxydants et antioxydants exacerbe le vieillissement cellulaire [150,157]. Par ailleurs, les ROSs peuvent modifier et dégrader, de façon directe et indirecte (via les protéases), les composants de la matrice extracellulaire comme les collagènes, les protéoglycanes et l'acide hyaluronique [149]. *In vitro*, il a été montré que l'activation du facteur transcription AP-1 (protéine activatrice 1), conduit à l'expression des métalloprotéinases matricielles MMP-1 (collagénase), MMP3 (stromélysine 1) et MMP-9 (gélatinase) et empêche l'expression de procollagène du type I [158]. On retrouve *in vivo* une augmentation de l'activité des MMP-1 et MMP-9 responsables de la dégradation de la MEC dans la peau des personnes âgées [144]. Cette dégradation de la MEC par la voie indirecte des ROS conduit à l'accumulation des fragments de collagène qui est un signe primordial du vieillissement intrinsèque de la peau.

#### **II.A.2. La réticulation de glycosylation non enzymatique : la glycation**

La glycation est une réaction non enzymatique aboutissant aux produits de glycation avancés (AGE : *advanced glycation end-products*), des produits résultant de la liaison entre un ose tel que le glucose, le galactose ou le fructose et la fonction amine libre d'une protéine, le plus souvent une lysine ou une arginine [159]. Pour notre étude de vieillissement cutané, nous nous intéresserons à la glycation de la protéine majoritaire du derme : le collagène fibrillaire type I.

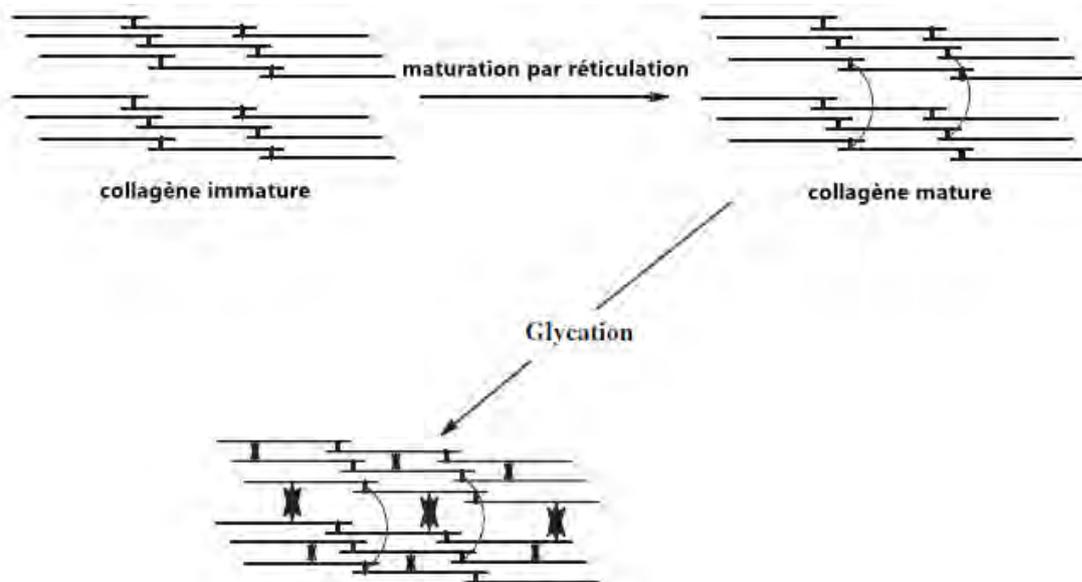
Le collagène est une protéine de longue durée de vie qui peut être modifiée par le processus naturel de glycation [160], ce qui joue un rôle majeur dans la modification des propriétés mécaniques du derme avec l'âge.

Comme illustré sur la Figure 16, ce processus de réticulation non enzymatique démarre beaucoup plus tard que le processus de réticulation enzymatique par la LOX détaillé dans le chapitre précédent.



*Figure 16 : profil de réticulation du collagène de la peau bovine en fonction de l'âge montrant l'augmentation de la HLNL avec la croissance et la conversion de ce dernier en HHL cours de la maturation, suivi par le processus de glycation [161]*

Ces processus de réticulation des collagènes dermiques avec l'âge sont schématisés sur la figure ci-dessous.



*Figure 17 : évolution des processus de réticulation du collagène avec l'âge [75]*

Comme schématisé sur la Figure 17, les sites de glycation, qui sont hautement conservés lors du vieillissement [162], se situent sur des molécules adjacentes et les pontages sont formés entre les domaines de triple hélice.

La figure ci-après, la première étape de glycation du collagène est une condensation de Maillard [91] impliquant la réaction d'un ose avec le groupe amine libre de la lysine ou de l'arginine pour former une base de Schiff, suivie d'un réarrangement moléculaire conduisant aux produits d'Amadori. Ces produits d'addition subissent alors des étapes d'oxydation ; des réticulations intermoléculaires vont alors se former par réaction entre les résidus lysines et arginines modifiées des molécules de collagène adjacentes.

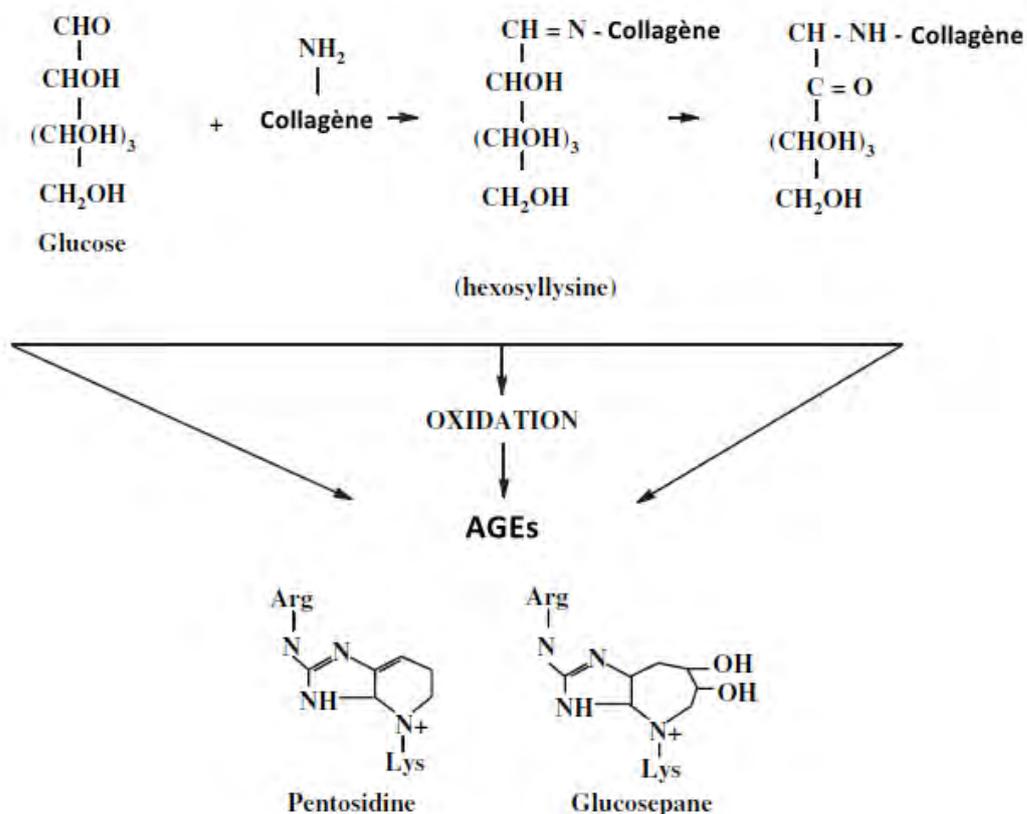


Figure 18: mécanisme de glycation du collagène – formation des AGEs [87]

Dans le collagène, les principaux AGE identifiés sont des réticulations lysine-arginine telles que la pentosidine et le glucosepane [38]. D'autres liaisons glyquées provenant de réactions entre les résidus modifiés lysine-lysine ont pu être identifiées dans le collagène, (cf. Tableau 4) mais ils ne sont présents qu'en quantité infime [163].

## Chapitre I. étude bibliographique

Réticulation	Nomenclature	Voies proposées
Lysyl-arginine	Pentosidine	Réarrangement d'oxydation des produits d'Amadori, 3-déoxyglucosone glycolaldéhyde et les pentoses
	Glucosepane	glyoxal, et glucose désoxyglucosone
Lysyl-lysine	GOLD, MOLD DOLD	interaction de deux résidus lysine avec deux molécules de glyoxal et le méthylglyoxal et désoxyglucosone
	Crosslines	Réticulations entre deux lysyl-NH <sub>2</sub> de deux formes stéréo-isomères différentes.
	Vesperlysine	Interaction de la lysine et de la dégradation par oxydation des produits de glucose

Tableau 4 : AGEs dans le collagène [163]

Parmi les nombreux AGEs présents dans l'organisme, le glucosepane est le seul pontage dont l'effet significatif sur les propriétés mécaniques des fibres de collagène *in vivo* a été démontré à ce jour [164]. En particulier, une densité de réticulation en excès, entraînant une diminution de la dissipation d'énergie lors de la déformation [97] rend les tissus collagéniques plus fragiles.

Le glucosepane s'accumule principalement dans la matrice extracellulaire de la peau âgée, atteignant un niveau de réticulation de 20% des molécules de collagène. Sa présence en quantité élevée peut contribuer à un certain nombre de dysfonctionnements de la matrice extracellulaire, tels que l'augmentation de la rigidité et de la charge de rupture, l'augmentation de la température de dénaturation, la diminution de la solubilité du collagène et la diminution de susceptibilité aux enzymes de dégradation au cours du vieillissement. [87,164,165].

Si la glycation affecte bien évidemment la fonctionnalité mécanique de la matrice extracellulaire, elle conduit aussi à l'inhibition de la réactivité des fibres de collagène avec les récepteurs cellulaires et les autres composants de la matrice. En particulier, la perte des résidus d'arginine spécifiques pourrait affecter la liaison au site Arg-Gly-Asp impliqué dans la reconnaissance des deux intégrines  $\alpha1\beta1$  et  $\alpha2\beta1$  qui forment une liaison physique entre les cellules et la matrice [75,166]. Ces interactions sont essentielles dans le développement, la cicatrisation et dans le maintien de l'intégrité tissulaire.

La pentosidine est quant à elle présente en faibles quantités dans la plupart des tissus ; correspondant à environ une réticulation pour 200 molécules de collagène, elle est susceptible d'avoir un effet significatif sur les propriétés physiques de la fibre collagénique [87].

L'inhibition des réactions de glycation pourrait réduire les effets néfastes du vieillissement [87]. Par exemple, le thé vert, l'ail et la carnosine sont des antioxydants chimiques ou naturels qui inhibent des réactions de glycation [167].

### **II.A.3. La théorie télomérique du vieillissement**

Hayflick a montré en 1965 que le nombre de divisions pour une cellule normale comme un fibroblaste diploïde était limitée *in vitro* [168]. Cette théorie a ensuite été proposée pour expliquer la perte de télomères par *Olovnikov* [169].

Les télomères, régions non codantes qui comprennent des répétitions de plus de 1000 fois la séquence TTAGGG chez les humains [170] ont pour fonction de protéger et de stabiliser le chromosome contre la dégradation et la détérioration de l'ADN [171]. Lorsque les télomères parviennent à une longueur critique, ils ne jouent plus leur rôle protecteur et provoquant la sénescence de la cellule, l'arrêt du cycle cellulaire et parfois l'apoptose [172]. Dans le derme, cette perte de télomères des fibroblastes entraîne l'accumulation de cellules sénescents qui remplacent les cellules saines et qui perdent leur capacité de prolifération et de synthèse de la MEC, ainsi que l'augmentation de l'expression de protéases de la MEC [128,141,173,174]. Cela explique la diminution de la cellularité du derme et par conséquent sa perte d'épaisseur [135].

### **II.B. Le vieillissement extrinsèque**

Dans la littérature, différents facteurs de vieillissement cutané extrinsèque sont reportés comme les ultraviolets de type A, le surpoids, le mode de vie (déséquilibre alimentaire, tabac, manque de sommeil), la pollution de l'air, etc. [141,151,175–180]. Cependant, l'un des facteurs essentiels du vieillissement extrinsèque concerne l'exposition aux UVs, encore appelé photo-vieillissement.

Le photo-vieillissement de la peau humaine est un processus cumulatif basé sur le degré d'exposition au soleil et le phototype de la peau.

L'exposition cumulative au soleil est le facteur extrinsèque le plus reconnu qui accélère le processus de vieillissement de la peau [181]. Approximativement 80 % du vieillissement extrinsèque de la peau est attribuable à l'exposition au soleil [182].

## II.B.1. Le rayonnement solaire

Le rayonnement solaire qui atteint la terre peut être divisé en cinq régions d'énergie et de longueur d'onde décroissante :

- les UVC, (100 - 280 nm)
- les UVB, (280-315 nm)
- les UVA, (315-400 nm)
- la lumière visible (400-760 nm)
- le rayonnement infrarouge (760nm-1mm).

Moins de 5% du rayonnement solaire qui atteint la surface de la terre est un rayonnement UV, qui constitue la composante la plus énergétique et donc la plus active à laquelle sont soumis les organismes vivants. Parmi ces rayonnements UVs, les UVC sont absorbés par la couche d'ozone dans la haute atmosphère de la Terre [183] et n'atteignent que très peu la surface de la terre. Les UVB constituent 2% du rayonnement UV auquel sont soumis les organismes et sont principalement absorbés par l'épiderme et le derme superficiel; les 98% restants sont les UVA, de plus faible énergie, mais qui pénètrent plus profondément dans le derme [184] et qui sont ainsi responsables de la majeure partie du photo-vieillessement du derme [184]. Il est à noter que la peau claire est plus fragile et sensible qui face à l'exposition aux UVs [153].

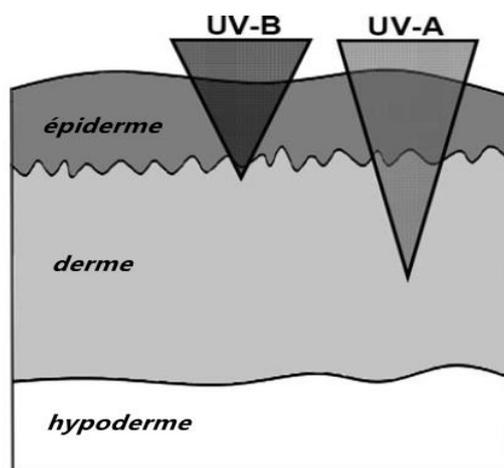


Figure 19 : pénétration du rayonnement UVA et UVB sur la peau humaine [185]

## II.B.2. Manifestations cliniques et évolution de la MEC

Les aspects différents du vieillissement intrinsèque et extrinsèque sont perceptibles lors d'un examen clinique.

La peau photovieillie se caractérise par une perte d'élasticité, une augmentation de la rugosité et de la sécheresse, une pigmentation irrégulière, une apparence cuirassée et la présence de rides profondes [186,187].

La figure ci-après illustre les effets couplés du vieillissement extrinsèque et lié à l'âge sur les principaux constituants du derme.

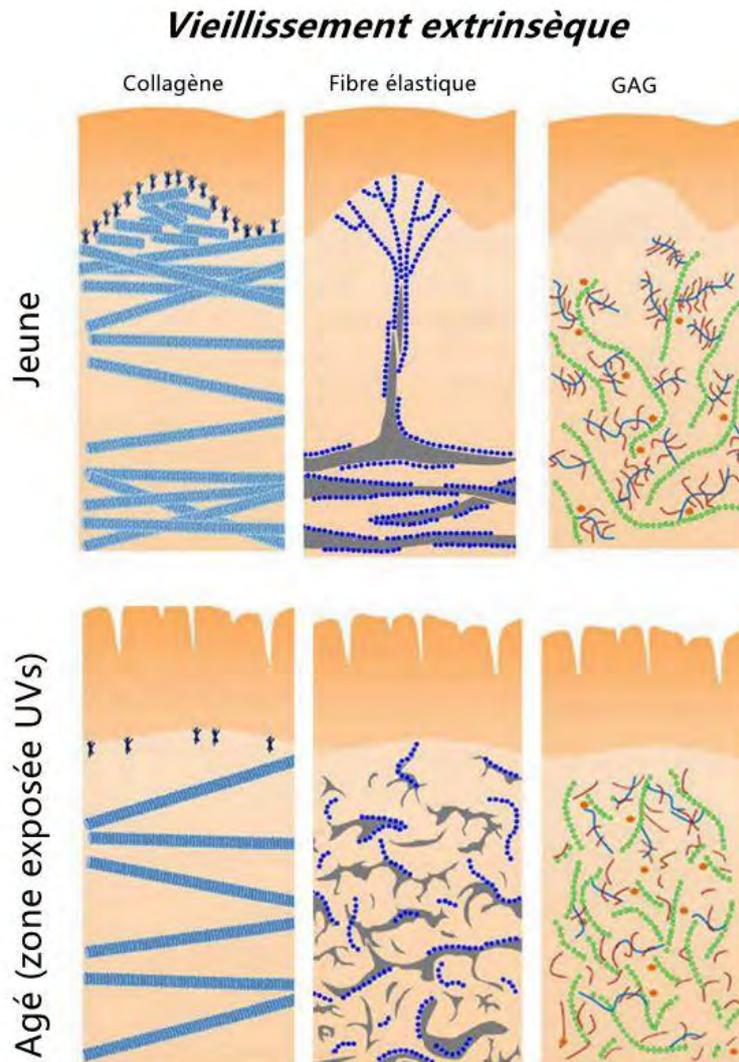


Figure 20 : remodelage de la MEC dans la peau âgée exposée aux UVs [129]

Ces changements morphologiques prédominent dans le derme superficiel et au niveau des zones photo-exposées. Ils s'accompagnent d'une redistribution des fluides dermiques qui se manifeste par l'apparition d'une bande hypo-échogène dans le derme superficiel appelée SENE (Sub Epidermic Non Echogenic Band).

### II.B.2.1. Evolution de la phase collagénique

La photo-exposition du derme atrophie par le vieillissement intrinsèque entraîne une accélération de la dégradation de collagènes [135,188], ainsi que la perte spécifique de collagène VII de la jonction dermo-épidermique [155,189]. Les fibres de collagène dans la peau photovieillie sont plus fragmentées, plus épaisses et plus solubles [133]. Cette altération morphologique est très différente de l'atrophie progressive des fibres collagéniques lors du vieillissement chronologique. *Varani et al.* ont montré que la synthèse de collagène était liée aux contraintes mécaniques [190]. La production de collagène est ainsi plus efficace dans les cellules sous tension mécanique élevée. La mauvaise adhérence des fibroblastes sur les fibres de collagène dégradé conduit à aggraver progressivement le photovieillissement [191].

Il est à noter que la synthèse de collagène dans la peau photovieillie semble rester similaire à celle des sites protégées du soleil [192]. La diminution plus sévère de la phase collagénique dans la peau photovieillie serait donc essentiellement due à une augmentation de sa dégradation.

La figure ci-après illustre les principales étapes de la dégradation structurale lors du vieillissement extrinsèque sous exposition UVs [193].

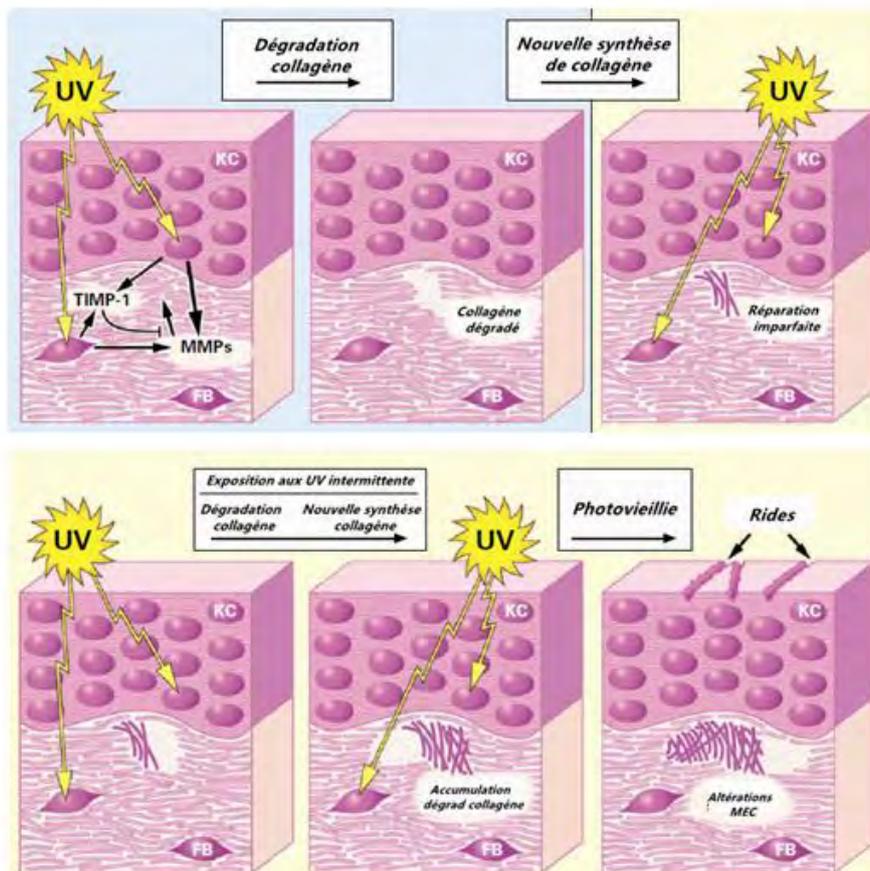


Figure 21 : détérioration dermique induite par irradiation UVs [193]

Comme détaillé sur la Figure 22, les UVs activent les MMP via deux voies principales : la détérioration de l'ADN (directe) ou bien par les ROS (indirecte).

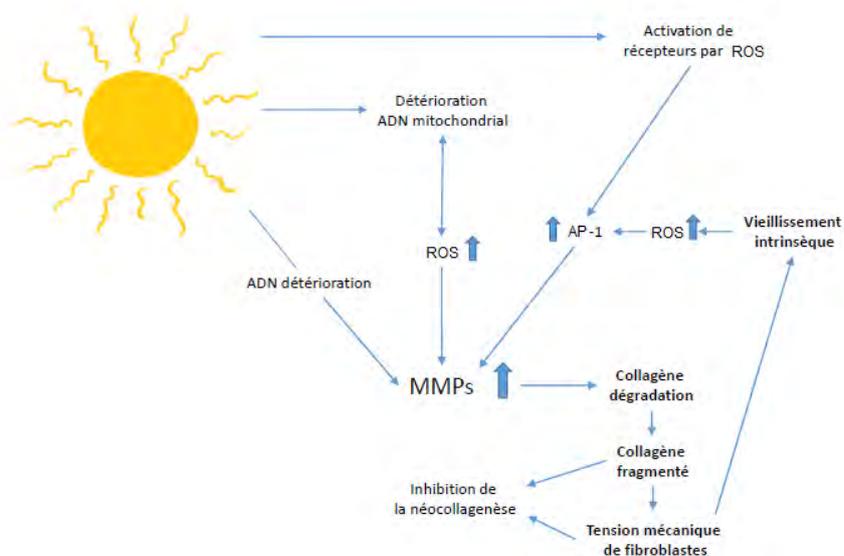


Figure 22 : schéma des voies de vieillissement extrinsèque[170]

Les UVA peuvent endommager l'ADN mitochondrial par la voie indirecte via les ROS. En revanche, les UVB peuvent réagir directement [194]. C'est la voie directe qui induit la surexpression des MMPs et initie la dégradation des fibres de collagène et en même temps régule négativement l'expression de TIMPs [153]. Ce processus n'existe pas lors du vieillissement intrinsèque.

Les ROS sont toujours générés majoritairement dans la mitochondrie comme pour le vieillissement intrinsèque.

L'activateur AP-1 transcriptionnel peut être également induit par l'irradiation d'UVs qui stimule ensuite la transcription de MMPs [153].

Enfin, il est à noter que les UVB (absorbés majoritairement par l'épiderme) peuvent altérer directement l'ADN cellulaire, provoquant une sénescence cellulaire avec un processus de vieillissement plus accéléré [185].

Les télomères peuvent être endommagés directement par irradiation UVs [152], en particulier les bases TT et G présentes en grand nombre dans les télomères [195]. La longueur des télomères dans les fibroblastes dermiques humains décroît avec le rayonnement UVs, et pourrait contribuer à un vieillissement précoce [196].

### II.B.2.2. Evolution de l'élastine

Il a été précédemment reporté une diminution de la quantité d'élastine dans la peau avec l'âge. En revanche, dans la peau photovieillie, la quantité d'élastine augmente en proportion de la quantité d'exposition au soleil [115]. Comme illustré sur la Figure 20, on retrouve dans la peau photovieillie une accumulation de fibres élastiques anormales, fragmentées, désorganisées, qui remplacent une partie de la phase collagénique [135,137,141].

Cette élastose solaire [115,197,198] est pratiquement indétectable dans la peau âgée non exposée [199]. *Bernstein et al.* suggère que ce mécanisme est dû à la fois à la synthèse et à la dégradation de l'élastine [135]. La stimulation de protéases par irradiation UV [197] serait en faveur de l'accélération de la dégradation d'élastine.

*Labat-Robert et al.* suggère que la dégradation du réseau de fibres élastiques est aussi due à la réponse des fibroblastes dermiques soumis eux-mêmes à un rayonnement UV aigu [200]. Cependant, il semble difficile de rendre compte seulement de l'accumulation du matériel amorphe élastique par la dégradation des fibres existantes. *Lavker et Kaidbey* ont suggéré un mécanisme de déposition de lysozyme induite par l'exposition UVs sur l'élastine qui formerait un complexe [201]. Le lysozyme sert à protéger les fibres contre une dégradation protéolytique. Cela pourrait expliquer, au moins en partie, l'accumulation massive de fibres

élastiques endommagées dans la peau endommagée par le soleil.

Les ROSs altèrent la transcription d'ARNm de tropoélastine par les fibroblastes dermiques humains. Cela pourrait expliquer que les ROS peuvent également contribuer au dépôt anormal d'élastine dans la peau photovieillie [202]. La littérature suggère que le matériel élastique produit est clairement dysfonctionnel et contribue grandement à la formation de la masse amorphe typique du derme photovieilli. [128,203].

### **II.B.2.3. Evolution des GAGs**

Au contraire du vieillissement intrinsèque, la quantité de GAGs (et en particulier l'HA) est accrue dans la peau sous exposition UVA et UVB [204–206].

Cette augmentation de la teneur en GAG semble incohérente avec l'aspect de la peau photovieillie, très distincte de celle du nouveau-né riche aussi en GAGs [207]. *Bernstein et al.* affirment que l'emplacement anormal de GAGs dans la peau lors du photovieillissement pourrait expliquer paradoxalement l'aspect papyracé sur la peau photovieillie [206]. Les GAGs de la peau photovieillie sont anormalement déposés sur un matériau élastique, au contraire de la dispersion homogène de la peau jeune [133]. L'augmentation des glycosaminoglycanes dans la peau photovieillie pourrait s'expliquer par le dépôt de versicane sur les fibres anormales élastotiques [208,209]. Le versicane étant un PG qui se lie avec les GAGs dans la peau, sa présence pourrait expliquer l'augmentation de l'acide hyaluronique.

### **II.C. Vieillissement intrinsèque/extrinsèque**

En résumé, le vieillissement chronologique de la peau peut donc se concevoir comme l'atrophie structurale irréversible et le déclin fonctionnel de la peau en fonction de l'âge. Le tableau ci-après récapitule les effets généraux du vieillissement intrinsèque sur les cellules et la MEC du derme [135,141,170].

## Chapitre I. étude bibliographique

---

Composants du derme	Effets du vieillissement intrinsèque
Fibroblastes	↓prolifération, ↓MEC production
MEC	↓épaisseur, ↑rigidité, ↓fibres collagène, ↓fibres élastique, ↑laxité, ↑rides et ↑désorganisation structurale

---

*Tableau 5 : évolutions majeures avec le vieillissement intrinsèque*

La photo-exposition joue un rôle considérable dans le processus de vieillissement cutané. Couplée avec le vieillissement chronique, l'exposition aux UVs accélère surtout le processus du vieillissement cutané [210].

---

Composants du derme	Effets du vieillissement extrinsèque
Fibroblaste	↓prolifération, ↓MEC production
Matrice dermique	↓épaisseur, ↑rigidité, ↓fibres collagène, ↑fibres élastique, ↑GAGs, ↑laxité, ↑rides, ↑jaunissement et ↑désorganisation structurale

---

*Tableau 6 : évolutions majeures avec le vieillissement extrinsèque*

### III. Techniques de caractérisation de la peau et des protéines de la MEC

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, de nombreux mécanismes moléculaires sont à l'œuvre lors des vieillissements intrinsèque et extrinsèque, entraînant en particulier une évolution des constituants majeurs du derme et son organisation hydrique [128,211,212]. L'évolution des caractéristiques physico-chimiques de la peau au cours du vieillissement est ainsi à l'origine de modifications de son comportement mécanique, thermique, diélectrique et vibrationnel. Nous présentons ici les principales études de caractérisation menées sur la peau et ses macromolécules majeures. La caractérisation d'autres types de tissus conjonctifs par ces techniques est aussi reportée, afin d'en dégager la potentialité pour une application ultérieure à la peau et au derme.

#### III.A. Analyses biophysiques

##### III.A.1. Comportement mécanique

L'analyse mécanique est largement employée dans le domaine biomédical et plus particulièrement dans l'ingénierie des biomatériaux [213,214], en particulier grâce à l'adaptation de techniques de mesure développées initialement pour la caractérisation de matériaux. Il est important de noter que l'influence de l'environnement hydrique joue un rôle capital [215].

##### III.A.1.1. Caractérisation mécanique *in vivo*

De manière générale, la caractérisation mécanique de la peau *in vivo* présente un avantage majeur de pertinence biologique et de très nombreuses études lui ont été dédiées.

Même si chaque composant de la peau a un comportement mécanique bien spécifique, la peau est très souvent considérée comme un matériau homogène, et comme nous l'avons abordé précédemment, les propriétés mécaniques de la peau sont en très grande partie gouvernée par le derme [99,216,217].

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont été menées afin de déterminer les propriétés mécaniques du derme [218–220], en particulier grâce à l'adaptation de techniques de mesure développées pour la caractérisation de matériaux basées sur la torsion, l'indentation, la lévarométrie, la ballistométrie, la succion (cutométrie), l'extensométrie [216].

L'un des paramètres les plus caractéristiques de la peau et du derme est son module de Young. La peau est un matériau hautement anisotrope et le module de Young dans le sens de

l'épaisseur peut varier de de 0,005 à 0,1 MPa par les tests d'indentation (selon la géométrie de l'indentomètre, les conditions du test (statique ou dynamique)) ; il varie selon les études de 0,025 à quelques dizaines de de MPa par des tests de succion et de torsion (peaux humaines et animales, toutes zones confondues) [218]. Nous avons compilé dans le tableau suivant les données reportées par *Diridilou et al.*[221], incrémentées des études publiées depuis sur l'évolution avec l'âge du module d'élasticité de la peau de l'avant-bras chez l'humain.

Module de Young (MPa)	Evolution avec l'âge	site	technique	référence
18-57	Augmentation de 20 à 70 ans	Avant-bras	succion	Grahame 1969 [222]
0,11-0,02	Diminution de 6 à 60 ans	Avant-bras postérieur	torsion	Sander 1973 [223]
0,42 0,85	Avant 40 ans Après 40 ans	Avant-bras postérieur	torsion	Agache 1980 [224]
1,1-1,32	Augmentation brusque après 65 ans	Avant-bras antérieur	torsion	Escoffier 1989 [225]
0,15 0,25	Avant 25 ans Après 60 ans	Avant-bras	succion	Barel 1998 [226]
0,08-0,26	De 6 mois à 90 ans	Avant-bras antérieur	succion	Diridollou 2001 [221]
0,0107 0,007	18-30 ans 51-70 ans	Avant-bras	Indentation dynamique	Boyer 2009 [227]
0,013-0,0145 0,006-0,008	23,2±1,6 ans 60,4±2,4 ans	Avant-bras	Flux d'air sans contact	Boyer 2012 [228]

*Tableau 7 : évolution du module d'élasticité de la peau par différentes techniques*

Comme nous pouvons le constater, ces différentes techniques peuvent conduire à une grande variabilité de résultats selon la sonde utilisée, l'échelle de mesure et les conditions de l'essai [229].

Il est aussi intéressant de travailler sur les valeurs relatives (composante élastique / composante visqueuse). *Luebbarding et al.* [230] ont vérifié par cutométrie la diminution de la composante élastique de la peau avec le vieillissement sur un large panel d'individus, avec une différence de comportement liée au sexe : avec l'âge, la peau des femmes devient moins

extensible, mais a une meilleure capacité à la recouvrance après étirement que la peau des hommes. Il est maintenant bien acquis que la peau mature est moins élastique et plus relâchée que la peau jeune, les modifications de la structure du derme présentant ici un rôle prépondérant. Concernant le photovieillissement, des tests de résilience *in vivo* sur des peaux de rats photoexposés ou non ont mis en évidence une forte corrélation entre les paramètres de résilience, le volume de rides et la destruction des fibres de collagène [231]. Le développement de nouvelles techniques permettent des analyses *in vivo* plus locales, en particulier par indentation statique localisée [232,233] (permettant d'obtenir les valeurs des modules Young des différents compartiments de la peau), par indentation dynamique [232,233] (permettant d'accéder aux composantes élastiques et visqueuses) et par tribologie [232,233] (permettant d'accéder aux différents paramètres de friction, à l'échelle locale). Enfin l'élastographie [216,234] est une méthode quantitative pour la mesure ou l'imagerie de propriétés biomécaniques de la peau à une résolution micrométrique, cellulaire ou encore moléculaire [234,235].

### III.A.1.2. Caractérisation mécanique *in vitro*

Les études *in vitro* ne doivent pas être négligées car elles permettent d'obtenir des caractéristiques inatteignables par contrôle non destructif.

L'un des tests les plus utilisés *in vitro* est le test de traction, permettant d'obtenir les différents régimes de déformation du derme et d'en déterminer les caractéristiques mécaniques essentielles, dans les zones d'élasticité linéaire et non linéaire [216,236,237]. L'une des études pionnières *in vitro* reliant la structure à la fonction mécanique du derme lors du vieillissement a été menée par *Daly et al.* [236] en 1977. Par la suite, les tests de contrainte-déformation effectués sur des échantillons de derme abdominal et thoracique humain, sur l'élastine et le collagène [98,237] ont permis de montrer que la viscoélasticité du derme humain était conditionnée par ces macromolécules constitutives majeures dont les interactions sont assurées par des liaisons hydrogène. Le stockage de l'énergie élastique serait localisé dans les séquences flexibles du collagène et de l'élastine, alors que les séquences plus rigides aideraient au transfert dans l'ensemble de la molécule. Une compilation récente des données de la littérature [218] reporte que les valeurs des modules d'élasticité de la peau ou du derme *in vitro* varient généralement de 4 à 15 MPa à faible vitesse de déformation, augmentant à plus forte vitesse, démontrant ainsi son caractère viscoélastique. Par contre le rôle de l'hydratation, qui joue un rôle essentiel dans les propriétés mécaniques, n'est en général pas considéré dans ces études.

L'analyse mécanique dynamique, largement utilisée dans le domaine des matériaux et

biomatériaux [214], est une technique de choix pour accéder au comportement rhéologique du derme ou de ces constituants dans le domaine fréquentiel.

Les propriétés mécaniques des macromolécules constitutives de la peau comme l'élastine ont été mises en évidence grâce à la manifestation mécanique de la transition vitreuse : une diminution du module conservatif et une augmentation du module de perte sont observées [238,239] avec l'hydratation, et il est possible de prévoir le comportement mécanique de la protéine sur de larges gammes de température, de fréquence de sollicitation et d'hydratation [240]. La manifestation mécanique de la transition vitreuse du collagène est aussi détectable, et comme dans le cas de l'élastine, elle est fonction de l'hydratation [241]. Un autre phénomène mécanique observable est le phénomène de rétrécissement du collagène (shrinkage) [242]. Ce phénomène de contraction des fibres collagéniques le long de l'axe longitudinal est observé de manière concomitante à la dénaturation [44,243]. Un décalage en température est parfois constaté entre les deux événements, diminuant avec le degré de réticulation de la protéine. Ce rétrécissement, qui n'est pas observé dans le cas du collagène non réticulé, est une cause directe de l'effondrement de la structure hélicoïdale rigide [244]. L'analyse mécanique dynamique du derme bovin [245] natif ou différemment digéré menée en conditions physiologiques a montré qu'une déstabilisation des réseaux d'élastine et de collagène par appauvrissement en protéines interfibrillaires (protéoglycanes et glycosaminoglycanes) modifiait significativement les propriétés viscoélastiques du derme et que l'organisation de ces protéines était par conséquent indispensable au maintien des propriétés mécaniques du derme.

Les tests oscillatoires à faible amplitude et les tests de fluage sur des biopsies de derme humain [246] effectués également à la température physiologique se confrontent eux aussi à la difficulté de maintenir un taux d'hydratation pertinent sur le plan physiologique.

Enfin, les études de nanomécanique *in vitro* [247], en particulier grâce à l'utilisation de l'AFM en mode statique ou dynamique [229,248], se développent également, permettant d'accéder à des caractéristiques mécaniques et topographiques locales ; on note non seulement une modification des propriétés mécaniques de la MEC, mais aussi de la composante cellulaire du derme ; *Schulze et al.* [249] ont ainsi montré que les fibroblastes dermiques se rigidifiaient avec l'âge.

### III.A.2. Comportement thermodynamique

Les propriétés thermiques de la matière sont intimement reliées à sa structure physique et chimique. Parmi les techniques d'analyse thermique, l'Analyse Calorimétrique Diatherme (ACD) est une technique largement utilisée en routine pour la caractérisation des matériaux

et protéines. Elle constitue ainsi une technique de choix pour à l'analyse du comportement thermodynamique *in vitro* des tissus biologiques [250], comme en témoignent différentes thèses de l'équipe de Physique des Polymères [41–44,104].

Combinée avec l'analyse thermogravimétrique (ATG), l'ACD est une méthode standard pour quantifier l'eau cristallisable et l'eau non cristallisable [251–255] présente dans les tissus. L'ACD est également une méthode appropriée pour évaluer la stabilité thermique des protéines, les changements conformationnels et pour confirmer la nature réversible/irréversible des transitions thermiques [256]. L'étude calorimétrique permet un découplage simple des réponses thermiques du collagène et de l'élastine, constituant une méthode pertinente pour un suivi en routine de leur évolution sous l'effet de facteurs physiologiques ou/et pathologiques [257,258]. Dans le cas de l'élastine, seul un phénomène de transition vitreuse est observé sur toute la gamme de température, fortement dépendant du taux d'hydratation de la protéine. L'élastine ne possède pas d'ordre à longue distance et bien que différentes structures secondaires coexistent au sein de la protéine, elle peut être considérée amorphe du point de vue de sa structure physique. Ces résultats illustrent parfaitement le modèle de Tamburro décrit précédemment [259] basé sur la présence de tours  $\beta$  labiles et dynamiques dans les domaines hydrophobes et le modèle de *Dagget* [260] décrivant les domaines hydrophobes de l'élastine comme des structures amorphes compactes. Il est à noter que des expériences de vieillissement physique mettent en évidence la formation de liaisons physiques de type liaisons hydrogène dans l'élastine, comme dans un polymère synthétique classique [43].

Les propriétés thermiques des collagènes fibrillaires sont le reflet de leur structure : il n'est pas détecté de transition vitreuse, associée à la phase amorphe, par calorimétrie. En revanche, l'existence d'un phénomène de dénaturation pour les collagènes fibrillaires est à relier à l'existence de structures secondaires continues, et les paramètres de dénaturation peuvent être utilisés pour vérifier l'intégrité du collagène et pour évaluer sa stabilité thermique [258]. L'ACD est ainsi particulièrement bien adaptée pour évaluer la stabilité thermique de collagènes purifiés en solution ou sous leur forme agrégée [261], ou directement dans les tissus natifs [257,261–268] et biomatériaux [257,263,264]. Elle a été appliquée avec succès pour caractériser le collagène à la fois dans le derme animal [269–271] ou humain [272–274]. L'évolution des transitions thermiques du collagène de peau de rats [271] en fonction de l'âge a montré la capacité de cette technique pour extraire des marqueurs du vieillissement intrinsèque. Cependant, peu de données thermiques sont disponibles sur le derme humain, en dépit de la capacité de la technique ACD à mettre en évidence l'évolution des principales protéines du derme sous facteurs physiques ou pathologiques, tels que l'altération du collagène dans le derme humain irradié [274], une

stabilité accrue de collagène avec la glycation induite par le diabète [269] ou la modification du collagène I/III dans les cicatrices et chéloïdes [275].

### III.A.3. Comportement diélectrique

Parmi les techniques diélectriques, une littérature abondante [276–279] montre clairement que la spectroscopie diélectrique dynamique (SDD) fournit des informations directes sur la dynamique orientationnelle des dipôles moléculaires, tels que le moment dipolaire complet des protéines ou les dipôles des groupes latéraux polaires ou des groupes peptidiques ; l'eau possédant une permittivité diélectrique importante et une forte dispersion dans certaines gammes de fréquence, sa signature diélectrique qui évolue suivant ses états est aussi très étudiée [277,280]. Les contributions basse fréquence (typiquement autour et en dessous de 10MHz) sont essentiellement causées par les protéines tandis que les contributions haute fréquence résultent de l'orientation des molécules d'eau [277]. La relaxation associée à l'eau « en masse », appelée aussi « eau libre » est généralement observée entre 20 et 10 GHz [281] alors que la relaxation associée à l'eau liée aux protéines est généralement observée autour de 100 MHz [282–285].

D'un point de vue diélectrique, la peau peut être assimilée à un matériau hétérogène multicouche contenant des composants dispersifs ou pas selon la gamme de fréquence considérée [286].

Ainsi une instrumentation non invasive utilisant le principe de réflectométrie à haute fréquence [287,288], a été développée pour déterminer *in vivo* l'hydratation des différentes couches de la peau via la mesure de sa permittivité diélectrique, et a permis dans certains cas de conclure à une modification des propriétés diélectriques de la peau ou du derme avec l'irradiation en radiothérapie [287,289], avec les brûlures [290] ou avec le pourcentage de glucose [291]. Dans la gamme des très hautes fréquences (>75 GHz), une modélisation diélectrique fine des différents compartiments (SC, épiderme, derme) de la peau a été effectuée par *Feldman et al.* [286]; couplés à des mesures *in vivo*, ces résultats ont montré que dans cette gamme de fréquence la bioimpédance de la peau dépendait essentiellement de l'état du système de transpiration.

A plus basse fréquence, les appareils commerciaux comme le cornéomètre utilisent la différence de permittivité de l'eau et des autres composants, pour estimer l'hydratation du SC *in vivo* via une mesure de capacité [292].

Dans la gamme des plus basses fréquences (<10MHz), la spectroscopie diélectrique dynamique permet d'explorer les différentes échelles de mobilité moléculaire des protéines

de la MEC, de même que l'analyse mécanique dynamique, avec une échelle de fréquence accessible est plus importante. Compte-tenu de la technologie utilisée, dans ce cas les mesures sont effectuées essentiellement *in vitro*. Initiées par *Bone, Pethig et Maeda* [43,293,294] l'étude du collagène sous différentes conditions d'hydratation a permis de révéler ses modes de relaxation secondaires localisés et ses modes de relaxation principaux, et d'associer cette dynamique particulière à sa structure et son réseau de liaisons hydrogène [43,295,296]. La comparaison avec les relaxations diélectriques de polyamides et protéines en hélice  $\alpha$  (kératine) [297] ainsi que les relaxations mécaniques de collagènes [298] ont permis d'associer sans ambiguïté la relaxation principale du collagène observée en spectroscopie diélectrique à la manifestation diélectrique de la transition vitreuse, indétectable en calorimétrie diatherme. La spectroscopie diélectrique a aussi montré sa capacité à suivre le phénomène de dénaturation du collagène [270]. Dans le cas de l'élastine, les relaxations dipolaires localisées et délocalisées ont aussi pu être mises en évidence par spectroscopie diélectrique [43,295,296,299], avec en particulier la signature diélectrique de la transition vitreuse de cette protéine amorphe. Le rôle crucial joué par l'eau dans la fonctionnalité de l'élastine a aussi été examiné avec attention, et il a été vérifié que les mouvements localisés de l'élastine (échelle nanométrique), indécélables par calorimétrie, sont asservis par la dynamique locale de l'eau de la couche d'hydratation [44,253], comme c'est le cas pour les protéines globulaires.

Enfin, la technique des courants thermostimulés a été particulièrement développée au sein de l'équipe de Physique des Polymères pour l'étude des protéines de la MEC, d'analogues polypeptidiques et des tissus biologiques [41–45,104]. De très basse fréquence équivalente ( $\approx 10^{-3}$  Hz), elle permet une haute résolution des phénomènes de relaxation avec un découplage des phénomènes de conductivité parasites, dans une zone en température très éloignée des phénomènes de dégradation. Elle a permis en particulier de suivre l'évolution de la mobilité moléculaire de collagène extrait de peaux de rats lors du vieillissement [41,42] et d'évaluer les effets d'un traitement par le tocophérol [42] ou les effets d'un rayonnement ionisant [42]. La décroissance des interactions eau/collagène au cours du vieillissement [300] est mise en évidence par cette technique diélectrique.

La restriction de la propagation coopérative à la transition vitreuse lors du clivage protéolytique de l'élastine native a pu être évaluée, amenant à une détection de l'effet de différentes élastases sur le réseau d'élastine dès les très faibles taux d'élastolyse [301].

Il est important de noter que cette technique a été employée avec succès pour suivre la mobilité moléculaire de l'élastine et du collagène dans leur contexte tissulaire (en particulier dans les tissus cardiovasculaires ou les tissus modèles riche en collagène comme le tendon

ou riche en élastine comme le ligament) [43,44]. Elle a permis de mettre en évidence les dynamiques moléculaires spécifiques à chacune des protéines et celles résultant de leur couplage, permettant de préciser plus finement l'évolution de la phase amorphe avec les facteurs pathologiques ou chimiques [302,303], ou encore de sonder les perturbations de l'environnement local avec ces mêmes facteurs.

### III.B. Analyses physicochimiques

Les spectroscopies Infra-Rouge et Raman sont parmi les techniques les plus utilisées dans les sciences naturelles. Ceci est dû au fait que la spectroscopie vibratoire peut être appliquée pour des échantillons de faible masse que les mesures sont rapides, de l'ordre de la minute [304].

Si les spectres de diffusion Raman fournissent des informations similaires à celles obtenues par les spectres d'absorption Infra-Rouge, ces deux techniques vibratoires présentent des avantages et des inconvénients caractéristiques dans les applications biomédicales en raison de leurs différents mécanismes et règles de sélection. Dans le cas de la peau, les mesures Infra-Rouge *in vivo* sont exclusivement menées sur le *stratum corneum*, alors qu'il est possible de sonder le derme *in vivo* avec la spectroscopie Raman.

Dans le cas de la spectroscopie Infra-Rouge, l'inconvénient majeur est associé à l'eau contenue dans les tissus biologiques. En effet l'eau possède un mode d'absorption très intense autour de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , dans la zone spectrale d'intérêt des protéines [305,306]. Des traitements mathématiques de sur-résolution des spectres doivent alors être utilisés. Dans le cas de la spectroscopie Raman, l'eau est un inconvénient plus mineur.

Dans le cas de la spectroscopie Raman, le principal inconvénient provient de la possible dénaturation thermique de l'échantillon biologique lors de l'irradiation laser [307].

#### III.B.1. Caractérisation de la MEC et des protéines par spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les techniques de spectroscopie IRTF sont relativement simples à mettre en œuvre, reproductibles et non destructives pour les tissus biologiques [308,309]. Ces techniques fournissent des informations à l'échelle moléculaire permettant d'étudier les groupes fonctionnels, les types de liaison et les conformations moléculaires [310,311] à l'origine des différentes structures secondaires des protéines, ainsi que l'influence de l'environnement.

Un large éventail de tissus biologiques et de protéines a été étudié par IRTF. Ces études incluent la peau, majoritairement le *stratum corneum* [312–321] mais aussi le derme

[322,323], les fibroblastes [324,325], les tissus cardio-vasculaires [326–331], les collagènes [332–339], l'élastine [107,340,341], les GAGs [342–345] et les lipoprotéines [346–348]. L'utilisation des spectroscopies Infra-Rouge amène des informations complémentaires sur la signature de chacun des composants dans la MEC, sur leur proportion et sur la nature des différentes structures secondaires des protéines dans les tissus [271,310,326,349], ainsi que sur leur hydratation [313].

Nous avons compilé dans le tableau suivant les principales données reportées dans la littérature pour quantifier les différents composés de la MEC et qui pourront être utilisés dans notre étude.

Aire et rapports d'aire	Bande/Zone	Référence
Lipides/protéines	$u_{as}(CH_2)+u_s(CH_2)/amide\ I + II$	Staniszewska [271]
Lipides insaturés	$u(=CH)/u_{as}(CH_2)+u_s(CH_2)$	
Lipides branchés	$u_{as}(CH_3)/u_{as}(CH_2)+u_s(CH_2)$	
Désordre des chaînes lipidiques	$u_{as}(CH_2)/u_s(CH_2)$	
Lipides/protéines	Lipides (3000–2800 $cm^{-1}$ ) /protéines (1700–1600 $cm^{-1}$ )	Wang [350]
Collagène	1338 $cm^{-1}$ 1284 $cm^{-1}$ 1240 $cm^{-1}$ 1204 $cm^{-1}$	Gough [330] Liu [351]
Protéines	(1583–1477 $cm^{-1}$ )	Zohdi [331]
Lipides	(1477–1350 $cm^{-1}$ )	
Carbohydrates	(1060–1000 $cm^{-1}$ )	

*Tableau 8 : principales données de la littérature pour quantifier les différents composés de la MEC*

Récemment, *Eklouh-Molinier et al.* [323] ont montré que les PGs pourraient affecter non seulement la structure mais aussi l'orientation des fibres de collagène dans la peau jeune. Avec l'âge, l'interaction PG-collagène est altérée et conduit par conséquent à une diminution de l'hydratation des fibres de collagène. Ils ont également mis en évidence de façon quantitative la diminution du compartiment dermique papillaire avec le vieillissement intrinsèque.

*Miyamae et al.* [322] mettent en évidence par spectroscopie dans le proche Infra-Rouge une réduction de la quantité totale de protéines avec le photovieillissement; des marqueurs

quantitatifs permettent de suivre leur altération dans ce cas. Cependant, le lien avec l'hydratation n'a pas été montré.

### III.B.2. Caractérisation de la MEC et des protéines par spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique de mesure récente utilisée pour étudier les matériaux biologiques, y compris les tissus humains [352]. L'indexation spectrale fournit des informations sur la structure à l'échelle moléculaire et permet de quantifier des modifications tissulaires dues aux différents processus biologiques [353]. La technique est considérée comme non invasive et peut être utilisée pour des mesures *in vivo* et/ou *in vitro* [354,355]. De nombreux tissus biologiques ont déjà été étudiés par la spectroscopie Raman, et en particulier la peau [356–361].

*Barry et al.* [314] ont combiné les spectroscopies IRTF et Raman pour analyser le *stratum corneum*, mettant en évidence plusieurs avantages de la spectroscopie Raman par rapport à la spectroscopie IRTF. La nature moléculaire et conformationnelle de la peau humaine, et les modifications induites par des traitements médicamenteux ou chimiques, peuvent être évaluées par spectroscopie Raman.

*Gniadecka et al.* ont montré que la quantité totale d'eau dans la peau photo-exposée était plus élevée que dans la peau photo-protégée d'environ 30% [362]. Ils ont aussi relevé que les interactions eau–protéines étaient plus faibles dans la peau photo-exposée ou âgée. La présence d'eau non liée aux protéines est mise en évidence dans la peau par une augmentation de la bande à  $180\text{ cm}^{-1}$  dans le spectre Raman [363] du derme photo-exposé.

Des mesures de spectroscopie Raman sur le collagène et le derme porcin en atmosphère humide [364] ont montré que la stabilisation du collagène est assurée par les liaisons hydrogène entre les groupes carbonyle des résidus proline et hydroxyproline et les molécules d'eau. Il est possible de déterminer la teneur en eau liée au collagène par la bande à  $938\text{ cm}^{-1}$ .

*Nakagawa et al.* [365] ont sondé des couches plus profondes de la peau ( $175\text{ }\mu\text{m}$ ) chez l'humain *in vivo*. Par cette méthode, ils ont observé que la teneur en eau totale de la peau augmente généralement avec l'âge; des variations importantes au cours de la journée sont aussi observées pour un même individu.



---

## *Chapitre II*

---



## Chapitre II. Choix et apport des techniques pour la caractérisation biophysique de la peau humaine – validation des protocoles

### I. Adaptation des techniques pour l'étude des biopsies cutanées hydratées et lyophilisées – obtention des signatures vibrationnelles, thermiques et diélectriques de la peau

Si les biopsies cutanées sont utilisées en routine pour des mesures histologiques *in vitro*, peu d'études biophysiques ont été entreprises jusqu'à présent sur de tels échantillons. Le premier objectif de ce travail de thèse est ainsi de valider l'utilisation combinée des techniques IRTF, ACD et CTS pour obtenir des données reproductibles à partir de ces échantillons de faible taille et pour établir un protocole de routine afin d'étudier un grand nombre d'échantillons.

#### I.A. Explants de peau abdominale

Les explants de peau abdominale (surface moyenne de 0,5 cm<sup>2</sup>) sont prélevés chez des patientes de type Caucasiennes respectivement âgées de 43, 46 et 64 ans opérées pour une abdominoplastie. Ces échantillons sont fournis par la société *Biopredic*. Après rinçage dans une solution de PBS (tampon phosphate salin) et retrait de l'hypoderme, ces explants sont cryoconservés à -80°C aux laboratoires Pierre Fabre. Ils sont ensuite transférés au CIRIMAT et conservés à -20°C. L'équipe de *Bujan et al.* ayant montré que la proportion de cellules endommagées était plus faible dans les tissus biologiques (tissus cardiovasculaires en particulier) cryoconservés et décongelés progressivement par rapport aux échantillons décongelés rapidement [366,367], nous avons procédé à une décongélation par paliers des explants, à savoir :

- un palier à 5°C pendant 24h,
- Un palier à 20°C pendant 10 min.

5 à 8 biopsies de 4 mm de diamètre sont prélevées à partir de ces explants à l'aide d'un punch à biopsie comme illustré dans les figures suivantes. Ces biopsies seront analysées à l'état hydraté ou après une lyophilisation de 60 min.

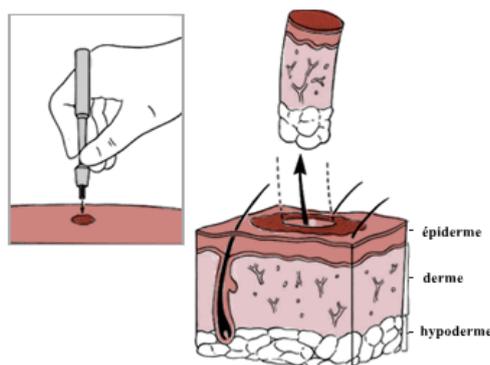


Figure 23 : prélèvement de biopsies à l'aide du punch à biopsie cutanée



Figure 24 : explant de peau et du prélèvement de la biopsie (la prise s'est faite au laboratoire PF)

Les valeurs quantitatives sont indiquées par la moyenne accompagnée de l'erreur standard. En statistique, nous avons pratiqué l'analyse unidirectionnelle de la variance (*one-way ANOVA*) pour comparer les moyennes des échantillons. La valeur « p » a également été utilisée pour déterminer la différence significative entre les groupes. Le seuil de significativité a été choisi pour les valeurs de  $p < 0,05$ .

### **I.B. Réponse vibrationnelle du derme humain par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)**

En spectroscopie IRTF en mode ATR (Réflexion totale atténuée), les tissus biologiques peuvent être analysés directement sans aucune autre préparation préalable, ce qui représente un avantage indéniable par rapport aux autres modes de mesure. Cette technique est largement utilisée pour étudier *in vivo* ou *in vitro* la couche externe de la peau humaine, à savoir la couche cornée [312,316–321], mais peu de données sont disponibles sur le derme, ce qui justifie cette étude.

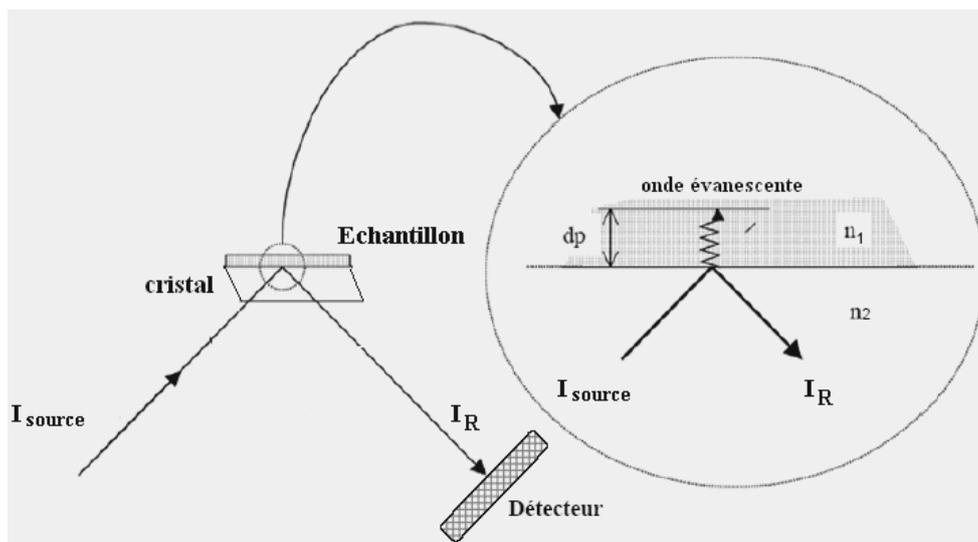


Figure 25 : fonctionnement de l'appareil IRTF-ATR

Le spectromètre utilisé est un Nicolet 5700 IRTF (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, MA) équipé d'un module ATR avec un diviseur de faisceau KBr et un détecteur MCT/B. Les échantillons sont directement déposés sur l'accessoire ATR (Smart Orbit équipé d'un cristal de diamant de type IIA, d'indice de réfraction 2,4). Ils peuvent être recouverts d'une capsule hermétique avec un joint de silicone spécialement conçue au laboratoire (cf. Figure 26).



Figure 26 : capsule hermétique

Dans le cas de la réflexion totale atténuée, la profondeur de pénétration  $dp$  de l'onde évanescente peut être estimée grâce à la formule suivante [312] :

$$dp = \left[ 2\pi\nu n_1 \sqrt{(\sin^2\theta - n_{2,1}^2)} \right]^{-1} \quad (1)$$

Avec  $n_1$  l'indice du cristal ATR,  $n_2$  l'indice du milieu,  $\nu$  la longueur d'onde et  $\theta$  l'angle d'incidence.

En considérant que l'indice de réfraction des biopsies hydratées est approximativement  $n_2 \sim 1,333$ , que la radiation incidente  $\nu$  s'étend de  $4000$  à  $400 \text{ cm}^{-1}$  et que  $\theta$  vaut  $45^\circ$ , on peut déduire que la profondeur de pénétration de l'onde dans les biopsies (et donc l'épaisseur explorée) est comprise entre **0,36 et 3,63  $\mu\text{m}$** .

Pour l'ensemble des analyses, 80 spectres sont accumulés dans la région  $4000\text{--}450 \text{ cm}^{-1}$  avec une résolution spectrale de  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Les données spectrales sont traitées grâce au logiciel Omnic 8.0 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Waltham, MA).

Le spectre de fond est enregistré avant chaque expérience et soustrait du spectre de l'échantillon. Les spectres sont ensuite corrigés de la ligne de base. Pour chaque type d'explant, plusieurs spectres sont enregistrés un spectre moyenné est calculé.

### I.B.1. Contrôle de l'hydratation du derme humain

Dans un premier temps les biopsies de peau abdominale hydratées ont été déposées **face derme** sur l'accessoire ATR sans capsule de protection. Sur la figure suivante sont présentés les spectres IRTF non normalisés enregistrés toutes les 2 minutes sur une même biopsie dans la zone  $[4000\text{--}450 \text{ cm}^{-1}]$ . Compte-tenu de la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, nous sondons dans ce cas **le derme réticulaire**. Le spectre de l'eau déionisée a été superposé pour comparaison.

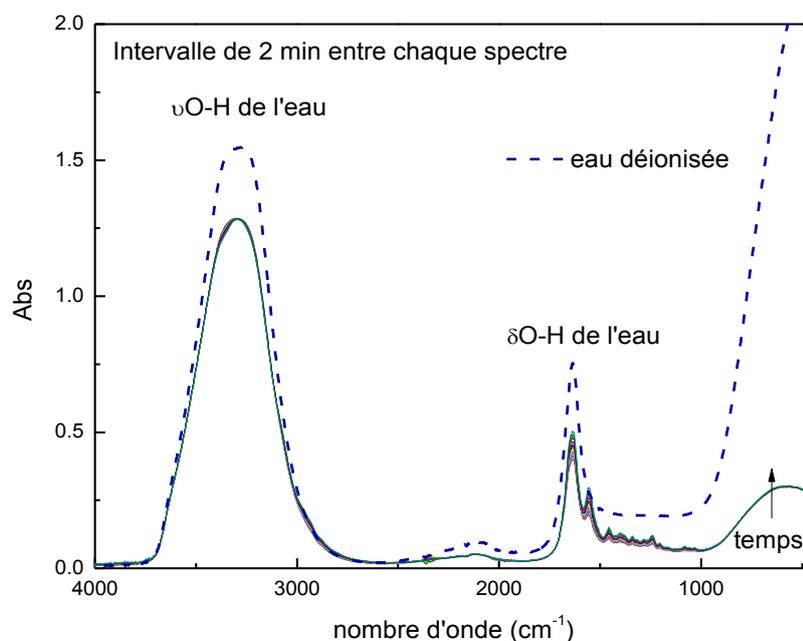


Figure 27 : spectres IRTF d'une biopsie hydratée de peau abdominale face derme en fonction du temps (de  $t=0$  à  $t=24 \text{ min}$ ) et spectre de l'eau déionisée

Il est important de noter que l'eau, même si elle est présente en quantité importante dans la biopsie, n'entraîne pas de phénomène de saturation des bandes comme c'est communément observé en mode transmission. Même si les bandes principales d'absorption de l'eau (indexées sur la Figure 27 [305]) présentent une forte signature sur le spectre du derme humain, elles ne masquent pas l'ensemble de la signature du derme, en particulier dans la zone  $[1800-1000\text{ cm}^{-1}]$ , où les bandes caractéristiques des protéines (Amide I, Amide II et Amide III) sont observables comme présentées (agrandissement Figure 28). Pour la suite de l'étude, nous présenterons principalement les zones d'intérêt  $[4000-2500\text{ cm}^{-1}]$  et  $[1800-1000\text{ cm}^{-1}]$ .

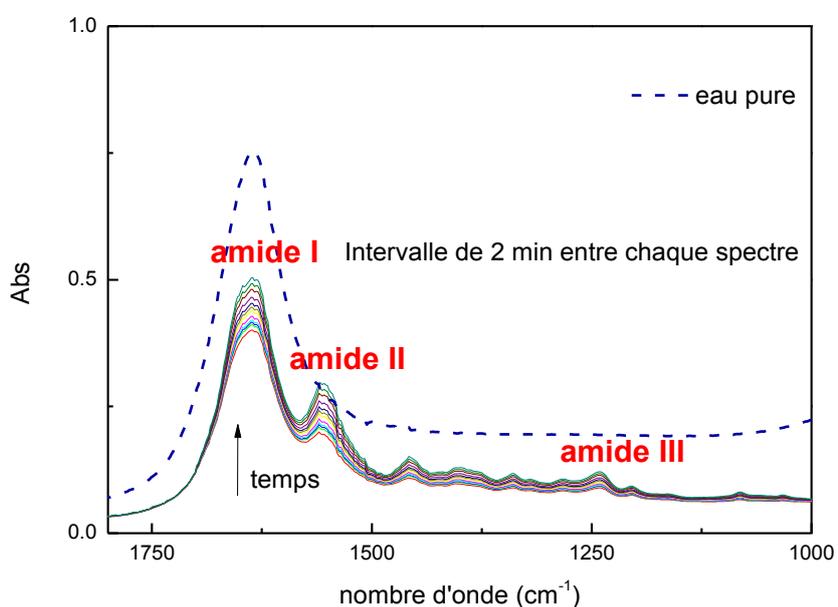
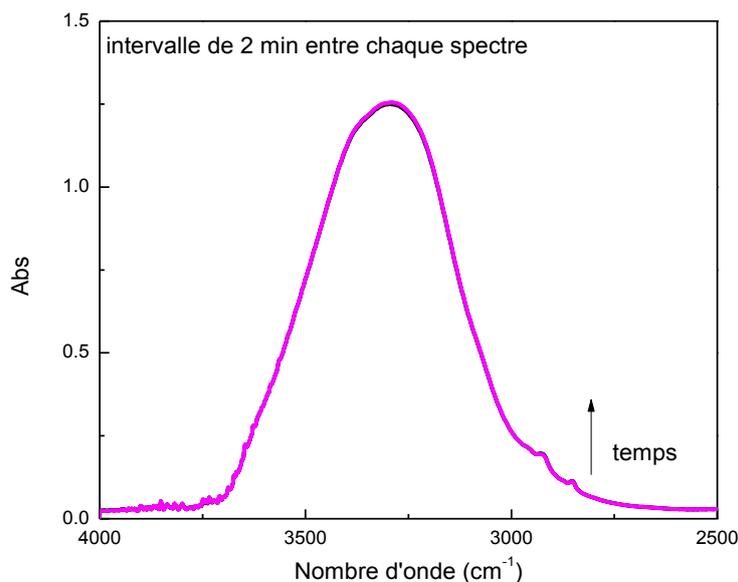


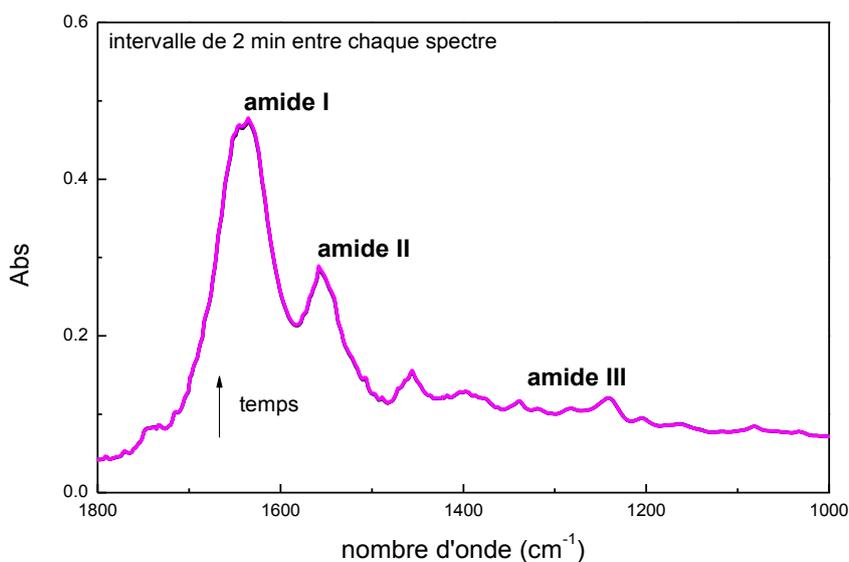
Figure 28 : agrandissement de la Figure 27 dans la zone  $[1800-1400\text{ cm}^{-1}]$

Cet agrandissement de la zone  $[1800-1000\text{ cm}^{-1}]$  met en évidence une variation importante de l'absorbance au cours du temps, associée à la déshydratation progressive de la biopsie hydratée sous les conditions ambiantes.

Les mêmes enregistrements ont été effectués dans le cas où les biopsies sont recouvertes par la capsule hermétique et sont présentés sur les figures ci-après.



*Figure 29 : évolution des spectres IRTF d'une biopsie hydratée de peau abdominale face derme en fonction du temps (de t=0 à t=24 min) avec la capsule hermétique dans la zone [4000-2500 cm<sup>-1</sup>]*



*Figure 30 : évolution des spectres IRTF d'une biopsie hydratée de peau abdominale face derme en fonction du temps (de t=0 à t=24 min) avec la capsule hermétique dans la zone [1800-1000 cm<sup>-1</sup>]*

Comme nous pouvons le constater, les spectres IRTF enregistrés dans ce cas ne varient plus en fonction du temps ; la capsule permet de maintenir constant le taux d'hydratation de la biopsie.

## I.B.2. Influence de l'hydratation sur la réponse vibrationnelle du derme humain

Afin d'évaluer l'influence de l'eau sur la réponse vibrationnelle du derme, nous avons enregistré avec les mêmes paramètres d'acquisition le spectre IRTF du derme humain lyophilisé et l'avons comparé au spectre du derme hydraté et à celui de l'eau déionisée sur les Figure 31 et Figure 32. Pour une meilleure comparaison, il a été nécessaire de normaliser les spectres ; l'amide I contenant des contributions de la vibration O-H de l'eau, nous avons choisi de normaliser les spectres à l'amide II [308,368].

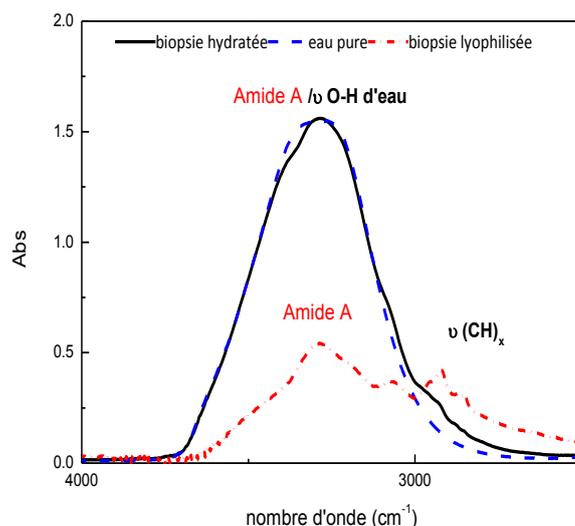


Figure 31 : spectres IRTF du derme hydraté et lyophilisé (peau abdominale) et de l'eau déionisée zone

[4000-2800 cm<sup>-1</sup>]

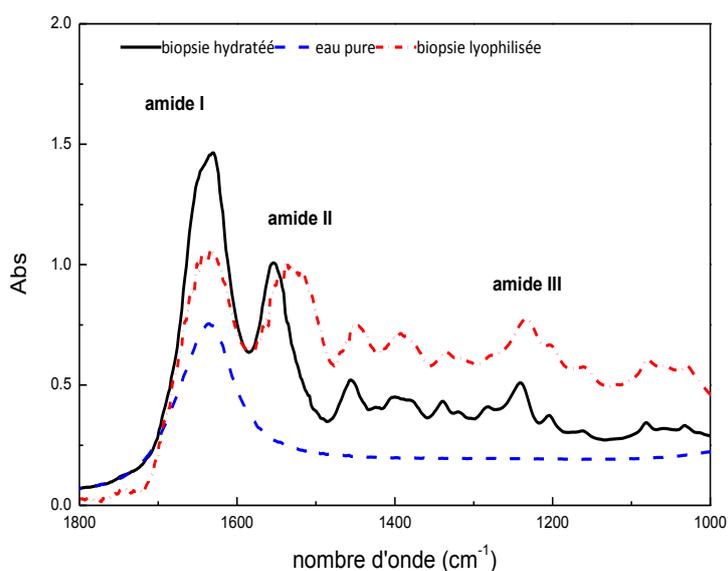


Figure 32: spectres IRTF du derme hydraté et lyophilisé (peau abdominale) et de l'eau déionisée [1800-900 cm<sup>-1</sup>]

Les différences les plus importantes entre les spectres du derme hydraté et lyophilisé sont localisées dans la région  $[3500-2800 \text{ cm}^{-1}]$ ; en effet dans ce cas la bande d'absorption classiquement dénommée amide A ainsi que les bandes d'absorption associées aux vibrations d'élongation des groupes  $(\text{CH})_x$  sont partiellement masquées, dans le spectre du derme hydraté, par l'élongation  $\nu(\text{OH})$  de l'eau pure. Ces bandes restent néanmoins décelables.

Dans la zone  $[1800-1000 \text{ cm}^{-1}]$ , comme nous l'avons précédemment remarqué, la signature de l'eau ne masque pas la signature vibrationnelle du derme hydraté; nous pouvons maintenant confirmer que la signature du derme hydraté dans cette zone est proche de celle du derme lyophilisé et qu'elle est exploitable que cette dernière pour les études qui vont suivre. Il est bien évident que la bande à  $1637 \text{ cm}^{-1}$  du derme hydraté est une bande composite amide I-eau et c'est la raison pour laquelle les spectres ne sont pas normalisés à cette bande, dont l'intensité varie en fonction de l'hydratation.

### **I.B.3. Assignation des bandes d'absorption du derme humain hydraté**

Nous avons reporté sur les figures suivantes les spectres moyennés représentatifs des biopsies d'explants abdominaux hydratés dans les zones  $[4000-2800 \text{ cm}^{-1}]$  et  $[1800-900 \text{ cm}^{-1}]$ . Afin de faciliter l'indexation des différentes bandes de vibration, nous avons aussi reporté le spectre IRTF du collagène de type I (purifié à partir de tendon d'Achille bovin, *Sigma Aldrich*) et réhydraté à 70%, de triglycérides (TG) (purifiés à partir de sang humain provenant de donneurs sains et gracieusement fournis par le Centre de Recherche Cardiovasculaire de Barcelone) et de l'acide hyaluronique (purifiée à partir d'humeur vitreuse bovine, *Alfa Aesar*). Les tableaux d'indexation des principales bandes d'absorption du collagène de type I, de l'acide hyaluronique et des triglycérides sont reportés en annexe A.

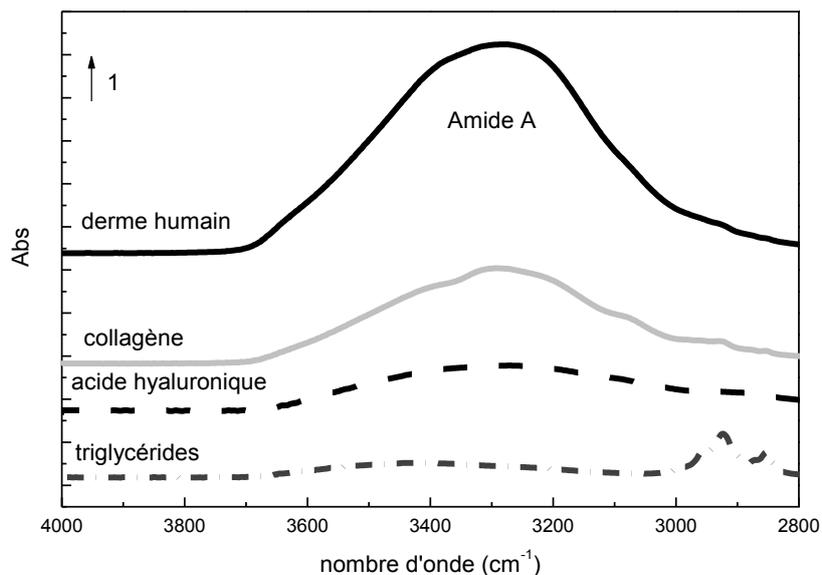


Figure 33 : spectres IRTF du derme, du collagène de type I, de l'HA et des TG dans la zone [4000-2800  $\text{cm}^{-1}$ ]

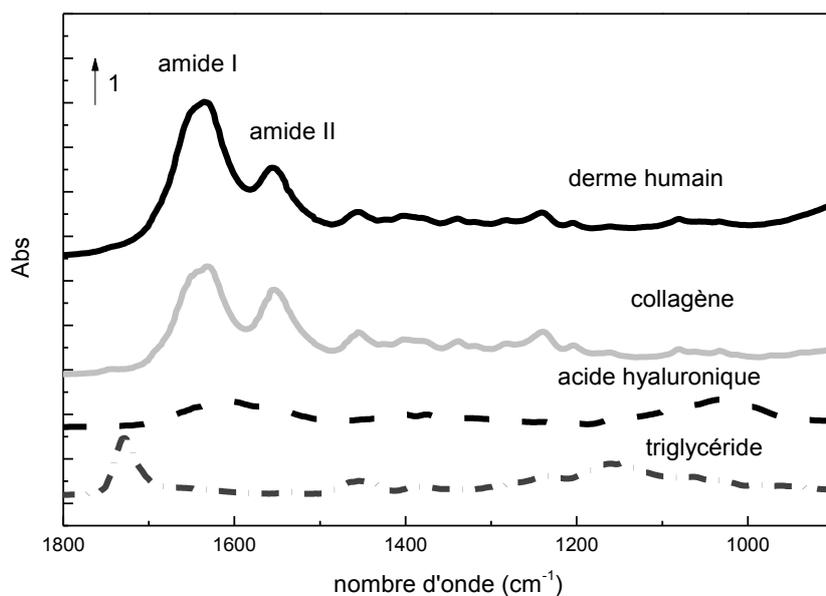


Figure 34: spectres IRTF du derme, du collagène de type I, de l'HA et des TG dans la zone [1800-900  $\text{cm}^{-1}$ ]

Les bandes d'absorption du derme sont identifiées par l'utilisation des données IRTF sur les peptides, les protéines [349,369–372] et les tissus biologiques [271,329,331,334,336,351], avec une attention marquée sur les données bibliographiques associées aux collagènes [332,335–339] et au derme[322,323].

Le tableau suivant présente l'indexation la plus probable pour les différentes bandes d'absorption du derme abdominal.

Position de la bande/cm <sup>-1</sup>	Indexation
3375-3289	<b>Amide A</b> : $\nu(\text{O-H})$ libre, $\nu(\text{O-H})$ lié, $\nu(\text{N-H})$ libre et $\nu(\text{N-H})$ lié Non sensible au squelette carboné; dépendant liaisons H (inter et intramoléculaires), de l'hydratation
3073	$\nu(\text{CH})$ aromatique
3011	$\nu(\text{=CH})$ lipides insaturés, triglycérides, acides gras $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ , $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ , $\nu_s(\text{CH}_3)$ , $\nu_s(\text{CH}_2)$
2957, 2924, 2873, 2852	(Gly, Pro, Hyp, Ala) des protéines + phospholipides, triglycérides $\nu_s(\text{CH}_3)$ principalement représentatif des protéines $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ and $\nu_s(\text{CH}_2)$ principalement représentatif des lipides
1744	$\nu(\text{C=O})$ triglycérides, esters de cholestérol, phospholipides
1694-1630	<b>Amide I</b> : $\nu(\text{C=O})$ protéines et $\delta(\text{O-H})$ eau
1558-1542	<b>Amide II</b> : $\nu(\text{C-N})$ , $\delta(\text{N-H})$ protéines
1520, 1515, 1507	Chaînes latérales (Tyrosine, Phénylalanine)
1452	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ protéine et lipides
1401-1393	$\nu_s(\text{COO}^-)$ acides aminés libres, acides gras, (GAG)s
1338	$\delta_w(\text{CH}_2)$ des chaînes latérales (proline), spécifique collagène
1320-1202	<b>Amide III</b> : $\delta_{\text{plan}}(\text{N-H})$ et $\nu(\text{C-N})$ de protéines 1282 cm <sup>-1</sup> : $\delta(\text{CH}_3)$ spécifique collagène 1205 cm <sup>-1</sup> : $\delta(\text{C-OH})$ Tyrosine (spécifique collagène)
1246-1235	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ des phospholipides, acides nucléiques
1250-1210	$\nu_{\text{as}}(\text{SO}_3^-)$ des (GAG)s sulfatés
1167-1156	$\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$ des esters de cholestérol, phospholipides $\nu(\text{C-O})$ , $\nu(\text{C-C})$ , $\nu(\text{C-OH})$ , $\nu(\text{C-O-C})$ des protéines, oligosaccharides, glycolipides 1171 cm <sup>-1</sup> : $\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$ des esters de cholestérol, phospholipides 1159 cm <sup>-1</sup> : $\nu(\text{C-OH})$ Hyp et acides nucléiques
1200-1000	1115 cm <sup>-1</sup> : $\nu(\text{C-O})$ carbohydrates 1081 cm <sup>-1</sup> : $\nu(\text{C-O-C})$ collagène, oligosaccharides, glycolipides, protéoglycanes, and $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ acides nucléiques et phospholipides 1032 cm <sup>-1</sup> : $\nu_s(\text{CO-O-C})$ collagène et (GAG)s, $\nu_s(\text{SO}_3^-)$ (GAG)s

Tableau 9 : indexation la plus probable des bandes d'absorption IR dans le derme réticulaire abdominal

Dans la zone [1900-800 cm<sup>-1</sup>], les bandes d'absorption du derme sont très proches des bandes d'absorption du collagène de type I : le coefficient de corrélation entre les spectres du collagène de type I et le derme est supérieur à 0,95 dans cette zone.

En particulier, la signature du collagène dans la région "empreinte digitale" (le triplet spécifique à 1204, 1238 and 1280 cm<sup>-1</sup> [271,350] ainsi que la bande spécifique de la proline à

1338  $\text{cm}^{-1}$  [271,373] se retrouvent dans le spectre du derme.

La très faible absorption dans la zone 1740-1720  $\text{cm}^{-1}$ , qui correspond à l'absorption spécifique d'élongation des groupes carbonyle de la liaison ester des lipides (phospholipides, des triglycérides insaturés et des esters de cholestérol esters [374,375])) confirme la bonne extraction manuelle de l'hypoderme dans ces échantillons de derme abdominal.

#### I.B.4. Sur-résolution des spectres du derme humain par dérivée seconde et FSD

Sur les spectres IRTF du derme humain, seules les bandes d'intensités maximales très nettes peuvent être identifiées, alors que les nombreux épaulements ne peuvent pas être facilement différenciés. Il est fréquent que des bandes d'absorption très proches constitue une seule bande composite ; c'est le cas pour les bandes amide I, II et III de la majorité des protéines et tissus.

Comme illustré par la figure suivante, les spectres de dérivée seconde permettent d'extraire des informations « cachées » dans le spectre d'absorption. Ce traitement des spectres est largement utilisé dans le cas de tissus biologiques [371,376], permettant une comparaison plus fine des différents échantillons. Il a aussi l'avantage de s'affranchir des dérives de ligne de base.

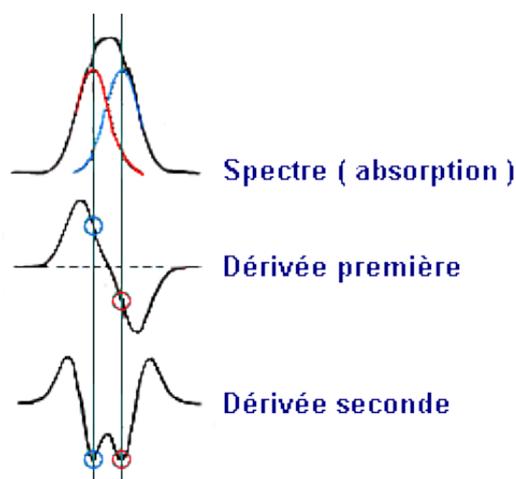


Figure 35 : spectre IRTF et ses dérivées première et seconde

Dans notre étude la dérivée seconde est déterminée par la méthode de Savitsky-Golayen 7 points [377].

La méthode d'auto-déconvolution de Fourier (FSD) complète la méthode de la dérivée seconde en apportant une confirmation supplémentaire sur la position des bandes d'absorption détectées en tant que minima sur les dérivées secondes des spectres. De plus,

cette méthode de sur-résolution est non seulement qualitative mais aussi quantitative [378]. L'objectif de la FSD est d'améliorer la résolution spectrale par une réduction de la largeur des bandes, tout en conservant la fréquence et l'intensité intégrée de chaque bande. La figure ci-dessous illustre un exemple simulé de FSD.

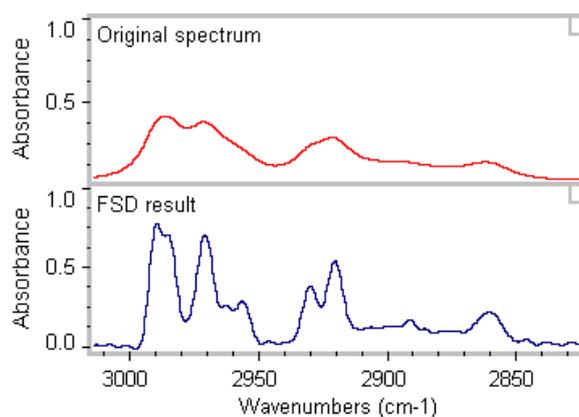
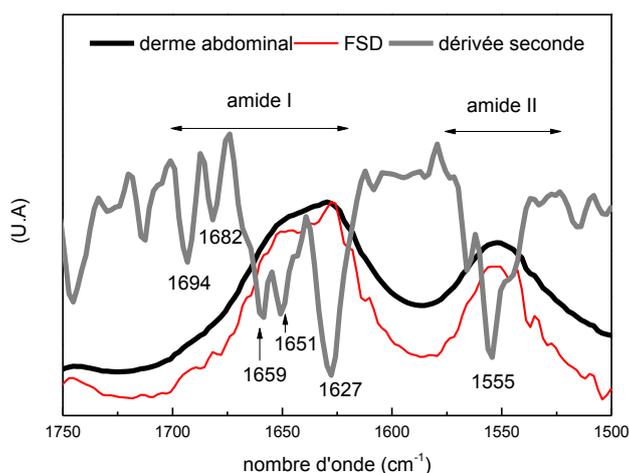


Figure 36 : spectres IRTF initial et FSD calculée par le logiciel OMNIC

Pour optimiser la sur-résolution FSD et conformément à la littérature [379,380], le paramètre « largeur de bande » a été fixé à  $13\text{ cm}^{-1}$  et le paramètre « Amélioration » à 1,7.

Nous avons utilisé ces traitements de sur-résolution pour extraire des informations supplémentaires de la réponse vibrationnelle du derme, en particulier dans la zone d'absorption amide I/amide II.

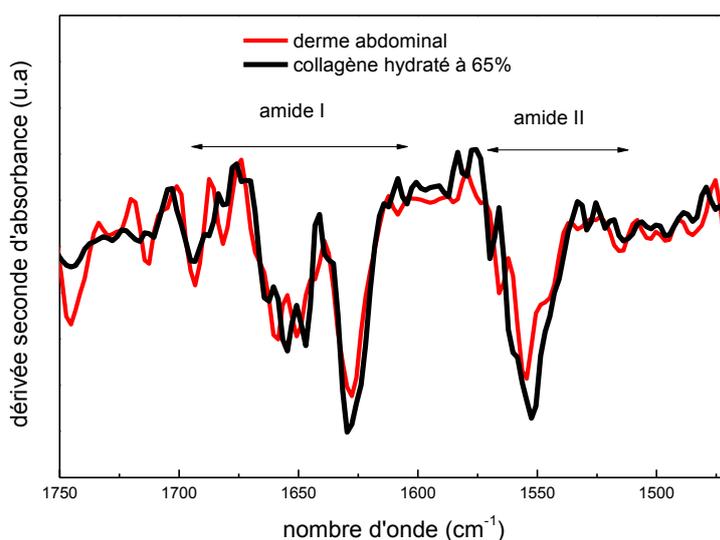
Nous avons reporté sur la Figure 37 le spectre IRTF d'un échantillon de derme abdominal, ainsi que sa dérivée seconde et son traitement FSD dans la zone amide I/II. Nous mettons en évidence la sur-résolution des spectres dans cette zone particulièrement sensible à la structure secondaire des protéines [381].



*Figure 37 : spectre IRTF d'une biopsie de derme abdominal et son traitement par FSD et par dérivée seconde dans la zone amide I/amide II*

Une étude de reproductibilité (cf. annexe B, Figure 2) a permis de vérifier que les différents minima détectés dans cette zone sur les spectres de dérivée seconde sont localisés à des nombres d'onde identiques dans les spectres des différents échantillons de derme abdominal et ne peuvent donc être considérés comme des artefacts.

Nous avons superposé sur la Figure 38 les spectres moyens de dérivée seconde du derme et du collagène de type I hydraté.



*Figure 38 : dérivées secondes (moyennées) des spectres IRTF des biopsies de derme abdominal et du collagène de type I hydraté à 65%*

La forte corrélation entre ces spectres confirme que la signature vibrationnelle du derme

dans cette zone est principalement associée à celle du collagène.

Les différents minima des spectres de dérivée seconde sont comparés aux différents maxima/épaulements des spectres FSD du derme abdominal dans la zone des amides I et II et sont reportés dans le Tableau 10. Comme on peut l'observer, les positions des minima et des maxima sont quasi-identiques, confirmant l'utilisation conjointe de ces 2 types de traitements pour améliorer la résolution des spectres IRTF du derme.

	Minima	Maxima/épaulements	Indexation
	Dérivées secondes	FSD	
Amide I	1694	1689	feuilletés $\beta$ anti-parallèles
	1682	1682	feuilletés $\beta$ anti-parallèles et tours $\beta$
	1667	1666	tours, boucles non liées par liaison H
	1659	1660	hélices $\alpha$
	1651	1652	hélices et/ou désordre
	1640-1636	1636	eau
	1627	1627	feuilletés $\beta$ intramoléculaires
	1618	1618	feuilletés $\beta$ intermoléculaires (signature des protéines agrégées)
Amide II	1609	1608	Gln[349]
	1576	1574	Asp, Trp
	1555	1556	Feuilletés $\beta$
	1543	1542	hélices $\alpha$
	1534	1534	désordre
	1527	1527	Lys
	1510	1509	Phe, Tyr[338]

*Tableau 10 : position des sous-modes dans la zone [1700-1500  $\text{cm}^{-1}$ ] par sur-résolution FSD et dérivée seconde*

Une comparaison avec les données de la littérature [271,326,332,337,338,340,349,369] (cf. tableau 4 annexe B) nous permet donc de suggérer les assignations reportées dans le tableau précédent pour les différentes composantes vibrationnelles du derme abdominal dans la zone de l'amide I.

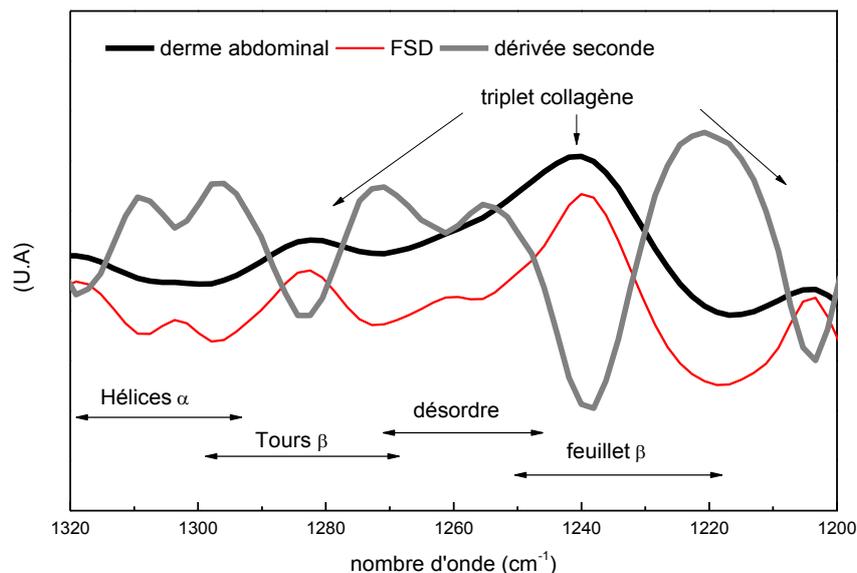
En accord avec les études antérieures réalisées sur des tissus cardiovasculaires, la bande spectrale à  $1659\text{ cm}^{-1}$  attribuée aux structures en hélice  $\alpha$  est particulièrement représentative de la structure quasi-exclusive hélicoïdale du collagène [337].

En ce qui concerne l'amide II, même si l'association à une structure secondaire particulière est en général moins évidente que pour l'amide I dans les tissus complexes [326], en particulier à cause de l'interférence avec les bandes d'absorption des chaînes latérales, nous retrouvons les principaux minima à  $1555$ ,  $1543$ , and  $1534\text{ cm}^{-1}$  à la fois dans le derme et le collagène de type I.

Dans un large panel de tissus, les bandes de vibration autour de  $1550\text{ cm}^{-1}$  sont généralement attribuées aux conformations en feuillets  $\beta$  et les bandes de la région  $1546\text{-}1540\text{ cm}^{-1}$  sont associées aux conformations hélicoïdales [271]. Dans le collagène pur lyophilisé, une bande à  $1549\text{ cm}^{-1}$  est associée à la structure en triple hélice tandis qu'une bande à plus bas nombre d'onde ( $1530\text{ cm}^{-1}$ ) correspondrait aux zones désordonnées [338]. L'utilisation de la dérivée seconde et de la FSD permet aussi une meilleure résolution des bandes d'absorption des chaînes latérales, indexées grâce aux références de la littérature dans le tableau précédent.

Les études de sur-résolution dans la zone de l'amide III (zone [ $1350\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ]) sont relativement restreintes en raison de la faible intensité de ce mode. Les composantes du mode amide III sont principalement dues à la combinaison en phase des vibrations(N-H) dans le plan et l'étirement de (C-N) [382] , et sont donc sensibles aux changements de structure secondaire des protéines. Comme les bandes de vibration de l'eau n'interfèrent pas dans cette zone et que l'on peut s'affranchir des contributions des chaînes latérales, la décomposition de l'amide III peut ainsi être utilisée pour la prédiction des structures secondaires [383–385] dans les protéines pures.

Nous avons reporté sur la Figure 39 le spectre IRTF d'un échantillon de derme abdominal, ainsi que sa dérivée seconde et son traitement FSD.



*Figure 39 : spectre IRTF d'une biopsie de derme abdominal et son traitement par FSD et par dérivée seconde dans la zone amide III*

Nous notons que les positions des minima de dérivés secondes et les maxima de FSD sont quasi-identiques dans ce cas aussi. En revanche, l'assignation à des structures secondaires dans cette zone est beaucoup plus délicate que dans la zone amide I et II, car il existe des interférences importantes avec les bandes de vibration d'autres constituants du derme tels que les phospholipides, les GAGs, etc (cf. Tableau 9).

Nous avons enfin utilisé les spectres de dérivés secondes du derme dans la zone caractéristique des vibrations d'élongation  $CH_x$  (Figure 40); pour discriminer entre la réponse de la phase lipidique (particulièrement riche en  $CH_2$  et  $CH_3$  dans une moindre mesure) et du collagène, qui contient des résidus riches en  $CH_3$  et  $CH_2$ , nous avons superposé sur cette figure les spectres de dérivés secondes de ces deux types de composés.

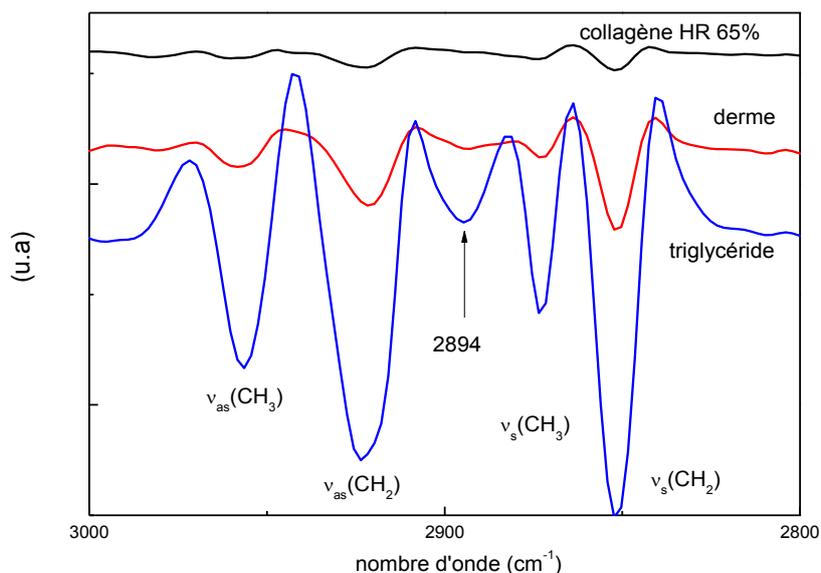


Figure 40 : dérivés secondes de différents constituants dans la zone (CHx)

Nous notons que les minima d'absorption du collagène et de la phase lipidique se situent aux mêmes nombres d'onde, avec une intensité beaucoup plus importante pour la phase lipidique dans cette zone ; seule une bande supplémentaire est notée à  $2894\text{ cm}^{-1}$  dans la phase lipidique.

Dans le derme abdominal sont observés les maxima d'absorbance détectés aux mêmes nombres d'onde que dans le collagène et la phase lipidique ; une bande spécifique de la phase lipidique à  $2894\text{ cm}^{-1}$  non détectable dans le collagène pur est aussi décelable.

### I.C. Déshydratation et dégradation du derme abdominal déterminées par Analyse Thermogravimétrique couplée à la spectrométrie Infra-Rouge (ATG/IRTF)

Le principe de l'ATG est de mesurer la perte de masse d'un échantillon lors d'un programme en température sous atmosphère contrôlée. Les analyses sont effectuées avec un analyseur thermogravimétrique Q50 (*Thermal Analysis Instrument*), de sensibilité  $0,1\text{ }\mu\text{g}$  en masse et de  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  en température sous atmosphère inerte (azote), pour des échantillons de masse initiale comprise entre 5 et 15 mg et placés dans des coupelles en alumine. Les échantillons sont soumis à une rampe linéaire en température depuis  $20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à  $600^{\circ}\text{C}$  à  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Les thermogrammes de perte de masse sont en général présentés en pourcentage de perte de masse ; il est souvent utile de superposer aussi à ces thermogrammes ATG les courbes dérivées en fonction de la température (DTG) sur lesquelles les différentes étapes de perte de masse sont détectées sous forme de minima.

Il est possible d'identifier les effluents émis lors de la dégradation thermique de l'échantillon par un couplage au spectromètre Nicolet 5700 IRTF en mode transmission. Pour ce faire une ligne de transfert est maintenue à une température de 225°C et la cellule d'analyse des gaz à 250°C pour éviter la condensation. L'ATG couplée IRTF permet de déterminer l'hydratation de l'échantillon, sa stabilité thermique et ses différentes étapes de dégradation.

La stabilité thermique de la peau humaine a été préalablement déterminée par ATG couplée IRTF sur un explant de peau abdominale de 21,1mg, masse nécessaire pour effectuer une analyse IRTF des effluents. Sur la Figure 41 sont reportés les thermogrammes ATG et DTG de cet explant, qui mettent en évidence plusieurs processus de perte de masse.

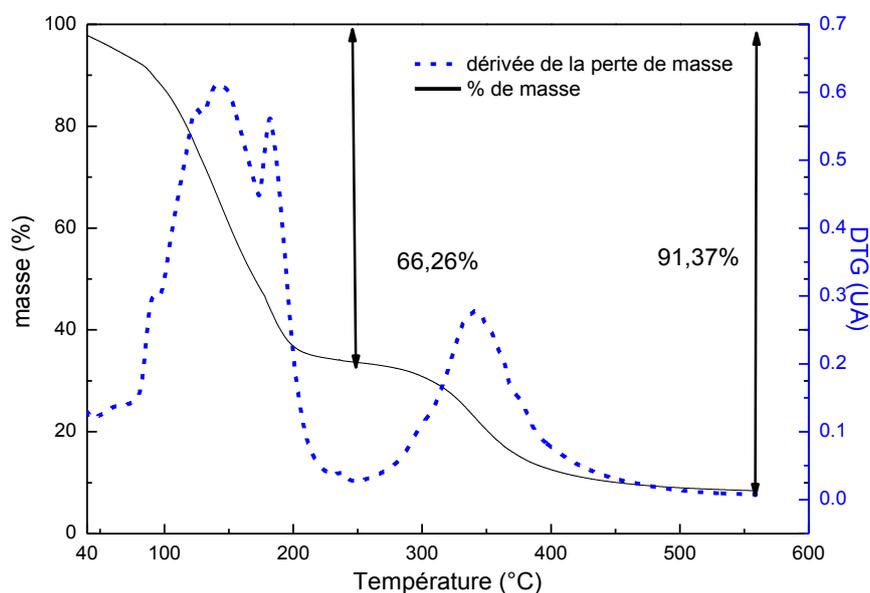


Figure 41 : thermogrammes ATG/DTG d'explant de peau abdominale

Au-dessous de 100°C, la perte de masse correspond uniquement à une déshydratation de l'échantillon associée à l'évaporation de l'eau libre et faiblement liée (confirmée par l'analyse IRTF des effluents, présentée dans la Figure 3 de l'annexe B). Entre 100 et 180°C, la perte de masse correspond à la perte d'eau plus fortement liée au derme. La perte de masse due à la déshydratation totale est de 66,3%.

À partir de 180°C, le spectre IRTF des effluents (Figure 4, annexe B) ne correspond plus à celui de la vapeur d'eau, et des bandes d'absorption des chaînes carbonées aliphatiques commencent à être détectées, signe de la dégradation de la phase lipidique.

A partir de 225°C, débutent les phénomènes de dégradation de la phase protéique (désamination et décarboxylation).

La dernière perte en masse s'étend entre 225°C et 600°C et correspond à la dégradation totale de la phase protéique par décarboxylation (présence de CO<sub>2</sub> sur le spectre IRTF des effluents, Figure 5 de l'annexe B) et désamination (présence d'hydrazine et d'ammoniac sur le spectre des effluents, Figure 6 de l'annexe B).

#### I.D. Réponse thermique de la peau humaine par Analyse Calorimétrique Diatherme (ACD)

L'ACD active se base sur la mesure du flux de chaleur échangé par le matériau étudié avec le four lors d'une programmation en température sous atmosphère contrôlée. Ce flux de chaleur est comparé à celui échangé entre une référence et un deuxième four. En conséquence, le système est maintenu à un état «thermique nul» en tout temps. La quantité d'énergie requise pour maintenir l'équilibre du système est directement proportionnelle aux changements d'énergie qui se produisent dans l'échantillon.

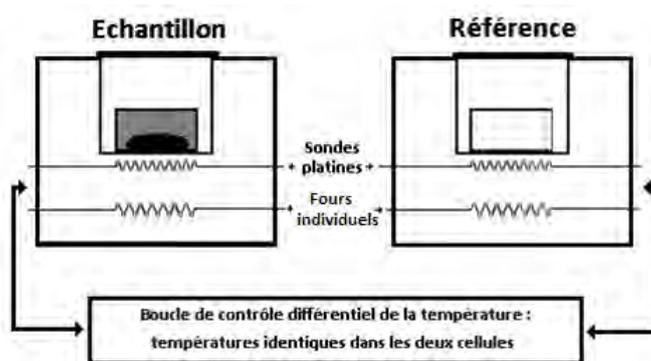


Figure 42 : dispositif du Pyris Diamond de Perkin Elmer

La différence de puissance  $W = W_{ech} - W_{ref}$  exprimée en W est en général normalisée à la masse  $m$  de l'échantillon pour une meilleure comparaison des propriétés thermiques. Il est aussi possible de déterminer la chaleur spécifique massique  $C_p$  (moyennant un étalonnage particulier en  $C_p$ ) ou au moins sa variation  $\Delta C_p$  par la formule suivante :

$$\Delta C_p = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_p = \frac{W}{qm} \quad (2)$$

où  $q$  est la vitesse de montée en température et  $H$  l'enthalpie.

L'appareil ACD utilisé est un Pyris Diamond (PERKIN ELMER, Waltham, Massachusetts) sous atmosphère inerte (l'hélium). La calibration pour notre étude est effectuée avec l'indium dont les paramètres de fusion sont  $\Delta H_f = 28,45 \text{ J.g}^{-1}$  et  $T_f = 156,6^\circ\text{C}$ , résultant en une sensibilité de  $0,1^\circ\text{C}$  en température et de  $0,5 \text{ mW}$  en flux de chaleur.

Les échantillons, de masse comprise entre 5 et 15 mg, sont sertis dans les coupelles hermétiques en aluminium (*TA Instruments TZERO LOW MASS PANS*). Les vitesses de refroidissement ou de chauffage sont comprises entre 0,5 et 20 °C.min<sup>-1</sup>.

L'étanchéité des coupelles est vérifiée par un contrôle de la masse entre chaque analyse ACD. Les transitions thermiques du premier ordre telles que la fusion ou la cristallisation présentent une discontinuité de la dérivée première de l'enthalpie, et les transitions du pseudo-second ordre telle que la transition vitreuse, une discontinuité de la dérivée seconde de l'enthalpie. Ainsi sur le signal associé à la chaleur spécifique massique, la fusion et la cristallisation seront caractérisées par un pic et la transition vitreuse par un saut de capacité calorifique.

Les paramètres caractéristiques de ces deux types de transition sont résumés dans le tableau suivant :

1 <sup>er</sup> ordre	2 <sup>nd</sup> ordre et pseudo-second ordre
T <sub>max</sub> , T <sub>onset</sub> , T <sub>fin</sub>	T <sub>inflexion</sub> , T <sub>1/2</sub>
ΔH (aire sous la courbe)	ΔC <sub>p</sub> (saut de chaleur spécifique)

### I.D.1. Transitions thermiques de la peau humaine

Nous avons vu précédemment que la méthode d'analyse ATG permettait de quantifier l'eau totale et de déterminer les températures limites d'exploration pour l'ACD sans risquer de dégradation totale de l'échantillon.

Pour l'ensemble des biopsies fraîches ou décongelées, les études ACD seront donc effectuées en coupelle hermétique jusqu'à des températures maximales de 85°C.

Afin de déterminer la quantité d'eau totale dans l'ensemble des biopsies et explants, un protocole alternatif plus rapide à mettre en œuvre qu'une mesure ATG consistera donc à déshydrater les échantillons à l'étuve à 180°C pendant 8 min. Il est à noter que la plupart de ces mesures sera effectuée sur des biopsies placées préalablement dans les coupelles hermétiques pour l'étude ACD. Dans ce cas, les coupelles hermétiques seront percées après l'étude ACD pour pouvoir effectuer cette déshydratation.

La quantité d'eau totale sera ainsi déterminée par simple différence entre la masse initiale et la masse sèche.

Sur la Figure 43 sont reportés les thermogrammes ACD (normalisés à la masse initiale) d'une

biopsie de peau abdominale correspondant à un premier chauffage à 10°C/min après un refroidissement jusqu'à -100°C et à un deuxième chauffage à 10°C/min (toujours après un refroidissement jusqu'à -100°C).

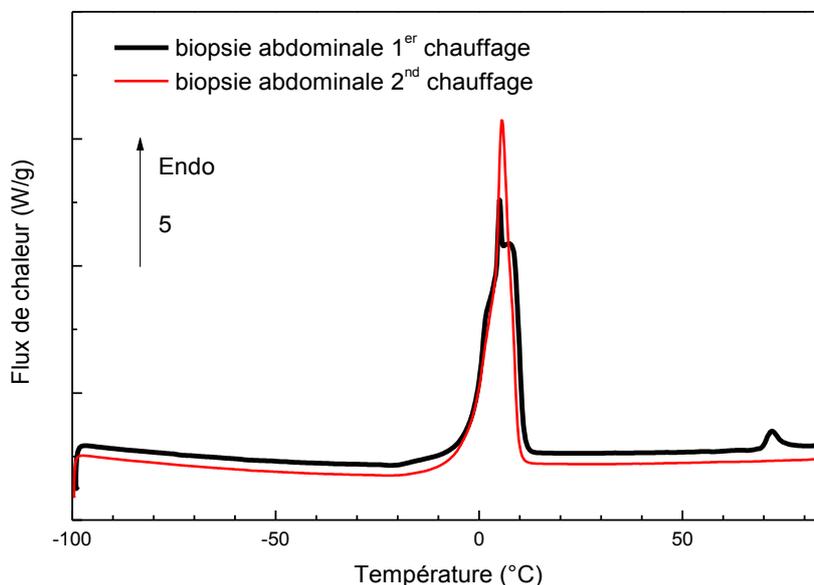


Figure 43: thermoграмmes ACD de derme humaine (1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> chauffages en température 10°C/min)

En accord avec les précédentes études calorimétriques sur les tissus biologiques hydratés [258], le pic endothermique enregistré dans la zone [-20;20°] est associé à la fusion de l'eau cristallisée lors du refroidissement antérieur.

Sur la Figure 44, nous avons reporté les thermoграмmes ACD agrandis dans la zone [60-85°C]. Sur cette figure est aussi superposé le thermoграмme ACD d'un péricarde bovin décellularisé à l'état natif, tissu relativement simple et uniforme essentiellement constitué par collagène de type I et caractéristique de la réponse thermique du collagène hydraté.

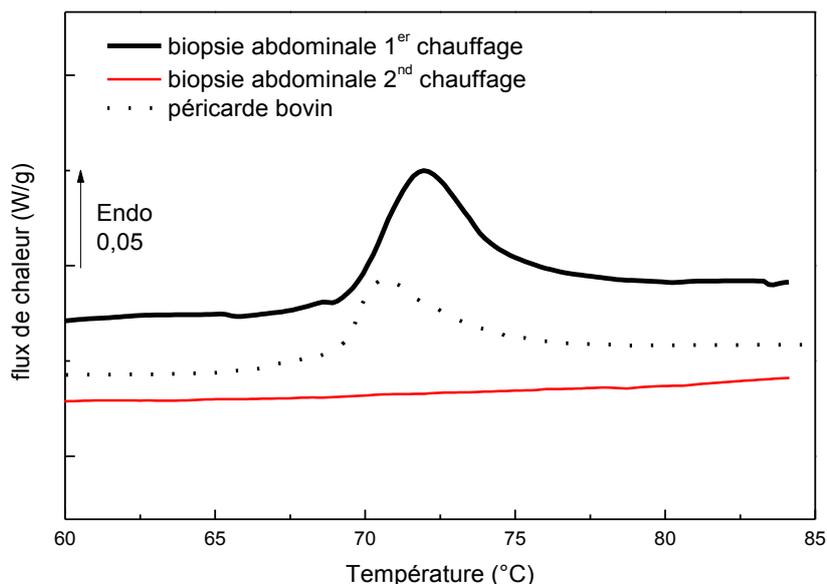


Figure 44 : agrandissement de la Figure 43 dans la zone [60-85°C] et péricarde bovin

Comme pour le péricarde bovin, un phénomène endothermique est enregistré pour la peau humaine dans cette zone de température pendant le premier chauffage en température et associé à la dénaturation thermique irréversible du collagène (non observée lors de chauffages successifs). Il est à noter que de faibles événements endothermiques réversibles sont attribués aux transitions de phase réversibles des lipides [316,317] dans cette zone de température. Ces transitions de phase non détectées dans notre cas permettent d'affirmer que l'hypoderme est éliminé correctement.

La structure caractéristique des collagènes type I et III est la triple hélice droite constituée de trois hélices de polyproline gauches. Lors du chauffage, la triple hélice se déroule pour produire des chaînes aléatoires de gélatine (Figure 45), qui peuvent rester liées de manière covalente les unes aux autres ou non en fonction du degré de chauffage [386,387].

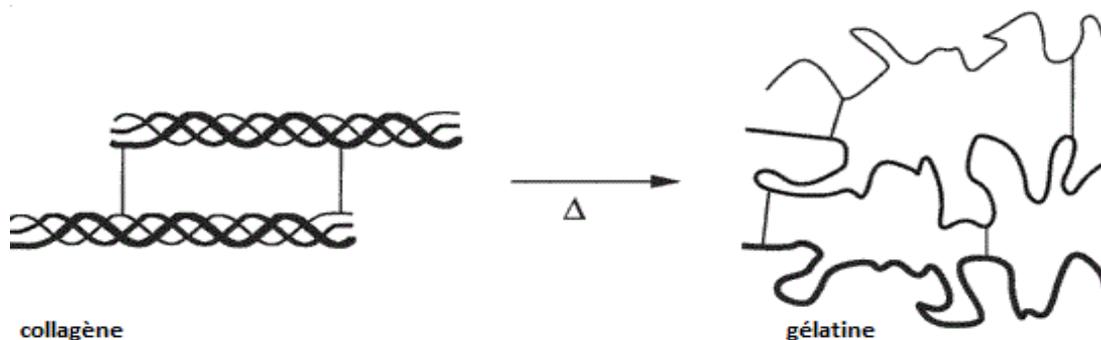


Figure 45 : dénaturation de collagène

La dénaturation du collagène est un processus activé thermiquement qui implique la rupture

des liaisons hydrogène couplant les trois chaînes alpha et un réarrangement de la triple hélice dans une configuration de chaîne aléatoire [261]. Si la dénaturation du collagène a d'abord été décrite comme une «fusion» du polymère [388], des études calorimétriques détaillées sont plutôt compatibles avec le mécanisme «polymer-in-a-box», dans laquelle la molécule est stabilisée par confinement [262].

## I.D.2. Exploitation des transitions thermiques de la peau humaine

### I.D.2.1. Endotherme de fusion de la glace

La transition associée à la fusion de l'eau cristallisée est largement utilisée pour quantifier la quantité d'eau cristallisable dans les protéines et les tissus hydratés [252,255] :

$$\% \text{ eau cristallisable} = \frac{\Delta H_f}{334} \quad (3)$$

où  $\Delta H_f$  est l'aire du pic de fusion de la glace en J/g, 334 J.g<sup>-1</sup> correspond à l'enthalpie de fusion de la glace pure à 0°C [255].

Ce pourcentage ne prend pas en compte l'eau non cristallisable contenue dans l'échantillon. Combinée à une analyse thermogravimétrique donnant accès à la quantité totale d'eau, la quantité d'eau non cristallisable peut ainsi être déterminée par une simple différence entre la quantité totale d'eau et l'eau cristallisable. Ces données sont présentées dans le tableau suivant pour les biopsies de peau abdominale.

Biopsies de peau abdominales	Masse initiale (mg)	Masse après séchage étuve (mg)	%eau totale	%eau cristallisable	%eau non cristallisable
P1a	14,1	4,5	68,1	49,6	18,5
P1b	11,7	3,5	70,1	50,9	19,2
P2a	12,1	3,4	71,9	52,8	19,1
P2b	12,0	3,6	70,0	53,6	16,4
P3a	10,1	3,0	70,3	51,8	18,5
P3b	14,9	4,1	72,5	57,8	14,7
moyenne			70,5 ± 0,6	52,8 ± 1,2	17,7 ± 0,7

Tableau 11 : quantification des différents types d'eau et caractéristiques de l'endotherme de dénaturation de biopsies de peau abdominales

L'hydratation totale des explants de peau abdominale est comprise entre 68,1 et 72,5% pour l'ensemble des échantillons analysés, ce qui est conforme aux données de la littérature [273,389], donnant une valeur moyenne de 65-70% pour l'hydratation du derme humain et de l'épiderme; cette valeur remarquablement élevée, correspondant environ à 2g d'eau/g matière sèche, est due à une combinaison de facteurs physiques et chimiques, y compris la présence de pores interconnectés, la nature hygroscopique de l'acide hyaluronique et le caractère hydrophile du collagène.

Si une littérature bien documentée est présente pour l'hydratation totale de la couche cornée, de l'épiderme et du derme par différentes techniques biophysiques [390], peu de données obtenues à partir de la spectroscopie Raman [364,391], DVS [364] et RMN [392] sont rapportées sur la quantification des différents types d'eau (très souvent dénommées « eau libre » et « eau liée ») dans la peau humaine.

Cette étude ACD préliminaire montre que l'eau cristallisable représente environ les trois quarts de l'eau totale dans ces explants de peau humaine. Le terme « eau cristallisable » est préféré au terme « eau libre » - plutôt réservé aux techniques vibrationnelles et relaxationnelles - car il recouvre l'eau en masse et en excès, mais aussi l'eau confinée dans les interstices et pouvant geler. Conformément aux résultats précédents par RMN, DVS et spectroscopie Raman [364,392], ce travail met en évidence que l'eau libre est présente en quantité relativement importante dans la peau humaine.

Un quart de la quantité totale d'eau de la peau humaine est de l'eau non cristallisable. Pour éviter toute confusion, dans cette étude, le terme « eau non cristallisable » est préféré au terme « eau liée », qui se réfère à l'eau directement liée à la protéine par des liaisons hydrogène dans la première couche d'hydratation, mais qui peut également être étendu à l'hydratation multicouche et identifié par un ralentissement de la dynamique par les techniques diélectriques et de RMN. [253,299,393–396] Outre la classification de l'eau en eau monocouche ou multicouche, les types d'eau peuvent également être classés selon leur comportement lors de la congélation et la décongélation, et dans ce cas-là, l'eau liée est parfois divisée en « eau liée non cristallisable » fortement associé aux groupes hydrophiles et « eau liée cristallisable » moins étroitement liée [397,398]. Dans notre cas, l'eau non cristallisable correspond à l'eau liée non cristallisable et elle correspond au remplissage de la première couche d'hydratation des protéines et d'autres composants hydrophiles tels que l'acide hyaluronique.

La valeur d'environ 0,6 g d'eau non cristallisable/g de matière sèche est conforme aux données de la littérature sur les tissus biologiques [251,258]. Habituellement, environ 0,3-0,7 g d'eau non cristallisable reste associé par gramme de protéine « à sec » [277]. En supposant

que la masse molaire moyenne d'un acide aminé dans le collagène est de  $100 \text{ g.mol}^{-1}$ , une évaluation sommaire conduit à une valeur de 4 moles d'eau/par mole d'acide animé de collagène, ce qui est légèrement supérieur à la valeur déterminée par DVS [399] ou par diffraction RX pour l'eau adsorbée en multicouche dans le collagène ou les peptides de collagène [52], certainement à cause de la présence d'acide hyaluronique dans le derme.

### I.D.2.2. Endotherme de dénaturation de la phase collagénique

Conformément à la littérature, les principales caractéristiques du pic de dénaturation sont  $T_{\text{onset}}$ ,  $T_{\text{max}}$  et  $\Delta H_d$  l'aire sous le pic endothermique comme représenté sur la figure ci-après.

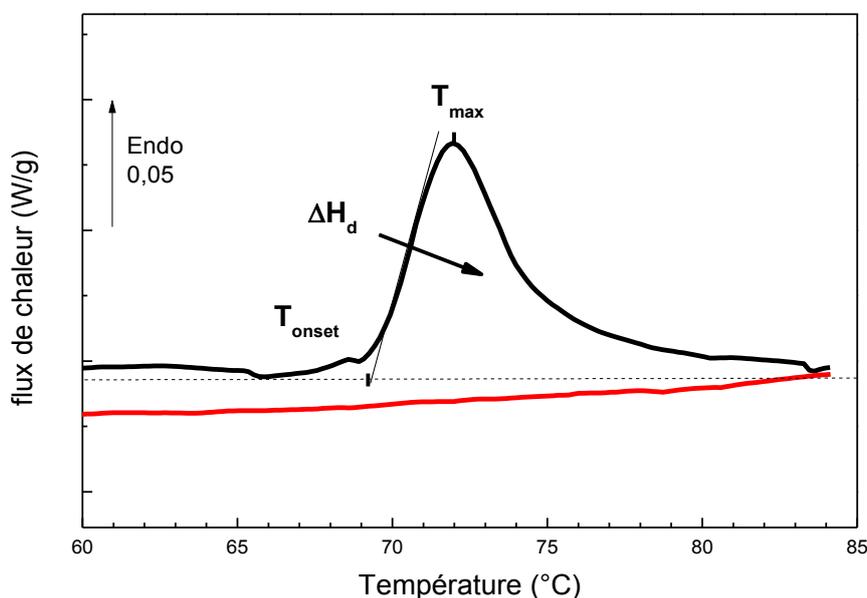


Figure 46 : thermoqrammes d'une biopsie abdominale (1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> chauffage en température) dans la zone [60-85°C]

$T_{\text{max}}$  et  $T_{\text{onset}}$  sont alternativement prises comme la température de dénaturation dans les travaux antérieurs [257,268,272,273,400] tandis  $\Delta H_d$ , une fois normalisé à la masse sèche, est une mesure de l'enthalpie de dénaturation de la phase collagénique.

La température de dénaturation est une mesure de la stabilité thermique de la triple hélice, tandis que l'enthalpie de dénaturation est une mesure du nombre net de liaisons hydrogène rompues lors de la dénaturation [262].

Nous avons compilé ces valeurs dans le tableau suivant pour les biopsies de peau abdominales analysées.

Biopsies de peau abdominale	Dénaturation $\Delta H$ (J/g)	Dénaturation en matière sèche $\Delta H$ (J/g)	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$T_{\text{max}}$ (°C)
P1a	4,8	14,9	69,6	72,0
P1b	3,4	11,5	71,5	73,2
P2a	5,6	19,9	69,7	71,4
P2b	5,6	18,8	68,1	71,0
P3a	3,7	12,3	73,1	74,7
P3b	5,9	21,4	69,8	72,3
moyenne	4,8±0,4	16,5±1,7	70,3±0,8	72,4±0,5

*Tableau 12 : caractéristiques de l'endotherme de dénaturation de biopsies de peau abdominale*

Dans le cas des explants de peaux abdominales,  $T_{\text{max}}$  est de l'ordre de 72°C; elle se situe dans la même gamme que celle de tissus hydratés riches en collagène et mesurée avec la même vitesse de chauffage tels que le tendon de la queue de rat, le péricarde et les peaux d'animaux [262]. Il a été précédemment montré que la température de dénaturation augmente considérablement avec la diminution de l'hydratation, en raison de la diminution de la teneur en eau intrafibrillaire et le remplacement des liaisons hydrogène protéine-protéine par des liaisons hydrogène des protéines dans l'eau [262,263,265,269]. Comme illustré dans la Figure 47 extraite de la littérature, cette température de dénaturation est indépendante de l'hydratation pour des tissus hydratés au-dessus de 30 moles d'eau pour trois résidus de collagène (qui correspond à 1,8 g d'eau/g de matière sèche).

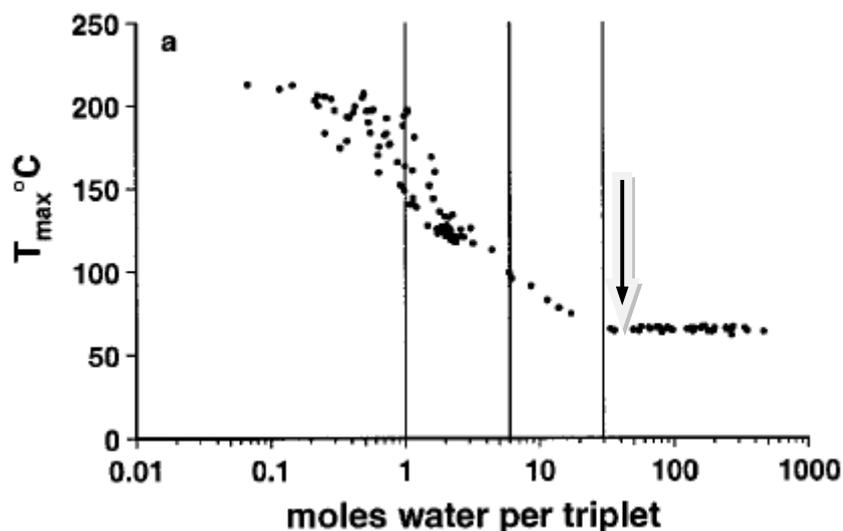


Figure 47 : évolution de la température de dénaturation du collagène avec l'hydratation [262]

**Il faut souligner que cette condition est vérifiée pour les échantillons étudiés, avec une hydratation totale de 2 g/g de matière sèche.** Dans ce cas, la température de dénaturation peut être considérée comme une caractéristique intrinsèque du collagène, et pourra être utilisée à des fins de comparaison.

En effet, la température de dénaturation du collagène est sensible aux liaisons inter et intramoléculaires et à la nature des chaînes latérales exposées au milieu environnant pendant du dépliement [267]. Un abaissement de la température de dénaturation peut indiquer la dégradation du collagène, la fragmentation ou l'expansion de la structure du collagène, tandis qu'une augmentation de cette température peut être due à la formation de liaisons stables, comme on peut l'observer dans des biomatériaux à base de collagène réticulé chimiquement [263].

L'enthalpie de dénaturation de la peau abdominale est évaluée à  $16,5 \text{ J.g}^{-1}$  de matière sèche. Cette valeur peut être considérée comme assez faible par rapport aux tissus collagéniques purs, tels que le tendon ou la peau animale (avec une enthalpie de dénaturation comprise entre  $30$  et  $60 \text{ J.g}^{-1}$ ); il faut rappeler que certaines analyses sont normalisées à la teneur réelle de collagène (et non à la masse sèche totale du tissu). De plus, dans notre cas, ni l'épiderme, ni les composants cellulaires n'ont été éliminés, ce qui diminue la quantité de collagène dans les échantillons. Seules quelques données sont disponibles sur l'enthalpie de dénaturation des peaux humaines, et nos valeurs sont en accord avec les valeurs de *Wiegand et al.* [275] avec une enthalpie de dénaturation de  $4,5 \text{ J.g}^{-1}$  de tissus frais pour la peau humaine native (ce qui correspond à environ  $13 \text{ J.g}^{-1}$  de tissu sec).

De plus, il a été montré que d'une manière similaire à celle de la température de dénaturation, l'enthalpie de dénaturation est largement affectée par l'hydratation, comme illustré par la Figure 48 extraite de la littérature [262].

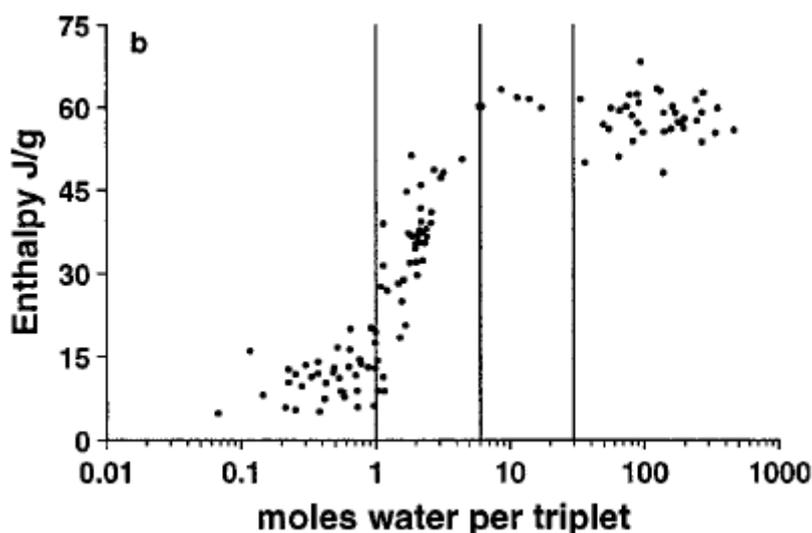


Figure 48 : évolution de l'enthalpie de dénaturation du collagène avec l'hydratation [262]

À très faible hydratation, l'enthalpie est cinq fois plus faible que l'enthalpie de dénaturation de la triple hélice complètement hydratée ; la triple hélice est dans ce cas-là maintenue par un cinquième du nombre initial de liaisons hydrogène. Elle atteint une valeur constante au-dessus de 30 moles d'eau pour trois résidus de collagène (soit en dessus de 1,8 g d'eau/g de matière sèche), **et cette condition est vérifiée pour les échantillons de peau étudiés.**

L'enthalpie de dénaturation pourra donc être utilisée comme un marqueur adapté à la mesure de densité du réseau de liaisons hydrogène dans le collagène hydraté de la peau.

### I.E. Réponse diélectrique de la peau humaine

L'analyse des propriétés diélectriques de la matière est largement répandue dans l'industrie, et représente un intérêt majeur dans de nombreux domaines tels que la chimie ou les sciences biologiques pour une caractérisation moléculaire des matériaux et biomacromolécules [401].

La polarisation d'un matériau induite par l'application d'un champ électrique peut se décomposer en différents termes qui correspondent aux différentes échelles d'observation:

- la polarisation électronique, représentant la déformation du cortège électronique des atomes,

- la polarisation ionique, associée à la différence d'électronégativité entre atomes,
- la polarisation d'orientation ou dipolaire, définie par les moments dipolaires des molécules,
- les polarisations de charge d'espace et de type Maxwell-Wagner-Sillars, attribuées à l'organisation ultrastructurale, un excès de charges libres et les hétérogénéités du matériau.

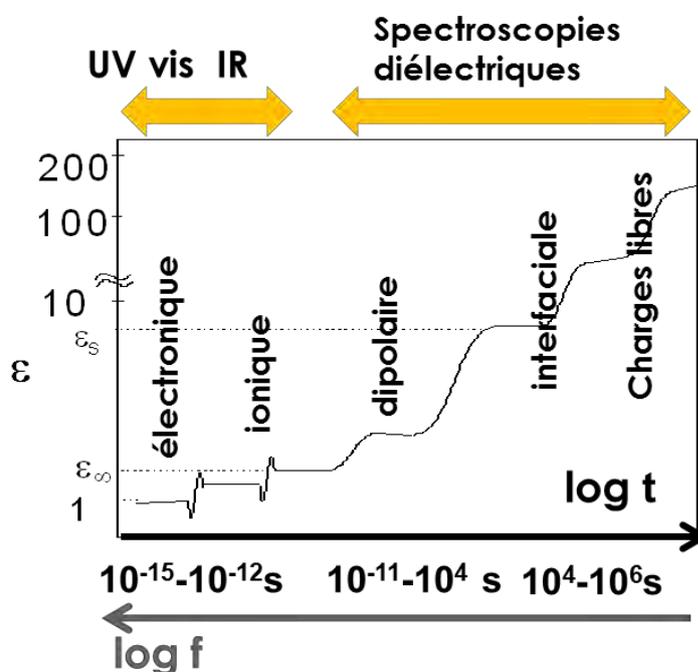


Figure 49 : mécanismes de polarisation sur les échelles temporelles et fréquentielles

L'établissement de la polarisation n'est pas instantané, et dépend de la nature des entités polarisables. Lorsque la fréquence du champ électrique appliqué augmente, certains mécanismes de polarisation ne peuvent plus atteindre leur valeur d'équilibre. Les mécanismes de polarisation les plus longs sont la réorientation dipolaire (de l'ordre de 10<sup>-9</sup> à 10<sup>5</sup> s) et les effets de charge d'espace (> 10<sup>3</sup> s), à cause de l'inertie des entités sollicitées et des interactions mises en jeu. Dans le cas des mécanismes dipolaires, qui feront l'objet de notre étude, les dipôles ne sont pas capables à haute fréquence de s'orienter assez vite pour rester dans l'alignement du champ électrique et la polarisabilité totale chute. Cette chute implique la réduction de la permittivité et l'absorption d'énergie diélectrique, caractéristiques d'une relaxation diélectrique, ou dispersion.

Dans le domaine temporel, et à une température donnée, des temps de relaxation sont alors définis pour chacun des phénomènes de relaxation dipolaire.

La détermination des différents phénomènes de relaxation dipolaire est particulièrement adaptée à l'étude des protéines, qui possèdent de nombreux moments dipolaires sur leur chaîne principale comme illustré sur la Figure 50; ces relaxations constituent ainsi une sonde

de leur dynamique de chaîne.

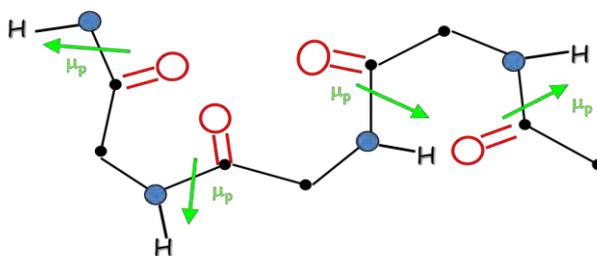


Figure 50 : moments dipolaires dans une chaîne polypeptidique

### Technique des Courants thermostimulés (CTS)

Elaborée en 1964 par *Bucci et al.* [402], la technique des CTS fut initialement conçue pour caractériser les défauts ponctuels dans les cristaux d'halogénure alcalins, et étendue par la suite à l'étude de divers matériaux, tels que les liquides polaires. Grâce à sa faible fréquence équivalente, de l'ordre de  $10^{-3}$  Hz [403], c'est une méthode quasi-statique de grande sensibilité utilisée pour caractériser les mouvements moléculaires des polymères synthétiques, amorphes ou semi-cristallins, ainsi que les biopolymères [401,404].

Son principe est schématisé sur la Figure 51. Un champ électrique statique  $E$  est appliqué pendant un temps  $t_p$  suffisant long à une température  $T_p$  à un échantillon placé entre deux électrodes. Les dipôles dont le temps de relaxation est court à cette température s'orientent. Cette polarisation est ensuite figée en abaissant la température à l'aide d'un refroidissement à l'azote liquide jusqu'à  $T_0 \ll T_p$  et le champ est supprimé. L'échantillon est court-circuité pendant un temps  $t_{cc}$  pour que les charges à la surface soient évacuées, avant d'être relié à un électromètre de sensibilité de  $5E-15$  A [405]. Une remontée linéaire en température à une vitesse donnée  $q_c$ , permet le retour à l'équilibre graduel des dipôles précédemment orientés, donnant lieu à un courant de dépolarisation. Chaque pic de courant correspond ainsi au phénomène de relaxation d'une famille particulière de dipôles.

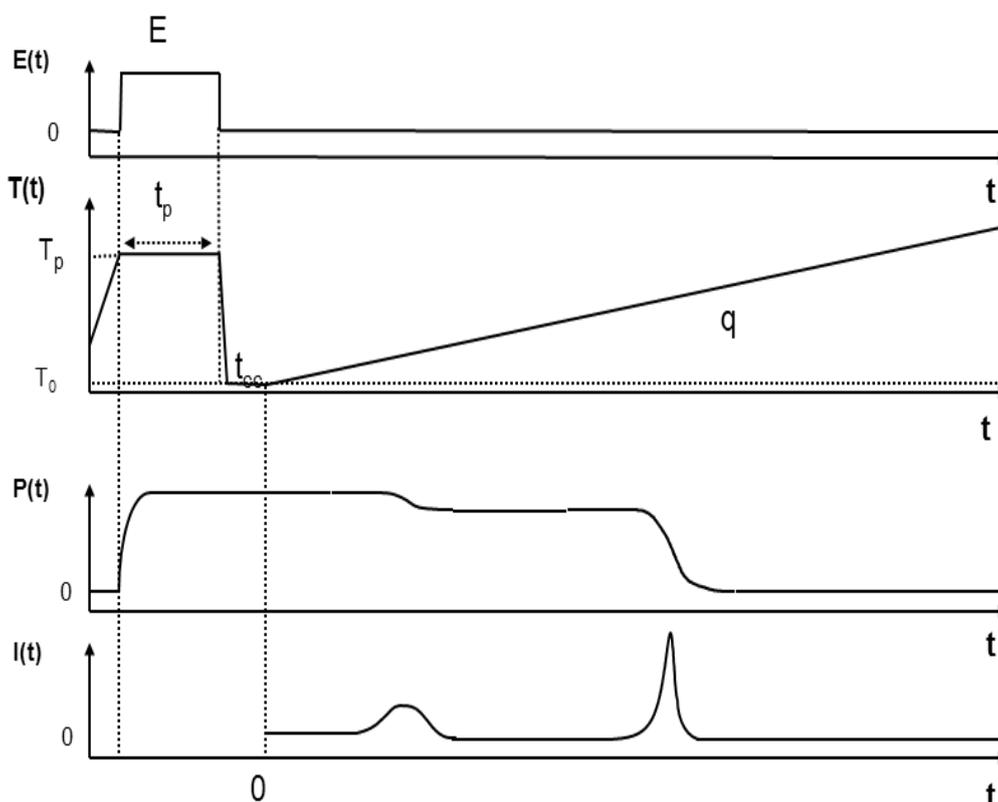


Figure 51 : principe des courants thermostimulés et schématisation des phénomènes de réorientation dipolaire

Certains critères des pics permettent de s'assurer de la nature dipolaire des entités relaxantes :

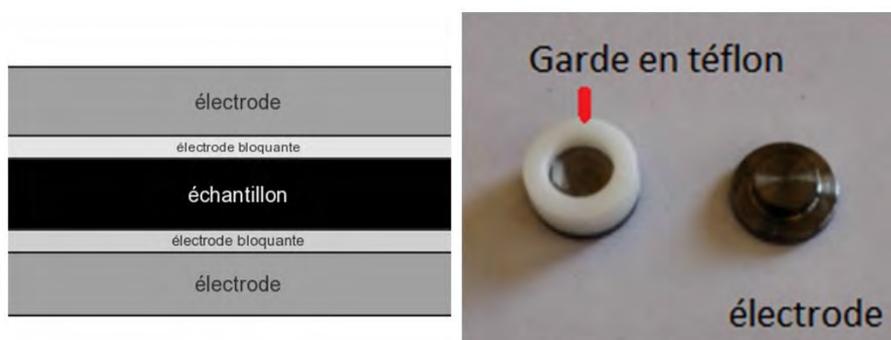
- leur reproductibilité,
- une intensité proportionnelle au champ appliqué,
- l'invariance avec différentes températures de polarisation  $T_p > T_{pic}$ .

L'appareil utilisé dans le cadre de cette étude est le TSC II (SETARAM INSTRUMENTATION). La cellule de mesure se situe à l'intérieur d'une enceinte hermétiquement close dont l'atmosphère inerte (hélium) est contrôlée après un pompage préalable sous vide primaire.

Compte-tenu de la faible surface des biopsies cutanées et de leur état d'hydratation, une adaptation et une importante étude de faisabilité ont été nécessaires pour mettre au point un protocole d'analyse CTS fiable pour la suite de ce travail de thèse.

Les biopsies étant de faible diamètre, il a été nécessaire de concevoir des électrodes spécifiques de 4 mm de diamètre ( $50 \text{ mm}^2$ ), entourées par une garde en téflon permettant une mesure précise de l'épaisseur. Afin de s'affranchir des problèmes d'écoulement de

charges importants dans les échantillons hydratés, des électrodes bloquantes en PTFE (épaisseur = 10  $\mu\text{m}$ ) peuvent être placées entre l'échantillon et les électrodes.



*Figure 52 : cellule de mesure et vue de coupe du dispositif avec les électrodes bloquantes*

Afin de conserver les échantillons dans un état hydraté, le cryostat est soumis à un pompage primaire de 30 secondes avant d'être rempli d'hélium.

Le champ électrique statique appliqué est de 400V/mm (ce qui permet de se placer dans la zone de linéarité), les temps  $t_p$  et  $t_{cc}$  de 2 minutes et la vitesse de remontée en température de  $7^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Selon la gamme de température explorée, les températures de polarisation  $T_p$  sont comprises entre  $-20$  et  $150^\circ\text{C}$ .

### **I.E.1. Modes de relaxation de la peau à l'état hydraté**

#### **I.E.1.1. Thermogrammes CTS globaux**

Nous avons reporté sur la Figure 53 les thermogrammes CTS enregistrés après une polarisation à 400V/mm à  $T_p = -20^\circ\text{C}$  pour une biopsie de peau abdominale de 4 mm de diamètre ; afin de s'affranchir de l'important phénomène de conductivité présent sur les spectres CTS de biopsies hydratées, les électrodes bloquantes sont utilisées.

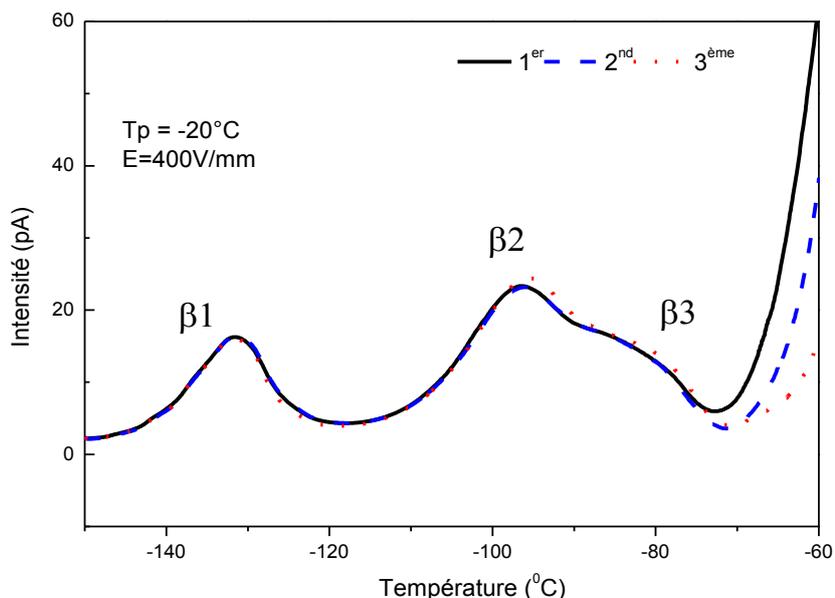


Figure 53 : thermogrammes CTS globaux d'une biopsie de peau abdominale hydratée après polarisation à -20°C

Les thermogrammes successifs sont reproductibles, ce qui permet de vérifier que l'hydratation des échantillons est bien conservée au cours de cette étude.

Trois modes de relaxation sont observés à -131°C (mode  $\beta_1$ ), -96°C (mode  $\beta_2$ ) et -80°C (mode  $\beta_3$ ). Un quatrième pic dont la position varie est souvent présent entre -80 et -20°C ; au contraire des modes  $\beta$ , l'intensité de ce pic n'est pas proportionnelle au champ électrique appliqué et varie au cours des thermogrammes successifs ce qui ne permet pas de l'associer à un phénomène de relaxation mais à une polarisation d'électrode ou interfaciale.

### I.E.1.2. Etude de la structure fine

Afin de préciser l'origine de la mobilité moléculaire, le thermogramme CTS complexe peut être résolu par la technique des polarisations fractionnées [402].

La technique des dépolarisations fractionnées consiste à polariser l'échantillon dans une fenêtre de polarisation de 5°C et à enregistrer le spectre CTS correspondant. En déplaçant cette fenêtre de polarisation dans la gamme de température voulue (ici de  $T_p = -140$  à  $T_p = -80^\circ\text{C}$ ), on obtient ainsi une série de thermogrammes élémentaires dont l'enveloppe reproduit l'allure du spectre global. Nous avons reporté sur la figure suivante cette décomposition expérimentale pour une biopsie de peau abdominale hydratée.

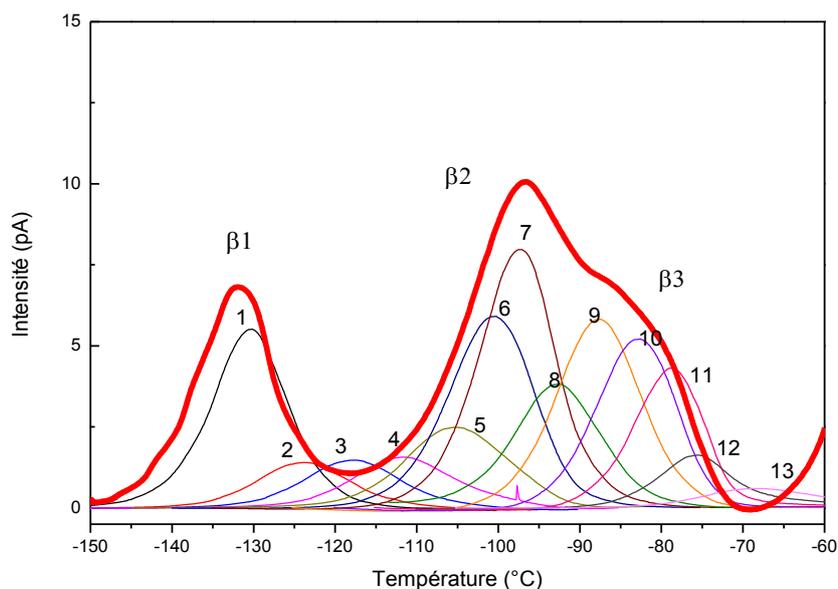


Figure 54: structure fine basse température de la peau abdominale hydratée

Lorsque la fenêtre de polarisation est suffisamment étroite, chaque pic élémentaire peut être analysé selon le formalisme de Debye ; il est associé à la dépolarisation d'entités relaxantes ayant un temps de relaxation  $\tau_i(T)$  unique.

Le temps de relaxation  $\tau_i(T)$  est déterminé par la relation suivante :

$$\tau_i(T) = \frac{1}{qI(T)} \int_T^{T_f} I(T) dT \quad (4)$$

Où  $q$  est la rampe en température,  $I$  l'intensité,  $T_i$  et  $T_f$  le début et la fin du pic.

Le temps de relaxation  $\tau_i(T)$  déterminé expérimentalement correspond, pour chaque pic élémentaire, au rapport entre l'aire restante sous le pic de dépolarisation et l'intensité à la température  $T$ , normalisé à la vitesse de remontée en température.

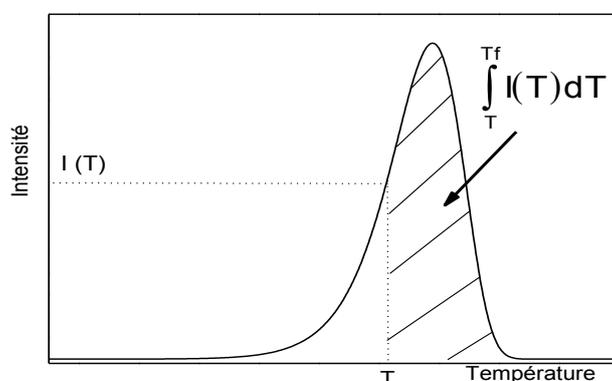
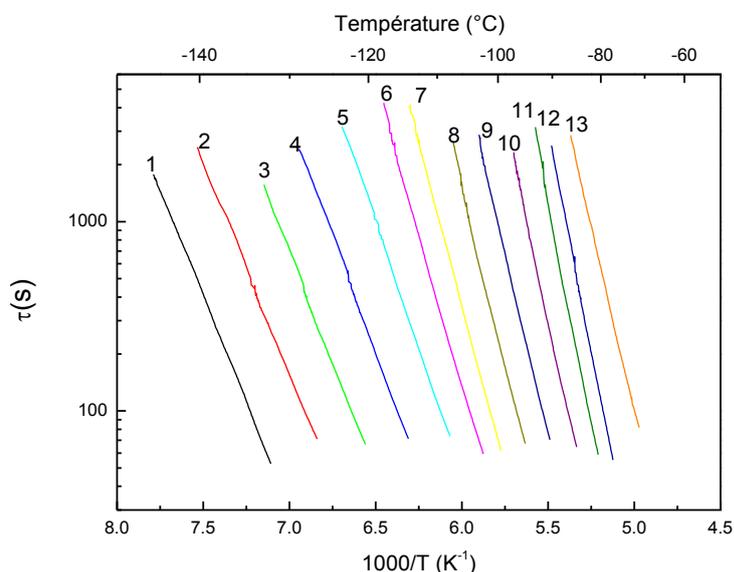


Figure 55 : analyse d'un pic de dépolarisation CTS élémentaire

Pour chaque spectre, on a donc accès au temps de relaxation en fonction de la température. Cette variation des temps de relaxation élémentaires isolés pour une biopsie de peau humaine en fonction de la température est reportée dans la figure ci-après.



*Figure 56: dépendance en température des temps de relaxation isolés dans la peau abdominale hydratée à basse température*

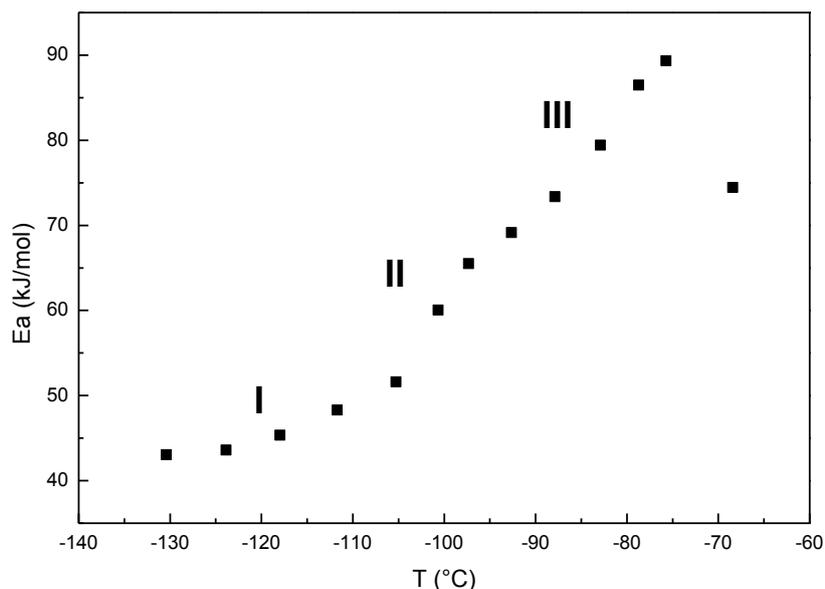
Chaque temps de relaxation élémentaire possède une dépendance linéaire avec l'inverse de la température en échelle semi-logarithmique, ce qui traduit une dépendance de type Arrhénius :

$$\tau_i(T) = \tau_{0i} \exp\left(\frac{E_{ai}}{RT}\right) \quad (5)$$

Avec  $\tau_{0i}$  le facteur préexponentiel et  $E_{ai}$  l'énergie d'activation.

Ces paramètres ont été déterminés pour chacun des temps de relaxation et reportés dans le tableau 6 de l'annexe B.

Nous avons reporté sur la Figure 57 l'évolution de l'énergie d'activation en fonction de la température pour l'ensemble de ces processus.



*Figure 57 : variation de l'enthalpie d'activation en fonction de la température du pic pour les processus élémentaires à basse température*

Nous repérons trois zones d'augmentation de l'énergie d'activation (notées I, II et III sur la Figure 57) qui correspondent aux 3 modes de relaxation  $\beta$ .

Dans la gamme de température du mode  $\beta_1$ , l'énergie d'activation est comprise entre 43 kJ/mol et 45 kJ/mol, ce qui correspond approximativement au double de l'énergie de rupture d'une liaison hydrogène (~20kJ/mol) [44]. Le facteur préexponentiel est de l'ordre de  $10^{-15}$  s. Dans la théorie des états activés d'Eyring [406], ce facteur est relié à l'entropie d'activation par la relation suivante :

$$\tau_0 = \frac{h}{kT} \exp - \frac{\Delta S}{k} \quad (6)$$

Le mode  $\beta_1$  est ainsi associé à des entropies d'activation de l'ordre de  $30 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ , ce qui en fait un mode peu coopératif.

Les modes  $\beta_2$  et  $\beta_3$  au contraire sont associés à des énergies d'activation comprises entre 50 kJ et 100 kJ/moles et à des entropies d'activation comprises entre 70 et 180  $\text{J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ , ce qui permet de les associer à des phénomènes beaucoup plus coopératifs (annexe B tableau 6).

Une autre représentation caractéristique de la distribution des temps de relaxation est le tracé du facteur préexponentiel  $\tau_0$  en fonction de l'énergie d'activation  $E_a$  en échelle semi-logarithmique (Figure 58).

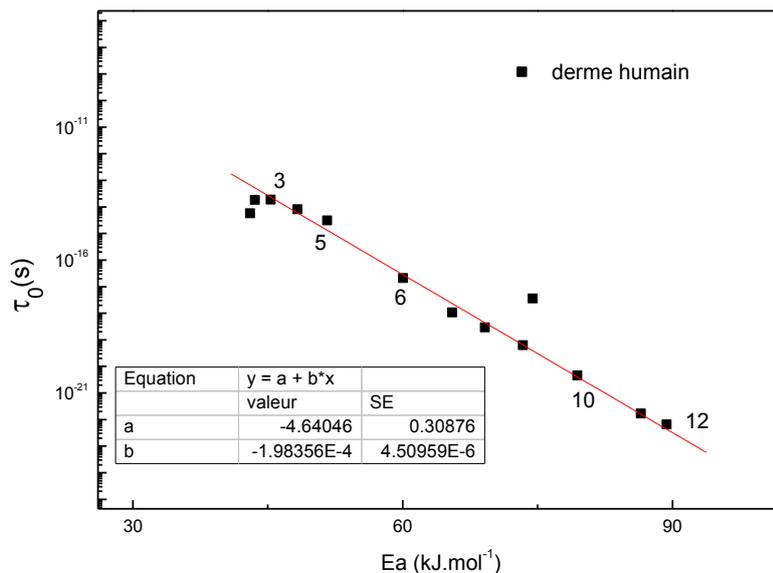


Figure 58 : diagramme de compensation du derme abdominal

On note une relation linéaire entre  $\log \tau_0$  et  $E_a$  pour les processus 3 à 12, ce qui peut se traduire par la loi suivante :

$$\tau_0 = \tau_c \exp\left(-\frac{E_a}{RT_c}\right) \quad (7)$$

Cette linéarité traduit un phénomène de compensation[43], associé à un mouvement coopératif, correspondant aux processus polarisés de  $-130$  à  $-80^\circ\text{C}$ . Les paramètres de compensation associés ont pour valeurs :

$$\tau_c = -10 \pm 6 \text{ } ^\circ\text{C} \text{ et } 1,1 \cdot 10^{-5} < \tau_c < 4,7 \cdot 10^{-5} \text{ s}$$

Par analogie avec les travaux précédents [44,253,299,394,407], le mode  $\beta_1$ , que l'on retrouve dans divers systèmes biologiques fortement hydratés (élastine hydratée (cf. Figure 7, annexe B), kératine hydratée, etc...) est associé à des réorientations de défauts dans l'eau cristallisable nécessitant la rupture de deux liaisons hydrogène. C'est ainsi un mode associé à la signature relaxationnelle de l'eau « libre ».

Le mode  $\beta_2$  est un mode que l'on retrouve universellement dans les protéines et tissus hydratés [253,299]; il correspond à la réorientation localisée du complexe eau liée-séquences hydrophiles des protéines.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'origine du mode  $\beta_3$  : beaucoup plus coopératif, il a été associé dans les protéines pures hydratées [253] à un réarrangement coopératif du réseau de liaison hydrogène à longue distance. Il a aussi été attribué, toujours dans les protéines pures hydratées [299] à l'eau confinée interagissant avec les groupes hydrophobes. Dans un tissu complexe tel que la peau, il est difficile de proposer une origine

plus précise pour ce mode de relaxation.

Il est à noter que les modes  $\beta_2$  et  $\beta_3$  sont très certainement corrélés puisque participant au même phénomène coopératif.

## **I.E.2. Modes de relaxation de la peau à l'état lyophilisé**

### **I.E.2.1. Thermogrammes CTS globaux**

Afin de s'affranchir de la réponse de l'eau, qui amène une complexité évidente aux thermogrammes CTS, et qui compromet une exploration aux températures supérieures à 0°C, il est souvent nécessaire d'étudier la réponse diélectrique des protéines et tissus biologiques à l'état lyophilisé [41–43].

Dans ce cas, la peau n'est pas étudiée dans son état natif et la plupart des informations associées à son organisation hydrique sont perdues. Cependant, les études à l'état lyophilisé ont montré dans le passé leur capacité à dégager des marqueurs de la dynamique intrinsèque des protéines constitutives des tissus conjonctifs tels que les tissus cardiovasculaires [43], la peau de rat [41,42]. Il est ainsi primordial de vérifier cette faisabilité sur la peau humaine lyophilisée.

Les échantillons peuvent être déshydratés directement dans le cryostat de mesure à basse température (-50°C) et sous pompage primaire pendant 14h, ce qui s'apparente à une lyophilisation.

Nous avons reporté sur la Figure 59 les thermogrammes CTS successifs d'une biopsie de peau abdominale enregistrés après une polarisation de 400V/mm à 5°C avec les électrodes bloquantes.

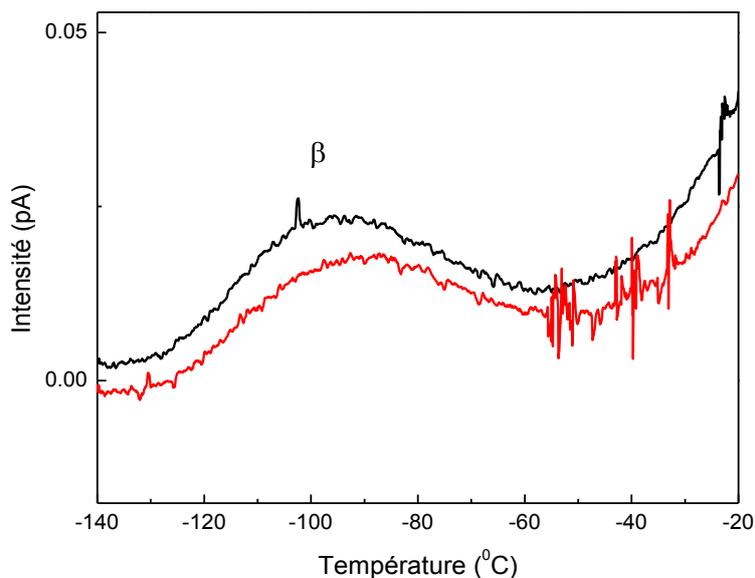
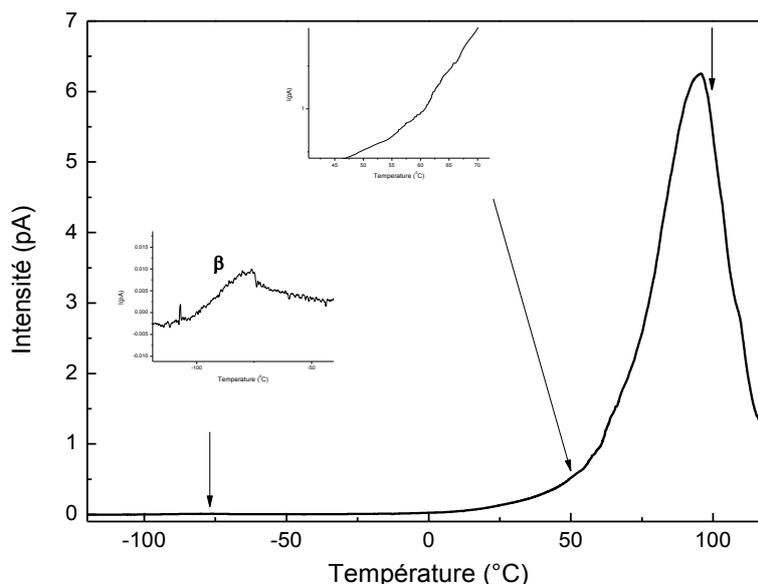


Figure 59: thermogrammes CTS globaux d'une biopsie de peau abdominale lyophilisée après polarisation à  $-5^{\circ}\text{C}$

On observe un large pic reproductible peu intense centré autour de  $-95^{\circ}\text{C}$ , dont l'intensité varie proportionnellement au champ électrique appliqué (résultats non montrés). Par analogie avec les travaux antérieurs, ce mode retrouvé de façon universelle dans les protéines et tissus lyophilisés a été dénommé mode  $\beta$  [43,44]. Il est associé à la réorientation des groupes hydrophiles des protéines et de l'eau liée (eau de la première couche d'hydratation) [41]; associé à un mouvement localisé, c'est ainsi un marqueur de la mobilité intramoléculaire.

Nous avons reporté sur la Figure 60 le thermogramme CTS d'une biopsie de peau abdominale enregistré après une polarisation de  $400\text{V}/\text{mm}$  à  $100^{\circ}\text{C}$ .

Dans l'agrandissement de la zone basse température, nous pouvons détecter le mode  $\beta$  précédemment décrit à  $-72^{\circ}\text{C}$ . Nous constatons que la température du mode  $\beta$  augmente avec la déshydratation tandis que son amplitude diminue. Ce comportement est cohérent avec les études antérieures [43] effectuées sur l'élastine et le collagène pur ou les tissus conjonctifs lyophilisés. Le mode  $\beta$ , associé aux mouvements localisés des séquences polaires de la protéine combinés aux molécules d'eau liées, est facilité en présence d'eau liée. Lors d'une lyophilisation suivie d'un chauffage à  $100^{\circ}\text{C}$  (à la température de polarisation), une partie importante de l'eau liée aux protéines est éliminée, entraînant une perte de mobilité intramoléculaire des séquences hydrophiles.



*Figure 60: thermogramme CTS global d'une biopsie de peau abdominale lyophilisée après une polarisation à 100°C*

Entre 40 et 70°C, nous observons des événements visibles sous forme d'épaulements reproductibles sur l'ensemble des biopsies abdominales étudiées ; par comparaison avec les travaux antérieurs [42,43,295] sur le collagène pur et les tissus cardiovasculaires riches en collagène, ces modes sont associés à la signature spécifique du collagène (cf. Figure 8, annexe B). Ces événements ont été attribués précédemment [43,408] aux mouvements relatifs des molécules de tropocollagène les unes par rapport aux autres. Difficilement décomposables en spectres élémentaires car peu distribués, ils sont très certainement la manifestation de transitions de phase plutôt que de modes de relaxation (modes isothermes, indépendants de la fréquence).

Enfin, un pic intense est observé à 90 °C. Par analogie avec les travaux antérieurs sur le collagène pur et les tissus riches en collagène [42,43], il a été associé à des mouvements délocalisés (de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres) le long des chaînes de collagène. Dans le collagène déshydraté pur, ce mode de relaxation a pu être associé à la manifestation diélectrique de la transition vitreuse du collagène [43]; une étude de la structure fine a montré que les mouvements mis en jeu étaient précurseurs du phénomène de dénaturation qui se produit dans ce cas autour de 230°C. Il est à noter que le mode haute température est très sensible à son histoire thermique.

### I.E.3. Normalisation des thermogrammes CTS complexes

Il est important de déterminer précisément la surface des biopsies après lyophilisation dans la cellule de CTS afin de pouvoir normaliser les spectres CTS et de comparer par la suite les intensités des pics de relaxation. Pour cela, nous avons utilisé *ImageJ*, logiciel Java libre initialement développé pour analyser des images médicales par le *National Institute of Health*.

Une image numérique est composée de pixels ; l'une des fonctions de ce logiciel est de convertir les pixels en longueur physique, après étalonnage préalable.

Une fois l'étalonnage établi, il est possible de déterminer la surface des biopsies, assimilées à des polygones, comme indiqué sur la Figure 61. Pour chaque échantillon, la valeur de la surface retenue correspond à la moyenne sur 3 mesures.

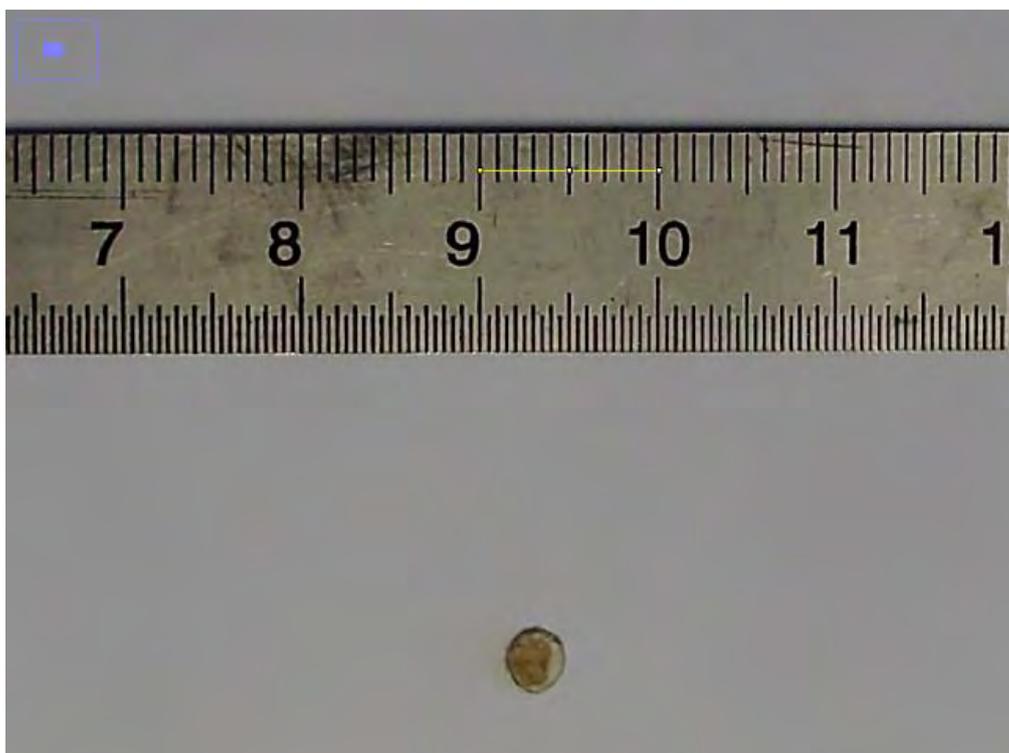


Figure 61 : prise de mesure

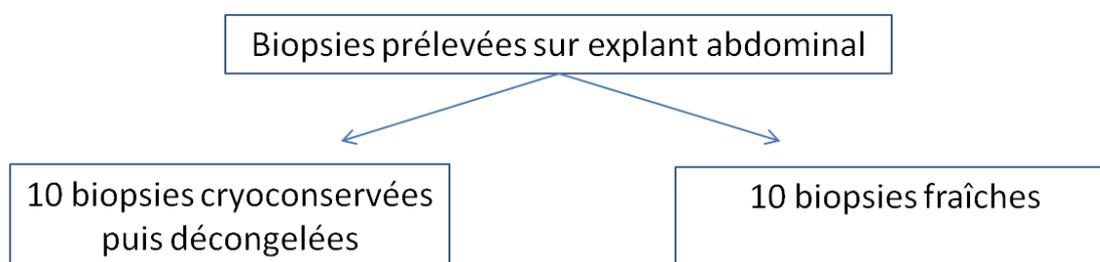
## II. Validation du protocole de conservation des biopsies – recherche de nouveaux biomarqueurs

Comme les études ultérieures seront nécessairement réalisées à partir de biopsies cutanées trempées dans l'azote liquide puis stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dès leur prélèvement, il a été primordial de déterminer l'influence de la congélation sur la réponse vibrationnelle et thermique des biopsies. Etant donné que l'analyse par CTS nécessite une trempe jusqu'à  $-150^{\circ}\text{C}$ , la comparaison des réponses diélectriques de biopsies fraîches et conservées n'a pas été jugée utile.

Cette étude sur un nombre conséquent d'échantillons a aussi permis de rechercher de nouveaux biomarqueurs de l'organisation hydrique et de l'architecture des protéines du derme.

### II.A. Biopsies cutanées abdominales

Un explant de peau abdominale (disque de 22 mm de diamètre) est prélevé chez une patiente de type Caucasiens âgée de 50 ans. Après rinçage dans une solution de PBS et retrait de l'hypoderme, 20 biopsies de 4 mm de diamètre sont prélevées sur l'explant à l'aide d'un punch à biopsie. Chaque biopsie est déposée sur une gaze et conservée dans un tube Eppendorf. Une partie des biopsies (biopsies fraîches) est conservée à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures avant analyse. Une autre série de biopsies est trempée dans l'azote liquide puis conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 8 jours avant analyse. Le protocole de décongélation est identique à celui décrit dans la partie I.



*Figure 62 : descriptif des échantillons*

## II.B. Réponse vibrationnelle

### II.B.1. Comparaison des réponses vibrationnelles du derme humain frais et conservé

Nous avons reporté sur la Figure 63 les spectres IRTF moyennés et normalisés à l'amide II des biopsies abdominales fraîches et conservées face derme dans la zone 2000-1000  $\text{cm}^{-1}$ . A titre de comparaison le spectre IRTF du collagène de type I a été superposé sur cette figure.

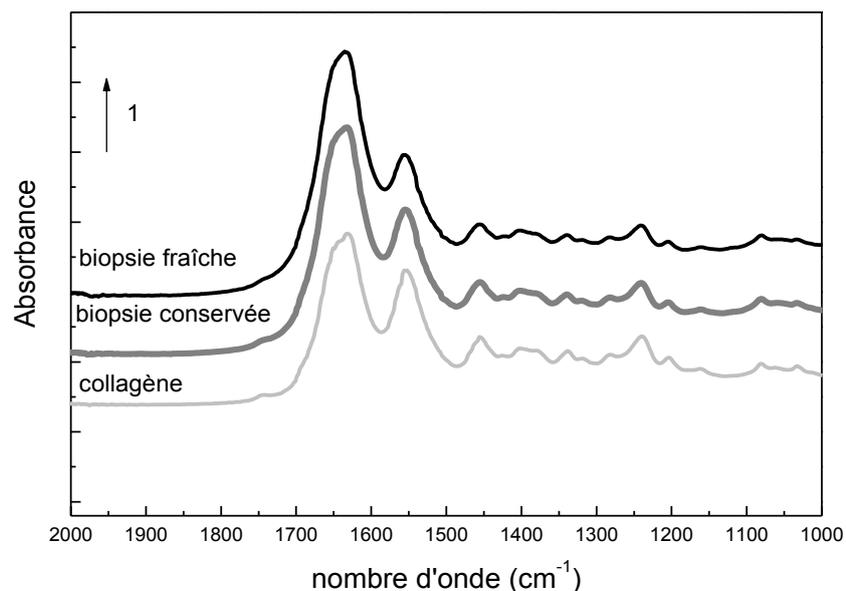


Figure 63 : spectres IRTF moyennés normalisés du derme humain abdominal frais et conservé et du collagène de type I hydraté - zone [2000-1000  $\text{cm}^{-1}$ ]

Les bandes d'absorption classiques des protéines (amide I, II, III) se retrouvent sur les spectres du derme frais et conservé et leurs positions sont identiques dans les deux cas. En particulier, les bandes d'absorption caractéristiques du collagène dans la région d'empreinte digitale (le triplet spécifique de bandes à 1204, 1238 et 1280  $\text{cm}^{-1}$  ainsi que la bande spécifique à 1338  $\text{cm}^{-1}$ ) sont parfaitement reproductibles dans les échantillons frais et conservés.

Nous avons aussi comparé les spectres de dérivées secondes (Figure 64) qui permettent d'augmenter la résolution.

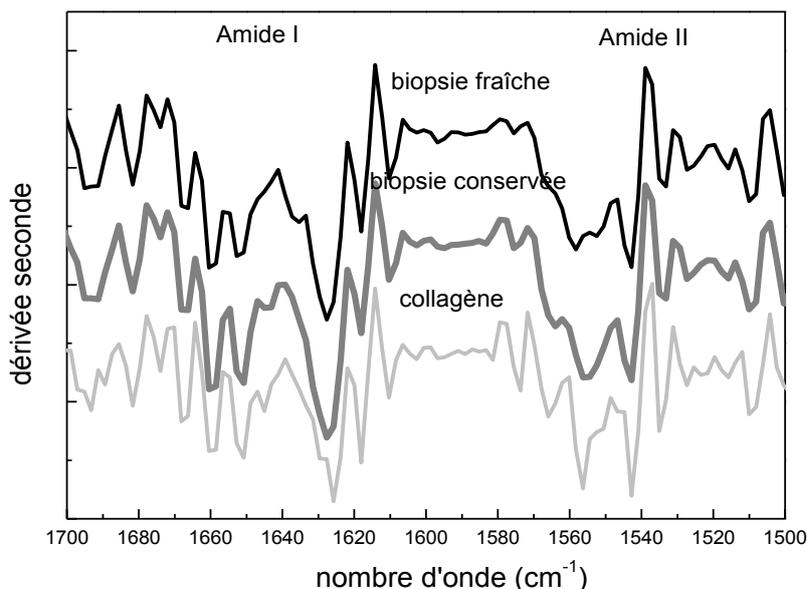


Figure 64: dérivées secondes moyennées des spectres IRTF du derme abdominal frais et conservé et du collagène de type I hydraté

Les minima principaux de l'amide I et II sont retrouvés aux mêmes nombres d'onde pour les biopsies fraîches et congelées, mettant en évidence la préservation des structures secondaires des protéines avec la conservation à basse température.

On retrouve aussi la corrélation étroite entre le collagène et le derme frais/conservé, avec des minima principaux de l'amide I et de l'amide II aux mêmes nombres d'onde tels que 1694, 1682, 1667, 1659, 1651  $\text{cm}^{-1}$  sur amide I et 1555, 1543, 1534  $\text{cm}^{-1}$  sur amide II.

## II.B.2. Recherche de biomarqueurs de l'intégrité du collagène dans le derme

Une série de biopsies fraîches a été dénaturée par chauffage à  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  de 20 à  $85^{\circ}\text{C}$  dans des récipients hermétiques. Les spectres IRTF moyennés du derme frais et dénaturé dans la zone amide I/II, ainsi que les dérivées secondes de ces spectres et leur traitement par FSD dans la zone amide I sont reportés dans les figures ci-jointes.

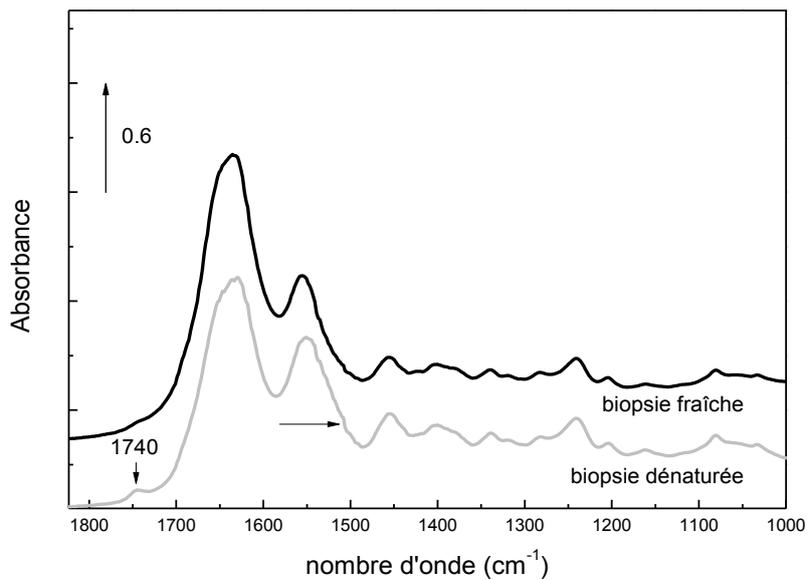


Figure 65: spectres IRTF de derme frais et dénaturé à la chaleur dans la zone  $[1800-1000 \text{ cm}^{-1}]$

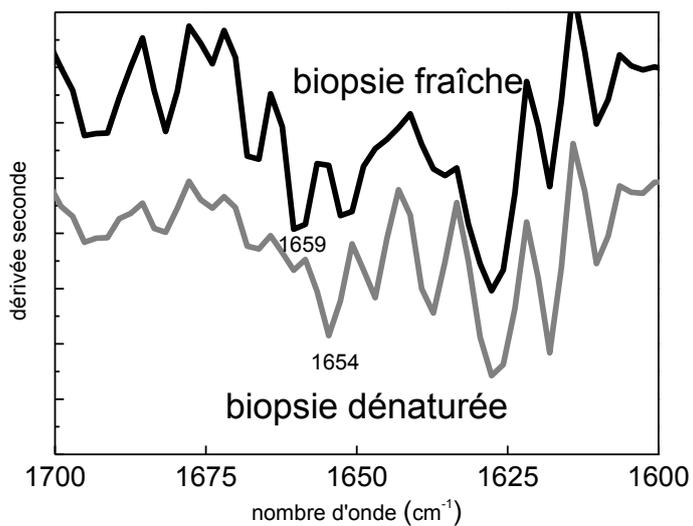


Figure 66: dérivées secondes des spectres IRTF dans la zone amide I

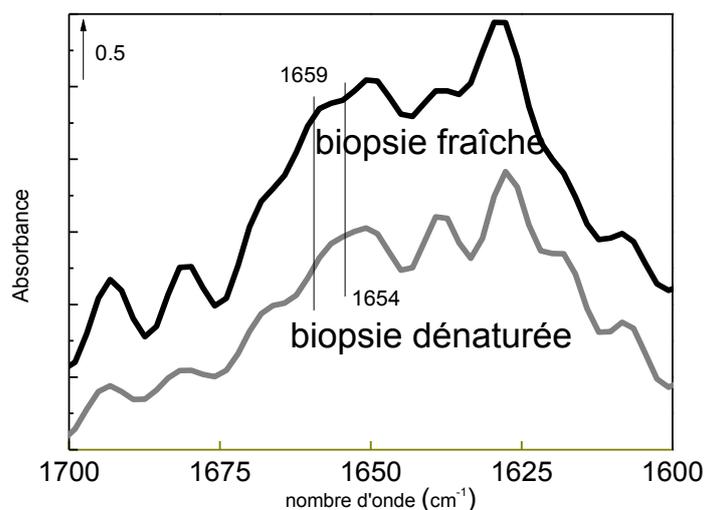


Figure 67: sur-résolution FSD des spectres IRTF dans la zone amide I

La comparaison entre les spectres IRTF du derme frais et dénaturé met en évidence deux différences principales:

- la première est l'augmentation de la bande de vibration à  $1740\text{ cm}^{-1}$ , attribuée à la vibration d'élongation du groupe carbonyle des fonctions ester. Une telle augmentation a déjà été détectée pour la gélatine [337,338] mais aucune hypothèse n'a été proposée jusqu'à maintenant pour l'expliquer. Nous pouvons supposer qu'elle provient d'une altération chimique du collagène dans le derme se produisant au cours du chauffage.

- la deuxième différence importante est le décalage de la bande amide II vers les faibles nombres d'onde ( $2\text{ cm}^{-1}$ ) pour le derme dénaturé (cf. Figure 65). Un tel comportement a déjà été rapporté dans les travaux antérieurs sur des films de collagène dénaturé par la chaleur [338]. Cette évolution vers les faibles nombres d'onde de la bande amide II peut être expliquée par l'effondrement de la structure en triple hélice du collagène et l'augmentation des zones désordonnées [338].

La comparaison entre les spectres de dérivée seconde ou les spectres FSD dans la zone de l'amide I souligne l'évolution des structures secondaires avec la dénaturation.

La différence la plus flagrante est la diminution de la bande à  $1659\text{ cm}^{-1}$  (précédemment adressée à la structure alpha hélicoïdale) [326] et l'apparition d'une nouvelle bande à  $1654\text{ cm}^{-1}$  qui peut être attribuée à des structures en hélices déstabilisées ou des structures désordonnées. Cette évolution avec la dénaturation a déjà été observée dans la littérature [337,338]. Elle confirme l'attribution de la bande d'absorption à  $1659\text{ cm}^{-1}$  à la signature

vibratoire de la triple hélice du collagène natif. Cette bande d'absorption peut être considérée comme un bon marqueur biologique de l'intégrité de collagène dans le derme, tandis que la bande d'absorption à  $1654\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à un marqueur du collagène modifié.

## II.C. Réponse thermique (ACD)

### II.C.1. Mesures de thermoporométrie sur les biopsies fraîches et conservées

L'ACD peut être utilisée pour déterminer la distribution de taille de pore dans les matériaux poreux ou tissus [409–412].

Ces études dites de thermoporométrie doivent être effectuées à très faible vitesse de chauffage.

Les thermogrammes ACD des biopsies fraîches et conservées enregistrés à  $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$  après un refroidissement à  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  suivi d'un équilibre pendant 10 min à  $-30^\circ\text{C}$  sont reportés dans la Figure 68.

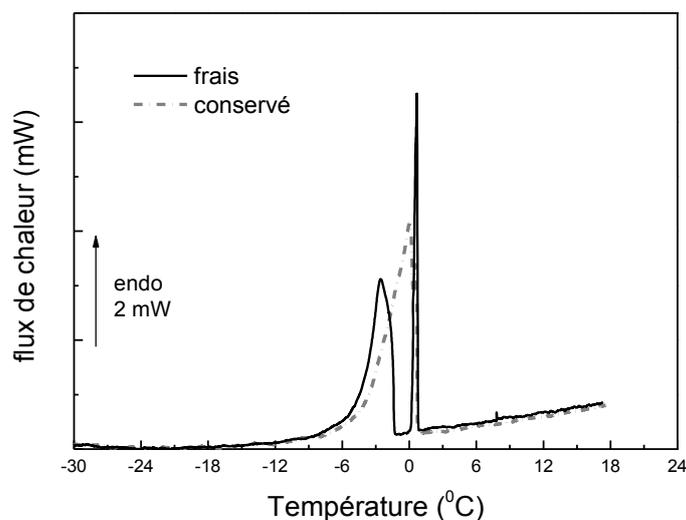


Figure 68 : thermogrammes ACD des biopsies fraîches et conservées à  $0,5^\circ\text{C min}^{-1}$

Sur les deux thermogrammes, deux pics endothermiques distincts ont été enregistrés dans la zone de fusion de la glace, ce qui met en évidence l'existence de lacunes remplies d'eau dans ces biopsies. Comme couramment observé dans les matériaux hydrophiles mésoporeux, les pics à basse température sont associés à la fusion de la glace confinée dans les lacunes tandis que les pics à plus haute température résultent de la fusion de la glace à l'extérieur des lacunes (excès d'eau) [409–412].

En se basant sur l'effet de Gibbs-Thomson, *Brun et al.* [409] ont établi que le rayon  $r_p$  de lacunes cylindriques hypothétiques remplies d'eau et le volume différentiel de ces lacunes  $dV/dr_p$  pouvaient être déterminés à partir de la chute  $\Delta T$  du point de fusion et du flux de chaleur  $dQ/dt$ . Les équations sont les suivantes :

$$r_p(nm) = \frac{-32.33}{\Delta T} + 0.68 \quad \text{avec } \Delta T = T - T_0 \text{ et } -40 < \Delta T < 0 \quad (8)$$

$$\frac{dV_p}{dr_p} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{dt}{d(\Delta T)} \times \frac{d(\Delta T)}{dr_p} \times \frac{1}{m \Delta H_f(T) \rho(T)} \quad (9)$$

où  $d(\Delta T)/dt$  est la vitesse de balayage,  $m$  est la masse de matière sèche,  $\Delta H_f$  l'enthalpie de fusion de l'eau,  $\rho$  la masse volumique de l'eau.

Les valeurs suivantes ont été utilisées pour l'eau :

$$\Delta H_f(T) = 334.1 + 2.119T - 0.00783T^2 \text{ (J Kg}^{-1}\text{) avec } \rho(T) = 0.917(1.032 - 1.17 \cdot 10^{-7}T) \text{ (Kg.m}^{-3}\text{) [413].}$$

$T_0$  a été déterminée expérimentalement comme étant le  $T_{onset}$  du second pic endothermique.

Dans le cas du derme, matériau fibreux, une géométrie cylindrique pour les lacunes est une approximation raisonnable [414–416].

En utilisant l'équation (8), l'axe des températures peut être converti en une échelle de taille des lacunes. Après une étape de soustraction de la ligne de base, le flux de chaleur  $dQ/dt$  est converti en un volume différentiel de pores en utilisant l'équation (9). Les distributions différentielles de tailles de lacunes pour les biopsies fraîches et conservées sont présentées sur la Figure 69.

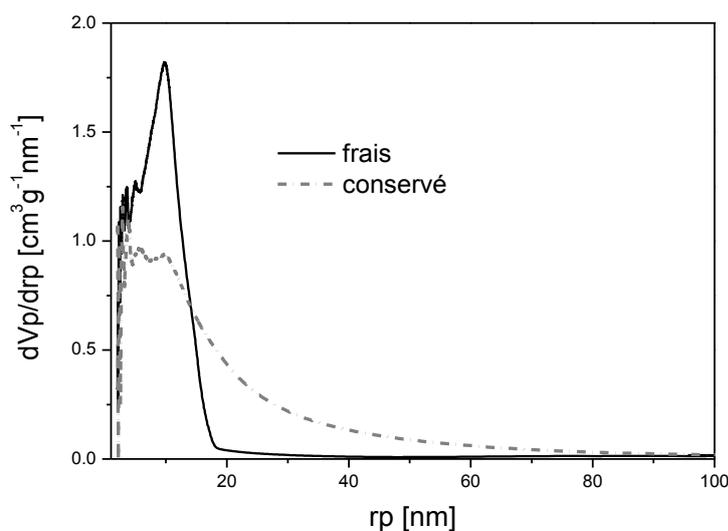


Figure 69 : distributions de taille des lacunes pour les biopsies fraîches et conservées

Sur la Figure 69, nous pouvons noter une distribution de taille relativement étroite pour la peau fraîche ; étant donné que le rayon des lacunes est compris entre 0 et 20 nm, elles font partie de la classe des mésopores. Le protocole de stockage (trempe et stockage à -20°C pendant 8 jours) conduit à un élargissement de la distribution de la taille des lacunes, avec la formation de macropores de rayon de 20 à 60 nm.

### II.C.2. Quantification de l'eau dans les biopsies fraîches et conservées

Le protocole présenté dans le paragraphe I.D.2.1. (basé sur l'exploitation de l'endotherme de fusion de la glace enregistré en ACD à 10°C/min) a été utilisé sur les séries de biopsies fraîches et conservées afin de déterminer l'organisation hydrique de ces échantillons.

A titre d'exemple, nous avons reporté sur la Figure 70 les thermogrammes représentatifs de biopsies fraîches et conservées dans la zone de cristallisation/fusion de la glace.

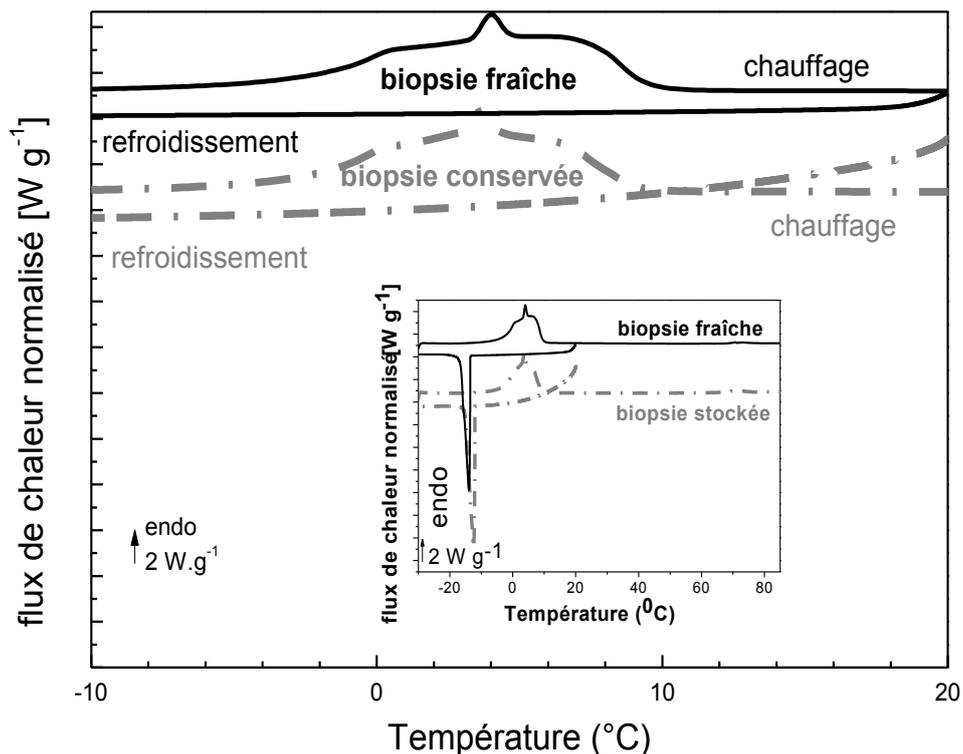


Figure 70 : thermogrammes ACD des biopsies fraîches et conservées (refroidissement et de chauffage successifs à  $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  ; élargissement dans la zone  $[-10; 20^{\circ}\text{C}]$  ; thermogrammes entiers en encart

L'endotherme de fusion de la glace, présent sur l'ensemble des échantillons, a été analysé comme précédemment pour déterminer la proportion d'eau cristallisable. Le protocole de déshydratation décrit dans le paragraphe I.C. a été utilisé pour déterminer la proportion d'eau totale. Nous avons reporté dans le tableau 7 de l'annexe B l'ensemble de ces paramètres. Sur la Figure 71 sont reportés les pourcentages moyens d'eau totale, d'eau cristallisable et non cristallisable de ces deux séries de biopsies.

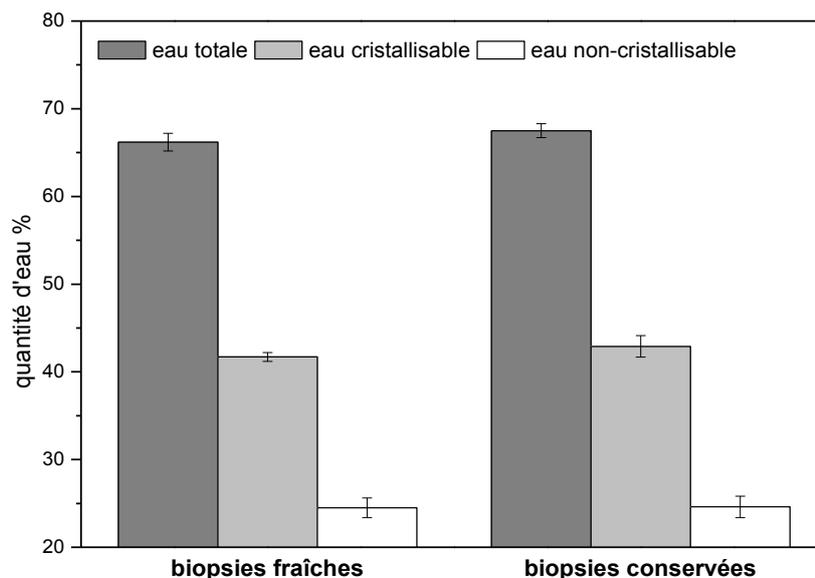
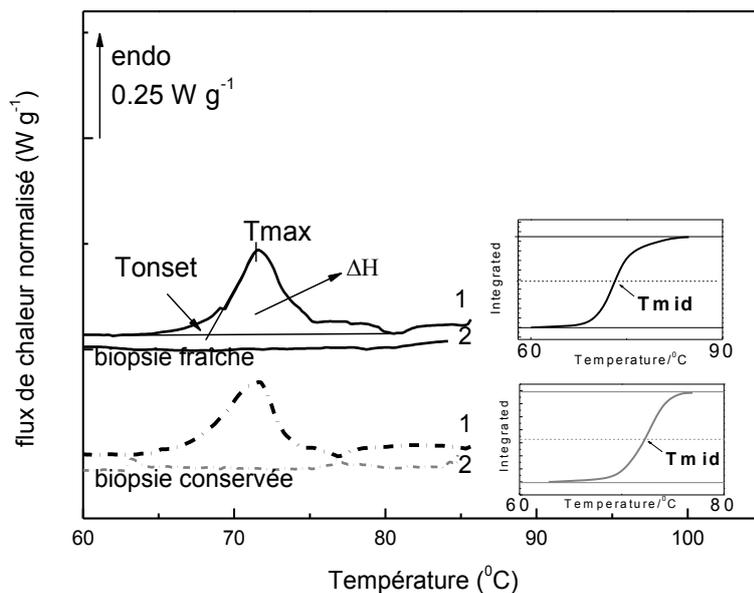


Figure 71: organisation hydrique des biopsies fraîches et conservées

L'analyse statistique n'indique pas de différence significative entre les quantités d'eau totale, d'eau cristallisable et d'eau non cristallisable dans les échantillons frais et conservés, attestant que le protocole de conservation des explants de peau n'induit pas de modification quantitative de l'organisation hydrique des échantillons. La première couche d'hydratation des protéines est bien conservée par le protocole de stockage. D'autre part, l'élargissement des lacunes observé par thermoporométrie n'entraîne pas une augmentation de la quantité d'eau cristallisable avec la trempé dans l'azote liquide.

### II.C.3. Dénaturation de la phase collagénique des biopsies fraîches et conservées

Le protocole détaillé dans le paragraphe I.D.2.2. (basé sur l'exploitation de l'endotherme de dénaturation du collagène enregistré en ACD à 10°C/min) a été utilisé sur les séries de biopsies fraîches et conservées afin de déterminer et de comparer les paramètres caractéristiques de la dénaturation thermique de la phase collagénique de ces échantillons. A titre d'exemple, nous avons reporté sur la Figure 72 les thermogrammes représentatifs de biopsies de peau abdominale fraîche et conservée dans la zone de dénaturation du collagène.



*Figure 72: thermogrammes ACD pour les biopsies fraîches et conservées (premier et second chauffage, vitesse de balayage  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , élargissement dans la zone (60-85°C)*

Dans tous les cas, l'endotherme associé à la dénaturation de la phase collagénique est détectable dans cette zone.

Afin de caractériser plus finement l'endotherme de dénaturation, nous avons dans ce cas reporté aussi le paramètre  $T_{mid}$ , qui représente la température à laquelle 50% de collagène est dénaturé. L'intégrale du flux de chaleur est reportée dans l'encart de la Figure 72 et permet la détermination de  $T_{mid}$ .

Nous avons reporté dans le tableau 8 de l'annexe B l'ensemble des paramètres caractéristiques de l'endotherme de dénaturation (à savoir  $T_{onset}$ ,  $T_{max}$ ,  $T_{mid}$  et  $\Delta H_d$ ) obtenus sur les biopsies fraîches et conservées. Sur la Figure 73 sont reportées les valeurs moyennes de ces paramètres caractéristiques pour les deux séries de biopsies, accompagnées de leur erreur standard.

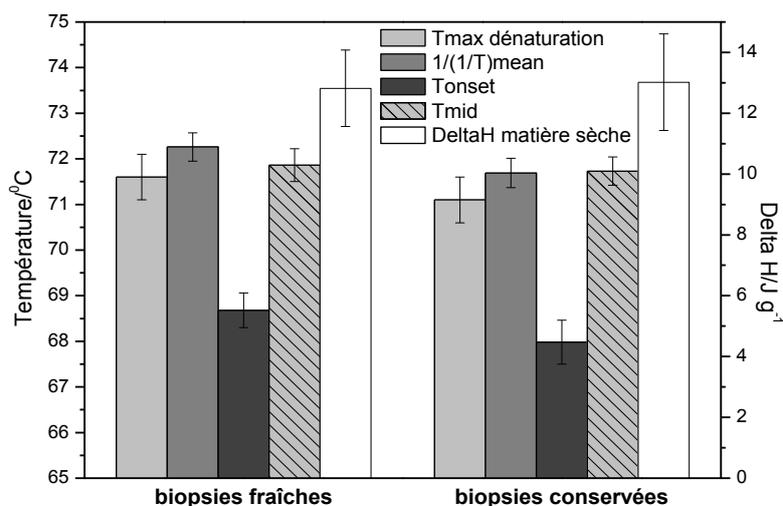


Figure 73 : caractéristiques thermiques de l'endotherme de dénaturation des biopsies de peau abdominale fraîches et conservées

La température  $T_{max}$ , qui est la plus couramment utilisée comme valeur de la température de dénaturation est de  $71,6^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  dans les biopsies de peau fraîche et de  $71,1^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  pour les biopsies conservées, sans différence significative entre ces deux valeurs. Il doit être souligné que  $T_{max}$  est déterminée avec une très faible erreur standard pour les échantillons étudiés, ce qui valide l'utilisation de l'ACD pour quantifier le phénomène de dénaturation.

De manière similaire, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de température  $T_{mid}$  et  $T_{onset}$  des biopsies fraîches et conservées.  $T_{onset}$  est bien sûr situé dans une zone inférieure à  $T_{max}$ , et les barres d'erreur de  $T_{onset}$  sont un peu plus larges que celles associées à  $T_{mid}$ .

Étant donné que la dénaturation du collagène dans la peau un phénomène multi-étape [268,272,273], il peut être aussi être intéressant de calculer la température moyenne réciproque  $(1/T)_{mean}$ , qui est plus représentative de l'asymétrie de l'endotherme de dénaturation et qui a été proposée par Miles et al. [273] :

$$\frac{\bar{1}}{T} = \int_{T_i}^{T_f} \frac{1}{T} \frac{C_p}{\Delta H} dT \quad (10)$$

Où  $T_i$  et  $T_f$  sont les limites de température inférieures et supérieures des endothermes. Nous avons ainsi compilé ce nouveau paramètre (cf. Tableau 8 annexe B). Pour une meilleure comparaison, l'inverse de  $(1/T)_{mean}$  a été converti en  $^{\circ}\text{C}$  et sa valeur moyenne reportée sur la figure précédente. La réciproque de  $(1/T)_{mean}$ , qui doit être égale à  $T_{max}$  pour un pic

endothémique étroit et symétrique, est dans notre cas légèrement supérieure à  $T_{max}$ ; ceci souligne l'asymétrie du pic endothermique dans des échantillons de peau, comme déjà observé sur d'autres tissus collagénique [273]. L'erreur standard est très faible pour ce paramètre. Comme il prend en compte l'asymétrie du pic (lié à la proportion de liaisons transversales stables à la chaleur), par opposition à  $T_{max}$ ,  $T_{onset}$ , et  $T_{mid}$ , il peut être considéré comme un des biomarqueurs préférentiels de la stabilité thermique du collagène ; il est important de noter que nous n'observons pas d'évolution significative de ce biomarqueur plus fin de la stabilité thermique du collagène avec le protocole de stockage.

L'enthalpie de dénaturation moyenne de la peau fraîche humaine est évaluée à  $12,8 \text{ J.g}^{-1}$  de matière sèche, avec un écart type d'environ 10%, ce qui correspond parfaitement aux données de *Wiegand et al.* [275]. Aucune différence significative n'a été relevée entre les valeurs moyennes de  $\Delta H$  pour les biopsies fraîches et conservées.

Ainsi l'ensemble des valeurs caractéristiques de l'endotherme de dénaturation n'évolue pas de façon significative avec le stockage à basse température suivi d'une décongélation contrôlée, attestant que ce protocole de conservation ne porte pas atteinte à la stabilité thermique des collagènes dans la peau humaine.

### III. Conclusion

Nous avons pu vérifier la capacité des trois techniques de caractérisation (ACD, IRTF et CTS) pour extraire des informations fiables et reproductibles sur des biopsies cutanées humaines extraites d'explant abdominaux, à la fois à l'état hydraté et lyophilisé.

Dans un premier temps, nous avons pu valider l'utilisation de la spectroscopie IRTF en mode ATR et le traitement des spectres pour indexer les différentes bandes d'absorption du derme et pour distinguer les différents types de structures secondaires des protéines dans ce tissu complexe.

Dans un deuxième temps, nous avons établi un protocole ACD pour déterminer à la fois :

- l'organisation hydrique de la peau via la quantification de l'eau cristallisable et de l'eau non cristallisable,
- la stabilité thermique de la phase collagénique, via l'étude de l'endotherme de dénaturation.

Dans un troisième temps, la technique des CTS nous a permis de sonder la peau sur une large gamme de temps/longueur, et de mettre en évidence des modes de relaxation associés aux différentes couches d'hydratation, et à la dynamique localisée et délocalisée des protéines dans ce tissu.

Grâce à l'utilisation combinée de l'ACD et de la spectroscopie IRTF, nous avons pu évaluer l'effet de la trempe dans l'azote liquide et de la conservation à basse température sur la peau humaine abdominale. Nous avons tout d'abord vérifié par thermoporométrie que la peau présentait une structure poreuse ; cette structure particulière de lacunes interconnectées dans la peau est primordiale pour les processus d'échange et pour la fonction de thermorégulation [414]. Excepté l'élargissement de la distribution de taille des lacunes, les différents marqueurs associés à l'organisation hydrique, à la stabilité thermique de la phase collagénique et aux structures secondaires des protéines n'évoluent pas avec ce protocole, qui est donc validé pour l'étude clinique ultérieure. De plus, cette analyse plus fine renforce l'étude préliminaire de faisabilité, montrant que l'ACD et la spectroscopie IRTF sont des techniques bien adaptées pour identifier des biomarqueurs reproductibles et appropriés de l'organisation hydrique et moléculaire de la peau humaine dans des biopsies de petit diamètre.

Ces différents protocoles de mesure ACD, IRTF et CTS pourront être utilisés en routine pour la suite de l'étude sur un grand nombre d'échantillons cryoconservés pour générer les signatures thermiques, vibrationnelles et diélectriques des différentes biopsies cutanées.

---

## *Chapitre III*

---



## Chapitre III. Etude clinique – recherche de biomarqueurs du vieillissement intrinsèque et extrinsèque

Le but de cette étude clinique est d'identifier des biomarqueurs appropriés pour une meilleure compréhension des changements moléculaires et organisationnels dans derme humain au cours des vieillissements intrinsèque et extrinsèque.

### III.A. Descriptif de l'étude clinique

76 sujets au total ont participé à cette étude globale, qui inclut des analyses ultérieures par différentes techniques.

Cette étude monocentrique et comparative a été menée sur deux groupes de sujets de sexe féminin, non enceintes, non-fumeuses, de phototype II et IIIa et répartis en deux groupes de 28 sujets d'âge distinct:

**Groupe 1:** âge compris entre 20 et 30 ans et vieillissement cutané majoritairement intrinsèque (correspondant à un score SCINEXA < 2). *Le score SCINEXA comprend 5 critères caractéristiques du vieillissement intrinsèque et 18 critères caractéristiques du vieillissement extrinsèque de la peau [417]. Ces critères sont utilisés pour définir un indice permettant d'évaluer ces vieillissements).*

**Groupe 2 :** âge supérieur à 60 ans avec signes cliniques de photovieillissement cutané, soit un vieillissement majoritairement extrinsèque (correspondant à un score SCINEXA ≥ 2).

Deux biopsies cutanées de 4 millimètres de diamètre sont prélevées à l'aide d'un punch à biopsie sur chaque sujet:

- sur le haut de la fesse (latéralisation randomisée, sans marques de bronzage), qui est une zone photo-protégée (zone Z01).
- sur la face externe de l'avant-bras gauche, qui est une zone naturellement et fortement photo-exposée (zone Z02).

7 sujets par groupe d'âge sont inclus pour l'analyse ultérieure par chaque technique. Afin de réduire le nombre de biopsies à 2 par sujet (zones Z01 et Z02), les biopsies provenant d'un même sujet sont analysées par un seul groupe de techniques. La répartition des 56 biopsies analysées par IRTF, CTS et ACD est la suivante :

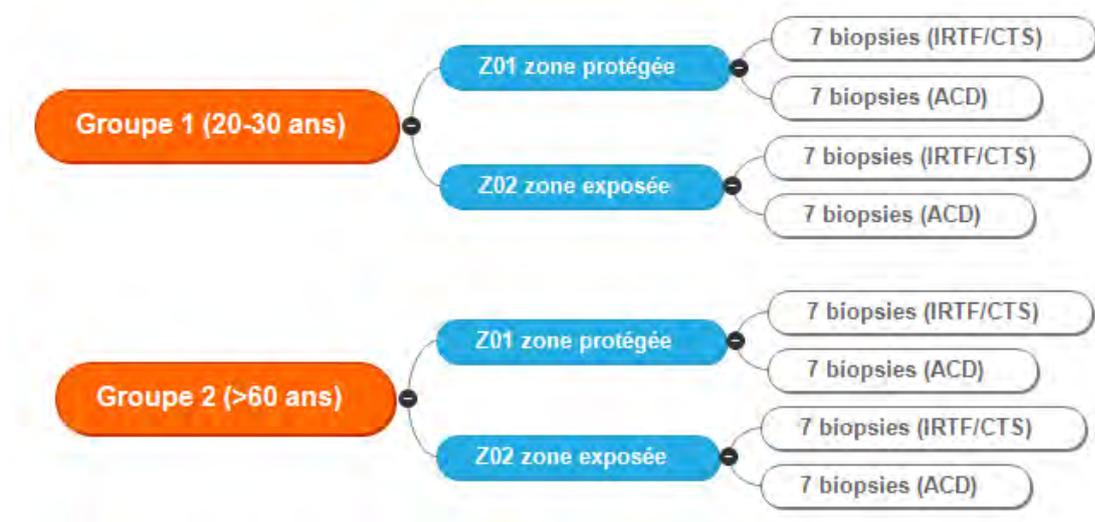


Figure 74 : détail des biopsies par groupe et zone analysées par IRTF, ACD et CTS

Pour des raisons de clarté, dans la suite de l'étude les résultats moyens obtenus sur les séries de biopsies provenant des différents groupes et zones seront identifiés sur les graphes par les abréviations suivantes :

échantillons	dénomination	abréviation
Groupe 20-30 ans, zone photo-protégée	Groupe 1, Z01	JP (jeunes - protégée)
Groupe 20-30 ans, zone photo-exposée	Groupe1, Z02	JE (jeunes - exposée)
Groupe >60 ans, zone photo-protégée	Groupe 2, Z01	AP (âgés - protégée)
Groupe >60 ans, zone photo-exposée	Groupe2, Z02	AE (âgés - exposée)

Tableau 13 : dénomination et abréviation des 4 séries de biopsies

Après prélèvement, les biopsies sont rincées dans de l'eau stérilisée, épongées, conservées dans des tubes Eppendorf, puis stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 20^{\circ}\text{C}$ ) avant d'être livrées au CIRIMAT où elles sont conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les biopsies sont ensuite décongelées par palier comme détaillé dans le chapitre 2 pour les analyses ultérieures.

Il est à noter que d'autres biopsies provenant du groupe 1 et 2 ont été préparées en vue des

analyses protéomiques et glycomiques par la technologie d'imagerie par spectrométrie de masse couplée à la micro-protéomique (spectrométrie MALDI/Shotgun protéique et glycanique) et par la technique RAMAN et la microscopie biphoton non linéaire.

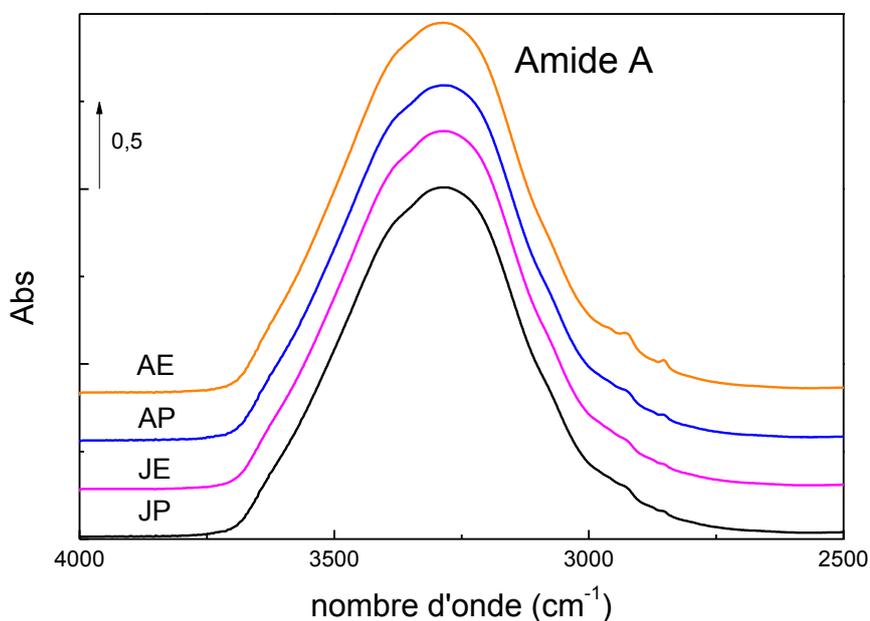
Les mesures biométrologiques (cutométrie et imagerie ultrasonore haute fréquence) et les macrophotographies sont quant à elles réalisées sur l'ensemble des sujets.

Les valeurs moyennes issues des analyses IRTF, ACD et CTS sont accompagnées de leur erreur standard. Nous avons effectué l'analyse unidirectionnelle de la variance (*one-way ANOVA*) pour comparer les moyennes de ces valeurs, en considérant significatives les différences associées à des valeurs de *p* inférieures à 0,05.

### III.B. Réponse vibrationnelle du derme humain

#### III.B.1. Etude qualitative

Nous avons représenté sur la Figure 75 les spectres IRTF normalisés et moyennés des 4 séries de biopsies provenant des zones protégées et exposées des sujets jeunes et âgés enregistrés sous hydratation constante dans les conditions validées dans le chapitre 2, paragraphe I.B.2.



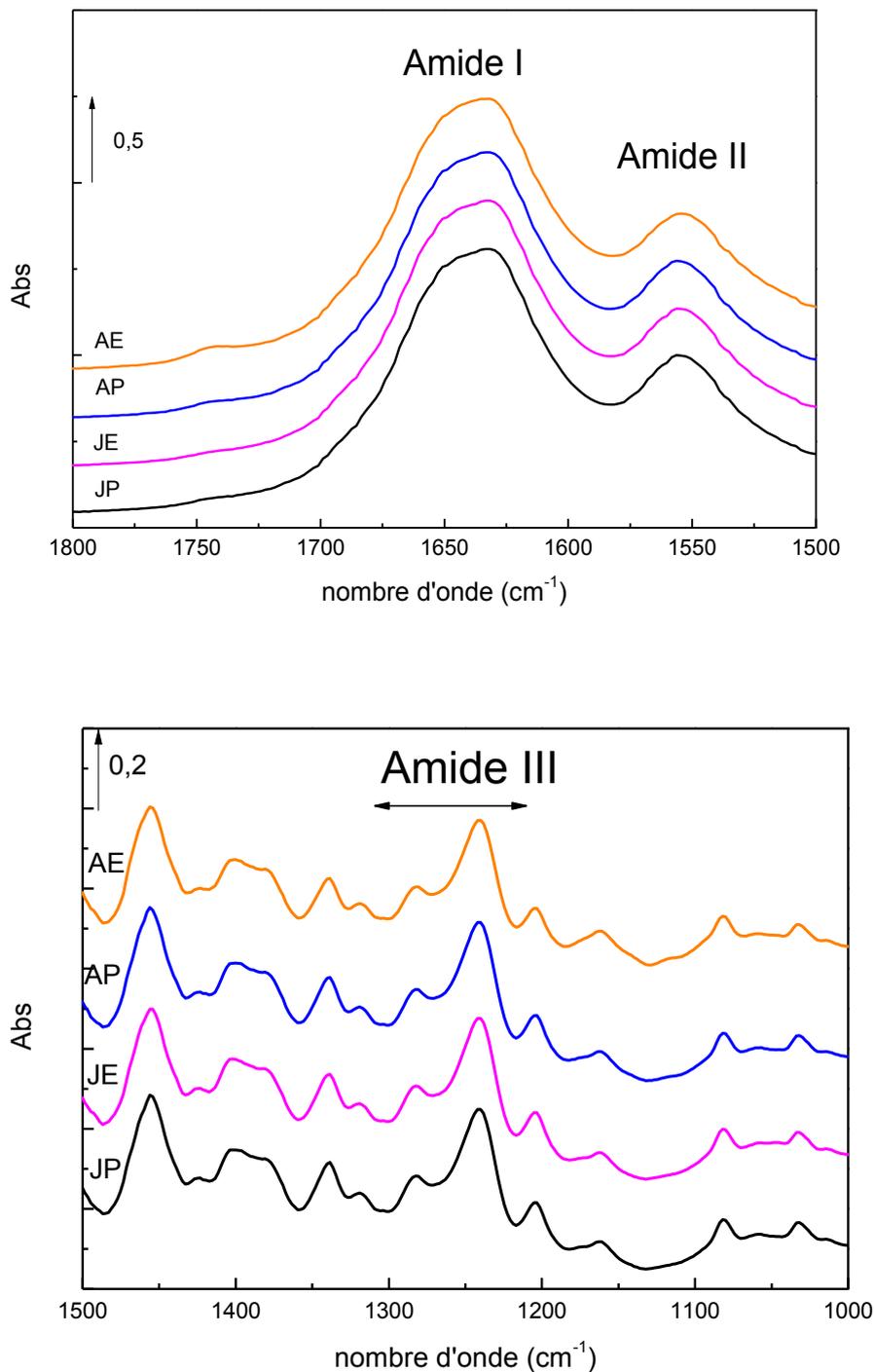


Figure 75 : spectres IRTF moyens des 4 séries de biopsies dans les zones [4000-2500] cm<sup>-1</sup>, [1750-1500] cm<sup>-1</sup> et [1500-1000] cm<sup>-1</sup>, du derme réticulaire

Nous retrouvons pour ces 4 séries de biopsies les bandes classiques d'absorption (amide A, amide I, II, III en particulier) précédemment mises en évidence pour l'étude de faisabilité sur le derme abdominal, avec en particulier la signature spécifique du collagène. L'indexation des

principales bandes d'absorption enregistrées face derme pour les quatre séries de biopsies est reportée dans le tableau ci-joint.

Position de la bande/cm <sup>-1</sup>	Indexation
3375-3289	<b>Amide A</b> : $\nu(\text{O-H})$ libre, $\nu(\text{O-H})$ lié, $\nu(\text{N-H})$ libre et $\nu(\text{N-H})$ lié Non sensible au squelette carboné; dépendant des liaisons hydrogène (inter et intramoléculaires), de l'hydratation
3073	$\nu(\text{CH})$ aromatique
3011	$\nu(=\text{CH})$ des lipides insaturées, triglycérides, acides gras
2957, 2923, 2873, 2853	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$ , $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ , $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ , $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ (Gly, Pro, Hyp, Ala) des protéines, phospholipides, triglycérides $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$ principalement représentatif des protéines $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ and $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ principalement représentatif des lipides
1744	$\nu(\text{C=O})$ triglycérides, esters de cholestérol, phospholipides
1694-1630	<b>Amide I</b> : $\nu(\text{C=O})$ protéines et $\delta(\text{O-H})$ eau
1558-1542	<b>Amide II</b> : $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$ des protéines
1520, 1515, 1507	Chaînes latérales (Tyrosine, Phénylalanine)
1455	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ des lipides et protéines
1406-1389	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ des acides aminés libres, acides gras, (GAG)s
1338	$\delta_{\text{w}}(\text{CH}_2)$ des chaînes latérales (proline), spécifique de la MEC (collagènes)
1320-1202	<b>Amide III</b> : $\delta_{\text{plan}}(\text{N-H})$ et $\nu(\text{C-N})$ des protéines 1282 cm <sup>-1</sup> : $\delta(\text{CH}_3)$ spécifique collagène 1240 cm <sup>-1</sup> : $\nu(\text{C-N})$ spécifique collagène 1205 cm <sup>-1</sup> : spécifique collagène
1270-1216	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ des phospholipides, acides nucléiques ; $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_3^-)$ des (GAG)s sulfatés
1200-1000	$\nu(\text{C-O})$ , $\nu(\text{C-C})$ , $\nu(\text{C-OH})$ , $\nu(\text{C-O-C})$ des protéines, oligosaccharides, glycolipides 1175 cm <sup>-1</sup> : $\nu_{\text{as}}(\text{CO-O-C})$ des esters de cholestérol, phospholipides 1161 cm <sup>-1</sup> : $\nu(\text{C-OH})$ Hyp et acides nucléiques 1080 cm <sup>-1</sup> : $\nu(\text{C-O-C})$ collagène, oligosaccharides, glycolipides, protéoglycanes, and $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ acides nucléiques et phospholipides 1032 cm <sup>-1</sup> : $\nu_{\text{s}}(\text{CO-O-C})$ dans collagènes et (GAG)s, $\nu_{\text{s}}(\text{SO}_3^-)$ (GAG)s

Tableau 14 : indexation la plus probable des bandes d'absorption IR dans le derme réticulaire des quatre séries de biopsies

La principale observation sur ces spectres IRTF moyens est le décalage du maximum de la bande amide II de  $2\text{ cm}^{-1}$  vers les faibles nombres d'onde pour la série de biopsies des zones photo-exposées des sujets âgés. Cette modification de la bande amide II est également visible sur le spectre de dérivée seconde (Figure 76) et le spectre sur-résolu par FSD (Figure 77). Nous remarquons que la composante à  $1556\text{ cm}^{-1}$  est plus faible en intensité dans cette série de biopsies.

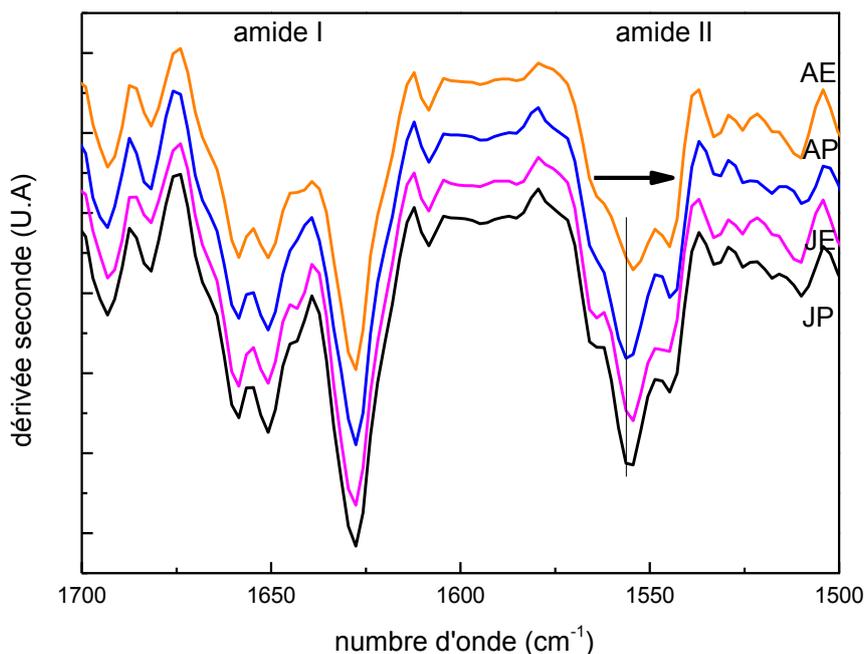


Figure 76 : spectres de dérivée seconde moyens des 4 séries de biopsies dans la zone amide I/II

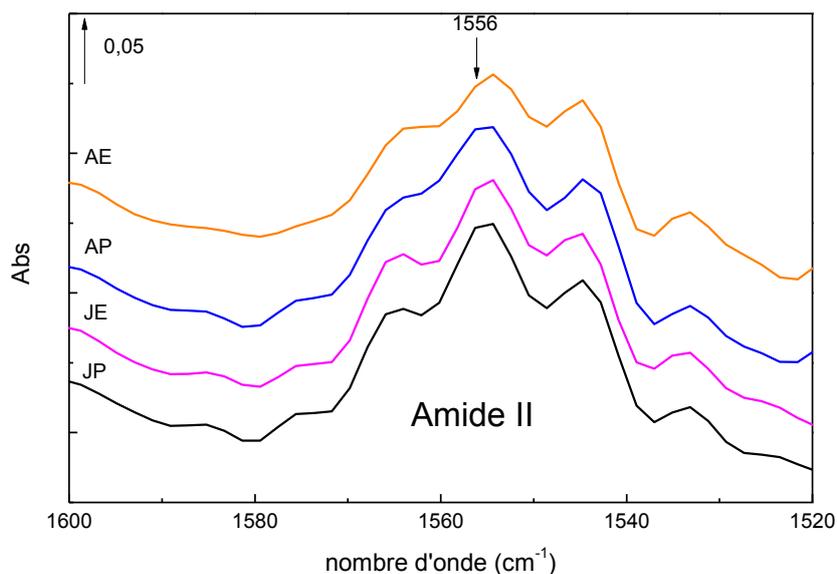


Figure 77 : spectres FSD moyens des 4 séries de biopsies dans la zone des amides I/II

Cette évolution est à rapprocher du décalage de la bande amide II vers les faibles nombres d'onde (de  $2\text{ cm}^{-1}$ ) mis en évidence dans le cas du derme dénaturé thermiquement (chapitre 2, II.B.2), dans lequel il y a effondrement de la structure en triple hélice des collagènes et augmentation des structures secondaires désordonnées, comme observé dans la littérature sur le collagène pur [338].

Afin de vérifier cette modification dans les proportions des différents types de structures secondaires, la sur-résolution FSD et pour les quatre séries de biopsies dans la zone de l'amide I est reportée sur la Figure 78.

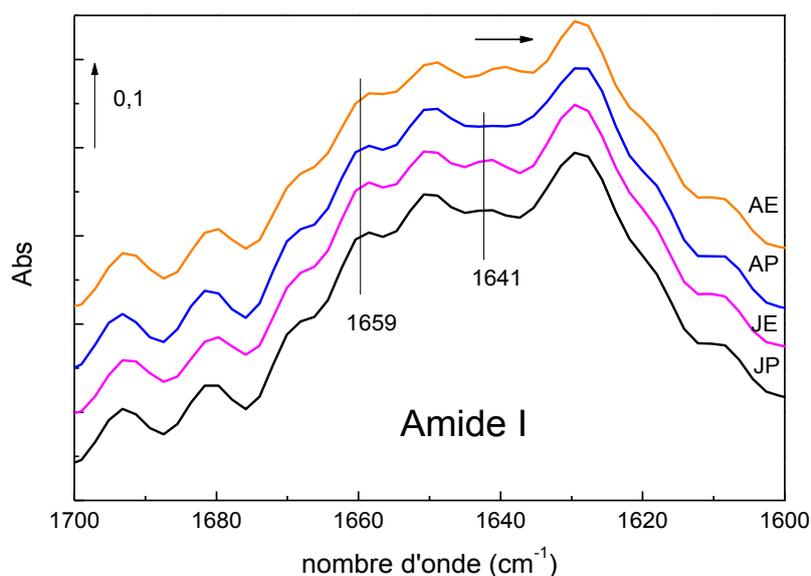


Figure 78 : spectres FSD moyens des 4 séries de biopsies dans la zone de l'amide I

La modification de la bande amide I pour le derme photo-exposé de sujets âgés est bien évidemment moins marquée que l'altération importante mise en évidence dans le cas du derme dénaturé thermiquement (cf. Chapitre 2, II.B.2.).

Nous n'avons pas observé une diminution flagrante de la bande à  $1659\text{ cm}^{-1}$  (associée aux structures  $\alpha$  hélicoïdale [326]) ni l'apparition d'une nouvelle bande à  $1654\text{ cm}^{-1}$  comme dans le chapitre 2, II.B.2. Cependant, nous notons un élargissement de la bande vers  $1654\text{ cm}^{-1}$  (triples hélices déstabilisées).

Une autre remarque concerne l'évolution de la composante autour de  $1641\text{ cm}^{-1}$  (précédemment associée à l'eau intermoléculaire) chez les sujets âgés ; cette composante disparaît pour les biopsies de peau protégée et se décale pour les biopsies de peau exposées. Ces évolutions sont certainement à rapprocher d'une variation dans l'organisation hydrique du derme qui pourra être quantifiée par ACD.

La sur-résolution FSD dans la zone de l'amide III [ $1320\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ] est reportée sur la Figure

79.

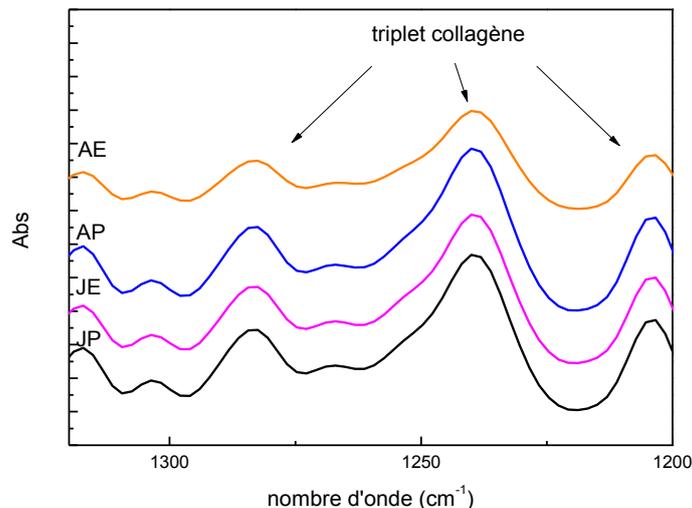


Figure 79 : spectres FSD moyens des 4 séries de biopsies dans la zone de l'amide III

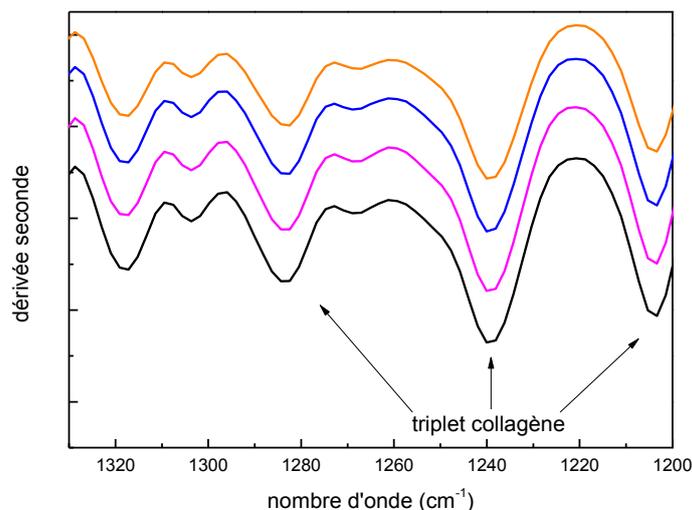


Figure 80 : spectres dérivée seconde moyens des 4 séries de biopsies dans la zone de l'amide III

Dans cette zone, nous n’observons aucun décalage de bande, et le triplet spécifique du collagène (1282, 1239 et 1204  $\text{cm}^{-1}$ ) est bien résolu sur l’ensemble des spectres. Comme nous l’avons vu dans le chapitre 2, l’assignation à des structures secondaires dans cette zone est beaucoup plus délicate que dans la zone amide I, car il existe des interférences importantes avec les bandes de vibration d’autres constituants du derme tels que les phospholipides, les GAGs, etc. Il est à noter que la région (1330-1290/1270-1245  $\text{cm}^{-1}$ ) correspond aux conformations en hélice  $\alpha$  et/ou désordre [369,418–420].

Enfin, la sur-résolution FSD et la dérivée seconde dans la zone [1200-1000  $\text{cm}^{-1}$ ] sont reportées sur les Figure 81 et Figure 82 pour les quatre séries de biopsies.

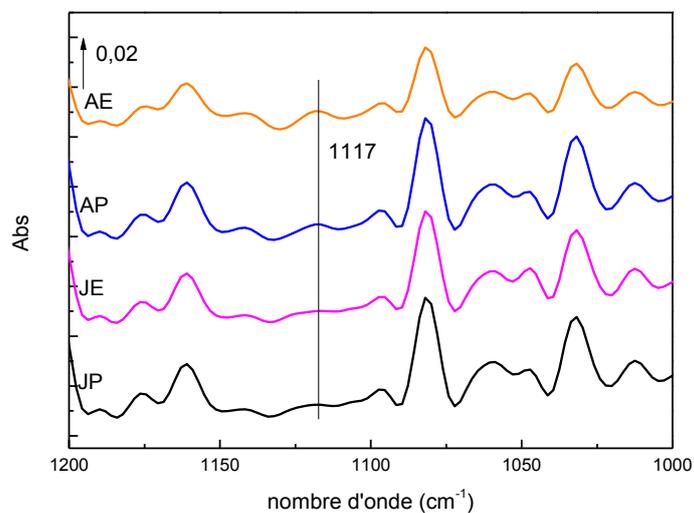


Figure 81 : spectres FSD moyens des 4 séries de biopsies dans la zone [1200-1000  $\text{cm}^{-1}$ ]

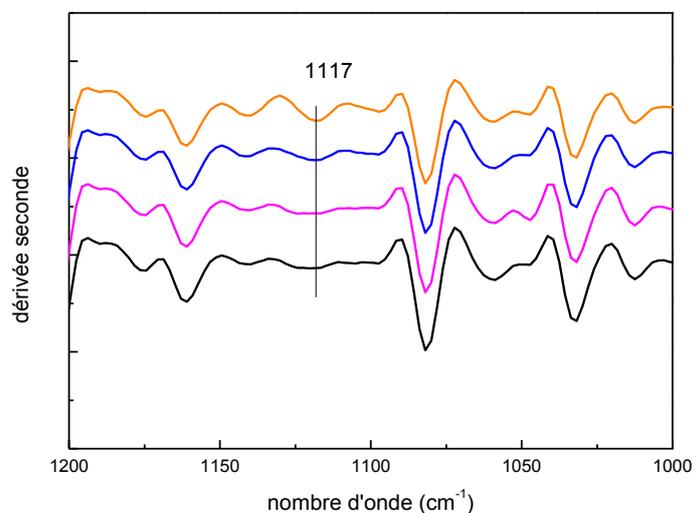


Figure 82 : spectres dérivée seconde moyens des 4 séries de biopsies dans la zone [1200-1000  $\text{cm}^{-1}$ ]

Dans cette zone, la principale modification (qui est aussi détectable sur les spectres IRTF non sur-résolus, cf. Figure 83, agrandissement des spectres globaux) est l'intensification de la bande d'absorption à 1117  $\text{cm}^{-1}$  pour la peau photo-exposée des sujets âgés, qui sera quantifiée par la suite.

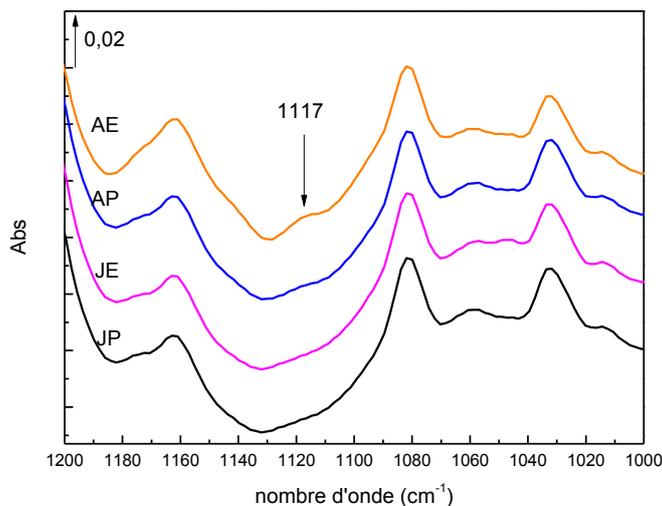


Figure 83 : agrandissement de la Figure 75 dans la zone [1200-1000  $\text{cm}^{-1}$ ]

### III.B.2. Etude quantitative

Afin de comparer quantitativement la réponse vibrationnelle des quatre séries de biopsies, l'aire des différentes bandes d'absorption a été déterminée à partir du spectre IRTF individuel de chaque biopsie. En se référant à la littérature [271,350,351], une série de rapports d'aire pouvant servir d'indicateurs a ensuite été compilée.

Les indicateurs qui nous sont apparus les plus pertinents et qui ont montré des évolutions significatives pour les différentes séries de biopsies sont présentés sur les figures ci-après. Des indicateurs complémentaires sont consultables en annexe C.

Sur la Figure 84 sont reportés les rapports entre l'aire de l'amide A et de l'amide II pour les quatre séries de biopsies.

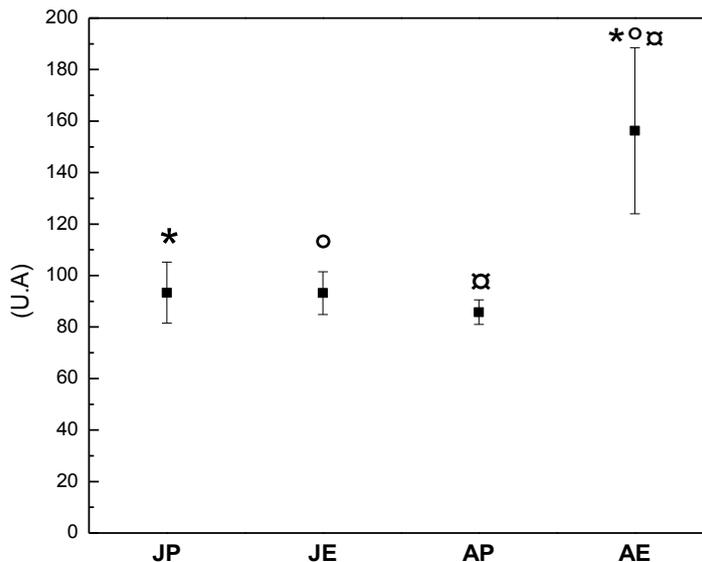


Figure 84 : aire (amide A)/aire (amide II) pour les 4 séries de biopsies

Ce rapport, qui reste constant pour les peaux de sujets jeunes protégées et exposées et les peaux de sujets âgés protégées augmente de manière significative ( $p=0,039$ ) pour la peau photo-exposée des sujets âgés. Cet indicateur apparaît ainsi comme un marqueur du vieillissement extrinsèque. Compte-tenu de l'indexation de l'amide A (cf. Tableau 9), cet indicateur est très certainement associé à une modification importante du réseau de liaisons hydrogène et de l'organisation hydrique dans le cas d'un vieillissement extrinsèque, même s'il nous apparaît délicat de proposer une explication plus poussée compte-tenu de la complexité du mode amide A observé en IRTF.

Sur la Figure 85 sont reportés les rapports entre l'aire de l'amide II et l'aire totale dans la gamme  $[1750-1000\text{ cm}^{-1}]$ .

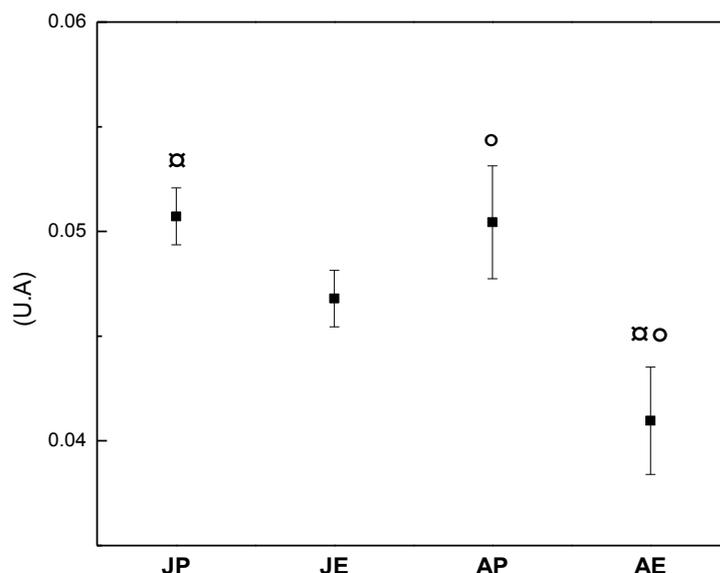


Figure 85 : aire (amide II)/aire totale [1750-1000  $\text{cm}^{-1}$ ] pour les quatre séries de biopsies

Compte-tenu de l'indexation de l'amide II (cf. Tableau 9), ce rapport peut être associé à la fraction protéique dans le derme.

Ce rapport diminue de façon drastique dans la peau photo-exposée des sujets âgés (de 19% entre AE et AP,  $p=0,026$  et entre AE et JP,  $p=0,016$ ). Aucune différence significative n'est retrouvée entre les peaux protégées des sujets jeunes et âgés, ce qui signifie que ce marqueur n'est pas sensible au vieillissement intrinsèque seul.

Aucune différence significative ( $p=0,174$ ) est trouvée pour la peau exposée des sujets jeunes par rapport à la peau protégée chez les jeunes exposés. En revanche, il faut faire attention à l'effet zone pour toutes les comparaisons entre les sites.

Ainsi la fraction protéique apparaît significativement diminuée dans le derme des sujets âgés dont la peau a été exposée de façon cumulative aux UV solaires tout au long de la vie.

Nous avons représenté sur la Figure 86 les rapports entre l'aire de la bande centrée à 1338  $\text{cm}^{-1}$  et l'aire totale dans la gamme [1750-1000  $\text{cm}^{-1}$ ]. La bande à 1338  $\text{cm}^{-1}$  étant spécifique de la MEC et en particulier du collagène [330], le rapport compilé est un indicateur de la fraction de phase collagénique préservée dans le derme papillaire.

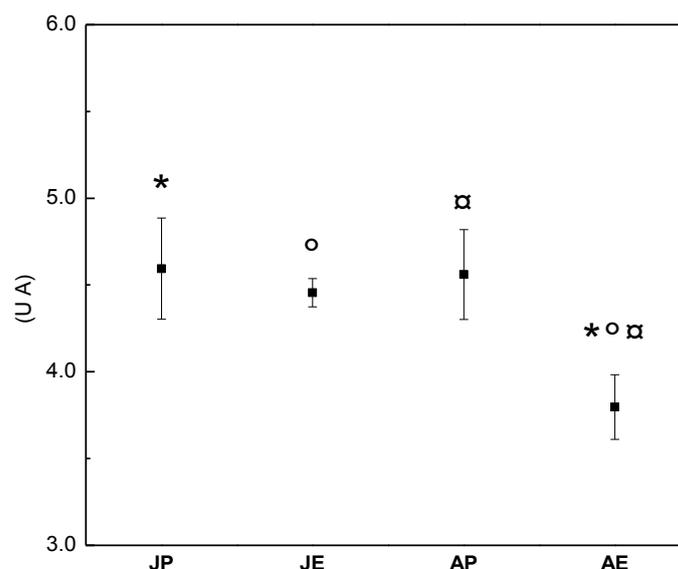


Figure 86 : aire [1357-1327  $\text{cm}^{-1}$ ]/aire [1750-1000  $\text{cm}^{-1}$ ] pour les quatre séries de biopsies

Comme illustré dans la Figure 86, une diminution significative (de 16%,  $p=0,016$ ) est mise en évidence pour la peau photo-exposée de sujets âgés (AE), par rapport à la peau photo-exposée de sujets jeunes (JE), alors que ce rapport reste constant dans les deux groupes d'âge pour la peau protégée. Cette diminution de la fraction de collagène dans le derme avec le vieillissement extrinsèque corrobore le résultat précédent ; principale protéine du derme, sa diminution entraîne la diminution de la fraction totale en protéines dans le derme âgé photo-exposé.

De même que le résultat précédent, la fraction de collagène est identique pour la peau protégée et exposée des sujets jeunes ; il n'y a pas d'effet de la photo-exposition ou d'effet zone dans ce cas.

Nous avons reporté dans la Figure 87 le rapport entre l'aire de la bande centrée à  $1204 \text{ cm}^{-1}$  et l'aire totale dans la gamme [1750-1000  $\text{cm}^{-1}$ ]. Compte-tenu de l'indexation de la bande à  $1204 \text{ cm}^{-1}$ [328,330], ce rapport est un autre indicateur de la fraction de phase collagénique dans le derme.

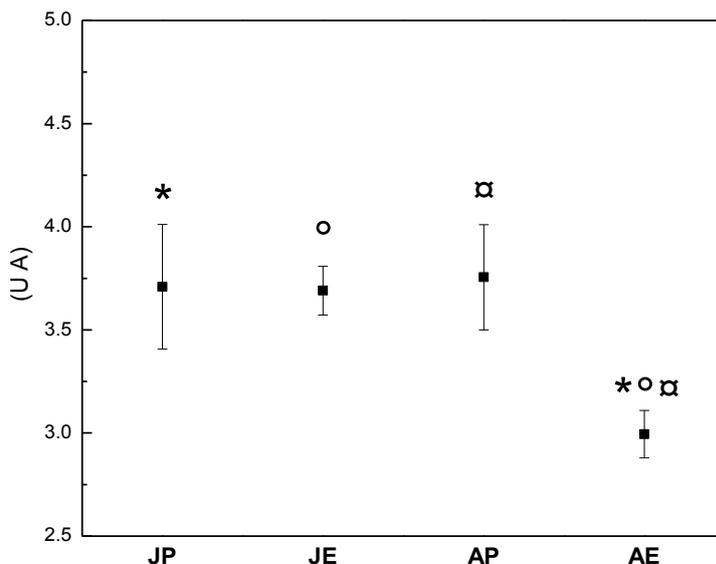


Figure 87 : aire [1218-1185 cm<sup>-1</sup>]/aire [1750-1000 cm<sup>-1</sup>] pour les quatre séries de biopsies

On retrouve la même évolution que pour l'indicateur précédent sur la bande spécifique collagène à 1338 cm<sup>-1</sup>, à savoir une diminution significative de cet indicateur (de 19%, p=0.006) pour le derme photo-exposé des sujets âgés (AE) par rapport aux sujets jeunes exposés (JE), alors qu'il reste constant dans le derme photo-protégé de sujets jeunes et âgés (p>0,05).

Ainsi cette évolution corrobore la diminution de la phase collagénique avec le vieillissement extrinsèque seul.

Nous avons reporté sur la Figure 88 le rapport entre l'aire de la bande centrée à 1240 cm<sup>-1</sup>] et l'aire de l'amide II.

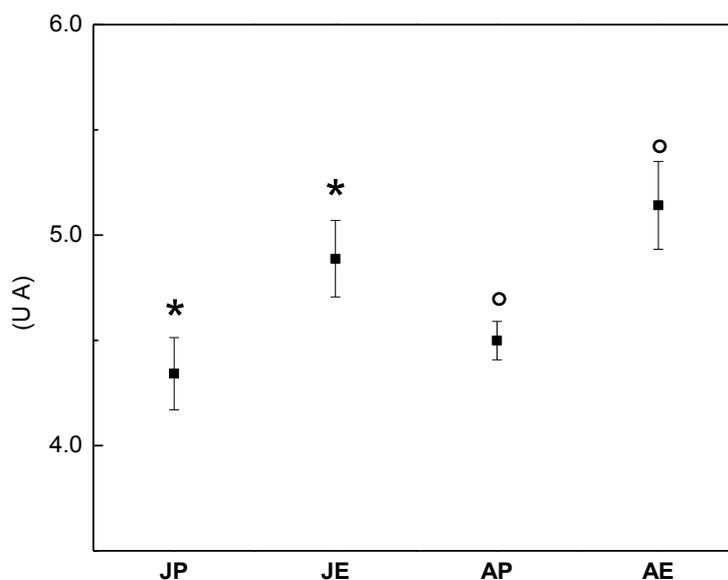


Figure 88: aire [1271-1217 cm<sup>-1</sup>] /aire (amide II) pour les quatre séries de biopsies

Comme indiqué dans le tableau d'indexation (Tableau 9), la zone d'absorption [1271-1217 cm<sup>-1</sup>] correspond à la superposition de différentes bandes d'absorption associées aux protéines de la MEC (Amide III, avec une composante majoritaire des protéines en feuillets  $\beta$  dans cette zone [369,383]), aux phospholipides et aux acides nucléiques.

Comme illustré sur la Figure 88, dans ce cas une différence significative est retrouvée entre la zone protégée et la zone photo-exposée pour chacun des groupes d'âge.

L'augmentation d'environ 15% de ce rapport dans la zone photo-exposée que ce soit pour les sujets âgés ou jeunes peut être due à un effet zone (la composition du derme réticulaire du haut de la fesse et de l'avant-bras pouvant montrer des différences) ou bien de la photo-exposition elle-même.

Etant donné que les protéines constituent la fraction principale du derme réticulaire, l'augmentation relative de l'absorbance dans cette gamme par rapport à la teneur totale en protéines (la normalisation est effectuée sur l'amide II) pourrait être un indicateur de l'augmentation des structures secondaires en feuillets  $\beta$  avec l'exposition au soleil, chez les sujets jeunes et âgés.

Nous avons reporté sur la Figure 89 le rapport entre l'aire de bande centrée à 1117 cm<sup>-1</sup>/l'aire de l'amide II et l'aire totale.

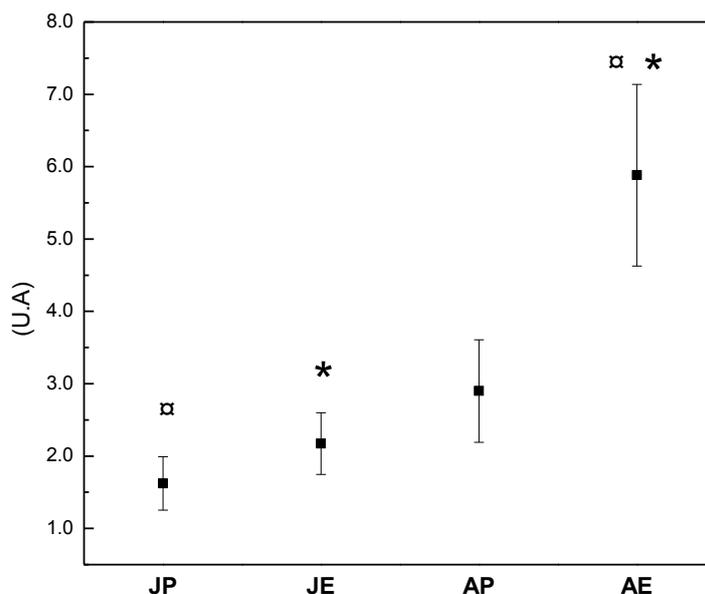


Figure 89 : aire [1128-1106 cm<sup>-1</sup>]/aire (amide II) pour les quatre séries de biopsies

Nous notons une augmentation significative de cet indicateur (de 65%,  $p=0,024$ ) pour le derme photo-exposé des sujets âgés (AE) par rapport aux sujets jeunes exposés (JE). Au contraire, cet indicateur n'évolue pas avec l'âge pour les zones protégées. Son évolution donc est associée au vieillissement extrinsèque.

La gamme [1128-1106 cm<sup>-1</sup>] correspond principalement à l'absorption des (GAG) sulfatés [421], représentés par le sulfate de chondroïtine (CS) et le sulfate de dermatane (DS) dans la peau humaine.

L'augmentation de cet indicateur dans la série de biopsies photo-exposées des sujets âgés pourrait être associée à une augmentation de ce type particulier de (GAG)s.

Enfin, nous avons reporté sur la Figure 90 le rapport entre l'aire de bande centrée à 1455 cm<sup>-1</sup>/et l'aire de l'amide II.

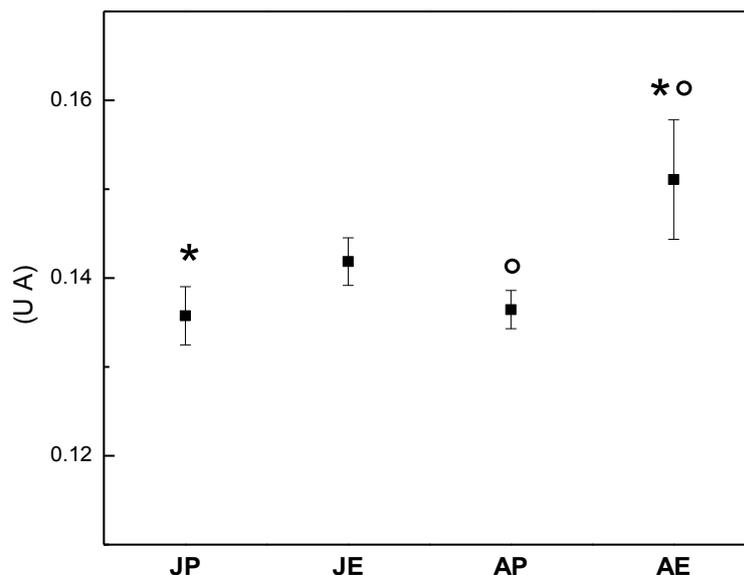


Figure 90 : aire [1482-1432  $\text{cm}^{-1}$ ]/ aire (amide II) pour les quatre séries de biopsies

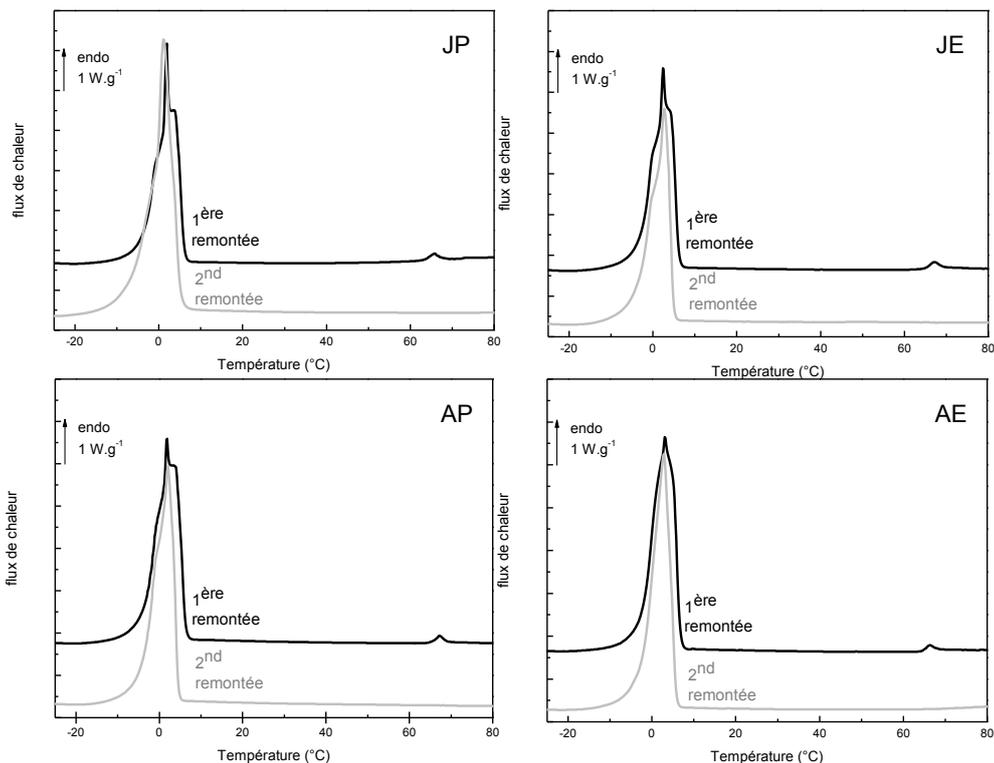
La gamme [1482-1432  $\text{cm}^{-1}$ ] correspondant principalement à la zone de déformation des  $(\text{CH})_x$  des lipides, le rapport compilé est un indicateur de la fraction de phase lipidique par rapport à la fraction protéique dans le derme réticulaire.

Dans ce cas, nous mettons en évidence une augmentation significative de cet indicateur pour le derme âgé photo-exposé (AE) par rapport au derme âgé protégé (AP) et au derme jeune protégé (JP). Il est à noter que l'indicateur associé à la fraction de la phase lipidique par rapport à l'ensemble des constituants du derme (Figure 2, annexe C) ne présente pas d'évolution significative entre les quatre séries de biopsies.

### III.C. Réponse thermique de la peau humaine par ACD

#### III.C.1. Organisation hydrique

Sur les figures ci-dessous sont reportés à titre d'exemple les thermogrammes ACD (normalisés par rapport à la masse initiale) de biopsies de peaux provenant des quatre séries étudiées (JP, JE, AP et AE) correspondant à deux remontées en température successives à  $10^\circ\text{C min}^{-1}$  entre  $-30$  et  $85^\circ\text{C}$ , dans les conditions validées dans le chapitre 2, paragraphe I.D.1.



*Figure 91 : thermogrammes ACD de biopsies cutanées de la série JP (jeune, photo-protégée), JE (jeune, photo-exposée), AP (âgé, photo-protégée) et AE (âgé, photo-exposée) lors de la première et deuxième remontée en température à 10 °C.min<sup>-1</sup>*

Comme discuté dans le chapitre 2, les pics endothermiques enregistrés dans la zone [-20 ; 20 °C] correspondent à la fusion de l'eau cristallisée lors du refroidissement à -30°C et sont utilisés pour déterminer la quantité d'eau cristallisable dans les biopsies. Après mesure ACD, les coupelles DSC ont subi le même protocole de déshydratation que précédemment afin de pouvoir déterminer par pesée la quantité d'eau totale des échantillons et déduire la quantité d'eau non cristallisable. Cette quantification a été effectuée pour l'ensemble des biopsies des quatre séries (cf. Tableau 1 annexe C) et les valeurs moyennes associées sont reportées sur la Figure 92.

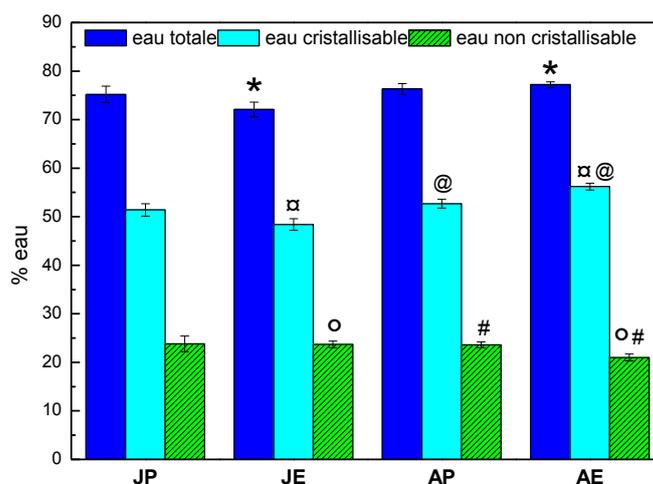


Figure 92 : organisation hydrique dans les quatre séries de biopsies

L'hydratation totale de la peau non exposée de sujets jeunes est de 75,2%±1,7%, répartis en 51,4%±1,3% d'eau cristallisable et 23,8%±1,6% d'eau non cristallisable, contre 72,1%±1,5%, 48,4%±1,2% et 23,7%±0,7%, respectivement pour la peau photo-exposée des sujets jeunes. Ces valeurs diffèrent légèrement de celles trouvées pour les explants de peau abdominale utilisés lors de l'étude de faisabilité (chapitre 2, paragraphe I.D.2.1) ; l'hydratation totale est ici supérieure ainsi que la quantité d'eau non cristallisable. Il convient de rappeler que les explants étudiés précédemment provenaient d'abdominoplasties effectuées chez des patients en surcharge pondérale, et donc que le derme étudié n'était pas forcément dans un état physiologique sain. Le mode de prélèvement est aussi différent ; les biopsies sont prélevées ici directement sur le patient, tandis qu'elles étaient prélevées sur des explants qui avaient subi un traitement différent dans le cas de l'étude de faisabilité.

Il faut souligner qu'il n'y a pas de différence significative entre les quantités d'eau totale, cristallisable et non cristallisable de peaux protégées et exposées au soleil dans le groupe des sujets jeunes.

On peut aussi calculer le rapport entre l'eau non cristallisable et l'eau cristallisable (Tableau 15), autre marqueur sensible de l'organisation hydrique utilisé dans la littérature [255]. Dans ce cas, nous ne trouvons pas non plus de différence significative dans le groupe des sujets jeunes sur les deux zones analysées. Même s'il est délicat de comparer les valeurs issues de deux zones anatomiquement distinctes, qui peut entraîner des biais, nous pouvons supposer que la photo-exposition ne conduit pas à une évolution de l'organisation hydrique chez les sujets jeunes.

Série de biopsies	Eau non cristallisable/cristallisable	Différence significative
JP	0,466±0,038	JP/AE
JE	0,490±0,017	JE/AE
AP	0,448±0,013	AP/AE
AE	0,374±0,016	JP, JE, AP

*Tableau 15 : rapport entre l'eau non cristallisable et l'eau cristallisable dans les quatre séries de biopsies*

Si l'on compare maintenant les quantités des différents types d'eau ou le rapport eau non cristallisable/eau cristallisable dans la zone protégée des UVs pour les deux groupes d'âge, nous ne constatons aucune évolution significative avec l'âge ; dans ce cas il ne peut y avoir de biais dans la comparaison, puisque les zones anatomiques sont identiques. Nous pouvons donc affirmer que le vieillissement chronologique seul n'entraîne pas de modification de l'organisation hydrique du derme.

En revanche, la comparaison entre les différentes quantités d'eau dans la zone exposée aux UVs pour les deux groupes d'âge (JE vs AE) met en évidence des différences significatives : alors que les pourcentages d'eau totale et d'eau cristallisable augmentent de façon significative ( $p=0,006$  ;  $p<0,001$ ) pour les peaux de sujets âgés (AE), le pourcentage d'eau non cristallisable diminue ( $p=0,021$ ). Cela entraîne une chute drastique du rapport eau non cristallisable/eau cristallisable.

L'ensemble de ces marqueurs met ainsi en évidence une très forte évolution de l'organisation hydrique avec le photo-vieillessement.

Ces faits sont corroborés par les différences significatives inter-zone (AP vs AE) dans le groupe d'âge supérieur à 60 ans, même si dans ce cas la comparaison de zones anatomiquement distinctes peut jouer un biais.

### III.C.2. Mesures de thermoporométrie (TPM)

Même si les biopsies analysées ont été conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant étude, et que nous avons précédemment montré (chapitre 2, paragraphe II.C.1) que la conservation à basse température entraînait une modification de la distribution de taille des lacunes, nous avons tenu à effectuer des mesures de thermoporométrie. Même si elles ne permettent pas de révéler la distribution native des lacunes dans la peau, elles peuvent tout de même être

utilisées à des fins comparatives.

Comme détaillé dans le chapitre 2, les analyses ACD ont ainsi été effectuées à  $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  dans la zone de fusion de la glace et le traitement mathématique des thermogrammes a permis de déterminer la distribution différentielle de taille de pores ou lacunes. Nous avons représenté sur la Figure 93 la valeur moyenne du rayon de pore (supposé cylindrique) correspondant au maximum de la distribution pour chaque série de biopsies.

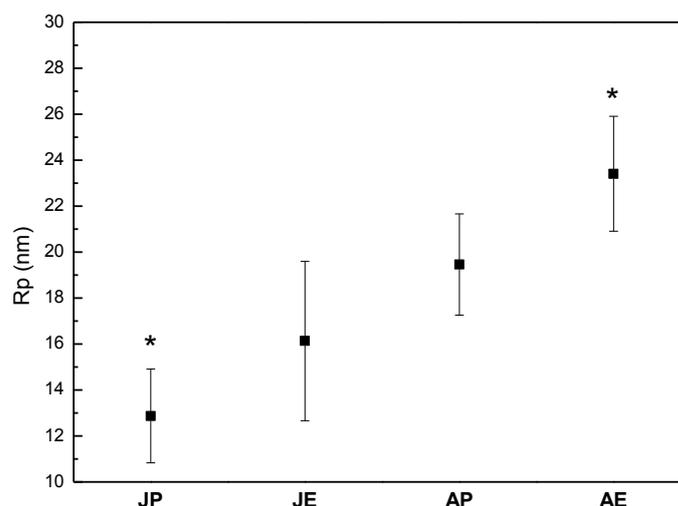


Figure 93 : rayon moyen de taille de pore au maximum de la distribution pour les 4 séries de biopsies

Le rayon moyen de pores au maximum de la distribution est compris entre 10 et 25nm pour l'ensemble des biopsies (classe des mésopores).

Nous remarquons une tendance à l'augmentation de taille de ce rayon moyen avec l'âge et la photo-exposition ; seule est significative ( $p=0,017$ ) l'augmentation de taille entre la série des peaux protégée de sujets jeunes et la série des peaux photo-exposée des sujets âgés (JP vs AE). Cette augmentation traduit soit :

- une modification drastique de l'architecture fibreuse de la MEC avec le vieillissement extrinsèque,
- une moins bonne aptitude à la préservation de l'architecture de la MEC avec la cryoconservation avec le vieillissement extrinsèque.

### III.C.3. Dénaturation de la phase collagénique

Sur les figures ci-dessous sont reportés l'élargissement des thermogrammes ACD de la Figure 94 dans la zone de dénaturation de la phase collagénique.

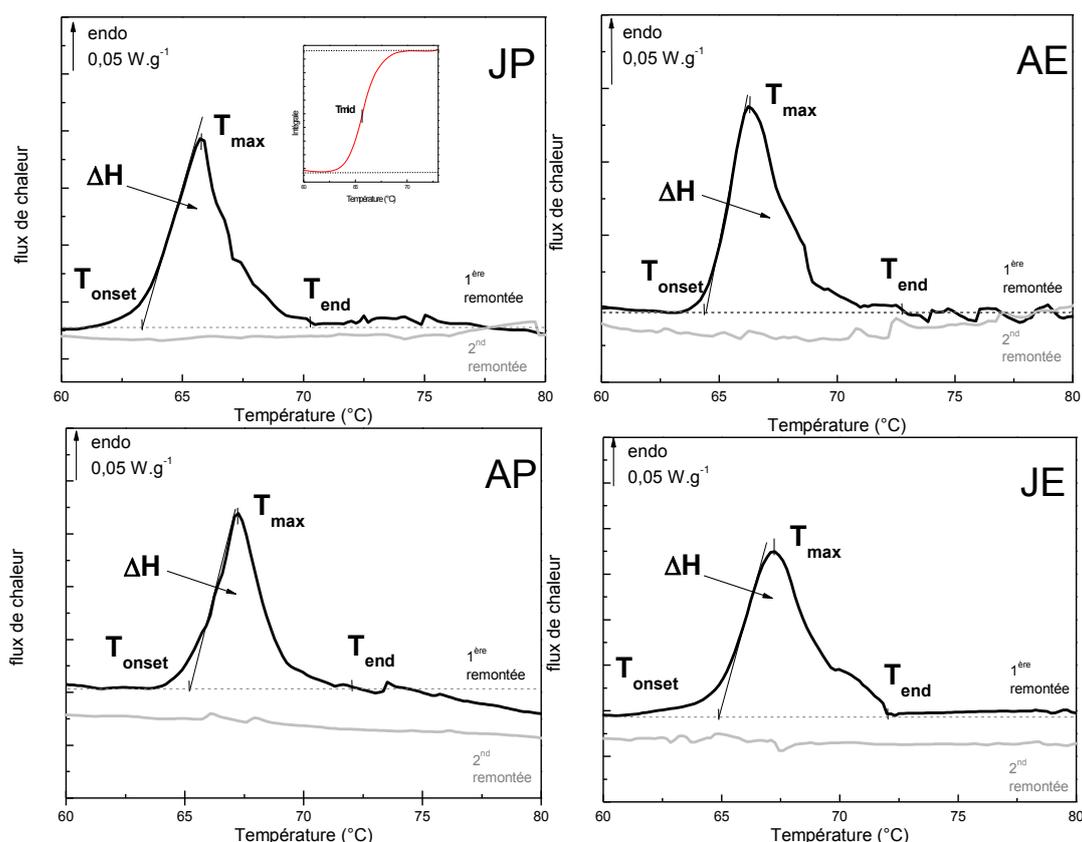


Figure 94 : agrandissement dans la zone de dénaturation des thermogrammes ACD de biopsies de peau de la série JP (jeune, photo-protégée), JE (jeune, photo-exposée), AP (âgé, photo-protégée) et AE (âgé, photo-exposée) lors de la première et deuxième remontée en température à 10 °C.min<sup>-1</sup>

Pour l'ensemble des biopsies, nous détectons dans cette zone de température un événement endothermique irréversible principal, qui peut s'accompagner de phénomènes exothermiques. Comme détaillé dans le chapitre 2, paragraphe II.C., le phénomène endothermique irréversible est associé à la dénaturation des collagènes fibreux de type I et III contenus dans le derme.

Nous avons cherché à compiler comme précédemment les principales caractéristiques de ce pic de dénaturation à savoir T<sub>onset</sub>, T<sub>max</sub>, T<sub>mid</sub> et ΔH<sub>d</sub>. Compte-tenu des phénomènes exothermiques parfois présents dans cette gamme, qui pourraient être associés à des réagréations non physiologiques de fragments dépliés de collagène, nous avons cherché à minimiser les traitements mathématiques des courbes. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de ne pas déterminer (1/T)<sub>mean</sub> utilisé dans le chapitre 2.

L'ensemble de ces paramètres caractéristiques est reporté dans le Tableau 2 de l'annexe C et

leurs valeurs moyennes pour les quatre séries de biopsies sont présentées sur les figures suivantes.

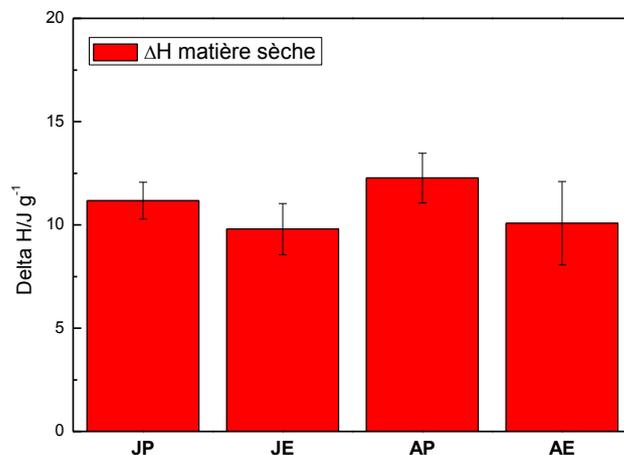


Figure 95 : enthalpie de dénaturation de la phase collagénique pour les quatre séries de biopsies

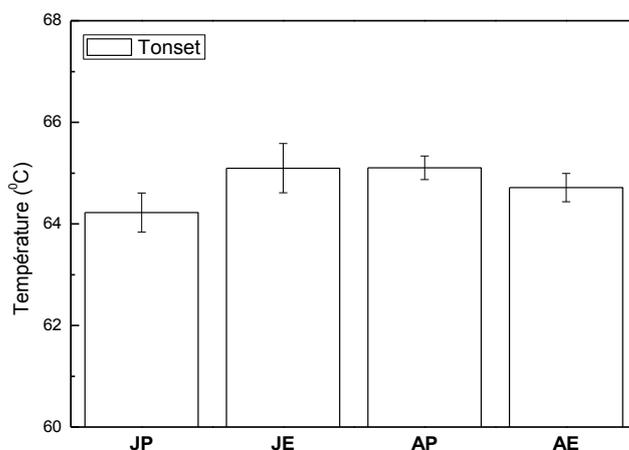


Figure 96 : température de début de pic ( $T_{onset}$ ) de dénaturation les quatre séries de biopsies

Il est à noter que l'enthalpie de dénaturation  $\Delta H$ , déterminée avec une erreur standard relativement élevée, est similaire dans les quatre séries de biopsies. De la même façon, il n'est pas observé de variation significative de  $T_{onset}$  pour les quatre séries de biopsies.

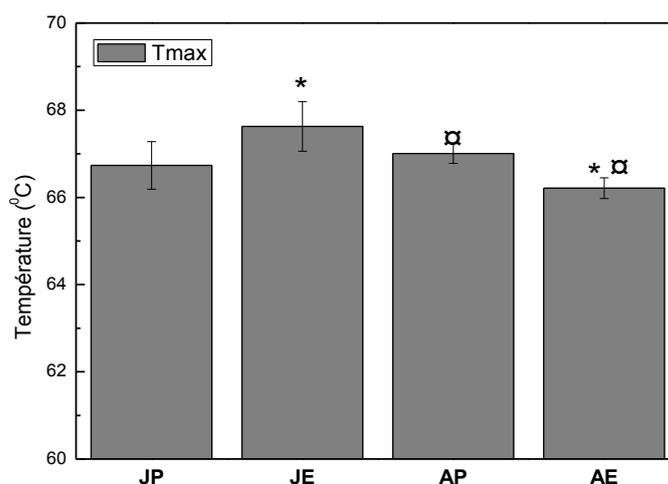


Figure 97 : température au maximum du pic de dénaturation  $T_{max}$  pour les quatre séries de biopsies

La température  $T_{max}$  est dans la littérature la plus utilisée comme température de dénaturation du collagène. Il faut souligner que sa valeur est similaire pour les deux groupes d'âge sur la zone photo-protégée (JP/AP) ; le vieillissement chronologique seul n'induit pas d'évolution.

En revanche, une différence significative ( $p=0,040$ ) de  $T_{max}$  est mise en évidence entre les deux groupes d'âge sur la zone photo-exposée ; cette diminution souligne l'effet délétère du vieillissement extrinsèque sur la stabilité thermique globale de la triple hélice collagénique.

Cette observation est corroborée par la différence significative ( $p=0,032$ ) retrouvée pour  $T_{max}$  entre la zone protégée et la zone photo-exposée dans le groupe des sujets âgés, même si la comparaison de deux zones anatomiquement distinctes peut apporter un biais.

Cette déstabilisation globale de la stabilité thermique de la triple hélice collagénique avec le vieillissement extrinsèque uniquement est corroborée par l'évolution de  $T_{mid}$ , un autre marqueur de cette stabilité.

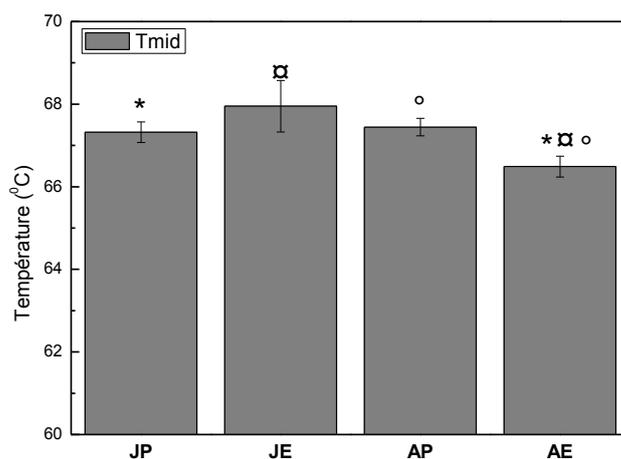


Figure 98 : température à laquelle la moitié du collagène est dénaturé (T<sub>mid</sub>) pour les quatre séries de biopsies

Dans ce cas en effet, on retrouve cette chute significative de T<sub>mid</sub> uniquement pour la série des biopsies AE (âgés, zone exposée).

La température de fin de pic T<sub>end</sub> a déjà été utilisée dans la littérature pour tenir compte de l'élargissement de la dénaturation thermique du collagène dans certaines conditions [268,272]. Nous avons donc déterminé cet autre paramètre caractéristique de l'endotherme de dénaturation (cf. Tableau 2 annexe C) en fixant une valeur seuil sur la courbe dérivée. Nous avons reporté sa valeur moyenne pour les quatre séries de biopsies sur la Figure 99.

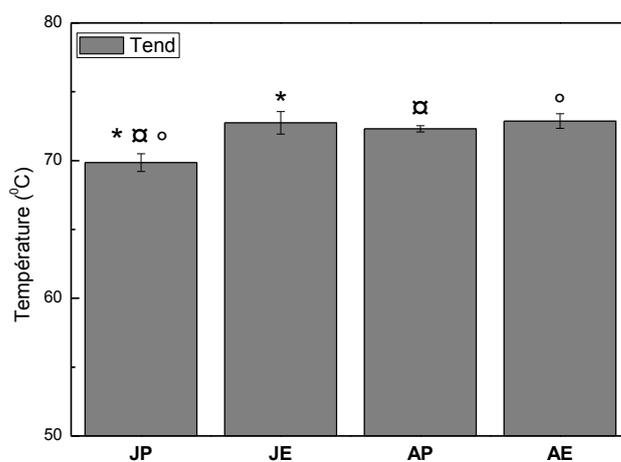


Figure 99 : température de fin de pic (T<sub>end</sub>) de l'endotherme de dénaturation pour les quatre séries de biopsies

Nous mettons en évidence une augmentation significative de  $T_{end}$  pour la zone photo-protégée dans les groupes des sujets âgés par rapport au groupe des sujets jeunes ( $p=0,003$ ). Cet élargissement du pic de dénaturation vers les hautes températures révèle la présence d'une population de domaines collagéniques de plus grande stabilité thermique. Une telle multiplicité du phénomène de dénaturation a déjà été observée dans d'autres types de tissus collagéniques avec les traitements physico-chimiques ou avec la pathologie [43,258]. Cette variation est associée ici à un effet du vieillissement intrinsèque.

Nous n'observons pas dans ce cas de différence significative entre les deux groupes d'âge sur la zone photo-exposée.

Enfin, même si la comparaison est plus délicate car effectuée entre des zones anatomiquement distinctes,  $T_{end}$  est significativement augmentée ( $p=0,005$ ) dans la peau photo-exposée par rapport à la peau photo-protégée des sujets jeunes.

### III.D. Réponse diélectrique de la peau humaine par CTS

#### III.D.1. Etude basse température des biopsies hydratées

Nous avons représenté sur la Figure 100 le thermogramme CTS complexe d'une biopsie de peau photo-protégée issue d'un sujet jeune obtenu après polarisation à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

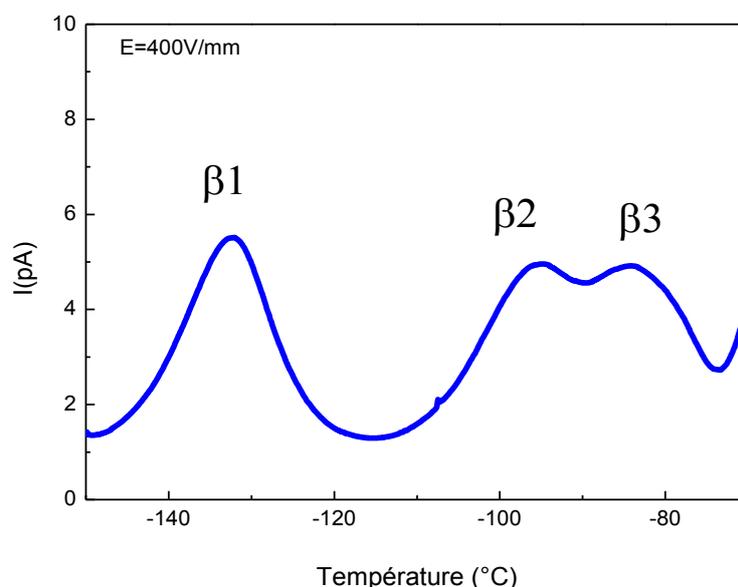


Figure 100 : thermogramme CTS global d'une biopsie de la série JP à l'état hydraté après polarisation à  $-20^{\circ}\text{C}$

Comme observé pour l'étude de faisabilité sur la peau abdominale, ce thermogramme se

caractérise ici aussi par trois pics bien définis dans cette gamme de température, notés  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$  et situés à -132,1, -95,9 et -84,2 °C respectivement. L'ensemble des thermogrammes CTS obtenus dans les mêmes conditions pour les différentes biopsies sont reportés en annexe C. Il est à noter que le mode  $\beta_3$  n'est pas toujours présent sur les thermogrammes.

Nous avons déterminé la température du maximum de chacun de ces modes  $\beta$  pour l'ensemble des biopsies et reporté les valeurs moyennes de chaque série sur la Figure 101.

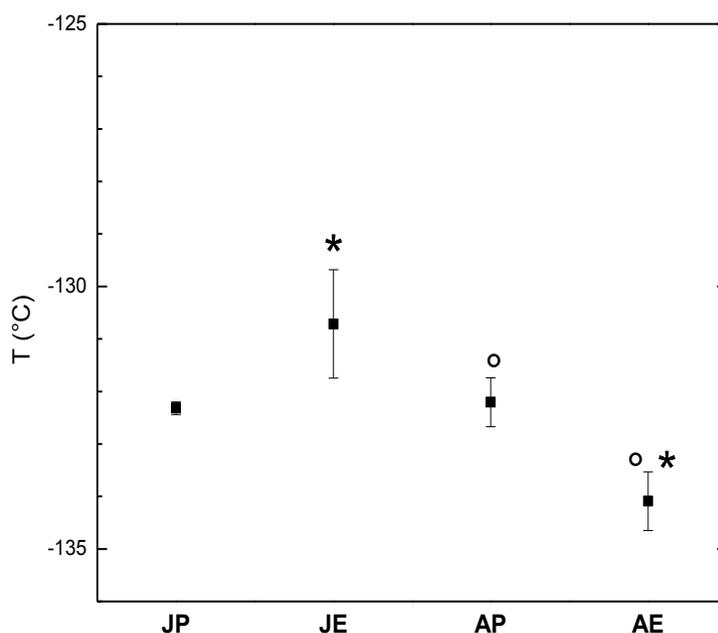


Figure 101 : température au maximum du mode  $\beta_1$  pour les quatre séries de biopsies

Il est important de noter que le mode de relaxation  $\beta_1$  se retrouve à la même température pour la peau protégée des deux groupes d'âge ; il n'y a pas d'évolution avec le vieillissement chronologique seul. Au contraire, ce mode se décale significativement vers les basses températures ( $p=0,014$ ) pour la peau photo-exposée dans le groupe de sujets âgés par rapport au groupe de sujets jeunes. Ainsi le décalage du mode  $\beta_1$  vers les basses températures est un marqueur du vieillissement extrinsèque seul.

Cette observation est corroborée par la différence significative ( $p=0,023$ ) retrouvée pour  $T_{\beta_1}$  entre la zone protégée et la zone photo-exposée dans le groupe des sujets âgés, même si la comparaison de deux zones anatomiquement distinctes peut apporter un biais.

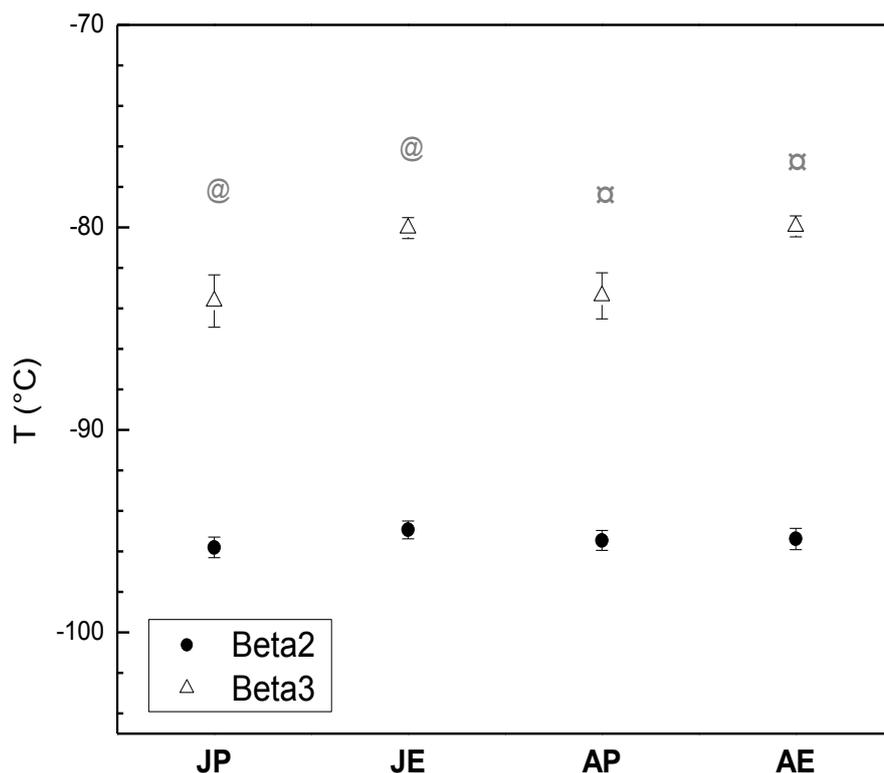


Figure 102 : températures au maximum du mode  $\beta_2$  et du mode  $\beta_3$  pour les quatre séries de biopsies

Contrairement au mode  $\beta_1$ , le mode  $\beta_2$  est invariant en température pour les 4 séries de biopsies.

Enfin, le mode  $\beta_3$  se décale significativement vers les hautes températures pour les biopsies des zones photo-exposées par rapport aux zones photo-protégées, et ceci dans les deux groupes d'âge. La comparaison étant effectuée sur deux zones anatomiquement distinctes, il est délicat de conclure sur l'effet de l'exposition, car l'effet zone pourrait être prépondérant.

## D.2. Etude basse température des biopsies déshydratées

Nous avons représenté sur la Figure 103 le thermogramme CTS global d'une biopsie de peau photo-protégée issue d'un sujet jeune obtenu après lyophilisation dans la cellule puis polarisation à 25°C. L'ensemble des thermogrammes CTS obtenus dans les mêmes conditions pour les différentes biopsies sont reportés en annexe C.

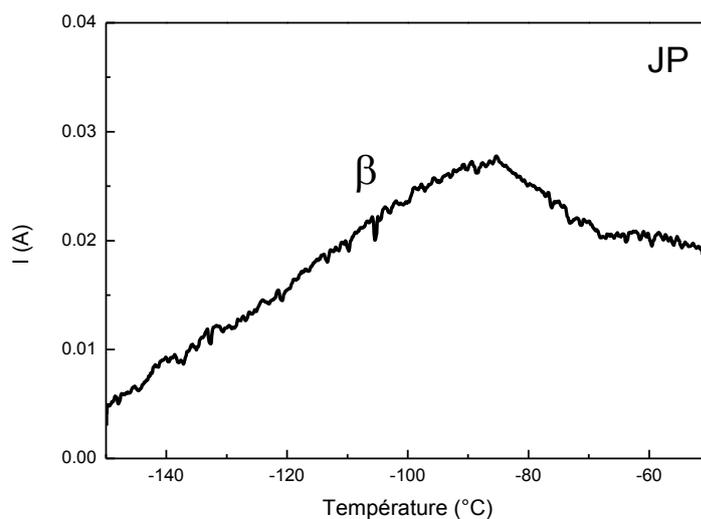


Figure 103 : thermogramme CTS global d'une biopsie de la série JP à l'état lyophilisé après polarisation à 25°C

Dans ce cas et comme précédemment observé pour les biopsies de peau abdominale, un mode  $\beta$  unique est mis en évidence dans cette gamme de température.

Nous avons déterminé la température du maximum de chacun de ces modes  $\beta$  pour l'ensemble des biopsies et reporté les valeurs moyennes de chaque série sur la Figure 104.

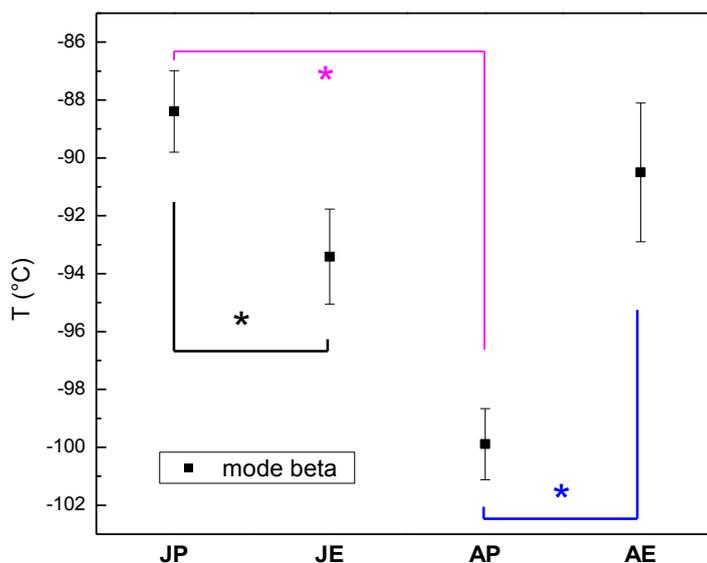


Figure 104 : température au maximum du mode  $\beta$  pour les quatre séries de biopsies

Nous notons que le mode de relaxation  $\beta$  se décale vers les basses températures avec l'âge

( $p=0,0002$ ) pour la peau protégée ; ce n'est pas le cas pour la peau photo-exposée. Nous avons ici une évolution uniquement avec le vieillissement chronologique.

Il est aussi à noter la comparaison entre site est très différente dans le groupe des sujets jeunes et le groupe des sujets âgés : alors que ce mode  $\beta$  se décale vers les basses températures sur la zone photo-exposée des sujets jeunes, il se décale vers les hautes températures sur la zone photo-exposée des sujets âgés : l'effet zone ne paraît pas prépondérant dans ce cas, et cette divergence traduit certainement des mécanismes complexes dans le cas du photo-vieillissement.

Comme décrit dans le chapitre 2, nous avons pu déterminer la surface de tous les échantillons et calculé les intensités normalisées à la surface afin de mener également une étude comparative sur l'intensité du mode  $\beta$ , comme présenté sur la Figure 105.

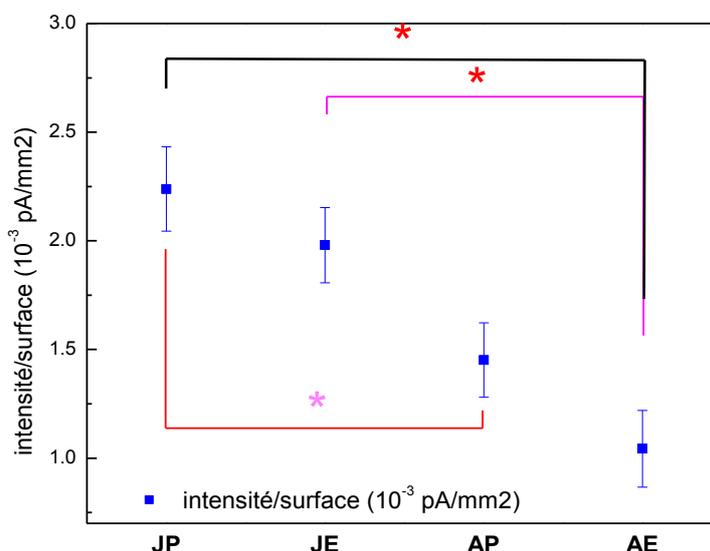


Figure 105 : Intensité maximale du mode  $\beta$  pour les quatre séries de biopsies

En ce qui concerne l'intensité de ce mode, nous retrouvons une diminution significative avec l'âge, à la fois pour la peau protégée (diminution de 35%,  $p=0,035$ ) et pour la peau exposée (diminution de 47%,  $p=0,004$ ). Ce marqueur est ainsi sensible au vieillissement intrinsèque et extrinsèque.

### III.D.3. Etude haute température des biopsies déshydratées

Nous avons représenté sur la Figure 106 le thermogramme CTS global d'une biopsie de peau photo-protégée issue d'un sujet jeune obtenu après lyophilisation dans la cellule puis

polarisation à 150°C.

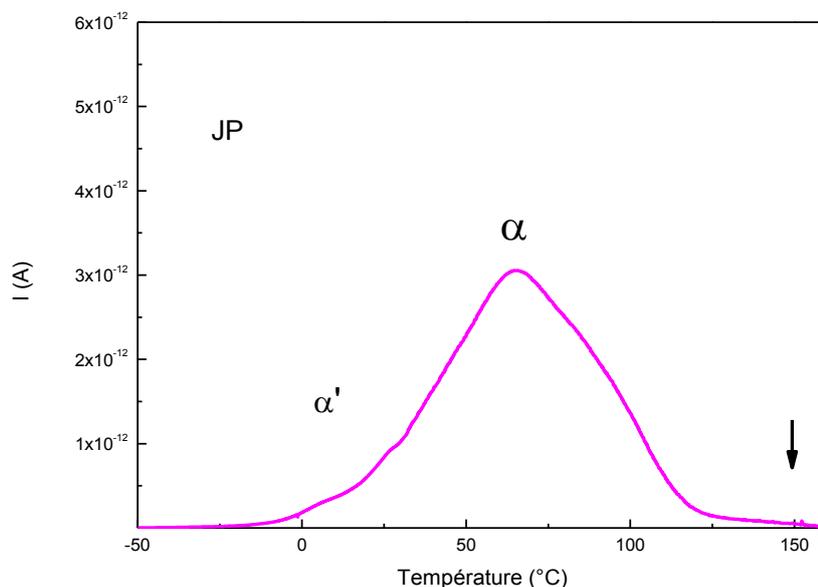


Figure 106 : thermogramme CTS global d'une biopsie de la série JP à l'état lyophilisé après polarisation à 150°C

L'ensemble des thermogrammes CTS obtenus dans les mêmes conditions pour les différentes biopsies sont reportés en annexe C.

Comme précédemment observé dans l'étude de faisabilité (chapitre 2), nous mettons en évidence dans cette gamme de température le mode principal  $\alpha$  entre 50 et 100°C. Les épaulements détectés autour de la température ambiante constituent le mode multiple  $\alpha'$ .

Nous avons déterminé la température du maximum du mode  $\alpha$  pour l'ensemble des biopsies ainsi que l'intensité normalisée à la surface et reporté les valeurs moyennes correspondantes pour chaque série sur les Figure 107 et Figure 108.

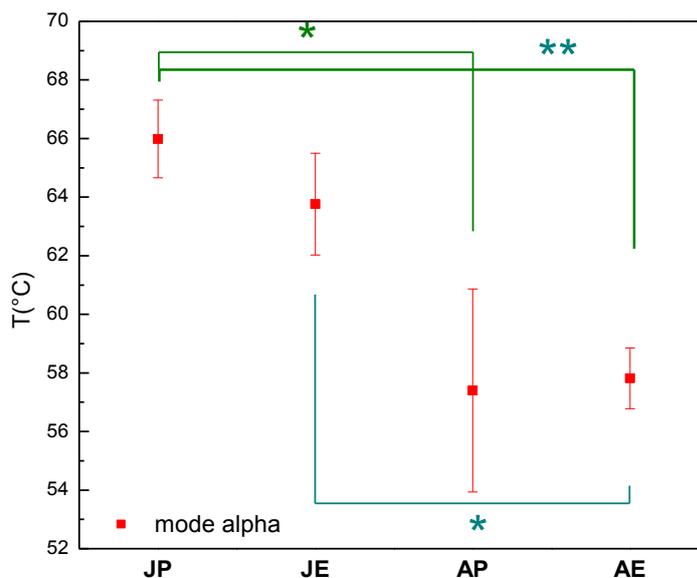


Figure 107 : Température au maximum du mode  $\alpha$  pour les quatre séries de biopsies

Un décalage significatif ( $p=0,021$ ) vers les basses températures est mis en évidence avec l'âge pour les biopsies de la zone photo-protégée, ce qui traduit un effet du vieillissement chronologique.

On retrouve un comportement similaire ( $p=0,029$ ) avec l'âge pour les biopsies de la zone photo-exposée.

De plus, même si la comparaison inter site est délicate, il n'y a pas de différence entre zone photo-protégée et zone photo-exposée chez le groupe de sujets jeunes comme chez le groupe des sujets âgés. Le vieillissement chronologique apparaît comme le facteur prépondérant sur le décalage du mode  $\alpha$  vers les basses températures.

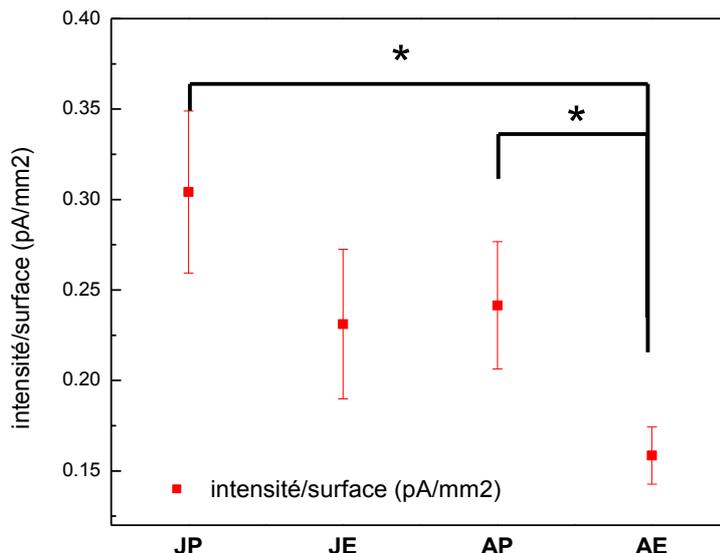


Figure 108 : Intensité maximale du mode  $\alpha$  pour les quatre séries de biopsies

L'intensité du mode  $\alpha$  demeure constante pour les biopsies de la zone protégée chez les deux groupes d'âge, signe que le vieillissement chronologique a peu d'effet sur ce paramètre. Une tendance à la diminution (mais qui n'est pas significative sur le nombre d'échantillons testés,  $p=0,152$ ) est observée avec l'âge pour les biopsies photo-exposées, ce qui pourrait traduire un effet du photo-vieillessement, qui reste à confirmer sur un plus grand nombre d'échantillons.

La comparaison inter zones chez les sujets âgés met en évidence une diminution significative de l'intensité du mode  $\alpha$ , mais dans ce cas l'effet zone peut être non négligeable.

### III.E. Synthèse et interprétation des principaux résultats issus des analyses IRTF, ACD et CTS

#### III.E.1. Organisation hydrique

Nos résultats ACD mettent en évidence **une profonde modification de l'organisation hydrique avec le vieillissement extrinsèque**, avec en particulier **une augmentation de la quantité d'eau totale et d'eau cristallisable au détriment de la quantité d'eau liée**. Ces résultats corroborent la modification du réseau de liaisons hydrogène eau-protéine et eau libre évoquée lors de l'analyse IRTF, avec l'augmentation significative du rapport Amide A/Amide II. L'étude diélectrique révèle que **seul le photo-vieillissement entraîne la modification de l'indicateur associé à la dynamique de l'eau cristallisable**, le mode  $\beta_1$ . Le décalage vers les basses températures de ce mode dans le cas du photo-vieillissement cutané tend à le rapprocher de la cinétique de la glace pure [422]. Ce résultat corrobore et complète les analyses ACD ; la dynamique de cette eau « libre » est de moins en moins influencée par les protéines. On peut parler d'une ségrégation de phase eau en masse/matrice.

Cette évolution de l'organisation hydrique avec le photo-vieillissement peut être rapprochée des études antérieures de spectroscopie Raman [363] qui ont montré que :

- que les structures hydriques et les quantités associées étaient similaires dans les zones protégées et photo-exposées des sujets jeunes,
- que les structures hydriques et les quantités associées étaient similaires dans le derme chronologiquement vieilli en comparaison du derme jeune,
- qu'il y avait une augmentation de la quantité d'eau totale et d'eau non liée dans le derme photo-âgé.

D'autres données de la littérature [423] ont mis en évidence une diminution de l'échogénicité du derme supérieur dans la peau âgée photo-vieillie. Nous rappelons qu'une diminution de l'échogénicité de la peau est associée à une augmentation de l'hydratation [424]. Une bande de faible échogénicité, qui augmente en épaisseur proportionnellement à l'âge dans les zones photo-exposées et qui occupe dans certains cas la plus grande partie du derme a pu être mise en évidence sur un large panel d'individus [425]. Non observée chez les sujets jeunes, ces zones correspondent histologiquement aux lésions élastolytiques et aux zones de dégradation du collagène, avec une accumulation de GAGs et d'eau non liée, non fonctionnelle. De façon complémentaire, des mesures IRM indiquent que la région sous-épidermique est spécialement encline à l'accumulation d'eau [132].

Le mode  $\beta_2$ , associé à la dynamique du complexe eau liée/protéines demeure stable en température avec le vieillissement chronologique et extrinsèque. Il est important de noter que même si la proportion d'eau liée diminue de façon significative avec le vieillissement extrinsèque, la première couche d'hydratation des protéines reste saturée à l'état hydraté, ce qui entraîne certainement cette invariance au niveau de la température du mode.

### III.E.2. Composants macromoléculaires de la MEC

#### Phase collagénique

D'une part, nous mettons en évidence une **augmentation significative de la température de fin de pic ( $T_{end}$ )** de l'endotherme de dénaturation de la phase collagénique par ACD **avec le vieillissement intrinsèque** ; un telle évolution a déjà été mise en évidence dans le derme de rat [268] et sur un échantillon de derme humain [272]. Cet élargissement de l'endotherme de dénaturation vers les hautes températures est attribué à l'augmentation de nœuds de réticulation stables, résistants à la chaleur. L'augmentation de la densité de nœuds de réticulation stables, non réductibles dans le collagène avec l'âge est bien connu [426], impliquant à la fois les processus contrôlés enzymatiquement mais aussi le processus de glycation non enzymatique (cf. Chapitre I, vieillissement).

Dans notre étude, cette augmentation des nœuds de réticulations semble être à la fois atteinte par le vieillissement chronologique mais aussi par l'exposition aux UVs, puisque l'on retrouve une augmentation de  $T_{end}$  pour la peau photo-exposée dans les groupes des sujets jeunes. L'effet de la photo-exposition semble plus délicat à expliquer. Comme nous l'avons évoqué précédemment, certaines études sur l'effet des UVs sur les collagènes mettant en évidence à la fois stabilisation et déstabilisation des fibres de collagène.

D'autre part, la comparaison de la signature vibrationnelle des différentes biopsies par IRTF a permis de mettre en évidence **une diminution significative de la fraction des collagènes fibrillaires dans le derme âgé photo-exposé**, qui s'accompagne d'une altération de son architecture en triple hélice.

Nous n'observons pas de d'évolution significative de l'enthalpie de dénaturation du collagène par ACD. Une étude thermique précédente sur la peau de rat a également montré que l'enthalpie de dénaturation totale n'était pas modifiée avec l'âge [268]. Ce marqueur de la densité de liaisons hydrogène nette détruite lors de l'effondrement de la structure en triple hélice n'est certainement pas suffisamment sensible pour mettre en évidence des

différences entre les quatre séries de biopsies.

**En revanche, la chute significative de la stabilité thermique moyenne du collagène (mesurée par  $T_{max}$  et  $T_{mid}$ ) dans la peau photo-exposée des sujets âgés** est en faveur d'une déstabilisation et/ou d'une fragmentation [267,273,274] des fibres de collagène avec l'exposition cumulative aux UVs tout au long de la vie.

Ces évolutions sont en accord avec les données de la littérature, qui reportent à la fois une diminution de la quantité et une modification de l'architecture du collagène du derme humain avec le vieillissement extrinsèque [135,427]. Le collagène étant le constituant protéique majeur du derme, cet effet s'accompagne d'**une diminution de la quantité totale de protéines dans le derme avec le photo-vieillessement** mise en évidence par IRTF. Cette diminution de la quantité totale de protéines du derme entraîne alors l'augmentation relative de la fraction lipidique par rapport à la fraction de protéines avec le photo-vieillessement.

Au niveau de la dynamique moléculaire, le mode  $\beta$  mis en évidence par analyse diélectrique sur les biopsies à l'état lyophilisé est associé à la mobilité localisée du complexe séquences hydrophiles/eau fortement liée.

**L'amplitude de la mobilité localisée diminue avec le vieillissement chronologique et cet effet s'accroît avec l'action cumulée de l'âge et des UVs.** Un comportement similaire de la réponse diélectrique a déjà été observé pour le collagène extrait du derme de rat ainsi que pour la peau de rat soumise à des rayonnements ionisants [42,300].

Cette chute significative de l'amplitude peut être associée :

- à une augmentation des liaisons intramoléculaires et intermoléculaires qui apportent des restrictions de mobilité à l'échelle de la liaison hydrogène (phénomène de sur-réticulation, mis en évidence avec l'augmentation de  $T_{end}$  en ACD pour le vieillissement chronologique)
- à une diminution du nombre de séquences polaires polypeptidiques (mis en évidence en IRTF avec la diminution de la fraction de collagène pour le vieillissement extrinsèque).

Il est à noter que la cinétique de cette dynamique (révélée par la position en température du mode  $\beta$ ) est différente selon le vieillissement intrinsèque et extrinsèque.

Le mode  $\alpha$  est associé à la dynamique délocalisée le long des chaînes de collagène principalement. **Une tendance à la diminution de l'amplitude de ce mode est mise en évidence avec l'effet cumulé du vieillissement et des UVs** ; un comportement similaire a été observé sur le collagène extrait de derme de rat et sur la peau de rat exposée à des traitements ionisants [42,300]. L'effet cumulé de l'augmentation des liaisons de réticulation

avec le vieillissement chronologique et la diminution drastique de la fraction de phase collagénique avec le photo-vieillessement pourrait expliquer l'évolution de cet indicateur de la mobilité des chaînes de collagène à l'échelle de la dizaine de nanomètres.

Enfin, nous soulignons que la cinétique de ce mode (associée à sa position en température) évolue principalement avec le vieillissement chronologique. Le décalage vers les basses températures du maximum de ce mode reste à expliquer. Dans le cas d'une autre protéine de la MEC (l'élastine), il a été montré que la relaxation  $\alpha$  se décalait vers les basses températures dès les faibles taux d'élastolyse, alors que de telles variations n'étaient pas détectées par ACD. Nous pouvons ainsi suggérer que ce décalage du mode principal du collagène avec le vieillissement chronologique est associé à des défauts dans la triple hélice, qui restreignent la propagation des mouvements et sont précurseurs de la dénaturation [43]. Différents mécanismes peuvent être proposés pour expliquer les profondes différences retrouvées au niveau de la phase collagénique avec le vieillissement intrinsèque et le photo-vieillessement du derme.

Il est important de rappeler que la structure secondaire du collagène est stabilisée à la fois par des ponts d'eau intra et inter-moléculaires avec les groupes carbonyles et hydroxyles [52]. Ainsi, en dépit d'une augmentation de la quantité totale d'eau dans la peau âgée photo-exposée, la diminution de l'eau liée aux protéines (et au collagène en particulier) dans le cas du photo-vieillessement peut entraîner l'instabilité et la fragmentation des fibrilles de collagène [427].

Il a aussi été montré que la quantité de HHL (principal nœud de réticulation du collagène mature du derme, cf. chapitre 1) dans le collagène de derme âgé photo-exposé était significativement plus faible que dans le derme âgé photo-protégé [428] ce qui pourrait être corrélé à une dégradation plus facile des fibres collagéniques dans ce cas.

Cette déstabilisation/fragmentation pourrait aussi être attribuée à un effet direct des UVs, car le collagène I contient des résidus phénylalanine et tyrosine sensibles aux UVs. Cependant, s'il est bien connu que les UVB en particulier entraînent des modifications dans la structure du collagène (avec à la fois des stabilisations et des déstabilisations) [258,429], ces UVB ne pénètrent pas dans le derme.

Si les UVA, qui pénètrent dans le derme, ne semblent pas avoir d'effet direct sur le pontage stable principal du derme (HHL), ils dégradent au contraire un autre pont de réticulation stable du collagène, le groupe pyridinoline [428].

De plus, de nombreux travaux ont mis l'effet indirect des UVs sur l'expression des gènes liés à la composition et au remodelage de la MEC [194,202,206,430], montrant que les UVA induisent des dommages dermiques tels que l'altération des fibres de collagène et d'élastine et l'expression de la métalloprotéase MMP-1 [431]. En particulier, dans des modèles de peau

reconstruites exposées aux UVA [431], les métalloprotéases MMP1 and MMP3 sont surexprimés dans les fibroblastes après 24h d'exposition aux UVA1, tandis que le gène COL1A1 est réprimé.

### Glycosaminoglycanes

#### Une altération de la composition des GAGs est détectée avec le vieillissement extrinsèque.

Cette évolution est à corrélérer avec les données de la littérature reportant une augmentation des (GAG)s et des (PG)s, qui sont distribués de façon anormale avec le photo-vieillessement [206,432–434]. En particulier, dans les lésions élastolytiques, les (GAG)s majoritaires sont des CS liés au noyau protéique du versicane. Ils ne se lient pas aux fibres de collagène et d'élastine comme dans la peau normale. Il a aussi été montré que l'exposition aux UVs augmentait de façon significative la quantité de CS dermique [433].

#### III.E.3. Tableau récapitulatif des marqueurs du vieillissement intrinsèque et extrinsèque

Nous avons résumé dans le Tableau 16 l'évolution significative des différents indicateurs issus des analyses spectroscopiques, calorimétriques et diélectriques avec les vieillissements intrinsèque et extrinsèque. Les indicateurs évoluant selon la zone (haut de fesse, photo-protégée et avant-bras, photo-exposée) ont aussi étaient indiqués.

	Vieillessement intrinsèque	Vieillessement extrinsèque	Effet zone/exposition
IRTF		1338/total - -	
		1204/total II - -	
		Fraction collagène	
		Amide A +	
		Amide II/total -	
		Fraction protéines	
		Amide II/1452 cm <sup>-1</sup> -	
		Protéines/lipides	
	1117 cm <sup>-1</sup> ++		
	(GAG)s sulfatés		
			1240/total +
			Feuillets β

	Vieillessement intrinsèque	Vieillessement extrinsèque	Effet zone/exposition
	$T_{end}^{+}$ Sur-réticulation, glycation		
ACD		$T_{max}^{-}$ $T_{mid}^{-}$ Stabilité thermique moyenne collagène	
		Eau totale $+$	
		Eau cristallisable $+$	
		Eau liée $-$	
		Eau liée/eau cristallisable $--$	
CTS état hydraté		$T_{\beta 1}^{-}$ Mobilité défauts eau crist.	$T_{\beta 3}^{+}$ Restriction dynamique réseau H
	$T_{\beta}^{-}$ Mobilité localisée		
CTS lyophilisé	$I_{\beta}^{-}$ Mobilité localisée	$I_{\beta}^{- -}$ Mobilité localisée	
	$T_{\alpha}^{-}$ Mobilité délocalisée		
		$(I_{\alpha}^{-})$	

Tableau 16 : tableau récapitulatif des marqueurs des vieillissements intrinsèque et extrinsèque



---

## *Chapitre IV*

---



## Chapitre IV. Effet de l'exposition *ex vivo*

En s'appuyant sur les protocoles d'analyse développés dans les chapitres précédents, nous tentons ici de compléter l'étude menée au niveau clinique par une analyse des modifications du derme lors d'une exposition aux UVs *ex vivo*, afin de prendre uniquement en compte l'influence physique de l'exposition.

### IV.A. Descriptif de l'étude de l'exposition aux UVs *ex vivo*

Les explants de peau abdominale (disques de 22 mm de diamètre) sont prélevés chez des patientes de type Caucasien respectivement âgées de 32, 34 et 40 ans. Après rinçage dans une solution de PBS et retrait de l'hypoderme, ces explants sont soumis à des expositions UV (longueurs d'onde : 280-400 nm) sous la lampe UVA/UVB (MULTIPOINT MODEL 601), sous dosimètre à ce que les durées d'exposition correspondent à des doses érythémales de 1 ou 2 DEM. Une partie des échantillons n'est pas exposée (NE, 0 DEM).

Après exposition, ces explants sont trempés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C ( $\pm 20^\circ\text{C}$ ) avant d'être livrés au CIRIMAT et conservés à -20°C avant décongélation par paliers et analyse.

Afin de connaître l'effet de l'exposition UVs direct *ex vivo*, nous avons analysé en parallèle des biopsies de peau abdominale dermatomées (sans la couche épidermique) provenant de deux patientes de type Caucasien de 32 et 36 ans. Ces biopsies ont été exposées à des doses de 0 (NE), 0,5, 1 et 2 DEM.

### IV.B. Suivi de l'exposition *ex vivo* du derme abdominal par IRTF

#### IV.B.1. Evolution des spectres IRTF moyennés du derme abdominal avec l'exposition aux UVs

Nous avons reporté sur la Figure 109, les spectres IRTF moyennés et normalisés à l'amide II dans les 3 zones d'intérêt précédemment détaillées pour le derme abdominal non exposé et exposé à 1 et 2 DEM.

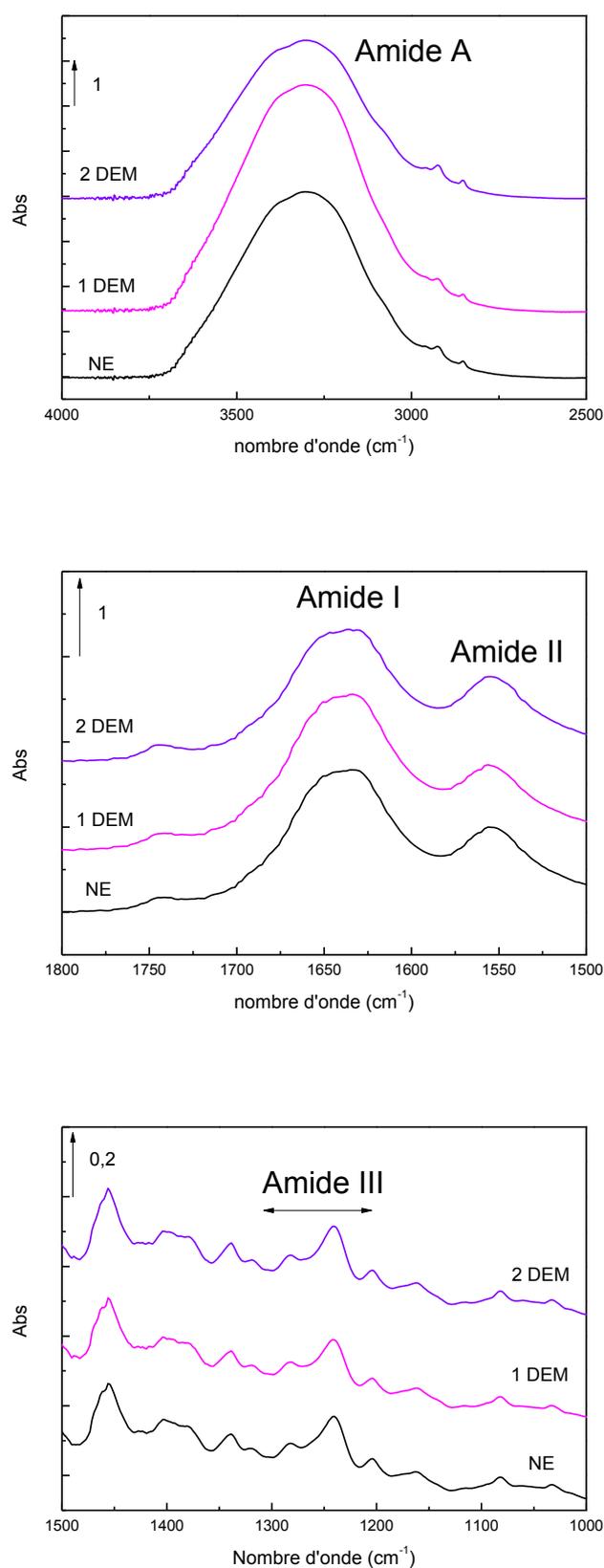


Figure 109 : spectres IRTF du derme abdominal normalisés et moyennés pour différentes doses d'exposition aux UVs dans les zones [4000-2500 cm<sup>-1</sup>], [1750-1500 cm<sup>-1</sup>] et [1500-1000 cm<sup>-1</sup>]

L'exposition UVs *ex vivo* ne modifie pas de façon drastique les bandes d'absorption du derme abdominal ; on retrouve les bandes classiques d'absorption des protéines (amide A, amide I, II, III) et des constituants minoritaires (lipides, acides nucléiques).

Les bandes associées à la phase lipidique (zone [3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ ] et [1750-1730  $\text{cm}^{-1}$ ] en particulier) sont plus prononcées dans le cas du spectre moyenné du derme abdominal exposé à 2 DEM.

#### IV.B.2. Evolution quantitative des bandes d'absorption du derme abdominal avec l'exposition aux UVs

Afin de quantifier une éventuelle évolution structurale ou chimique des échantillons avec l'exposition aux UVs nous avons choisi de compiler une série de rapports d'aires de pic en accord avec la littérature [271,328,330,331,350]. Nous avons reporté sur les figures suivantes l'évolution avec l'exposition UV des rapports d'aire nous paraissant les plus pertinents.

Sur la Figure 110 sont reportés les rapports entre l'aire de l'amide A et l'aire de l'amide II.

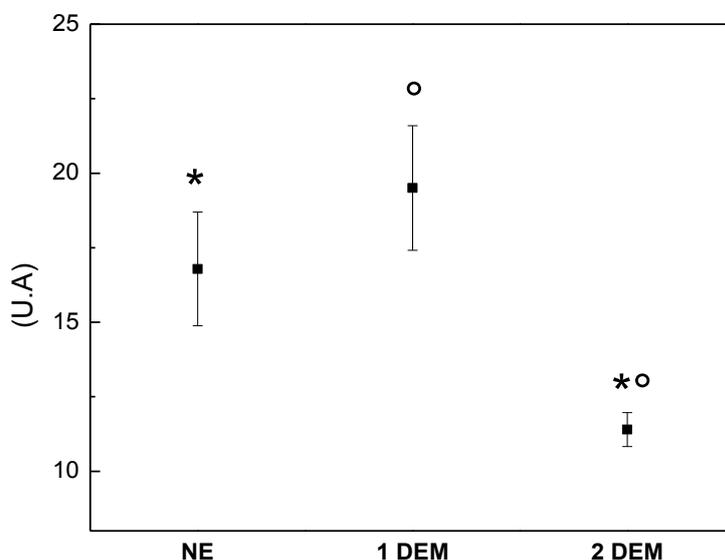


Figure 110 : aire (amide A)/(amide II) pour les trois séries de biopsies

Une diminution significative est observée avec une exposition à 2 DEM par rapport à aux échantillons non exposés ( $p=0,030$ ) et exposés à 1 DEM ( $p=0,004$ ). Cette diminution traduit très probablement une différence d'organisation du réseau de liaisons hydrogène dans le derme avec l'exposition aux UVs.

Sur la Figure 111 sont reportés les rapports entre l'aire de la bande centrée à 1338  $\text{cm}^{-1}$  et l'aire totale dans la gamme [1750-1000  $\text{cm}^{-1}$ ].

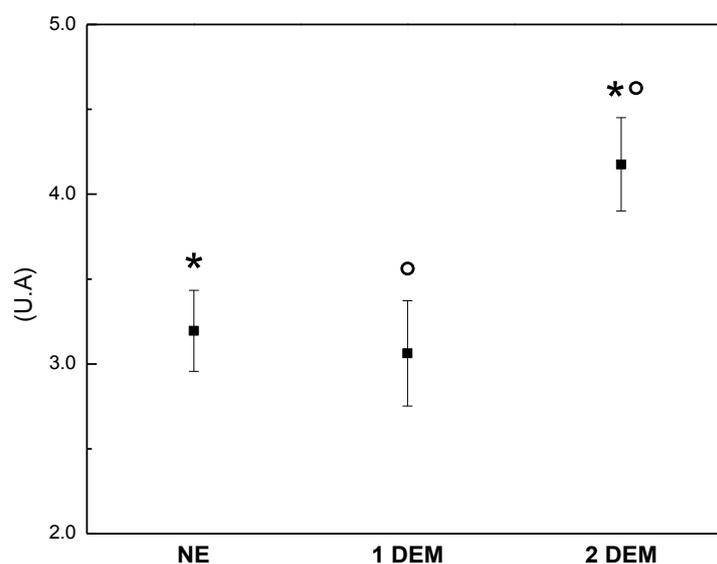


Figure 111 : aire [1357-1327  $\text{cm}^{-1}$ ]/aire [1750-1000  $\text{cm}^{-1}$ ] pour les trois séries de biopsies

Une augmentation significative de cet indicateur de la fraction de collagène dans le derme est observée pour une exposition de 2 DEM par rapport au derme non exposé ( $p=0,022$ ) et exposé à 1 DEM ( $p=0,023$ ).

Sur la Figure 112 sont reportés les rapports entre l'aire de la bande centrée à 1338  $\text{cm}^{-1}$  et l'aire de l'amide II.

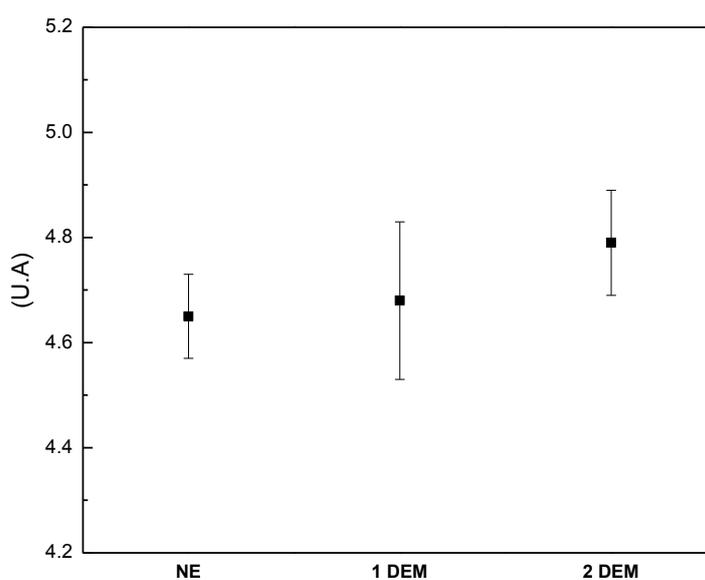


Figure 112 : aire [1357-1327  $\text{cm}^{-1}$ ]/aire (amide II) pour les trois séries de biopsies

Nous observons que l'indicateur associé à la fraction de collagène dans la fraction protéique ne varie pas de façon significative sous l'effet des UVs. La fraction collagénique du derme est ainsi préservée lors de l'exposition de l'épiderme aux UVs.

L'augmentation significative de l'indicateur de la fraction de collagène totale dans le derme est certainement due à une altération de certains composants, au profit de la phase collagénique, plus résistante.

Puisque les spectres moyennés font apparaître une augmentation des bandes d'absorption associées à la phase lipidique, nous avons compilé les rapports d'aire de ces absorptions normalisés à la fraction protéique ; si la tendance générale (qui reste à confirmer sur un grand nombre d'échantillons) est en faveur d'une augmentation du rapport lipides/protéines, les barres d'erreur sont très importantes dans ce cas, certainement à cause des prélèvements imprécis et de la probable contamination de certains échantillons par des lipides de l'hypoderme.

Le rapport entre l'aire de la bande centrée à  $1240\text{ cm}^{-1}$  et l'aire de l'amide II, qui augmentait avec l'exposition dans l'étude clinique, reste constant dans ce cas. Il en est de même pour le rapport entre l'aire de la bande centrée à  $1117\text{ cm}^{-1}$  et l'aire totale entre  $1750$  et  $1000\text{ cm}^{-1}$ , associé aux GAGs sulfatés, et qui augmentait avec la photo exposition cumulée au cours de la vie dans l'étude clinique.

D'autres indicateurs associés aux polysaccharides, aides nucléiques, etc... ont été compilés et n'ont pas mis en évidence de différence significative avec l'exposition *ex vivo* de la peau abdominale.

#### **IV.B.3. Evolution des spectres de dérivée seconde et des spectres FSD du derme abdominal avec l'exposition aux UVs**

Afin de mettre en évidence des modifications éventuelles de la réponse vibrationnelle du derme abdominal avec l'exposition aux UVs *ex vivo*, nous avons cherché à augmenter la résolution des spectres comme détaillé dans les chapitres précédents.

Nous avons reporté sur la Figure 113 les spectres moyennés de dérivée seconde dans la zone de l'amide A du derme abdominal non exposé, et exposé à 1 ou 2 DEM.

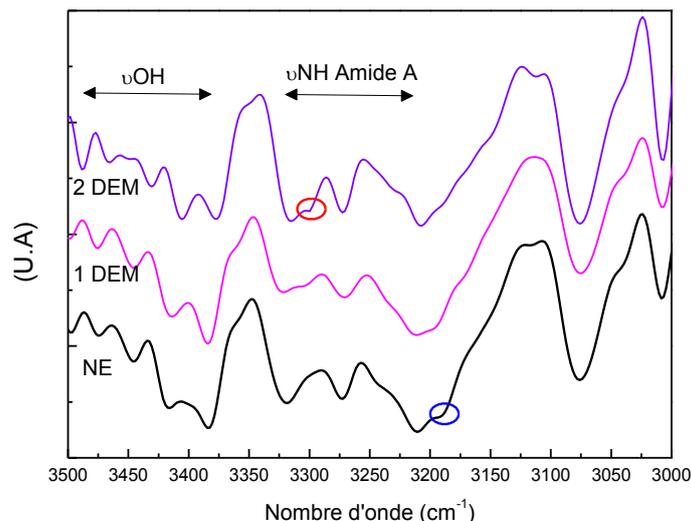


Figure 113 : spectres de dérivée seconde moyens des 3 séries de biopsies dans la zone amide A

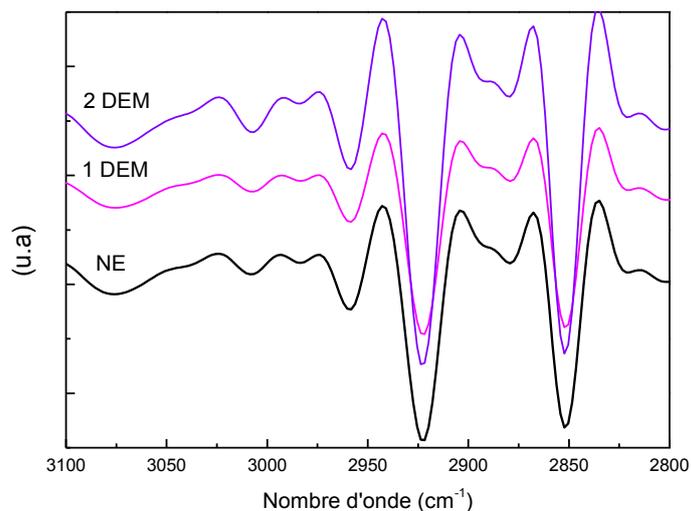
Ces spectres de dérivées secondes, qui amènent des informations plus fines sur les élongations associées aux (O-H) et (N-H), sont très peu modifiés par l'exposition aux UVs. Seules de très légères différences sont décelées, en particulier :

- l'apparition d'une nouvelle population à  $3300\text{ cm}^{-1}$  pour une exposition sous 2 DEM.
- La quasi-disparition de l'épaule à  $3190\text{ cm}^{-1}$  avec l'exposition à 2 DEM.

Même si les modifications sont très mineures avec ces doses UVs, nous n'avons observé cet effet qu'à 2 DEM.

L'épaule à  $3190\text{ cm}^{-1}$  peut être attribué essentiellement à la vibration d'élongation N-H dans les structures cis-ordonnées[435], par contre l'épaule à  $3430\text{ cm}^{-1}$  correspond à une structure trans-ordonnée. Nous pouvons supposer une réorganisation de cis à trans avec l'exposition aux UVs.

Sur la Figure 114 sont superposés les spectres moyennés de dérivées seconde dans la zone d'élongation des (CH<sub>x</sub>) du derme abdominal différemment exposé.



*Figure 114 : spectres de dérivée seconde du derme abdominal non exposé et exposé dans la zone des élongations (CH<sub>2</sub>)*

Les minimas sont situés exactement aux mêmes positions quelle que soit l'exposition. Ainsi on peut dire que l'exposition à ces doses d'UVs *ex vivo* ne modifie pas la nature des lipides du derme abdominal, ou que la technique IRTF n'est pas suffisamment sensible pour détecter des différences.

Afin de déterminer les éventuelles modifications de structures secondaires des protéines, nous avons porté une attention particulière aux zones des amides I/II et de l'amide III.

Nous avons reporté ci-après (Figure 115 et Figure 116) les spectres moyennés de dérivées secondes et les spectres FSD du derme abdominal différemment exposé dans la zone des amides I et II.

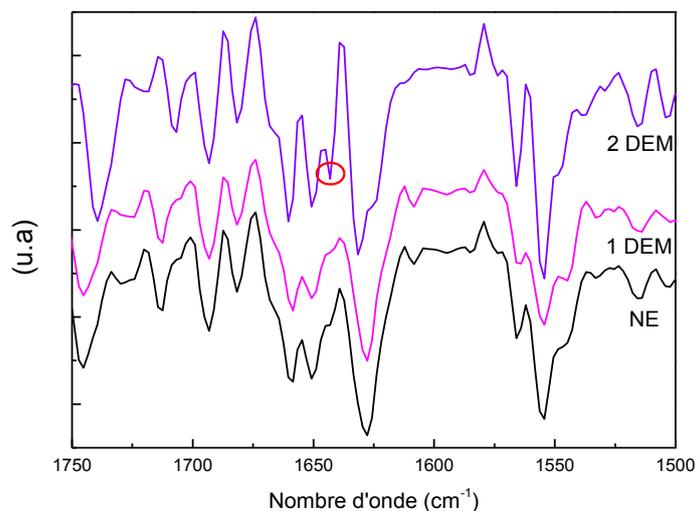


Figure 115 : spectres moyennés de dérivée seconde du derme abdominal non exposé et exposé dans la zone amide I/II

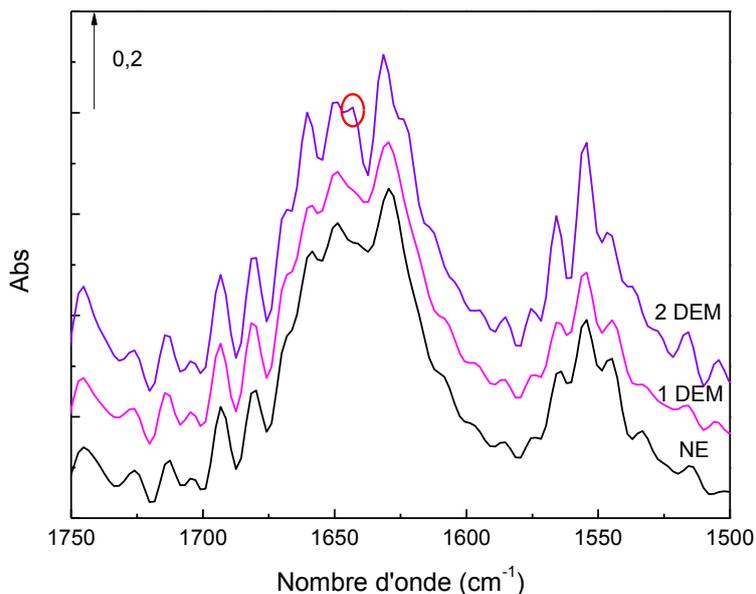


Figure 116 : spectres FSD moyennés du derme abdominal non exposé et exposé dans la zone amide I/II

Sur les spectres de dérivée seconde ou de FSD, les minimas/maximas sont situés quasiment aux mêmes positions quelle que soit l'exposition. De manière qualitative, nous pouvons donc dire que les mêmes structures secondaires de protéines sont donc présentes dans le derme non exposé et exposé.

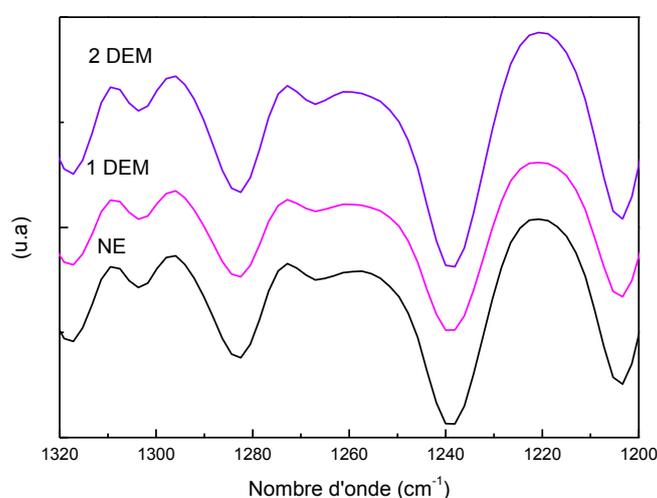
De très légères différences sont notées sur ces spectres :

- Un minimum/maximum supplémentaire apparaît à  $1643 \text{ cm}^{-1}$  pour une exposition de 2

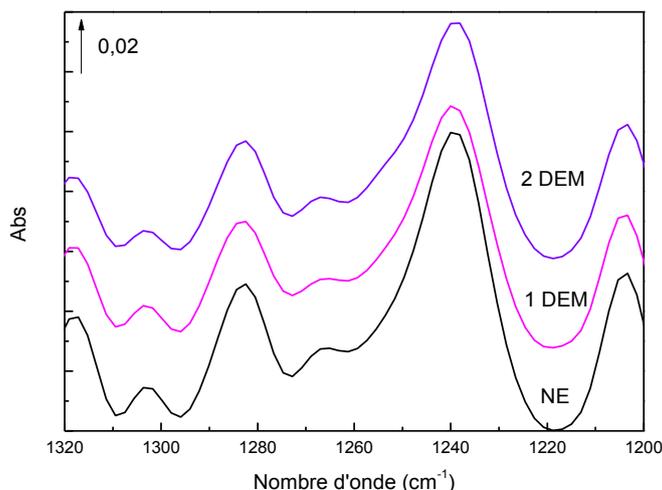
DEM. Il est soit associé à l'eau intermoléculaire, soit à une modification chimique des carbonyles associés à la phase lipidique, plus susceptibles aux UVs. Il est à noter que ce minimum/maximum n'est pas observé dans le collagène de type I hydraté à 65% (origine bovine).

- L'absorption à  $1565\text{ cm}^{-1}$  qui peut être attribuée à la chaîne latérale de l'acide glutamique [310], est plus intense avec une exposition sous 2 DEM.

Nous avons représenté sur la Figure 117 et la Figure 118, les spectres moyennés de dérivées secondes et les spectres FSD du derme abdominal différemment exposé dans la zone de l'amide III.



*Figure 117 : spectres moyens de dérivée seconde du derme abdominal non exposé et exposé dans la zone de l'amide III*



*Figure 118 : spectres moyens de FSD du derme abdominal non exposé et exposé dans la zone de l'amide III*

Dans la zone de l'amide III, sensible elle aussi à la structure secondaire des protéines, (Figure 117 et Figure 118), les minima/maxima sont situés aux mêmes positions quelle que soit l'exposition aux UVs, ce qui corrobore les observations précédentes sur la préservation des structures secondaires des protéines.

#### IV.C. Suivi de l'exposition ex vivo de la peau abdominale par ACD

##### IV.C.1. Transitions thermiques de la peau humaine

Sur la Figure 119 sont reportés les thermogrammes ACD (normalisés à la masse initiale) de trois biopsies de peau abdominale d'un même sujet à l'état initial (NE) et soumises à des expositions de 1 et 2 DEM, correspondant à un premier chauffage à 10°C/min. Sur la Figure 120, nous avons reporté ces thermogrammes ACD agrandis dans la zone [60-85°C] et nous avons superposé les thermogrammes correspondants à la 2<sup>ème</sup> remontée en température.

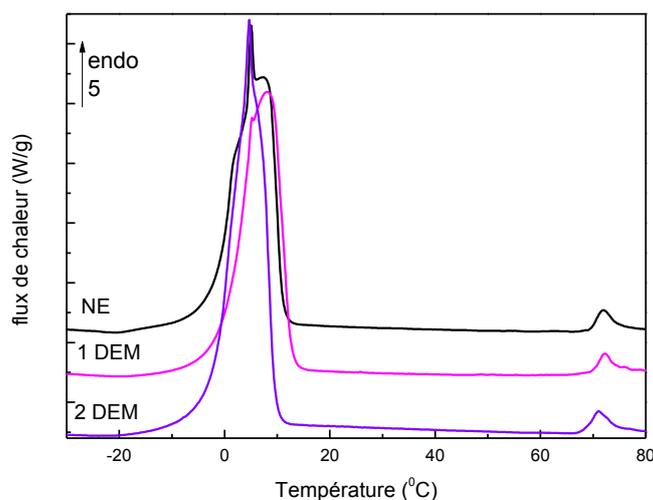


Figure 119 : thermogrammes ACD des biopsies abdominales (non exposée, exposée à 1 et 2 DEM)

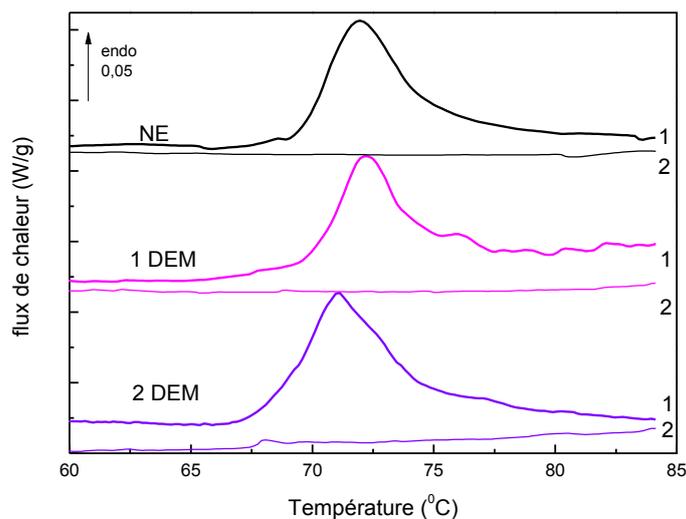


Figure 120 : agrandissement de la zone de dénaturation [60-85°C] et superposition de la 2<sup>ème</sup> remontée en température

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, le pic endothermique enregistré dans la zone [-20-20°C] sur la Figure 119 est associé à la fusion de l'eau cristallisée lors du refroidissement antérieur (toujours après un refroidissement contrôlé). Le phénomène endothermique enregistré dans la zone [60-85°C] est associé à la dénaturation thermique irréversible du collagène (non observée lors de balayages successifs), toujours visible après les expositions aux UVs.

### IV.C.1.1. Organisation hydrique de la peau abdominale avec l'exposition UV

Comme dans les chapitres précédents, nous avons déterminé le pourcentage d'eau cristallisable à partir de l'endotherme de fusion de la glace. Nous avons reporté dans les tableaux (annexe D tableau 1, 2 et 3) l'ensemble des données obtenues sur l'ensemble des explants. Sur les Figure 121 et Figure 122 sont reportés les pourcentages moyens d'eau totale, d'eau cristallisable et non cristallisable en fonction de l'exposition aux UVs, ainsi que et le rapport (eau non cristallisable)/eau cristallisable).

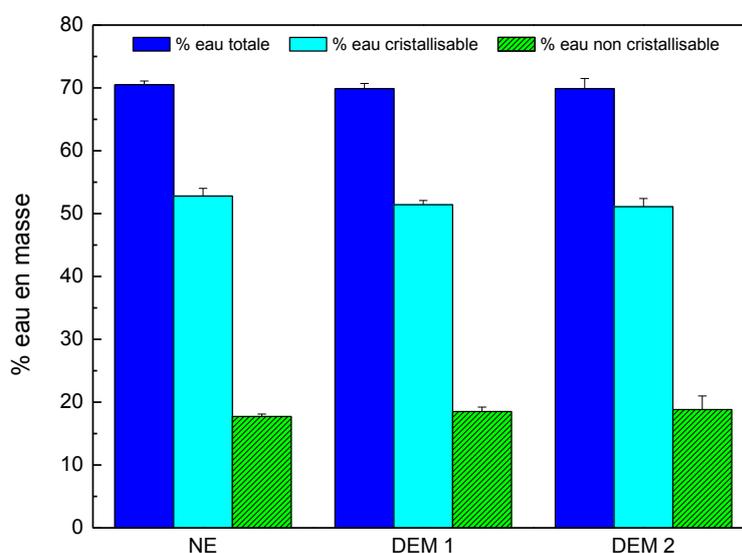


Figure 121 : évolution de l'hydratation avec l'exposition aux UVs dans les biopsies abdominales

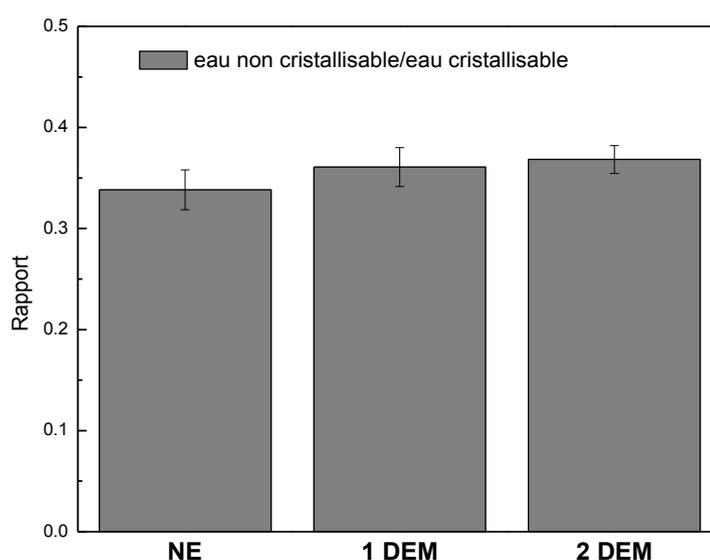


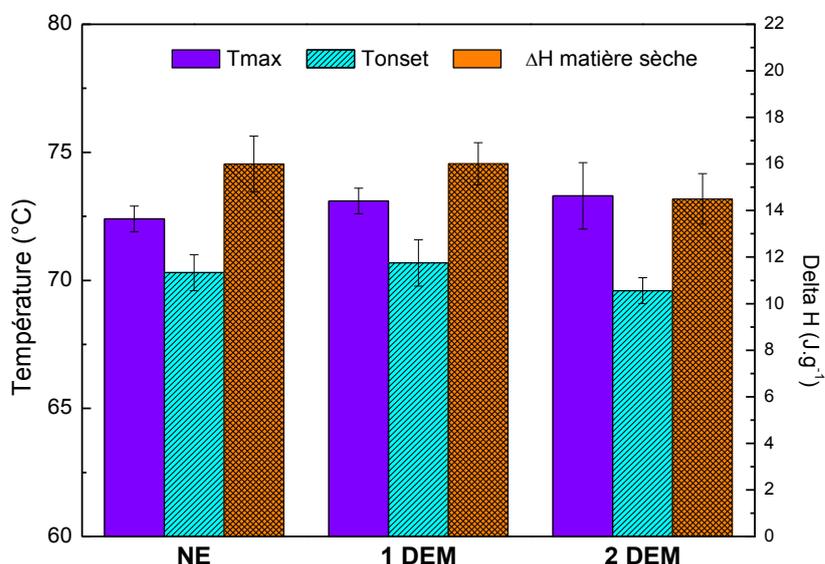
Figure 122 : rapport (eau non cristallisable)/(eau cristallisable) dans les biopsies abdominales

Aucune différence significative n'est retrouvée avec l'exposition des explants pour ces doses d'UVs. L'hydratation du derme reste constante, avec une valeur d'hydratation totale d'environ de 70%, une teneur d'eau cristallisable de l'ordre de 52% et une teneur d'eau non cristallisable de l'ordre de de 18%.

Ces résultats permettent de conclure que l'effet de l'exposition *ex vivo* des explants de peau n'induit pas de modification quantitative de l'organisation hydrique des échantillons. La première couche d'hydratation des protéines est bien conservée avec l'exposition *ex vivo* pour ces doses (1 et 2 DEM).

#### IV.C.1.2. Dénaturation de la phase collagénique de la peau abdominale avec l'exposition UV

Nous avons utilisé le protocole de traitement de l'endotherme de dénaturation détaillé dans le chapitre II afin de déterminer et de comparer les paramètres caractéristiques de la dénaturation thermique de la phase collagénique de ces échantillons. L'ensemble des paramètres caractéristiques de l'endotherme de dénaturation, à savoir  $T_{onset}$ ,  $T_{max}$ , et  $\Delta H_d$  sont consignés dans les tableaux 1, 2 et 3 de l'annexe D. Sur la Figure 123 sont reportées les valeurs moyennes de ces paramètres caractéristiques pour ces trois séries d'explants.



*Figure 123 : évolution des paramètres thermiques de la dénaturation du collagène avec l'exposition aux UVs dans les biopsies abdominales*

Aucune différence significative n'est retrouvée avec l'exposition des explants pour ces doses d'UV. Sur le nombre d'échantillon considéré, les paramètres de dénaturation du collagène

restent constants, avec une température début de dénaturation  $T_{onset}$  alentour de 70°C, une température  $T_{max}$  d'environ 73°C et une enthalpie de dénaturation de 15,7J.g<sup>-1</sup>.

Ainsi nous pouvons conclure qu'à ces doses d'exposition ex vivo, les UVs n'ont pas une influence directe sur la matrice collagénique de la peau abdominale.

#### IV.C.2. Transitions thermiques du derme abdominal humain

Nous avons utilisé le même protocole ACD sur des explants de peau abdominale sans épiderme (peau dermatomée).

##### IV.C.2.1. Organisation hydrique du derme abdominal avec l'exposition UV

Sur la Figure 124 sont reportés les pourcentages moyens d'eau totale, d'eau cristallisable et non cristallisable en fonction de l'exposition aux UVs. Sur la Figure 125, nous avons représenté le rapport entre l'eau non cristallisable et l'eau cristallisable.

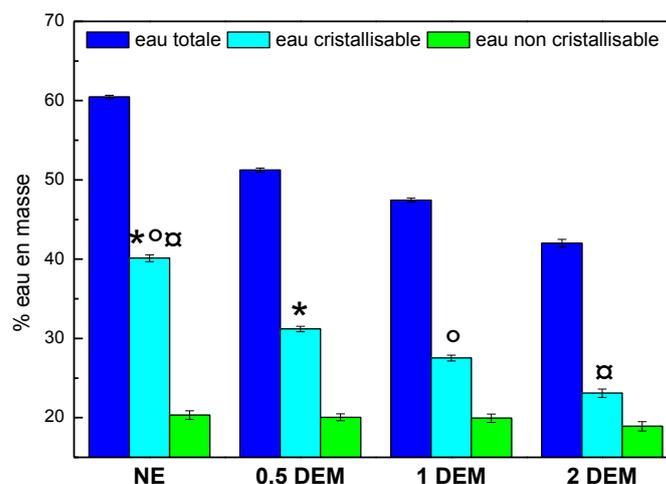


Figure 124 : organisation hydrique du derme abdominal non exposé et exposé aux UVs

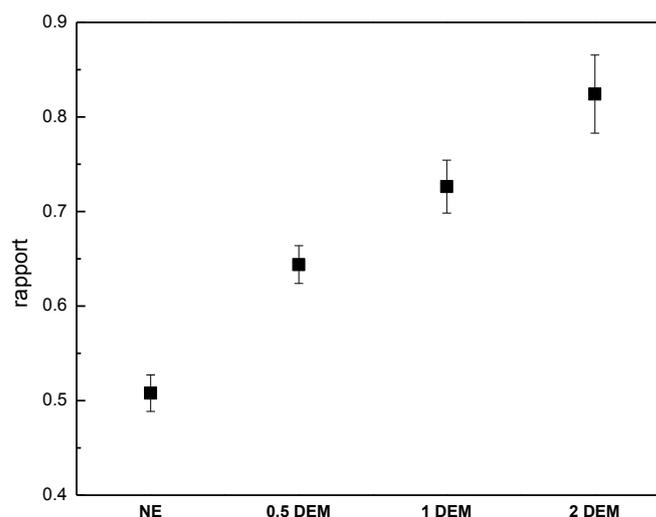


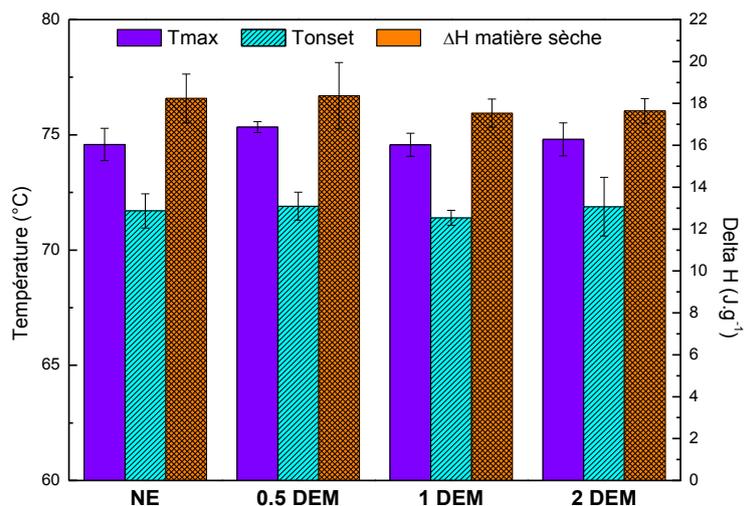
Figure 125 : rapport entre l'eau non cristallisable et l'eau cristallisable dans le derme abdominal non exposé et exposé

On note dans ce cas une diminution significative de l'eau totale et l'eau cristallisable avec l'exposition aux UVs, et ce dès 0,5 DEM. En revanche, la quantité d'eau non cristallisable reste constante quel que soit l'exposition. Ceci entraîne une augmentation très significative du rapport (eau non cristallisable)/(eau cristallisable) avec l'exposition aux UV, de façon quasi-linéaire.

On met ainsi en évidence le rôle barrière de l'épiderme : sans ce dernier, l'exposition *ex vivo* aux UVs entraîne une déshydratation drastique du derme, ce qui se traduit par une diminution de la quantité d'eau cristallisable et donc d'eau totale. En revanche la première couche d'hydratation des protéines, correspondant à de l'eau fortement liée et donc non cristallisable est préservée avec l'exposition aux UVs dans ces conditions.

#### **IV.C.2.2. Dénaturation de la phase collagénique du derme abdominal avec l'exposition UV**

Sur la Figure 123 sont reportées les valeurs moyennes des paramètres de dénaturation pour ces trois séries d'explants dermatomés.



*Figure 126 : évolution des paramètres thermiques de la dénaturation du collagène du derme abdominal avec l'exposition aux UVs*

Comme dans le cas de la peau abdominale, (Figure 123), aucune différence significative n'est retrouvée avec l'exposition des explants dermatomés pour ces doses d'UV. Les paramètres de dénaturation de la phase collagénique de la peau abdominale restent constants, avec une température début de dénaturation  $T_{onset}$  alentour de 72°C, une température  $T_{max}$  d'environ 75°C et une enthalpie de dénaturation de 18 J.g<sup>-1</sup>. Il est à noter que l'enthalpie de dénaturation est plus élevée que dans la peau (derme/épiderme) ce qui apparaît logique car la proportion de collagène augmente. On note aussi une augmentation de la température de dénaturation (+2°C) par rapport à la peau (derme/épiderme).

Il est important de noter que la diminution de l'hydratation n'entraîne pas de déstabilisation du collagène dans le derme exposé ; cette préservation de la stabilité thermique du collagène est très certainement corrélée à la préservation de la quantité d'eau liée, comme précédemment décrit dans la littérature [427,436].

#### IV.D. synthèse et interprétation des principaux résultats d'analyse IRTF et ACD

Nous résumons ici les principales conclusions sur l'effet direct des UVs sur la peau abdominale *ex vivo*.

##### Organisation hydrique

Les résultats de l'analyse thermique ne mettent pas en évidence de modification quantitative

de l'organisation hydrique de la peau abdominale à ces doses d'exposition *ex vivo*. En revanche, la diminution de l'amide A pour une dose de 2 DEM et la modification des spectres de dérivées secondes sont en faveur d'une modification du réseau de liaisons hydrogène avec en particulier une possible réorganisation de structures de cis à trans.

Nous avons aussi mis en évidence le rôle crucial de l'épiderme en étudiant les peaux dermatomées : sans épiderme, les UV induisent une déshydratation drastique, et ce dès une dose de 0,5 DEM.

### **Phase collagénique**

Les paramètres de dénaturation thermique du collagène restent constants avec l'exposition UV, ce qui implique une conservation de la matrice collagénique dans la peau abdominale exposée. Les effets directs des UVs à ces doses d'exposition n'induisent pas de déstabilisation ni de fragmentation de la phase collagénique. On retrouve un résultat similaire sur le derme seul, non protégé par l'épiderme.

Cette conclusion est corroborée par les résultats vibrationnels, qui mettent en avant la préservation de la fraction de collagène dans la fraction totale de protéines du derme lors de l'exposition de l'épiderme aux UVs.

### **Autres composants**

La fraction de collagène dans le derme augmente au détriment de composants moins stables aux UVs, qu'il reste à déterminer.

Nous n'avons pas mis en évidence une augmentation de la fraction de (GAG)s sulfatés avec ce type d'exposition aux UVs.

### **Tableau récapitulatif des marqueurs de l'exposition *ex vivo* de la peau aux UVs**

	Effet exposition (sans épiderme)	Effet exposition (avec épiderme)
IRTF	Non évalué	1338/total +
	Non évalué	Amide A/amide II -
ACD	Eau totale-	
	Eau cristallisable -	
	Eau liée/eau cristallisable++	

Tableau 17 : tableau récapitulatif des marqueurs du vieillissement intrinsèque et extrinsèque

On conclut donc que les effets directs de l'exposition UV sur le derme *ex vivo* ne conduisent pas aux mêmes modifications que l'exposition cumulée tout au long de la vie. Dans le cas où la peau *ex vivo* est exposée avec l'épiderme, très peu de modifications sont relevées ; ce modèle ne paraît pas pertinent pour simuler une exposition UV *in vivo*.

---

## *Conclusion et perspectives*

---



## Conclusion et perspectives

Nous avons vérifié dans ce travail de thèse **la capacité** des trois techniques de caractérisation (**ACD, IRTF et CTS**) pour extraire des informations reproductibles sur des **biopsies cutanées humaines** extraites d'explant abdominaux, à l'état hydraté et lyophilisé.

Nous avons validé l'utilisation de la spectroscopie IRTF en mode ATR et la sur-résolution des spectres pour obtenir l'empreinte digitale vibrationnelle du derme et des indicateurs quantitatifs des différents constituants de ce tissu complexe.

En parallèle, nous avons établi un protocole d'analyse ACD applicable à un grand nombre de biopsies pour déterminer finement **l'organisation hydrique** de la peau via la quantification de l'eau cristallisable et de l'eau non cristallisable et pour évaluer la **stabilité thermique de la phase collagénique**.

**L'adaptation de la technique CTS** à l'étude de biopsies cutanées de faible diamètre et dans différentes conditions d'hydratation a permis de **sonder la dynamique des différentes couches d'hydratation** et la **mobilité localisé et délocalisée des protéines du derme**.

L'utilisation combinée de l'ACD et de la spectroscopie IRTF a confirmé la **fiabilité du protocole de conservation** des biopsies prélevées dans le cadre de l'étude clinique.

Dans le cadre de l'étude clinique menée sur la peau photo-exposée et photo-protégée des sujets de 20-30 ans et de sujets âgés de plus de 60 ans, nous avons pu relever **différents indicateurs du vieillissement intrinsèque et extrinsèque**.

Nous avons d'une part mis en évidence **une profonde modification de l'organisation hydrique avec le vieillissement extrinsèque** ; la **quantité d'eau totale et d'eau cristallisable augmente au détriment de la quantité d'eau liée**. Nous avons aussi montré que **seul le photo-vieillessement entraîne la modification de la dynamique de l'eau cristallisable**, et l'on peut suggérer une ségrégation de phase eau en masse/matrice.

Ces données quantitatives sont à relier à la diminution de l'échogénicité du derme supérieur dans la peau âgée photo-vieillie, et à l'accumulation de GAGs et d'eau non liée, non fonctionnelle dans les zones élastolytiques.

D'autre part, l'évolution de la **phase collagénique** a pu être suivie. La présence d'une fraction de collagène stable thermiquement est relevée avec **le vieillissement intrinsèque**, et associée à l'augmentation de la densité de nœuds de réticulation stables, non réductibles dans le collagène avec l'âge, impliquant très certainement le processus **de glycation** non enzymatique.

Une des autres conséquences majeures **du photovieillissement, avec la modification de l'organisation hydrique, est la diminution significative de la fraction des collagènes fibrillaires**, qui s'accompagne d'une altération de son architecture en triple hélice. La **décroissance significative de la stabilité thermique moyenne du collagène dans la peau photo-exposée des sujets âgés** est en faveur d'une déstabilisation et/ou d'une fragmentation des fibres de collagène avec l'exposition cumulative aux UVs tout au long de la vie. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication [437].

Ces modifications se répercutent sur la dynamique du derme, et il est souligné que **l'amplitude de la mobilité localisée et délocalisée diminue avec le vieillissement chronologique et que cet effet s'accroît avec l'action cumulée de l'âge et des UVs.**

Enfin **une altération de la composition des GAGs est détectée avec le vieillissement extrinsèque, avec une probable augmentation de la fraction de GAGs sulfatés** comme les CS liés au noyau protéique du versicane dans les lésions élastolytiques.

Dans la dernière partie de cette thèse, nous avons pu vérifier que l'organisation hydrique de la peau **n'était pas modifiée** lorsqu'elle était exposée **ex vivo à différentes doses d'UVs**, même si des modifications mineures du réseau de liaisons hydrogène dans le derme étaient détectées.

De la même façon, nous avons montré que les **effets directs des UVs à ces doses d'exposition sur la peau ex vivo n'induisent pas de déstabilisation ni de fragmentation de la phase collagénique du derme.** Une diminution de la quantité de certains composants qui restent à identifier au profit de la phase collagénique, plus résistante, est notée, et seules sont détectées des altérations mineures de la réponse vibrationnelle du derme sur les spectres sur-résolus.

Nous avons aussi confirmé le **rôle essentiel de l'épiderme, qui empêche la déshydratation drastique du derme**, qui se produit sinon dès les faibles doses d'UVs (0,5 DEM).

Ce modèle permet de conclure que les effets directs de l'exposition UV sur le derme *ex vivo* ne conduisent évidemment pas aux mêmes modifications que l'exposition cumulée tout au long de la vie.

Pour contribuer à la compréhension des profondes différences retrouvées au niveau de l'organisation hydrique et de la phase collagénique avec le photo-vieillissement du derme, il serait nécessaire d'étudier grâce aux protocoles **élaborés l'évolution des indicateurs précédemment déterminés** dans différents modèles plus simples, comme la peau reconstruite exposée aux UVs. Il serait aussi intéressant de pouvoir sonder grâce aux trois

techniques utilisées dans ce travail les constituants purifiés extraits de la MEC de la peau photo-exposée, à savoir les collagènes de type I et III et l'élastine, afin d'évaluer plus finement dans cette MEC disséquée l'évolution des structures secondaires de ces protéines et leur dynamique propre.

Enfin, l'ensemble des indicateurs obtenus en ACD, IRTF et CTS sur les séries de biopsies des deux groupes d'âge vont être prochainement corrélées avec les indicateurs issus des analyses protéomiques et glycomiques, de l'analyse Raman, des mesures de cutométrie et de l'imagerie ultrasonore haute fréquence, afin d'identifier clairement de nouvelles cibles cliniques impactées par le vieillissement intrinsèque ou sous l'effet des Uvs.

L'ensemble de ces indicateurs pourra alors être utilisé pour la recherche de nouveaux actifs à visée anti-âge ou protecteurs solaires.



## Références Bibliographiques

- [1] J. Kanitakis ; *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*, **Eur. J. Dermatology** Vol.12 (Iss 4), 390–401, 2002.
- [2] E. Cleary ; *skin*, **harwood academic publishers**, 77–109, 1996.
- [3] W.. James, T. Berger, D.M. Elston ; *Skin: Basic Structure and Function*, **Elsevier Saunders**, 1–11, 2011.
- [4] B. Young, G. O’Dowd, P. Woodford ; *skin*, **Churchill Livingstone**, 159–179, 2013.
- [5] L. Alonso, E. Fuchs ; *Stem cells of the skin epithelium.*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** Vol.100 Suppl, 11830–11835, 2003.
- [6] D. Gawkrödger, M.R. Ardern-Jones ; *Dermatology: An Illustrated Colour Text*, **Churchill Livingstone**, 2012.
- [7] J. Sandby-Møller, T. Poulsen, H.C. Wulf ; *Epidermal Thickness at Different Body Sites: Relationship to Age, Gender, Pigmentation, Blood Content, Skin Type and Smoking Habits*, **Acta Derm. Venereol.** Vol.83 (Iss 6), 410–413, 2003.
- [8] D.H. Chu, A.R. Haake, K. Holbrook, C.A. Loomis ; *The Structure and Development of Skin*, **McGraw-Hill Professional**, 89–115, 2003.
- [9] D.H. Chu ; *Overview of biology, development, and structure of skin*, **McGraw-Hill**, 57–73, 2012.
- [10] J. Kim, R. Modlin ; *Innate Immunity and the Skin*, **McGraw-Hill Professional**, 2003.
- [11] Holbrook, Odland ; *Regional differences in the thickness (cell layers) of the human stratum corneum: an ultrastructural analysis*, Vol.62, 415–422, 1974.
- [12] I. Brody ; *Ultrastructure of the stratum corneum.*, **Int. J. Dermatol.** Vol.16 (Iss 4), 245–256, 1977.
- [13] E.H. Mojumdar, G.S. Gooris, J.A. Bouwstra ; *Phase behavior of skin lipid mixtures: the effect of cholesterol on lipid organization*, **Soft Matter** Vol.11 (Iss 21), 4326–4336, 2015.
- [14] Peter Elias, K. Feingold, J. Fluhr ; *Skin As an Organ of Protection*, **McGraw-Hill Professional**, 2003.
- [15] G.F. Murphy ; *Histology of the Skin*, **Lippincott Williams & Wilkins**, 9–58, 2004.
- [16] D.J. Tobin ; *Biochemistry of human skin—our brain on the outside*, **Chem. Soc. Rev.** Vol.35 (Iss 1), 52–67, 2006.
- [17] G. Szabo, A.B. Gerald, M.A. Pathak, T.B. Fitzpatrick ; *Racial Differences in the Fate of Melanosomes in Human Epidermis*, **Nature** Vol.222 (Iss 5198), 1081–1082, 1969.
- [18] J.P. Lacour, D. Dubois, a Pisani, J.P. Ortonne ; *Anatomical mapping of Merkel cells in normal human adult epidermis.*, **Br. J. Dermatol.** Vol.125 (Iss 6), 535–542, 1991.
- [19] E. Makrantonaki, C.C. Zouboulis ; *The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2).*, **Exp. Gerontol.** Vol.42 (Iss 9), 879–86, 2007.
- [20] R.E. Burgeson, A.M. Christiano ; *The dermal—epidermal junction*, **Curr. Opin. Cell Biol.** Vol.9 (Iss 5), 651–658, 1997.
- [21] L. Bruckner-Tuderman ; *Basement Membranes*, **McGraw-Hill Professional**, 2003.
- [22] E. Pokidysheva, S. Boudko, J. Vranka, K. Zientek, K. Maddox, et al. ; *Biological role of prolyl 3-hydroxylation in type IV collagen.*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** Vol.111 (Iss 1), 161–6, 2014.
- [23] L. Bruckner-Tuderman, U.W. Schnyder, K.H. Winterhalter, P. Bruckner ; *Tissue form of type VII collagen from human skin and dermal fibroblasts in culture*, **Eur. J. Biochem.** Vol.165 (Iss 3), 607–611, 1987.
- [24] M. Aumailley, L. Bruckner-Tuderman, W. Carter, R. Deutzmann, D. Edgar, et al. ; *A simplified laminin nomenclature*, **Matrix Biol.** Vol.24 (Iss 5), 326–332, 2005.

## Références Bibliographiques

---

- [25] M. Aumailley, P. Rousselle ; *Laminins of the dermo-epidermal junction.*, **Matrix Biol.** Vol.18 (Iss 1), 19–28, 1999.
- [26] P. Rousselle, G.P. Lunstrum, D.R. Keene, R.E. Burgeson ; *Kalinin : An Epithelium-Specific Basement Membrane Adhesion Molecule That Is a Component of Anchoring Filaments*, Vol.114 (Iss 3), 1991.
- [27] T. Nishiyama, S. Amano, M. Tsunenaga, K. Kadoya, a Takeda, et al. ; *The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane.*, **J. Dermatol. Sci.** Vol.24 Suppl 1, S51-9, 2000.
- [28] M. Aumailley, T. Krieg ; *Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes*, Vol.106 (Iss 2), 209–214, 1996.
- [29] A.M. Christiano, J. Uitto ; *Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. Revelations from the paradigms of epidermolysis bullosa*, **Exp. Dermatol.** Vol.5 (Iss 1), 1–11, 1996.
- [30] P.A.J. Kolarsick, M.A. Kolarsick, C. Goodwin ; *Anatomy and Physiology of the Skin*, **Oncology Nursing Society**, 1–12, 2009.
- [31] J.M. Sorrell ; *Fibroblast heterogeneity: more than skin deep*, **J. Cell Sci.** Vol.117 (Iss 5), 667–675, 2004.
- [32] M. Zak, P. Kuroпка, M. Kobielarз, A. Dudek, K. Kaleta-Kuratewicz, et al. ; *Determination of the mechanical properties of the skin of pig fetuses with respect to its structure*, **Acta Bioeng. Biomech.** Vol.13 (Iss 2), 37–43, 2011.
- [33] F.H. Silver, L.M. Siperko, G.P. Seehra ; *Mechanobiology of force transduction in dermal tissue.*, **Skin Res. Technol.** Vol.9 (Iss 1), 3–23, 2003.
- [34] C. Prost-squarcioni, S. Fraitag, M. Heller, N. Boehm ; *Histologie fonctionnelle du derme*, **Ann. Dermatol. Venereol.** Vol.135 (Iss 1), 5–20, 2008.
- [35] H.Y. Chang, J.-T. Chi, S. Dudoit, C. Bondre, M. van de Rijn, et al. ; *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts.*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** Vol.99 (Iss 20), 12877–12882, 2002.
- [36] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, et al. ; *Cell Junctions and the Extracellular Matrix*, **Garland Science**, 1035–1090, 2015.
- [37] V. Ottani, D. Martini, M. Franchi, A. Ruggeri, M. Raspanti ; *Hierarchical structures in fibrillar collagens.*, **Micron** Vol.33 (Iss 7–8), 587–96, 2002.
- [38] S. Ricard-Blum ; *The collagen family.*, **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** Vol.3 (Iss 1), a004978, 2011.
- [39] M. van der Rest, B. Dublet, M.F. Champliaud ; *Fibril-associated collagens.*, **Biomaterials** Vol.11, 28–31, 1990.
- [40] M. van der Rest, R. Garrone ; *Collagens as multidomain proteins.*, **Biochimie** Vol.72 (Iss 6–7), 473–84,
- [41] A. Saadat ; *Etude de la mobilité moléculaire du collagène par courants thermostimulés : modélisation du vieillissement cutané*, Thèse de l'Université Paul Sabatier, 1988.
- [42] S. Mezghani ; *Etude par spectroscopie diélectrique de la mobilité moléculaire du collagène au cours du vieillissement et de l'irradiation*, Thèse de l'Université Paul Sabatier, 1994.
- [43] V. Samouillan ; *Etude de la structure physique des biopolymères constitutifs du tissu cardio-vasculaire. Application à la définition de biomatériaux*, Thèse de l'Université Paul Sabatier, 1999.
- [44] D. Tintar ; *Etude de la dynamique de chaîne des protéines de la matrice extracellulaire par spectroscopies mécanique et diélectrique*, Thèse de l'Université Paul Sabatier, 2010.
- [45] N. Hitmi ; *Etude des transitions dans les composés minérale et organique des tissus calcifiés par spectroscopie diélectrique basse fréquence*, Thèse de l'Université Paul Sabatier, 1983.
- [46] J.A. McGrath, R.A.J. Eady, F.M. Pope ; *Anatomy and Organization of Human Skin*, **Blackwell Publishing**, 2004.
- [47] B. Young, G. O'Dowd, P. Woodford ; *Supporting/connective tissues*, **Churchill Livingstone**, 65–100, 2013.

## Références Bibliographiques

---

- [48] S. Ricard-Blum, F. Ruggiero ; *The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane.*, **Pathol. Biol. (Paris)**. Vol.53 (Iss 7), 430–42, 2005.
- [49] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner ; *Collagens--structure, function, and biosynthesis.*, **Adv. Drug Deliv. Rev.** Vol.55 (Iss 12), 1531–46, 2003.
- [50] J. Bella, B. Brodsky, H.M. Berman ; *Hydration structure of a collagen peptide.*, **Structure** Vol.3 (Iss 9), 893–906, 1995.
- [51] S.K. Holmgren, K.M. Taylor, L.E. Bretscher, R.T. Raines ; *Code for collagen's stability deciphered.*, **Nature** Vol.392 (Iss 6677), 666–7, 1998.
- [52] J. Bella, B. Brodsky, H.M. Berman ; *Hydration structure of a collagen peptide.*, **Structure** Vol.3 (Iss 9), 893–906, 1995.
- [53] I. Streeter, N.H. de Leeuw ; *A molecular dynamics study of the interprotein interactions in collagen fibrils.*, **Soft Matter** Vol.7 (Iss 7), 3373–3382, 2011.
- [54] T.T. Nguyen, T. Happillon, J. Feru, S. Brassart-Passco, J.-F. Angiboust, *et al.* ; *Raman comparison of skin dermis of different ages: focus on spectral markers of collagen hydration*, **J. Raman Spectrosc.** Vol.44 (Iss 9), 1230–1237, 2013.
- [55] M.E. Nimni, R.D. Harkness ; *Molecular structure and function of collagen*, **CRC Press**, 1–77, 1988.
- [56] X. Liu, H. Wu, M. Byrne, S. Krane, R. Jaenisch ; *Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development*, **Proc. Natl. Acad. Sci.** Vol.94 (Iss 5), 1852–1856, 1997.
- [57] C.M. Kielty, M.E. Grant ; *The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix*, **John Wiley & Sons, Inc.**, 103–147, 2002.
- [58] T.F. Linsenmayer ; *Collagen*, **Plenum press**, 7–44, 1991.
- [59] G.J. Cameron, I.L. Alberts, J.H. Laing, T.J. Wess ; *Structure of type I and type III heterotypic collagen fibrils: an X-ray diffraction study.*, **J. Struct. Biol.** Vol.137 (Iss 1–2), 15–22, 2002.
- [60] D.. Birk ; *Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly*, **Micron** Vol.32 (Iss 3), 223–237, 2001.
- [61] E.J. Kucharz ; *The collagens: Biochemistry and pathophysiology*, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 1992.
- [62] D.A.D. Parry, A.S. Craig ; *Growth and development of collagen fibrils in connective tissue*, **Martinus Nijhoff**, 34–64, 1984.
- [63] K.M. Blum, T. Novak, L. Watkins, C.P. Neu, J.M. Wallace, *et al.* ; *Acellular and cellular high-density, collagen-fibril constructs with suprafibrillar organization*, **Biomater. Sci.** Vol.4 (Iss 4), 711–723, 2016.
- [64] R.M. Lavker, P.S. Zheng, G. Dong ; *Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.88 (Iss 3 Suppl), 44s–51s, 1987.
- [65] M.D. Shoulders, R.T. Raines ; *Collagen structure and stability.*, **Annu. Rev. Biochem.** Vol.78, 929–58, 2009.
- [66] G. Zhang, B.B. Young, Y. Ezura, M. Favata, L.J. Soslowsky, *et al.* ; *Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis.*, **J. Musculoskelet. Neuronal Interact.** Vol.5 (Iss 1), 5–21, 2005.
- [67] D.R. Keene, L.Y. Sakai, H.P. Bächinger, R.E. Burgeson ; *Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter.*, **J. Cell Biol.** Vol.105 (Iss 5), 2393–402, 1987.
- [68] W. Henkel, R.W. Glanville ; *Covalent Crosslinking between Molecules of Type I and Type III Collagen. The Involvement of the N-Terminal, Nonhelical Regions of the alpha(I) and alpha(III) Chains in the Formation of Intermolecular Crosslinks*, **Eur. J. Biochem.** Vol.122 (Iss 1), 205–213, 1982.
- [69] R. Fleischmajer, J.S. Perlish, R.E. Burgeson, F. Shaikh-Bahai, R. Timpl ; *Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis.*, **Ann. N. Y. Acad. Sci.** Vol.580, 161–75, 1990.

## Références Bibliographiques

---

- [70] P. Martin, W.R. Teodoro, A.P.P. Velosa, J. de Morais, S. Carrasco, *et al.* ; *Abnormal collagen V deposition in dermis correlates with skin thickening and disease activity in systemic sclerosis.*, **Autoimmun. Rev.** Vol.11 (Iss 11), 827–35, 2012.
- [71] M. Sun, S. Chen, S.M. Adams, J.B. Florer, H. Liu, *et al.* ; *Collagen V is a dominant regulator of collagen fibrillogenesis: dysfunctional regulation of structure and function in a corneal-stroma-specific Col5a1-null mouse model.*, **J. Cell Sci.** Vol.124 (Iss Pt 23), 4096–105, 2011.
- [72] D.E. Birk, P. Brückner ; *The Extracellular Matrix: an Overview*, **Springer Berlin Heidelberg**, 2011.
- [73] T. Kobayasi, T. Karlsmark ; *Type V and VI collagen for cohesion of dermal fibrillar structures.*, **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** Vol.38 (Iss 2–3), 103–8, 2006.
- [74] D.R. Baselt, J.P. Revel, J.D. Baldeschwieler ; *Subfibrillar structure of type I collagen observed by atomic force microscopy.*, **Biophys. J.** Vol.65 (Iss 6), 2644–2655, 1993.
- [75] N.C. Avery, A.J. Bailey ; *Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation to turnover of collagen: relevance to aging and exercise.*, **Scand. J. Med. Sci. Sports** Vol.15 (Iss 4), 231–40, 2005.
- [76] D. Fujimoto ; *Evidence for natural existence of pyridinoline crosslink in collagen.*, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol.93 (Iss 3), 948–53, 1980.
- [77] R.C. Siegel ; *Lysyl oxidase.*, **Int. Rev. Connect. Tissue Res.** Vol.8, 73–118, 1979.
- [78] L.I. Smith-Mungo, H.M. Kagan ; *Lysyl oxidase: Properties, regulation and multiple functions in biology*, **Matrix Biol.** Vol.16 (Iss 7), 387–398, 1998.
- [79] M.J. Barnes, B.J. Constable, L.F. Morton, P.M. Royce ; *Age-related variations in hydroxylation of lysine and proline in collagen.*, **Biochem. J.** Vol.139 (Iss 2), 461–8, 1974.
- [80] D.R. Eyre, J.J. Wu ; *Collagen cross-links*, **Top. Curr. Chem.** Vol.247, 207–229, 2005.
- [81] D.R. Eyre, M.A. Weis, J.J. Wu ; *Advances in collagen cross-link analysis*, **Methods** Vol.45 (Iss 1), 65–74, 2008.
- [82] A.J. Bailey, C.M. Peach ; *Isolation and structural identification of a labile intermolecular crosslink in collagen*, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol.33 (Iss 5), 812–819, 1968.
- [83] A.J. Bailey, M.S. Shimokomaki ; *Age related changes in the reducible cross-links of collagen.*, **FEBS Lett.** Vol.16 (Iss 2), 86–88, 1971.
- [84] S.P. Robins, A.J. Bailey ; *The chemistry of the collagen cross-links. The characterization of fraction C, a possible artifact produced during the reduction of collagen fibres with borohydride.*, **Biochem. J.** Vol.135 (Iss 4), 657–65, 1973.
- [85] M. Yamauchi, R.E. London, C. Guenat, F. Hashimoto, G.L. Mechanic ; *Structure and formation of a stable histidine-based trifunctional cross-link in skin collagen.*, **J. Biol. Chem.** Vol.262 (Iss 24), 11428–34, 1987.
- [86] M. Yamauchi, G.S. Chandler, H. Tanzawa, E.P. Katz ; *Cross-linking and the molecular packing of corneal collagen*, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol.219 (Iss 2), 311–315, 1996.
- [87] N.C. Avery, A.J. Bailey ; *Restraining Cross-Links Responsible for the Mechanical Properties of Collagen Fibers: Natural and Artificial*, 81–110, 2008.
- [88] J.M. Orban, L.B. Wilson, J.A. Kofroth, M.S. El-Kurdi, T.M. Maul, *et al.* ; *Crosslinking of collagen gels by transglutaminase.*, **J. Biomed. Mater. Res. A** Vol.68 (Iss 4), 756–62, 2004.
- [89] H.P. Bachinger, P. Bruckner, R. Timpl, D.J. Prockop, J. Engel ; *Folding Mechanism of the Triple Helix in Type-III Collagen and Type-III pN-Collagen. Role of Disulfide Bridges and Peptide Bond Isomerization*, **Eur. J. Biochem.** Vol.106 (Iss 2), 619–632, 1980.

## Références Bibliographiques

---

- [90] G. Bulaj ; *Formation of disulfide bonds in proteins and peptides*, **Biotechnol. Adv.** Vol.23 (Iss 1), 87–92, 2005.
- [91] Maillard LC ; *Action des acides aminés sur les sucres ; formation des mélanoidines par voie méthodique*, 66–68, 1912.
- [92] J. Uitto, L. Pulkkinen, M.-L. Chu ; *Collagen*, **McGraw-Hill Professional**, 2003.
- [93] C.T. McKee, J.A. Last, P. Russell, C.J. Murphy ; *Indentation versus tensile measurements of Young's modulus for soft biological tissues.*, **Tissue Eng. Part B. Rev.** Vol.17 (Iss 3), 155–64, 2011.
- [94] J.S. Graham, A.N. Vomund, C.L. Phillips, M. Grandbois ; *Structural changes in human type I collagen fibrils investigated by force spectroscopy*, **Exp. Cell Res.** Vol.299 (Iss 2), 335–342, 2004.
- [95] A. Gautieri, S. Vesentini, A. Redaelli, M.J. Buehler ; *Hierarchical structure and nanomechanics of collagen microfibrils from the atomistic scale up*, **Nano Lett.** Vol.11 (Iss 2), 757–766, 2011.
- [96] S. Nesbitt, W. Scott, J. Macione, S. Kotha ; *Collagen Fibrils in Skin Orient in the Direction of Applied Uniaxial Load in Proportion to Stress while Exhibiting Differential Strains around Hair Follicles*, **Materials (Basel)**. Vol.8, 1841–1857, 2015.
- [97] M.J. Buehler ; *Nature designs tough collagen: explaining the nanostructure of collagen fibrils.*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** Vol.103 (Iss 33), 12285–90, 2006.
- [98] F.H. Silver, I. Horvath, D.J. Foran ; *Mechanical implications of the domain structure of fiber-forming collagens: comparison of the molecular and fibrillar flexibilities of the alpha1-chains found in types I-III collagen.*, **J. Theor. Biol.** Vol.216 (Iss 2), 243–54, 2002.
- [99] F.H. Silver, G.P. Seehra, J.W. Freeman, D. DeVore ; *Viscoelastic properties of young and old human dermis: A proposed molecular mechanism for elastic energy storage in collagen and elastin*, **J. Appl. Polym. Sci.** Vol.86 (Iss 8), 1978–1985, 2002.
- [100] H. Sage, W.R. Gray ; *Studies on the evolution of elastin—I. Phylogenetic distribution*, **Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.** Vol.64 (Iss 4), 313–327, 1979.
- [101] I. Pasquali-Ronchetti, M. Baccarani-Contri ; *Elastic fiber during development and aging.*, **Microsc. Res. Tech.** Vol.38 (Iss 4), 428–35, 1997.
- [102] F. Ramirez ; *Pathophysiology of the microfibril/elastic fiber system: introduction.*, **Matrix Biol.** Vol.19 (Iss 6), 455–6, 2000.
- [103] B.A. Kozel, C.H. Ciliberto, R.P. Mecham ; *Deposition of tropoelastin into the extracellular matrix requires a competent elastic fiber scaffold but not live cells*, **Matrix Biol.** Vol.23 (Iss 1), 23–34, 2004.
- [104] C. Constantinidès-Mégret ; *Etude de la structure physique de l'élastine par spectroscopies thermostimulées*, Thèse de l'Université Paul Sabatier, 1988.
- [105] Z. Indik, H. Yeh, N. Ornstein-Goldstein, P. Sheppard, N. Anderson, *et al.* ; *Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA.*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** Vol.84 (Iss 16), 5680–4, 1987.
- [106] R.P. Mecham, J.E. Heuser ; *The Elastic Fiber*, **Springer US**, 79–109, 1991.
- [107] L. Debelle, A.J. Alix, M.P. Jacob, J.P. Huvenne, M. Berjot, *et al.* ; *Bovine elastin and kappa-elastin secondary structure determination by optical spectroscopies.*, **J. Biol. Chem.** Vol.270 (Iss 44), 26099–103, 1995.
- [108] A.M. Tamburro, V. Guantieri, D.D. Gordini ; *Synthesis and structural studies of a pentapeptide sequence of elastin. Poly (Val-Gly-Gly-Leu-Gly).*, **J. Biomol. Struct. Dyn.** Vol.10 (Iss 3), 441–54, 1992.
- [109] B. Bochicchio, A. Pepe, M. Crudele, N. Belloy, S. Baud, *et al.* ; *Tuning self-assembly in elastin-derived peptides*, **Soft Matter** Vol.11 (Iss 17), 3385–3395, 2015.

## Références Bibliographiques

---

- [110] L.D. Muiznieks, S.E. Reichheld, E.E. Sitarz, M. Miao, F.W. Keeley ; *Proline-poor hydrophobic domains modulate the assembly and material properties of polymeric elastin*, **Biopolymers** Vol.103 (Iss 10), 563–573, 2015.
- [111] H. Umeda, M. Takeuchi, K. Suyama ; *Two new elastin cross-links having pyridine skeleton. Implication of ammonia in elastin cross-linking in vivo.*, **J. Biol. Chem.** Vol.276 (Iss 16), 12579–87, 2001.
- [112] S.M. PARTRIDGE, D.F. ELSDEN, J. THOMAS ; *Constitution of the cross-linkages in elastin.*, **Nature** Vol.197, 1297–8, 1963.
- [113] E. Petersen, F. Wågberg, K.-A. Angquist ; *Serum concentrations of elastin-derived peptides in patients with specific manifestations of atherosclerotic disease.*, **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.** Vol.24 (Iss 5), 440–4, 2002.
- [114] E.F. Bernstein, Y.Q. Chen, K. Tamai, K.J. Shepley, K.S. Resnik, *et al.* ; *Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.103 (Iss 2), 182–6, 1994.
- [115] K.G. Lewis, L. Bercovitch, S.W. Dill, L. Robinson-Bostom ; *Acquired disorders of elastic tissue: part I. Increased elastic tissue and solar elastotic syndromes.*, **J. Am. Acad. Dermatol.** Vol.51 (Iss 1), 1-21–4, 2004.
- [116] B. Vrhovski, A.S. Weiss ; *Biochemistry of tropoelastin.*, **Eur. J. Biochem.** Vol.258 (Iss 1), 1–18, 1998.
- [117] A.M. Tamburro, B. Bochicchio, A. Pepe ; *Dissection of human tropoelastin: exon-by-exon chemical synthesis and related conformational studies.*, **Biochemistry** Vol.42 (Iss 45), 13347–62, 2003.
- [118] A.M. Tamburro, B. Bochicchio, A. Pepe ; *The dissection of human tropoelastin: from the molecular structure to the self-assembly to the elasticity mechanism.*, **Pathol. Biol. (Paris)**. Vol.53 (Iss 7), 383–9, 2005.
- [119] A. Ostuni, B. Bochicchio, M.F. Armentano, F. Bisaccia, A.M. Tamburro, *et al.* ; *Molecular and supramolecular structural studies on human tropoelastin sequences.*, **Biophys. J.** Vol.93 (Iss 10), 3640–51, 2007.
- [120] V. Villani, L. D'Alessio, A. Tamburro ; *Contribution of Gly-X-Gly sequences to elastin's elasticity. Development of the transition to chaos mechanism of elasticity*, **Armento Press**, 31–37, 1997.
- [121] T.N. Wight, D. Heinegård, V.C. Hascall ; *proteoglycans:structure and function*, **Springer US**, 45–78, 1991.
- [122] R.R. Vivès ; *Héparanes sulfate : Structure, fonctions, régulation*, 2011.
- [123] D.A. Carrino, A. Calabro, A.B. Darr, M.T. Dours-Zimmermann, J.D. Sandy, *et al.* ; *Age-related differences in human skin proteoglycans.*, **Glycobiology** Vol.21 (Iss 2), 257–68, 2011.
- [124] D. a Carrino, P. Onnerfjord, J.D. Sandy, G. Cs-Szabo, P.G. Scott, *et al.* ; *Age-related changes in the proteoglycans of human skin. Specific cleavage of decorin to yield a major catabolic fragment in adult skin.*, **J. Biol. Chem.** Vol.278 (Iss 19), 17566–17572, 2003.
- [125] D.A. Carrino, J.M. Sorrell, A.I. Caplan ; *Age-related changes in the proteoglycans of human skin.*, **Arch. Biochem. Biophys.** Vol.373 (Iss 1), 91–101, 2000.
- [126] J. Xu, D. Mosher ; *Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins*, **Springer Berlin Heidelberg**, 41–75, 2010.
- [127] J. Uitto, E.F. Bernstein ; *Molecular Mechanisms of Cutaneous Aging: Connective Tissue Alterations in the Dermis*, **J. Investig. Dermatology Symp. Proc.** Vol.3 (Iss 1), 41–44, 1998.
- [128] G. Jenkins ; *Molecular mechanisms of skin ageing.*, **Mech. Ageing Dev.** Vol.123 (Iss 7), 801–10, 2002.
- [129] E.C. Naylor, R.E.B. Watson, M.J. Sherratt ; *Molecular aspects of skin ageing*, **Maturitas** Vol.69 (Iss 3), 249–256, 2011.
- [130] J. Krutmann ; *Skin Aging*, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 15–24, 2011.
- [131] M.J. Koehler, K. König, P. Elsner, R. Bückle, M. Kaatz ; *In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography.*, **Opt. Lett.** Vol.31 (Iss 19), 2879–2881, 2006.
- [132] J.M. Waller, H.I. Maibach ; *Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): Blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity*, **Ski. Res. Technol.** Vol.11 (Iss 4), 221–235, 2005.

## Références Bibliographiques

---

- [133] J.M. Waller, H.I. Maibach ; *Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure.*, **Skin Res. Technol.** Vol.12 (Iss 3), 145–54, 2006.
- [134] A. Madan, A. Arun, S. Verma ; *An Open Label , Non Comparative , Non-randomized , Pilot study to see the efficacy and safety of anti wrinkle cream in the treatment of facial skin wrinkles Introduction :*, Vol.2 (Iss 4), 350–355, 2014.
- [135] E.F. Bernstein, J. Uitto ; *The effect of photodamage on dermal extracellular matrix.*, **Clin. Dermatol.** Vol.14 (Iss 2), 143–51, 1996.
- [136] J.L. Bologna ; *Dermatologic and cosmetic concerns of the older woman.*, **Clin. Geriatr. Med.** Vol.9 (Iss 1), 209–29, 1993.
- [137] M. El-Domyati, S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D.E. Birk, *et al.* ; *Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin.*, **Exp. Dermatol.** Vol.11 (Iss 5), 398–405, 2002.
- [138] C. Frances, L. Robert ; *Elastin and Elastic Fibers in Normal and Pathologic Skin*, **Int. J. Dermatol.** Vol.23 (Iss 3), 166–179, 1984.
- [139] C. Robert, C. Lesty, A.M. Robert ; *Ageing of the skin: study of elastic fiber network modifications by computerized image analysis.*, **Gerontology** Vol.34 (Iss 5–6), 291–6, 1988.
- [140] I. Ghersetich, T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, G. Dini ; *Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging.*, **Int. J. Dermatol.** Vol.33 (Iss 2), 119–22, 1994.
- [141] J. Ortonne, T. Passeron ; *Le vieillissement cutané et sa prévention*, **Press. med** Vol.32, 2003.
- [142] L. Vitellaro-Zuccarello, R. Garbelli, V.D. Rossi ; *Immunocytochemical localization of collagen types I, III, IV, and fibronectin in the human dermis. Modifications with ageing.*, **Cell Tissue Res.** Vol.268 (Iss 3), 505–11, 1992.
- [143] C.R. Lovell, K.A. Smolenski, V.C. Duance, N.D. Light, S. Young, *et al.* ; *Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing.*, **Br. J. Dermatol.** Vol.117 (Iss 4), 419–28, 1987.
- [144] J. Varani, R.L. Warner, M. Gharaee-Kermani, S.H. Phan, S. Kang, *et al.* ; *Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen- degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.114 (Iss 3), 480–486, 2000.
- [145] G. Kaya, J.-H. Saurat ; *Dermatoporosis: a chronic cutaneous insufficiency/fragility syndrome. Clinicopathological features, mechanisms, prevention and potential treatments.*, **Dermatology** Vol.215 (Iss 4), 284–94, 2007.
- [146] D. Harman ; *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.*, **J. Gerontol.** Vol.11 (Iss 3), 298–300, 1956.
- [147] D. Harman ; *The biologic clock: the mitochondria?*, **J. Am. Geriatr. Soc.** Vol.20 (Iss 4), 145–7, 1972.
- [148] D. Harman ; *Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009.*, **Biogerontology** Vol.10 (Iss 6), 773–81, 2009.
- [149] R.J. Waddington, R. Moseley, G. Embery ; *Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases.*, **Oral Dis.** Vol.6 (Iss 3), 138–51, 2000.
- [150] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, C.E. Cross ; *Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?*, **J. Lab. Clin. Med.** Vol.119 (Iss 6), 598–620, 1992.
- [151] A. Vierkötter, J. Krutmann ; *Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations.*, **Dermatoendocrinol.** Vol.4 (Iss 3), 227–31, 2012.
- [152] M. Yaar, B.A. Gilchrist ; *Photoageing: Mechanism, prevention and therapy*, **Br. J. Dermatol.** Vol.157 (Iss 5), 874–887, 2007.

## Références Bibliographiques

---

- [153] G.J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, *et al.* ; *Mechanisms of photoaging and chronological skin aging.*, **Arch. Dermatol.** Vol.138 (Iss 11), 1462–70, 2002.
- [154] G.E. Rhie, H.S. Mi, Y.S. Jin, W.C. Won, H.C. Kwang, *et al.* ; *Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.117 (Iss 5), 1212–1217, 2001.
- [155] W. Ma, M. Wlaschek, I. Tantcheva-Poór, L.A. Schneider, L. Naderi, *et al.* ; *Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue*, **Clin. Exp. Dermatol.** Vol.26 (Iss 7), 592–599, 2001.
- [156] K.B. Beckman, B.N. Ames ; *The free radical theory of aging matures.*, **Physiol. Rev.** Vol.78 (Iss 2), 547–81, 1998.
- [157] D. Harman ; *Aging: overview.*, **Ann. N. Y. Acad. Sci.** Vol.928, 1–21, 2001.
- [158] M. Karin, Z. g Liu, E. Zandi ; *AP-1 function and regulation.*, **Curr. Opin. Cell Biol.** Vol.9 (Iss 2), 240–6, 1997.
- [159] M.-P. Wautier, F.J. Tessier, J.-L. Wautier ; *[Advanced glycation end products: A risk factor for human health].*, **Ann. Pharm. Fr.** Vol.72 (Iss 6), 400–8, 2014.
- [160] N.C. Avery, A.J. Bailey ; *The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen.*, **Pathol. Biol. (Paris).** Vol.54 (Iss 7), 387–95, 2006.
- [161] S.R. Jackson, N.C. Avery, J.F. Tarlton, S.D. Eckford, P. Abrams, *et al.* ; *Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse*, **Lancet** Vol.347 (Iss 9016), 1658–1661, 1996.
- [162] K.M. Reiser, M. Amigable, J. a Last ; *Nonenzymatic Glycation of Type I Collagen*, **J. Biol. Chem.** Vol.4 (Iss 10), 24207–24216, 1992.
- [163] S. Vasani, P. Foiles, H. Founds ; *Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks*, **Arch. Biochem. Biophys.** Vol.419 (Iss 1), 89–96, 2003.
- [164] D.R. Sell, K.M. Biemel, O. Reihl, M.O. Lederer, C.M. Strauch, *et al.* ; *Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix. Relationship with diabetes.*, **J. Biol. Chem.** Vol.280 (Iss 13), 12310–5, 2005.
- [165] J.S. Sjöberg, S. Bulterijs ; *Characteristics, formation, and pathophysiology of glucosepane: a major protein cross-link.*, **Rejuvenation Res.** Vol.12 (Iss 2), 137–48, 2009.
- [166] D. Tuckwell, M. Humphries ; *Integrin–collagen binding*, **Semin. Cell Dev. Biol.** Vol.7 (Iss 5), 649–657, 1996.
- [167] A.R. Hipkiss ; *Glycation, ageing and carnosine: are carnivorous diets beneficial?*, **Mech. Ageing Dev.** Vol.126 (Iss 10), 1034–9, 2005.
- [168] L. Hayflick ; *THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS.*, **Exp. Cell Res.** Vol.37, 614–36, 1965.
- [169] A.M. Olovnikov ; *A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon.*, **J. Theor. Biol.** Vol.41 (Iss 1), 181–90, 1973.
- [170] E. Kohl, J. Steinbauer, M. Landthaler, R.M. Szeimies ; *Skin ageing*, **J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.** Vol.25 (Iss 8), 873–884, 2011.
- [171] P. Boukamp ; *Ageing mechanisms: the role of telomere loss.*, **Clin. Exp. Dermatol.** Vol.26 (Iss 7), 562–5, 2001.
- [172] D.B. Lombard, K.F. Chua, R. Mostoslavsky, S. Franco, M. Gostissa, *et al.* ; *DNA repair, genome stability, and aging.*, **Cell** Vol.120 (Iss 4), 497–512, 2005.
- [173] K.-I. Nakamura, N. Izumiyama-Shimomura, M. Sawabe, T. Arai, Y. Aoyagi, *et al.* ; *Comparative analysis of telomere lengths and erosion with age in human epidermis and lingual epithelium.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.119 (Iss 5), 1014–9, 2002.

## Références Bibliographiques

---

- [174] E. Wang ; *Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved.*, **Cancer Res.** Vol.55 (Iss 11), 2284–92, 1995.
- [175] G.E. Piérard ; *The quandary of climacteric skin ageing.*, **Dermatology** Vol.193 (Iss 4), 273–4, 1996.
- [176] C.S. Youn, O.S. Kwon, C.H. Won, E.J. Hwang, B.J. Park, *et al.* ; *Effect of Pregnancy and Menopause on Facial Wrinkling in Women*, **Acta Derm. Venereol.** Vol.83 (Iss 6), 419–424, 2003.
- [177] L.B. Dunn, M. Damesyn, A.A. Moore, D.B. Reuben, G.A. Greendale ; *Does estrogen prevent skin aging? Results from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I)*, **Arch. Dermatol.** Vol.133 (Iss 3), 339–42, 1997.
- [178] S. Shuster ; *Smoking and wrinkling of the skin.*, **Lancet (London, England)** Vol.358 (Iss 9278), 330, 2001.
- [179] A. Gragnani, S. Mac Cornick, V. Chominski, S.M. Ribeiro de Noronha, S.A. Alves Corrêa de Noronha, *et al.* ; *Review of Major Theories of Skin Aging*, **Adv. Aging Res.** Vol.3 (Iss 4), 265–284, 2014.
- [180] M. Ramos-e-Silva, L.R. Celem, S. Ramos-e-Silva, A.P. Fucci-da-Costa ; *Anti-aging cosmetics: Facts and controversies*, **Clin. Dermatol.** Vol.31 (Iss 6), 750–758, 2013.
- [181] Mina Yaar, B.A. Gilchrest ; *STUDIES OF PHOTOAGING*, **Ski. Pharmacol. Toxicol.** Vol.181, 205–209, 1990.
- [182] J. Uitto ; *Understanding premature skin aging.*, **N. Engl. J. Med.** Vol.337 (Iss 20), 1463–5, 1997.
- [183] P.E. Hockberger ; *A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms.*, **Photochem. Photobiol.** Vol.76 (Iss 6), 561–579, 2002.
- [184] I.S. Masnec, S. Poduje ; *Photoaging*, **Coll. Antropol.** Vol.32 (Iss Suppl, 2), 177–180, 2008.
- [185] J. Krutmann, B.A. Gilchrest ; *Photoaging of skin*, **Ski. Aging** 33–43, 2006.
- [186] L.H. Kligman, A.M. Kligman ; *The nature of photoaging: its prevention and repair.*, **Photodermatol.** Vol.3 (Iss 4), 215–27, 1986.
- [187] M. Wlaschek, I. Tantcheva-Poór, L. Naderi, W. Ma, L.A. Schneider, *et al.* ; *Solar UV irradiation and dermal photoaging*, **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** Vol.63 (Iss 1–3), 41–51, 2001.
- [188] R. Warren, V. Gartstein, A.M. Kligman, W. Montagna, R.A. Allendorf, *et al.* ; *Age, sunlight, and facial skin: a histologic and quantitative study.*, **J. Am. Acad. Dermatol.** Vol.25 (Iss 5 Pt 1), 751–60, 1991.
- [189] N.M. CRAVEN, R.E.B. WATSON, C.J.P. JONES, C.A. SHUTTLEWORTH, C.M. KIELTY, *et al.* ; *Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII*, **Br. J. Dermatol.** Vol.137 (Iss 3), 344–350, 1997.
- [190] J. Varani, M.K. Dame, L. Rittie, S.E.G. Fligiel, S. Kang, *et al.* ; *Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation.*, **Am. J. Pathol.** Vol.168 (Iss 6), 1861–8, 2006.
- [191] J. Varani, L. Schuger, M.K. Dame, C. Leonard, S.E.G. Fligiel, *et al.* ; *Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.122 (Iss 6), 1471–9, 2004.
- [192] E. Schwartz, F.A. Cruickshank, C.C. Christensen, J.S. Perlish, M. Lebowitz ; *COLLAGEN ALTERATIONS IN CHRONICALLY SUN-DAMAGED HUMAN SKIN*, **Photochem. Photobiol.** Vol.58 (Iss 6), 841–844, 1993.
- [193] G.J. Fisher, Z.Q. Wang, S.C. Datta, J. Varani, S. Kang, *et al.* ; *Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light.*, **N. Engl. J. Med.** Vol.337 (Iss 20), 1419–1428, 1997.
- [194] J.H. Rabe, A.J. Mamelak, P.J.S. McElgunn, W.L. Morison, D.N. Sauder ; *Photoaging: Mechanisms and repair*, **J. Am. Acad. Dermatol.** Vol.55 (Iss 1), 1–19, 2006.

## Références Bibliographiques

---

- [195] M.G. Kosmadaki, B.A. Gilchrist ; *The role of telomeres in skin aging/photoaging.*, **Micron** Vol.35 (Iss 3), 155–9, 2004.
- [196] B. Yin, X. Jiang ; *Telomere shortening in cultured human dermal fibroblasts is associated with acute photodamage induced by UVA irradiation.*, **Postępy dermatologii i Alergol.** Vol.30 (Iss 1), 13–8, 2013.
- [197] K.A. Codriansky, M.J. Quintanilla-Dieck, S. Gan, M. Keady, J. Bhawan, *et al.* ; *Intracellular degradation of elastin by cathepsin k in skin fibroblasts - A possible role in photoaging*, **Photochem. Photobiol.** Vol.85 (Iss 6), 1356–1363, 2009.
- [198] S.H. Ibbotson, M.N. Moran, J.F. Nash, I.E. Kochevar ; *The effects of radicals compared with UVB as initiating species for the induction of chronic cutaneous photodamage*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.112 (Iss 6), 933–938, 1999.
- [199] J. Bhawan, W. Andersen, J. Lee, R. Labadie, G. Solares ; *Photoaging versus intrinsic aging: a morphologic assessment of facial skin.*, **J. Cutan. Pathol.** Vol.22 (Iss 2), 154–159, 1995.
- [200] J. Labat-Robert, A. Fourtanier, B. Boyer-Lafargue, L. Robert ; *Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin. Effect of UV-irradiation.*, **J. Photochem. Photobiol. B.** Vol.57 (Iss 2–3), 113–8, 2000.
- [201] R. Lavker, K. Kaidbey ; *The spectral dependence for UVA-induced cumulative damage in human skin*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.108 (Iss 1), 17–21, 1997.
- [202] Y. Kawaguchi, H. Tanaka, T. Okada, H. Konishi, M. Takahashi, *et al.* ; *Effect of reactive oxygen species on the elastin mRNA expression in cultured human dermal fibroblasts.*, **Free Radic. Biol. Med.** Vol.23 (Iss 1), 162–5, 1997.
- [203] R.M. Lavker, D.A. Veres, C.J. Irwin, K.H. Kaidbey ; *Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to suberythemogenic doses of UVA in human skin*, **Photochem. Photobiol.** Vol.62, 348–352, 1995.
- [204] L.H. Kligman, F.J. Akin, A.M. Kligman ; *Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.78 (Iss 2), 181–9, 1982.
- [205] A. Fourtanier, J. Labat-Robert, P. Kern, C. Berrebi, A.M. Gracia, *et al.* ; *In vivo evaluation of photoprotection against chronic ultraviolet-A irradiation by a new sunscreen Mexoryl SX.*, **Photochem. Photobiol.** Vol.55 (Iss 4), 549–60, 1992.
- [206] E.F. Bernstein, C.B. Underhill, P.J. Hahn, D.B. Brown, J. Uitto ; *Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans.*, **Br. J. Dermatol.** Vol.135 (Iss 2), 255–62, 1996.
- [207] M.D. Willen, J.M. Sorrell, C.C. Lekan, B.R. Davis, A.I. Caplan ; *Patterns of glycosaminoglycan/proteoglycan immunostaining in human skin during aging.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.96 (Iss 6), 968–74, 1991.
- [208] R.G. LeBaron, D.R. Zimmermann, E. Ruoslahti ; *Hyaluronate binding properties of versican.*, **J. Biol. Chem.** Vol.267 (Iss 14), 10003–10, 1992.
- [209] D.R. Zimmermann, M.T. Dours-Zimmermann, M. Schubert, L. Bruckner-Tuderman ; *Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis.*, **J. Cell Biol.** Vol.124 (Iss 5), 817–25, 1994.
- [210] G.J. Fisher ; *The pathophysiology of photoaging of the skin.*, **Cutis** Vol.75 (Iss 2 Suppl), 5-8-9, 2005.
- [211] I.M. Braverman, E. Fonferko ; *Studies in Cutaneous Aging: I. The Elastic Fiber Network*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.78 (Iss 5), 434–443, 1982.
- [212] J. Labat-Robert, L. Robert ; *Introduction: matrix biology in the 21st century. From a static-rheological role to a dynamic-signaling function.*, **Pathol. Biol. (Paris)**. Vol.53 (Iss 7), 369–71, 2005.
- [213] M. Spina, F. Ortolani, A. El Messlemani, A. Gandaglia, J. Bujan, *et al.* ; *Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprostheses: Extracellular matrix structure, prevention from calcification, and cell repopulation features*, **J. Biomed. Mater. Res.** Vol.67A (Iss 4), 1338–1350, 2003.
- [214] M.-H. Lacoste-Ferré, P. Demont, J. Dandurand, E. Dantras, M. Blandin, *et al.* ; *Thermo-mechanical analysis of dental silicone polymers*, **J. Mater. Sci.** Vol.41 (Iss 22), 7611–7616, 2006.

## Références Bibliographiques

---

- [215] M.-H. Lacoste-Ferré ; *Corrélations structure-propriétés mécaniques : applications aux bases souples polymères utilisées en prothèse amovible complète*, Thèse de l'Université Paul Sabatier, 2004.
- [216] S. Gahagnon ; *Etude in vivo du comportement mécanique du derme par une méthode élastographique haute résolution : applications à l'exploration d'anomalies du tissu élastique (syndrome de Marfan).*, <http://www.theses.fr> 2009.
- [217] S. Diridollou, M. Berson, V. Vabre, D. Black, B. Karlsson, *et al.* ; *An In Vivo Method for Measuring the Mechanical Properties of the Skin Using Ultrasound*, **Ultrasound Med. Biol.** Vol.24 (Iss 2), 215–224, 1998.
- [218] A. Kalra, A. Lowe, A. Am ; *Mechanical Behaviour of Skin : A Review*, **J. Mater. Sci. Eng.** Vol.5 (Iss 4), 2016.
- [219] A. Tosti, G. Compagno, M.L. Fazzini, S. Villardita ; *A ballistometer for the study of the plasto-elastic properties of skin.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.69 (Iss 3), 315–7, 1977.
- [220] K. Moronkeji, R. Akhtar ; *Mechanical Properties of Aging Human Skin*, **Springer International Publishing**, 237–263, 2015.
- [221] S. Diridollou, V. Vabre, M. Berson, L. Vaillant, D. Black, *et al.* ; *Skin ageing: changes of physical properties of human skin in vivo*, **Int. J. Cosmet. Sci.** Vol.23 (Iss 6), 353–362, 2001.
- [222] R. Grahame, P.J.L. Holt ; *The Influence of Ageing on the in vivo Elasticity of Human Skin*, **Gerontology** Vol.15 (Iss 2–3), 121–139, 1969.
- [223] R. Sanders ; *Torsional elasticity of human skin in vivo*, **Arch. Eur. J. Physiol.** Vol.342 (Iss 3), 255–260, 1973.
- [224] P.G. Agache, C. Monneur, J.L. Leveque, J. De Rigal ; *Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo*, **Arch. Dermatol. Res.** Vol.269 (Iss 3), 221–232, 1980.
- [225] C. Escoffier, J. de Rigal, A. Rochefort, R. Vasselet, J.L. Lévêque, *et al.* ; *Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.93 (Iss 3), 353–7, 1989.
- [226] A.O. Barel, R. Lambrecht, P. Clarys ; *Mechanical function of the skin: state of the art.*, **Curr. Probl. Dermatol.** Vol.26, 69–83, 1998.
- [227] G. Boyer, L. Laquière, A. Le Bot, S. Laquière, H. Zahouani ; *Dynamic indentation on human skin in vivo: ageing effects.*, **Skin Res. Technol.** Vol.15 (Iss 1), 55–67, 2009.
- [228] G. Boyer, C. Pailler Mattei, J. Molimard, M. Pericoi, S. Laquiere, *et al.* ; *Non contact method for in vivo assessment of skin mechanical properties for assessing effect of ageing.*, **Med. Eng. Phys.** Vol.34 (Iss 2), 172–8, 2012.
- [229] M.L. Crichton, B.C. Donose, X. Chen, A.P. Raphael, H. Huang, *et al.* ; *The viscoelastic, hyperelastic and scale dependent behaviour of freshly excised individual skin layers*, **Biomaterials** Vol.32 (Iss 20), 4670–4681, 2011.
- [230] S. Luebberding, N. Krueger, M. Kerscher ; *Mechanical properties of human skin in vivo : a comparative evaluation in 300 men and women*, **Ski. Res. Technol.** Vol.20 (Iss 2), 127–135, 2014.
- [231] A. Oba, C. Edwards ; *Relationships between changes in mechanical properties of the skin, wrinkling, and destruction of dermal collagen fiber bundles caused by photoaging*, **Ski. Res. Technol.** Vol.12 (Iss 4), 283–288, 2006.
- [232] H. Zahouani, G. Boyer, C. Pailler-Mattei, M. Ben Tkaya, R. Vargiolu ; *Effect of human ageing on skin rheology and tribology*, Vol.271 (Iss 9), 2011.
- [233] C. Pailler-Mattei, S. Bec, H. Zahouani ; *In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests.*, **Med. Eng. Phys.** Vol.30 (Iss 5), 599–606, 2008.
- [234] J.M. Schmitt ; *OCT elastography: imaging microscopic deformation and strain of tissue*, **Opt. Express** Vol.3 (Iss 6), 199, 1998.

## Références Bibliographiques

---

- [235] X. Liang, V. Crecea, S.A. Boppart ; *DYNAMIC OPTICAL COHERENCE ELASTOGRAPHY: A REVIEW.*, **J. Innov. Opt. Health Sci.** Vol.3 (Iss 4), 221–233, 2010.
- [236] C.H. Daly, G.F. Odland ; *Age-related changes in the mechanical properties of human skin.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.73 (Iss 1), 84–7, 1979.
- [237] F.H. Silver, J.W. Freeman, D. DeVore ; *Viscoelastic properties of human skin and processed dermis.*, **Skin Res. Technol.** Vol.7 (Iss 1), 18–23, 2001.
- [238] J.M. Gosline, C.J. French ; *Dynamic mechanical properties of elastin*, **Biopolymers** Vol.18 (Iss 8), 2091–2103, 1979.
- [239] A.L. Andradý, J.E. Mark ; *Dynamic mechanical relaxations in swollen elastin networks*, **Polym. Bull.** Vol.27 (Iss 2), 227–234, 1991.
- [240] M.A. Lillie, J.M. Gosline ; *The effects of hydration on the dynamic mechanical properties of elastin.*, **Biopolymers** Vol.29 (Iss 8–9), 1147–60, 1990.
- [241] H. Stefanou, A.E. Woodward, D. Morrow ; *Relaxation behavior of collagen.*, **Biophys. J.** Vol.13 (Iss 8), 772–9, 1973.
- [242] N.S. Cohen, M. Odlyha, G.M. Foster ; *Measurement of shrinkage behaviour in leather and parchment by dynamic mechanical thermal analysis*, **Thermochim. Acta** Vol.365 (Iss 1), 111–117, 2000.
- [243] B.J. Rigby ; *Relation between the shrinkage of native collagen in acid solution and the melting temperature of the tropocollagen molecule.*, **Biochim. Biophys. Acta** Vol.133 (Iss 2), 272–7, 1967.
- [244] M.E. Nimni ; *The molecular organization of collagen and its role in determining the biophysical properties of the connective tissues.*, **Biorheology** Vol.17 (Iss 1–2), 51–82, 1980.
- [245] M. Ventre, F. Mollica, P.A. Netti ; *The effect of composition and microstructure on the viscoelastic properties of dermis.*, **J. Biomech.** Vol.42 (Iss 4), 430–5, 2009.
- [246] B. Holt, A. Tripathi, J. Morgan ; *Viscoelastic response of human skin to low magnitude physiologically relevant shear.*, **J. Biomech.** Vol.41 (Iss 12), 2689–95, 2008.
- [247] M.A.F. Kendall, Y.-F. Chong, A. Cock ; *The mechanical properties of the skin epidermis in relation to targeted gene and drug delivery*, **Biomaterials** Vol.28 (Iss 33), 4968–4977, 2007.
- [248] C.A. Grant, P.C. Twigg, D.J. Tobin ; *Static and dynamic nanomechanical properties of human skin tissue using atomic force microscopy: Effect of scarring in the upper dermis*, **Acta Biomater.** Vol.8 (Iss 11), 4123–4129, 2012.
- [249] C. Schulze, F. Wetzel, T. Kueper, A. Malsen, G. Muhr, *et al.* ; *Stiffening of human skin fibroblasts with age*, **Clin. Plast. Surg.** Vol.39 (Iss 1), 9–20, 2012.
- [250] P. Gill, T.T. Moghadam, B. Ranjbar ; *Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience.*, **J. Biomol. Tech.** Vol.21 (Iss 4), 167–93, 2010.
- [251] N. Aktas, Y. Tülek, H.Y. Gökalp ; *Determination of freezable water content of beef semimembranous muscle DSC study*, **J. Therm. Anal.** Vol.48 (Iss 2), 259–266, 1997.
- [252] A. Panagopoulou, A. Kyritsis, A.-M. Aravantinou, D. Nanopoulos, R.S. i Serra, *et al.* ; *Glass Transition and Dynamics in Lysozyme–Water Mixtures Over Wide Ranges of Composition*, **Food Biophys.** Vol.6 (Iss 2), 199–209, 2011.
- [253] V. Samouillan, D. Tintar, C. Lacabanne ; *Hydrated elastin: Dynamics of water and protein followed by dielectric spectroscopies*, **Chem. Phys.** Vol.385 (Iss 1–3), 19–26, 2011.
- [254] G. Kerch, J. Zicans, R. Merijs Meri, A. Stunda-Ramava, E. Jakobsons ; *The use of thermal analysis in assessing the effect of bound water content and substrate rigidity on prevention of platelet adhesion*, **J. Therm. Anal. Calorim.** Vol.120 (Iss 1), 533–539, 2015.

## Références Bibliographiques

---

- [255] K.R. Heys, M.G. Friedrich, R.J.W. Truscott ; *Free and bound water in normal and cataractous human lenses.*, **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** Vol.49 (Iss 5), 1991–7, 2008.
- [256] Y.H. Roos, N. Potes ; *Quantification of Protein Hydration, Glass Transitions, and Structural Relaxations of Aqueous Protein and Carbohydrate-Protein Systems.*, **J. Phys. Chem. B** Vol.119 (Iss 23), 7077–86, 2015.
- [257] V. Samouillan, J. Dandurand-Lods, a Lamure, E. Maurel, C. Lacabanne, *et al.* ; *Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprotheses.*, **J. Biomed. Mater. Res.** Vol.46 (Iss 4), 531–8, 1999.
- [258] V. Samouillan, F. Delaunay, J. Dandurand, N. Merbahi, J.-P. Gardou, *et al.* ; *The Use of Thermal Techniques for the Characterization and Selection of Natural Biomaterials*, **J. Funct. Biomater.** Vol.2 (Iss 4), 230–248, 2011.
- [259] L. Debelle, A.M. Tamburro ; *Elastin: molecular description and function.*, **Int. J. Biochem. Cell Biol.** Vol.31 (Iss 2), 261–72, 1999.
- [260] B. Li, D.O. Alonso, B.J. Bennion, V. Daggett ; *Hydrophobic hydration is an important source of elasticity in elastin-based biopolymers.*, **J. Am. Chem. Soc.** Vol.123 (Iss 48), 11991–8, 2001.
- [261] C.A. Miles, T. V Burjanadze, A.J. Bailey ; *The kinetics of the thermal denaturation of collagen in unrestrained rat tail tendon determined by differential scanning calorimetry.*, **J. Mol. Biol.** Vol.245 (Iss 4), 437–46, 1995.
- [262] C.A. Miles, M. Ghelashvili ; *Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers.*, **Biophys. J.** Vol.76 (Iss 6), 3243–52, 1999.
- [263] J. Lee, C. Pereira, D. Abdulla, W. Naimark, I. Crawford ; *A multi-sample for collagenous denaturation biomaterials temperature tester*, **Mol. Eng. phys.** Vol.17, 115–121, 1995.
- [264] P. Budrugaec ; *Phase transitions of a parchment manufactured from deer leather*, **J. Therm. Anal. Calorim.** Vol.120 (Iss 1), 103–112, 2015.
- [265] L.G. Nöt, I. Naumov, L. Vámhidy, D. Lőrinczy, N. Wiegand ; *Comparison of thermal characteristics of degenerated and inflamed human collagen structures with differential scanning calorimetry*, **J. Therm. Anal. Calorim.** Vol.113 (Iss 1), 273–279, 2012.
- [266] K. Torres, H. Trębacz, M. Bączik-Donica, A. Atras, A. Torres, *et al.* ; *Does thermodynamic stability of peritoneal collagen change during laparoscopic cholecystectomies? A differential scanning calorimetry (DSC) study.*, **Surg. Endosc.** Vol.28 (Iss 9), 2623–6, 2014.
- [267] B. Burton, A. Gaspar, D. Josey, J. Tupy, M.D. Grynepas, *et al.* ; *Bone embrittlement and collagen modifications due to high-dose gamma-irradiation sterilization.*, **Bone** Vol.61, 71–81, 2014.
- [268] F. Flandin, C. Buffevant, D. Herbage ; *A differential scanning calorimetry analysis of the age-related changes in the thermal stability of rat skin collagen*, **Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.** Vol.791 (Iss 2), 205–211, 1984.
- [269] M. Melling, W. Pfeiler, D. Karimian-Teherani, M. Schnallinger, G. Sobal, *et al.* ; *Differential scanning calorimetry, biochemical, and biomechanical analysis of human skin from individuals with diabetes mellitus.*, **Anat. Rec.** Vol.259 (Iss 3), 327–33, 2000.
- [270] C. Bircan, S.A. Barringer ; *Determination of Protein Denaturation of Muscle Foods Using the Dielectric Properties*, **J. Food Sci.** Vol.67 (Iss 1), 202–205, 2002.
- [271] E. Staniszewska, K. Malek, M. Baranska ; *Rapid approach to analyze biochemical variation in rat organs by ATR FTIR spectroscopy*, **Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.** Vol.118, 981–986, 2014.

## Références Bibliographiques

---

- [272] M. Le Lous, F. Flandin, D. Herbage, J.-C. Allain ; *Influence of collagen denaturation on the chemorheological properties of skin, assessed by differential scanning calorimetry and hydrothermal isometric tension measurement*, **Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.** Vol.717 (Iss 2), 295–300, 1982.
- [273] C.A. Miles, N.C. Avery ; *Thermal stabilization of collagen in skin and decalcified bone.*, **Phys. Biol.** Vol.8 (Iss 2), 26002, 2011.
- [274] W.Q. Sun, P. Leung ; *Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation.*, **Acta Biomater.** Vol.4 (Iss 4), 817–26, 2008.
- [275] N. Wiegand, I. Naumov, L.G. Nót, L. Várhidy, D. Lőrinczy ; *Differential scanning calorimetric examination of pathologic scar tissues of human skin*, **J. Therm. Anal. Calorim.** Vol.111 (Iss 3), 1897–1902, 2012.
- [276] R. Pethig ; *Protein-Water Interactions Determined by Dielectric Methods*, **Annu. Rev. Phys. Chem.** Vol.43 (Iss 1), 177–205, 1992.
- [277] N. Nandi, K. Bhattacharyya, B. Bagchi ; *Dielectric relaxation and solvation dynamics of water in complex chemical and biological systems.*, **Chem. Rev.** Vol.100 (Iss 6), 2013–46, 2000.
- [278] G. Careri ; *2D Ising model for hydrated protein surfaces*, **Nuovo Cim. D** Vol.20 (Iss 7–8), 1135–1140, 1998.
- [279] F. DESPA ; *Biological Water: Its Vital Role in Macromolecular Structure and Function*, **Ann. N. Y. Acad. Sci.** Vol.1066 (Iss 1), 1–11, 2005.
- [280] W.J. Ellison, K. Lamkaouchi, J.-M. Moreau ; *Water: a dielectric reference*, **J. Mol. Liq.** Vol.68 (Iss 2), 171–279, 1996.
- [281] U. Kaatzte ; *Complex permittivity of water as a function of frequency and temperature*, **J. Chem. Eng. Data** Vol.34 (Iss 4), 371–374, 1989.
- [282] S. Mashimo, N. Miura ; *High order and local structure of water determined by microwave dielectric study*, **J. Chem. Phys.** Vol.99 (Iss 12), 9874, 1993.
- [283] S. Mashimo, S. Kuwabara, S. Yagihara, K. Higasi ; *Dielectric relaxation time and structure of bound water in biological materials*, **J. Phys. Chem.** Vol.91 (Iss 25), 6337–6338, 1987.
- [284] N. Miura, N. Asaka, N. Shinyashiki, S. Mashimo ; *Microwave dielectric study on bound water of globule proteins in aqueous solution*, **Biopolymers** Vol.34 (Iss 3), 357–364, 1994.
- [285] Y. Hayashi, N. Miura, N. Shinyashiki, S. Yagihara, S. Mashimo ; *Globule-coil transition of denatured globular protein investigated by a microwave dielectric technique*, **Biopolymers** Vol.54 (Iss 6), 388–397, 2000.
- [286] Y. Feldman, A. Puzenko, P. Ben Ishai, A. Caduff, I. Davidovich, *et al.* ; *The electromagnetic response of human skin in the millimetre and submillimetre wave range.*, **Phys. Med. Biol.** Vol.54 (Iss 11), 3341–63, 2009.
- [287] T. Lahtinen, J. Nuutinen, E. Alanen, M. Turunen, L. Nuortio, *et al.* ; *Quantitative assessment of protein content in irradiated human skin*, **Int. J. Radiat. Oncol.** Vol.43 (Iss 3), 635–638, 1999.
- [288] K. Kojo, T. Lahtinen, A. Oikarinen, T. Oivanen, M. Artama, *et al.* ; *Reliability and validity of a bioimpedance measurement device in the assessment of UVR damage to the skin.*, **Arch. Dermatol. Res.** Vol.300 (Iss 5), 253–61, 2008.
- [289] J. Nuutinen, T. Lahtinen, M. Turunen, E. Alanen, M. Tenhunen, *et al.* ; *A dielectric method for measuring early and late reactions in irradiated human skin.*, **Radiother. Oncol.** Vol.47 (Iss 3), 249–54, 1998.
- [290] Y. Hayashi, N. Miura, N. Shinyashiki, S. Yagihara ; *Free water content and monitoring of healing processes of skin burns studied by microwave dielectric spectroscopy in vivo.*, **Phys. Med. Biol.** Vol.50 (Iss 4), 599–612, 2005.
- [291] F. Dewarrat, L. Falco, M. Mueller, S. Reinhard, A. Caduff, *et al.* ; *A dielectric inverse problem applied to human skin measurements during glucose excursions*, **Physiol. Meas.** Vol.32 (Iss 8), 1285–1300, 2011.

## Références Bibliographiques

---

- [292] P. Clarys, R. Clijsen, J. Taeymans, A.O. Barel ; *Hydration measurements of the stratum corneum: comparison between the capacitance method (digital version of the Corneometer CM 825®) and the impedance method (Skicon-200EX®)*, **Ski. Res. Technol.** Vol.18 (Iss 3), 316–323, 2012.
- [293] H. Maeda, E. Fukada ; *Effect of water on piezoelectric, dielectric, and elastic properties of bone*, **Biopolymers** Vol.21 (Iss 10), 2055–2068, 1982.
- [294] S. Bone, R. Pethig ; *Dielectric studies of protein hydration and hydration-induced flexibility.*, **J. Mol. Biol.** Vol.181 (Iss 2), 323–6, 1985.
- [295] V. Samouillan, a. Lamure, C. Lacabanne ; *Dielectric relaxations of collagen and elastin in the dehydrated state*, **Chem. Phys.** Vol.255 (Iss 2–3), 259–271, 2000.
- [296] S.A. Lusceac, M. Rosenstihl, M. Vogel, C. Gainaru, A. Fillmer, *et al.* ; *NMR and dielectric studies of hydrated collagen and elastin: Evidence for a delocalized secondary relaxation*, 2010.
- [297] J. Algie ; *Etude de la structure physique de l'élastine par courants thermostimulés*, Thèse de l'Université Paul Sabatier, 1980.
- [298] J.C.W. Chien ; *Solid-State Characterization of the Structure and Property of Collagen*, **J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.** Vol.12 (Iss 1), 1–80, 1975.
- [299] A. Panagopoulou, A. Kyritsis, M. Vodina, P. Pissis ; *Dynamics of uncrystallized water and protein in hydrated elastin studied by thermal and dielectric techniques.*, **Biochim. Biophys. Acta** Vol.1834 (Iss 6), 977–88, 2013.
- [300] S. Mezghani, A. Lamure, D. Bader, C. Lacabanne ; *Thermally stimulated current changes of irradiated skin*, **J. Mater. Sci. Mater. Med.** Vol.7 (Iss 5), 285–289, 1996.
- [301] V. Samouillan, J. Dandurand, C. Lacabanne, W. Hornebeck ; *Molecular mobility of elastin: effect of molecular architecture.*, **Biomacromolecules** Vol.3 (Iss 3), 531–7, 2002.
- [302] V. Samouillan, E. Lamy, J. Dandurand, A. Foucault-Bertaud, C. Chareyre, *et al.* ; *Changes in the physical structure and chain dynamics of elastin network in homocysteine-cultured arteries.*, **J. Biomed. Mater. Res. A** Vol.93 (Iss 2), 696–703, 2010.
- [303] V. Samouillan, J. Dandurand, C. Lacabanne, A. Stella, M. Gargiulo, *et al.* ; *Analysis of the molecular mobility of collagen and elastin in safe, atheromatous and aneurysmal aortas*, **Pathol. Biol.** Vol.60 (Iss 1), 58–65, 2012.
- [304] M. Baranska, M. Roman, K. Majzner ; *General Overview on Vibrational Spectroscopy Applied in Biology and Medicine*, **Springer Netherlands**, 3–14, 2014.
- [305] H.J. Bakker, J.L. Skinner ; *Vibrational spectroscopy as a probe of structure and dynamics in liquid water.*, **Chem. Rev.** Vol.110 (Iss 3), 1498–517, 2010.
- [306] H. Fabian, M. Jackson, L. Murphy, P.H. Watson, I. Fichtner, *et al.* ; *A comparative infrared spectroscopic study of human breast tumors and breast tumor cell xenografts*, **Biospectroscopy** Vol.1 (Iss 1), 37–45, 1995.
- [307] L.-P. Choo-Smith, K. Maquelin, T. van Vreeswijk, H.A. Bruining, G.J. Puppels, *et al.* ; *Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy*, **Appl. Environ. Microbiol.** Vol.67 (Iss 4), 1461–1469, 2001.
- [308] M.J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, H.J. Butler, *et al.* ; *Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials*, **Nat. Protoc.** Vol.9 (Iss 8), 1771–1791, 2014.
- [309] S.E. Glassford, B. Byrne, S.G. Kazarian ; *Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins*, **Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics** Vol.1834 (Iss 12), 2849–2858, 2013.
- [310] A. Barth ; *Infrared spectroscopy of proteins.*, **Biochim. Biophys. Acta** Vol.1767 (Iss 9), 1073–101, 2007.

## Références Bibliographiques

---

- [311] J. Kong, S. Yu ; *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures.*, **Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)**. Vol.39 (Iss 8), 549–59, 2007.
- [312] L. Brancalèon, M.P. Bamberg, T. Sakamaki, N. Kollias ; *Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a Possible Method to Investigate Biophysical Parameters of Stratum Corneum In Vivo*, 380–386, 2001.
- [313] G.W. Lucassen, G.N. van Veen, J.A. Jansen ; *Band analysis of hydrated human skin stratum corneum attenuated total reflectance fourier transform infrared spectra in vivo.*, **J. Biomed. Opt.** Vol.3 (Iss 3), 267–80, 1998.
- [314] B. Barry, H.G.M. Edwards, A.C. Williams ; *Fourier Transform Raman and Infrared Vibrational Study of Human Skin: Assignment of Spectral Bands*, **J. Raman Spectrosc.** Vol.23, 641–645, 1992.
- [315] M. Leroy, M. Lafleur, M. Auger, G. Laroche, R. Pouliot ; *Characterization of the structure of human skin substitutes by infrared microspectroscopy*, **Anal. Bioanal. Chem.** Vol.405 (Iss 27), 8709–8718, 2013.
- [316] R. Pouliot, L. Germain, F.A. Auger, N. Tremblay, J. Juhasz ; *Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro human skin equivalent produced by tissue engineering and its comparison with normal human skin by ATR-FTIR spectroscopy and thermal analysis (DSC)*, **Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids** Vol.1439 (Iss 3), 341–352, 1999.
- [317] K. Babita, V. Kumar, V. Rana, S. Jain, A.K. Tiwary ; *Thermotropic and Spectroscopic Behavior of Skin : Relationship with Percutaneous Permeation Enhancement*, 95–113, 2006.
- [318] J. Urschitz, S. Iobst, Z. Urban, C. Granda, K.A. Souza, *et al.* ; *A Serial Analysis of Gene Expression in Sun-Damaged Human Skin*, 3–13, 2002.
- [319] S. Takada, S. Naito, J. Sonoda, Y. Miyauchi ; *Noninvasive In Vivo Measurement of Natural Moisturizing Factor Content in Stratum Corneum of Human Skin by Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy*, **Appl. Spectrosc.** Vol.66 (Iss 1), 26–32, 2012.
- [320] L. Zhang, A. Aksan ; *Fourier transform infrared analysis of the thermal modification of human cornea tissue during conductive keratoplasty*, **Appl. Spectrosc.** Vol.64 (Iss 1), 23–29, 2010.
- [321] G. Yu, G. Zhang, C.R. Flach, R. Mendelsohn ; *Vibrational spectroscopy and microscopic imaging: novel approaches for comparing barrier physical properties in native and human skin equivalents.*, **J. Biomed. Opt.** Vol.18 (Iss 6), 61207, 2013.
- [322] Y. Miyamae, Y. Yamakawa, M. Kawabata, Y. Ozaki ; *A combined near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and principal component analysis method of assessment for the degree of photoaging and physiological aging of human skin.*, **Anal. Sci.** Vol.28 (Iss 12), 1159–64, 2012.
- [323] C. Eklouh-Molinier, T. Happillon, N. Bouland, C. Fichel, M.-D. Diébold, *et al.* ; *Investigating the relationship between changes in collagen fiber orientation during skin aging and collagen/water interactions by polarized-FTIR microimaging.*, **Analyst** Vol.140 (Iss 18), 6260–8, 2015.
- [324] A. Salman, J. Ramesh, V. Erukhimovitch, M. Talyshinsky, S. Mordechai, *et al.* ; *FTIR microspectroscopy of malignant fibroblasts transformed by mouse sarcoma virus*, **J. Biochem. Biophys. Methods** Vol.55 (Iss 2), 141–153, 2003.
- [325] M. Huleihel, A. Salman, V. Erukhimovitch, J. Ramesh, Z. Hammody, *et al.* ; *Novel spectral method for the study of viral carcinogenesis in vitro*, **J. Biochem. Biophys. Methods** Vol.50 (Iss 2–3), 111–121, 2002.
- [326] F. Bonnier, S. Rubin, L. Debelle, L. Ventéo, M. Pluot, *et al.* ; *FTIR protein secondary structure analysis of human ascending aortic tissues.*, **J. Biophotonics** Vol.1 (Iss 3), 204–14, 2008.
- [327] R. Cheheltani, J.M. Rosano, B. Wang, A.K. Sabri, N. Pleshko, *et al.* ; *Fourier transform infrared spectroscopic imaging of cardiac tissue to detect collagen deposition after myocardial infarction.*, **J. Biomed. Opt.** Vol.17 (Iss 5), 56014, 2012.

## Références Bibliographiques

---

- [328] K.Z. Liu, I.M. Dixon, H.H. Mantsch ; *Distribution of collagen deposition in cardiomyopathic hamster hearts determined by infrared microscopy.*, **Cardiovasc. Pathol.** Vol.8 (Iss 1), 41–7, 1999.
- [329] R. Cheheltani, J.M. Rosano, B. Wang, A.K. Sabri, N. Pleshko, *et al.* ; *Fourier transform infrared spectroscopic imaging of cardiac tissue to detect collagen deposition after myocardial infarction of cardiac tissue to detect collagen deposition*, **J. Biomed. Opt.** 2012.
- [330] K.M. Gough, D. Zelinski, R. Wiens, M. Rak, I.M.C. Dixon ; *Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart: Effect of chronic AT1 suppression*, **Anal. Biochem.** Vol.316 (Iss 2), 232–242, 2003.
- [331] V. Zohdi, B.R. Wood, J.T. Pearson, K.R. Bambery, M.J. Black ; *Evidence of altered biochemical composition in the hearts of adult intrauterine growth-restricted rats.*, **Eur. J. Nutr.** Vol.52 (Iss 2), 749–58, 2013.
- [332] K. Belbachir, R. Noreen, G. Gouspillou, C. Petibois ; *Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy.*, **Anal. Bioanal. Chem.** Vol.395 (Iss 3), 829–37, 2009.
- [333] C. Eklouh-Molinier, T. Happillon, N. Bouland, C. Fichel, M.-D. Diébold, *et al.* ; *Investigating the relationship between changes in collagen fiber orientation during skin aging and collagen/water interactions by polarized-FTIR microimaging*, **Analyst** Vol.140 (Iss 18), 6260–6268, 2015.
- [334] N.P. Camacho, P. West, P. a Torzilli, R. Mendelsohn ; *FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage.*, **Biopolymers** Vol.62 (Iss 1), 1–8, 2001.
- [335] a Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, M. Gawron, J. Kozłowska, a Planecka ; *Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates.*, **Int. J. Biol. Macromol.** Vol.47 (Iss 4), 570–7, 2010.
- [336] M. Pluot, B. Baehrel, M. Manfait, S. Rubin, F. Bonnier, *et al.* ; *Analysis of structural changes in normal and aneurismal human aortic tissues using FTIR microscopy*, **Biopolymers** Vol.89 (Iss 2), 160–169, 2007.
- [337] K.J. Payne, A. Veis ; *Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies.*, **Biopolymers** Vol.27 (Iss 11), 1749–60, 1988.
- [338] O.S. Rabotyagova, P. Cebe, D.L. Kaplan ; *Collagen Structural Hierarchy and Susceptibility to Degradation by Ultraviolet Radiation.*, **Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.** Vol.28 (Iss 8), 1420–1429, 2008.
- [339] C. Petibois, G. Gouspillou, K. Wehbe, J.-P. Delage, G. Déléris ; *Analysis of type I and IV collagens by FT-IR spectroscopy and imaging for a molecular investigation of skeletal muscle connective tissue.*, **Anal. Bioanal. Chem.** Vol.386 (Iss 7–8), 1961–6, 2006.
- [340] M.-C. Popescu, C. Vasile, O. Craciunescu ; *Structural analysis of some soluble elastins by means of FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy.*, **Biopolymers** Vol.93 (Iss 12), 1072–84, 2010.
- [341] L. Debelle, A.J. Alix, S.M. Wei, M.P. Jacob, J.P. Huvenne, *et al.* ; *The secondary structure and architecture of human elastin.*, **Eur. J. Biochem.** Vol.258 (Iss 2), 533–9, 1998.
- [342] N. Mainreck, S. Brezillon, G. Sockalingum, F.-X. Maquart, M. Manfait, *et al.* ; *Rapid Characterization of Glycosaminoglycans Using a Combined Approach by Infrared and Raman Microspectroscopies*, **J. Pharm. Sci.** Vol.100 (Iss 2), 441–450, 2011.
- [343] K. Haxaire, Y. Maréchal, M. Milas, M. Rinaudo ; *Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments.*, **Biopolymers** Vol.72 (Iss 1), 10–20, 2003.
- [344] K. Haxaire, Y. Maréchal, M. Milas, M. Rinaudo ; *Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. II. Definition and quantitative analysis of elementary hydration spectra and water uptake.*, **Biopolymers** Vol.72 (Iss 3), 149–61, 2003.

## Références Bibliographiques

---

- [345] Y. Maréchal, M. Milas, M. Rinaudo ; *Hydration of hyaluronan polysaccharide observed by IR spectrometry. III. Structure and mechanism of hydration.*, **Biopolymers** Vol.72 (Iss 3), 162–73, 2003.
- [346] D. Krilov, M. Balarin, M. Kosović, O. Gamulin, J. Brnjac-Kraljević ; *FT-IR spectroscopy of lipoproteins—A comparative study*, **Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.** Vol.73 (Iss 4), 701–706, 2009.
- [347] V. Samouillan, J. Dandurand, L. Nasarre, L. Badimon, C. Lacabanne, *et al.* ; *Lipid loading of human vascular smooth muscle cells induces changes in tropoelastin protein levels and physical structure.*, **Biophys. J.** Vol.103 (Iss 3), 532–40, 2012.
- [348] V. Samouillan, E. Revuelta-López, J. Dandurand, L. Nasarre, L. Badimon, *et al.* ; *Cardiomyocyte intracellular cholesteryl ester accumulation promotes tropoelastin physical alteration and degradation: Role of LRP1 and cathepsin S*, **Int. J. Biochem. Cell Biol.** Vol.55, 209–219, 2014.
- [349] A. Barth ; *The infrared absorption of amino acid side chains.*, **Prog. Biophys. Mol. Biol.** Vol.74 (Iss 3–5), 141–73, 2000.
- [350] Q. Wang, W. Sanad, L.M. Miller, A. Voigt, K. Klingel, *et al.* ; *Infrared imaging of compositional changes in inflammatory cardiomyopathy*, **Vib. Spectrosc.** Vol.38 (Iss 1–2), 217–222, 2005.
- [351] K.Z. Liu, I.M. Dixon, H.H. Mantsch ; *Distribution of collagen deposition in cardiomyopathic hamster hearts determined by infrared microscopy.*, **Cardiovasc. Pathol.** Vol.8 (Iss 1), 41–7, 1999.
- [352] R. Manoharan, Y. Wang, M.S. Feld ; *Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy*, **Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.** Vol.52 (Iss 2), 215–249, 1996.
- [353] Z. Movasaghi, S. Rehman, I.U. Rehman ; *Raman Spectroscopy of Biological Tissues*, **Appl. Spectrosc. Rev.** Vol.42 (Iss 5), 493–541, 2007.
- [354] A. Downes, A. Elfick ; *Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine*, **Sensors** Vol.10 (Iss 3), 1871–1889, 2010.
- [355] L. Franzen ; *Applications of Raman spectroscopy in skin research — From skin physiology and diagnosis up to risk assessment and dermal drug delivery*, **Adv. Drug Deliv. Rev.** Vol.89, 91–104, 2015.
- [356] B.W. Barry, H.G.M. Edwards, A.C. Williams ; *Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: Assignment of spectral bands*, **J. Raman Spectrosc.** Vol.23 (Iss 11), 641–645, 1992.
- [357] P.J. Caspers, H.A. Bruining, G.J. Puppels, G.W. Lucassen, E.A. Carter ; *In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.116 (Iss 3), 434–442, 2001.
- [358] H. Wang, N. Huang, J. Zhao, H. Lui, M. Korbelik, *et al.* ; *Depth-resolved in vivo micro-Raman spectroscopy of a murine skin tumor model reveals cancer-specific spectral biomarkers*, **J. Raman Spectrosc.** Vol.42 (Iss 2), 160–166, 2011.
- [359] M. Gniadecka, H.C. Wulf, N. Nymark Mortensen, O. Faurskov Nielsen, D.H. Christensen ; *Diagnosis of Basal Cell Carcinoma by Raman Spectroscopy*, **J. Raman Spectrosc.** Vol.28 (Iss 2–3), 125–129, 1997.
- [360] M. Gniadecka, O.F. Nielsen, S. Wessel, M. Heidenheim, D.H. Christensen, *et al.* ; *Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.111 (Iss 6), 1129–33, 1998.
- [361] M. Förster, M.-A. Bolzinger, G. Montagnac, S. Briançon ; *Confocal Raman microspectroscopy of the skin*, **Eur. J. Dermatology** Vol.21 (Iss 6), 851–863, 2012.
- [362] M. Gniadecka, O. Faurskov Nielsen, D.H. Christensen, H.C. Wulf ; *Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.110 (Iss 4), 393–8, 1998.
- [363] M. Gniadecka, O.F. Nielsen, S. Wessel, M. Heidenheim, D.H. Christensen, *et al.* ; *Water and protein structure in photoaged and chronically aged Skin*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.111, 1129–1133, 1998.

## Références Bibliographiques

---

- [364] Q. Zhang, K.L. Andrew Chan, G. Zhang, T. Gillece, L. Senak, *et al.* ; *Raman microspectroscopic and dynamic vapor sorption characterization of hydration in collagen and dermal tissue.*, **Biopolymers** Vol.95 (Iss 9), 607–15, 2011.
- [365] N. Nakagawa, M. Matsumoto, S. Sakai ; *In vivo measurement of the water content in the dermis by confocal Raman spectroscopy.*, **Skin Res. Technol.** Vol.16 (Iss 2), 137–41, 2010.
- [366] J. Buján, G. Pascual, N. García-Honduvilla, M.J. Gimeno, F. Jurado, *et al.* ; *Rapid Thawing Increases the Fragility of the Cryopreserved Arterial Wall*, **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.** Vol.20 (Iss 1), 13–20, 2000.
- [367] G. Pascual, M. Rodríguez, C. Corrales, F. Turégano, N. García-Honduvilla, *et al.* ; *New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes*, **Cryobiology** Vol.48 (Iss 1), 62–71, 2004.
- [368] R.J. Delle-Bovi, A. Smits, H.M. Pylypiw ; *Rapid Method for the Determination of Total Monosaccharide in Enterobacter Cloacae Strains Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, **Am. J. Anal. Chem.** Vol.2, 212–216, 2011.
- [369] A. Barth ; *Infrared spectroscopy of proteins.*, **Biochim. Biophys. Acta** Vol.1767 (Iss 9), 1073–1101, 2007.
- [370] M.-C. Popescu, C. Vasile, O. Craciunescu ; *Structural analysis of some soluble elastins by means of FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy.*, **Biopolymers** Vol.93 (Iss 12), 1072–84, 2010.
- [371] J. Kong, S. Yu ; *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*, **Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)**. Vol.39 (Iss 8), 549–559, 2007.
- [372] S. Venyaminov, N.N. Kalnin ; *Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H<sub>2</sub>O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands.*, **Biopolymers** Vol.30 (Iss 13–14), 1243–57, 1990.
- [373] H.C. Canuto, K.W. Fishbein, a Huang, S.B. Doty, R. a Herbert, *et al.* ; *Characterization of skin abnormalities in a mouse model of osteogenesis imperfecta using high resolution magnetic resonance imaging and Fourier transform infrared imaging spectroscopy.*, **NMR Biomed.** Vol.25 (Iss 1), 169–76, 2012.
- [374] D. Krilov, M. Balarin, M. Kosović, O. Gamulin, J. Brnjas-Kraljević ; *FT-IR spectroscopy of lipoproteins--a comparative study.*, **Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.** Vol.73 (Iss 4), 701–6, 2009.
- [375] M. Nara, M. Okazaki, H. Kagi ; *Infrared study of human serum very-low-density and low-density lipoproteins. Implication of esterified lipid C=O stretching bands for characterizing lipoproteins.*, **Chem. Phys. Lipids** Vol.117 (Iss 1–2), 1–6, 2002.
- [376] A. Dong, S.J. Prestrelski, S. Dean Allison, J.F. Carpenter ; *Infrared Spectroscopic Studies of Lyophilization- and Temperature-Induced Protein Aggregation*, **J. Pharm. Sci.** Vol.84 (Iss 4), 415–424, 1995.
- [377] A. Savitzky, M.J.E. Golay ; *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures.*, **Anal. Chem.** Vol.36 (Iss 8), 1627–1639, 1964.
- [378] E.R. Mittlefehldt, J.A. Gardella ; *Quantitative Fourier Self-Deconvolution and Fourier Transform Infrared Analysis of Bisphenol-A-Polycarbonate/Poly(dimethylsiloxane) Random Block Copolymers*, **Appl. Spectrosc.** Vol. 43, Issue 7, pp. 1172-1179 Vol.43 (Iss 7), 1172–1179, 1989.
- [379] D.M. Byler, H. Susi ; *Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra.*, **Biopolymers** Vol.25 (Iss 3), 469–87, 1986.
- [380] J.K. Kauppinen, D.J. Moffatt, H.H. Mantsch, D.G. Cameron ; *Fourier Self-Deconvolution: A Method for Resolving Intrinsically Overlapped Bands*, **Appl. Spectrosc.** Vol.35 (Iss 3), 271–276, 1981.
- [381] E. GOORMAGHTIGH, V. CABIAUX, J.-M. RUYSSCHAERT ; *Secondary structure and dosage of soluble and membrane proteins by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy on hydrated films*, **Eur. J. Biochem.** Vol.193 (Iss 2), 409–420, 1990.
- [382] S. Cai, B.R. Singh ; *Identification of beta-turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins.*, **Biophys. Chem.** Vol.80 (Iss 1), 7–20, 1999.

## Références Bibliographiques

---

- [383] M.-X. Xie, Y. Liu ; *Studies on amide III infrared bands for the secondary structure determination of proteins*, Vol.24 (Iss 2), 2003.
- [384] S. Cai, B.R. Singh ; *A Distinct Utility of the Amide III Infrared Band for Secondary Structure Estimation of Aqueous Protein Solutions Using Partial Least Squares Methods†*, 2004.
- [385] A. Barth, C. Zscherp ; *What vibrations tell about proteins*, **Q. Rev. Biophys.** Vol.35 (Iss 4), S0033583502003815, 2002.
- [386] P.L. Privalov, E.I. Tiktopulo, V.M. Tischenko ; *Stability and mobility of the collagen structure.*, **J. Mol. Biol.** Vol.127 (Iss 2), 203–16, 1979.
- [387] G. Balian, J.H. Bowes ; *The Structure and Properties of Collagen.*, 1–27, 1977.
- [388] P.J. Flory, R.R. Garrett ; *Phase Transitions in Collagen and Gelatin Systems 1*, **J. Am. Chem. Soc.** Vol.80 (Iss 18), 4836–4845, 1958.
- [389] S. Verdier-Sévrain, F. Bonté ; *Skin hydration: a review on its molecular mechanisms.*, **J. Cosmet. Dermatol.** Vol.6 (Iss 2), 75–82, 2007.
- [390] C.L. Ngan, M. Basri, M. Tripathy, R. Abedi Karjiban, E. Abdul-Malek ; *Skin intervention of fullerene-integrated nanoemulsion in structural and collagen regeneration against skin aging.*, **Eur. J. Pharm. Sci.** Vol.70, 22–8, 2015.
- [391] M. Gniadecka, O. Faurskov Nielsen, D.H. Christensen, H.C. Wulf ; *Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair, and nail.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.110 (Iss 4), 393–8, 1998.
- [392] A.C. Wright, D.E. Bohning, A.P. Pecheny, K.M. Spicer ; *Magnetic resonance chemical shift microimaging of aging human skin in vivo: initial findings*, **Ski. Res. Technol.** Vol.4 (Iss 2), 55–62, 1998.
- [393] A. Perry, M.P. Stypha, B.K. Tenn, K.K. Kumashiro ; *on Elastin C NMR Reveals Effects of Temperature and Hydration*, **Biophys. J.** Vol.82, 1086–1095, 2002.
- [394] J.L. Leveque, J.C. Garson, G. Boudouris ; *Water in keratin: Study of the depolarization thermal current peak II.*, **Biopolymers** Vol.16 (Iss 8), 1725–33, 1977.
- [395] U. Kaatze ; *The dielectric properties of water in its different states of interaction*, **J. Solution Chem.** Vol.26 (Iss 11), 1049–1112, 1997.
- [396] G. Melacini, A.M. Bonvin, M. Goodman, R. Boelens, R. Kaptein ; *Hydration dynamics of the collagen triple helix by NMR.*, **J. Mol. Biol.** Vol.300 (Iss 5), 1041–9, 2000.
- [397] H. Hatakeyama, T. Hatakeyama ; *Interaction between water and hydrophilic polymers*, **Thermochim. Acta** Vol.308 (Iss 1–2), 3–22, 1998.
- [398] U. Einhorn-Stoll, H. Hatakeyama, T. Hatakeyama ; *Influence of pectin modification on water binding properties*, **Food Hydrocoll.** Vol.27 (Iss 2), 494–502, 2012.
- [399] S.G. Gevorgian, A.E. Allahverdyan, D.S. Gevorgyan, A.L. Simonian, C.-K. Hu ; *Stabilization and Anomalous Hydration of Collagen Fibril under Heating*, **PLoS One** Vol.8 (Iss 11), e78526, 2013.
- [400] V. Samouillan, F. Delaunay, J. Dandurand, N. Merbahi, J.-P. Gardou, *et al.* ; *The use of thermal techniques for the characterization and selection of natural biomaterials.*, **J. Funct. Biomater.** Vol.2 (Iss 3), 230–48, 2011.
- [401] R. Pethig ; *Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials*, **John Wiley Sons** 376, 1979.
- [402] C. Bucci, R. Fieschi, G. Guidi ; *Ionic Thermocurrents in Dielectrics*, **Phys. Rev.** Vol.148 (Iss 2), 816–823, 1966.
- [403] J. van Turnhout ; *Thermally Stimulated Discharge of Polymer Electrets*, **Polym. J.** Vol.2 (Iss 2), 173–191, 1971.
- [404] P.H. Bentley ; *High Performance Biomaterials. A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications*, **Royal Society of Medicine Press**, Vol.85 (Iss 12), 1992.

## Références Bibliographiques

---

- [405] *Setaram Instruction Manual TSC/RMA*, 1–73,
- [406] H. Eyring ; *Viscosity, Plasticity, and Diffusion as Examples of Absolute Reaction Rates*, **J. Chem. Phys.** Vol.4 (Iss 4), 283, 1936.
- [407] J.L. Leveque, J.C. Garson, P. Pissis, G. Boudouris ; *Free water in hair keratin? a depolarization thermal-current study*, **Biopolymers** Vol.20 (Iss 12), 2649–2656, 1981.
- [408] N. Hitmi ; *Etude des transitions dans les composantes minérale et organique des tissus calcifiés par spectroscopie diélectrique basse fréquence*, Thèse de l'Université Paul Sabatier, 1983.
- [409] M. Brun, A. Lallemand, J.-F. Quinson, C. Eyraud ; *A new method for the simultaneous determination of the size and shape of pores: the thermoporometry*, **Thermochim. Acta** Vol.21 (Iss 1), 59–88, 1977.
- [410] M.R. Landry ; *Thermoporometry by differential scanning calorimetry: experimental considerations and applications*, **Thermochim. Acta** Vol.433 (Iss 1–2), 27–50, 2005.
- [411] K. Ishikiriyama, M. Todoki, T. Kobayashi, H. Tanzawa ; *Pore Size Distribution Measurements of Poly(methyl methacrylate) Hydrogel Membranes for Artificial Kidneys Using Differential Scanning Calorimetry*, **J. Colloid Interface Sci.** Vol.173 (Iss 2), 419–428, 1995.
- [412] D. Majda, W. Makowski, M. Mańko ; *Pore size distribution of micelle-templated silicas studied by thermoporometry using water and n-heptane*, **J. Therm. Anal. Calorim.** Vol.109 (Iss 2), 663–669, 2012.
- [413] K. Ishikiriyama, M. Todoki, K. Motomura ; *Pore Size Distribution (PSD) Measurements of Silica Gels by Means of Differential Scanning Calorimetry*, **J. Colloid Interface Sci.** Vol.171 (Iss 1), 92–102, 1995.
- [414] N.N. Fathima, M.P. Kumar, J.R. Rao, B.U. Nair ; *A DSC investigation on the changes in pore structure of skin during leather processing*, **Thermochim. Acta** Vol.501 (Iss 1–2), 98–102, 2010.
- [415] H. Fashandi, M. Karimi ; *Characterization of porosity of polystyrene fibers electrospun at humid atmosphere*, **Thermochim. Acta** Vol.547, 38–46, 2012.
- [416] J.N. Hay, P.R. Laity ; *Observations of water migration during thermoporometry studies of cellulose films*, **Polymer (Guildf)**. Vol.41 (Iss 16), 6171–6180, 2000.
- [417] A. Vierkötter, U. Ranft, U. Krämer, D. Sugiri, V. Reimann, *et al.* ; *The SCINEXA: A novel, validated score to simultaneously assess and differentiate between intrinsic and extrinsic skin ageing*, **J. Dermatol. Sci.** Vol.53 (Iss 3), 207–211, 2009.
- [418] J.L. Lippert, D. Tyminski, P.J. Desmeules ; *Determination of the secondary structure of proteins by laser Raman spectroscopy*, **J. Am. Chem. Soc.** Vol.98 (Iss 22), 7075–7080, 1976.
- [419] B. G. Frushour, J.L. Koenig ; *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*, **Heyden**, 35–97, 1975.
- [420] M.-X. XIE, Y. LIU ; *Studies on amide III infrared bands for the secondary structure determination of proteins*, **Chem. J. Chinese Univ.** Vol.24 (Iss 2), 226–231, 2003.
- [421] S. Brézillon, V. Untereiner, L. Lovergne, I. Tadeo, R. Noguera, *et al.* ; *Glycosaminoglycan profiling in different cell types using infrared spectroscopy and imaging*, **Anal. Bioanal. Chem.** Vol.406 (Iss 24), 5795–5803, 2014.
- [422] P. Pissis, A. Anagnostopoulou-Konsta, L. Apeki, D. Daoukaki-Diamanti, C. Christodoulides ; *Dielectric effects of water in water-containing systems*, **J. non Cryst. solids** Vol.131–133, 1174–1181, 1991.
- [423] M. Gniadecka, G.B. Jemec ; *Quantitative evaluation of chronological ageing and photoageing in vivo: studies on skin echogenicity and thickness.*, **Br. J. Dermatol.** Vol.139 (Iss 5), 815–21, 1998.
- [424] R.K. Mlosek, S. Malinowska, M. Sikora, R. Dębowska, A. Stępień, *et al.* ; *The use of high frequency ultrasound imaging in skin moisturization measurement*, **Ski. Res. Technol.** Vol.19 (Iss 2), 169–175, 2013.

## Références Bibliographiques

---

- [425] S. Seidenari, A. Pagnoni, A. Di Nardo, A. Giannetti ; *Echographic evaluation with image analysis of normal skin: variations according to age and sex.*, **Skin Pharmacol.** Vol.7 (Iss 4), 201–9, 1994.
- [426] H.C. Wulf, J. Sandby-Møller, T. Kobayasi, R. Gniadecki ; *Skin aging and natural photoprotection*, **Micron** Vol.35 (Iss 3), 185–191, 2004.
- [427] E.F. Bernstein, Y.Q. Chen, J.B. Kopp, L. Fisher, D.B. Brown, *et al.* ; *Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. Comparison of sun-protected and photoaged skin by northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy.*, **J. Am. Acad. Dermatol.** Vol.34 (Iss 2 Pt 1), 209–18, 1996.
- [428] M. Yamauchi, P. Prisayanh, Z. Haque, D.T. Woodley ; *Collagen cross-linking in sun-exposed and unexposed sites of aged human skin.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.97 (Iss 5), 938–41, 1991.
- [429] A. Sionkowska ; *Thermal stability of UV-irradiated collagen in bovine lens capsules and in bovine cornea.*, **J. Photochem. Photobiol. B.** Vol.80 (Iss 2), 87–92, 2005.
- [430] G.J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, *et al.* ; *Mechanisms of photoaging and chronological skin aging.*, **Arch. Dermatol.** Vol.138 (Iss 11), 1462–70, 2002.
- [431] C. Marionnet, C. Pierrard, C. Golebiewski, F. Bernerd ; *Diversity of biological effects induced by longwave UVA rays (UVA1) in reconstructed skin.*, **PLoS One** Vol.9 (Iss 8), e105263, 2014.
- [432] J.-Y. Jung, J.-H. Oh, Y.K. Kim, M.H. Shin, D. Lee, *et al.* ; *Acute UV Irradiation Increases Heparan Sulfate Proteoglycan Levels in Human Skin*, **J. Korean Med. Sci.** Vol.27 (Iss 3), 300, 2012.
- [433] B.B. Werth, M. Bashir, L. Chang, V.P. Werth ; *Ultraviolet Irradiation Induces the Accumulation of Chondroitin Sulfate, but Not Other Glycosaminoglycans, in Human Skin*, **PLoS One** Vol.6 (Iss 8), e14830, 2011.
- [434] K. Hasegawa, M. Yoneda, H. Kuwabara, O. Miyaiishi, N. Itano, *et al.* ; *Versican, a major hyaluronan-binding component in the dermis, loses its hyaluronan-binding ability in solar elastosis.*, **J. Invest. Dermatol.** Vol.127 (Iss 7), 1657–63, 2007.
- [435] R. Eckel, H. Huo, H.W. Guan, X. Hu, X. Che, *et al.* ; *Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue*, **Vib. Spectrosc.** Vol.27 (Iss 2), 165–173, 2001.
- [436] J. Bella, B. Brodsky, H.M. Berman ; *Hydration structure of a collagen peptide.*, **Structure** Vol.3 (Iss 9), 893–906, 1995.
- [437] R. Tang, V. Samouillan, J. Dandurand, C. Lacabanne, F. Nadal-Wollbold, *et al.* ; *Thermal and vibrational characterization of human skin*, **J. Therm. Anal. Calorim.** 1–12, 2016.

---

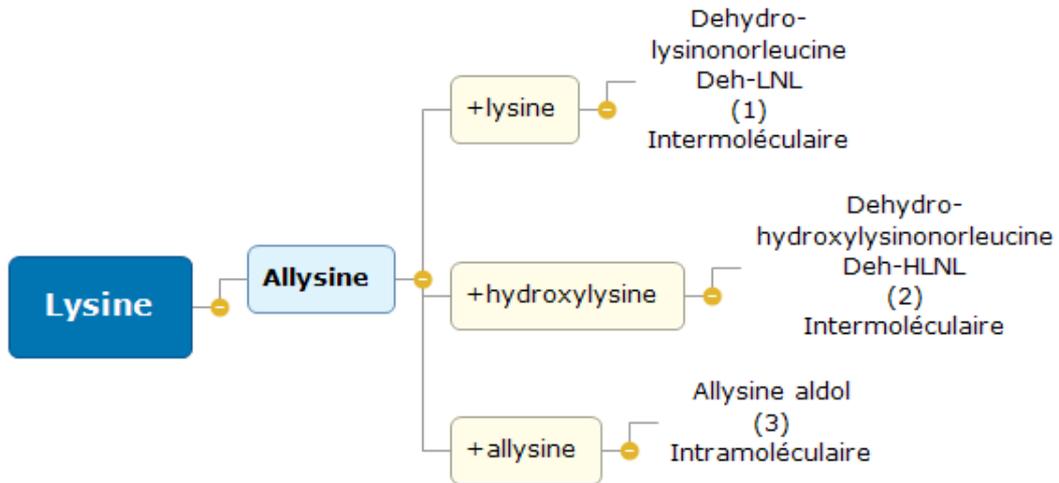
## *Annexes*

---

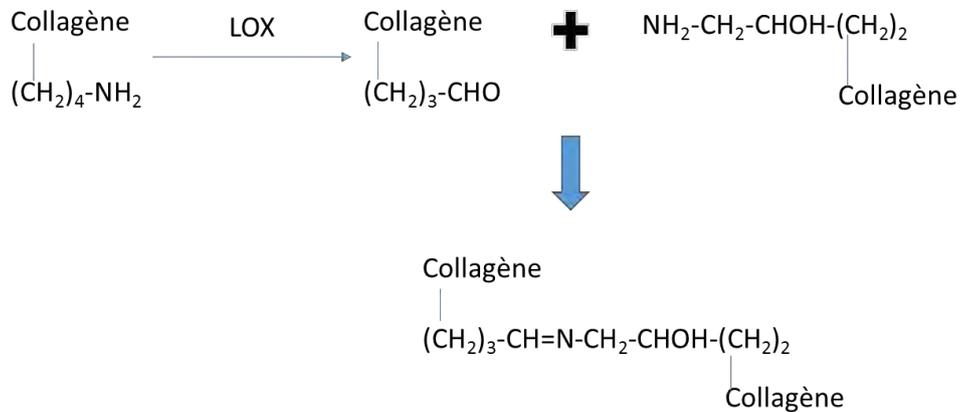


## Annexes

### Annexe A (chapitre 1)



*Figure 1 : voie de réticulation « lysine »*



*Figure 2 : détail de la réaction (2) de la voie « lysine » prédominante dans le derme adulte*

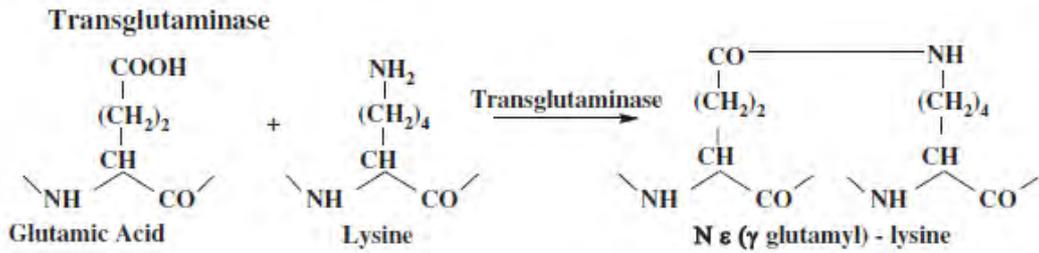


Figure 3 : formation du pontage  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine

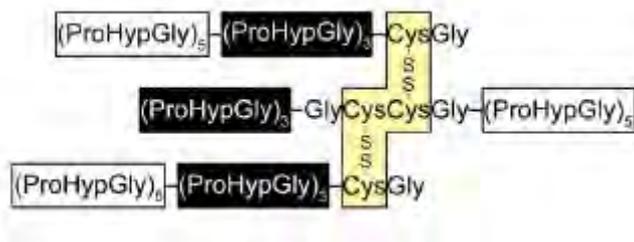


Figure 4 : liaisons disulfures dans le collagène de type III

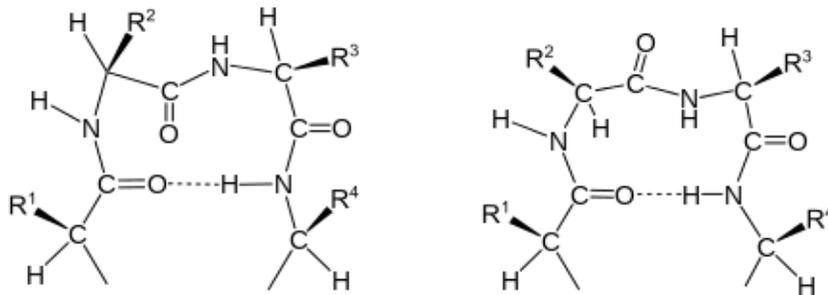


Figure 5: coudes  $\beta$  (type I et II)

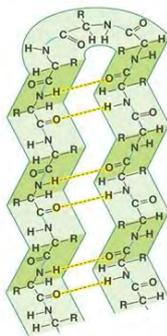


Figure 6: feuillet  $\beta$  anti parallèle

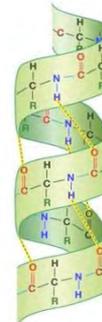


Figure 7: hélice  $\alpha$

## Annexe B (chapitre 2)

Position (cm <sup>-1</sup> )	Indexation
3446, 3361, 3197	<b>amide A <math>\nu(\text{O-H})</math> et <math>\nu(\text{N-H})</math></b>
3066	$\nu\text{CH}$ aromatique
2955	$\nu\text{as}(\text{CH}_3)$
2922	$\nu\text{as}(\text{CH}_2)$
2850	$\nu\text{s}(\text{CH}_3)$
2827	$\nu\text{s}(\text{CH}_2)$
1741	$\nu(\text{C=O})$ Ester
1632	<b>amide I <math>\nu(\text{C=O})</math></b>
1542	amide II $\nu(\text{CN})$ , $\delta(\text{NH})$
1464-1380	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$ aliphatique, chaîne latérale
1338	$\delta\omega(\text{CH}_2)$ proline <b>spécifique collagène</b>
1282	$\delta(\text{CH}_3)$ <b>spécifique collagène</b>
1240	<b>amide III <math>\delta_{\text{plan}}(\text{N-H})</math></b>
1206	$\delta(\text{C-OH})$ Tyrosine <b>spécifique collagène</b>
1164	$\gamma(\text{CH}_2)$ Proline, Tyrosine
1086	$\nu(\text{C-O})$ protéine
1039	$\nu(\text{C-C})$ , $\nu(\text{C-O})$ , Phénylalanine, Sérine

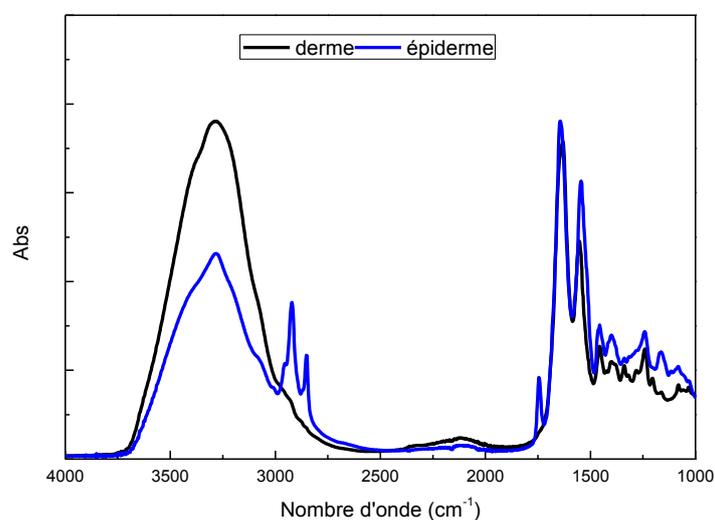
*Tableau 1 : indexation probable des bandes IR dans le collagène*

Position (cm <sup>-1</sup> )	Indexation
3275	<b>amide A <math>\nu(\text{O-H})</math> et <math>\nu(\text{N-H})</math></b>
2929	$\nu(\text{C-H})$ étirement
1646	<b>amide I <math>\nu(\text{C=O})</math></b>
1604	$\nu\text{as}(\text{COO}^-)$
1554	<b>amide II <math>\delta(\text{N-H})</math></b>
1411-1376	$\nu\text{s}(\text{COO}^-)$ et groupe acétyl-amino
1145	$\nu\text{as}(\text{COC})$ hétérosides
1072	$\nu(\text{C-OH})$ alcool II
1033	$\nu(\text{C-OH})$ alcool II et $\nu(\text{C-OH})$ alcool I (C6-O6H)

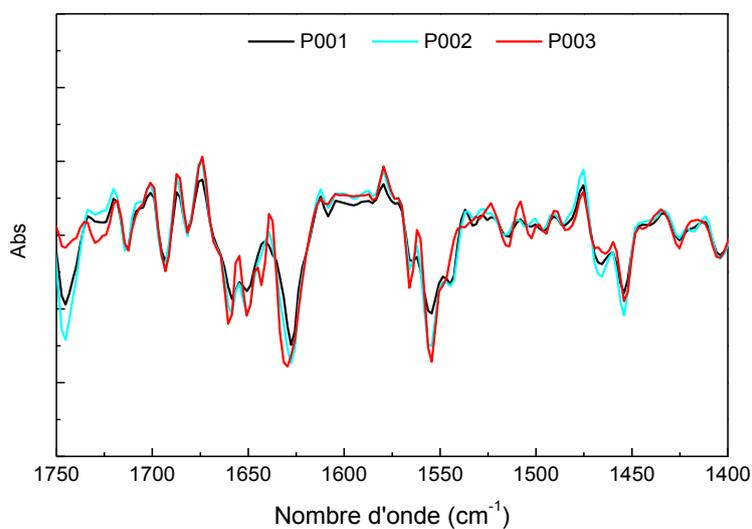
*Tableau 2 : indexation probable des bandes IR dans l'acide hyaluronique (HA)*

position (cm <sup>-1</sup> )	Indexation
2954	vas(CH3)
2927	vas(CH2)
2866	vs(CH3)
2854	vs(CH2)
1744	v (C=O)
1464-1453	δ(CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> )
1383-1361	δ(CH <sub>3</sub> )
1261-1250	ωC-H, ρCH <sub>2</sub>
1179-1166	v(CO), COOR

*Tableau 3 : indexation probable des bandes IR dans les triglycrides*



*Figure 1 : spectres IR/ATR d'une biopsie cutanée abdominale (face derme – face épiderme)*



*Figure 2 : dérivées secondes des spectres IR/ATR de 3 biopsies cutanées abdominales, face derme*

*Annexes*

	Bande dérivée seconde (cm <sup>-1</sup> )	Indexation
Amide I	1696, 1691	Feuillets $\beta$ (antiparallèles)
	1685, 1675, 1667	Tours $\beta$
	1680	Feuillets $\beta$ et tours $\beta$
	1663	Hélice $3_{10}$
	1658	Hélice $\alpha$ -like
	1656	Hélice $\alpha$
	1651, 1649, 1647	Désordre, hélice $\alpha$
	1642, 1638 (intra), 1633, 1630, 1627, 1624, 1622, 1620 (inter)	Feuillets $\beta$ inter et intramoléculaires
autre	1608	Chaînes latérales
Amide II	1587	Tours $\beta$
	1550, 1552, 1555	Feuillets $\beta$
	1539, 1541, 1542, 1546	Hélice $\alpha$
	1537	désordre
Amide III	1310-1270	Tours $\beta$
	1310 -1260	Hélice $\alpha$
	1260-1230	désordre
	1265-1220	Feuillets $\beta$

Tableau 4 : indexation des minimas de dérivée seconde dans les protéines

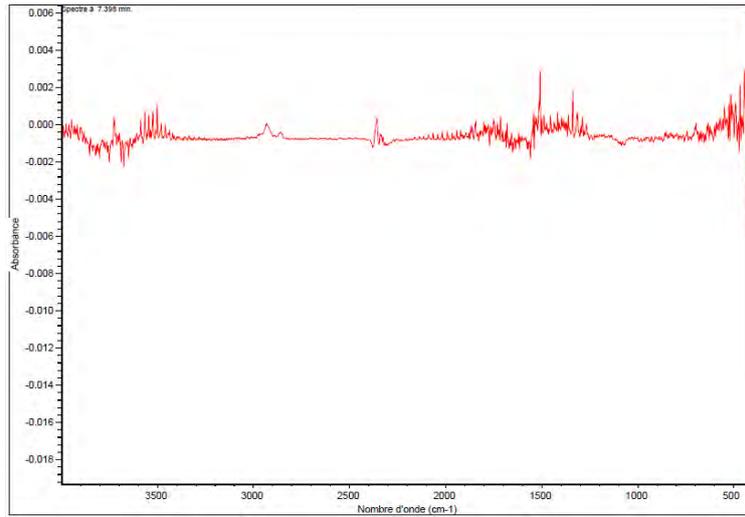


Figure 3 : spectre IRTF des effluents issus de l'analyse ATG à T= 80°C

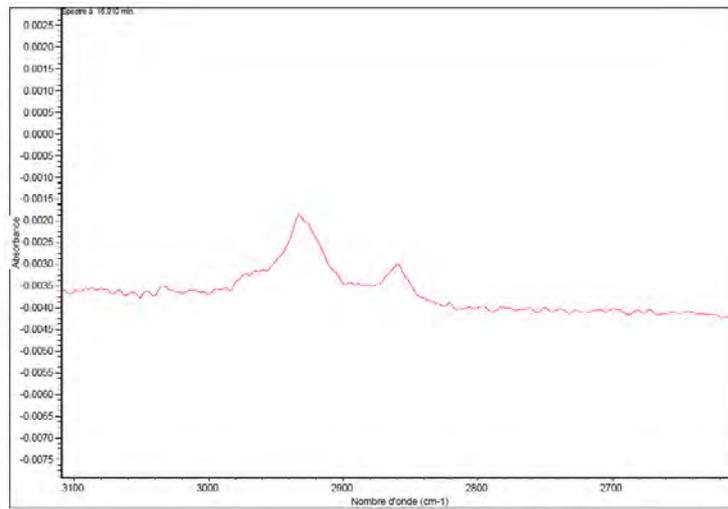


Figure 4 : spectre IRTF des effluents issus de l'analyse ATG à T= 180°C

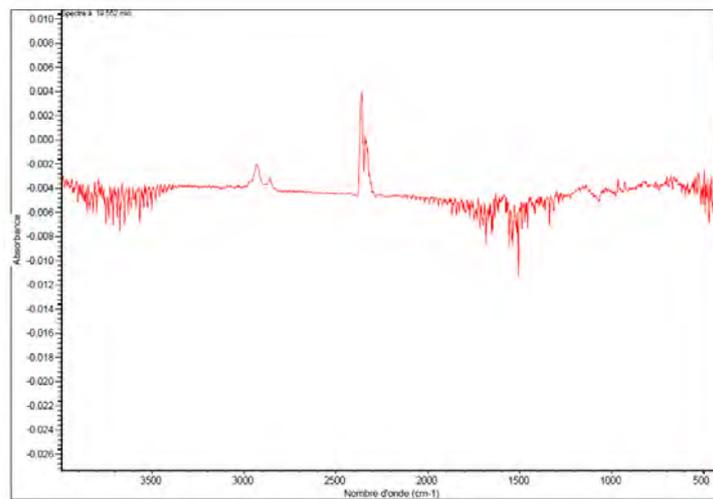


Figure 5 : spectre IRTF des effluents issus de l'analyse ATG à T= 225°C

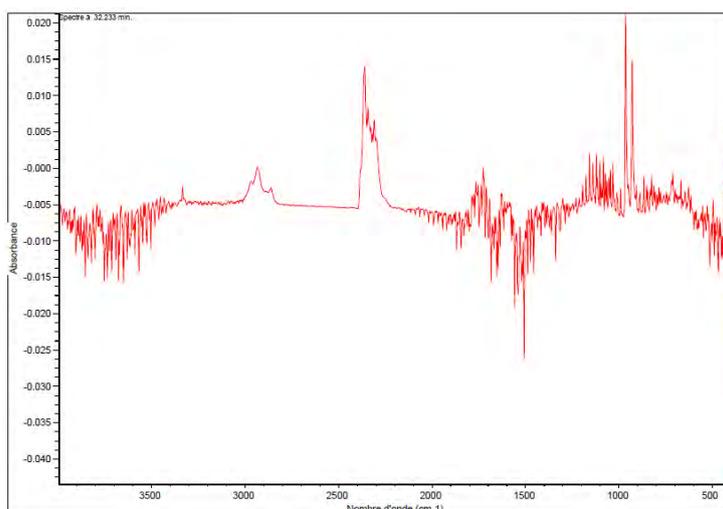


Figure 6 : spectre IRTF des effluents issus de l'analyse ATG à  $T=330^{\circ}\text{C}$

$T_{\text{pol}}(^{\circ}\text{C})$	$T_{\text{max}}(^{\circ}\text{C})$	Log $\tau$	Ea (eV)	$r^2$	Ea (kJ/mol)	$\tau$ (s)	$\Delta S$ (J/mol/K)
-140	-130,42	-14,24	0,45	1,000	43,03	5,71E-15	33,89
-135	-123,87	-13,74	0,45	0,999	43,58	1,82E-14	23,87
-130	-117,97	-13,73	0,47	0,999	45,32	1,88E-14	23,29
-125	-111,69	-14,09	0,50	0,999	48,30	8,13E-15	29,92
-120	-105,27	-14,51	0,53	0,999	51,59	3,09E-15	37,63
-115	-100,67	-16,68	0,62	0,999	60,05	2,08E-17	78,98
-110	-97,33	-17,97	0,68	1,000	65,51	1,07E-18	103,50
-105	-92,62	-18,53	0,72	0,999	69,15	2,95E-19	114,00
-100	-87,87	-19,21	0,76	1,000	73,37	6,23E-20	126,71
-95	-82,91	-20,34	0,82	0,999	79,41	4,54E-21	148,26
-90	-78,70	-21,78	0,90	0,999	86,48	1,68E-22	175,51
-85	-75,72	-22,18	0,93	0,999	89,35	6,60E-23	183,13
-80	-68,42	-17,44	0,77	0,999	74,45	3,62E-18	33,88

Tableau 6 : Paramètres des processus élémentaires de type Arrhénius isolés dans le domaine des basses températures – biopsie abdominale

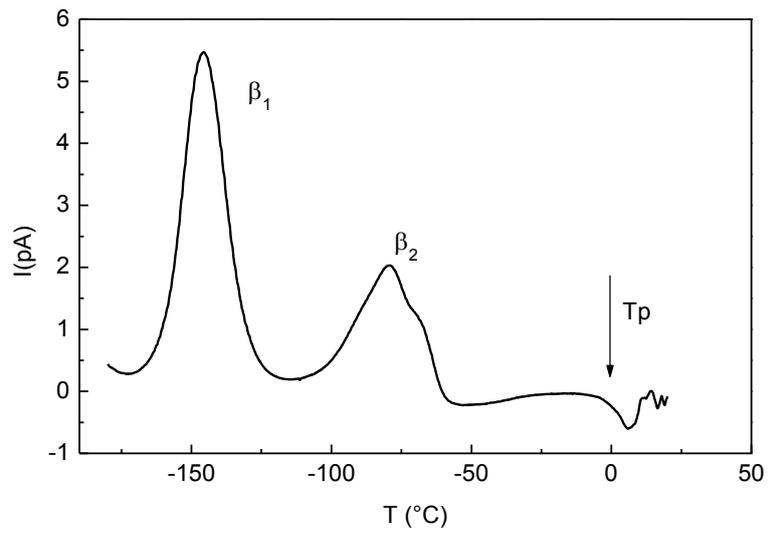


Figure 7 : thermogramme CTS basse température de l'élastine pure hydratée à 67%

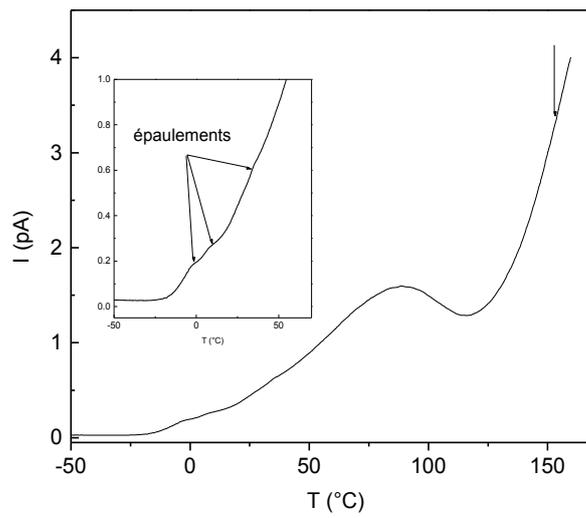


Figure 8 : thermogramme CTS complexe haute température du collagène de type I lyophilisé

**Annexes**

<b>Biopsies fraîches</b>	<b>%eau totale</b>	<b>%eau cristallisable</b>	<b>%eau non cristallisable</b>
1	59,8%	41,0%	18,8%
2	69,2%	39,8%	29,4%
3	65,0%	44,0%	21,0%
4	65,8%	42,1%	23,7%
5	66,3%	40,2%	26,1%
6	72,2%	42,4%	29,8%
7	66,0%	44,7%	21,3%
8	64,8%	41,1%	23,7%
9	65,4%	40,3%	25,1%
10	67,5%	41,2%	26,3%
<b>moyenne</b>	<b>66,2%±1,01%</b>	<b>41,7%±0,51%</b>	<b>24,5%±1,13%</b>
<b>Biopsies conservées</b>			
1	69,8%	39,2%	30,7%
2	70,8%	39,0%	31,8%
3	65,2%	42,8%	22,4%
4	68,6%	46,1%	22,5%
5	71,1%	49,7%	21,3%
6	64,3%	43,3%	21,0%
7	68,2%	43,3%	24,9%
8	63,0%	36,4%	26,6%
9	68,2%	45,1%	23,1%
10	66,3%	44,1%	22,1%
<b>moyenne</b>	<b>67,5%±0,79%</b>	<b>42,9%±1,22%</b>	<b>24,6%±1,22%</b>

*Tableau 7 : quantification des différents types d'eau des biopsies de peau abdominales fraîches et conservées*

Biopsies fraîches	Tonset (°C)	Tmax (°C)	Tmid (°C)	1/(1/T)m (°C)	ΔH masse sèche (J/g)
1	70,6	73,8	73,5	73,7	5,7
2	67,9	70,9	71,6	71,9	13,3
3	68,8	70,8	71,3	71,7	9,1
4	68,6	72,3	72,5	72,9	13,9
5	69,7	72,6	72,4	72,8	14,4
7	67,1	68,9	69,5	69,9	5,9
8	68,2	72,1	72,4	72,9	10,1
9	68,5	71,5	71,7	72,1	8,4
10	69,1	71,6	71,9	72,5	11,5
moyenne	68,7±0,3	71,6±0,5	71,86±0,36	72,26±0,31	10,2±1,1
<b>Biopsies conservées</b>					
1	68,5	72,7	73,2	73,3	15,4
2	70,7	72,8	72,2	73,3	16,8
3	67,3	71,1	71,8	71,7	12,7
4	70,7	72,1	72,9	72,4	8,5
5	67,2	69,4	70,3	70,0	
7	67,7	71,6	72,4	72,2	11,7
10	67,2	68,6	70,0	69,6	7,9
11	67,4	70,3	71,1	70,9	9,5
moyenne	68,3±0,5	71,1±0,5	71,73±0,31	71,69±0,32	11,8±1,3

*Tableau 8 : caractéristiques de l'endotherme de dénaturation des biopsies de peau abdominales fraîches et conservées*

Annexe C (Chapitre 3)

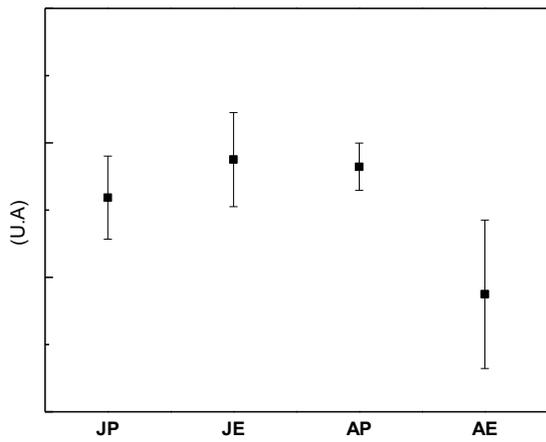


Figure 1 : aire [amide II]/aire [amide I/II] pour les quatre séries de biopsies

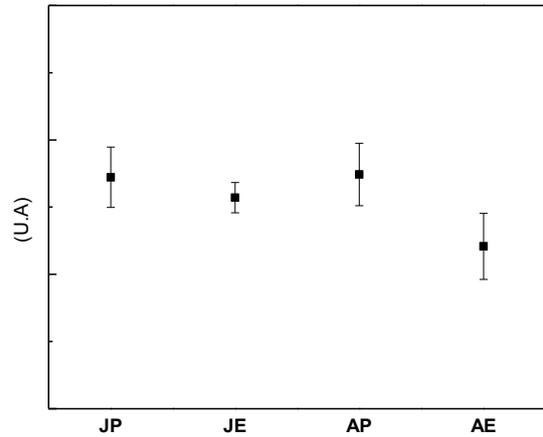


Figure 2 : aire [1482-1432 cm<sup>-1</sup>]/aire [1750-1000 cm<sup>-1</sup>] pour les quatre séries de biopsies

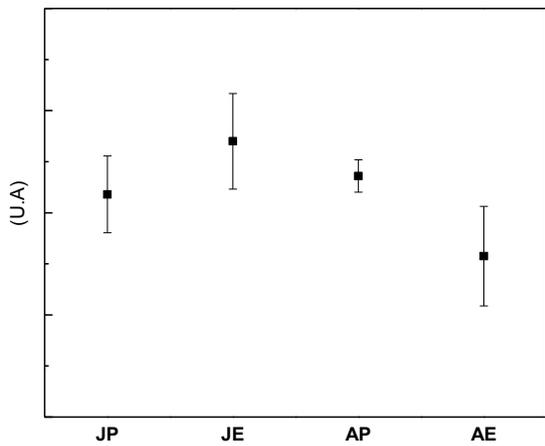


Figure 3 : aire [1357-1327 cm<sup>-1</sup>]/aire [amide I/II] pour les quatre séries de biopsies

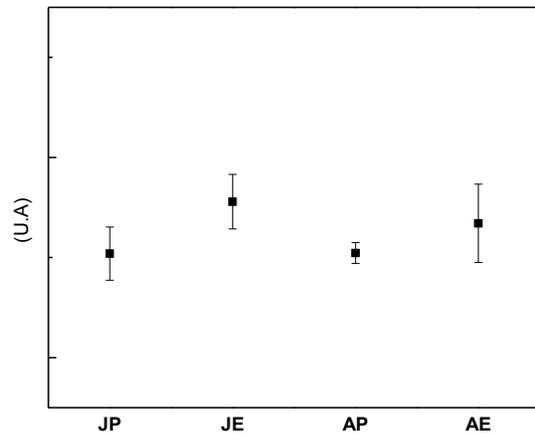


Figure 4 : aire [1357-1327 cm<sup>-1</sup>]/aire [amide II] pour les quatre séries de biopsies

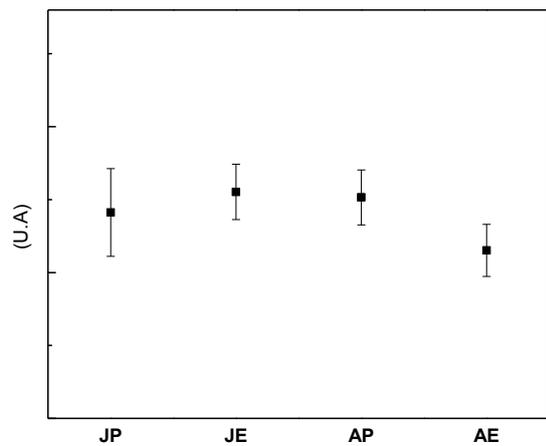


Figure 5 : aire [1271-1217 cm<sup>-1</sup>]/aire [1750-1000 cm<sup>-1</sup>] pour les quatre séries de biopsies

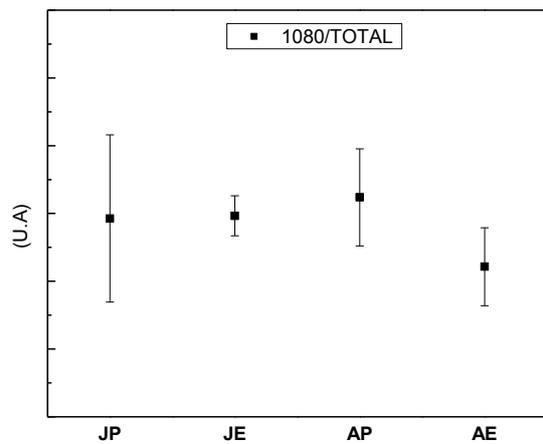


Figure 6 : aire [1090-1071 cm<sup>-1</sup>]/aire [1750-1000 cm<sup>-1</sup>] pour les quatre séries de biopsies

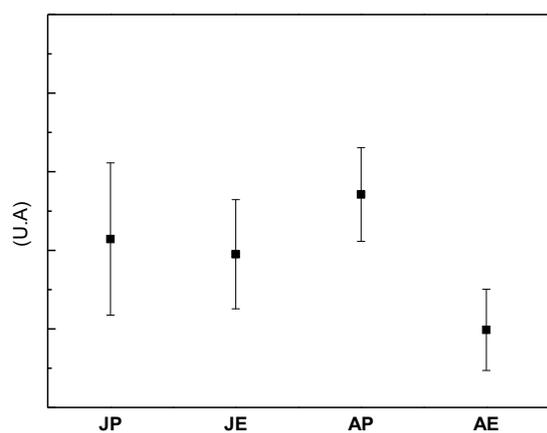


Figure 7 : aire [1042-1020  $\text{cm}^{-1}$ ]/aire [1750-1000  $\text{cm}^{-1}$ ] pour les quatre séries de biopsies

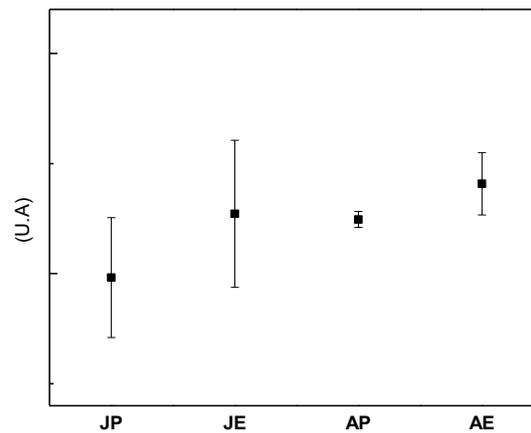


Figure 8 : aire [1042-1020  $\text{cm}^{-1}$ ]/aire [amide II] pour les quatre séries de biopsies

**Annexes**

<b>Biopsies Jeune-protégées (JP)</b>	<b>%eau totale</b>	<b>%eau cristallisable</b>	<b>%eau non cristallisable</b>
1	73,0%	51,4%	21,6%
2	71,4%	50,8%	20,6%
3	77,6%	48,1%	29,5%
4	73,1%	50,4%	22,8%
5	80,8%	56,1%	24,7%
moyenne	75,2%±1,7%	51,4%±1,3%	23,8%±1,6%
<b>Biopsies Jeune-exposées (JE)</b>			
1	69,1%	47,1%	22,0%
2	72,0%	46,4%	25,5%
3	68,1%	45,0%	23,1%
4	71,6%	48,0%	23,6%
5	78,3%	52,5%	25,8%
6	73,5%	51,5%	22,1%
moyenne	72,1%±1,5%	48,4%±1,2%	23,7%±0,7%
<b>Biopsies âgé-protégées (AP)</b>			
1	79,2%	56,3%	22,9%
2	75,6%	50,9%	24,7%
3	79,6%	53,4%	26,1%
4	76,4%	53,4%	23,0%
5	71,5%	48,7%	22,8%
6	78,2%	53,7%	24,5%
7	73,5%	52,3%	21,2%
moyenne	76,3%±1,1%	52,7%±0,9%	23,6%±0,6%
<b>Biopsies âgé-exposées (AE)</b>			
1	78,0%	59,4%	18,5%
2	77,9%	54,9%	23,0%
3	79,0%	57,8%	21,2%
4	75,0%	54,5%	20,5%
5	78,0%	54,4%	23,7%
6	75,0%	56,0%	19,0%
7	77,7%	56,6%	21,1%
moyenne	77,2%±0,6%	56,2%±0,7%	21,0%±0,7%

*Tableau 1 : quantification des différents types d'eau des quatre séries de biopsies*

**Annexes**

<b>Biopsies Jeune-protégées (JP)</b>	<b>Tonset (°C)</b>	<b>Tmax (°C)</b>	<b>Tmid (°C)</b>	<b>Tend (°C)</b>	<b>ΔH masse sèche (J/g)</b>
1	65,3	68,3	67,9	69,8	11,0
2	65,0	67,8	67,4	71,0	10,2
3	63,8	66,1	67,9	67,4	9,7
4	63,4	65,4	66,6	70,3	10,3
5	63,7	66,2	66,9	70,8	14,6
moyenne	64,2±0,4	66,7±0,5	67,3±0,3	69,9±0,6	11,2±0,9
<b>Biopsies Jeune-exposées (JE)</b>					
1	65,2	67,9	67,7	70,7	9,1
2	65,1	67,6	67,2	75,2	8,2
3	67,3	70,5	70,3	72,9	10,2
4	63,9	66,3			5,2
5	65,0	67,1	67,9	73,7	11,8
6	63,5	65,9	66,7	71,3	15,6
7	66,0	68,1			8,4
moyenne	65,1±0,5	67,6±0,6	68,0±0,6	72,7±0,8	9,8±1,2
<b>Biopsies âgé-protégées (AP)</b>					
1	65,3	66,7	66,9	72,0	11,0
2	64,1	66,4	66,7	72,0	13,0
3	65,9	67,4	67,8	72,8	13,5
4	64,9	67,1	67,3	72,3	17,3
5	65,1	67,9	67,9	71,5	14,1
6	64,7	66,2	68,3	73,4	7,8
7	65,7	67,3	67,3	72,2	9,3
moyenne	65,1±0,2	67,0±0,2	67,4±0,2	72,3±0,2	12,7±1,2
<b>Biopsies âgé-exposées (AE)</b>					
1	63,9	66,2	66,4	72,8	19,6
2	65,6	67,1			3,2
3	65,5	66,4	65,9	72,0	14,3
4	64,1	65,1	65,7	70,8	7,8
5	64,7	66,2	66,7	73,4	9,8
6	65,2	66,6	67,4	74,4	7,0
7	64,0	65,9	66,7	73,9	9,0
moyenne	64,7±0,3	66,2±0,2	66,5±0,3	72,9±0,5	10,1±2,0

*Tableau 2 : caractéristique endotherme de dénaturation des quatre séries de biopsies*

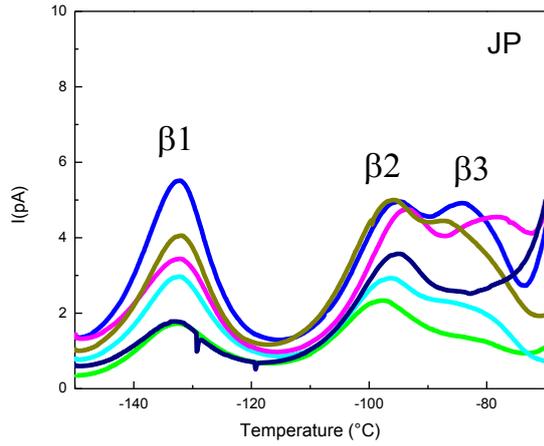


Figure 9 : thermogramme CTS global des biopsies de la série JP à l'état hydraté après polarisation à  $-20^{\circ}\text{C}$

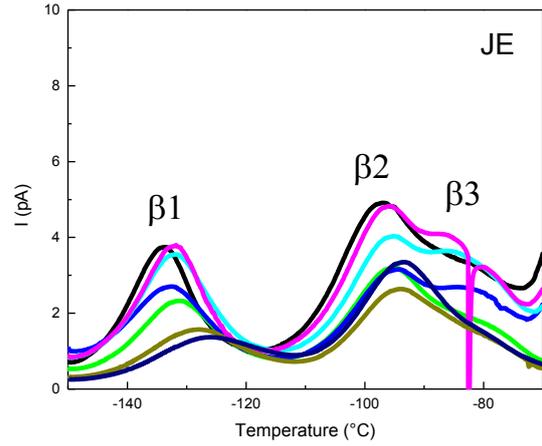


Figure 10 : thermogramme CTS global des biopsies de la série JE à l'état hydraté après polarisation à  $-20^{\circ}\text{C}$

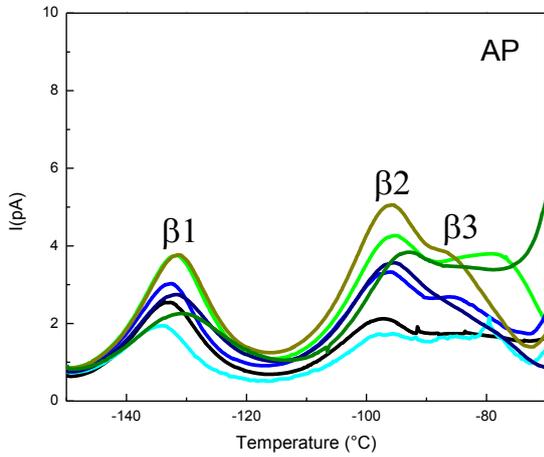


Figure 11 : thermogramme CTS global des biopsies de la série AP à l'état hydraté après polarisation à  $-20^{\circ}\text{C}$

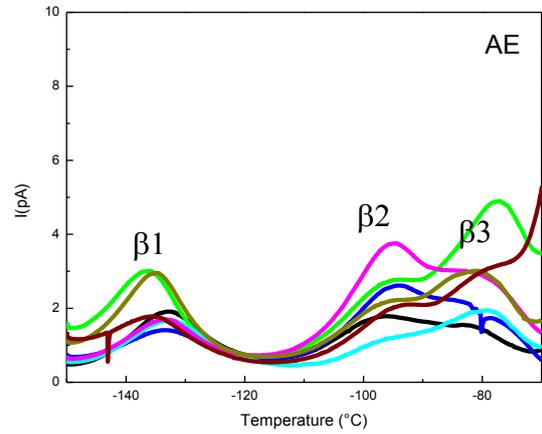


Figure 12 : thermogramme CTS global des biopsies de la série AE à l'état hydraté après polarisation à  $-20^{\circ}\text{C}$

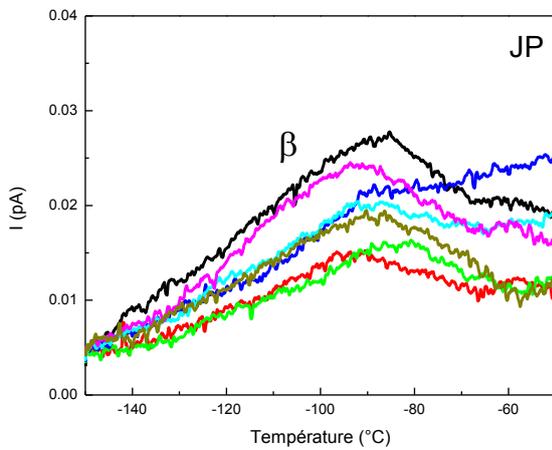


Figure 13 : thermogramme CTS global des biopsies de la série JP à l'état lyophilisé après polarisation à  $25^{\circ}\text{C}$

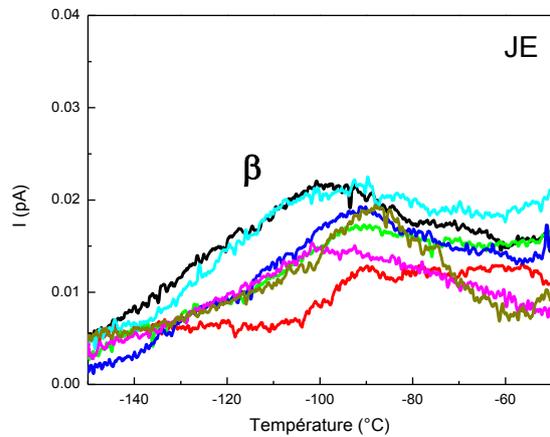


Figure 14 : thermogramme CTS global des biopsies de la série JE à l'état lyophilisé après polarisation à  $25^{\circ}\text{C}$

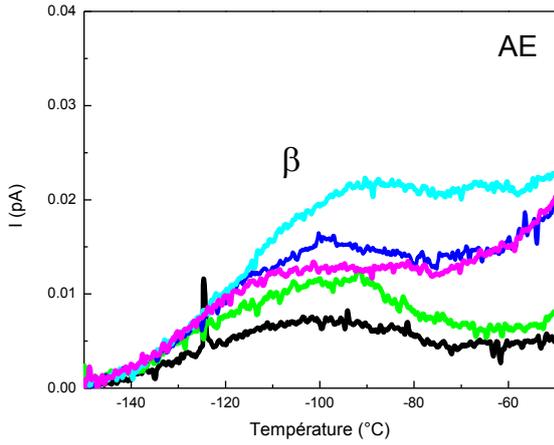


Figure 15 : thermogramme CTS global des biopsies de la série AP à l'état lyophilisé après polarisation à 25°C

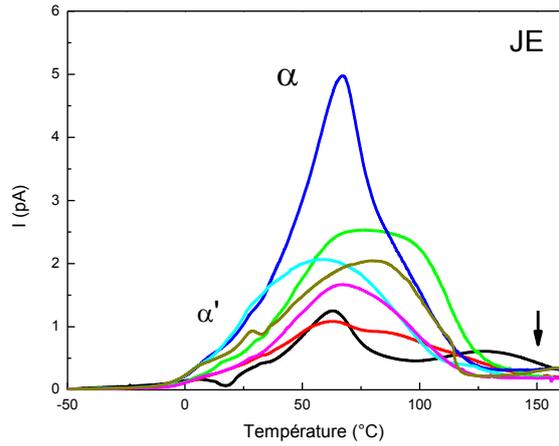


Figure 18 : thermogramme CTS global des biopsies de la série JE à l'état lyophilisé après polarisation à 150°C

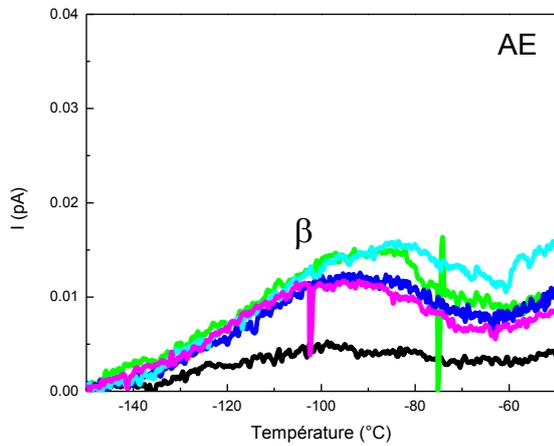


Figure 16 : thermogramme CTS global des biopsies de la série AE à l'état lyophilisé après polarisation à 25°C

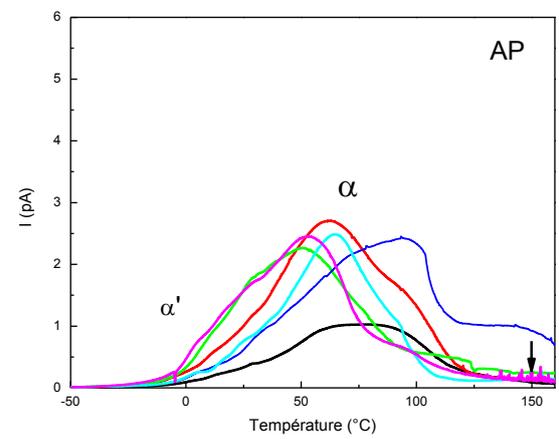


Figure 19 : thermogramme CTS global des biopsies de la série AP à l'état lyophilisé après polarisation à 150°C

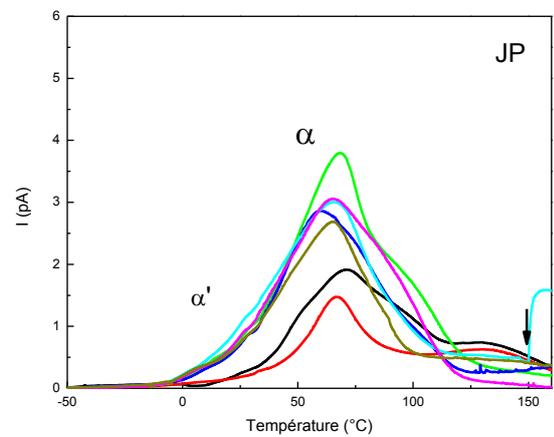


Figure 17 : thermogramme CTS global des biopsies de la série JP à l'état lyophilisé après polarisation à 150°C

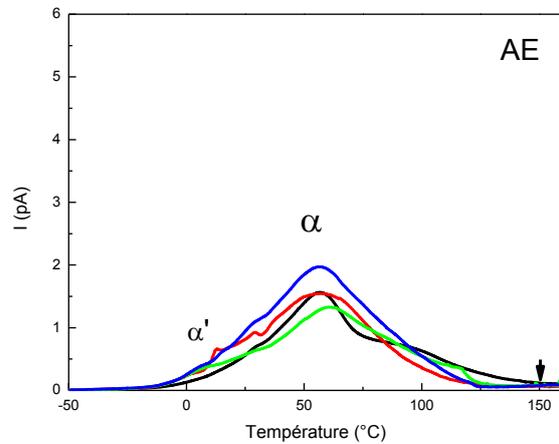


Figure 20 : thermogramme CTS global des biopsies de la série AE à l'état lyophilisé après polarisation à 150°C

## Annexe D (Chapitre 4)

Explants non exposés	%eau totale	%eau cristallisable	%eau non cristallisable	Dénaturation en matière sèche $\Delta H$ (J/g)	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>d</sub> (°C)
P001-Z00	70,3	49,1	21,2	12,7	69,8	72,7
P001-Z00b	69,7	50,8	18,9	13,3	72,5	73,9
P002-Z00	71,5	53,9	17,6	18,2	68,9	71,9
P002-Z00b	71,2	53,2	18	17,6	69,7	71,8
P003-Z00	69,4	51,2	18,2	14,1	72,3	73,4
P003-Z00b	72,9	57,1	15,8	20,2	70,2	72,4
moyenne	70,8±0,5	52,6±1,1	18,3±0,7	16,0±1,2	70,6±0,6	72,7±0,3

*Tableau 1 : hydratation et paramètres thermiques des explants non exposés*

Explants sous exposition UVs (1DEM)	%eau totale	%eau cristallisable	%eau non cristallisable	Dénaturation en matière sèche $\Delta H$ (J/g)	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>d</sub> (°C)
P001-Z01	68,1	49,1	19,0	18,4	72,5	73,4
P001-Z01b	71,0	52,0	19,0	13,8	70,0	72,0
P002-Z01	71,1	52,2	18,9	15,7	70,9	73,1
P003-Z01	72,4	51,7	20,7	14,3	72,3	74,7
P003-Z01b	69,5	53,9	15,6	17,9	67,7	71,1
moyenne	69,9±0,8	51,4±0,7	18,5±0,7	16,0±0,9	70,7±0,9	73,1±0,5

*Tableau 2 : hydratation et paramètres thermiques des explants exposés sous 1 DEM (Remarque:*

*P002-Z01b : la coupelle est mal scellée (non pris en compte dans la moyenne))*

Explants sous exposition UVs (2DEM)	%eau totale	%eau cristallisable	%eau non cristallisable	Dénaturation en matière sèche $\Delta H$ (J/g)	T <sub>onset</sub> (°C)	T <sub>d</sub> (°C)
P001-Z02	69,7	49,7	20,0	16,1	71,0	72,7
P001-Z02b	77,1	55,8	21,3	14,8	70,3	72,0
P002-Z02	65,4	47,2	18,2	9,4		79,8
P002-Z02b	67,5	50,1	17,4	15,5	68,6	71,1
P003-Z02	70,9	54,1	16,8	16,9	69,2	72,5
P003-Z02b	68,7	49,7	19,0	14,1	68,9	71,6
moyenne	69,9±1,6	51,1±1,3	18,8±0,7	14,5±1,1	69,6±0,5	73,3±1,3

*Tableau 3 : hydratation et paramètres thermiques des explants exposés sous 2 DEM*



---

## Thesis summary

Skin aging and cumulative exposure to UVs within a lifetime affects a number of actors in the extracellular matrix such as collagen, elastin, glycans and associated biomolecules (metalloproteinases and their inhibitors, hyaluronidases, etc). The concentration, structure and / or distribution, and the hydric organization are modified by this phenomenon. All these modifications result in a loss of function of the matrix and the clinical manifestations of aging.

The aim of this thesis, carried out in collaboration with the Skin Research Center of Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, is to analyze the changes in the dermis and the hydric organization within the matrix with age and under the effect of UVs to help the knowledge of skin alteration under these conditions. Given the different scales to be explored - from Angstrom to the micron - a combination of different techniques is necessary to reach the macromolecular dynamics via behavior laws.

Firstly, we validated the use of infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and thermostimulated Currents (TSC) techniques to analyze human cutaneous biopsies. These techniques were proven to be suitable to scan the dermis over a wide range of scales and to provide relevant information on the main macromolecules of the dermis and the different water structures.

Then we studied the evolution of thermal, dielectric and vibrational signatures of the dermis during chronological aging and photo-aging via a clinical study involving subjects from two age groups (20-30 years and over 60 years). Markers of intrinsic and extrinsic aging have been extracted from this work.

The evolution of these signatures was also studied in an *ex vivo* study on the effects of UV exposure of dermis, leading to a better understanding of the different mechanisms involved in chronological aging and photo-aging.

---

**AUTEUR :** Rong TANG

**TITRE :** Modifications moléculaires et organisationnelles du derme au cours des vieillissements intrinsèque et photo-induit

**DIRECTRICE DE THESE :** Dr Valérie SAMOUELLAN

---

## **RESUME**

Le vieillissement de la peau et l'exposition cumulative aux UVs au sein d'une vie affecte un certain nombre d'acteurs de la matrice extracellulaire, majoritairement le collagène, l'élastine, les glycanes et les biomolécules qui leurs sont associés (métalloprotéinases et leurs inhibiteurs, hyaluronidases, etc...) qui peuvent être modifiés en terme de concentration, de structure et/ou de répartition. L'organisation hydrique est également perturbée lors de ce phénomène et l'ensemble de ces modifications aboutit à une perte de fonction de la matrice et à l'apparition de manifestations cliniques du vieillissement.

L'objectif de ce travail de thèse effectuée en partenariat avec le Centre de Recherche sur la peau (Pierre Fabre Dermo-Cosmétique) est d'analyser les modifications du derme et de l'organisation hydrique au sein de la matrice, avec l'âge et sous l'effet des UVs, de façon à mieux comprendre les altérations de la peau dans ces conditions. Compte tenu des différentes échelles à explorer - de l'Angstrom au micron -, la combinaison d'un ensemble de techniques est nécessaire pour disposer de lois de comportement de dynamique macromoléculaire qui permettent l'interprétation des résultats.

Nous avons tout d'abord validé l'utilisation de la spectroscopie infra-rouge (IRTF), de l'analyse calorimétrique diatherme (ACD) et de la technique des courants thermostimulés (CTS) pour analyser des biopsies cutanées humaines. Ces techniques se sont révélées adaptées pour sonder le derme sur une large gamme d'échelle, et pour apporter des informations pertinentes sur les principales macromolécules du derme et sur son organisation hydrique.

Nous avons ensuite suivi l'évolution des réponses thermiques, diélectriques et vibrationnelles du derme au cours du vieillissement chronologique et du photo-vieillissement via une étude clinique portant sur des sujets de deux groupes d'âge (20-30 ans et supérieur à 60 ans). Ce travail a permis d'extraire des marqueurs du vieillissement intrinsèque et extrinsèque.

L'évolution de ces réponses a aussi été suivie dans une étude *ex vivo* portant sur les effets de l'exposition du derme aux UVs, afin de contribuer à la compréhension des différents mécanismes mis en jeu lors du vieillissement chronologique et du photo-vieillissement.

---

**MOTS-CLES :** collagène dénaturation, peau humaine, vieillissement cutané, organisation hydrique