

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Laboratoire I3MTO

THÈSE présentée par : Eugénie MUSSARD

Soutenue le : **11 Décembre 2019**
Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Andrographis paniculata et ses diterpènes contre le stress oxydant et l'inflammation dans le vieillissement cutané

THÈSE dirigée par :

Hechmi TOUMI
Sabine BERTEINA-RABOIN

Professeur, Université d'université
Professeur, Université d'université

RAPPORTEURS :

Patrick BREST
Morad BENSIDHOUM

Chargé de recherche, Université de Nice
Chargé de recherche, Université Paris Diderot

JURY :

Hechmi TOUMI
Sabine BERTEINA-RABOIN
Patrick BREST
Morad BENSIDHOUM
Marie-Claude VIAUD-MASSUARD
Romain DEBRET

Professeur, Université d'université
Professeur, Université d'université
Chargé de recherche, Université de Nice
Chargé de recherche, Université Paris Diderot
Professeur, Université de Tours, Présidente du jury
Chargé de recherche, Université Claude Bernard Lyon

INVITES :

Stéphane PALLU
Annabelle CESARO

Maître de conférences, Université d'Orléans
Maître de conférences, Université d'Orléans

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie sincèrement les Docteurs Patrick Brest et Morad Bensidhoum du temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce manuscrit. Je remercie chaleureusement le professeur Marie-Claude Viaud-Massuard et le Docteur Romain Debret de leur présence en qualité d'examineur au sein de ce jury. Je remercie également le Docteur Stéphane Pallu et le Docteur Annabelle Cesaro de leur participation en tant que jury invité.

Je remercie le Docteur Eric Lespessailles de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. J'exprime également toute ma reconnaissance aux Professeurs Hechmi Toumi et Sabine Berteina-Raboin, ainsi qu'au Docteur Annabelle Cesaro de m'avoir donnée l'opportunité de réaliser une thèse au laboratoire I3MTO, pour leur aide et leur soutien tout au long de ces trois années.

Je remercie chaleureusement Mme Brigitte Legrain, directrice du laboratoire Novaxia et partenaire industriel du projet, pour ses discussions enrichissantes lors des réunions. J'exprime également toute ma reconnaissance à Stéphane Cordier, Simona Mancini et Philippe Ung pour leur implication dans le projet PeauMaths.

Je remercie Cosmétosciences et la région Centre Val de Loire d'avoir financé ma thèse. Je remercie très chaleureusement Emmanuelle Percheron pour son soutien pendant ces trois ans, pour sa sympathie et sa bonne humeur.

Je remercie très chaleureusement les membres du laboratoire avec qui j'ai pu travailler au cours de ces années : Eric Dolleans, Solène Prochasson et Fouzia Yajid. Une notion spéciale pour Jenny Leonard, je te remercie chaleureusement pour ton aide et ta disponibilité. Une pensée également à tous les stagiaires venus à l'I3MTO : Dave, Lauranne, Myriam, Laura, Raphael, Pauline et Eléonore. J'exprime également toute ma reconnaissance aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer pendant ma thèse : Sundry Jousselin et Wendy Auchere. Je remercie ma binôme Hélène Ozanne pour tous ces bons moments passés et son soutien. Cette

thèse n'aurait pas été la même sans toi, je pars avec des souvenirs inoubliables entre tes chansons, tes blagues et ta bonne humeur communicatrice !

Je remercie très chaleureusement les membres de l'équipe GlycoBiochimie. Je tiens à remercier en particulier, Richard Daniellou, pour sa sympathie et sa bonne humeur quotidienne. Un grand merci à Pierre Lafite pour son aide et ses précieux conseils. Je remercie Philippe Moreau et Arnaud Pâris pour leur gentillesse. Et encore merci Arnaud pour ton aide lors des manip. Mes remerciements vont aussi à tous les stagiaires de Glyco : Yasmina et Émilie, Hyuna, Pauline, Ferdinand, Alexis et Alice. Merci Yasmina d'avoir toujours été là pour moi. Je remercie la nouvelle recrue Benjamin (Damien) Bretagne pour sa sympathie et sa bonne humeur. Je tiens à remercier tout particulièrement Jihen Ati et Mateja Senicar. Mateja, tu auras été ma voisine préférée, les voyages entre la rue de Bourgogne et l'Université auront été des plus sympathiques, à discuter et à esquiver les mauvais conducteurs ! Une vraie copilote... 😊

Je tiens à remercier l'équipe de GlycoDiag, son directeur Ludovic Landemarre et son équipe : Yasmina Traoré, Benoît Roubinet, Federica Vena et Camille Beaugendre. Je n'oublie pas les anciens de GlycoDiag : Blanka Didak, Mélanie Lecerf, Alexiane Decout et leur stagiaire Nathanael.

Une pensée pour Thomas Degrange, je n'oublie pas notre projet d'élevage de chèvres, notre partenaire Mateja a trouvé le slogan : « Oh My Goat ! ». Je remercie Alexis Carreras de sa gentillesse et sa bonne humeur. Merci à ma princesse des neiges Julien Gucinski d'avoir égayé ces derniers mois. Merci à Alexis et Julien pour la relecture du manuscrit. (Une pensée à Norman, Sushi, Elsa et Polochon !)

Je remercie tous mes étudiants Edifice : Anna, Lucie, Jolan, Sophia, Thomas et Zakarya, ainsi que leur professeur Mme Laetitia Bideau-Sorita pour leur sympathie et les bons moments partagés ensemble.

Je tiens à remercier tous mes anciens collègues de l'UMR 8126 à l'Institut Gustave Roussy. J'ai passé 3 années exceptionnelles à vos côtés. Vous m'avez accordée votre confiance lors de ma licence professionnelle en apprentissage, puis mon poste d'assistant ingénieur et enfin

mon stage de master 1. Vous m'avez donnée l'envie de continuer mes études et le goût des sciences. Je remercie tout particulièrement Charles-Henry Gattolliat d'avoir été mon Maître Jedi.

Je remercie également tous mes amis, en commençant par ma colocataire et amie Delphine Mazé qui m'a supportée depuis le master 2, et de m'avoir régaler avec ses petits plats faits maison. Je te remercie énormément pour ton aide et les corrections que tu as apportés au manuscrit. Je remercie également Florent Algret qui a rejoint la colocation en cours de route. Merci à vous deux pour ces bons moments partagés, les jeux de société, les soirées Plus belle la vie, les escapes Games, les sorties...

Pour finir, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude envers ma famille. Merci d'avoir cru en moi en toutes circonstances. Je remercie tout particulièrement mes parents de m'avoir soutenue, ma sœur jumelle Mélanie pour son amour et son écoute, et mon petit frère Maxime pour sa bonne humeur et son humour. Je remercie également de tout cœur mes grands-parents de leur amour inconditionnel. Je remercie énormément mon chéri, Geoffroy, pour son aide, son écoute et surtout son amour.

Table des matières

Index des figures.....	I
Liste des abréviations	III
Contributions scientifiques.....	V
Monitorat.....	VII
Préface.....	IX

Etude bibliographie	3
---------------------------	---

1. Les généralités.....	3
-------------------------	---

1.1. Caractéristiques de la peau humaine.....	3
---	---

1.1.1. Structure générale de la peau	3
--	---

1.1.2. Fonctions biologiques de la peau	8
---	---

1.2. Introduction au vieillissement cutané.....	13
---	----

1.2.1. Diminution de la prolifération des cellules	15
--	----

1.2.2. Détérioration des constituants cellulaires	17
---	----

1.2.3. Affaiblissement des systèmes de protection et de réparation	18
--	----

1.2.4. Diminution hormonale	24
-----------------------------------	----

1.3. Vieillissement intrinsèque	24
---------------------------------------	----

1.3.1. Le vieillissement intrinsèque de l'épiderme.....	24
---	----

1.3.2. La jonction dermo-épidermique.....	25
---	----

1.3.3. Le vieillissement intrinsèque du derme	26
---	----

1.4. Vieillissement extrinsèque	28
---------------------------------------	----

1.4.1. Analyse de « l'exposome »	29
--	----

1.4.2. Manifestations du vieillissement extrinsèque.....	33
--	----

1.5.	Bilan des deux mécanismes	34
2.	Les mécanismes biologiques du vieillissement	35
2.1.	Les processus du vieillissement dans l'épiderme	35
2.2.	Les processus du vieillissement dans le derme.....	36
2.2.1.	Changements au niveau du collagène.....	37
2.2.2.	Augmentation des niveaux des métalloprotéinases matricielles (MMPs).....	38
2.2.3.	Voie de signalisation TGF- β au cours du vieillissement	39
2.2.4.	Interaction entre les fibroblastes et la MEC.....	40
2.2.5.	Modifications des autres composants de la MEC	41
3.	Stress oxydant dans le vieillissement de la peau humaine	47
3.1.	La production d'ERO dans la peau	48
3.1.1.	Production d'ERO par les mitochondries	48
3.1.2.	Production d'ERO par les peroxysomes	49
3.1.3.	Production d'ERO dans le réticulum endoplasmique.....	50
3.1.4.	Production d'ERO dans les membranes	50
3.1.5.	Production d'ERO dans le cytosol.....	51
3.2.	Les effets néfastes du soleil sur la peau.....	52
3.2.1.	La pénétration des UV dans la peau.....	53
3.2.2.	Les dommages directs liés aux UV.....	54
3.2.3.	Les dommages indirects liés aux UV.....	57
3.2.4.	Dommages au tissu conjonctif de la peau causés par les UV.....	60
3.3.	Les cytokines induites par les ERO	62
3.3.1.	TNF- α	62
3.3.2.	IL-6	63
3.3.2.	IL-8	63

3.4.	Les capacités antioxydantes de la peau	63
3.4.1.	Les antioxydants	64
3.4.2.	Nrf2, le régulateur de la signalisation redox	66
4.	L'andrographolide, une biomolécule anti-âge ?	69
Mussard, E., Cesaro, A., Lespessailles, E., Legrain, B., Berteina-Raboin, S., and Toumi, H. (2019). Andrographolide, a Natural Antioxidant: An Update. <i>Antioxidants</i> (Basel) 8. (Revue publiée dans le journal <i>Antioxidants</i>)		
	Objectifs du travail de la thèse	103
	Article 1.....	107
Mussard, E., Toumi, H., Legrain, B., Jousselin, S., Yajid, F., Lespessailles, E., Berteina-Raboin, S., and Cesaro, A. <i>Andrographis paniculata</i> and its bioactive diterpenoids protect fibroblasts against inflammation and oxidative stress. (Article en soumission)		
	Article 2.....	139
Mussard, E., Toumi, H., Legrain, B., Jousselin, S., Yajid, F., Lespessailles, E., Berteina-Raboin, S., and Cesaro, A. <i>Andrographis paniculata</i> and its bioactive diterpenoids protect keratinocytes against inflammation and oxidative stress. (Article en cours de préparation)		
	Discussion générale	169
	Conclusion	188
	Perspectives.....	190
	Références	195

Index des figures

Figure 1 : Photographie de la plante <i>Andrographis paniculata</i>	X
Figure 2 : Formule chimique de l'andrographolide	XI
Figure 3 : Formules chimiques de (A) la neoandrographolide, (B) la 14-deoxyandrographolide et (C) la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide	XII
Figure 4 : Ultrastructure simplifiée de la peau.	4
Figure 5 : Structure de l'épiderme.	5
Figure 6 : Composants cellulaires et extracellulaires de la peau jeune.	8
Figure 7 : Profils continus de la perte en eau transdermiques et de la fonction de barrière par rapports aux différents groupes ethniques.	12
Figure 8 : Photographie.	13
Figure 9 : Production d'œstrogène, rapport collagène/élastine et profils d'élasticité cutanée chez les femmes en fonction de l'âge.	14
Figure 10 : Système de réparation de l'ADN.	20
Figure 11 : Topographie de l'avant-bras en vue palmaire.	25
Figure 12 : Organisation de la jonction dermo-épidermique.	26
Figure 13 : Réduction de la taille des fibroblastes.	27
Figure 14 : Les principaux facteurs extérieurs.	30
Figure 15 : Mécanismes du vieillissement cutané intrinsèque et extrinsèque.	35
Figure 16 : Organisation des fibrilles de collagène.	37

Figure 17 : Voie de signalisation TGF- β pour la production de collagène par les fibroblastes cutanés.	40
Figure 18 : Morphologie des fibroblastes.	41
Figure 19 : Remodelage des composants de la MEC dans le vieillissement.	45
Figure 20 : La production d'ERO et leur système de détoxification.	65
Figure 21 : Photographie de la plante <i>Andrographis paniculata</i> .	70
Figure 22 : Famille chimique dont fait partie l'andrographolide et ses dérivés.	71
Figure 23 : Extrait du livre « Les plantes et leurs vertus - un livre de chevet pour les malades - un guide pour ceux qui les soignent », du Docteur L. Cafford.	171
Figure 24 : Schéma bilan de l'étude des molécules et de l'extrait <i>d'Andrographis paniculata</i> sur le principal type cellulaire du derme.	179
Figure 25 : Schéma bilan de l'étude des molécules et de l'extrait <i>d'Andrographis paniculata</i> sur le principal type cellulaire de l'épiderme.	184

Liste des abréviations

A

ADNmt: ADN mitochondrial
ADP: Adénosine diphosphate
AGE: *Advanced glycation end-products*
AP-1: *Activator protein 1*
ARE: *Antioxidant response element*
ATP: Adénosine triphosphate

B

BER: *Base excision repair*

C

CAT: Catalase

D

DCF: 2',7'-dichlorofluorescéine
DCFH-DA: 2',7'-dichlorofluorescine diacétate
DGR: *Double Glycine Repeat*

E

EGF: *Epidermal growth factor*
EpRE: *Electrophilic Response Element*
ERO: Espèce réactive de l'oxygène

G

G6PDH: Glucose-6-phosphate deshydrogénase
GAG: Glycosaminoglycanes
GCL: *Glutamate cysteine ligase*
GG-NER: *Global genome NER*

GPx: *Glutathion peroxydase*
GR: *Glutathion reductase*
GSH: Glutathion réduit
GSSG: Glutathion oxydé
GST: *Glutathion S-transferase*

H

HA: *Hyaluronic acid*
HO-1: *Heme oxydase-1*
HSP: *Heat shock proteins*

I

IL-6: Interleukine-6
IL-8: Interleukine-6
IVR: *Intervening region*

M

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*
MDA: Malondialdéhyde
MEC: Matrice extracellulaire
MMP: *Matrix metalloproteinases*

N

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NER: *Nucleotide excision repair*
NF-kB: *Nuclear factor-kappa B*
NOX: *NADPH oxydase*
NQO1: *NAD(P)H deshydrogenase [quinone] 1*
Nrf2: *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*

P

PG: Protéoglycanes

S

SOD: Superoxyde dismutase

SPRR: *Small proline rich proteins*

T

TC-NER: *Transcription coupled NER*

TGF- α : *Transforming growth factor-alpha*

TGF- β : *Transforming growth factor-beta*

TIMP: *Tissue inhibitors of matrix metalloprotease*

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*

TRXR: *Thioredoxin reductase*

U

UV: Ultraviolets

Γ

γ -GCS: *Gamma-glutamylcysteine synthetase*

Contributions scientifiques

PUBLICATIONS

Mussard, E., Toumi, H., Legrain, B., Jousselin, S., Yajid, F., Lespessailles, E., Berteina-Raboin, S., and Cesaro, A. *Andrographis paniculata* and its bioactive diterpenoids protect fibroblasts against inflammation and oxidative stress.

(Article en soumission dans le journal *Advances in Integrative Medicine*)

Mussard, E., Toumi, H., Legrain, B., Jousselin, S., Yajid, F., Lespessailles, E., Berteina-Raboin, S., and Cesaro, A. *Andrographis paniculata* and its bioactive diterpenoids protect keratinocytes against inflammation and oxidative stress.

(Article en cours de préparation)

Mussard, E., Cesaro, A., Lespessailles, E., Legrain, B., Berteina-Raboin, S., and Toumi, H. (2019). Andrographolide, a Natural Antioxidant: An Update. *Antioxidants* (Basel) 8.

(Revue publiée dans le journal *Antioxidants*)

COMMUNICATION ORALE

Mussard, E. Effects of andrographolide or methanolic extract of *Andrographis paniculata* on cutaneous cells. International Conference on Skin Care & Aging, Montreal, CANADA, April 2019.

COMMUNICATION PAR POSTER

Mussard, E., Toumi, H., Legrain, B., Jousselin, S., Yajid, F., Lespessailles, E., Berteina-Raboin, S., and Cesaro, A. Oxidative stress and Inflammation in cutaneous cells: effects of *Andrographis paniculata* and its bioactive diterpenoids. International Conference on Oxidative Stress reduction, Redox Homeostasis & Antioxidants (Paris Redox), Paris, FRANCE, June 2019.

Monitorat

Licence STAPS 1^{ère} année

UE 103 Anatomie et biomécanique appliquées à la motricité

- TD anatomie du poignet et de la main, novembre/décembre 2018.

Licence STAPS 2^{ème} année

UE 306 Physiologie et anatomie du tissu osseux et cartilagineux

- TD Tissu osseux et cartilagineux, novembre 2017

UE 302 Croissance, développement et socialisation motrice

- TD Anatomie du poignet et de la main, novembre/décembre 2018.

Master STAPS 1^{ère} année (recherche)

UE 9 Analyse biologique, histologique et biochimique du système musculaire, articulaire et osseux

- TD Analyse d'articles, novembre 2017.

UE.3 Fonction musculaire et ostéoarticulaire (SMSP2R)

- CM Physiologie du muscle, septembre, octobre 2018

Master STAPS 2^{ème} année (professionnel)

UE.24 Fonction musculaire, récupération et réathlétisation

- CM Physiologie du muscle, décembre 2017

Master STAPS 2^{ème} année (recherche)

UE 25 Imagerie des tissus

- TP Les bases de culture cellulaire, novembre 2017

Programme EDIFICE

Encadrement de 5 lycéens pendant 2 ans dans le cadre de leur examen de TPE.

Préface

Avec l'augmentation de l'espérance de vie, le nombre de personnes âgées s'est grandement accentué lors des dernières décennies. La peau étant l'interface visible entre l'individu et la société, l'industrie cosmétique s'est fortement intensifiée, amenant ainsi au développement de la recherche sur la biologie du vieillissement. Plusieurs ingrédients actifs ont été identifiés comme des éléments régulateurs de l'homéostasie cutanée, avec des applications cosmétiques et/ou dermatologiques potentielles. Parmi ces ingrédients, les composés naturels sont souvent retrouvés dans les formulations cosmétiques. En effet, le marché des produits cosmétiques naturels est l'un des plus dynamiques au monde et répond à une demande croissante des consommateurs. Compte tenu de la diversité des plantes et des composés naturels disponibles, ce domaine d'étude est en pleine expansion. La plupart des produits phytochimiques retrouvés dans les cosmétiques appartiennent aux catégories des flavonoïdes, polyphénols, caroténoïdes et coumarines. Parmi les plantes médicinales couramment utilisées, on peut citer le curcuma, les thés, le chardon-Marie et l'harpagophytum. Il existe également des produits phytochimiques purs tels que la quercétine, l'hespéridine, la curcumine, le gallate d'épigallocatechine, la silybine et l'harpagoside. Malgré l'utilisation répandue des plantes dans les produits cosmétiques actuels, il existe peu de données scientifiques de leur mécanisme d'action.

Les cosmétiques à base de plantes sont formulés à partir de différents ingrédients cosmétiques qui forment la base dans laquelle un ou plusieurs actifs agissent sur les affections cutanées. L'industrie cosmétique est donc à la recherche de nouveaux actifs ciblant des voies biologiques impliquées dans le vieillissement cutané. Nous pouvons citer quelques composés naturels actuellement utilisés dans les crèmes cosmétiques luttant contre le vieillissement (Mukherjee et al., 2011). Par exemple, il a été démontré que l'aloïne A et l'aloïne B inhibaient la collagénase et les métalloprotéinases (Barrantes and Guinea, 2003). La berbérine inhibe l'expression et l'activité de la MMP-9 (Kim et al., 2008). Elle joue également un rôle dans le contrôle de l'inflammation en supprimant l'expression de l'IL-6 via les voies de signalisation ERK et AP-1 (Kim et al., 2008). Des études ont montré que la berbérine et le xanthorrhizol

régulaient l'expression de MMP-1 et du procollagène de type I dans les fibroblastes dermiques (Kim and Chung, 2008; Oh et al., 2009). Les polyphénols présents dans le thé vert (la catéchine, l'épigallocatechine et l'épigallocatechine-3-gallate) protègent la peau des effets néfastes de l'inflammation induite par les rayons du soleil, le stress oxydant et les dommages à l'ADN (Nichols and Katiyar, 2010). Dans ce contexte, proposer de nouveaux actifs naturels donne un intérêt pour l'industrie cosmétique afin de développer des composés innovants destinés au soin de la peau.



Figure 1 : Photographie de la plante *Andrographis paniculata* (<https://www.phytomania.com/andrographis.htm>)

La plante *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Wall. ex Nees (Figure 1) est une plante asiatique utilisée traditionnellement pour traiter les infections respiratoires et la fièvre (Okhwarobo et al., 2014). Son principal composé actif est un diterpène labdane appelé andrographolide (Figure 2). Ce dernier présente des propriétés biologiques intéressantes pour la cosmétique anti-âge. En effet, de nombreuses études ont révélé des effets antioxydants et anti-inflammatoires de l'andrographolide (Tan et al., 2017). Dans un contexte de vieillissement cutané, une seule étude à ce jour a été publiée sur un modèle murin exposé aux UV

(Ultraviolets) (Zhan et al., 2016). Il s'agissait d'un traitement avec un analogue structurel, l'andrographolide sodium bisulfate. Pour la première fois, l'effet protecteur de l'andrographolide sur le photovieillissement de la peau a été évalué. Les mécanismes de cette protection impliquaient principalement une réduction de l'expression des métalloprotéases matricielles (MMP, de l'anglais *matrix metalloproteinases*), une augmentation des activités des enzymes antioxydantes et une inhibition de la production excessive des cytokines par irradiation UV. Par conséquent, l'étude *in vitro* de ces mécanismes sur différents types cellulaires constitutifs de la peau permettrait de mieux comprendre l'activité anti-âge de l'andrographolide.

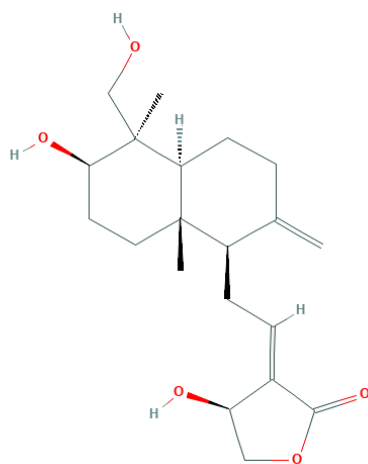


Figure 2 : Formule chimique de l'andrographolide (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Le travail de thèse confié vise à étudier l'effet contre le vieillissement cutané de molécules et d'un extrait provenant d'*Andrographis paniculata*. Les molécules choisies sont l'andrographolide et certains de ses dérivés, dont notamment la neoandrographolide, 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (Figure 3). Ces molécules sont présentes en grande concentration dans les feuilles. C'est pourquoi, un extrait des feuilles obtenu par un procédé d'extraction au méthanol a également été utilisé.

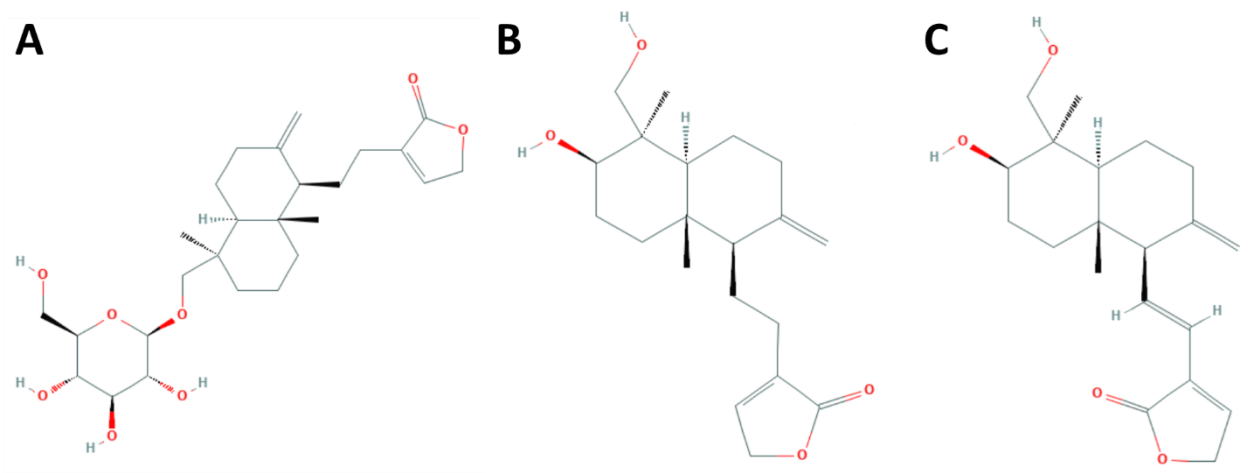


Figure 3 : Formules chimiques de (A) la neoandrographolide, (B) la 14-deoxyandrographolide et (C) la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Ce travail de thèse s’articule en trois chapitres :

- Une étude bibliographique comportant différents chapitres sur (1) quelques généralités de la physiologie, de l’anatomie et du vieillissement de la peau, (2) des détails sur les processus biologiques du vieillissement cutané, (3) le rôle du stress oxydant dans ces processus et (4) le potentiel de l’andrographolide comme antioxydant naturel. Ce dernier point est présenté sous forme d’une revue de littérature publiée dans le journal *Antioxidants*.

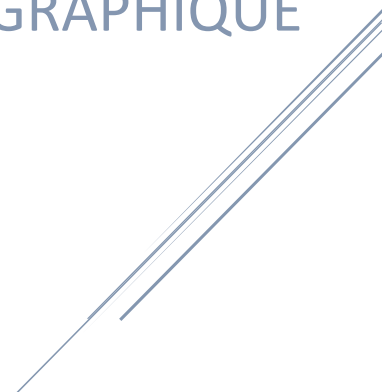
A la suite de cet état de l’art, les principaux résultats de la thèse sont exposés en deux parties constituées de publications en soumission ou en préparation. Deux modèles cellulaires de fibroblastes cutanés humains et de kératinocytes humains m’ont servi à étudier le stress oxydant et l’inflammation dans un contexte de vieillissement cutané.

- La première partie concerne l’évaluation des effets anti-âges d’un extrait ou de certains diterpènes lactone d’*Andrographis paniculata* sur la culture primaire de fibroblastes dermiques humains. Ces résultats sont rassemblés dans un article soumis dans le journal *Advances in Integrative Medicine*.

- La seconde partie quant à elle, regroupe les données obtenues sur une lignée cellulaire de kératinocytes selon le même schéma expérimental de la première partie. Ces résultats sont présentés sous forme d'un article en cours de préparation.

Enfin, les travaux sont discutés dans le contexte global de l'utilisation de l'*Andrographis paniculata* comme ressource de principes actifs anti-âge, et les perspectives pour la suite du projet sont décrites.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



Etude bibliographique

1. Les généralités

1.1. Caractéristiques de la peau humaine

La peau humaine constitue le revêtement externe du corps. Il s'agit du plus grand organe représentant environ 15 % du poids total chez l'adulte. Son épaisseur totale varie entre 1,5 et 4 mm selon les régions du corps (Branchet et al., 1990; Kanitakis, 2002). Par exemple, l'épiderme (une des couches de la peau) de la paupière mesure moins de 0,1 mm tandis que celui de la plante des pieds est le plus épais mesurant 1,5 mm environ. Le derme est plus épais au niveau du dos, où il est 30 à 40 fois plus épais que l'épiderme sus-jacent (Kolarsick et al., 2011).

1.1.1. Structure générale de la peau

La peau et ses structures dérivées (ses annexes) forment le système tégumentaire. Cet organe complexe est disposé en couches successives, dont les éléments constitutifs ont une structure et une organisation bien définie. Sa composition est définie par trois couches, de la plus externe à la plus interne : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Jia and Nash, 2015; Lephart, 2016; Madison, 2003; Martini et al., 2004). La peau est également traversée par des annexes dont les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares (Tobin, 2017). La Figure 4 illustre les différentes couches de la peau ainsi que ses annexes.

Structure de la peau

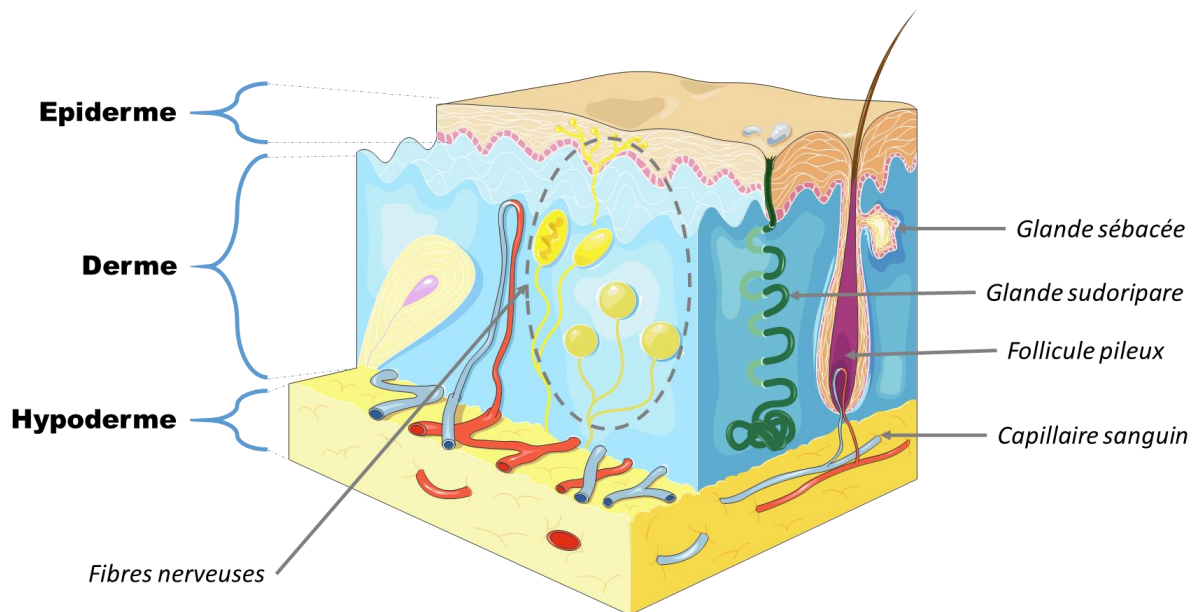


Figure 4 : Ultrastructure simplifiée de la peau. La figure a été adaptée et modifiée de Servier Art : <https://smart.servier.com>

L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. Il est formé d'un tissu épithélial stratifié squameux pavimenteux kératinisé et non vascularisé (Kolarsick et al., 2011). « Épithélial stratifié » car ses cellules sont étroitement juxtaposées, sans interposition de fibre ou de substance fondamentale et ceci sur plusieurs couches. « Pavimenteux » car ses cellules superficielles sont plates. Et « kératinisé » car ses cellules synthétisent de grande quantité de kératine indispensable à la fonction de barrière cutanée.

L'épiderme est composé de quatre ou cinq couches distinctes selon l'épaisseur de la peau. Pour rappel, l'épiderme est composé des couches suivantes, de l'intérieur de l'organisme à l'extérieur : le *stratum basal*, le *stratum spinosum*, le *stratum granulosum*, le *stratum lucidum* (dans la paume des mains et la plante des pieds), et le *stratum corneum*. Le *stratum corneum* (couche cornée) est lui-même constitué de deux couches distinctes :

le *stratum compactum* et le *stratum disjunctum*. L'épaisseur de l'épiderme varie de 50 μm à 1 mm en fonction de la localisation anatomique, avec une moyenne de 100 μm (Kanitakis, 2002). L'épiderme n'est pas traversé par des vaisseaux sanguins. Il est donc alimenté par diffusion depuis le derme (McLafferty et al., 2012). Il contient en revanche de nombreuses terminaisons nerveuses (Reilly et al., 1997). La Figure 5 représente les principales couches de l'épiderme ainsi que les cellules qui la compose.

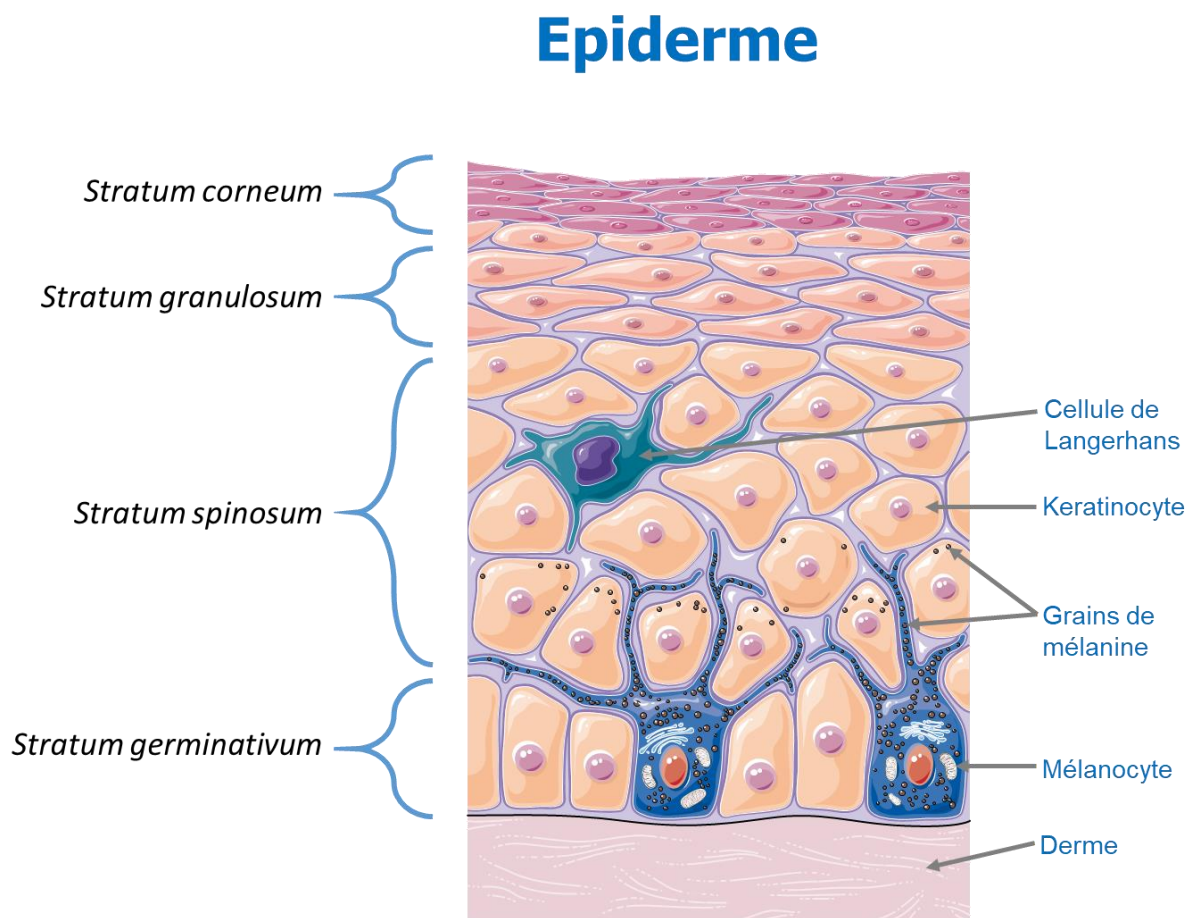


Figure 5 : Structure de l'épiderme. La figure a été créée à l'aide de Servier Art. <https://smart.servier.com>

Les couches basales, épineuses et granuleuses constituent la partie « vivante » de l'épiderme (100-150 μm). Quant à la couche cornée (10-30 μm), elle est constituée

de cellules mortes appelées également cornéocytes. Il s'agit de la couche la plus externe de l'épiderme. L'ensemble forme une structure en forme de « mur de briques » (Farage et al., 2017; Jia and Nash, 2015; Madison, 2003; Menon, 2002; Shindo et al., 1994).

L'épiderme est composé de quatre types de cellules dont les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (Prost-Squarcioni, 2006). Les kératinocytes sont les cellules les plus abondantes de l'épiderme (au moins 80 %). Leur rôle est primordial puisqu'ils produisent de la kératine, une protéine fibreuse donnant les propriétés de protection à la barrière cutanée (Eckert and Rorke, 1989). Les mélanocytes situés près de la jonction épidermo-dermique assurent la pigmentation de la peau aux fins de la photoprotection (Natarajan et al., 2014). Les cellules de Langerhans sont des macrophages intraépidermiques chargées de la défense immunologique de la peau (Stingl et al., 1980). Enfin, les cellules de Merkel sont des cellules neuroendocrines impliquées dans les fonctions sensorielles (Boulais and Misery, 2007).

Le derme

Le derme confère à la peau sa structure et ses principales propriétés mécaniques. Le derme est une couche dense et irrégulière de tissu conjonctif. Son épaisseur varie de 2 à 3 mm, ce qui représente la majeure partie de la peau (Brincat et al., 2005). Il est traversé par des récepteurs mécanosensoriels, des glandes sudoripares et des glandes sébacées. Le derme est également vascularisé et riche en composant de la MEC (matrice extracellulaire). Il est composé de deux couches structurellement distinctes : la couche papillaire et la couche réticulaire (Figure 6). Les fibroblastes sont les principales cellules du derme. Ils sont responsables de la synthèse des composés de la MEC tels que le collagène et l'élastine.

Les collagènes de type I et de type III sont les protéines les plus abondantes dans le derme. Ils se copolymérisent pour former des fibrilles allongées mécaniquement rigides

qui confèrent à la peau une résistance à la traction (Heim et al., 2006). Les collagènes fibrillaires (le type I et le type III), bien que largement distribués dans le jeune derme, sont particulièrement abondants dans le derme papillaire et le derme réticulaire profond (Figure 6) (El-Domyati et al., 2002). En revanche, la distribution du collagène de type VII est limitée aux fibrilles d'ancrage situées et orientées perpendiculairement au niveau de la jonction dermo-épidermique (Keene et al., 1987). Ce collagène joue un rôle dans la fixation du derme à la jonction dermo-épidermique (Christiano et al., 1994).

En plus de posséder une résistance mécanique, la peau doit être à la fois souple et élastique (Doubal and Klemera, 2002). Les fibres élastiques sont fondamentales pour assurer cette élasticité tissulaire (Aaron and Gosline, 1981). Ces fibres adoptent une architecture caractéristique et hautement ordonnée. Les microfibrilles de fibrilline sont orientées perpendiculairement au niveau de la jonction dermo-épidermique et se confondent avec les fibres élastiques de grand diamètre riches en élastine dans le derme réticulaire (Figure 6). Le rôle des fibres élastiques est de ramener la peau à sa configuration normale après un étirement (Lephart, 2016; Mera et al., 1987; Piérard et al., 2014).

Enfin, la peau est principalement hydratée par les oligosaccharides, les GAG (glycosaminoglycanes) et des PG (protéoglycanes). Ils absorbent 1 000 fois leur volume et jouent donc un rôle dans la régulation de l'hydratation de la peau (Farage et al., 2017; Lephart, 2016; Martini et al., 2004). Par exemple, l'acide hyaluronique est distribué dans tout le derme et joue un rôle primordial dans la captation de l'eau (Waller and Maibach, 2006).

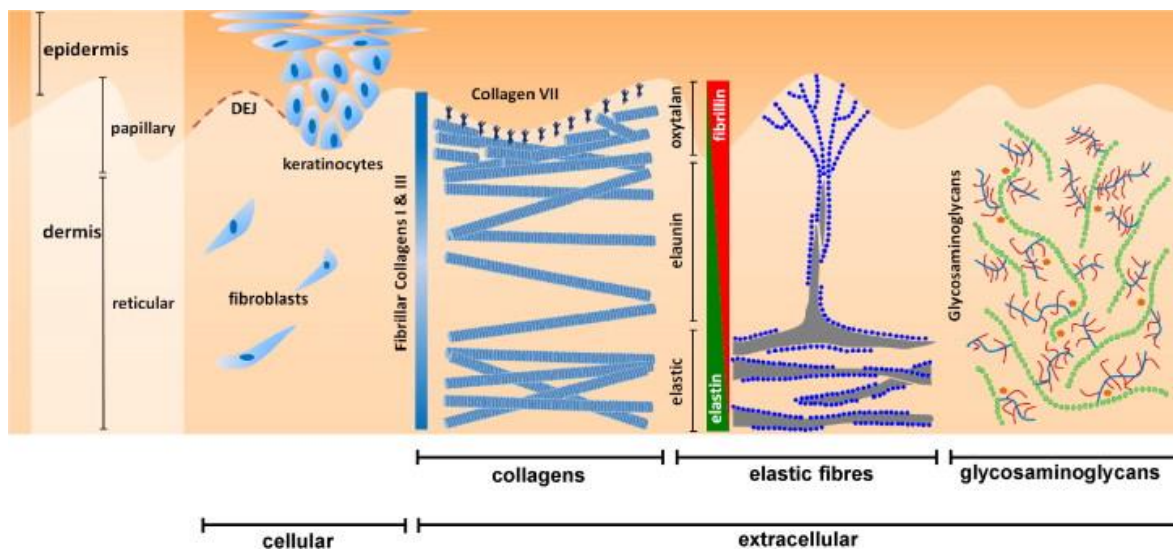


Figure 6 : Composants cellulaires et extracellulaires de la peau jeune (Naylor et al., 2011).

L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau et se trouve au-dessus du muscle sous-jacent. Il isole le corps et le protège des blessures mécaniques, tout en assurant une réserve d'énergie. Les cellules principales de l'hypoderme sont les adipocytes disposés en lobules séparés par du tissu conjonctif.

1.1.2. Fonctions biologiques de la peau

La peau remplit des fonctions vitales dont la fonction de barrière physique pour protéger le corps contre la perte d'eau et contre les agressions extérieures (agents pathogènes, produits chimiques, rayons solaires) tout au long de la vie (Jia and Nash, 2015; Madison, 2003; Shindo et al., 1994). De plus, la peau assure des fonctions physiologiques essentielles, notamment la défense immunitaire, la thermorégulation, les informations sensorielles provenant des mécanorécepteurs, et les mécanismes endocriniens et métaboliques (Jia and Nash, 2015; Lephart, 2016; Martini et al., 2004). Enfin, le système de défense antioxydante

de la peau est très développé afin de remplir au mieux ses fonctions biologiques (Shindo et al., 1994).

Fonction de barrière

La plus grande fonction de la peau est de former une barrière entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme. Cette capacité permet de protéger la peau contre des agressions de type physique, chimique/biochimique et immunitaire, mais également contre les effets nocifs des rayons du soleil.

Pour maintenir son intégrité, la peau dispose de caractéristiques mécaniques essentielles à la protection contre les chocs, l'étirement et les frottements (Pedersen and Jemec, 2006). L'ensemble des couches épidermiques confère une résistance mécanique, notamment la couche cornée qui assure une protection efficace via les cornéocytes. En effet, les protéines qui entourent les cornéocytes forment une véritable enveloppe cellulaire et les cornéodesmosomes assurent les liaisons solides entre les cornéocytes (Madison, 2003). De plus, la kératine contenue dans les cornéocytes fonctionne comme une solide barrière élastique, dure et résistante à la friction. La structure de la kératine en hélice α joue le rôle de ressort lors d'un étirement (Wortmann and Zahn, 1994). La fonction du derme dans la résistance mécanique est prédominante. Les fibres de collagène présentes dans le derme donnent à la peau sa résistance aux tensions alors que les fibres d'élastine confèrent des propriétés élastiques après un étirement. Enfin, l'hypoderme protège les muscles et les os contre les chocs et autres pressions mécaniques en amortissant l'énergie mécanique.

Afin de lutter contre les germes, allergènes et autres éléments irritants, la peau est recouverte d'un film hydrolipidique déposé à la surface de la couche cornée. Il s'agit d'une émulsion eau/huile dont l'eau et les acides gras proviennent respectivement des sécrétions sudorales et des glandes sébacées. Le pH acide à la surface de la peau limite la propagation des microorganismes (Jones et al., 2014). L'élimination progressive

des cornéocytes en surface par desquamation permet de limiter la propagation des microorganismes (Marks, 2004). De plus, les cellules de Langerhans et les leucocytes présents respectivement dans l'épiderme et le derme, ont pour fonction d'éliminer les pathogènes.

La protection contre les rayonnements solaires est assurée dans un premier temps par la pigmentation puis dans un second temps par les mécanismes de réparation de l'ADN. La pigmentation est le résultat de la production de mélanine par les mélanocytes (Jablonski and Chaplin, 2013). La mélanine diffracte et reflète la lumière, absorbe les photons et piège les radicaux libres. Quant aux mécanismes de réparation de l'ADN, ils se mettent en place en dernier recours afin de limiter l'apparition de mutations dans le génome (Cleaver and Crowley, 2002).

L'épiderme présente la plus grande proportion d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD1) à 125%, la catalase (CAT) à 720% et la glutathion peroxydase (GPx1) à 60% par rapport à la couche dermique (Shindo et al., 1994). De plus, l'activité de la CAT varie en fonction des saisons (été/hiver) contrairement à l'activité de la SOD qui reste stable (Hellemans et al., 2003). De plus, les antioxydants biosynthétisés que sont le glutathion et l'acide urique, ainsi que les antioxydants d'origine alimentaire (vitamine C, D et E) sont présents à des concentrations beaucoup plus élevées dans l'épiderme que dans le derme (Shindo et al., 1994). Ainsi, la couche épidermique contient la plus forte concentration d'antioxydants et constitue la principale ligne de défense antioxydante de la peau (Natarajan et al., 2014; Seo and Chung, 2006; Shindo et al., 1994).

Détection des informations extérieures

Les terminaisons nerveuses contenues dans la peau permettent de détecter les informations extérieures. Il existe quatre types de récepteurs : les cellules de Merkel

(pression), les corpuscules de Meissner (tactile), les corpuscules de Ruffini (chaleur) et les corpuscules de Pacini (tactile).

Thermorégulation

Pour abaisser la température corporelle, la peau joue un rôle important à travers la dilatation des vaisseaux sanguins et la production de sueur à la surface de la peau (Sanyal and Maji, 2001). Ces deux processus induisent respectivement, la libération de chaleur et le rafraîchissement du corps par évaporation de la sueur. Pour augmenter la température corporelle, les vaisseaux sanguins se contractent afin de limiter la perte de chaleur. La circulation sanguine se fait dans l'hypoderme qui joue un rôle d'isolant thermique. De petites fibres nerveuses régulent le flux sanguin cutané local en réponse à des perturbations thermiques (Wu et al., 2017). Enfin, les poils interviennent dans la régulation thermique en formant une couche d'air isolante.

Hydratation

La régulation hydrique est nécessaire pour le maintien de l'intégrité de la peau. Il existe des différences interethniques au niveau de la face non observées sur d'autres sites anatomiques comme l'avant-bras (Voegeli et al., 2019). Une étude récente a analysé l'hydratation cutanée et la fonction de barrière de différents groupes ethniques à l'aide respectivement, d'un cornéomètre et d'une approche par cartographie de chaleur (Figure 7). Les auteurs ont noté un manque de concordance entre l'hydratation et la fonction de barrière de la peau en fonction des groupes ethniques (Voegeli et al., 2019). Une peau fortement pigmentée était plus hydratée, en accord avec d'autres études (Diridollou et al., 2007). À l'inverse, une pigmentation foncée montre une fonction de barrière inférieure à une peau claire.

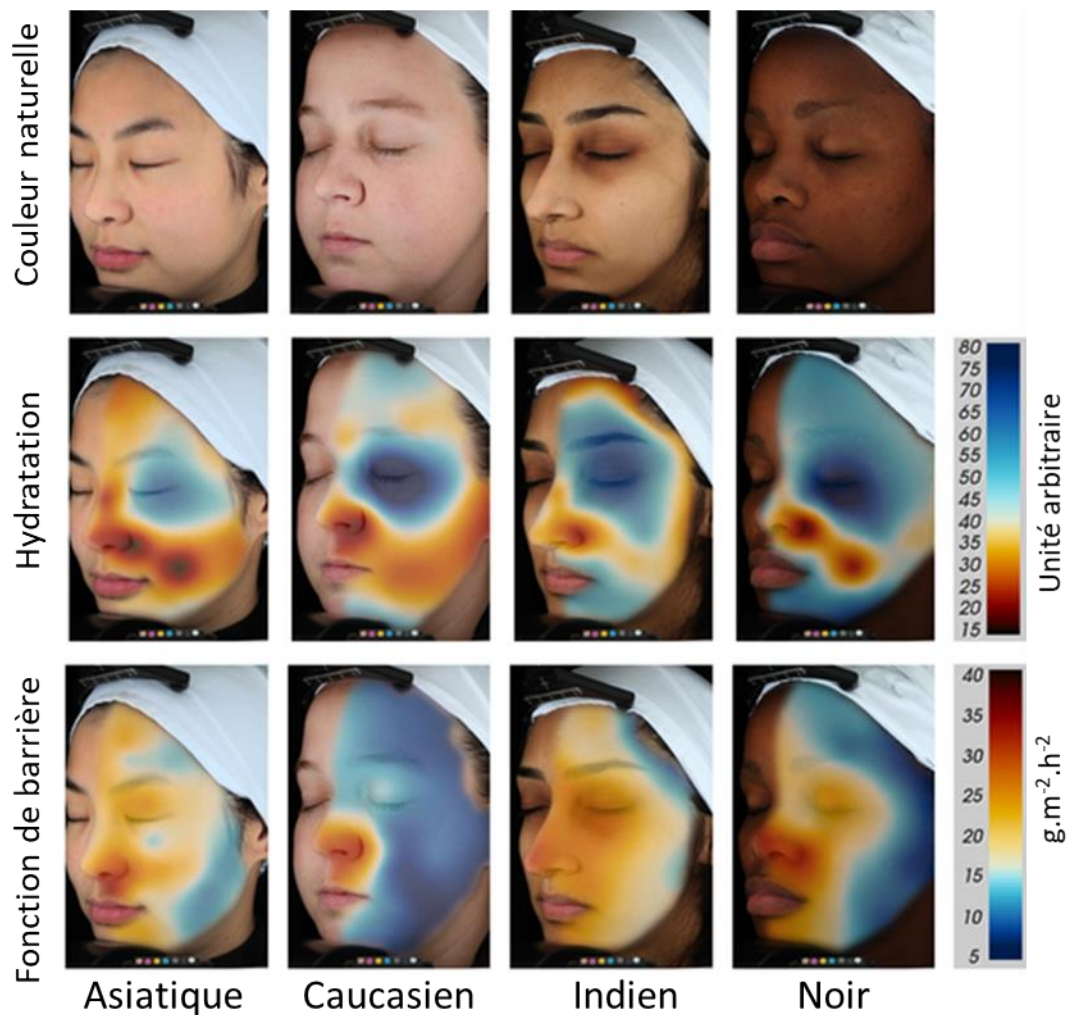


Figure 7 : Profils continus de la perte en eau transdermiques et de la fonction de barrière par rapports aux différents groupes ethniques (bleu : bonne condition cutanée et rouge : altération de la peau ; d’après Voegeli et al., 2019).

Métabolisme

Dans la partie profonde de l’épiderme et sous l’influence des UVB, la vitamine D est synthétisée (Mostafa and Hegazy, 2015). Le tissu adipeux constituant l’hypoderme est un réservoir d’énergie et d’hormone pour la peau.

1.2. Introduction au vieillissement cutané

Le vieillissement est un processus naturel progressif qui touche tous les organismes vivants. Il entraîne une perte de l'intégrité structurelle et des fonctions physiologiques (Farage et al., 2017). Au niveau cutané, il se traduit par un déséquilibre de l'architecture du derme, ce qui entraîne l'apparition de rides (Figure 8). D'autres manifestations surviennent comme par exemple une diminution de l'épaisseur cutanée, une perte de l'élasticité, un dessèchement de la peau, et la présence de taches (Flament et al., 2013; Zouboulis and Makrantonaki, 2011).



Figure 8 : Photographie (libre de droit provenant du site <https://pixabay.com>)

Particulièrement au niveau du visage, les rides autour des yeux et de la bouche ainsi que les rides du front se développent et le teint devient pâle (Friedman, 2005). De plus,

l'affaissement et l'amincissement de la peau du visage sont dus à la diminution du collagène sous-jacent et des fibres d'élastine de la couche dermique (El-Domyati et al., 2002). Les premiers signes du vieillissement cutané apparaissent vers l'âge de 30 ans. Ils se manifestent ensuite surtout après la ménopause avec l'apparition d'une sécheresse cutanée, d'une diminution de la fermeté de la peau, et d'une perte d'élasticité (Lephart, 2016). En effet, la quantité de collagène et d'élastine cutanés atteignent leur maximum vers l'âge de 30 ans, ce qui correspond au pic de production d'œstrogènes (Figure 9).

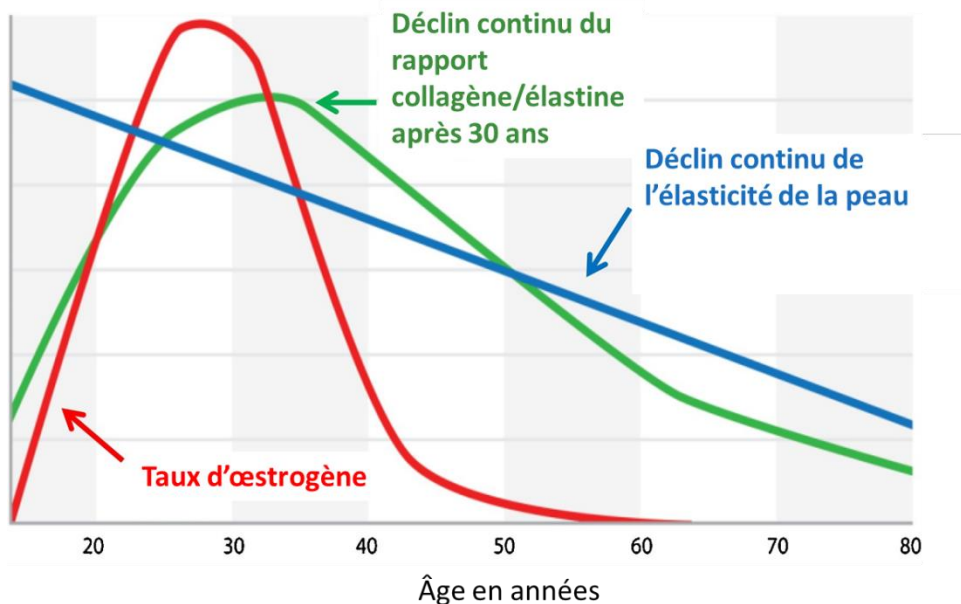


Figure 9 : Production d'œstrogène, rapport collagène/élastine et profils d'élasticité cutanée chez les femmes en fonction de l'âge (figure adaptée d'après Lephart, 2016).

Dans la peau âgée, les fibres de collagène sont fragmentées via l'action de l'enzyme MMP-1 induite par la production de ROS. Le stress oxydant joue un rôle primordial dans le vieillissement cutané, bien que l'organisme soit pourvu d'un système de défense très efficace. Citons par exemple la SOD qui est une enzyme antioxydante intervenant dans le mécanisme d'élimination des radicaux libres. Dans une étude, des souris déficientes

en SOD présentait un amincissement de l'épiderme induit par des cassures de l'ADN entraînant une sénescence cellulaire (Velarde et al., 2012). Quant à l'élastine, son importance n'est pas négligeable puisque sa perte peut accélérer le vieillissement cutané (Uitto, 2008). Alors que le vieillissement de la peau apparaît pour la première fois vers l'âge de 30 ans, une étude a démontré que la perte d'élasticité de la peau liée à l'âge précède la formation de rides visibles (Fujimura et al., 2007).

Les signes de l'âge sont irréversibles et progressifs. Ils font intervenir le vieillissement cellulaire et les facteurs environnementaux (Farage et al., 2008a). Ces deux processus sont nommés respectivement, le vieillissement intrinsèque ou endogène et le vieillissement extrinsèque ou exogène. Le facteur environnemental le plus étudié est le rayonnement solaire, c'est pourquoi le vieillissement extrinsèque est souvent appelé photo-vieillessement.

1.2.1. Diminution de la prolifération des cellules

La sénescence est définie par l'incapacité des cellules à se diviser. À la différence des cellules quiescentes, les cellules sénescents ne peuvent pas reprendre leur prolifération en réponse à une stimulation par les mitogènes (Terzi et al., 2016). La sénescence entraîne des modifications dans l'expression des gènes dont ceux liés à la prolifération cellulaire (Doggett et al., 1992). Les cellules sénescents restent donc métaboliquement actives mais elles ne se divisent plus.

La sénescence répliative

Les cellules cutanées perdent leur capacité à se multiplier, il s'agit de la sénescence répliative. Ce processus correspond à l'arrêt cellulaire en phase G1. En culture, les cellules non immortalisées ont une durée de vie limitée liée à ce phénomène de sénescence répliative (Hayflick, 1974). De nombreuses études ont mis en évidence la réduction de la prolifération cellulaire dans les fibroblastes (Cristofalo and Pignolo, 1993),

les kératinocytes (Gilchrest, 1983) et les mélanocytes (Medrano et al., 1994). La morphologie des fibroblastes sénescents est caractérisée par l'élargissement des cellules avec une augmentation de la taille de leur noyau et de leurs nucléoles (Bayreuther et al., 1988). De la même façon, les kératinocytes sénescents présentent un phénotype particulier. Ils sont définis par une forme irrégulière, un élargissement, l'apparition de vacuoles claires (Soroka et al., 2008). La sénescence peut être détectée à l'aide d'un biomarqueur associé à l'activité de la β -galactosidase. Il s'agit d'une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des β -galactosides en monosaccharides. Cette enzyme est présente uniquement dans les cellules sénescents (Dimri et al., 1995). La perte de lamin-B1 est un nouveau marqueur pour identifier les cellules sénescents dans la peau (Wang et al., 2017). Cette perte facilite la détection et la quantification des cellules sénescents dans des modèles *in vitro* exposés aux UV et dans des modèles *in vivo* exposés de façon chronique aux UV. De nombreux modèles cellulaires et murins permettent d'étudier le vieillissement (Baker et al., 2008, 2011; Wang and Dreesen, 2018). La sénescence est une conséquence du raccourcissement des télomères produit à chaque division cellulaire. En effet, lorsqu'ils deviennent trop courts un signal d'arrêt de la prolifération est envoyé.

La perte des télomères

Comme évoqué précédemment, la sénescence répliquative est expliquée par le raccourcissement progressif des télomères. L'enzyme impliquée dans le processus de stabilisation des télomères est une transcriptase inverse appelée télomérase. Dans les tumeurs, la télomérase favorise la tumorigenèse (Shay and Wright, 1996). Au contraire, son absence entraîne un vieillissement prématuré (Shay, 2016). De ce fait, la perte des télomères engendre une mort cellulaire « passive » contrairement à l'apoptose qui est une mort programmée. Les cellules de l'épiderme expriment la télomérase puisque l'épiderme est un tissu régénératif (Flores et al., 2005). La perte des télomères dans ce tissu expliquerait le vieillissement primaire de la peau (Kanaki et al., 2016). Des travaux récents

ont mis en évidence des mécanismes du vieillissement cutané liés aux télomères (Wang and Dreesen, 2018). Le vieillissement intrinsèque est en grande partie contrôlé par le raccourcissement progressif des télomères, aggravé par les dommages oxydatifs (Epel et al., 2004). Sur une peau exposée au soleil, les rayons UV endommagent également l'ADN et accélèrent le raccourcissement des télomères (Rochette and Brash, 2010). La perturbation des télomères entraîne des modifications au niveau de la voie de signalisation p53, ce qui conduit à la mort cellulaire par apoptose (Kosmadaki and Gilchrest, 2004).

L'apoptose

Un autre mécanisme responsable du vieillissement cutané est l'apoptose ou mort programmée. L'apoptose est en partie responsable de la diminution de l'épaisseur des couches cutanées (Gilhar et al., 2004). Cette mort cellulaire intervient dans les cellules lors de mutations ou de détériorations importantes. Elle élimine les cellules potentiellement cancéreuses. L'apoptose semble être un processus cellulaire susceptible d'être affecté au cours du vieillissement cutané. En effet, l'apoptose est à la fois un mécanisme homéostatique important et une réponse cellulaire protectrice (Haake et al., 1998). L'apoptose augmente dans l'épiderme des personnes âgées en corrélation avec l'amincissement de leur couche épidermique (Gilhar et al., 2004).

1.2.2. Détérioration des constituants cellulaires

Dans le vieillissement cutané, les constituants cellulaires sont modifiés et ne fonctionnent pas correctement. C'est toute la machinerie cellulaire qui semble être détériorée, aussi bien la synthèse des protéines que leur taux de renouvellement (Basisty et al., 2018; Rattan, 1996).

Modifications post-traductionnelles

Les protéines subissent des modifications post-traductionnelles après leur synthèse. Avec l'âge, des erreurs s'accumulent lors de ces modulations. Il en résulte la formation de protéines matures non fonctionnelles. Celle-ci peut être expliquée par l'augmentation d'erreurs post-traductionnelles ou une défaillance du système d'élimination des protéines altérées (Basisty et al., 2018). Parmi ces modifications, nous pouvons citer la glycation des protéines. Il s'agit d'une réaction non enzymatique, appelée réaction de Maillard, qui se produit entre des sucres réducteurs et des résidus lysines de protéines (Gkogkolou and Böhm, 2012). Il en résulte des liaisons entre les constituants de la MEC comme le collagène, rigidifiant ainsi l'ensemble du derme (Pageon et al., 2007).

Accumulation de protéines

Certaines protéines, comme le collagène de type III, la fibronectine, l'élastine, la collagénase et l'élastase sont synthétisées de façon anarchique dans le derme (Naylor et al., 2011a). Leur amplification a des conséquences sur la structure même du derme et elle est particulièrement retrouvée dans la peau âgée exposée au soleil.

1.2.3. Affaiblissement des systèmes de protection et de réparation

La peau possède des systèmes de défense et de réparation efficaces contre les dommages liés aux facteurs environnementaux ou au métabolisme cellulaire.

Les antioxydants

La production endogène ou exogène d'ERO (espèce réactive de l'oxygène) est régulée par un système naturel de défense comportant des antioxydants puissants, tels que la SOD, la CAT, les peroxydases, les vitamines, et le système du glutathion. Une défaillance pour l'un ou plusieurs acteurs de ce système de défense peut entraîner un déséquilibre majeur qui contribue à accélérer le vieillissement cutané (Kohen, 1999). L'ensemble

des antioxydants peut être submergé et conduire à un état de stress oxydant qui peut être partiellement neutralisé par l'application topique d'antioxydants exogènes (Chen et al., 2012a). Les composants du système de défense antioxydant de la peau humaine sont régulés de manière complexe durant le vieillissement cutané. En effet, une étude *in vivo* a montré que les activités de la SOD et de la GPx n'étaient pas modifiées au cours du vieillissement intrinsèque et extrinsèque dans la peau humaine. Par contre, l'activité de la CAT était significativement augmentée dans l'épiderme des peaux photo-âgées (163%) et naturellement âgées (118%), mais elle était significativement plus faible dans le derme des peaux photo-âgées (67%) et naturellement âgées (55%) par rapport aux peaux jeunes. En ce qui concerne la glutathion réductase (GR), son activité était significativement plus élevée (121%) dans l'épiderme naturellement vieilli (Rhie et al., 2001).

Le système de réparation de l'ADN

Les mécanismes de réparation de l'ADN sont essentiels afin de lutter contre l'apparition de mutations qui accentue le vieillissement ou qui participe au développement de tumeurs. Par exemple, l'exposition aux rayons solaires entraîne la formation de photoproduits qui endommagent l'ADN. Ces lésions sont réparées par un processus appelé réparation par excision de nucléotide. Lorsqu'elles ne sont pas réparées, les lésions de l'ADN induites par les UVB entraînent une accumulation de mutations, prédisposant au vieillissement prématuré de la peau (Shah and He, 2015). Sur la Figure 10, les principaux systèmes de réparation de l'ADN simple et double brins sont représentées (Rass et al., 2012).

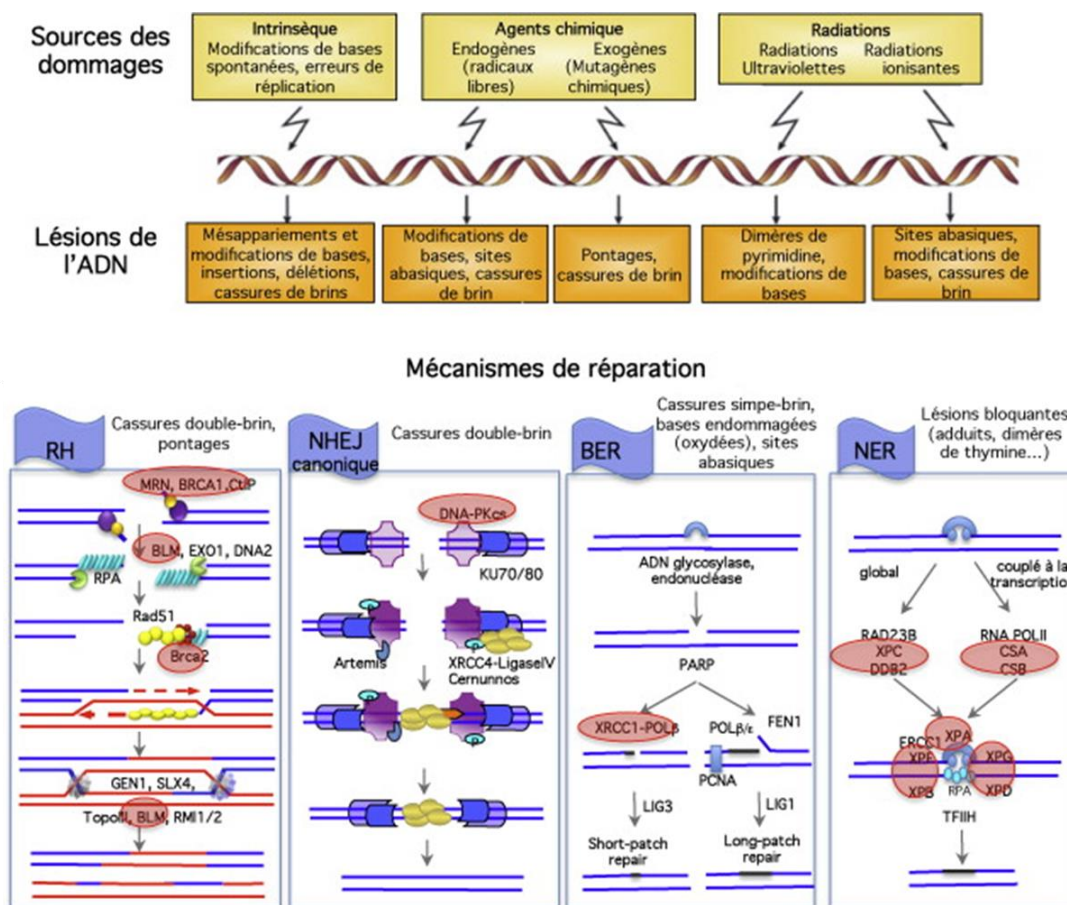


Figure 10 : Système de réparation de l'ADN chez les mammifères en fonction de différentes sources de dommages impliquant diverses lésions de l'ADN (d'après Rass et al., 2012).

La réparation de l'ADN simple brin comprend le système de réparation par excision de bases (BER, pour « *base excision repair* » en anglais) et le système de réparation par excision de nucléotides (NER, pour « *nucleotide excision repair* » en anglais). Le système BER permet l'élimination des bases anormales (jusqu'à 4 nucléotides) et la réparation d'un site abasique. L'ADN glycosylase coupe la liaison N-glycosidique entre la base anormale et le désoxyribose, entraînant l'apparition d'un site « vacant » (abasique). Une endonucléase 3'-5' coupe la liaison phosphodiester adjacente au site abasique. Puis l'ADN-polymérase I synthétise la séquence d'ADN manquant au niveau de ce même

site. Enfin, l'ADN-ligase crée la liaison Phosphodiester manquante. Le système BER subit des modifications liées à l'âge, susceptibles de contribuer à l'accumulation de lésions oxydatives de l'ADN et de mutations (Gorbunova et al., 2007). Le système NER utilise également l'endonucléase 3'-5', l'ADN-polymérase I et l'ADN-ligase, pour réparer des zones plus étendues avec plusieurs nucléotides. Il est divisé en deux voies : la voie globale GG-NER (pour *Global genome NER*, en anglais) et la voie couplée à la transcription TC-NER (pour *Transcription coupled NER*, en anglais) (Nicolai et al., 2015). Le système NER correspond au mécanisme de réparation des dommages induits par les UV (Canitrot et al., 2003). Il est impliqué dans le vieillissement prématuré, comme le démontre les déficiences de cette voie dans les pathologies héréditaires suivantes : la xérodérma pigmentosum, la trichothiodystrophie et le syndrome de Cockayne (Kraemer et al., 2007). D'autres études ont montré la diminution du système NER liée à l'âge (Gorbunova et al., 2007). Les voies BER et NER diffèrent par les enzymes de reconnaissance utilisées. Le mécanisme d'action partagé par le système BER et le système NER repose sur l'utilisation de brin opposé comme modèle suite à la réparation des bases endommagées.

La réparation de l'ADN double brin comprend le système de réparation par recombinaison homologue (HR, pour « *Homologous Recombinaison* » en anglais) et le système de réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ, « *Non-Homologous End Joining* » en anglais). Les cassures dans les deux brins d'ADN, comme celles causées par les radiations ionisantes, sont les lésions cellulaires les plus mortelles. En effet, si elles ne sont pas réparées, ces cassures peuvent conduire à des réarrangements génomiques. Il en résulte la formation de tumeurs ou la mort cellulaire. Pour réparer ces lésions double brin, la chromatide sœur est utilisée comme modèle dans les cas de la HR. La réparation par HR est effectuée par la protéine RAD51 et d'autres protéines comme RPA, BRCA1, BRCA2 et RAD52 (Gorbunova et al., 2007). Le système NHEJ joint simplement deux extrémités cassées en utilisant une homologie de séquence extrêmement limitée ou nulle (Lieber, 2010). Ce système peut produire des insertions ou des délétions

de nucléotides. Avec l'âge, les composants de HR et NHEJ s'expriment moins, ce qui conduit à la diminution de leur efficacité (Nicolai et al., 2015). Au cours du vieillissement, une étude a montré que NHEJ devenait plus sujet aux erreurs et moins efficace dans les fibroblastes humains sénescents (Seluanov et al., 2004).

Le protéasome

Lors du vieillissement, les protéines altérées s'accumulent dans les cellules (Rattan, 1996). Ces protéines présentent des modifications par oxydation qui s'expliquent par l'augmentation des dommages causés à ces dernières et à une diminution de leur élimination lorsqu'elles sont oxydées. Le protéasome est un complexe protéique non lysosomal impliqué dans la dégradation des protéines, dont les celles oxydées (Ciechanover, 1998; Grune et al., 1997). Son rôle dans le vieillissement cutané est donc recherché. Une étude a montré une diminution de l'activité du protéasome associée à la sénescence dans des kératinocytes (Petropoulos et al., 2000). Dans des cellules épidermiques provenant de la peau de donneurs humains, l'activité des protéasomes diminue en fonction de l'âge des donneurs (Bulteau et al., 2000). De la même façon, dans des fibroblastes dermiques, l'activité du protéasome s'est avérée réduite dans les fibroblastes provenant de donneurs âgés (Hwang et al., 2007). En résumé, les altérations du protéasome entraînent un déclin de son fonctionnement, ce qui accélère le vieillissement.

Les protéines chaperonnes

Les protéines chaperonnes ont pour fonction d'assister les autres protéines dans leur maturation en modulant leur conformation tridimensionnelle (Morange, 2000). Ces protéines sont pour la plupart des protéines de choc thermique HSP (pour « *Heat shock proteins* », en anglais) ou des protéines de stress cellulaire (Arrigo, 2005). En effet, ces protéines sont exprimées en réponse à des variations de température ou de stress comme le stress oxydant.

Dans la peau, les cellules de l'épiderme et du derme expriment des protéines HSP (Edwards et al., 1991; Trautinger et al., 1995a), qui confèrent une protection contre les dommages causés par des facteurs extérieurs comme le rayonnement solaire (Roh et al., 2008). Les kératinocytes expriment HSP70 pour se protéger d'un choc thermique (Trautinger et al., 1993). Par contre, les fibroblastes n'expriment pratiquement pas HSP70 dans des conditions normales (Fonager et al., 2002). D'autres HSP sont retrouvés dans la peau, notamment au niveau de l'épiderme, comme l'HSP27, l'HSP60, l'HSP90, l'HSP100 et l'HSP47 (Sato et al., 1996; Wilson et al., 2000). Les protéines HSP ont des rôles importants dans la peau. Par exemple, HSP27 participe à la différenciation des kératinocytes (Jonak et al., 2011) alors qu'HSP47 est associé à la synthèse du collagène dans les fibroblastes (Sato et al., 1996).

Les protéines HSP jouent un rôle important dans l'homéostasie cutanée et dans les processus de vieillissement (Vidal Magalhães et al., 2012). En effet, avec l'âge leur expression diminue et par conséquent, la tolérance au stress s'affaiblit dans la peau âgée. Il peut s'agir d'un stress physique comme l'exposition aux UV, ou d'un stress chimique, ou bien encore d'un stress thermique (Wilson et al., 2000). HSP70 est une protéine efficace contre le photovieillissement. Elle est capable de réduire l'accumulation de protéine oxydée dans les fibroblastes dermiques (Verbeke et al., 2001). Ce processus peut être expliqué par la capacité à moduler l'activité de certains acteurs antioxydants tels que la GPx et la GR (Guo et al., 2007). Il semble que la présence d'HSP70 dans les kératinocytes soit essentielle pour leur protection contre les UVB (Trautinger et al., 1995b). HSP70 semble atténuer la mort cellulaire dans les kératinocytes exposés à la chaleur, et son expression est diminuée dans les kératinocytes âgés par rapport à de jeunes kératinocytes (Chinnathambi et al., 2008).

1.2.4. Diminution hormonale

Les hormones jouent un rôle important dans le vieillissement intrinsèque (Kanaki et al., 2016). Avec l'âge, la sécrétion d'hormones telles que l'hormone de croissance, le déhydroépiandrostérone, l'estradiol, la testostérone, la vitamine D et l'IGF-1 diminue (Kanaki et al., 2016). Les cellules cutanées possèdent un grand nombre de récepteurs aux facteurs de croissance et aux hormones sexuelles (Zouboulis, 2004). Les déséquilibres hormonaux peuvent entraîner diverses altérations morphologiques et physiologiques dans la peau âgée. La synthèse des lipides et de la MEC, la vascularisation, la fonction sensorielle, la production de sueur, la pigmentation, l'hydratation de la peau et la fonction de barrière, semblent être maintenues par des hormones (Makrantonaki et al., 2010). On peut citer également la cicatrisation des plaies, la fonction immunitaire, l'épaisseur de l'épiderme et l'homéostasie dermique (Makrantonaki et al., 2010). Il a été démontré que l'hormonothérapie améliore la production de collagène, augmente l'épaisseur de la peau, les lipides de surface, et l'hydratation de la peau (Rzepecki et al., 2019; Sator et al., 2001).

1.3. Vieillesse intrinsèque

Le vieillissement intrinsèque de la peau est un processus lent et hétérogène, qui varie en fonction des individus et des sites anatomiques d'une même personne. Il est généralement plus facile à observer dans les zones protégées du soleil. Les caractéristiques du vieillissement intrinsèque se manifestent par une peau lisse, pâle, sèche, moins élastique et présentant de fines rides.

1.3.1. Le vieillissement intrinsèque de l'épiderme

Les rides de surface

La surface de la peau présente une topographie variable en fonction de la zone anatomique. Cette surface est caractérisée par la présence de sillons, d'orifices folliculaires

et de pores sudoripares. Ce réseau de sillons forme un microrelief qui est modifié avec l'âge (Trojahn et al., 2015). Dans la Figure 11, ces sillons sont étudiés à l'aide d'images prises par des caméra utilisant les UVA. Des formes géométriques complexes sont présentes chez le sujet jeune. Les polygones formés sont de plus en plus grossiers avec l'âge. De manière générale, dans le vieillissement intrinsèque la peau présente des ridules fines et des rides d'expression (Tobin, 2017).

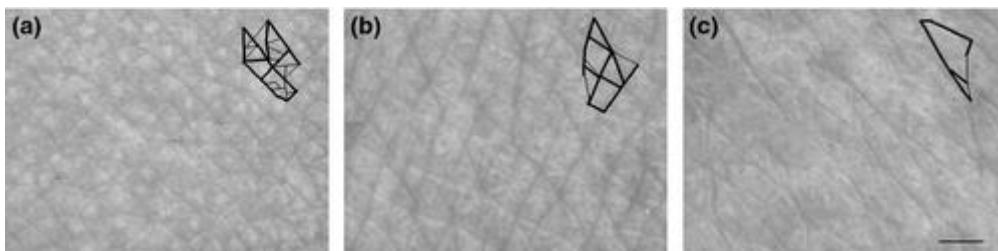


Figure 11 : Topographie de l'avant-bras en vue palmaire d'un enfant (a), d'un jeune adulte (b) et d'un adulte plus âgé (c) à l'aide d'une caméra VisioScan VC98 (Trojahn et al., 2015).

L'amincissement de l'épiderme

Les kératinocytes prolifèrent moins vite et le stade terminal de différenciation est également ralenti. Il en résulte un amincissement de l'épiderme avec une couche cornée épaissie, ce qui donne à la peau son teint terne (Lephart, 2016).

1.3.2. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique s'aplatit à travers la disparition des papilles dermiques, entraînant une diminution des échanges en oxygène et en nutriments entre le derme et l'épiderme (Südel et al., 2005). L'aplatissement de la jonction dermo-épidermique entraîne une moindre résistance aux forces de cisaillement et une vulnérabilité accrue aux blessures (Grove, 1989). Cet aplatissement augmente le potentiel de séparation entre le derme et

l'épiderme, ce qui pourrait expliquer la formation de rides (Südel et al., 2005). Si l'expression des composants membranaires de la jonction dermo-épidermique tels que les collagènes de type IV et de type VII ne change pas (Figure 12), une étude a montré une nette désorganisation de l'ultrastructure de cette jonction avec le temps (Dos Santos et al., 2015).

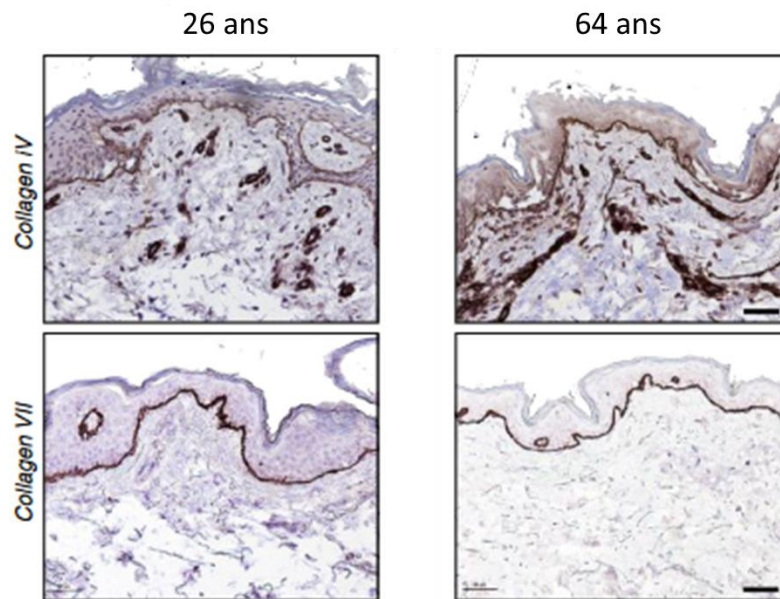


Figure 12 : Organisation de la jonction dermo-épidermique d'une personne de 26 ans et d'une personne de 64 ans à travers leur profil immunohistologique du collagène de type IV et du collagène de type VII (Dos Santos et al., 2015). Barre d'échelle à 50 μ m.

1.3.3. Le vieillissement intrinsèque du derme

L'épaisseur du derme diminue avec l'âge et les composants de la MEC qui le composent deviennent de moins bonne qualité.

Les fibroblastes dermiques

La population et la taille de fibroblastes dans le derme diminuent fortement dans la peau âgée (Farage et al., 2007; Tu and Quan, 2016). De manière générale, les fibroblastes ont une

capacité de synthèse diminuée dans la peau âgée lors du vieillissement intrinsèque. A l'exception de la synthèse du collagène de type III, de la fibronectine, de l'élastase et de la collagénase, qui augmentent drastiquement. La taille réduite des fibroblastes est une caractéristique prédominante dans la peau âgée, ce qui induit la production d'ERO et la sécrétion de MMP-1 responsable de la dégradation des fibres de collagènes (Tu and Quan, 2016). Ces processus sont illustrés dans la Figure 13.

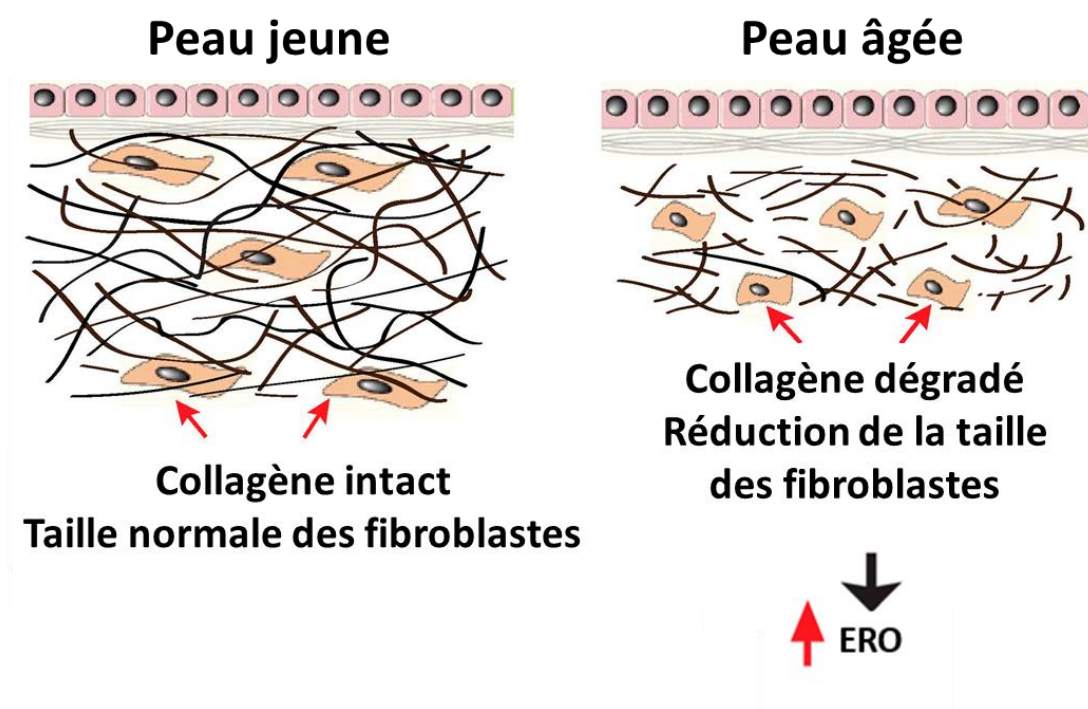


Figure 13 : Réduction de la taille des fibroblastes induisant la production d'ERO et la dégradation des fibres de collagènes (image adaptée d'après Tu and Quan, 2016).

Les constituants de la matrice extracellulaire (MEC)

La peau perd sa souplesse et sa fermeté à cause de la perte des macromolécules qui composent la MEC. Le remodelage de la MEC dans la peau intrinsèquement vieillie est caractérisé par une atrophie des collagènes dermiques (en particulier au niveau du derme réticulaire), une atrophie des fibres élastiques et une perte des GAG (Naylor et al., 2011a).

Le rapport entre le collagène de type I / collagène de type III diminue. Leur biosynthèse diminue également (El-Domyati et al., 2002). Des pontages entre les fibres de collagène se forment suite à des réactions de glycation (Gkogkolou and Böhm, 2012). Ces pontages créent alors des faisceaux de collagène plus épais et plus rigide, difficiles à dégrader (Robert et al., 2009). Les élastines verticales du derme papillaire se fragmentent et forment des complexes amorphes avec le collagène. Quant aux élastines horizontales au niveau du derme réticulaire, elles se dégradent également et forment des complexes amorphes. Ces dégradations sont dues à la synthèse accrue d'élastase par les fibroblastes qui augmentent avec l'âge. Les fibres élastiques se chargent en calcium, ce qui augmente leur liaison avec les lipides. Par conséquent, cette liaison diminue l'élasticité du derme (Robert et al., 1988). Avec l'âge, il y a une augmentation de la densité en fibronectine et une augmentation de la synthèse des enzymes protéolytiques par les fibroblastes (Robert et al., 2009). La conséquence est la présence d'une grande quantité de fibronectine très dégradée par ces enzymes (Kumazaki et al., 1993). Au contraire, les glycosaminoglycanes sont moins produits dans le derme. Il en résulte une diminution de l'hydratation cutanée. Fait intéressant, l'acide hyaluronique reste stable dans le derme alors qu'il diminue dans l'épiderme (Lee et al., 2016a). L'acide hyaluronique ayant pour rôle de retenir l'eau, sa diminution entraîne donc une perte d'hydratation dans la couche épidermique.

1.4. Vieillesse extrinsèque

Le vieillissement extrinsèque est un processus plus ou moins évitable puisqu'il est induit par l'exposition au niveau de la peau à différents facteurs environnementaux. De plus, il est en superposition avec le vieillissement chronologique. L'exposition aux rayonnements solaires étant la principale origine du vieillissement extrinsèque. Le terme de « photovieillesse » est alors employé pour désigner ce type de vieillissement (Krutmann et al., 2017). Les caractéristiques d'une peau vieillie de manière extrinsèque

se définissent par l'apparition de rides grossières, d'une texture rugueuse, d'un teint verdâtre, d'une perte d'élasticité et de l'apparition des taches hétérogènes (Tobin, 2017).

1.4.1. Analyse de « l'exposome »

L'exposome de la peau définit l'ensemble des expositions auxquelles la peau est soumise tout au long de la vie. Il identifie les facteurs externes impliqués dans les dommages cutanés et qui accélèrent le vieillissement de la peau. Dans la Figure 14, les principaux facteurs externes sont représentés. Les expositions aux rayonnements solaires, à la pollution et au tabac sont bien documentées dans la littérature. Ces derniers déclenchent des processus moléculaires qui endommagent la structure de la peau. D'autres facteurs, moins bien étudiés, sont identifiés dans l'exposome cutané. Ces facteurs agissent soit séparément, soit en interagissant les uns avec les autres (Krutmann et al., 2017).

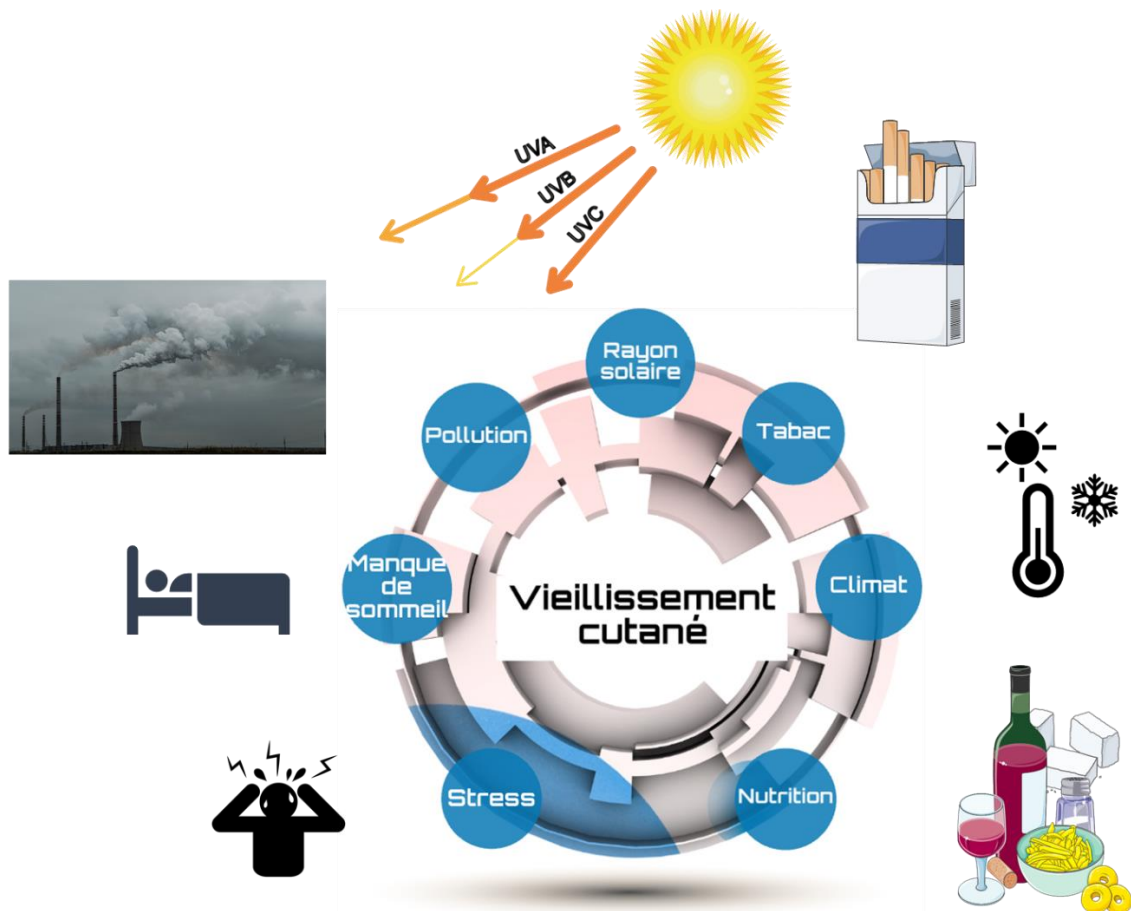


Figure 14 : Les principaux facteurs extérieurs composant l'exposome du vieillissement cutané. La figure a été créée à l'aide de Servier Art, Pixabay et Thenounproject.
<https://smart.servier.com>, <https://pixabay.com>, <https://thenounproject.com>

Les rayonnements solaires

Les rayonnements solaires sont la cause principale du vieillissement prématuré de la peau. Les zones anatomiques les plus exposées au soleil sont donc celles qui sont le plus touchées par le vieillissement extrinsèque. De nombreuses études ont fourni des données appuyant la relation entre l'exposition solaire et le vieillissement (Li et al., 2015; Vierkötter et al., 2010). Les détails sur l'impact des rayonnements solaires seront décrits dans la partie « 3.2. *Les effets néfastes du soleil sur la peau* » du manuscrit de thèse.

La pollution de l'air

La pollution est une contamination de l'air à des agents chimiques, physiques ou biologiques (Krutmann et al., 2017). Par exemple, la contamination peut être due au plomb (usines de traitement des métaux et industries), aux particules (suie, gaz d'échappement, industrie), au dioxyde d'azote (gaz d'échappement de voiture), à l'oxyde de soufre (installations industrielles), ou à l'ozone. La relation entre la pollution de l'air et le vieillissement prématuré de la peau a été mise en évidence dans des études sur l'exposition aux particules liées à la circulation routière (Li et al., 2015; Vierkötter et al., 2010).

Le tabagisme

La relation entre l'usage de la cigarette et le vieillissement prématuré de la peau est corroborée par des études épidémiologiques. La peau des fumeurs est caractérisée par des rides faciales saillantes autour de la bouche, des lèvres et des yeux (Aizen and Gilhar, 2001; Doshi et al., 2007; Koh et al., 2002). Des troubles de la pigmentation peuvent également être retrouvés au niveau du visage (Tamai et al., 2014). Une inhalation de cigarette contient plus de 3 800 substances chimiques nocives différentes, notamment la nicotine, le monoxyde de carbone, le goudron, le formaldéhyde, l'acide cyanhydrique, l'ammoniac, le mercure, le plomb et le cadmium (Krutmann et al., 2017). Toutes ces molécules peuvent induire un stress oxydant, ce qui épuise les défenses antioxydantes de la peau et par conséquent, favorise la sénescence des fibroblastes (Yang et al., 2013a). L'expression de MMP1 a été retrouvée augmentée dans la peau de fumeurs (Lahmann et al., 2001a). Or, MMP1 est impliqué dans la dégradation de la MEC (le collagène), ce qui provoque l'apparition de rides.

La nutrition

Une relation entre la nutrition et le vieillissement cutané peut être établie d'après des études sur les carences nutritionnelles. Par exemple, le déficit en vitamines a mis en évidence des troubles cutanés (Heath and Sidbury, 2006). Au contraire, une alimentation riche en antioxydants peut retarder le vieillissement cutané. Dans une étude, l'apport élevé en vitamine C est associé à une probabilité plus faible d'apparition des rides (Cosgrove et al., 2007). De plus, la consommation élevée de légumes, d'huile d'olive, de légumineuses et de poissons semble protéger contre les lésions cutanées (Purba et al., 2001). À l'inverse, une consommation élevée en glucides et en lipides est associée à l'apparition de rides (Cosgrove et al., 2007). Aussi, la viande et les produits laitiers semblent nocifs pour la peau lorsqu'ils sont consommés en grande quantité (Purba et al., 2001).

Le manque de sommeil

La privation de sommeil a une incidence sur l'aspect du visage avec l'apparition de ridules au niveau de la bouche et des yeux (Axelsson et al., 2010; Oyetakin-White et al., 2015; Sundelin et al., 2013).

Le stress

Il semblerait que le stress joue un rôle important dans le vieillissement de la peau. Certaines données confirment que le stress induit une diminution de la perméabilité de l'épiderme et une détérioration de la barrière cutanée (Fukuda et al., 2015; Garg et al., 2001).

Les variations de température

La température de la peau est d'environ 33°C (Krutmann et al., 2017). La lumière du soleil augmente la température de la peau à travers l'exposition aux infrarouges (Kim et al., 2006). Des études montrent que cette augmentation de la température induit l'angiogenèse

cutanée et l'infiltration des cellules immunitaires. Il en résulte une perturbation de la structure de la MEC via la production de MMP. L'architecture du derme est donc affectée, ce qui contribue à l'aspect vieilli de la peau (Cho et al., 2009). La source de chaleur induisant le vieillissement cutané peut provenir d'autres sources que le soleil. En effet, les boulangers exposés à des fours chauds ou bien encore les souffleurs de verre, présentent des signes prématurés de vieillissement au niveau du visage et des bras (Krutmann et al., 2017).

1.4.2. Manifestations du vieillissement extrinsèque

Le vieillissement extrinsèque se traduit au niveau de l'épiderme par un épaissement marqué au niveau de la couche cornée (Tobin, 2017). Au niveau du derme, la peau photo-vieillie est caractérisée par des événements de remodelage cataboliques et anaboliques qui peuvent être spécifiques à un composant de la matrice, hautement localisés et dépendants de la dose de rayonnement UV reçue (Naylor et al., 2011a). De façon générale, les protéines élastiques s'accumulent de façon désorganisée selon un processus appelé « élastose solaire » (Naylor et al., 2011a). Les PG s'accumulent également sous forme d'agrégats. Dans la peau gravement photo-altérée, il y a une perte des collagènes fibrillaires (type I et type III) dans tout le derme (Talwar et al., 1995), et du collagène de type VII dans la jonction dermo-épidermique (Craven et al., 1997). La teneur en GAG dermiques, en particulier l'acide hyaluronique et les GAG contenant du sulfate de chondroïtine, est augmentée et redistribuée. Ces GAG se retrouvent co-localisés avec le réseau de fibres élastiques (Bernstein et al., 1996). Ce remodelage est plus ou moins conséquent en fonction de l'exposition solaire reçue par la peau. Le derme réticulaire se caractérise par une répartition abondante de protéines de fibres élastiques apparemment désorganisées, notamment la tropoélastine, la fibrilline-1, la fibuline-2 et la fibuline-5 (Naylor et al., 2011a).

1.5. Bilan des deux mécanismes

La Figure 15 présente les mécanismes potentiels du vieillissement cutané avec à gauche, le vieillissement intrinsèque ou chronologique, et à droite, le vieillissement extrinsèque ou photovieillissement. Les dommages causés à l'ADN mitochondrial, l'augmentation des ERO et le raccourcissement des télomères jouent un rôle dans le vieillissement intrinsèque. Il en résulte des cellules sénescentes incapables de proliférer correctement et présentant des synthèses protéiques altérées, ce qui conduit à la formation d'une MEC anormale. En revanche, les mécanismes menant au photovieillissement de la peau sont principalement causés par l'adsorption répétitive des rayonnements UV qui peut réguler positivement l'expression des protéases de la MEC. De plus, les rayonnements UV peuvent endommager directement les biomolécules cutanées riches en chromophores et induire la production d'ERO. Ces derniers peuvent à leur tour agir sur les cellules et les composants de la MEC pour les altérer (Naylor et al., 2011a).

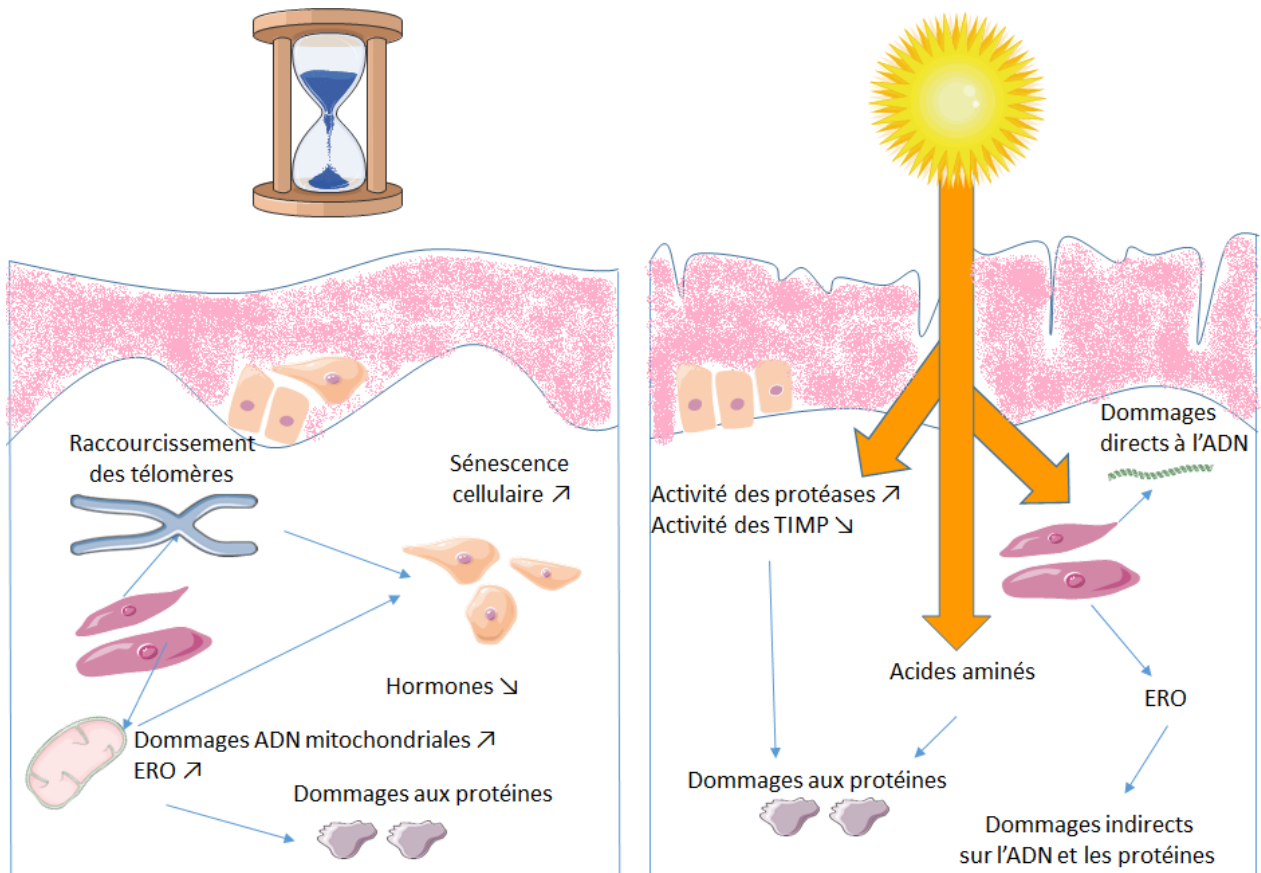


Figure 15 : Mécanismes du vieillissement cutané intrinsèque et extrinsèque (d'après Naylor et al., 2011).

2. Les mécanismes biologiques du vieillissement

2.1. Les processus du vieillissement dans l'épiderme

De nombreuses études ont montré qu'il n'existait pas de corrélation entre l'épaisseur de l'épiderme et l'âge. Cependant, la diminution de l'élasticité cutanée liée à l'âge induit un amincissement global de la peau ainsi qu'une diminution de l'encombrement des cellules épidermiques (Fenske and Lober, 1986). La surface épidermique est fine et régulière chez les sujets jeunes. Avec l'âge, l'architecture de l'épiderme devient plus grossière. Les crêtes épidermiques s'affaissent, la surface de la peau devient irrégulière (Montagna and Carlisle,

1979). La finesse de la peau observée chez les personnes âgées a été attribuée à une perte d'épaisseur au niveau du derme.

Au niveau cellulaire, on observe une diminution de la partie « vivante » de l'épiderme en raison d'une réduction du taux de renouvellement des kératinocytes (Lephart, 2016). Les cellules de la couche basale prennent des formes irrégulières et leur polarité est perturbée. Par contre, la couche cornée voit son épaisseur augmentée par un dysfonctionnement de la desquamation (Lephart, 2016). De plus, les cornéocytes s'appauvrissent en substances hygroscopiques qui assurent la fixation de l'eau. Par conséquent, la diminution quantitative de ces substances, les stérols ou les triglycérides par exemple, entraîne une baisse de l'hydratation de la peau (Wang and Wu, 2019). En ce qui concerne les mélanocytes, il en existe deux types : les mélanocytes DOPA-positifs caractérisés par la formation de pigments, et les mélanocytes DOPA-négatifs. Le nombre de mélanocytes enzymatiquement actifs diminue, ce qui fragilise la protection contre les rayons solaires (Tobin, 2017). De plus, la densité de mélanocytes devient hétérogène. La conséquence est l'apparition d'une pigmentation inégale avec des zones riches en cellules actives et des zones dépourvues de mélanocytes DOPA-positifs. Ces phénomènes expliquent la présence de taches pigmentées ou au contraire la présence de taches achromatiques (Kadono et al., 2001). Enfin, on note également une réduction de moitié de la densité des cellules de Langerhans (Tobin, 2017). Ces cellules étant chargées de la défense immunitaire, cette réduction provoque une sensibilité accrue aux infections cutanées chez les personnes âgées.

2.2. Les processus du vieillissement dans le derme

Les ERO générés lors du vieillissement cutané induisent la production excessive de MMP et l'inhibition de la voie TGF- β (pour *Transforming growth factor-beta*, en anglais). Par conséquent, les fibres de collagène se fragmentent et leur biosynthèse diminue.

Les fibroblastes se retrouvent alors dans une matrice anormale et leur interaction avec la MEC est altérée. Mal ancrés, les fibroblastes acquièrent des formes moins allongées et leur taille diminue. Dans cette configuration, les fibroblastes produisent moins de collagène. De plus, les fibroblastes âgés produisent davantage de ERO, ce qui conduit à l'inhibition de la voie TGF- β (*transforming growth factor-beta*) et l'augmentation des MMP. Tous ces processus créent alors une boucle qui accélère le vieillissement.

2.2.1. Changements au niveau du collagène

Les modifications quantitatives et structurelles des fibres de collagène sont les principales modifications liées à l'âge (El-Domyati et al., 2002; Fisher et al., 1997; Quan and Fisher, 2015a). Dans les peaux jeunes, les fibres de collagène sont abondantes et bien organisées Figure 16. Au contraire dans les peaux âgées, ces fibres sont fragmentées et hétérogènes (Quan and Fisher, 2015a; Yasui et al., 2013). La dégradation accrue de collagène et la réduction de sa biosynthèse par les fibroblastes expliquent les modifications cliniques retrouvées dans le vieillissement cutané (Fisher et al., 1997, 2008; Quan et al., 2010). L'apparition de rides et la perte d'élasticité sont observées dans le vieillissement intrinsèque et extrinsèque (Fisher et al., 1997; Varani et al., 2000).

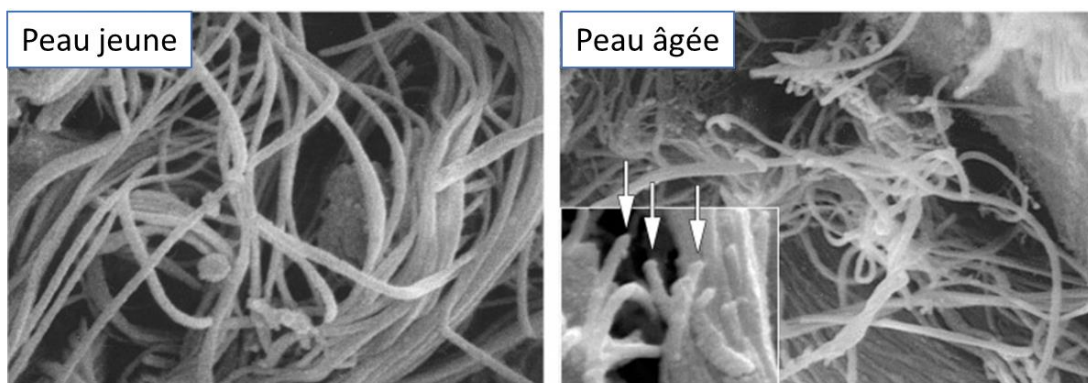


Figure 16 : Organisation des fibrilles de collagène dans le derme de la peau jeune (grossissement initial $\times 10\,000$) et âgée (grossissement initial $\times 8\,000$ et $\times 12\,500$) par microscopie électronique à balayage (d'après Cole et al., 2018).

2.2.2. Augmentation des niveaux des métalloprotéinases matricielles (MMPs)

Les MMPs sont des protéases ubiquitaires capables de dégrader les protéines de la MEC (Verma and Hansch, 2007). Il existe plusieurs types de MMPs : les collagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13); les gélatinases A et B (MMP-2 et MMP-9); les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11); les matrilysines (MMP-7 et MMP-26); et les MMPs membranaires (MMP-14, MMP-15, MMP-16 et MMP-17) (Pittayapruek et al., 2016a). Dans la peau, le collagène est clivé initialement par MMP1 puis par MMP-3 et MMP-9 (Brennan et al., 2003; Fisher et al., 1996). Ce sont principalement les fibroblastes et les kératinocytes qui produisent les MMPs dans la peau (Parks, 1999). Les cellules de Langerhans produisent également des MMP-9 afin de dégrader le collagène de type IV (Kobayashi, 1997). Les MMPs sont régulées par les inhibiteurs spécifiques appelés TIMP (pour *Tissue inhibitors of matrix metalloprotease*, anglais) qui peuvent être classés en quatre sous-groupes : TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 (Nagase et al., 2006).

Dans les peaux âgées, la quantité de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-13, MMP-17, MMP-26 et MMP-27 est plus élevée que dans une peau jeune. Les MMPs ne sont pas régulées par les TIMPs puisque leur concentration n'est pas augmentée (Qin et al., 2017; Quan et al., 2013). La fragmentation du collagène s'accélère avec l'âge notamment à cause de la diminution de TIMP-1 (Yokose et al., 2012).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont principalement responsables de l'augmentation des MMPs dans la peau âgée (Golden et al., 2002; Quan and Fisher, 2015a; Stadtman, 1992). Dans la peau, les ERO sont générés de façon intrinsèque et extrinsèque via respectivement, le métabolisme normal de l'oxygène et l'exposition aux facteurs

extérieurs. L'irradiation aux UV étant le facteur extrinsèque majeur. Les ERO activent les protéines MAPK (pour *mitogen-activated protein kinases*, en anglais) qui activent ERK (pour *extracellular signal-regulated kinase*, en anglais), p38 et JNK (pour *c-Jun NH2-terminal kinase*, en anglais). Cette activation induit l'expression et l'activation du facteur de transcription AP-1 (pour *activator protein 1*, en anglais). Ce dernier joue un rôle essentiel dans la régulation de la transcription des MMP-1, MMP-3, MMP-9 et MMP-12 (Chiang et al., 2013a; Kim et al., 2011a; Park et al., 2014a; Shaulian and Karin, 2002). Le facteur NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) est un autre facteur de transcription impliqué dans l'augmentation des MMPs telles que MMP-1 et MMP-3 dans les fibroblastes cutanés (Park et al., 2014a; Pittayapruek et al., 2016a).

2.2.3. Voie de signalisation TGF- β au cours du vieillissement

Le facteur de croissance TGF- β est une cytokine polypeptidique importante pour la régulation de la biosynthèse des composants de la MEC (Varga et al., 1987). En effet, le TGF- β contrôle l'homéostasie du collagène via la voie de signalisation des Smad (Quan et al., 2010), comme le montre la Figure 17. Dans un premier temps, le ligand TGF- β se lie au récepteur TGF- β de type II qui va recruter et phosphoryler un récepteur TGF- β de type I. La phosphorylation du second récepteur va activer les facteurs de transcription Smad2 et Smad3. Une fois activés, Smad2/Smad3 vont se complexer avec Smad4 pour former un hétéromère. Ce complexe va alors se diriger dans le noyau par translocation afin de se fixer sur ses séquences cibles (Chen et al., 2015a; Hwang et al., 2014a; Sun et al., 2015). Ces séquences se trouvent dans les régions promotrices des gènes cibles de TGF- β . Ces gènes correspondent aux éléments de la MEC, tels que le collagène et la fibronectine, et les TIMPs. Ces derniers sont régulés positivement par TGF- β . En revanche, les gènes cibles régulés négativement par TGF- β correspondent à ceux des MMPs. On en déduit que la voie de signalisation TGF- β est essentielle au maintien de l'homéostasie du derme. Dans la peau

âgée, AP-1 induite par les ERO inhibe la voie de signalisation TGF- β dans les fibroblastes cutanés (Sárdy, 2009).

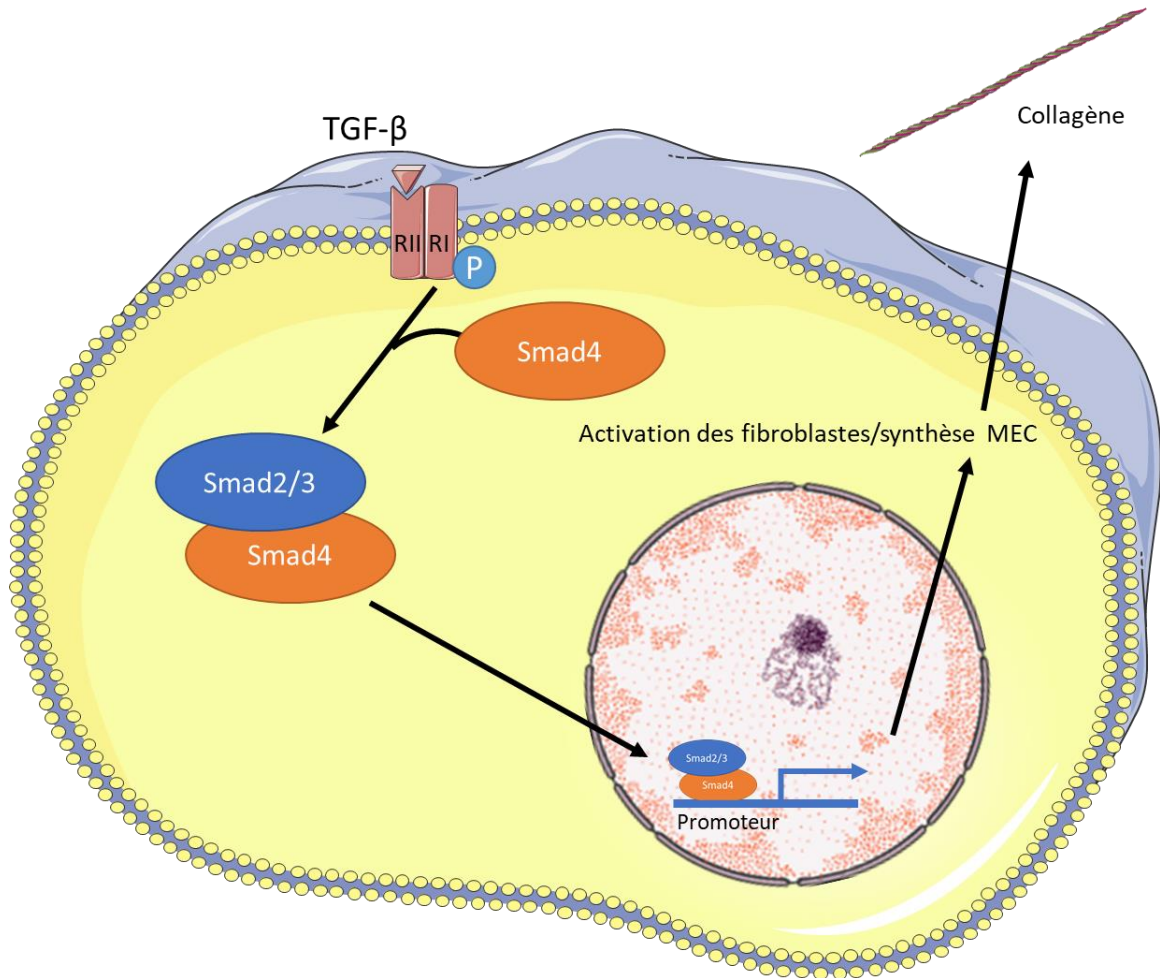


Figure 17 : Voie de signalisation TGF- β pour la production de collagène par les fibroblastes cutanés. La figure a été créée à l'aide de Servier Art :

<https://smart.servier.com>

2.2.4. Interaction entre les fibroblastes et la MEC

Les fibroblastes, en adhérant à la MEC, acquièrent leur forme allongée. Cette adhérence permet également aux fibroblastes d'exercer des forces mécaniques indispensables à leurs mouvements. Dans la peau âgée, l'ancrage et la morphologie des fibroblastes sont

altérés en raison de la destruction de la MEC (Figure 18). Il en résulte alors une diminution de l'allongement et donc de la taille des fibroblastes (Fisher et al., 2008, 2009, 2016; Quan et al., 2013; Varani et al., 2006a). Cette diminution induit la génération de ERO mitochondriales qui vont activer la voie de signalisation AP-1 (Qin et al., 2017; Quan et al., 2015). Une élévation des niveaux de MMP est alors observée (Qin et al., 2017). De plus, la réduction de la taille et de l'allongement des fibroblastes provoque une diminution du récepteur T β RII. Cette régulation à la baisse explique la diminution de la production de la MEC via la voie TGF- β (Fisher et al., 2016). Enfin, la taille réduite des fibroblastes est caractéristique des fibroblastes sénescents, ce qui corrèle avec la diminution de la production de la MEC (Quan et al., 2013).

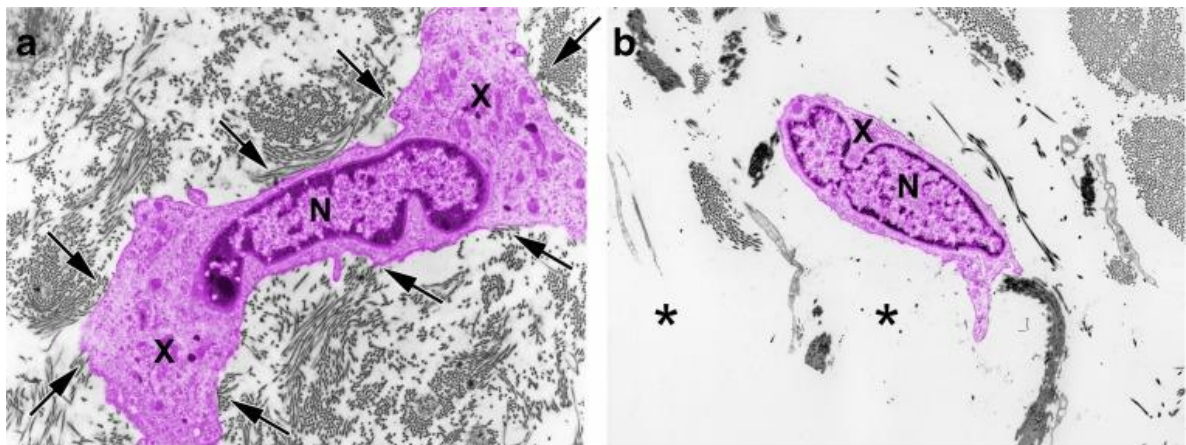


Figure 18 : Morphologie des fibroblastes (colorés en rose pour plus de clarté) dans (a) une peau jeune et (b) une peau photo-âgée par microscopie électronique à transmission au grossissement $\times 2000$ (Cole et al., 2018).

2.2.5. Modifications des autres composants de la MEC

Globalement, l'élastine, les GAG et les PG sont moins synthétisés dans la peau âgée de façon intrinsèque par rapport à une peau jeune. Par contre dans le vieillissement extrinsèque, ces composants se retrouvent accumulés dans le derme mais sous une forme

non fonctionnelle (Naylor et al., 2011b). Ces augmentations observées dans le photovieillissement semblent être un processus compensatoire aux dommages imputés à la MEC (Lee et al., 2016b).

Remodelage de l'élastine

Les fibres élastiques jouent un rôle important dans le soutien et l'élasticité de la peau (Amano, 2016; Doubal and Klemnera, 2002; Naylor et al., 2011a). Elles sont produites dans le derme par les fibroblastes (Weihermann et al., 2017). Les fibres élastiques sont formées à partir d'un précurseur de l'élastine, la tropoélastine, par réticulation des résidus lysine grâce aux lysyl oxydases (LOX) (Noblesse et al., 2004). Une peau jeune est composée de fibres élastiques très ordonnées avec des microfibrilles riches en fibrilline orientées perpendiculairement au niveau du derme papillaire et des grosses fibres élastiques dans le derme réticulaire, constituées d'élastine (Dahlbäck et al., 1990). L'élastine est la protéine responsable de l'élasticité du tissu cutané. Elle confère aux fibres élastiques leur résilience et permet à la peau de reprendre sa position initiale quand elle est étirée.

Dans une peau âgée, la structure des fibres élastiques est modifiée (Figure 19). Dans le vieillissement intrinsèque, les microfibrilles riches en fibrilline du derme papillaire sont dégradées. Prenons exemple de la fibuline-5. Cette glycoprotéine joue un rôle important dans l'association de la tropoélastine avec les microfibrilles pour former les fibres élastiques (Yanagisawa et al., 2002). Dans le vieillissement intrinsèque la fibuline-5 disparaît du derme avec l'âge entraînant un remodelage des fibres élastiques (Amano, 2016; Langton et al., 2012).

Par contre, dans le vieillissement extrinsèque les fibres élastiques s'accumulent dans tout le derme de façon désorganisée (Figure 19). On parle alors d'élastose solaire (Naylor et al., 2011a). Cette désorganisation est due à la dégradation des fibres élastiques par l'activation accrue des MMP, telles que MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12 et MMP-13

(Ashworth et al., 1999; Chakraborti et al., 2003; Fisher et al., 1997). La MMP-12 est la métalloprotéase la plus active dans le processus de dégradation de l'élastine (Chung et al., 2002). Son expression peut être induite par les rayons UV, ce qui conduit au développement de l'élastose solaire. De plus l'expression des enzymes lysyl-oxydases diminue avec l'âge, ce qui entraîne une réduction de l'assemblage des nouvelles fibres élastiques (Cenizo et al., 2006). En résumé, l'élastose solaire est caractérisée par une accumulation de grosses fibres élastiques non fonctionnelles et désorientées alors que le nombre de fibres élastiques fonctionnelles est réduit (Weihermann et al., 2017). Ces modifications sont à l'origine de la perte d'élasticité et de la formation de rides (Naylor et al., 2011a).

Modulation des glycosaminoglycanes (GAG)

Les GAG sont des macromolécules glucidiques présentes dans la MEC. Ces polysaccharides sont catégorisés en six types : la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le kératane sulfate, l'héparane sulfate, l'héparine et l'acide hyaluronique (Lee et al., 2016b; Oh et al., 2011a; Taylor and Gallo, 2006). Les chaînes de GAG peuvent se lier à une protéine afin de former un PG, soit par covalence (GAG sulfatés) soit par des liaisons non covalentes (acide hyaluronique). Les GAG contiennent des charges négatives qui contribuent à la rétention des molécules d'eau. Leur structure peu flexible forme ainsi un gel résistant aux contraintes mécaniques. Prenons l'exemple de l'acide hyaluronique qui s'associe avec les fibres de collagène pour former des structures rigides (Anderegg et al., 2014). Cette configuration joue un rôle dans l'absorption des chocs (Anderegg et al., 2014).

L'acide hyaluronique est l'un des principaux composants de la MEC. Il est composé d'unités répétitives de disaccharides dont l'acide D-glucuronique et la N-acétyl-D-glucosamine. L'acide hyaluronique joue un rôle biologique important dans la peau, notamment dans la régulation de l'hydratation de la peau et l'apparition de rides. Il est principalement produit par les fibroblastes et est retrouvé abondamment dans le derme papillaire (Oh et al., 2011a). Il est également retrouvé dans l'espace intercellulaire de

l'épiderme où il est produit par les kératinocytes. Avec l'âge, la quantité d'acide hyaluronique ne varie pas significativement lorsque l'on parle du vieillissement intrinsèque. Par contre, ses protéines de liaison sont moins nombreuses, ce qui diminue les propriétés de l'acide hyaluronique (Humbert et al., 2003; Oh et al., 2011b). Par exemple, le CD44 est un récepteur identifié à l'origine en tant que récepteur des lymphocytes, et sa liaison à l'acide hyaluronique n'a été démontré que plus tardivement (Yasaka et al., 1995). Le CD44 régule positivement la prolifération la migration et la différenciation cellulaire dans les tissus qui contiennent une quantité importante d'acide hyaluronique (Maytin, 2016). Donc une diminution du CD44 entraîne une diminution de sa liaison avec l'acide hyaluronique et donc réduit l'activation des voies de signalisation régulant la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. Dans le vieillissement extrinsèque, la teneur en acide hyaluronique augmente, notamment dans l'élastose solaire (Maytin, 2016). Cette augmentation peut être expliquée par l'augmentation de l'acide hyaluronique synthétase induite par les UV (Oh et al., 2011a; Tobiishi et al., 2011; Tzellos et al., 2009). L'élastose solaire est donc corrélée à une accumulation d'acide hyaluronique non fonctionnel car il est dégradé par l'acide hyaluronique synthétase.

En ce qui concerne les autres GAG, globalement ils sont réduits dans le vieillissement intrinsèque (Oh et al., 2011b). En effet, l'héparane sulfate et la chondroïtine sulfate diminuent alors que le kératane sulfate augmente (Lee et al., 2016b). Par contre dans le vieillissement extrinsèque, les GAG sulfatés totaux augmentent (Oh et al., 2011b). La Figure 19 illustre de façon simplifiée, le remodelage des GAG.

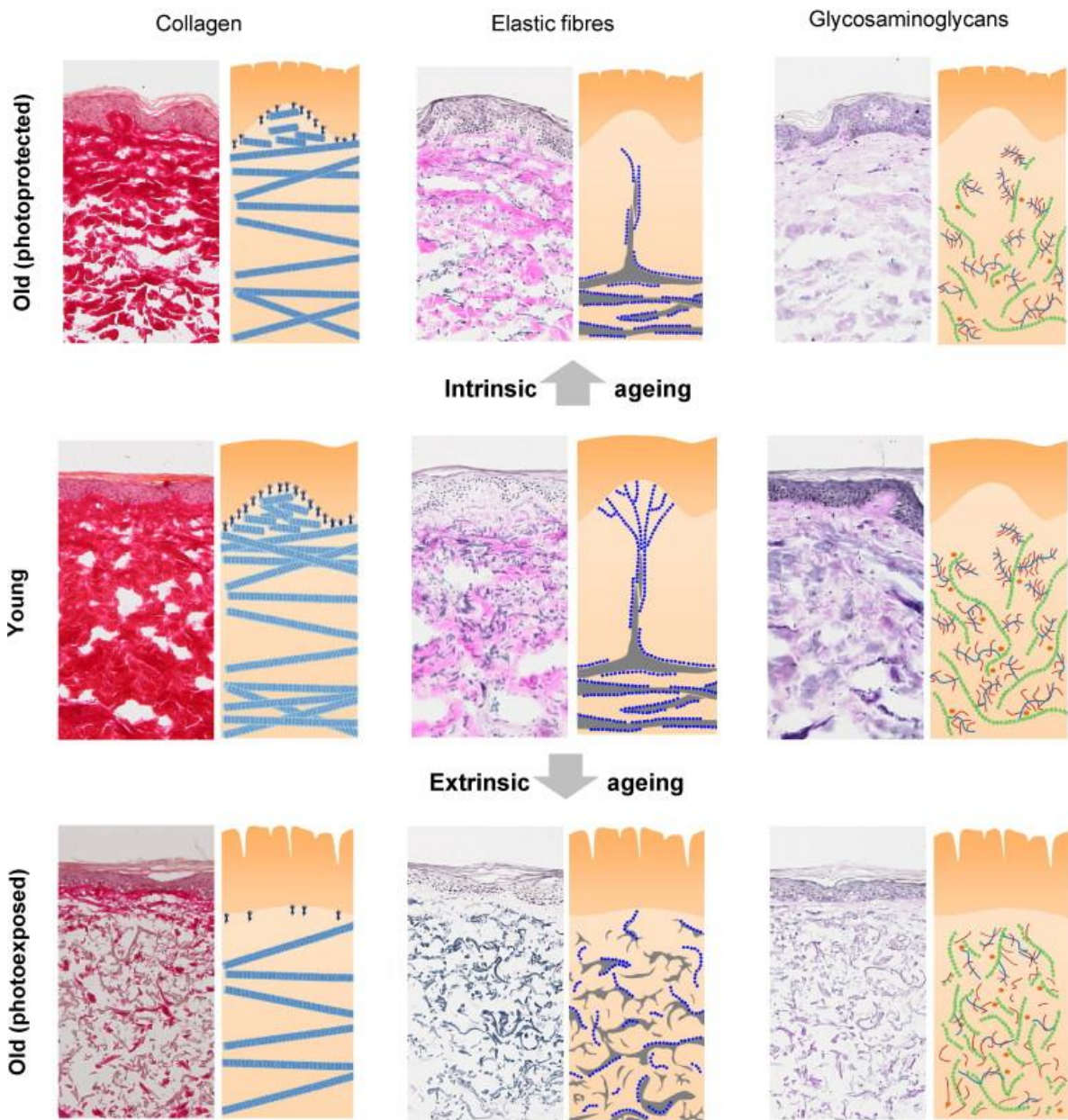


Figure 19 : Remodelage des composants de la MEC dans le vieillissement intrinsèque et extrinsèque (Naylor et al., 2011b).

Changements dans les protéoglycans (PG)

Les PG, également appelés mucopolysaccharides, constituent une famille de protéines associées aux GAG. Ils sont essentiels aux propriétés mécaniques de la peau (Lee et al.,

2016b). La décorine, le biglycane et le versican sont les PG les plus abondants dans la peau humaine (Li et al., 2013). La décorine et le biglycane sont les protéines porteuses du sulfate de dermatane alors que le versican s'associe à la chondroïtine. Dans le vieillissement chronologique, les modifications des PG dépendent de la localisation et du sexe du sujet (Lee et al., 2016b). Dans le photovieillissement, le versicane augmente, le bi-glycane ne varie pas et la décorine disparaît du derme (Bernstein et al., 1995; Lee et al., 2016b).

3. Stress oxydant dans le vieillissement de la peau humaine

Les ERO peuvent avoir des effets bénéfiques dans la mesure où elles agissent en tant que molécules régulatrices dans plusieurs voies de signalisation cellulaire. Par exemple, les ERO peuvent être le premier signal de danger lors de la cicatrisation pour attirer les cellules immunitaires et lutter contre les microorganismes (D'Autréaux and Toledano, 2007; Finkel and Holbrook, 2000; Martin and Feng, 2009). Néanmoins, en règle générale, les ERO sont considérées comme des composés toxiques.

L'une des théories pour expliquer le vieillissement s'appuie sur l'hypothèse émise par Denham Harman en 1956. Selon lui, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) s'accumulent avec le temps et jouent un rôle majeur dans le processus de vieillissement (Harman, 1956). Par la suite, les mitochondries ont été identifiées comme les principales génératrices d'ERO dans les cellules (Harman, 1972). Cette théorie est largement appliquée dans la peau. De tous les tissus, la peau est exposée aux plus hauts niveaux d'ERO. C'est, à part les poumons et les yeux, le seul organe en contact direct avec l'oxygène atmosphérique, y compris les polluants atmosphériques et le gaz naturel nocif d'ozone (Vermeij et al., 2011). De plus, le vieillissement extrinsèque est au moins aussi important que le vieillissement intrinsèque.

Le vieillissement intrinsèque est induit par des facteurs génétiques et des changements physiologiques normaux qui apparaissent avec le temps, alors que le vieillissement extrinsèque est provoqué par l'exposition à divers facteurs environnementaux (Farage et al., 2008a). Le vieillissement conduit à un amincissement des couches cutanées, une sécheresse et une perte de sensibilité. De plus, la fonction de barrière est altérée (Farage et al., 2008b). Par contre, dans le vieillissement extrinsèque, la composition du derme n'est pas la même et par conséquent, la peau s'épaissit (Farage et al., 2013; Zouboulis and Makrantonaki, 2011).

3.1. La production d'ERO dans la peau

Les sources d'ERO dans la cellule sont multiples. Elles peuvent être produites par des enzymes pro-oxydantes (NADPH oxydase et xanthine oxydase), au niveau des mitochondries (chaîne respiratoire), au niveau du peroxysome, par des enzymes de la famille du cytochrome P450, par des cyclooxygénases et des lipoxygénases.

3.1.1. Production d'ERO par les mitochondries

Les mitochondries sont les principales consommatrices de dioxygène dans les cellules. Elles contiennent de nombreuses enzymes capables de transférer un électron à l'oxygène, ce qui entraîne la formation de superoxyde (O_2^-). Ce superoxyde constitue un déchet métabolique qui fait partie de la famille d'ERO nocives pour les constituants cellulaires lorsqu'il se trouve en excès. En faible quantité, il est impliqué dans l'activation de voie de signalisation conduisant à l'adaptation des cellules au stress. Les enzymes mitochondriales connues pour générer des ERO incluent les enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique, l'aconitase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase ; les complexes I, II et III de la chaîne de transport d'électrons ; la pyruvate déshydrogénase et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase ; la dihydroorotate déshydrogénase ; les monoamines oxydases (MAO) A et B ; et cytochrome b5 réductase (Addabbo et al., 2009).

La chaîne respiratoire, appelée également chaîne de transport des électrons, se trouve dans la membrane interne des mitochondries. Les électrons sont introduits dans le complexe I via la NADH et dans le complexe II via $FADH_2$. Puis, les électrons sont transférés dans le complexe III et enfin dans le complexe IV. Dans le complexe IV (le cytochrome c oxydase), les électrons se déposent finalement au niveau de l'oxygène moléculaire, ce qui entraîne la production d' H_2O . Cependant, avant que les électrons n'atteignent le complexe IV, ils peuvent quitter prématurément la chaîne respiratoire par les complexes I et III, formant ainsi du superoxyde (Turrens, 2003). La production d'ERO par les mitochondries

est limitée dans la peau, notamment dans l'épiderme. En effet, les kératinocytes dégradent leurs organites à la fin de leur maturation. Les kératinocytes deviennent alors des cornéocytes : des cellules dépourvues de noyau, mitochondrie et réticulum endoplasmique. Dans l'épiderme, la contribution des mitochondries à la production d'ERO est donc vraie dans les cellules souches et les kératinocytes encore vivants.

3.1.2. Production d'ERO par les peroxysomes

Comme les mitochondries, les peroxysomes sont des sites essentiels pour l'utilisation du dioxygène (Fransen et al., 2012). Les peroxysomes sont des organites cellulaires contenant de nombreuses enzymes catalysant une réaction d'oxydation produisant du peroxyde d'hydrogène. Ces enzymes sont impliquées dans :

- La β -oxydation des acides gras à longues chaînes via les Acyl-CoA oxydase (1, 2 et 3),
- Le catabolisme et l'anabolisme des acides aminés via la D-amino-oxydase et la D-aspartate oxydase (métabolisme de l'aspartate et de l'alanine),
- Le métabolisme du glyoxylate/dicarboxylate via la L- α -hydroxyacide oxydase (1 et 2),
- Et la production de spermidine (substance stimulant l'autophagie) via la polyamine oxydase.

Outre la production de peroxyde d'hydrogène, les peroxysomes produisent également de l'ion superoxyde (O_2^-). La source principale d' O_2^- provient de l'activité de l'enzyme xanthine oxydase (del Río et al., 1992). Celle-ci est présente à la fois dans le cytosol et dans les peroxysomes. Elle catalyse les étapes terminales de la dégradation de la purine, transformant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique et en peroxyde d'hydrogène (del Río et al., 1992).

3.1.3. Production d'ERO dans le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique produit également des ERO. Un complexe de protéine disulfure isomérase/réticulum endoplasmique oxydoréductase-1 génère du peroxyde d'hydrogène. La protéine disulfure isomérase catalyse le repliement correct des protéines par des liaisons disulfures. Pour ce faire, cette isomérase catalyse l'ouverture (réduction) et la fermeture (oxydation) des ponts disulfures entre les résidus de cystéines de certaines protéines dans la lumière du réticulum endoplasmique. La protéine disulfure isomérase est ensuite régénérée par l'oxydoréductase. Lors de cette régénération, l'oxydoréductase produit du peroxyde d'hydrogène à partir du dioxygène (Bhandary et al., 2012).

Le réticulum endoplasmique produit également des ERO à travers des protéines de la famille des cytochromes P450. Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines responsables de la détoxification des xénobiotiques et des composés lipophiles. Pour ce faire,

les cytochromes P450 augmentent leur solubilité en transférant des électrons du NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) au cytochrome P450 via le cytochrome P450 réductase. Les xénobiotiques sont alors hydroxylés. Lors de ce processus, des radicaux libres peuvent être formés (Bae et al., 2011; Gorsky et al., 1984). Les principales enzymes P450 exprimées dans la peau sont les cytochromes 1A1, 1B1, 2B6, 2D6, 2E1, 3A4 et 3A5 (Baron et al., 2001; Yengi et al., 2003).

3.1.4. Production d'ERO dans les membranes

La NOX (NADPH) oxydase est un complexe enzymatique membranaire appartenant à la classe des oxydoréductases. Cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation de la NADPH par le dioxygène (O_2) en $NADP^+$, H^+ et O_2^- . Chez l'homme, il existe sept NOX : NOX1, 2, 3, 4, 5 et DUOX1 et 2. La NOX est composée de 6 sous-unités fonctionnelles : le cytochrome b558,

la Rap 1A, la sous-unité p47^{phox}, la sous-unité p67^{phox}, la sous-unité p40^{phox} et la sous-unité Rac. Le cytochrome b558 est intégré à la membrane. Il est constitué de deux sous-unités : p22^{phox} et Nox2. La protéine G appelée RAP 1A lie le GTP/GDP. Elle est liée au cytochrome b558 et s'active lorsqu'elle est associée avec le GTP. La sous-unité p47^{phox} assure la fonction d'organisateur en assurant la translocation des sous-unités p67^{phox} et p40^{phox} à la membrane. La sous-unité p67^{phox} s'associe au cytochrome b558 afin d'activer l'activité oxydase de l'enzyme. La sous-unité p40^{phox} joue un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique. Enfin, la sous-unité Rac est cytosolique et liée au GDP sous sa forme non activée. Lorsqu'elle est activée, elle se lie au GTP et s'associe au cytochrome b558 sur la membrane.

Contrairement à toutes les autres sources d'ERO évoquées jusqu'à présent, le superoxyde produit par les membranes n'est pas un sous-produit mais il est produit activement. Il a pour rôle de défendre l'hôte contre les micro-organismes (Rinnerthaler et al., 2012). La génération de ERO par le complexe enzymatique NADPH oxydase joue également un rôle dans la modification post-traductionnelle des protéines, et la régulation de l'expression génique (Bedard and Krause, 2007). La NOX peut être trouvée dans différentes membranes telles que la membrane cytoplasmique, la membrane du réticulum endoplasmique ou les mitochondries (Block et al., 2009; Nauseef, 2008). La NADPH oxydase semble être une source majeure d'ERO dans les cellules cutanées exposées aux UV (Beak et al., 2004).

3.1.5. Production d'ERO dans le cytosol

Les ERO sont également produits dans le cytosol en tant que sous-produits du métabolisme de l'acide arachidonique. Les enzymes cyclo-oxygénase et lipoxigénase utilisent l'acide arachidonique comme substrat pour la synthèse de prostaglandine H₂ et des leucotriènes, respectivement. En présence de NADPH ou de NADH, ces enzymes

peuvent produire du superoxyde. Les niveaux d'acide arachidonique sont relativement bas dans la peau mais ils peuvent augmenter au cours du vieillissement (Kim et al., 2010). En effet, une inflammation chronique de faible intensité se produit dans les peaux âgées (Giacomini and Rein, 2010). Le psoriasis et l'eczéma atopique sont d'autres exemples d'inflammation où le taux d'acide arachidonique augmente dans la peau (Ruzicka et al., 1986; Ziboh et al., 2000). La cyclooxygénase et la lipoxygénase semblent être une source majeure d'ERO dans les cellules cutanées exposées aux UV (Ashida et al., 2003; Beak et al., 2004; Pillai et al., 2005).

La réaction de l'oxygène avec les ions fer contribue également à la production d'ERO dans le cytosol. Le superoxyde réagit avec le fer ferrique pour donner du fer ferreux dans le cytosol (réaction de Haber-Weiss). Ensuite le fer ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour donner du fer ferrique, de l'hydroxyle (HO \cdot) et de l'hydroxyde (OH \cdot) (réaction de Fenton). Ces deux radicaux sont plus toxiques pour les cellules que le superoxyde (Barb et al., 1949; Barbusiński, 2009; Trenam et al., 1992).

3.2. Les effets néfastes du soleil sur la peau

L'un des facteurs environnementaux les plus nocifs pour la peau est le rayonnement solaire. Il est indispensable à la vie mais nécessite une protection vis-à-vis des dégâts qu'il engendre au niveau cellulaire. Le rayonnement solaire est défini par différentes radiations qui atteignent la surface de la Terre selon un spectre de 290 à 400 nm. Ce sont des rayonnements UV divisés en trois catégories : les UVA (320-400 nm), les UVB (290-320 nm) et les UVC (200-290 nm). En dessous de 290 nm, les rayonnements solaires n'atteignent quasiment pas la Terre. Le rayonnement UVC est donc bloqué par la couche d'ozone. Une exposition artificielle aux UVC provoque des mutations de l'ADN et augmente considérablement la formation de cancers de la peau (Pfeifer et al., 2005). La distinction entre UVA et UVB se fait à 315-320 nm selon les sources, cette délimitation est artificielle

(Leun, 2004; Parisi and Turner, 2006). Le rayonnement UVB est plus délétère pour les cellules que le rayonnement UVA à dose d'irradiation identique. Cependant, le rayonnement UVA traverse l'atmosphère pratiquement sans être absorbé. Il est donc abondamment présent tout au long de la journée. Les UVA pénètrent dans l'épiderme puis dans le derme. L'intensité de rayonnement des UVA et UVB dépend de plusieurs facteurs dont l'angle solaire, la réflexion par le sol, l'altitude et la présence de nuages ou de particules filtrantes présentes dans le ciel (Diffey, 1998; Parisi and Turner, 2006). La dose d'irradiation (J/m^2) est le produit de l'intensité de rayonnement multipliée par le temps d'exposition et détermine principalement les dommages cutanés causés par les UV. Par exemple, les personnes vivant près de l'équateur reçoivent plus d'UV que les personnes vivant loin de l'équateur. Les personnes qui travaillent en extérieur sont plus exposées aux effets nocifs des rayons solaires que les personnes travaillant en intérieur. L'apparition d'un vieillissement prématuré de la peau et l'apparition de cancers de la peau sont corrélées à cette exposition chronique. Ces observations sont particulièrement vraies pour les zones du corps les plus exposées au soleil comme le visage, la tête, le cou et les mains (Godar, 2005).

3.2.1. La pénétration des UV dans la peau

Les chromophores présents dans la peau absorbent les rayons UV. Cette absorption entraîne des interactions directes ou indirectes en créant des dommages cellulaires (Svobodova et al., 2006). En d'autres mots, les photons peuvent provoquer des dommages cellulaires par le biais de deux mécanismes différents. Soit par absorption directe des UV par des chromophores cellulaires, qui entraînent la formation d'états excités et une réaction chimique ultérieure. Ou encore des mécanismes de photosensibilisation, dans lesquels la lumière UV est absorbée par des sensibilisateurs endogènes (ou exogènes) excités qui vont ultérieurement former des ERO. Ces espèces hautement réactives peuvent interagir avec les macromolécules cellulaires et causer des dommages oxydatifs.

La formation d'ERO par le rayonnement solaire se fait par des voies indirectes. Les UVB ne pénètrent pas profondément dans la peau, ils sont absorbés en grande partie par l'épiderme. Les chromophores endogènes qui absorbent ces UV sont l'ADN, les acides aminés aromatiques des protéines, les lipides, les mélanines, la NADH, la NADPH, les quinones, les porphyrines, les caroténoïdes, l'acide urocanique (Svobodova et al., 2006; Young, 1997). Les coups de soleil sont provoqués en grande partie par les UVB et non les UVA (Diffey, 2002). Par contre, les UVA jouent un rôle important dans le photovieillissement. En effet, ils pénètrent plus profondément dans les couches cutanées, jusqu'au derme. Dans le derme, les UVA endommagent la MEC. Les chromophores transforment l'énergie obtenue par le rayonnement UV en d'autres types d'énergie. Par exemple, la mélanine transforme le rayonnement UV absorbé en chaleur, réduisant ainsi les dommages causés aux cellules et donc le photovieillissement (Ortonne, 2002). La peau de l'homme présente différents degrés de pigmentation en fonction du type et de la densité de mélanine produit par les mélanocytes. Par conséquent, une peau foncée protège d'avantage contre le risque de cancer qu'une peau claire (Ortonne, 2002).

3.2.2. Les dommages directs liés aux UV

Les dommages cellulaires directs et indirects liés aux rayonnements UV, accélèrent le vieillissement cutané. Les UVB sont principalement responsables des dommages directs. Comme cité précédemment, les UVB sont majoritairement arrêtés au niveau de l'épiderme. La couche cornée absorbe ces UV, mais une petite intensité de rayonnement atteint quand même les couches épidermiques viables, causant ainsi des dommages cellulaires (Hussein, 2005; Pfeifer et al., 2005). Le rayonnement UVB pénètre donc moins que celui des UVA mais il est plus intense et provoque plus de dommages directs.

Domages au niveau des acides nucléiques

L'ADN a un maximum d'absorption à 260 nm, ce qui correspond au rayonnement UVC. Donc l'ADN absorbe dans une moindre mesure les UVB et encore moins les UVA qui se situent respectivement à des radiations comprises entre 290-320 nm (UVB) et 320-400 nm (UVA). Néanmoins, les UVA et les UVB engendrent des dommages à l'ADN. Lors de l'absorption des UVB par l'ADN génomique ou mitochondrial, deux bases pyrimidiques (thymine ou cytosine) adjacentes peuvent former des liaisons entre elles, formant un dimère pyrimidique (Goodsell, 2001). Cette réaction photochimique entraîne la formation de photoproduits. En fonction du nombre de liaisons covalentes concernées, il y a formation de cyclobutanes ou de photoproduits 6-4, correspondant à deux liaisons entre les carbones 6-2 et 5-3 ou une liaison entre les carbones 6-4, respectivement (Maverakis et al., 2010). Suite à cette lésion, soit la cellule meurt par apoptose, soit son système de réparation retire l'anomalie, soit une mutation est introduite dans le génome. Les photoproduits 6-4 sont plus facilement réparés par les cellules alors que les cyclobutanes ont tendance à persister. C'est pourquoi ces derniers sont plus délétères pour les cellules. Les cyclobutanes jouent donc un rôle important dans la formation de mutations (Matsumura and Ananthaswamy, 2004). Rappelons que les photoproduits peuvent être engendrés par des liaisons covalentes thymine-thymine ou cytosine-cytosine ou bien encore thymine-cytosine. Le résidu le plus problématique est la cytosine présente dans les photoproduits car elle est instable. Cette cytosine peut réagir avec l'eau et se transformer en uracile (base azotée de l'ARN). L'uracile est semblable à la thymine, ce qui entraîne une confusion lors de la réplication de l'ADN par les polymérase. En effet, une erreur se produit lors de la réplication et par conséquent au lieu de présenter une guanine en face d'une cytosine, la polymérase insère une adénine. Si ces anomalies ne sont pas réparées par le système de réparation par excision de nucléotides, elles provoquent l'apparition de mutations spécifiques aux UV. De plus, les dimères de cyclobutanes sont produits préférentiellement sur des sites pyrimidines avec

des cytosines méthylées. La méthylation des bases cytosines se produit principalement dans les séquences 5'-CG-3 '(CpG) (Tommasi et al., 1997). Ces sites spécifiques sont considérés comme une « signature » des dommages de l'ADN induits par les UV (Ikehata and Ono, 2007). L'absorption du rayonnement UVB par l'ARN peut également avoir des conséquences néfastes. De façon transitoire, lors de la transcription et de la traduction de l'ARN, des mutations dans l'ARNm peuvent conduire à la production de protéines non fonctionnelles (Ljungman and Zhang, 1996).

Dommmages aux mitochondries

L'ADN mitochondrial (ADNmt) possède peu de système de réparation. Il est d'autant plus vulnérable qu'il est proche de la chaîne respiratoire des mitochondries qui constitue un site de production des ERO. De plus, une mitochondrie endommagée produit davantage d'ERO. C'est pour cette raison que la production d'ERO induit par les UV, ainsi que les dommages constitutifs, continuent des semaines après l'exposition au soleil (Birch-Machin and Swalwell, 2010). Les UVA sont moins énergétiques que les UVB. Cependant, ils traversent la peau avec une plus grande intensité. Une des conséquences de l'exposition au rayonnement UVA est la cassure directe des brins d'ADN. Ce phénomène reste néanmoins peu probable. En général, il se produit une oxydation de l'ADN. Il s'agit d'un dommage indirect que nous verrons dans la partie « 3.2.3. *Les dommages indirects liés aux UV* ».

Dommmages au niveau des protéines

Les protéines, de par la présence d'acides aminés aromatiques, absorbent à 280 nm. Elles peuvent également absorber les UVA et les UVB, ce qui peut modifier leur structure spatiale. Ces modifications entraînent des dysfonctionnements importants. Les protéines potentiellement touchées sont par exemple : les enzymes antioxydantes, les transporteurs, les récepteurs, et les protéines du cytosquelette. Les acides aminés aromatiques qui

absorbent les UV sont la phénylalanine, la tyrosine et surtout le tryptophane (Watson et al., 2013). L'absorption des UVB peut entraîner la production de radicaux par photo-ionisation aussi appelée photo-oxydation de type I. Lors de ce processus, du superoxyde est formé. Un stress oxydant peut alors conduire à la dégradation des protéines présentes dans les cellules cutanées. Les protéines ainsi modifiées perdent leur fonction (enzymatique ou structurelle), ce qui menace la survie des cellules. Les protéines endommagées sont dégradées par le système ubiquitine/protéasome (Kriegenburg et al., 2011).

3.2.3. Les dommages indirects liés aux UV

Les oxydants

Les rayonnements UV peuvent provoquer des dommages biologiques et accélérer le vieillissement par des voies indirectes. Ces voies sont dues à l'absorption des rayonnements solaires par des photosensibilisants endogènes ou exogènes. Contrairement aux UVB, les UVA sont moins arrêtés par les constituants de l'épiderme, ils pénètrent donc plus profondément dans le derme. Les constituants de l'épiderme et du derme absorbent l'énergie et entrent dans un état excité (Pattison and Davies, 2006). Cette énergie est restituée sous forme de chaleur, de fluorescence ou de phosphofluorescence. Les liaisons covalentes peuvent être rompues si l'énergie est intense, générant des photoproduits. Les photosensibilisants excités peuvent endommager la peau selon deux types de réactions. Ils peuvent réagir directement avec un constituant cellulaire pour former des produits stables ou des radicaux libres. Ou, ils peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire et former des radicaux libres. Dans le deuxième cas, de l'oxygène singulet peut être généré (Kammeyer and Luiten, 2015).

La SOD est une enzyme antioxydante capable de transformer le superoxyde (O_2^-) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un radical moins réactif. Ce radical peut réagir ensuite avec la CAT pour donner les produits suivants : $H_2O_2 + O_2$. Ou il peut réagir avec la GPx pour

donner de l'H₂O. Une dernière possibilité est la réaction avec l'H₂O₂ et la myéloperoxydase (MPO) pour produire deux acides hypochloreux (HOCl) (Folkes et al., 1995). Si l'H₂O₂ n'est pas suffisamment neutralisé par les antioxydants, il peut former des ions hydroxydes et radicaux hydroxydes (Bissett et al., 1991), comme déjà évoqué à la partie « 3.1.5 Production d'ERO dans le cytosol ». L'ion hydroxyde est très réactif. Il peut également être produit par photolyse, lorsque l'H₂O₂ est exposé aux UVB. Une forte production d'ERO entraîne un stress oxydant qui se manifeste par des dommages au niveau des constituants cellulaires (Kammeyer and Luiten, 2015). Les ERO jouent un rôle dans la cancérogénèse et la dégénérescence tissulaire, qui contribuent à une accélération du vieillissement cutané.

Les dommages lipidiques

Les lipides sont les principaux composants structurels de la membrane cytoplasmique. Ils sont retrouvés sous forme de phospholipides. La peroxydation lipidique des chaînes d'acides gras insaturés par les ERO, provenant des rayonnements UV, induit la formation des hydroperoxydes lipidiques. Cette peroxydation est proportionnelle au degré d'insaturation des acides gras. Des concentrations importantes de lipides peroxydés perturbent l'intégrité des membranes et donc des cellules impliquées (Girotti, 2001). Les lipides peroxydés retrouvés dans les cellules sont le MDA (malondialdéhyde), le 4-hydroxynonéal et des aldéhydes (Barrera et al., 2018; Marnett, 1999).

Les dommages à l'ADN et à l'ARN

Les ERO peuvent endommager l'ADN de façon indirecte par l'oxydation de la guanine en 8-oxoguanine (Kasai et al., 1986). Lors de la réplication, la 8-oxoxyguanosine génère une substitution de guanine en thymine et une incorporation de 8-oxoguanine provoque une substitution d'une adénine en cystéine (Cheng et al., 1992). Par conséquent, ces transformations entraînent des dysfonctionnements cellulaires si elles ne sont pas réparées par les systèmes de réparation de l'ADN.

L'ARN est plus sensible aux dommages causés par les ERO car il est simple brin et donc plus accessible aux ERO. De plus, il n'est ni protégé par le noyau ni par les histones (Li et al., 2006). Comme évoqué pour l'ADN, les lésions d'oxydation (8-oxoguanine) entraînent également une diminution de l'efficacité de la traduction, ce qui engendrent des protéines anormales avec entre autres des fonctions altérées (Dukan et al., 2000).

Les dommages aux mitochondries

La fréquence de mutation est plus élevée dans l'ADNmt que dans l'ADN génomique en raison d'une absence de système de réparation efficace et de l'absence d'histones (Yakes and Van Houten, 1997). Les mutations de l'ADNmt s'accumulent au cours du vieillissement. Fréquemment une délétion de 4 977 paires de bases se produit dans l'ADNmt lors d'une exposition aux UVA. Cette mutation est proportionnelle au temps d'exposition et à la dose reçue par les cellules. De plus, elle est corrélée à la production d'oxygène singulet par les mitochondries (Berneburg et al., 1999). Les dommages à l'ADNmt entraînent une altération du processus de phosphorylation oxydative, aboutissant à la production accrue d'oxygène singulet. À son tour, cette production engendre de nouvelles mutations au niveau de l'ADNmt (Wallace et al., 1998).

Les dommages aux protéines

Les protéines exposées aux ERO, subissent des changements dans leur conformation. Lorsqu'il s'agit de l'élastine ou du collagène, les propriétés mécaniques de la peau sont altérées. La dégradation du collagène et l'accumulation anormale d'élastine sont visibles dans le photovieillissement (Krieg et al., 1988). Ces changements sont dus à l'oxydation de certains acides aminés (Stadtman, 1995).

3.2.4. Dommages au tissu conjonctif de la peau causés par les UV

Après une exposition chronique aux UV, la MEC présente des dommages visibles au niveau du collagène, de l'élastine et des GAG. Bien que certains mécanismes de vieillissement se chevauchent, le vieillissement chronologique et le photovieillissement présentent des changements différents au niveau de la MEC. Le vieillissement chronologique est caractérisé par une peau présentant une atrophie des structures dermiques, alors que le photovieillissement est caractérisé par l'accumulation aberrante de fibres d'élastine et de GAG, ainsi que par du collagène fragmenté (Scharffetter-Kochanek et al., 2000).

Les dommages aux collagènes

Les ERO induites par les UVA et les UVB stimulent la synthèse des métalloprotéases matricielles (MMP) dans le derme et au niveau de la lame basale (Birkedal-Hansen, 1987). Les MMP jouent un rôle complexe dans le vieillissement de la peau. En effet, elles vont dégrader le collagène, modifiant ainsi les propriétés structurelles du derme.

Par ailleurs, la génération d'ERO par les UVA et UVB activent certaines voies de signalisation dont AKT, ERK, JNK et p38 via la phosphorylation des MAPK. Ce qui conduit de façon directe ou indirecte à l'oxydation des lipides, de l'ADN ou des protéines (Fisher et al., 1998). Pour ce faire, ces phénomènes d'oxydation inactivent les récepteurs cellulaires de surface, tels que les récepteurs IL-1, TNF- α (pour *Tumor necrosis factor alpha*, en anglais) ou les facteurs de croissance EGF (pour *Epidermal growth factor*, en anglais), au niveau des membranes cellulaires des fibroblastes et des kératinocytes (Xu et al., 2006). Une fois activée, la voie MAPK induit la transcription des facteurs AP-1 et NF κ B. Ils vont à leur tour, activer la transcription d'une gamme de gènes incluant les MMP (MMP-1,-2,-3 et -9) et des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, VEGF et TNF- α). De plus, ils vont inhiber la voie de signalisation du TGF- β . En effet, dans la littérature il a été montré que les UV inhibait

le récepteur TGF- β de type II (T β RII) (Quan et al., 2004). Ce qui provoque l'inhibition de la voie du TGF- β , provoquant ainsi la diminution de la production de procollagène de type I et III (Talwar et al., 1995). En parallèle, les cytokines pro-inflammatoires favorisent l'infiltration des neutrophiles, et par la même occasion la production de MMP-8. Enfin, la production de MMP favorise la dégradation du collagène de type I, III et IV, ainsi que la dégradation de l'élastine (Sárdy, 2009).

Les TIMP (*Tissue inhibitors of matrix metalloprotease*) sont des inhibiteurs des MMP. La balance entre les TIMP et les MMP est essentielle à l'homéostasie du derme (Hall et al., 2003). Suite aux rayonnements UV, TIMP-1 n'est que légèrement augmenté (Lahmann et al., 2001b), et l'expression de TIMP-2 n'est pas régulée positivement (Oh et al., 2004). La balance TIMP/MMP est donc en faveur des MMP, et par conséquent le collagène est dégradé.

Les dommages à l'élastine

Lors du photovieillissement, l'élastine présente dans le derme est anormale, agrégée et ramifiée (Naylor et al., 2011a). Ceci est dû à plusieurs facteurs que sont : la synthèse incorrecte de l'élastine, la dégradation induite par les UV ou les ERO, et la dégradation accrue provoquée par les élastases. Ces élastases sont sécrétées par les macrophages, les neutrophiles et les fibroblastes suite à une inflammation induite par les UV (Starcher and Conrad, 1995). Ces cellules produisent également des MMP comme la MMP-2, MMP-9 et la MMP-12 (Codriansky et al., 2009). Ces MMP sont également directement produites par les ERO via l'activation des voies de signalisation. Les ERO générées lors de l'inflammation peuvent également affecter l'assemblage des fibres élastiques (Akhtar et al., 2010).

Les dommages aux GAG

Les GAG ne sont pas des chromophores car ils n'absorbent pas directement les rayonnements UV. Les dommages sont indirects et se traduisent par une destruction

du squelette disaccharidique de ces composés par les ERO générées par les UV. Par exemple, l'acide hyaluronique présent dans la peau exposée aux UVB de façon chronique, subit une perte de densité dans le derme contribuant au phénotype sénescence des fibroblastes dermiques (Dai et al., 2007).

3.3. Les cytokines induites par les ERO

Les agressions environnementales telles que les rayons UV, l'exposition à des produits chimiques, à la fumée de cigarette, ou bien encore à des polluants, contribuent à la génération d'ERO. Ces ERO stimulent les processus d'inflammation cutanée (Pillai et al., 2005). Les premiers effets induits par les rayonnements UV sont la libération de cytokines pro-inflammatoires par les kératinocytes. Ces derniers sécrètent de l'IL-1 et du TNF- α (Köck et al., 1990; Wood et al., 1996). De plus, l'une des premières réponses détectables après l'irradiation des cellules aux UV est l'activation des récepteurs de surface des cytokines (Rittié and Fisher, 2002). L'irradiation UV active le facteur de transcription NF- κ B qui stimule la transcription des cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF- α , l'IL-6 (interleukine-6) et l'IL-8 (interleukine-8). Les cytokines induites par les rayons UV agissent ensuite par l'intermédiaire de leurs récepteurs de surface cellulaire pour activer NF- κ B (pour *Nuclear factor-kappa B*, en anglais) et ainsi amplifier la réponse UV (Fisher et al., 2002).

3.3.1. TNF- α

Dans la peau, le TNF- α est produit par les fibroblastes (Bashir et al., 2009a), les macrophages, les monocytes et les kératinocytes (Feliciani et al., 1996). Il s'agit d'une protéine membranaire qui peut être sécrétée après un clivage enzymatique. Le rayonnement UVB favorise la production de TNF- α par les fibroblastes dermiques et les kératinocytes épidermiques, ce qui augmente l'inflammation (Bashir et al., 2009b). Le TNF- α joue un rôle clé dans les réponses inflammatoires qui se produisent dans la peau. En effet, il est capable de moduler l'expression des MMP dont MMP-9 qui endommage

l'épiderme de façon irréversible (Youn et al., 2011). TNF- α augmente l'activité de liaison des facteurs AP-1 et NF- κ B sur séquences cibles, entraînant alors l'expression des MMP (Crawford and Matrisian, 1996; Youn et al., 2011).

3.3.2. IL-6

IL-6 est impliqué dans la régulation d'une multitude de fonctions cellulaires, notamment la prolifération, l'apoptose, l'angiogenèse et la différenciation. Dans la peau, IL-6 est produit par les kératinocytes suite à une induction par TGF- α (pour *Transforming growth factor-alpha*, en anglais) (Aragane et al., 1996). Son taux augmente après une exposition aux UVB dans les kératinocytes (Chung et al., 1996) et dans les fibroblastes (Brenneisen et al., 1999).

3.3.2. IL-8

IL-8 semble favoriser le développement d'un certain nombre de maladies cutanées (Bachelor and Bowden, 2004). Son expression est régulée par des inducteurs du stress oxydant en association avec la voie de signalisation AP-1. L'irradiation des kératinocytes avec les UVA induit l'expression d'IL-8 via la voie de signalisation AP-1 (Wu et al., 2008a).

3.4. Les capacités antioxydantes de la peau

Pour se défendre contre les dommages causés par les ERO et les ERN, des systèmes de défense sont mis en place dans les cellules afin de créer une barrière antioxydante protectrice (Kohen, 1999; Shindo et al., 1994). Le but étant de prévenir ou de réparer un excès de ces oxydants. Les antioxydants ont pour fonction de maintenir l'homéostasie de l'oxygène et non d'éliminer complètement tous les oxydants car ils peuvent avoir des fonctions importantes (Rhee, 2006).

3.4.1. Les antioxydants

Les antioxydants de la peau peuvent être des antioxydants de faible poids moléculaire, des enzymes ou des protéines détoxifiantes. Dans le groupe d'antioxydants de bas poids moléculaire, on retrouve l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), l'acide urique, le glutathion et l'ubiquinol. Ils sont tous capables de neutraliser les ERO (Kohen, 1999). En ce qui concerne les enzymes, on retrouve la SOD, la CAT, la GPx et la glutathion réductase (GR), qui permet de détoxifier activement les ERO (McCord and Fridovich, 1969; Schallreuter and Wood, 1989). Des protéines, appelée SPRR (pour *Small proline rich proteins*, en anglais), interviennent dans le processus de détoxification. Elles interviennent soit par extinction directe, soit par régulation indirecte des voies de signalisation qui activent le système de défense antioxydant (D'Autréaux and Toledano, 2007; Winyard et al., 2005). De manière générale, la production d'ERO est plus intense au niveau des couches les plus externes de l'épiderme car ces couches sont davantage exposées aux facteurs environnementaux. C'est pourquoi les antioxydants de la peau sont présents à des niveaux plus élevés dans les couches les plus externes de l'épiderme afin de contrer cette production d'ERO (Shindo et al., 1994). La Figure 20 illustre de façon simplifiée la production d'ERO et leur système de détoxification.

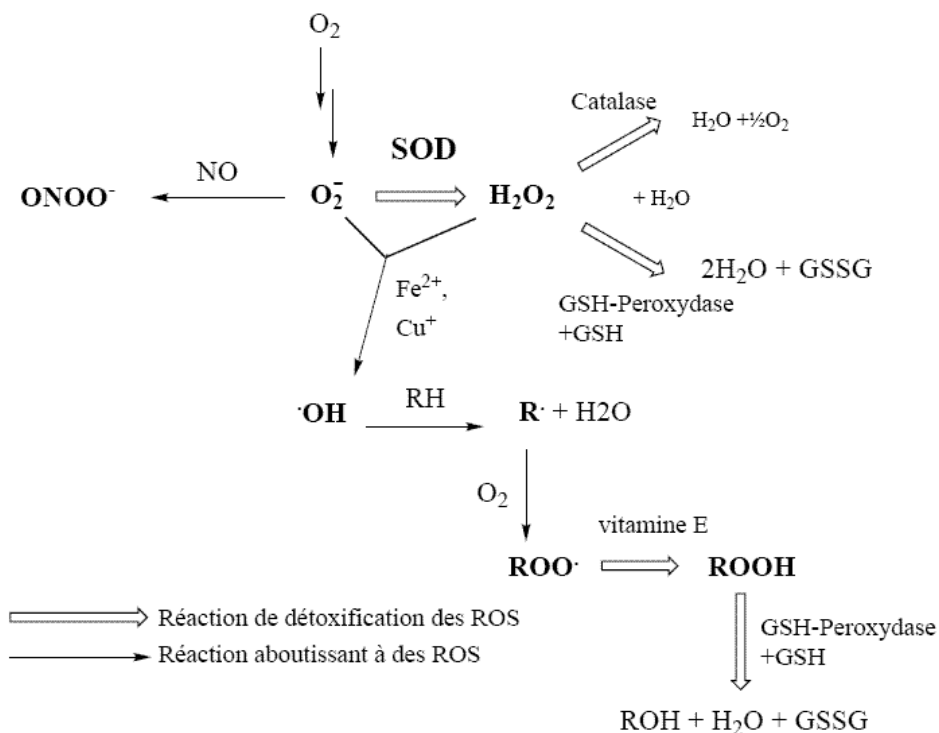
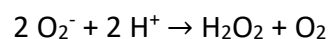


Figure 20 : La production d'ERO et leur système de détoxification (version simplifiée).
https://fr.wikipedia.org/wiki/Stress_oxydant

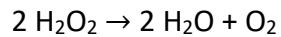
Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD représente la première défense de l'organisme contre le stress oxydant. Elle assure l'élimination de l'anion superoxyde en formant du peroxyde d'hydrogène par une réaction de dismutation. Ensuite, l' H_2O_2 est utilisé par des enzymes à activité peroxydase. Chez les mammifères, il existe trois isoenzymes : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse (SOD2) et une forme extracellulaire (SOD3). Ces enzymes diffèrent par leur emplacement chromosomique, leur structure quaternaire, leur teneur en métal et leur localisation cellulaire (Fridovich, 1975a).



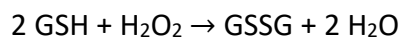
Catalase (CAT)

La CAT catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. La CAT se situe principalement dans le peroxysome, mais aussi dans le cytoplasme. Elle protège contre les effets nocifs de quantités excessives de H₂O₂ (Aebi, 1984a).

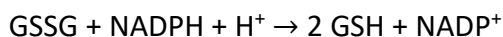


Glutathion peroxydase (GPx)

La GPx est un système complet qui réduit les peroxydes au détriment de son substrat spécifique, le GSH (glutathion réduit). La GPx joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H₂O₂. Son rôle principal est l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les lipides polyinsaturés. La réaction catalysée par GPx nécessite la présence de GSH comme donneur d'électrons.



Le produit formé est le GSSG (glutathion oxydé). La GSSG est ensuite réduite par le glutathion réductase (GR) avec le NADPH. Le rapport GSH / GSSG est un indice de l'état d'oxydation des cellules. Il existe plusieurs isoformes de GPx contenant du sélénium : GPx cytosolique et mitochondrial, GPx cytosolique et GPx extracellulaire (Ighodaro and Akinloye, 2018).



3.4.2. NRF2, le régulateur de la signalisation redox

NRF2 (pour *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*, en anglais) est un facteur de transcription essentiel contre le stress oxydant et le stress électrophile. Des preuves évidentes ont démontré son rôle primordial dans l'équilibre des réactions d'oxydo-réduction par l'activation d'une large variété des gènes impliqués dans la défense

antioxydante. En effet, son rôle protecteur consiste à induire l'expression d'enzymes spécifiques. Il s'agit d'enzymes antioxydantes, d'enzymes de phase II (dites de conjugaison) et d'enzymes de détoxification. Ces enzymes contiennent des séquences d'ADN ARE (pour *Antioxidant response element*, en anglais) et EpRE (pour *Electrophilic response element*, en anglais) sur leurs promoteurs. Les cibles de NRF2 sont donc des enzymes chélateurs des ERO, des enzymes de détoxification ou des enzymes de phase II. Plusieurs études ont mis en évidence les gènes régulés par NRF2, comme par exemple les gènes impliqués dans la biosynthèse du glutathion (γ -GCS, GCL, GR, G6PDH, GST et GPx), les gènes NQO1, HO-1, SOD, CAT et TRXR¹.

En condition physiologique, NRF2 est maintenu dans le cytoplasme en formant un complexe inactif avec la protéine KEAP-1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*). KEAP-1 est ancré au cytosquelette via l'actine. La liaison entre NRF2 et KEAP-1 facilite l'ubiquitination et la protéolyse de NRF2 via le complexe Cul3-based E3. KEAP-1 est un régulateur essentiel de la réponse antioxydante puisqu'il capte les changements d'oxydo-réduction par certaines de ses cystéines. En effet, son domaine N-terminal contient le résidu Cys151 qui est important pour la détection du stress oxydant. Son domaine IVR (*Intervening Region*) contient les résidus Cys273 et Cys288, qui interviennent également dans la détection du stress oxydant. Son domaine DGR (pour *Double Glycine Repeat*, en anglais) et son domaine C-terminal forment une structure permettant d'interagir avec NRF2. La phosphorylation de NRF2 au niveau de ses résidus sérine et/ou tyrosine provoque également la libération de NRF2. Son activité peut donc être augmentée via la stabilisation de la protéine par des modifications de KEAP-1 ou la phosphorylation de NRF2.

¹ Abréviations : γ -GCS (*Gamma-glutamylcysteine synthetase*), GCL (*Glutamate cysteine ligase*), GR (*Glutathion reductase*), G6PDH (*Glucose-6-phosphate déshydrogenase*), GST (*Glutathion S-transferase*), NQO1 (*NAD(P)H deshydrogenase [quinone] 1*), HO-1 (*Heme oxydase-1*), et TRXR (*Thioredoxin reductase*)

Le facteur de transcription NRF2 est exprimé dans tous les types cellulaires de la peau (Schäfer and Werner, 2015). De plus, un gradient d'expression et d'activité de NRF2 a été détecté dans l'épiderme (Schäfer et al., 2010). En effet, la protection contre les ERO dépendante de NRF2 est plus élevée dans les couches les plus différenciées que dans la couche basale. De nombreuses études montrent que le rayonnement UVB n'active pas NRF2 ni dans les kératinocytes ni dans les fibroblastes. En revanche, le rayonnement UVA active NRF2 dans les fibroblastes. Dans les kératinocytes, les UVA ont un effet controversé sur l'activation de NRF2 (Schäfer and Werner, 2015).

4. L'andrographolide, une biomolécule anti-âge ?

Les ERO, notamment ceux produits par les UV, sont largement responsables de l'accélération du vieillissement cutané. C'est pourquoi, l'utilisation de produits cosmétiques antioxydants est une piste privilégiée par les industries cosmétiques. Que ces produits aient un effet direct ou indirect sur le stress oxydant, leur utilisation permettrait de réduire les effets sur les cellules cutanées et la détérioration de la MEC. De manière générale, les antioxydants aideraient à maintenir le tissu cutané en bon état. La recherche de nouveaux actifs, en ciblant les effets antioxydants, anti-inflammatoires et/ou régénérants matriciels, peut répondre aux demandes des industriels. Le projet s'est focalisé sur la plante *Andrographis paniculata* et ses diterpènes labdanes (Figure 21). Cette plante est largement utilisée en Chine, en Inde et en Asie du Sud-Est pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures. L'andrographolide est son principal composant biologiquement actif. D'autres analogues de l'andrographolide sont présents dans l'*Andrographis paniculata*, tels que la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide. De nombreuses études ont révélé des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de ces diterpènes labdanes (Hanh et al., 2020; Luo et al., 2020), mais la recherche sur la peau, notamment sur le vieillissement cutané, est très peu documentée.



Figure 21 : Photographie de la plante *Andrographis paniculata* (https://fr.wikipedia.org/wiki/Andrographis_paniculata)

Un rappel, les diterpènes labdanes sont des molécules chimiques de la famille des terpènes qui sont des hydrocarbures polyinsaturés présents dans les plantes (Figure 22). Les terpènes sont constitués par la répétition d'unités isopréniques : $(C_5H_8)_n$. Les diterpènes sont formés de 20 carbones avec 4 unités d'isoprènes. Le terme « labdane » désigne les diterpènes bi-cycliques naturels. L'andrographolide et ses dérivés contiennent un motif lactone. Il s'agit d'un groupement ester cyclique, ici un cyclopentane.

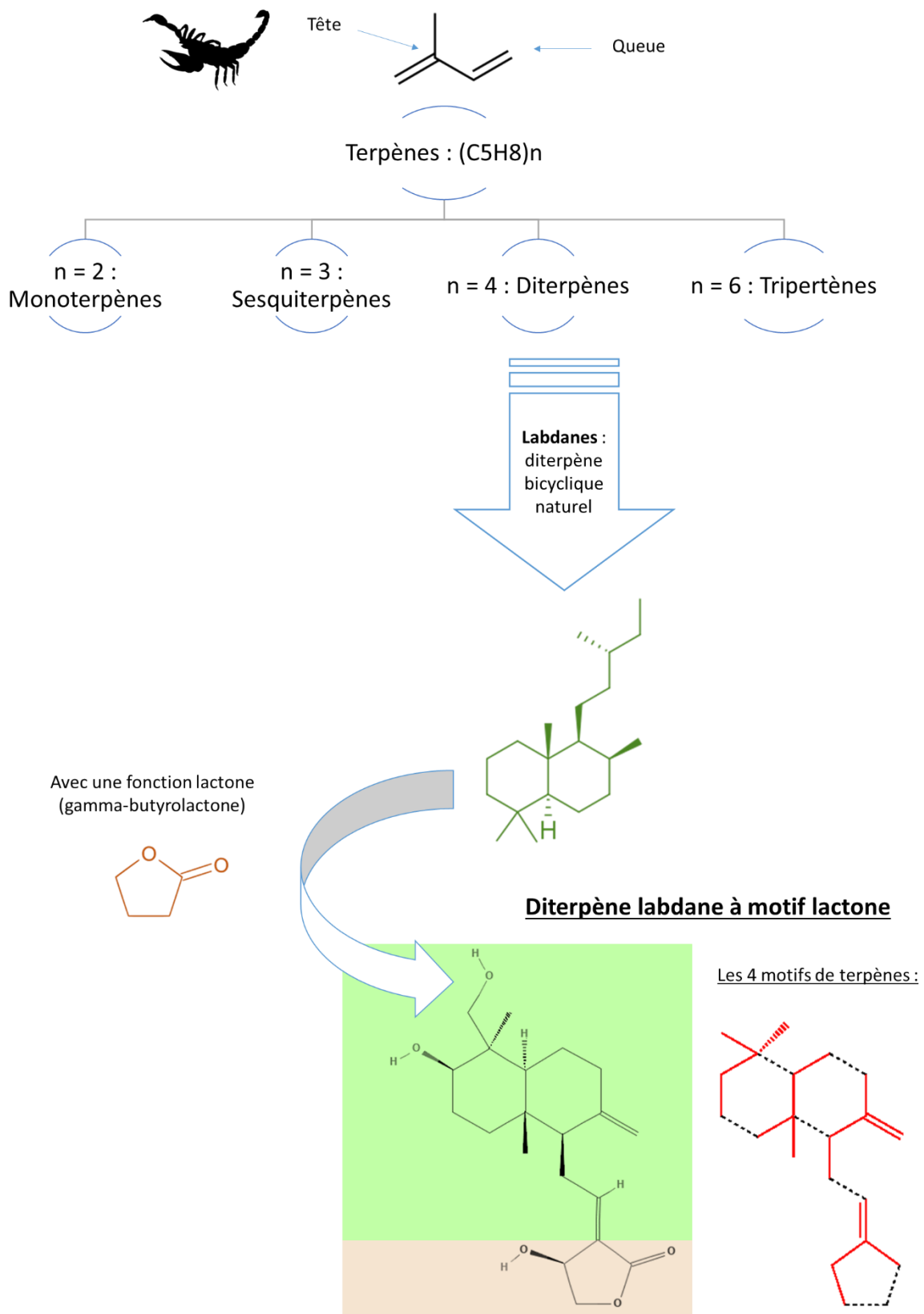


Figure 22 : Famille chimique dont fait partie l'andrographolide et ses dérivés.

Dans la prochaine partie, une revue de la littérature dans laquelle les propriétés antioxydantes de l'andrographolide sont répertoriées. La revue a été publiée dans le journal *Antioxydants*. Dans un premier temps, les paramètres pharmacocinétiques sont décrits afin de répondre aux exigences du journal visé. Puis dans un second temps, les effets antioxydants de l'andrographolide sur des modèles *in vitro* et *in vivo* sont listés selon le plan suivant : (1) la neutralisation directe des radicaux libres, (2) la protection des mitochondries, (3) l'inhibition des enzymes pro-oxydantes, (4) la régulation positive des enzymes antioxydantes et (5) contrôle positif du facteur de transcription NRF2.

Andrographolide, a natural antioxidant: an update

Eugenie Mussard¹, Annabelle Cesaro¹, Eric Lespessailles^{1,2}, Brigitte Legrain³, Sabine Berteina-Raboin⁴, and Hechmi Toumi^{1,2*}

¹ I3MTO laboratory, EA 4708, University of Orleans, 45067 Orleans, France;

² Département Rhumatologie, Centre Hospitalier Régional d'Orléans, 45067 Orleans, France;

³ Novaxia laboratory, 41220 St Laurent Nouan, France, France;

³ Institut de Chimie Organique et Analytique, UMR CNRS 7311, University of Orleans, 45067 Orleans, France.

* Correspondence: hechmi.toumi@univ-orleans.fr; Tel.: +332 38 41 71 69

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Traditionally *Andrographis paniculata* has been used as an herbal remedy for lung infection treatments. Its leaves contain a diterpenoid labdane called Andrographolide responsible for a wide range of biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. This manuscript is a brief review of the antioxidant mechanisms and the regulation of the Nrf2 signaling pathway by andrographolide.

Keywords: *Andrographis paniculata*; Andrographolide; Oxidative stress; Nrf2

I. Introduction

Andrographis paniculata (Burm. F.) Wall ex Nees is a plant from Acanthaceae family. This plant is also known as "Chuan-Xin-Lian" in China, Kalmegh in India, "Senshinren" in Japan, "Hempedu bumi" in Malaysia, "Fah Talai" in Thailand and, "green chiretta" in the Scandinavian countries (Lim et al., 2012). *Andrographis paniculata* has medicinal properties and traditionally been used in India, Sri Lanka, China and other countries in Southeast Asia (Okhwarobo et al., 2014). This plant is widely recognized for its therapeutic properties against upper respiratory tract infections due to its high anti-inflammatory activity (Abu-Ghefreh et al., 2009). *Andrographis paniculata* has several biological activities. It has been used as an

antipyretic (Madav et al., 1995; Pokala et al., 2019), hepatoprotective activity (Pan et al., 2017; Shukla et al., 1992), and immunostimulant (Churiyah et al., 2015; Puri et al., 1993). The leaves of *Andrographis paniculata* contain many bioactive compounds including diterpene lactones (deoxyandrographolide, andrographolide, neoandrographolide and 14-deoxy-11, 12-didehydroandrographolide), diterpene glucoside (deoxyandrographolide19beta-D-glucoside) and flavonoids (5,7,2',3'-tetramethoxyflavanone and 5-hydroxy-7,2',3'-trimethoxyflavone) (Akbar, 2011). Discovered in 1951, Andrographolide (C₂₀H₃₀O₅) is the main active ingredient in the plant (Chakravarti and Chakravarti, 1951). It is a lactone diterpene that gives the plant a bitter taste. Many studies have focused on the anti-viral (Manjula et al., 2018; Paemanee et al., 2019; Wintachai et al., 2015), anti-thrombotic (Lu et al., 2012; Mussbacher et al., 2019), hepatoprotective (Chua, 2014; Singha et al., 2007), anticancer (Khan et al., 2018; Liao et al., 2019) and anti-inflammatory properties (Tan et al., 2017) of andrographolide. Several data reported the antioxidant activities of andrographolide in various *in vitro* and *in vivo* model systems. This review describes its pharmacokinetic parameters and examine the current status regarding the antioxidant effect of andrographolide. The antioxidant effects are explored: (1) direct scavenging free radicals, (2) mitochondria protection, (3) inhibition of ROS-producing enzymes, (4) antioxidant enzymes regulation and, (5) transcription factor Nrf2 control.

II. Andrographolide bioavailability

Most phytochemicals are poorly absorbed, rapidly metabolized and excreted, resulting in low bioavailability (Scalbert and Williamson, 2000). Pharmacokinetics studies are important for understanding biological properties.

It has been reported that andrographolide is rapidly absorbed and metabolized in rats. A concentration of 1 μM (0.35 $\mu\text{g/mL}$) in plasma is obtained within 30 min after administration of 50 mg/kg and bioavailability is 1.19% (Chen et al., 2014). Andrographolide was measured in plasma and various rat tissues after oral administration of andrographolide at a dose of 100 mg/kg/day for four weeks. The highest concentration of andrographolide was in the kidney, followed by the liver, spleen and brain, while the same concentration was found in the heart and lungs (Bera et al., 2014). The maximum concentration was calculated at 115.81 ng/ml at 0.75 h. Andrographolide half-life elimination was 2.45 h (Bera et al., 2014). Andrographolide was also measured in human plasma after an oral dose of 200 mg of andrographolide. The maximum concentration was calculated at 58.62 ng/mL at 1.6 h. Its elimination half-life was 10.50 h (Xu et al., 2009).

Andrographolide is insoluble in water and non-polar solvents but soluble in acetone, methanol, chloroform and ether (Sareer et al., 2014). Therapeutic use of andrographolide is limited by its low water solubility, resulting in small bioavailability after oral administration. For this reason, the use of vectors such as microparticles or nanoparticles is interesting for its formulation for therapeutic applications. The microparticles used include polylactic-glycolic acid, alginate acid, and glucan derivatives. And for nanoparticles, several nanocarriers are used, such as, vesicles, polymeric nanoparticles, solid lipid nanoparticles, gold nanoparticles, nanocrystals, microemulsions and nanoemulsions, and nanosuspensions (Casamonti et al., 2019). In order to increase the stability and bioavailability of andrographolide, solid lipid nanoparticles loaded with andrographolide have been prepared by a high-pressure homogenization method. It has been demonstrated that the bioavailability of andrographolide was increased to 241% by nanoparticles compared to the andrographolide suspension (Yang et al., 2013b).

III. Antioxidant proprieties of andrographolide

Andrographolide contributes to antioxidant defenses (Li et al., 2018; Tan et al., 2018; Yan et al., 2018). It acts directly by neutralizing free radicals. Also, it interferes indirectly by protecting mitochondrial integrity, inhibiting pro-oxidant enzymes and/or activating antioxidant enzymes. Note that the transcription factor Nrf2 is involved in the regulation of the antioxidant defense system. Hence, the Nrf2 regulation by andrographolide is of interest for the regulation of the redox system.

a) Direct free radical scavenging

Reactive oxygen species are oxygenated chemical species such as free radicals, oxygen ions, and peroxides. ROS have at least one unpaired electron, which makes them highly reactive. For example, singlet oxygen, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. They are continuously produced by ionizing radiation such as sunlight, as well as byproducts of cellular metabolism (Sies, 1997). These compounds, when they are found in excess in the cells and go beyond the cellular defense systems, lead to a phenomenon called oxidative stress. They become toxic and are important factors for many diseases such as diabetes (Piconi et al., 2003), inflammation (Singh et al., 2005), and cancer (Reuter et al., 2010; Sosa et al., 2013).

A study has shown that the andrographolide exhibited significant antioxidative property (IC₅₀: 3.2 µg/ml) by its ability to scavenge a stable free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) as compared to known antioxidants like ascorbic acid, butylated hydroxy toluene (BHT) and the plant extract (Krithika et al., 2013). Several methods have been developed to determine andrographolide composition in leaf extracts. Different solvents are used at different extraction times. The amount of andrographolide in these extracts is important. One study used the HPLC-UV-MS method and the DPPH test determined the free radical scavenging activities in the

different extracts. The radical scavenging activity of all samples was lower than the positive control, BHT (Zhao et al., 2014). A study showed that an aqueous extract of *Andrographis paniculata* exhibited greater antioxidant activity than an ethanol extract. With 50 µg / ml, the radical scavenging activity were 66.8% in the methanol extract versus 57.8% in the ethanol extract. These results can be explained by a greater presence of phenol in the ethanol extract (Lin et al., 2009).

In cellular models, andrographolide reduces the generation of ROS (Peng et al., 2016; Sheeja et al., 2006; Shen et al., 2002). Indeed, in murine RAW264.7 macrophages, treatment with 10 µM and 30 µM of Andrographolide reduced the production of ROS in these cells stimulated by LPS or OVA (Peng et al., 2016). Sheeja et al, evaluated the antioxidants and anti-inflammatory properties of methanolic extract of *Andrographis paniculata*. This extract was found to inhibit formation of oxygen derived free radicals such as superoxide (32%) hydroxyl radicals (80%) lipid peroxidation (80%) and nitric oxide (42.8%) *in vitro* model. *In vivo* studies using mice models also showed significant inhibition in PMA induced superoxide (32.4%) and nitric oxide (65.3%) formation (Sheeja et al., 2006). Shen YC et al, showed that andrographolide (0.1, 1 and 10 µM) inhibits intracellular ROS (singlet oxygen and hydrogen peroxide) in N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced neutrophils (Shen et al., 2002).

b) Protective effects of andrographolide on mitochondria

Mitochondria are organelles whose main function is to generate energy to the cells. Indeed, in the inner membrane, the electron transport chain generates ATP (adenosine triphosphate) from ADP (adenosine diphosphate). This process is called oxidative phosphorylation. The electrons are introduced into the complex I via NADPH and into the II complex via FADH₂. Then its transferred to complex III and

finally to complex IV. In the IV complex (cytochrome c oxidase), electrons are deposited in molecular oxygen, which leads to H₂O production. However, electrons can be transferred to oxygen at complexes I and III to form superoxide (O₂⁻) rather than of H₂O. This superoxide can damage macromolecules, such as example, DNA, proteins or lipids.

Andrographolide improves mitochondrial dysfunctions in various models both *in vivo* and *in vitro*. Andrographolide treatment reduces oxidative stress and protects the mitochondria. These effects were observed in a transgenic mouse model (APP/PS1) to imitate Alzheimer's disease. Mice received andrographolide sulfonate at a dose of 5 mg/kg/day from 2-month-old mice and lasted for 7 months. Mitochondria in the hippocampus of APP / PS1 mice were isolated. Treatment with andrographolide maintained the ATP content nearly to a normal level. It reduced oxidative stress and maintains the potential of the mitochondrial membrane. It also diminished mitochondrial swelling in APP / PS1 mice (Geng et al., 2018). This confirms that andrographolide has a neuroprotective effect through its activity on mitochondria.

In another model, mitochondria were isolated from rat brains. Rats received nicotine (1 mg/kg/day) for 7 days and simultaneously andrographolide or an aqueous extract of *Andrographis paniculata* (250 mg/kg/day). Mitochondrial activity was tested on the following complexes: complex I (DPNH-coenzyme Q reductase), complex II (succinate dehydrogenase coenzyme Q reductase) and complex III (coenzyme Q cytochrome c reductase). Measurements were performed in different regions of the brain: the cerebral hemisphere, the cerebellum, the diencephalon, and the brain stem. Supplementation with andrographolide or aqueous extract significantly increases the activity of mitochondrial complexes in the electron transport chain (I, II, III) and decreases the production of NO, malondialdehyde and carbonyl protein in the rat brain exposed to nicotine. Besides, these treatments have

increased the activity of SOD, CAT, GR, GSH-Px, GST and GSH, and GSSG concentrations (Das et al., 2009a). Andrographolide also acts in mitochondria of hepatic origin. Rats were exposed to copper (15 mg/kg/day) for 45 days and then treated with andrographolide at a dose of 20 mg/kg/day for 15 days. Andrographolide has reduced the superoxide anions production and restores the membrane potential of mitochondria (Roy et al., 2011). Andrographolide also inhibited LPS-induced superoxide production in mouse peritoneal macrophages. This inhibition was dose-dependent (0.1 to 100 μ M) with an IC₅₀ of 7.9 μ M. Another compound from *Andrographis paniculata* was tested. It is called neoandrographolide, an andrographolide analogue. Neoandrographolide also suppressed LPS-induced NO production with an IC₅₀ of 35.5 μ M (Batkhuu et al., 2002). Note that andrographolide and an aqueous extract of *Andrographis paniculata* were also used in lymphocytes exposed to nicotine (100 μ M). Results showed andrographolide or aqueous extract at 5, 10 and 20 μ M reduced oxidative stress, decreased (1) superoxide anion production, (2) lipid peroxidation, (3) protein oxidation, and (4) DNA fragmentation. Yet, it increased cell viability, SOD and GSH activity (Das et al., 2009b).

The energy production in the mitochondria is essential for cell survival. However, excessive production of mitochondrial ROS is harmful to cells. Andrographolide activity in mitochondria is beneficial for healthy cells and also anti-tumor activity in cancer cells via mitochondria. In fact, recent studies have shown that andrographolide causes cell death involving mitochondria in HeLa cells (Alzaharna et al., 2017), a 5-FU colorectal cancer line (Wang et al., 2016), and finally liver cancer cells (Chen et al., 2012b).

c) Inhibition of free radical-producing enzymes by andrographolide

i. NADPH oxidase

NADPH oxidase (NOX) is a membrane enzyme complex belonging to the class of oxidoreductases. This enzyme catalyzes the oxidation reaction of NADPH by oxygen (O₂) to NADP⁺, H⁺, and O₂⁻. NOX induces the production of ROS in cells. In humans, there are seven NOX: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 and DUOX2. It is composed of 6 functional subunits. Cytochrome b558 is integrated into the membrane. It consists of two subunits: p22^{phox} and Nox2. The G protein called Rap 1A binds the GTP/GDP. It is linked to cytochrome b558 and is activated when associated with GTP. The p47^{phox} subunit acts as an organizer by translocating the p67^{phox} and p40^{phox} subunits to the membrane. The p67^{phox} subunit associates with cytochrome b558 to activate the oxidase activity of the enzyme. The p40^{phox} subunit plays a role in regulating the enzymatic activity. Finally, the Rac subunit is cytosolic and linked to the GDP in its non-activated form. When activated, it binds to GTP and associates with cytochrome b558 on the membrane.

Andrographolide (100 µg/kg, iv) reduced brain damage in a mouse model of cerebral ischemia. It reduces NOX2 (gp91^{phox}) expression via a limiting of PI3K/AKT-dependent NF-κB activation. Andrographolide (10 µM) reduced NOX2 expression in BV2 microglial line after 8 h of oxygen-glucose deprivation (Chern et al., 2011). In diabetic mouse model induced by intraperitoneal injection of streptozotocin, the effects of andrographolide on the myocardium were explored. Results demonstrated that andrographolide has improved the deleterious effects of oxidative stress by NADPH oxidase reduction. Indeed, andrographolide (10 and 20 mg/kg/day) significantly decreased of NOX2, NOX4, and p47^{phox} expressions in the myocardial tissues. Similarly, the effect of andrographolide was shown in H9c2 cardiomyoblasts exposed to high glucose (25 mM). Treatment with andrographolide (1, 5 and 10 µM)

significantly reduced the expression of NOX2, NOX4, and p47^{phox} (Liang et al., 2018). It modified the NADPH oxidase expression but it also modified its activity. It inhibited the NADPH oxidase activation in the lung tissue of rats after treatment with LPS (5 mg/kg). Andrographolide (0.18 and 1.8 g/kg) decreased also the translocation of the p47^{phox} and p67^{phox} subunits from the cytoplasm to the nucleus (Yang et al., 2014). To activate NADPH oxidase, TNF- α prompts the translocation of the p47^{phox} and p67^{phox} subunits from the cytoplasm to the nucleus. In the endothelial line EA.hy926, andrographolide (7.5 μ M) reduced the translocation of the p47^{phox} and p67^{phox} subunits (Lu et al., 2014). In human colorectal cancer line HCT116 cells, andrographolide (20 μ M) decreased the translocation of the p47^{phox} subunit (Yuan et al., 2018).

Oxidative stress is involved in many diseases (Liguori et al., 2018). But the production of low ROS concentration acts as messengers to activate signaling pathways. Therefore, the generation of ROS in low concentration is of interest. ROS production activates the antioxidant system in order to anticipate and protect against oxidative damage. For example, this "vaccine" effect has been studied in RIN-m β cell line of the pancreas with an andrographolide derivative containing a lipoic acid. Andrographolide-lipoic acid conjugate (0.01 - 0.1 and 1 μ M) increased the ROS level in a dose-dependent manner after 1 hour by increased expression of NADPH oxidase. As a result, the expression of the antioxidant proteins Trx1, Prx1, Prx5, HO-1, SOD1 and SOD2. Together, they protect the cells from H₂O₂-induced apoptosis (Yan et al., 2013).

ii. Xanthine oxidase

Xanthine oxidase catalyzes the terminal steps of purine degradation, converting hypoxanthine to xanthine, and xanthine to uric acid and hydrogen peroxide. In

human xanthine oxidase controls the final step of purine catabolism and is normally found in the liver and the intestinal mucosa. Xanthine oxidase is considered an essential source of O_2^- and H_2O_2 in inflammatory diseases (Ives et al., 2015; Kelley, 2019).

Currently, no study has proven any effect of pure andrographolide for xanthine oxidase. Yet a single report from Lin et al., showed an inhibitory effect to xanthine oxidase activity by two extracts of *Andrographis paniculata*. The extracts were obtained from water or ethanol extraction. The aqueous extract and ethanolic extract inhibited xanthine oxidase activity with an IC₅₀ of 13.62 $\mu\text{g/ml}$ and 26.60 $\mu\text{g/ml}$, respectively (Lin et al., 2009). Both extracts contain andrographolide. Nevertheless, in this study, there was no evidence that the observed effect comes from andrographolide. However, a silico study showed strong binding interactions between xanthine oxidase and andrographolide. The interaction is with 4 amino acids and the binding energy is -4.57 kcal/mol (Thangathirupathi et al., 2013). These results suggest that andrographolide may be a potent inhibitor of xanthine oxidase.

d) Activation of antioxidant system

Maintaining a non-cytotoxic level of ROS is provided by endogenous and exogenous antioxidant systems. There are two sources of antioxidants: one provided by the diet, the other is internal and consists of non-enzymatic or enzymatic cellular antioxidants (Sies, 1997). Here, we will focus on superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx).

i. SOD, CAT, and GPx

SOD represents the first defenses of the body against oxidative stress. SOD ensures the elimination of the superoxide anion in hydrogen peroxide by a dismutation reaction ($2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). Then, H_2O_2 is supported by enzymes with peroxidase activity. In mammals, there are 3 isoenzymes: a cytosolic and nuclear form associated with copper and zinc ions (CU/ZN-SOD₁), a mitochondrial form associated with manganese (Mn-SOD₂) and an extracellular form (EC-SOD₃). These enzymes differ in their chromosomal location, quaternary structure, metal content, and cell localization (Fridovich, 1975b).

CAT catalyzes the disproportionation of hydrogen peroxide into water and oxygen ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). CAT is mainly located in the peroxisome, and also in the cytoplasm. CAT protects against the harmful effects of excessive amounts of H_2O_2 (Aebi, 1984b).

GPx is a complete system that reduces peroxides at the expense of its specific substrate, reduced glutathione (GSH). GPx plays a central role in the H_2O_2 removal mechanism. Its main role is lipid peroxides elimination resulting from oxidative stress action on polyunsaturated lipids. The GPx catalyzed reaction requires the presence of GSH as the electron donor ($2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$). The product formed is glutathione disulfite (GSSG). GSSG is then reduced by glutathione reductase (GR) using NADPH ($\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$) (Flohe et al., 1973; Rotruck et al., 1973). The GSH / GSSG ratio is an index of the oxidation state in the cells (Zitka et al., 2012). There are several isoforms of GPx containing selenium: cytosolic and mitochondrial GPx, cytosolic GPX and extracellular GPx.

ii. *In vitro* studies

Several studies showed that andrographolide restores SOD and CAT activities in cells treated with oxidative stress inducers. For example, oral treatment with andrographolide (5 mg/kg, 7 mg/kg and 10 mg/kg) restored SOD and CAT activities due to treatment with hexachlorocyclohexane (Trivedi et al., 2007). These results are supported by another study on lymphocytes isolated from rats. In this report, SOD activity was reduced in the presence of nicotine. Treatment with andrographolide (5 µg/ml, 10 µg/ml and 20 µg/ml) or an aqueous extract of *Andrographis paniculata* restored SOD activity in lymphocytes (Das et al., 2009b). In rat erythrocytes, SOD and CAT activities were reduced by treatment with CCL4. Treatment of rats with a methanolic extract of *Andrographis paniculata* (1 g/kg) restored SOD and CAT activities after stimulation by CCL4 (Akowuah et al., 2009). Another data reported that SOD activity was significantly increased in serum of hyperlipidemic rats by oral administration of andrographolide 10 and 20 mg/kg (Al Batran et al., 2013). SOD activity increased in the liver, kidneys, heart and red blood cells of rats treated with andrographolide (30 and 50 mg/kg/day). Catalase activity increased in a dose-dependent manner only in the heart of treated rats. SOD1 protein levels in the liver, kidneys and heart of rats were increased by treatment with andrographolide. Finally, SOD1 mRNA levels increased in the liver and kidneys of rats treated with andrographolide (Chen et al., 2014). A study on atherogenic rabbits showed that the bacterium *Porphyromonas gingivalis* decreased the activities of SOD and CAT. These effects were reversed by oral administration of andrographolide at 10 or 20 mg/kg (Al Batran et al., 2014). SOD, CAT and GSH activities decreased in the gastric tissue of rats treated with indomethacin. Oral administration of andrographolide sodium bisulfate (40, 80 and 160 mg/kg) 7 days before treatment with indomethacin reduced oxidative stress by restoring SOD, CAT and GSH activities (Liu et al., 2015). Mice treated with arsenic have decreased SOD and CAT activities. Oral administration of

andrographolide or andrographolide nanoparticles increased these activities in groups co-treated with arsenic (Das et al., 2015). SOD and CAT activities are decreased in the brains of diabetic rats. These reductions were less significant in diabetic mice treated orally with andrographolide at doses of 15, 30 or 60 mg/kg or with hydromethanolic extract of *Andrographis paniculata* (Thakur et al., 2016). Another diabetes study showed similar results in a model of rats with diabetes mellitus by streptozotocin injection. SOD and CAT activities were reduced in the hippocampus, hypothalamus and cerebellum of the cerebral cortex of the rat brain. However, andrographolide supplementation (2.5 mg / kg) reduces SOD and CAT activities to normal levels (Naik et al., 2017). In the lung tissues of mice treated with bleomycin, SOD activity decreased compared to untreated mice. Co-treatment with andrographolide (25, 50 and 100 mg/kg) significantly increased the SOD activity in a dose-dependent manner (Guo et al., 2016). Topical application of sodium bisulfate andrographolide (0.4 - 1.2 and 3.6 mg/mouse) to the skin of mice exposed to UV radiation resulted in a dose-dependent increase in SOD and CAT activity compared to untreated mice (Zhan et al., 2016). In contrast, andrographolide sodium bisulfate significantly decreased SOD activity in the kidneys of mice treated with 150 and 1000 mg/kg (Lu et al., 2011).

3.4.3. *In vivo* studies

Some studies show the effect of andrographolide on antioxidant enzyme activity *in vitro* models. In RIN-m lineage, andrographolide conjugated with alpha-lipoic acid increased SOD and CAT activities (Yan et al., 2016). Similarly, in chondrocytes isolated from rat articular cartilage, andrographolide at 0.625 and 2.5 µg/ml increased SOD protein content, SOD and CAT activity, and SOD1, SOD2 and CAT expression after exposure with H₂O₂ (Li et al., 2018). In contrast, in line HK-2, treatment with andrographolide sodium bisulfate decreased SOD activity by 30 to

120 μ M in a dose-dependent manner, and significantly from 60 μ M onwards (Gu et al., 2016). This decrease contributes to the induction of cell apoptosis by oxidative stress.

e) Nrf2 signaling pathway: Andrographolide regulation

i. Nrf2 signaling pathway

Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) is an essential transcription factor against oxidative and electrophilic stress. There is clear evidence that it plays a key role in balancing oxidation-reduction reactions by activating a wide variety of genes involved in antioxidant defense. This protective role consists in inducing the expression of specific enzymes. These are antioxidant enzymes, phase II enzymes, and detoxification enzymes. These enzymes contain ARE (Antioxidant Response Element) and EpRE (Electrophilic Response Element) DNA sequences on their promoters. The Nrf2 targets are therefore ROS chelating enzymes, detoxification enzymes or phase II enzymes. Several studies have identified genes regulated by Nrf2, such as those involved in glutathione biosynthesis (γ -GCS, GCL, GR, G6PDH, GST, and GPx), the NQO1, HO-1, SOD, CAT, and TRXR genes.

In physiological condition, Nrf2 is maintained in the cytoplasm by forming an inactive complex with the KEAP-1 protein (Kelch-like ECH-associated protein 1). KEAP-1 is anchored to the cytoskeleton via actin. The binding between Nrf2 and KEAP-1 facilitates the ubiquitination and proteolysis of Nrf2 via the Cul3-based E3 complex. KEAP-1 is an essential regulator of the antioxidant response since it captures oxidation-reduction changes by some of its cysteines. Its N-terminal domain contains the residue Cys¹⁵¹ which is important for the detection of oxidative stress. Its IVR domain (Intervening Region) contains the residues Cys²⁷³ and Cys²⁸⁸, which are also involved in the detection of oxidative stress. Its DGR (Double Glycine

Repeat) domain and its C-terminal domain form a structure to interact with Nrf2. Phosphorylation of Nrf2 at its serine and/or tyrosine residues also causes the release of Nrf2. Therefore, its activity can be increased via protein stabilization by KEAP-1 modifications or Nrf2 phosphorylation.

ii. Scientific studies *in vitro*

Andrographolide induces an increase in Nrf2 expression and its translocation to the cell nucleus, independently of the cell type studied. This translocation increases ARE promoter and SOD, CAT, GCLC, GCLM, SRXN1, TXNRD1, GSR, GS, and GR expressions. These enzymes have cytoprotective, antioxidant and detoxifying effects. Also, the stress protein HO-1 is protective against oxidative aggressions. Its expression was increased by andrographolide via Nrf2. HO-1 generates antioxidant compounds including carbon monoxide, bilirubin, and free iron. In the absence of oxidative stress, Nrf2 remains sequestered in the cytoplasm by the KEAP1 protein, and it is rapidly degraded by the proteasome. In most studies, andrographolide does not appear to regulate KEAP1. The main effects of andrographolide on *in vitro* models are summarized in Table 1.

Andrographolide (2.5 - 5 and 7.5 μM) induces a dose-dependent increase in HO-1 expression in the endothelial cell line EA.hy926 after a 16 hours pre-treatment followed by incubation with TNF α (1 ng/ml) for 6 hours. Treatment with 7.5 μM andrographolide improves the dissociation of Nrf2 to KEAP-1 and their nuclear translocation. Nrf2 can bind to ARE sequences, which explains the increase in HO-1 expression in cells (Yu et al., 2010). In another study on EA.hy926, treatment with 7.5 μM andrographolide induced HO-1 synthesis in these cells (Lin et al., 2017). In the bronchial cell line BEAS-2B simulated by cigarette smoke extract, treatment with 30 μM andrographolide reduced oxidative stress. This treatment favored the nuclear

translocation of Nrf2 and its binding to ARE sequences. This phenomenon thus leads to positive regulation of the antioxidant genes GCLM, GCLC, GPx-2, GR and HO-1. Cellular GSH levels were significantly increased by andrographolide in cells exposed to cigarette smoke extract for 24 hours (Guan et al., 2013; Tan et al., 2018). The human hepatoma line Huh-7 has decreased HO-1 promoter activity when it contains hepatitis C virus replicons (Ava5 cells). This activity increases in a dose-dependent manner when Ava5 cells are treated with andrographolide (1 - 5 and 10 μM) for 72 hours. In correlation, HO-1 expression is dose-dependently increased with andrographolide (1- 5 - 7.5 and 10 μM). Finally, HO-1 protein synthesis increased significantly after 7.5 μM of andrographolide. The total amount of Nrf2 protein increased dose-dependently from andrographolide to 5 μM . The amount of nuclear Nrf2 protein also increased strongly from andrographolide to 7.5 μM . With 10 μM of andrographolide, the accumulation of Nrf2 protein in the nucleus increased with time, from 3h to 24h of treatment. The DNA binding activity of Nrf2 decreases in Ava5 cells compared to Huh-7 control cells. Treatment with andrographolide (0 - 1 - 5 - 7.5 and 10 μM) for 72 hours significantly and dose-dependently increased this activity as early as 5 μM . No significant changes in KEAP-1 protein levels were observed in the presence of andrographolide. The formed Nrf2 protein is therefore not advantageously eliminated by ubiquitination (Lee et al., 2014). GSH content increases in the endothelial cell line EA.hy926 by treatment with andrographolide at 7.5 μM after 24 hours. Only GCLM and HO-1 but no GCLC expressions increased time-dependently with treatment with andrographolide at 7.5 μM . Nrf2 is activated by andrographolide and participates in the induction of HO-1 and GCLM expression from 1h of treatment and maintained up to 4h (Lu et al., 2014). In primary endothelial cells of mouse brains treated with andrographolide at 5 or 10 μM , the amount of HO-1 mRNA and protein increased with time. The increase in HO-1 protein was significant after 4 hours of

treatment and the increase in HO-1 expression is significant after 2 hours of treatment with andrographolide at 10 μ M. These inductions are greater with 10 μ M andrographolide than with 5 μ M. Andrographolide (10 μ M) activates Nrf2 via its phosphorylation on ser⁴⁰. A translocation of Nrf2 from the cytoplasm to the nucleus was also observed in cells treated with andrographolide (10 μ M) after 30 minutes of treatment (Yen et al., 2016). Primary culture of rat astrocytes treated with different concentrations of andrographolide (1 - 5 - 10 - 30 and 50 μ M) for 1 hour shows an increase in Nrf2 protein from 1 μ M. Treatment with andrographolide at 50 μ M increases the RNAm Nrf2 from 24 hours of treatment while the protein level increases significantly from 30 minutes of treatment and is maintained until 24 hours. The positive regulation of protein level is therefore not related to the increase in gene expression but rather to the regulation of protein turnover, such as the improvement of protein stability. The Nrf2 protein increased significantly in the cell fraction and the nuclear fraction after 1h and 30 minutes of treatment with andrographolide at 50 μ M, respectively. However, andrographolide did not affect the phosphorylation of Nrf2 on ser⁴⁰ or KEAP-1 levels. Andrographolide, therefore, does appear to induce accumulation of Nrf2 in the nucleus via the escape of Nrf2 to its degradation by the proteasome. The cycloheximide use, an inhibitor of the initiation and elongation of de novo protein synthesis, showed that Nrf2 had a half-life of 10 minutes. However, with andrographolide (50 μ M), its half-life was reduced to 40 minutes. Indeed, andrographolide reduced the ubiquitination of Nrf2. This mechanism can explain the increased stability of Nrf2 in cells and therefore the positive regulation of its effector genes. HO-1 expression was increased after 2 hours of incubation with andrographolide at 50 μ M. While the HO-1 protein level was increased after 4 hours (Wong et al., 2016). In HT22 a mice neuronal cell line, andrographolide (1 - 5 and 10 μ M) increased cytoplasmic and nuclear protein levels in a dose-dependent manner after 24 hours of treatment. These increases were

significant at 10 μ M. Also, the KEAP-1 content wasn't modified by andrographolide at 10 μ M for 24 hours. The transcription activity of ARE sequences increased with andrographolide treatment (1 - 5 and 10 μ M) in a concentration-dependent manner for 16 hours. HO-1 expression and HO-1 protein content increased and varied with andrographolide concentration for 24 hours (Seo et al., 2017). In H9c2 a rat myoblast cell line, stimulation with 25 mM glucose reduced the amount of Nrf2 and HO-1 proteins. Co-stimulation with andrographolide (0.1 - 1 - 5 and 10 μ M) increased the Nrf2 and HO-1 proteins in the cells (Liang et al., 2018). In chondrocytes isolated from rat articular cartilage, andrographolide at 0.625 and 2.5 μ g/ml increased the Nrf2 protein after exposure with H₂O₂ (Li et al., 2018). The amyloid peptide A β 42 (10 μ M) reduces Nrf2 mRNA and protein after 24 hours of treatment in the PC12 line derived from tumor cells of the adrenal medulla in rats. Pre-treatment with andrographolide at 20 μ M for 1 hour restores the Nrf2 protein content and increases its expression (Gu et al., 2018). Andrographolide increases Nrf2 transcription activity and protein concentration in HEK293T cells. Indeed, the cells were treated with different concentrations of andrographolide (1 - 7.5 - 15 - 30 - 60 and 120 μ M) for 4 hours. The Nrf2 protein increases from 7.5 μ M and in a dose-dependent manner up to 120 μ M. In addition, andrographolide (7.5 μ M) increases Nrf2 protein levels in a time-dependent manner from 1h to 8h of treatment. The transcriptional activity of the ARE sequences was increased via treatment with andrographolide at 7.5 μ M for 24 hours. Andrographolide (7.5 μ M) induces Nrf2 by regulating its KEAP-1 inhibitor via interaction with Cys¹⁵¹ after 6 hours of treatment. This mechanism is similar to sulforaphane (Hu et al., 2011; Wang et al., 2008; Zhang and Hannink, 2003). Andrographolide (7.5 μ M) also caused a 30% decrease in the binding between CUL3 and KEAP-1 depending on Cys¹⁵¹. This disruption has the consequence of inhibiting the transfer of ubiquitin to Nrf2 and therefore its degradation by the proteasome. At low concentration (7.5 μ M), andrographolide decreases the binding between CUL3

and KEAP-1 and stabilizes the Nrf2 protein depending on Cys¹⁵¹. While treatment with a high concentration of andrographolide (100 μ M) increases the binding from CUL3 to KEAP-1 and induces Nrf2 independently of Cys¹⁵¹ (Wong et al., 2018). *Andrographis paniculata* extracts enriched with andrographolide by phytoconcentration were studied. Effects on the Nrf2 pathway in a human hepatic cell line HepG2 were observed (Khole et al., 2019). An unenriched plant extract (AP), 10% (AP10) and 20% (AP20) enriched extracts of andrographolide and pure andrographolide at 20 μ M (AN20) and 40 μ M (AN40) were used. Except for the AP treatment, all treatments significantly increased Nrf2 expression. An increase total Nrf2 and nuclear Nrf2 was induced by all treatments. Moreover, all treatments except AP significantly increased HO-1 expression. Similarly, all treatments increased the HO-1 protein in the cells. HO-1 is positively regulated by Nrf2 and negatively by BACH-1 and mir-377. Andrographolide didn't modify the BACH-1 expression but all treatments except AP reduced the mir-377 expression. The GSH content was increased by all treatments. In addition, GCLC, GCLM, and GS expressions were significantly increased by all treatments, and particularly by AP20, by negatively regulating mir-433. Treatments increased GR mRNA, protein, and enzyme activity. On the other hand, GPx1 expression and total GPx activity were decreased by upregulating mir-181a (Khole et al., 2019).

New andrographolide derivatives have been discovered, some of which are natural derivatives, other synthetic derivatives derived from chemistry (Hossain et al., 2014; Lim et al., 2012; Sareer et al., 2014). For example, CHP1002 is a restructured derivative of andrographolide. This synthetic molecule has the same central nucleus as andrographolide and two polyethylene glycol molecules to improve water solubility and stability of andrographolide. In the RAW264 macrophage line, CHP1002 at 25 - 50 or 100 μ M improves HO-1 protein levels in a dose-dependent manner. The HO-1 protein is increased from 4 hours of treatment with a peak at 6

hours. Moreover, the expression of the HO-1 gene is induced by CHP1002 after 2 hours of treatment. The Nrf2 pathway was studied to elucidate the underlying mechanisms of HO-1 induction by CHP1002. Treatment with 100 μ M of CHP1002 increased the level of Nrf2 protein in total cellular homogenates from 2 hours after treatment to 8 hours compared to the untreated control. Also, an accumulation of the Nrf2 protein in the nucleus was observed as early as 2 hours after treatment and persisted and increased until 6 hours (Zhang et al., 2013). A synthetic derivative of andrographolide by conjugation with an alpha-lipoic acid increased the expression of Nrf2 and HO-1 in the β cells of the Langerhans islets of rats RIN-m (Yan et al., 2016).

iii. Scientific studies *in vivo*

The main effects of andrographolide on *in vitro* models are summarized in Table 2. Andrographolide increased Nrf2 translocation and its binding activity to ARE sequences in the liver of Sprague–Dawley rats intragastrically treated with 30 or 50 mg/kg/day andrographolide for 5 consecutive days (Chen et al., 2014). With regard to Nrf2 targets, the andrographolide treatment has induced the following results:

- SOD activity has increased in the liver, kidney, heart, and red blood cells,
- CAT activity has increased in the heart,
- GSH peroxidase activity has increased in the kidney,
- GSH reductase has increased in the kidney, heart, and red blood cells,
- GSH S-transferase has increased in the liver,
- GSH protein is increased in the heart,
- antioxidant proteins (SOD1, GST Ya, GST Yb, HO-1, GCLC, and GCLM) have increased in the liver, kidney, and heart,

- The mRNA of GCLC, GCLM, GST Ya/Yb, SOD1, and HO-1 have increased in the liver and kidney.

Andrographolide increased HO-1 protein in the brain of Wistar rats treated with 0.1 mg/kg by intraperitoneal for 6 h (Yen et al., 2016). It increased Nrf2 translocation and decreased *KEAP-1* mRNA expression in lung of BALB/c mice treated with 5 or 10 mg/kg andrographolide by intraperitoneal for 1 and 24 h (Tan et al., 2016). In this study, mRNA expression of HO-1, GR, GCLM, GPx-2, and NQO1 have increased by andrographolide treatment. Andrographolide increased Nrf2 and HO-1 proteins in liver of BALB/c mice treated with LPS/D-galactosamine (1 h) followed andrographolide (2.5, 5, or 10 mg/kg) by intraperitoneal for 8h (Pan et al., 2017). Andrographolide increased Nrf2 translocation in liver of C57BL/6 mice orally treated with acetaminophen for 2 weeks and co-treated with andrographolide (20 or 40 mg/kg) every day during 4 weeks additional (Yan et al., 2018). Moreover, andrographolide reversed the decreased hepatic expression of GCLC, GCLM and HO-1 mRNA expression induced by acetaminophen. It increased Nrf2 mRNA in the heart of C57BL/6 mice treated with streptozotocin by intraperitoneal injection followed by intragastric gavage of andrographolide (1, 10 or 20 mg/kg/day) for 12 weeks (Liang et al., 2018). In the same way, this treatment has increased SOD activity, decreased MDA, and decreased mRNA of Nox2, Nox-4, p47^{phox}, Nrf2 and HO-1. Andrographolide increased Nrf2 protein in lung of Balb/c mice sensitized (dermally and intranasally) with toluene diisocyanate for asthma induction and treated with andrographolide 0.1, 0.5 or 1 mg/kg (Sulaiman et al., 2018). HO-1 protein increased only with the dose 1 mg/kg of andrographolide.

IV. Conclusions

Medicinal herbs contain a wide range of active ingredients including antioxidants. The natural antioxidants are of interest for treating a large number of diseases due to oxidative stress. Moreover, *Andrographis paniculata* has long been used in traditional medicine in Asia. Several studies have shown that its main bioactive component, andrographolide, has shown beneficial effects against oxidative stress, notably through Nrf2 activation. To examine the various mechanisms involved, this review is intended to collect a lot of studies focusing on the antioxidant activity of andrographolide.

In conclusion, there are several potential mechanisms to explain its antioxidant activity. These mechanisms can be direct or indirect. Firstly, andrographolide can directly neutralize free-radicals. Secondly, it can prevent the free-radicals formation by protecting mitochondria or by inhibition of specific ROS-producing enzymes. Thirdly, it activates enzymatic or non-enzymatic antioxidants, mainly via the activation of the Nrf2 signaling pathway. Therefore, andrographolide use as an active ingredient is a promising strategy for the development of new anti-oxidant drugs.

Funding: This research was supported by Cosmetosciences, a global training and research program dedicated to the cosmetic industry. Located in the heart of the cosmetic valley, this program led by University of Orléans is funded by the Région Centre-Val de Loire.

Acknowledgments: This research was supported by Cosmetosciences, a global training and research program dedicated to the cosmetic industry.

Conflicts of Interest: The author declares no conflict of interest.

Table 1: Main effects of andrographolide on Nrf2 pathway.

Treatment(s)	Nrf2 mRNA	Nrf2 protein	Nrf2 translocation	Nrf2 phosphorylation	Nrf2 binding activity to ARE sequence	Nrf2 inhibitor (KEAP-1)	Nrf2 turnover and ubiquitination	Nrf2 targets	Ref.
2.5 - 5 - 7.5 μ M for 16h followed by incubation with TNF- α (1 ng/ml) for an additional 6 h	-	-	↗	-	↗	-	-	HO-1 mRNA and protein ↗	(Yu et al., 2010)
7.5 μ M andrographolide for 16 h	-	-	-	-	-	-	-	HO-1 protein ↗	(Lin et al., 2017)
30 μ M andrographolide with 2% cigarette smoke extract	-	-	↗	-	↗	-	-	GSH ↗; expression of antioxidants GCLM, GCLC, GR, GPx-2 and HO-1 ↗	(Guan et al., 2013)
30 μ M for 24 h	-	-	↗	-	↗	-	-	↗ ARE-sensitive genes including HO-1, GCLC, GCLM, SRXN1,	(Tan et al., 2018)

									TXNRD1, GSR but not NQO1	
1 - 5 - 7.5 - 10 μM	-	↗	↗	-	↗	No effect	-	HO-1 promoter activity and mRNA ↗	(Lee et al., 2014)	
7.5 μM andrographolid e for 24 h	-	-	↗	-	-	-	-	HO-1 mRNA and protein ↗; GCLM mRNA and protein ↗ but not GCLC	(Lu et al., 2014)	
5 and 10 μM	-	-	↗	p-Nrf2 (ser ⁴⁰) ↗	-	-	-	HO-1 mRNA and protein ↗	(Yen et al., 2016)	
1 - 5 - 10 - 30 et 50 μM	50 μM for 24h ↗	1 - 50 μM for 1h ↗ and 50 μM for 30 min - 24h ↗	50 μM for 30 min - 24 h ↗	no effect on p- Nrf2 (ser ⁴⁰)	-	No effect	↘	HO-1 mRNA (2 h with 50 μM) and protein (4 h with 50 μM) ↗	(Won g et al., 2016)	
1 - 5 et 10 μM	-	↗	↗	-	↗	No effect	-	HO-1 mRNA and protein ↗	(Seo et al., 2017)	

Glucose 25 mM and andrographolide 0.1 - 1 - 5 et 10 μM	-	↗	-	-	-	-	-	-	HO-1 protein ↗, Nox2, Nox4, and P47 ^{phox} mRNA ↘	(Liang et al., 2018)
H ₂ O ₂ 0.1 mmol/l and andrographolide 0.625 and 2.5 μg/ml	-	↗	-	-	-	-	-	-	Activities of SOD and CAT ↗; SOD and CAT proteins ↗	(Li et al., 2018)
β-amyloid (Aβ) peptide 10 μM and andrographolide 20 μM for 1 h	↗	↗	-	-	-	-	-	-	-	(Gu et al., 2018)
1 - 7,5 - 15 - 30 - 60 and 120 μM	-	↗	-	-	↗	-	↗	-	At low concentration, function of the CUL3-RBX1-KEAP1 E3 ubiquitin ligase via Cys ¹⁵¹ ↘, at high concentration action via a mechanism	(Wong et al., 2018)

independent
of Cys¹⁵¹ in
KEAP1

20 and 40 μ M

↗

↗

↗

-

-

-

-

HO-1 protein ↗;
GSH protein ↗;
GCLC / GCLM /
GS mRNAs and
proteins ↗; GR
mRNA, protein
and activity ↗
but GPx1 mRNA
and total GPx
activity ↘

(Khole
et al.,
2019)

Table 2: Main effects of andrographolide on Nrf2 pathway.

Model(s)	Treatment(s)	Nrf2 mRNA	Nrf2 protein	Nrf2 translocation	Nrf2 binding activity to ARE sequence	Nrf2 inhibitor (KEAP-1)	Nrf2 targets	Ref.
Sprague-Dawley rats (liver, heart, and kidneys)	30 or 50 mg/kg/day for 5 consecutive days, intragastrical	-	-	↗ (liver)	↗ (liver)	-	SOD activity ↗ (liver, kidney, heart, and red blood cells); CAT activity ↗ (heart); GSH peroxidase activity ↗ (kidney); GSH reductase ↗ (kidney, heart, and red blood cells); GSH S-transferase ↗ (liver); GSH protein ↗ (heart); antioxidant proteins (SOD1, GST Ya, GST Yb, HO-1, GCLC, and GCLM) ↗ (liver, kidney, and heart); mRNA (GCLC, GCLM, GST Ya/Yb, SOD1, and HO-1) ↗ (liver and kidney)	(Chen et al., 2014)
Wistar rats	0.1 mg/kg, intraperitoneal (6 h)	-	-	-	-	-	HO-1 protein ↗ (brains)	(Yen et al., 2016)
BALB/c mice	5 or 10 mg/kg, intraperitoneal (1 and 24 h)	-	-	↗ (lung)	-	mRNA ↘ (lung)	HO-1, GR, GCLM, GPx-2, and NQO1 (mRNA) ↗	(Tan et al., 2016)

BALB/c mice	LPS/GalN (1 h) followed ANDRO (2.5, 5, or 10 mg/kg), intraperitoneal (8h)	-	↗ (liver)	-	-	-	HO-1 protein ↗ (liver)	(Pan et al., 2017)
C57BL/6 mice	Acetaminophen (orally) every day for 6 weeks followed by ANDRO (20 or 40 mg/kg, orally) treatment every day at 2 weeks after acetaminophen administration	-	-	↗ (liver)	-	-	ANDRO reversed the decreased hepatic expression of GCLC, GCLM and HO-1 mRNA expression induced by acetaminophen. Co-treatment with ANDRO (40 mg/kg) ↗ NQO1 mRNA	(Yan et al., 2018)
C57BL/6 mice	Streptozotocin (intraperitoneal injection) for 5 consecutive days followed by ANDRO (1, 10 or 20 mg/kg/day) for 12 weeks by intragastric gavage	↗ (heart)	-	-	-	-	SOD activity ↗; MDA and 4-HNE ↓; Nox2, Nox-4, p47 ^{phox} , Nrf2 and HO-1 mRNA ↓	(Liang et al., 2018)
Balb/c mice	Toluene diisocyanate treatment (dermally and intranasally) for asthma induction with ANDRO treatment (0.1, 0.5 or 1 mg/kg, prophylactic regimen)	-	↗ (lung)	-	-	-	HO-1 protein ↗ (1 mg/kg, lung)	(Sulaiman et al., 2018)

OBJECTIFS



Objectifs du travail de la thèse

L'une des préoccupations dermatologiques les plus fréquentes est le vieillissement cutané. L'ensemble des données présentées ci-dessus décrivent les deux types de vieillissement. L'un est le vieillissement chronologique dû au passage du temps, et l'autre est le vieillissement prématuré ou photovieillissement dû à des facteurs environnementaux. Compte-tenu du rôle important du stress oxydant dans ces processus biologiques, l'accent a été porté sur cet axe. Les sources d'ERO dans la peau, notamment leur production via l'exposition aux UV, ont été décrites afin de bien comprendre l'importance d'utiliser des produits antioxydants de façon topique sur la peau. Qu'ils aient un effet direct ou indirect sur le stress oxydant, leur utilisation permettrait de réduire les effets sur les cellules cutanées et la détérioration de la MEC. De manière générale, les antioxydants aideraient à maintenir le tissu cutané en bon état.

Il existe plusieurs produits cosmétiques anti-âges à base d'ingrédients actifs synthétiques, dont la monoéthanolamine, la diéthanolamine, le laureth sulfate de sodium et la triéthanolamine. Ces molécules présenteraient des effets indésirables sur certaines personnes et déclencherait des réactions allergiques. Les molécules naturelles seraient moins allergènes tout en présentant des activités anti-âges très efficaces. De plus, l'usage de cosmétiques naturels est en grande recrudescence ces dernières années. L'intérêt des industries cosmétiques pour les principes actifs naturels est donc en plein essor. La recherche de ces nouveaux actifs se développe à partir d'une ressource végétale riche en composants antioxydants et/ou anti-inflammatoires, à découvrir ou à redécouvrir. En effet, de nombreuses plantes ont servi dans la médecine et en cosmétique dans d'autres civilisations. Ces connaissances ont perduré ou se sont perdues avec le temps.

Rechercher de nouveaux actifs, en ciblant les effets antioxydants, anti-inflammatoires et/ou régénérants matriciels, peut répondre aux demandes des industriels. Le projet s'est focalisé sur la plante *Andrographis paniculata* et ses diterpènes lactones. Cette plante est largement utilisée en Chine, en Inde et en Asie du Sud-Est pour traiter les infections des voies respiratoires supérieures. L'andrographolide est son principal composant biologiquement

actif. D'autres analogues de l'andrographolide sont présents dans l'*Andrographis paniculata*, tels que la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide. De nombreuses études ont révélé des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de ces diterpènes lactones, mais la recherche sur la peau, notamment sur le vieillissement cutané, est très peu documentée.

A l'aide de deux modèles cellulaires de fibroblastes dermiques et de kératinocytes, les objectifs de cette thèse se divisent ainsi (1) évaluer une gamme de concentrations non cytotoxiques, (2) étudier les potentielles capacités antioxydantes, (3) analyser les capacités anti-inflammatoires, et (4) étudier l'évolution de certains composants de la MEC. Les traitements utilisés sont un extrait méthanolique d'*Andrographis paniculata*, l'andrographolide, la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide. Dans une première partie, un article soumis dans le journal *Advances in Integrative Medicine* retrace les résultats obtenus sur la culture primaire de fibroblastes dermiques HDFa. Dans une seconde partie, un article en cours de préparation rassemble les résultats obtenus sur la lignée cellulaire de kératinocytes HaCaT.

ARTICLES



Article 1 : Étude de la couche dermique

Introduction générale de l'article 1

La peau est composée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Avec le vieillissement cutané, ces trois couches subissent des altérations. Les modifications survenant dans le derme sont les plus évidentes. En effet, une atteinte progressive du derme se produit et conduit à l'apparition de rides et une perte d'élasticité cutanée (Lapière, 1990). L'un des principaux mécanismes de l'atrophie dermique est une réduction de la MEC, et en particulier du collagène (Kohl et al., 2011). Ce sont les fibroblastes qui produisent le collagène. Ce type cellulaire est donc intéressant pour l'étude du vieillissement cutané au niveau du derme. Chez les peaux âgées, la production du collagène par les fibroblastes diminue et sa dégradation augmente (Quan et al., 2009; Talwar et al., 1995; Varani et al., 2006b). C'est pourquoi, la plupart des approches anti-âge ciblent et visent à inverser ce processus. Le stress oxydant et l'inflammation sont des facteurs importants dans le processus de vieillissement cutané. Pour cette raison, l'usage de principes actifs aux propriétés antioxydantes et/ou anti-inflammatoires est intéressant pour la lutte contre les signes de l'âge. De plus, les produits d'origine naturelle sont en plein développement dans le secteur de la cosmétique (Mukherjee et al., 2011). Les antioxydants exogènes renforcent donc la résistance au stress oxydant, préviennent les dommages cutanés et réduisent par conséquent le vieillissement de la peau (Masaki, 2010).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la plante *Andrographis paniculata*. Nous avons exploré l'effet d'un extrait méthanolique d'*Andrographis paniculata*, l'andrographolide, la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide sur le stress oxydant, l'inflammation et la production de collagène dans une culture primaire de fibroblastes dermiques humains. Ces cellules proviennent d'une culture commerciale issue d'une donneuse de type caucasienne âgée de 34 ans, non fumeuse et non alcoolique.

Dans un premier temps, une gamme de concentrations non cytotoxiques a été évaluée par le test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium) et un dosage de l'activité de la LDH. Dans un second temps, la production d'ERO a été dosée à travers la mesure de la sonde DCFH-DA (2',7'-dichlorofluoresceine diacétate). Afin de créer un stress oxydant, les HDFa ont été mis sous pression à l'H₂O₂. Dans un troisième temps, l'expression de *TNF-α* a été déterminée par RT-qPCR avec ou sans pression avec du LPS pour induire une inflammation. De plus, l'inflammation a été induite par le TNF-α pour doser la sécrétion de l'IL-6 et celle de l'IL-8 par la technique d'ELISA dans les surnageants cellulaires. Enfin, la production de procollagène de type I a été déterminée par un test ELISA.

Dans cette étude, nous avons démontré que les concentrations 1, 2,5 et 5 µg/ml pouvaient être utilisées sur les HDFa sans risque de cytotoxicité. Cette gamme de concentrations a pu être utilisée pour la suite des expériences. Nous avons mis en évidence un effet positif de l'extrait méthanolique d'*A. paniculata* et de la 14-deoxyandrographolide contre la production d'ERO à 5 µg/mL et 1 µg/mL, respectivement, dans les HDFa soumis au stress oxydant. En ce qui concerne l'inflammation, l'extrait méthanolique et l'andrographolide ont réduit la sécrétion d'IL-6 et l'expression de *TNF-α* dans des conditions inflammatoires, à une concentration de 5 µg/ml pour les deux. Enfin, la 14-deoxyandrographolide à 5 µg/mL, a réduit la production de pro-collagène de type I.

Nous suggérons que l'utilisation de l'extrait méthanolique d'*Andrographis paniculata* et celle de l'andrographolide pourraient être intéressantes en cosmétique pour prévenir le vieillissement cutané. Le vieillissement cutané touchant aussi bien le derme que l'épiderme, d'autres études devront être entreprises afin d'étudier les effets de ces traitements sur d'autres types cellulaires cutanés, tels que les kératinocytes.

**Andrographis paniculata and its bioactive diterpenoids protect dermal fibroblasts
against inflammation and oxidative stress**

Mussard E.^{a, *}, Toumi H.^{a, b, *}, Legrain B.^c, Jusselin S.^a, Yajid F.^a, Lespessailles E.^{a, b},
Berteina-Raboin S.^d, Cesaro A.^a

^a EA 4708, I3MTO, Université d'Orléans – rue de Chartres, 45000 Orléans, France,

^b Département Rhumatologie, Centre Hospitalier Régional d'Orléans, 45067 Orléans,
France,

^c NOVAXIA - 6 rue des champs Godin, 41220 St Laurent Nouan, France,

^d Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans-Pôle de Chimie, UMR
CNRS 7311, Rue de Chartres-BP 6759, 45067 Orléans CEDEX 2, France.

***Corresponding author**

Hechmi TOUMI, I3MTO laboratory, University of Orleans, 45 000 Orleans, France

Tel: +33 2.38.74.40.56

E-mail address: hechmi.toumi@univ-orleans.fr

ABSTRACT

Background

Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees has long been used in ayurvedic medicine through its anti-inflammatory properties. However, its protective effect of skin aging has not been studied *in vitro*.

Purpose

This study aimed to investigate the anti-aging effects of methanolic extract (ME), andrographolide (ANDRO), neoandrographolide (NEO), 14-deoxyandrographolide (14DAP) and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (14DAP11-12) on human dermal fibroblasts (HDFa) under pro-oxidant or pro-inflammatory condition.

Methods

The *in vitro* anti-aging capacity of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 (1, 2.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was performed in HDFa. Oxidative stress and inflammation were induced by hydrogen peroxide and lipopolysaccharide/TNF- α , respectively. Reactive oxygen species (ROS) production was measured by fluorescence of DCF-DA probe and cytokines (IL6, IL8 and TNF- α) were quantified by ELISA (IL6 and IL8) or RTqPCR (TNF- α). Procollagen type I production was determined by an ELISA.

Results

Our results showed a decrease of ROS production with ME and 14DAP at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Furthermore, IL-6 production and TNF- α expression decreased under ANDRO and ME at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Conclusion

Our data indicated that ME and 14DAP provide protection from oxidative stress. In addition, ME and ANDRO decreased an inflammation marker, IL-6. This suggests their

potential natural treatment against skin damage. Hence, their applications could be of interest in cosmetic for prevent skin aging.

KEYWORDS

Andrographis paniculata; Andrographolide; Skin aging; Oxidative stress; Inflammation

ABBREVIATIONS

14DAP, 14-deoxyandrographolide; 14DAP11-12, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide; ANDRO, Andrographolide; HDFa, Human dermal fibroblasts, adult; I κ B, inhibitor of kappa B; IKK, I κ B kinase; IL-6, interleukin-6; IL-8, interleukin-8; LDH, Lactate dehydrogenase; MAPK, Mitogen activated protein kinases; ME, Methanolic extract; MMPs, Matrix metalloproteinases; NEO, Neoandrographolide; NF- κ B, Nuclear factor-kappa B; PIP, Procollagen type I carboxy-terminal; ROS, Reactive oxygen species; TGF- β 1, Transforming growth factor- β 1; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; UV, Ultraviolet

INTRODUCTION

Skin aging is a complex and unavoidable process. It is divided into two categories: intrinsic aging and extrinsic aging. Intrinsic aging is mainly caused by cell senescence, while extrinsic aging is due to environmental factors such as UV (Cavinato and Jansen-Dürr, 2017; Farage et al., 2008). Extrinsic UV-induced aging is called photoaging. It is associated with reactive oxygen species (ROS) production that exceeds the antioxidant defenses (Fisher et al., 2002; Gilchrist, 1989). This imbalance causes oxidative stress in cells. Interestingly, ROS production activates the nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway (Gloire et al., 2006; Li and Karin, 1999; Morgan and Liu, 2011). Briefly, an excess of ROS induced by UV radiation can activate the I κ B kinase (IKK) which leads to the phosphorylation I κ B and finally to activation of NF- κ B (Park et

al., 2019b; Tanaka et al., 2005). This activation induces pro-inflammatory cytokines secretion such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Lee et al., 2019; Wang and Eskiw, 2019).

Moreover, NF- κ B activation increases matrix metalloproteinases (MMPs) expression leading to extracellular matrix degradation including collagen (Andrulewicz-Botulińska et al., 2019; Han et al., 2019; Kim et al., 2019; Park et al., 2019a). Collagen fibers are essential elements in the dermis architecture (Kielty and Shuttleworth, 1997; Meigel et al., 1977). Both quality and quantity of collagen are essential to the cutaneous mechanical properties (El-Domyati et al., 2002; Fisher et al., 1997, 2008; Quan and Fisher, 2015). In the dermis, fibroblasts synthesize collagen type I and collagen type III (Lovell et al., 1987). It is noted that this capacity drops with age (Varani et al., 2006; Wulf et al., 2004). Therefore, the low collagen production and the action of MMPs lead to the sagging skin and the wrinkles formation (Aust et al., 2008).

In order to reduce skin aging, synthetic antioxidants are widely used in cosmetic products. However, their long-term use may trigger toxic effects. Many studies have shown the interest of natural antioxidant and anti-inflammatory compounds against skin aging (Mukherjee et al., 2011; Saraf and Kaur, 2010; Tundis et al., 2015). In addition, the bioactive molecules are less allergenic and very efficient (Aburjai and Natsheh, 2003). In this study, we focused on *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees (synonym *Justicia paniculata*). its common name is « king of bitter » is part of the Acanthaceae family. It has been used in conventional medicine in Asia to treat inflammatory diseases such as respiratory diseases (influenza, cough, and bronchitis) and hepatitis (Okhwarobo et al., 2014; Tan et al., 2017).

Methanol extract (ME) from the leaves of *Andrographis paniculata* has been shown to be anti-inflammatory (Sheeja et al., 2006a), antioxidant (Hussain et al., 2017; Radhika et al., 2012) and antitumor (Suzuki et al., 2016). The same extract showed a hepatoprotective (Handa and Sharma, 1990) and antiviral effect (Tang et al., 2012). In these extracts, many bioactive compounds are identified, including diterpenes (Chao and Lin, 2010). In 2014, Sareer et al., show that Andrographolide (ANDRO) is the main bioactive compound in the leaves of *Andrographis paniculata* (Sareer et al., 2014). To date, this molecule is known for its antiviral

(Paemanee et al., 2019), anticancer (Forestier-Román et al., 2019), hepatoprotective (Wang et al., 2019), antioxidant (Tan et al., 2018) and anti-inflammatory (Yang et al., 2019) properties. Other diterpenoids are present in the aerial part of the plant: 14-deoxyandrographolide (14DAP) and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (14DAP11-12), neoandrographolide (NEO). Antioxidant and anti-inflammatory effects of these derivatives have been reported in several publications (Batkhuu et al., 2002; Kamdem et al., 2002; Lee et al., 2010; Liu et al., 2007; Mandal et al., 2013; Parichatikanond et al., 2010)

However, the effect of these molecules on skin aging notably on cells oxidation and inflammation has not been explored. Herein, we aim to evaluate the potential effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on human skin fibroblasts under oxidative stress or pro-inflammatory conditions.

RESULTS

Analysis of methanolic extract from *Andrographis paniculata*

Andrographolide was identified in methanolic extract. ANDRO peaks from ME were identified at 11.9 min by comparing the retention times obtained using the andrographolide standard. As shown in Fig.1, we detected a proportion of andrographolide in methanolic extract of 0.87 %. We tested methanol extract according to the andrographolide concentration.

Cytotoxicity assays

In preliminary experiments, we evaluated the effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 at various concentrations (0 to 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on HDFa viability. Hence, cell proliferation was measured by an MTT assay and cell cytotoxicity was performed by a dosage of the LDH release, for 24 h and 48 h. Cell viability and cytotoxicity were not affected by ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 up to a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 2). Therefore,

ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 were used in subsequent experiments at 1, 2.5 and 5 µg/mL.

Antioxidant activity in HDFa

Next, we analyzed the effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on ROS production in H₂O₂-stimulated HDFa for 1 h. H₂O₂ caused an increase in intracellular ROS levels in HDFa compared to non-stimulated cells (Fig. 3). This increase in ROS production under H₂O₂ pressure was significantly reduced by ME treatment at 5 µg/mL (Fig. 3A) and by 14DAP at 1 µg/mL (Fig. 3D) compared to H₂O₂ condition (79% and 17% of decrease, respectively). In contrast, ANDRO, NEO and 14DAP11-12 had been unsuccessful in decreasing ROS levels (Fig. 3B, C, and E) under oxidative stress.

TNF-α expression in HDFa

To explore whether ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 attenuated TNF-α expression, we pretreated HDFa with these molecules for 18h and then stimulated cells with LPS at 10 µg/mL for an additional 6h. Under pro-inflammatory condition, we observed that ME and ANDRO at 5µg/mL significantly decreased TNF-α mRNA level (Fig. 4A and B). However, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 treatments didn't lead to a decrease of TNF-α mRNA expression (Fig. 4C, D and E).

Cytokine secretions in HDFa

As mentioned above, LPS was used to induce an inflammatory stress. We observed that HDFa treated by LPS show an increase in IL-6 and IL-8 cytokines production. In these conditions, our treatments ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 did not affect this increase of IL-6 and IL-8 (data not shown).

Afterward the effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 treatment on IL-6 and IL-8 production were analyzed. We observed that TNF- α treatment led to an increase in IL-6 and IL-8 production in HDFa compared to non-stimulated cells (Fig. 5). The increased IL-6 secretion was significantly reduced by ANDRO and ME at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (20% and 27% of decrease, respectively) (Fig. 5A and B). However, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 had no effect on IL-6 production (Fig. 5C, D and E) under TNF- α condition. Yet no effect has been observed for IL-8 (Fig. 6).

Pro-collagen type I production

Finally, we measured the pro-collagen type I synthesis in HDFa after incubation with ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 for 48 h (Fig. 7). As shown in Fig. 7, there was a significant decrease for 14DAP at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (34% decrease).

DISCUSSION

Inflammation and oxidative stress are often involved in extrinsic skin aging (Rittié and Fisher, 2002). Many natural agents with anti-inflammatory and antioxidant properties are of interest for the skin anti-aging process (Mukherjee et al., 2011; Saraf and Kaur, 2010; Tundis et al., 2015). In this study, we focused on *Andrographis paniculata* plant. We have explored the effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on oxidative stress, inflammation and collagen production.

Oxidative stress is attributed to the cytokines production and the collagen fragmentation (Fisher et al., 2002). Therefore, regulating ROS levels seems to be an interesting strategy by which natural compounds with antioxidant activity could be used. In the present study, ME with the bioactive compound ANDRO (comprising 0.87 % of ANDRO) showed a high antioxidant effect in HDFa (Fig. 3B), as seen in prior studies (Akowuah et al., 2006; Sheeja et al., 2006b). Also, our study examined the antioxidant propriety of 14DAP at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in HDFa

(Fig. 3B). There are few studies on the antioxidant capacity of 14DAP. Based on our findings, it would appear that ANDRO isn't responsible for ROS decrease in HDFa stimulated with ME under H₂O₂ pressure. According to Malahubban et al., *Andrographis paniculata* leaves extracted with methanol had a high phenolic content. Also, this extract had the highest levels of bioactive compounds, followed by ethanol, water and chloroform. A large quantity of alkaloids, saponins, flavonoids, tannins, terpenoids and steroids has been found, including the highest amount of ANDRO. The presence of phenols and other bioactive molecules may explain the ROS decrease in the results we obtain with ME. One or more active ingredients can act alone or in synergy in this extract. Interestingly, we didn't observe a decrease in ROS production in our cells treated with ANDRO. However, many studies have shown that ANDRO reduces oxidative stress (Gu et al., 2018; Liang et al., 2018; Wu et al., 2018). For example, ANDRO (0.625 μM and 2.5 μM) decreased ROS production in a primary culture of rat chondrocytes co-treated with H₂O₂ for 1h (Li et al., 2018). ANDRO may act differently depending on the cell type. In mouse skin exposed to UVs, Zhan et al., have shown that topical application of ANDRO increased the activity of SOD and CAT in (Zhan et al., 2016). These enzymes are essential to the mechanism of free radical elimination and consequently the cellular redox balance (He et al., 2017).

With increased age, the immune systems undergo multiple changes. These include a progressive increase of proinflammatory cytokines production such as interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), and tumor necrosis factor alpha (TNFα) with age, thus producing chronic low-grade inflammation (Pillai et al., 2005). Fibroblasts are non-immune cells but these cells have the ability to produce proinflammatory cytokines and participating in local inflammatory responses (Smith et al., 1997). Cytokines such as IL-6 accelerated the secretion of MMP-1 and MMP-3 (Hwang et al., 2013; Park et al., 2004). On the other hand, TGF-β1 induced procollagen type I synthesis. However, IL-6 limited the TGF-β1 pathway in dermal fibroblasts (Sun et al., 2016; Zhong et al., 2011), hence leading to collagen loss in the dermis. Thus, the application of anti-inflammatory compounds appears to be a strategy to prevent skin aging. Our results showed that in HDFa, treatment with ANDRO or ME at 5 μg/mL while undergoing TNFα-stimulation resulted in decrease in IL-6 secretion (Fig. 5A and B). Sheeja and Kuttan, reported low cytokine levels in mice treated for metastatic tumor with extract of *Andrographis*

paniculata (Sheeja and Kuttan, 2010), in accordance with our results. IL-6 plays a key role in the inflammatory response of HDFa (Lago and Puzzi, 2019), and as shown in our data, treatment with ME and ANDRO regulate IL-6 production. In our study, ME and ANDRO at 5 µg/mL showed a decrease of TNF-α expression in HDFa under inflammation (Fig. 4A and B). Our results confirm recent reports which have shown an inhibitory effect of ANDRO on TNF-α in inflammation (Ding et al., 2017; Wong et al., 2016; Xu et al., 2019; Yang et al., 2019). According our results, ANDRO inhibits LPS-mediated TNF-α and IL-6 production in RAW 264.7 cells (Lee et al., 2011). In the skin, andrographolide sodium bisulfate significantly reduced the secretion of TNF-α (1.2 and 3.6 mg/mouse) and IL-6 (3.6 mg/mouse) in mice skin exposed to UV radiation (Zhan et al., 2016). Interestingly, we didn't observe any inhibition of IL-8 secretion in HDFa treated with TNF-α (Fig. 6). However, in a colorectal line HCT116 treated with TNF-α, ANDRO (5, 10 and 20 µM) restrained IL-8 in regards to mRNA, protein and promoter activity (Yuan et al., 2018).

In intrinsic aging, collagen level decreases whereas in extrinsic aging, collagen level increases and often fragmented (Uitto, 2008). Collagen is mainly responsible for dermal strength (Fisher, 2005). In the present study, only NEO at 5 µg/mL decreased the procollagen type I in HDFa (Fig. 7). NEO application could be interesting to reduce changes in the organization of connective tissue in skin damaged by photoaging. Zhan et al., showed that Andrographolide sodium bisulfate (1.2 and 3.6 mg/mouse) prevents UV-induced collagen damage by inhibiting UV-induced increases in MMP-1 and MMP-3 expression in mice skin (Zhan et al., 2016).

CONCLUSION

In this study, we demonstrated a positive effect of ME, ANDRO and 14DAP against skin damage caused by oxidative stress and inflammation in dermal fibroblasts. In fact, ME and 14DAP acted positively against oxidative stress at 5 µg/mL and 1 µg/mL, respectively. Moreover, 5 µg/mL both ME and ANDRO decreased IL-6 secretion and TNF-α expression under

inflammatory condition. Finally, at 5µg/mL 14DAP decreased pro-collagen type I secretion. We suggest that the use of ME and ANDRO could be of interest in cosmetic for prevent skin aging.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Andrographolide was obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Neoandrographolide, 14-Deoxyandrographolide and 14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide were purchased from Carbosynth (Carbosynth, Compton, Berkshire, UK). The compounds were illustrated in the Figure 1. The molecules were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) as a stock solution at 10 mg/mL and stored at -20°C.

Preparation of *A. paniculata* extract

The dried leaves of *Andrographis paniculata* were purchased from AYur-vana®. The leaf powder was extracted by maceration in methanol (15 mL / g) for 2h at RT and then sonicated for 1h in ice. The crude extract was filtered, and the methanol was evaporated overnight at RT. The extract was suspended in DMSO (0.6 g / mL) and filtered.

HPLC analysis

Methanolic extract was analyzed by reverse-phase HPLC using a Zorbax Eclipse XDB-C18 column 4.6 x 150 mm (Agilent) on an Agilent 1220 Infinity II LC System. The mobile phase was delivered at a rate of 1 mL/min with a gradient from A (0.1% HCOOH in H₂O) to B (0.1% HCOOH in CH₃CN) (10% B for 4 min, 10% to 60% B in 10 min, 60% to 100% B in 2 min.). The column effluent was monitored at 250 nm.

The quantity of andrographolide contained in the methanolic extract was determined by comparison with a range of pure andrographolide (standard).

Cell culture

Human dermal fibroblasts, adult (HDFa) was obtain from Gibco (Gibco, Life Technologies Corp. C-013-5C, Carlsbad, CA). HDFa were cultured with DMEM (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 2% L-glutamine (Lonza, Basel, Switzerland) and 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Mixture (Lonza, Basel, Switzerland). For the experiments, HDFa were used from passage P3 to passage P7. HDFa were seeded at a density of 5 000 cells/cm² and maintained at 37 °C in 5% CO₂. The medium was changed twice a week. Cell confluence at the time of experiment was approximately 80%.

Cell treatment

Experimental group cells were treated with ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12. The concentration range used were 1, 2.5 or 5 µg/mL for ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12, and equivalent to 1, 2.5 or 5 µg/mL of andrographolide for ME. The control cells were treated with 0.05% DMSO.

MTT assay

Cell viability was assessed using a colorimetric assay that reduces MTT (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) to formazan dye, producing a purple color. Briefly, HDFa seeded in a 96-well plate at 8 x 10³ cells/well. After 24 h of incubation, cells were treated with the concentration range of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 for 24 h or 48 h. Then, 10% (w/v) of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well and further incubated for 4 h at 37

°C, 5% CO₂. The medium was removed, and the blue crystals were dissolved in 100 µl SDS-acidic-isopropanol solution (0.5% SDS; 80 mM HCl). The optical density (OD) of each well was measured at 450 nm using 620 nm reference with a microplate reader (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific). The assay performed in 6 replicates of three independent experiments (n=3).

Lactate dehydrogenase activity

Cell cytotoxicity was assessed by determining released lactate dehydrogenase (LDH) into the medium by damaged cells, using Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). This method is based on the LDH-catalyzed reduction of pyruvate lactate by NADH. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^4 cells per well. After 24 h of incubation, cells were treated with the concentration range of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 for 24 h or 48 h. Briefly, equal amounts of culture supernatant were mixed with reaction mixture containing NADH. After 30 min at room temperature, the reaction was stopped by Stop Solution. The absorbance was measured with a microplate reader (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific) at 490 nm using 680 nm reference. LDH activity released in maximum LDH release by complete lysis of cells were determined. Data are presented as the percentage of LDH released into the medium relative to maximum LDH control. The assay performed in 6 replicates of three independent experiments (n=3).

Intracellular reactive oxygen species (ROS)

The intercellular production of ROS levels was determined using DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). The permeable DCFH-DA is oxidized by ROS to the highly fluorescent compound 2',7'-chlorofluorescein (DCF). HDFa were seeded in 96-well plates at 1.5×10^4 cells/well. After 24 h of incubation, the medium was replaced by DMEM containing 25 µM DCFH-DA for 45 min at 37°C. Then DCFH-DA was removed, and the cells were washed with PBS. Afterwards, the cells were incubated with the

concentration range of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12 with or without 0.5 mM H₂O₂ (as free radical generator) for 1 h at 37°C. Subsequently, fluorescence intensity per each well was detected using a microplate reader (EMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at an excitation wavelength of 485 nm and at an emission wavelength of 520 nm. The fluorescence intensity is directly proportional to the concentration of free radical compounds. The assay performed in 6 replicates of three independent experiments (n=3).

Quantitative RT-PCR

HDFa were seeded in 6-well plates at 4.5×10^4 cells/well up to 80 % confluence. Then, cells were pretreated with the concentration range of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12 for 18 h and LPS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was added in the medium at 10 µg/mL for an additional time of 6 h. Total RNA was isolated from cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Nucleic acid concentration and purity were determined by µDrop™ plate (Thermo Fisher Scientific Inc.). One microgram of total RNA was retrotranscribed using QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's procedure. The reaction was performed according to the manufacturer's instructions of QuantiTect® SYBR Green Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany). Quantitative PCR was performed by C1000™ Thermal cycler (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad) under the following conditions: 10 min 95°C, followed by 40 cycles of 15 s 95°C and 1 min 60°C. Quantitative PCR reaction was performed using specific primers: human TNF-α (Invitrogen: forward, 5'-CTC TTC TGC CTG CTG CAC TT-3'; reverse, 5' CAG CTT GAG GGT TTG CTA CA3') and GAPDH (Qiagen cat. #QT00079247) as an internal control. Data were analyzed using 2-ΔΔCT method. The assay performed in 2 replicates of three independent experiments (n=3).

Measurement of IL-6 and IL-8 secretion

HDFa were seeded in 24-well plates at 1×10^4 cells/well up to 80 % confluence and then further cultured in fresh DMEM containing ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12, with or without TNF- α (10 ng/mL; as cytokines generator) for 24 h. Supernatants were collected and used in analysis of newly secreted interleukins. IL-6 and IL-8 were quantified using a sandwich ELISA assay kit (Peprotech, Rock Hill, NJ, USA), according to the manufacturer's protocol. The assay performed in 2 replicates of three independent experiments (n=3).

Measurement of procollagen type I secretion

HDFa were seeded in 24-well plates at 2.5×10^4 cells/well overnight and then further cultured in fresh serum-free DMEM with or without ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12 for 48 h. Collected cell-free supernatants were analyzed for the level of procollagen type I carboxy-terminal (PIP) by an ELISA kit (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) according to the manufacturer's recommended protocol. The assay performed in 2 replicates of three independent experiments (n=3).

Statistic test

All data are presented as mean \pm standard deviation (SD). Comparisons between groups were analyzed using GraphPad Prism software via ANOVA by Kruskal-Wallis statistic (Dunn's multiple comparisons test). Difference with p-value <0.05 was considered significant.

Acknowledgements

We sincerely thank Dr. Pierre Lafite for his scientific advice and Wendy Auchere for the realization of some experiments.

FOOTNOTE

Funding

This research was supported by Cosmetosciences, a global training and research program dedicated to the cosmetic industry. Located in the heart of the cosmetic valley, this program led by University of Orléans is funded by the Région Centre-Val de Loire.

Conflicts of interests

The authors declare no conflict of interests.

REFERENCES

Aburjai, T., and Natsheh, F.M. (2003). Plants used in cosmetics. *Phytother. Res. PTR* 17, 987–1000.

Akowuah, G.A., Zhari, I., Norhayati, I., and Mariam, A. (2006). HPLC and HPTLC densitometric determination of andrographolides and antioxidant potential of *Andrographis paniculata*. *J. Food Compos. Anal.* 19, 118–126.

Andrulewicz-Botulińska, E., Kuźmicz, I., Nazaruk, J., Wosek, J., and Galicka, A. (2019). The concentration-dependent effect of anethole on collagen, MMP-2 and GAG in human skin fibroblast cultures. *Adv. Med. Sci.* 64, 111–116.

Aust, M.C., Fernandes, D., Kolokythas, P., Kaplan, H.M., and Vogt, P.M. (2008). Percutaneous Collagen Induction Therapy: An Alternative Treatment for Scars, Wrinkles, and Skin Laxity. *Plast. Reconstr. Surg.* 121, 1421.

Batkhuu, J., Hattori, K., Takano, F., Fushiya, S., Oshiman, K., and Fujimiya, Y. (2002). Suppression of NO production in activated macrophages in vitro and ex vivo by neoandrographolide isolated from *Andrographis paniculata*. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1169–1174.

Cavinato, M., and Jansen-Dürr, P. (2017). Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp. Gerontol.* 94, 78–82.

Chao, W.-W., and Lin, B.-F. (2010). Isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian). *Chin. Med.* 5, 17.

Ding, Y., Shi, C., Chen, L., Ma, P., Li, K., Jin, J., Zhang, Q., and Li, A. (2017). Effects of andrographolide on postoperative cognitive dysfunction and the association with NF- κ B/MAPK pathway. *Oncol. Lett.* 14, 7367–7373.

El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., Brown, D., Birk, D.E., Gasparro, F., Ahmad, H., and Uitto, J. (2002). Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp. Dermatol.* 11, 398–405.

Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., and Maibach, H.I. (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 30, 87–95.

Fisher, G.J., Wang, Z.Q., Datta, S.C., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J.J. (1997). Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* 337, 1419–1428.

Fisher, G.J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., and Voorhees, J.J. (2002). Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Arch. Dermatol.* 138, 1462–1470.

Fisher, G.J., Varani, J., and Voorhees, J.J. (2008). Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch. Dermatol.* 144, 666–672.

Forestier-Román, I.S., López-Rivas, A., Sánchez-Vázquez, M.M., Rohena-Rivera, K., Nieves-Burgos, G., Ortiz-Zuazaga, H., Torres-Ramos, C.A., and Martínez-Ferrer, M. (2019). Andrographolide induces DNA damage in prostate cancer cells. *Oncotarget* 10, 1085–1101.

Gilchrest, B.A. (1989). Skin aging and photoaging: An overview. *J. Am. Acad. Dermatol.* 21, 610–613.

Gloire, G., Legrand-Poels, S., and Piette, J. (2006). NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493–1505.

Gu, L., Yu, Q., Li, Q., Zhang, L., Lu, H., and Zhang, X. (2018). Andrographolide Protects PC12 Cells Against β -Amyloid-Induced Autophagy-Associated Cell Death Through Activation of the Nrf2-Mediated p62 Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 19.

Han, H.-S., Shin, J.-S., Myung, D.-B., Ahn, H.S., Lee, S.H., Kim, H.J., and Lee, K.-T. (2019). *Hydrangea serrata* (Thunb.) Ser. Extract Attenuate UVB-Induced Photoaging through MAPK/AP-1 Inactivation in Human Skin Fibroblasts and Hairless Mice. *Nutrients* 11.

Handa, S.S., and Sharma, A. (1990). Hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata* against carbontetrachloride. *Indian J. Med. Res.* 92, 276–283.

He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., and Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 44, 532–553.

Hussain, R.M., Razak, Z.N.R.A., Saad, W.M.M., and Mustakim, M. (2017). Mechanism of antagonistic effects of *Andrographis paniculata* methanolic extract against *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, 685–695.

Hwang, E., Kim, S.H., Lee, S., Lee, C.H., Do, S.-G., Kim, J., and Kim, S.Y. (2013). A comparative study of baby immature and adult shoots of *Aloe vera* on UVB-induced skin photoaging in vitro. *Phytother. Res. PTR* 27, 1874–1882.

Kamdem, R.E., Sang, S., and Ho, C.-T. (2002). Mechanism of the superoxide scavenging activity of neoandrographolide - a natural product from *Andrographis paniculata* Nees. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4662–4665.

Kielty, C.M., and Shuttleworth, C.A. (1997). Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc. Res. Tech.* 38, 413–427.

Kim, M., Son, D., Shin, S., Park, D., Byun, S., and Jung, E. (2019). Protective effects of *Camellia japonica* flower extract against urban air pollutants. *BMC Complement. Altern. Med.* 19, 30.

Lago, J.C., and Puzzi, M.B. (2019). The effect of aging in primary human dermal fibroblasts. *PloS One* 14, e0219165.

Lee, K.-C., Chang, H.-H., Chung, Y.-H., and Lee, T.-Y. (2011). Andrographolide acts as an anti-inflammatory agent in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages by inhibiting STAT3-mediated suppression of the NF- κ B pathway. *J. Ethnopharmacol.* 135, 678–684.

Lee, K.-J., Park, K.H., and Hahn, J.-H. (2019). Alleviation of Ultraviolet-B Radiation-Induced Photoaging by a TNFR Antagonistic Peptide, TNFR2-SKE. *Mol. Cells* 42, 151–160.

Lee, M.-J., Rao, Y.K., Chen, K., Lee, Y.-C., Chung, Y.-S., and Tzeng, Y.-M. (2010). Andrographolide and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide from *Andrographis paniculata* attenuate high glucose-induced fibrosis and apoptosis in murine renal mesangial cell lines. *J. Ethnopharmacol.* 132, 497–505.

Li, N., and Karin, M. (1999). Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J.* 13, 1137–1143.

Li, B., Jiang, T., Liu, H., Miao, Z., Fang, D., Zheng, L., and Zhao, J. (2018). Andrographolide protects chondrocytes from oxidative stress injury by activation of the KEAP1-Nrf2-Are signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* 234, 561–571.

Liang, E., Liu, X., Du, Z., Yang, R., and Zhao, Y. (2018). Andrographolide Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy in Mice by Blockage of Oxidative Damage and NF- κ B-Mediated Inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 9086747.

Liu, J., Wang, Z.-T., Ji, L.-L., and Ge, B.-X. (2007). Inhibitory effects of neoandrographolide on nitric oxide and prostaglandin E2 production in LPS-stimulated murine macrophage. *Mol. Cell. Biochem.* 298, 49–57.

Lovell, C.R., Smolenski, K.A., Duance, V.C., Light, N.D., Young, S., and Dyson, M. (1987). Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *Br. J. Dermatol.* 117, 419–428.

Mandal, S., Nelson, V.K., Mukhopadhyay, S., Bandhopadhyay, S., Maganti, L., Ghoshal, N., Sen, G., and Biswas, T. (2013). 14-Deoxyandrographolide targets adenylate cyclase and prevents ethanol-induced liver injury through constitutive NOS dependent reduced redox signaling in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 59, 236–248.

Meigel, W.N., Gay, S., and Weber, L. (1977). Dermal architecture and collagen type distribution. *Arch. Dermatol. Res.* 259, 1–10.

Morgan, M.J., and Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res.* 21, 103–115.

Mukherjee, P.K., Maity, N., Nema, N.K., and Sarkar, B.K. (2011). Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine* 19, 64–73.

Okhuarobo, A., Ehizogie Falodun, J., Erharuyi, O., Imieje, V., Falodun, A., and Langer, P. (2014). Harnessing the medicinal properties of *Andrographis paniculata* for diseases and beyond: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4, 213–222.

Paemanee, A., Hitakarun, A., Wintachai, P., Roytrakul, S., and Smith, D.R. (2019). A proteomic analysis of the anti-dengue virus activity of andrographolide. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 109, 322–332.

Parichatikanond, W., Suthisisang, C., Dhepakson, P., and Herunsalee, A. (2010). Study of anti-inflammatory activities of the pure compounds from *Andrographis paniculata* (burm.f.) Nees and their effects on gene expression. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1361–1373.

Park, C.-H., Lee, M.J., Ahn, J., Kim, S., Kim, H.H., Kim, K.H., Eun, H.C., and Chung, J.H. (2004). Heat shock-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 are mediated through ERK and JNK activation and via an autocrine interleukin-6 loop. *J. Invest. Dermatol.* 123, 1012–1019.

Park, N.H., Kang, Y.-G., Kim, S.-H., Bae, I.-H., Lee, S.H., Kim, D.-Y., Hwang, J.S., Kim, Y.J., Lee, T.R., and Lee, E.-S. (2019a). Dehydroabietic Acid Induces Regeneration of Collagen Fibers in

Ultraviolet B-Irradiated Human Dermal Fibroblasts and Skin Equivalents. *Skin Pharmacol. Physiol.* 32, 109–116.

Park, S.-H., Lee, S.-S., Bang, M.-H., Jo, S.K., Jhee, K.-H., and Yang, S.-A. (2019b). Protection against UVB-induced damages in human dermal fibroblasts: efficacy of tricin isolated from enzyme-treated *Zizania latifolia* extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 83, 551–560.

Pillai, S., Oresajo, C., and Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 27, 17–34.

Quan, T., and Fisher, G.J. (2015). Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology* 61, 427–434.

Radhika, P., Annapurna, A., and Rao, S.N. (2012). Immunostimulant, cerebroprotective & nootropic activities of *Andrographis paniculata* leaves extract in normal & type 2 diabetic rats. *Indian J. Med. Res.* 135, 636–641.

Rittié, L., and Fisher, G.J. (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.* 1, 705–720.

Saraf, S., and Kaur, C.D. (2010). Phytoconstituents as photoprotective novel cosmetic formulations. *Pharmacogn. Rev.* 4, 1–11.

Sareer, O., Ahmad, S., and Umar, S. (2014). *Andrographis paniculata*: a critical appraisal of extraction, isolation and quantification of andrographolide and other active constituents. *Nat. Prod. Res.* 28, 2081–2101.

Sheeja, K., and Kuttan, G. (2010). *Andrographis paniculata* downregulates proinflammatory cytokine production and augments cell mediated immune response in metastatic tumor-bearing mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 11, 723–729.

Sheeja, K., Shihab, P.K., and Kuttan, G. (2006a). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 28, 129–140.

Sheeja, K., Shihab, P.K., and Kuttan, G. (2006b). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 28, 129–140.

Smith, R.S., Smith, T.J., Blieden, T.M., and Phipps, R.P. (1997). Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am. J. Pathol.* 151, 317–322.

Sun, Z., Park, S.Y., Hwang, E., Park, B., Seo, S.A., Cho, J.-G., Zhang, M., and Yi, T.-H. (2016). Dietary *Foeniculum vulgare* Mill extract attenuated UVB irradiation-induced skin photoaging by activating of Nrf2 and inhibiting MAPK pathways. *Phytomedicine* 23, 1273–1284.

Suzuki, R., Matsushima, Y., Okudaira, N., Sakagami, H., and Shirataki, Y. (2016). Cytotoxic Components Against Human Oral Squamous Cell Carcinoma Isolated from *Andrographis paniculata*. *Anticancer Res.* 36, 5931–5935.

Tan, W.S.D., Liao, W., Zhou, S., and Wong, W.S.F. (2017). Is there a future for andrographolide to be an anti-inflammatory drug? Deciphering its major mechanisms of action. *Biochem. Pharmacol.* 139, 71–81.

Tan, W.S.D., Liao, W., Peh, H.Y., Vila, M., Dong, J., Shen, H.-M., and Wong, W.S.F. (2018). Andrographolide simultaneously augments Nrf2 antioxidant defense and facilitates autophagic flux blockade in cigarette smoke-exposed human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 360, 120–130.

Tanaka, K., Hasegawa, J., Asamitsu, K., and Okamoto, T. (2005). Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor kappaB inhibitor, parthenolide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 624–630.

Tang, L.I.C., Ling, A.P.K., Koh, R.Y., Chye, S.M., and Voon, K.G.L. (2012). Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 3.

Tundis, R., Loizzo, M.R., Bonesi, M., and Menichini, F. (2015). Potential role of natural compounds against skin aging. *Curr. Med. Chem.* 22, 1515–1538.

Uitto, J. (2008). The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J. Drugs Dermatol. JDD* 7, s12-16.

Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligiel, S.E.G., Kang, S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2006). Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin. *Am. J. Pathol.* 168, 1861–1868.

Wang, C., and Eskiw, C.H. (2019). Cytoprotective effects of Avenanthramide C against oxidative and inflammatory stress in normal human dermal fibroblasts. *Sci. Rep.* 9, 2932.

Wang, L., Cao, F., Zhu, L.-L., Liu, P., Shang, Y.-R., Liu, W.-H., Dong, X., Bao, H.-D., Gong, P., and Wang, Z.-Y. (2019). Andrographolide impairs alpha-naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in vivo. *J. Nat. Med.* 73, 388–396.

Wong, S.Y., Tan, M.G.K., Banks, W.A., Wong, W.S.F., Wong, P.T.-H., and Lai, M.K.P. (2016). Andrographolide attenuates LPS-stimulated up-regulation of C-C and C-X-C motif chemokines in rodent cortex and primary astrocytes. *J. Neuroinflammation* 13, 34.

Wu, T., Peng, Y., Yan, S., Li, N., Chen, Y., and Lan, T. (2018). Andrographolide Ameliorates Atherosclerosis by Suppressing Pro-Inflammation and ROS Generation-Mediated Foam Cell Formation. *Inflammation* 41, 1681–1689.

Wulf, H.C., Sandby-Møller, J., Kobayasi, T., and Gniadecki, R. (2004). Skin aging and natural photoprotection. *Micron Oxf. Engl.* 1993 35, 185–191.

Xu, Y., Wei, H., Wang, J., Wang, W., and Gao, J. (2019). Synthesis of andrographolide analogues and their neuroprotection and neurite outgrowth-promoting activities. *Bioorg. Med. Chem.*

Yang, M.-Y., Yu, Q.-L., Huang, Y.-S., and Yang, G. (2019). Neuroprotective effects of andrographolide derivative CX-10 in transient focal ischemia in rat: Involvement of Nrf2/AE and TLR/NF- κ B signaling. *Pharmacol. Res.* 144, 227–234.

Yuan, M., Meng, W., Liao, W., and Lian, S. (2018). Andrographolide Antagonizes TNF- α -Induced IL-8 via Inhibition of NADPH Oxidase/ROS/NF- κ B and Src/MAPKs/AP-1 Axis in Human Colorectal Cancer HCT116 Cells. *J. Agric. Food Chem.* 66, 5139–5148.

Zhan, J.Y.-X., Wang, X.-F., Liu, Y.-H., Zhang, Z.-B., Wang, L., Chen, J.-N., Huang, S., Zeng, H.-F., and Lai, X.-P. (2016). Andrographolide Sodium Bisulfate Prevents UV-Induced Skin Photoaging through Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016, 3271451.

Zhong, J., Hu, N., Xiong, X., Lei, Q., and Li, L. (2011). A novel promising therapy for skin aging: Dermal multipotent stem cells against photoaged skin by activation of TGF- β /Smad and p38 MAPK signaling pathway. *Med. Hypotheses* 76, 343–346.

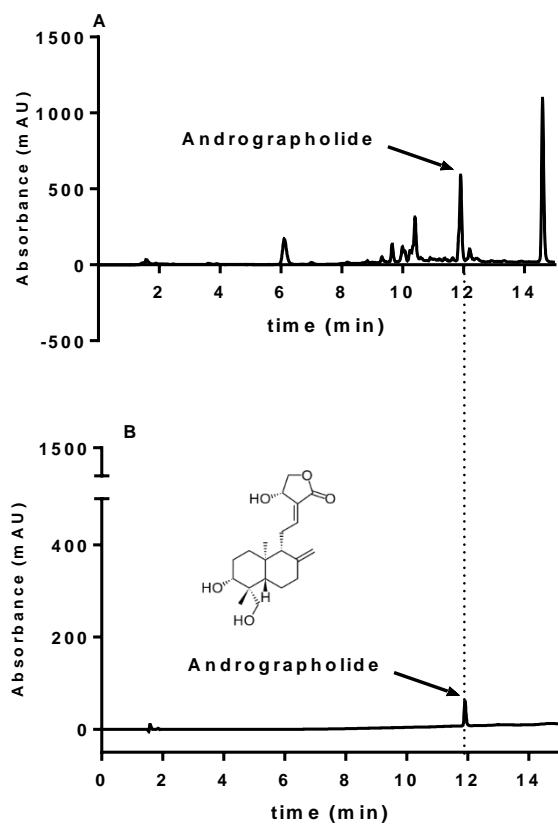


Fig. 1: HPLC results of (A) andrographolide from methanolic extract of *Andrographis paniculata*; (B) andrographolide standard.

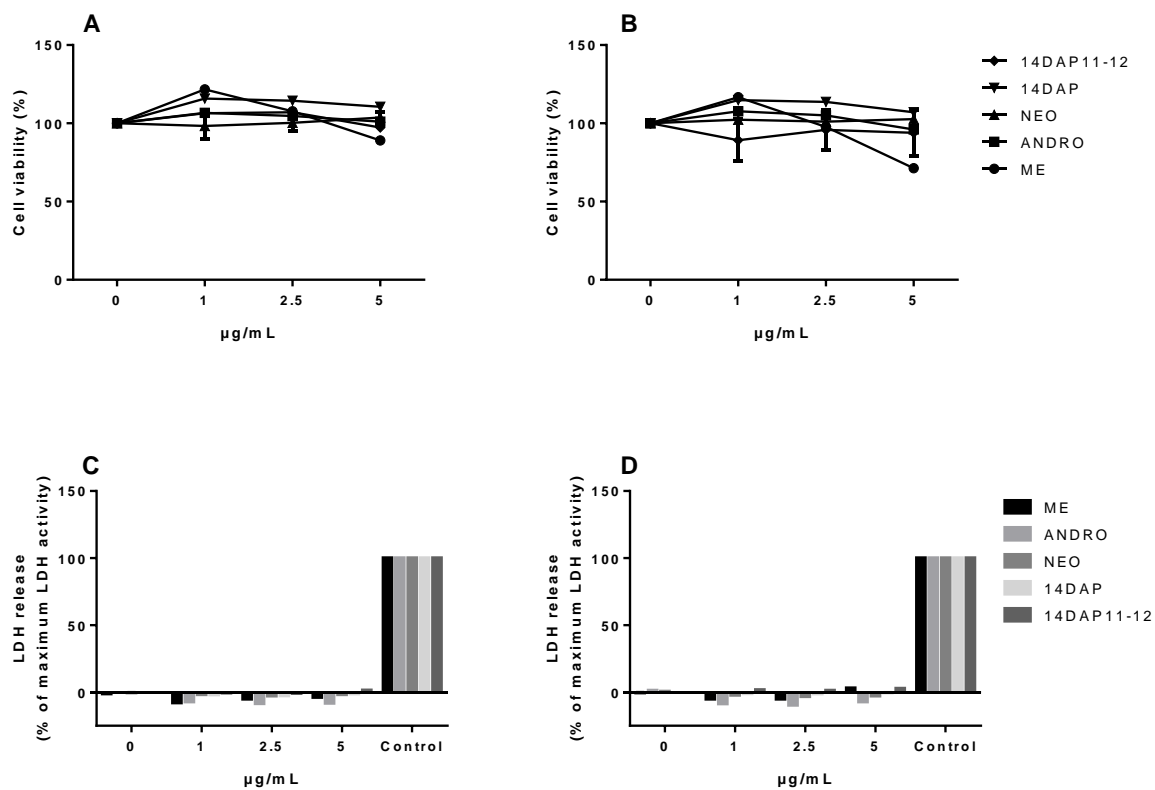


Fig. 2: Effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on HDFa cytotoxicity. HDFa were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 µg/mL) of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12 for 24 h (A and C) and 48 h (B and D). The control cells were treated with 0.05% DMSO. Cell viability and cell cytotoxicity were determined by an MTT assay (A and B) and a dosage of LDH release (C and D), respectively. The values mean \pm S.D. * $p < 0.05$ compared with control group, $n=3$.

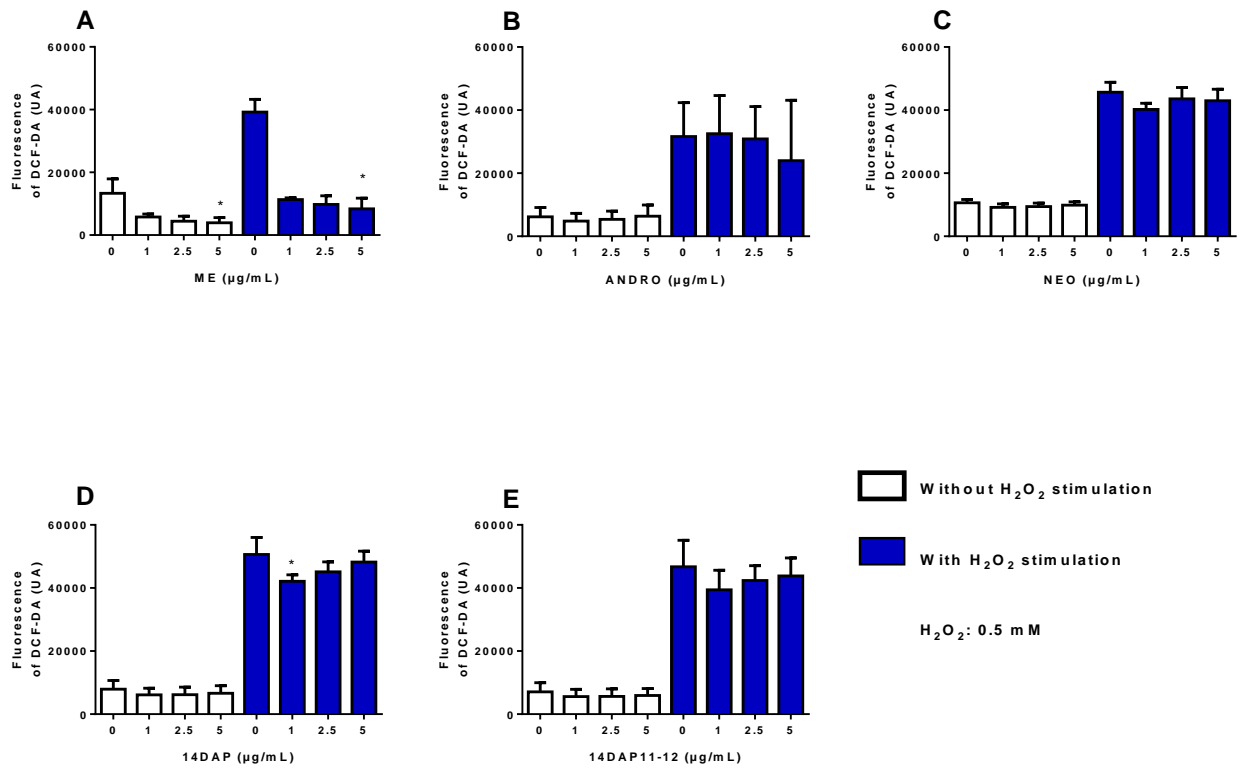


Fig. 3: Effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on oxidative stress. HDFa were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 µg/mL) of ME (A), ANDRO (B), NEO (C), 14DAP (D), or 14DAP11-12 (E) for 1 h. The control cells were treated with 0.05% DMSO. ROS production was induced by 0.5 mM H₂O₂ and free radical scavenging activity was done using a DCFH-DA probe. The values mean ±S.D. * p < 0.05 compared with control group, n=3.

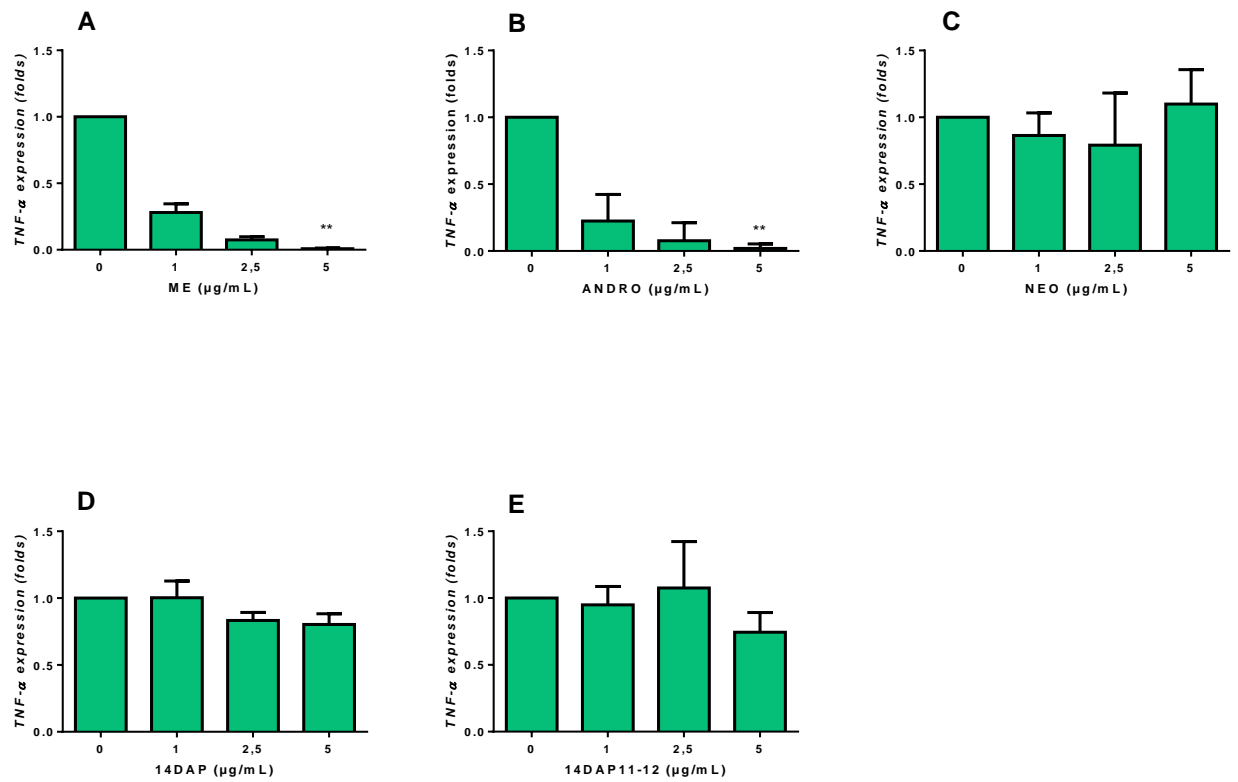


Fig. 4: Effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on *TNF-α* expression under pro-inflammation condition. HDFa were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 µg/mL) of ME (A), ANDRO (B), NEO (C), 14DAP (D), or 14DAP11-12 (E) for 24 h. The control cells were treated with 0.05% DMSO. Inflammation condition was induced by LPS (10 µg/mL) and *TNF-α* expression was determined by a RT-qPCR. The values mean ±S.D. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with control group, n=3.

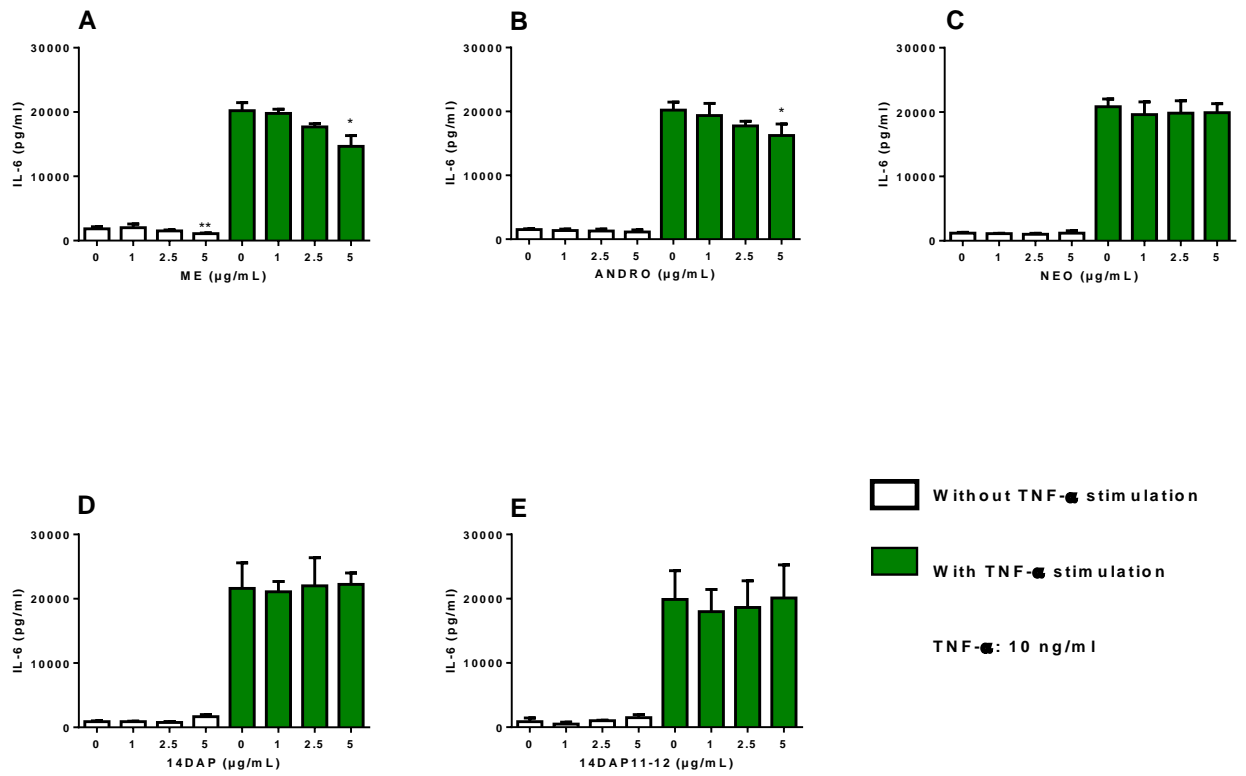


Fig. 5: Effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on IL-6 secretion. HDFa were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of ME (A), ANDRO (B), NEO (C) 14DAP (D), or 14DAP11-12 (E) for 24h. The control cells were treated with 0.05% DMSO. Inflammation was induced by TNF- α (10 ng/mL) and cytokines secretion was done using an ELISA assay. The values mean \pm S.D. * $p < 0.05$ compared with control group, $n=3$.

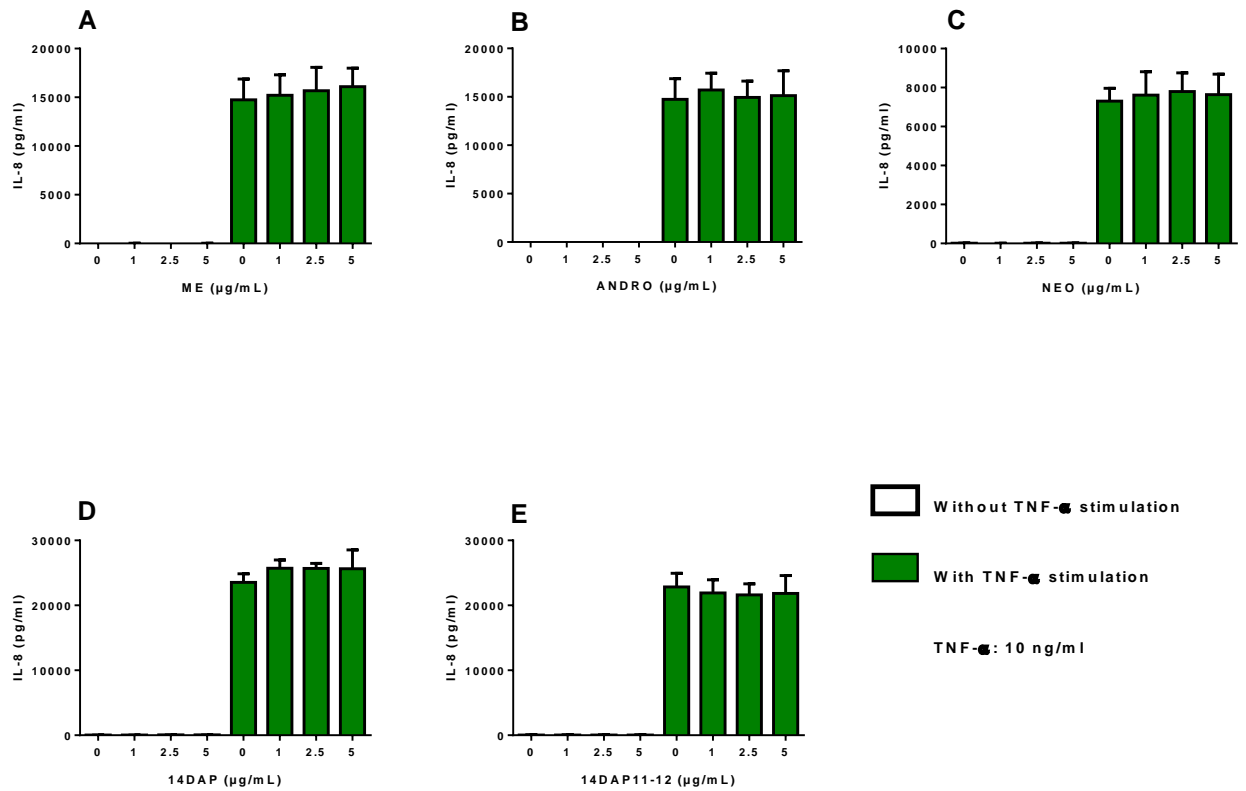


Fig. 6: Effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on IL-8 secretion. HDFa were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 $\mu\text{g/mL}$) of ME (A), ANDRO (B), NEO (C), 14DAP (D), or 14DAP11-12 (E) for 24h. The control cells were treated with 0.05% DMSO. Inflammation was induced by TNF- α (10 ng/mL) and cytokines secretion was done using an ELISA assay. The values mean \pm S.D. * $p < 0.05$ compared with control group, $n=3$.

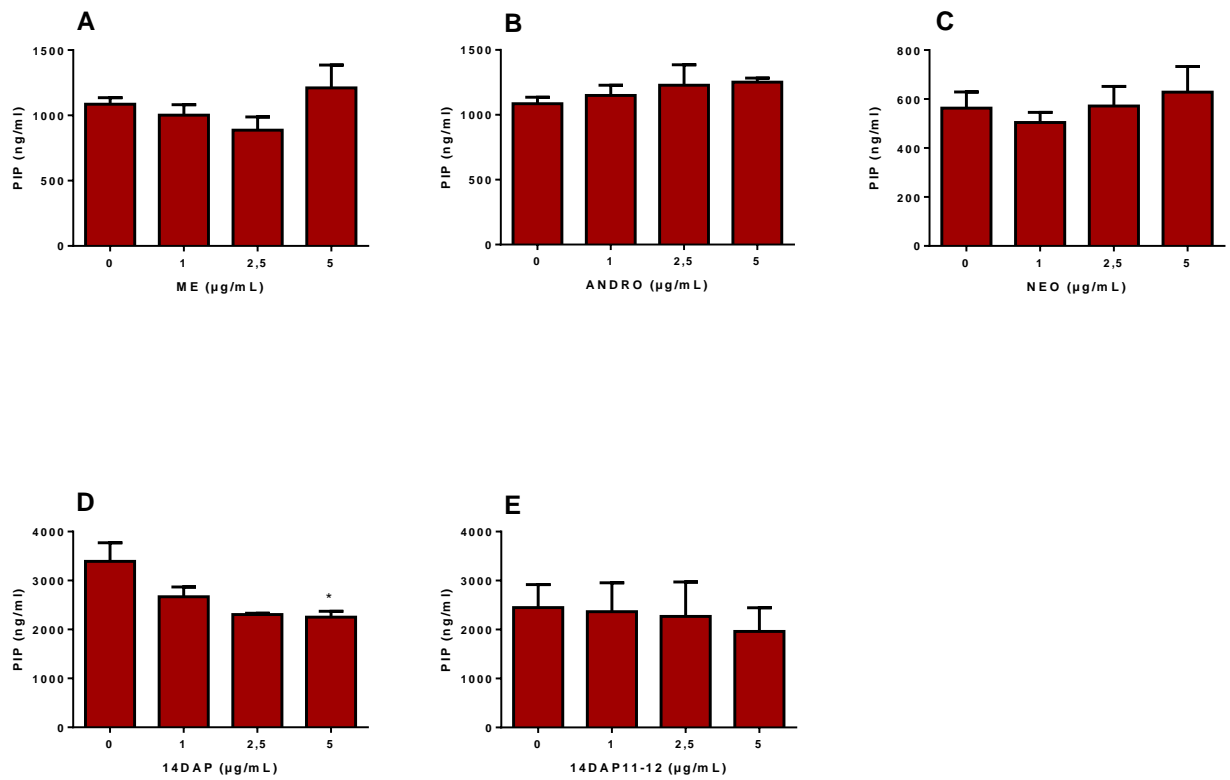


Fig. 7: Effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on procollagen type I C-peptide (PIP) production. HDFa were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 µg/mL) of ME (A), ANDRO (B), NEO (C) 14DAP (D), or 14DAP11-12 (E) for 48h. PIP was determined by an ELISA. The values mean ±S.D. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with control group, n=3.

Article 2 : Étude de la couche épidermique

Introduction générale de l'article 2

La peau est le plus grand organe humain et forme l'interface entre le corps et l'environnement extérieur. Son vieillissement est régi par les gènes et il est accéléré par des facteurs extérieurs tels que la pollution, le tabagisme, l'exposition aux rayons solaires et le stress (Krutmann et al., 2017). On parle alors de vieillissement intrinsèque pour le vieillissement induit par les gènes, et de vieillissement extrinsèque pour celui provoqué par des facteurs environnementaux (Cavinato and Jansen-Dürr, 2017). Le vieillissement détériore les cellules via des processus d'oxydation et d'inflammation (Pillai et al., 2005; Rinnerthaler et al., 2015). Il en résulte une diminution du renouvellement des cellules épidermiques et par conséquent une diminution de l'épaisseur de l'épiderme (Tobin, 2017). Les kératinocytes constituent les principales cellules de l'épiderme. Des facteurs extrinsèques, comme le rayonnement solaire, induisent la production d'ERO. Ces derniers endommagent les kératinocytes qui vont sécréter à leur tour des cytokines pro-inflammatoires et produire davantage d'ERO (Chang et al., 2017). Parmi ces cytokines, on peut citer l'IL-8 et le TNF- α (Kondo et al., 1993; Morisaki et al., 2010). La production de ces cytokines active et attire les cellules inflammatoires qui libèrent de grande quantité de métabolites réactifs de l'oxygène de l'azote ainsi que des enzymes protéolytiques. La production accrue de ces facteurs induit un remodelage de la structure tridimensionnelle de la MEC (Hašová et al., 2011). Les macromolécules de la MEC présentent des altérations spécifiques et caractéristiques lors du vieillissement cutané extrinsèque et intrinsèque (Rabe et al., 2006). Parmi eux, les GAG, en particulier l'AH, revêtent une grande importance (Averbeck et al., 2007). L'acide hyaluronique est l'un des principaux composants de la MEC de la peau. Elle est présente dans le derme mais aussi dans l'épiderme. Avec l'âge, sa dégradation dans l'épiderme entraîne une diminution de l'hydratation cutanée (Papakonstantinou et al., 2012).

L'*Andrographis paniculata* est une plante traditionnelle qui a été utilisée en Asie pour traiter des maladies inflammatoires telles que les maladies respiratoires (Tan et al., 2017).

Des études phytochimiques ont extrait et identifié des biomolécules dans les feuilles d'*Andrographis paniculata*, notamment à l'aide du méthanol, où des études ont montré des activités antioxydantes (Hussain et al., 2017; Radhika et al., 2012) et anti-inflammatoires (Sheeja et al., 2006). Parmi ces biomolécules, l'ANDRO a été identifié comme son principal principe actif (Sareer et al., 2014). Dans le contexte du vieillissement cutané, il est intéressant pour ses activités antioxydantes (Tan et al., 2018) et anti-inflammatoires (Yang et al., 2019). Ces propriétés font de l'andrographolide un potentiel agent anti-âge. D'autres diterpénoïdes sont retrouvés dans cette plante comme la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide. Tous les trois sont des analogues de l'andrographolide et présentent des activités antioxydantes et anti-inflammatoires (Batkhuu et al., 2002; Liu et al., 2007; Mandal et al., 2013; Parichatikanond et al., 2010). À ce jour, il n'existe qu'une seule étude sur l'effet protecteur d'un dérivé de l'andrographolide, l'andrographolide sodium bisulfate, contre le vieillissement cutané. Ce dérivé avait réduit le vieillissement prématuré de la peau de souris exposée aux UVB (Zhan et al., 2016). Aucun rapport scientifique n'est actuellement disponible pour valider les propriétés anti-âges de ces diterpènes ni de l'extrait méthanolique d'*Andrographis paniculata* sur des modèles *in vitro*. Notre étude a donc été d'évaluer le potentiel de protection d'un extrait méthanolique, de l'andrographolide, de la neoandrographolide, de la 14-deoxyandrographolide et de la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide contre le stress oxydant et l'inflammation dans une lignée de kératinocytes humains : HaCaT.

Dans un premier temps, une gamme de concentrations non cytotoxiques a été évaluée par le test MTT et un dosage de l'activité de la LDH. Dans un second temps, la production d'ERO a été dosée à travers la mesure de la sonde DCFH-DA. Afin de créer un stress oxydant, les HaCaT ont été mis sous pression à l' H_2O_2 . Dans un troisième temps, l'expression de *TNF- α* a été déterminée par RT-qPCR avec ou sans pression en présence de LPS pour induire une inflammation. En parallèle, l'inflammation a été induite par le *TNF- α* , et la sécrétion de l'IL-8 a été dosée par ELISA dans les surnageants. Enfin, la production d'acide hyaluronique a été déterminée par un test ELISA.

Les résultats montrent que l'extrait d'*Andrographis paniculata* contient 0,87 % d'andrographolide. Notre rendement est peu satisfaisant mais cohérent avec les données retrouvées dans la littérature (Chao and Lin, 2010; Jayakumar et al., 2013; Pholphana et al., 2004). En ce qui concerne l'étude du stress oxydant, l'extrait méthanolique a montré un effet antioxydant élevé dans les HaCaT co-traités au peroxyde d'hydrogène. Nous observons également une diminution de la production d'ERO avec la plus faible concentration de 14-deoxyandrographolide. Au niveau de la réponse inflammatoire, l'extrait méthanolique a réduit significativement l'expression du *TNF- α* mais pas la sécrétion d'IL-8 dans les HaCaT en condition inflammatoire. Enfin, nos données indiquent que nos traitements n'ont eu d'effet sur la sécrétion d'acide hyaluronique.

En conclusion, nous suggérons que l'utilisation de l'extrait méthanolique d'*Andrographis paniculata* en tant qu'agent anti-âge pourrait prévenir efficacement le vieillissement cutané. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier la ou les molécules ou bien encore la combinaison de molécules bioactives issues de l'extrait.

***Andrographis paniculata* and its bioactive diterpenoids protect keratinocytes against inflammation and oxidative stress**

Mussard E.^{a,*}, Toumi H.^{a,b,*}, Legrain B.^c, Jousselin S.^a, Yajid F.^a, Lespessailles E.^{a,b},
Berteina-Raboin S.^d, Cesaro A.^a

^a EA 4708, I3MTO, Université d'Orléans – rue de Chartres, 45000 Orléans, France,

^b Département Rhumatologie, Centre Hospitalier Régional d'Orléans, 45067 Orléans, France,

^c NOVAXIA - 6 rue des champs Godin, 41220 St Laurent Nouan, France,

^d Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans-Pôle de Chimie, UMR
CNRS 7311, Rue de Chartres-BP 6759, 45067 Orléans CEDEX 2, France.

***Corresponding author**

Hechmi TOUMI, I3MTO laboratory, University of Orleans, 45 000 Orleans, France

Tel: +33 2.38.74.40.56

E-mail address: hechmi.toumi@univ-orleans.fr

Eugenie MUSSARD, I3MTO laboratory, University of Orleans, 45 000 Orleans, France

Tel: +33 2.38.49.25.53

E-mail address: eugenie.mussard@univ-orleans.fr

ABSTRACT

Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees is widely used in a traditional herbal medicine to treat various diseases by its anti-inflammatory properties. This study aimed to explore the potential anti-aging activity of *Andrographis paniculata* in cutaneous cells. The biological activities were performed with a methanolic extract (ME), andrographolide (ANDRO), neoandrographolide (NEO), 14-deoxyandrographolide (14DAP) and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (14DAP11-12) in HaCaT cells. Oxidative stress and inflammation were induced by hydrogen peroxide and lipopolysaccharide/TNF- α , respectively. Reactive oxygen species (ROS) production was measured by fluorescence of DCF-DA probe and cytokines were quantified by ELISA for Interleukine-8 (IL-8) or RTqPCR for Tumor necrosis factor- α (TNF- α). Hyaluronic acid (HA) secretion was determined by an ELISA. Our results

showed a decrease in ROS production and *TNF- α* expression with ME (5 $\mu\text{g/mL}$) in HaCaT under pro-oxidant and pro-inflammatory conditions, respectively. These data suggest that ME protects HaCaT from oxidative stress and inflammation. Therefore, ME may be a possible candidate for development of natural and effective agents against skin aging.

Keywords

Andrographis paniculata; Andrographolide; Skin aging; Keratinocytes; Oxidative stress; Inflammation

Abbreviations

14DAP, 14-deoxyandrographolide; 14DAP11-12, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide; ANDRO, Andrographolide; ECM, Extracellular matrix; HA, Hyaluronic acid; IL-8, Interleukin-8; ME, Methanolic extract; MMPs, Matrix metalloproteinases; NEO, Neoandrographolide; ROS, Reactive oxygen species; *TNF- α* , Tumor necrosis factor- α

INTRODUCTION

The skin is the largest human organ. It is the interface between the body and the environment. Skin aging has an intrinsic and extrinsic origin (Cavinato and Jansen-Dürr, 2017; Farage et al., 2008). In other words, skin aging occurs chronologically (intrinsic aging) or is caused by environmental factors (extrinsic aging). In both processes, oxidative stress plays a role in the inflammation induction and the destruction of skin macromolecules (Pillai et al., 2005; Rinnerthaler et al., 2015). This results in a decrease in the renewal of epidermal cells and consequently a decrease in the epidermal thickness (Tobin, 2017). Keratinocytes are the main cells of the epidermis. Extrinsic factors, such as solar radiation, induce the production of

reactive oxygen species (ROS) that affect keratinocytes, which in turn secrete pro-inflammatory cytokines and produce more ROS (Chang et al., 2017). Inflammation and oxidative stress also cause the production and activation of MMPs, which damages the extracellular matrix (ECM) in the dermis (Pillai et al., 2005). Some of cytokines known to be released by keratinocytes in inflammatory condition are Interleukin-8 (IL-8) and Tumor Necrosis Factor (TNF- α) (Kondo et al., 1993; Morisaki et al., 2010). Hyaluronic acid (HA) is one of the main components of the extracellular matrix of the skin. It is present in the dermis but also in the epidermis. With age, its degradation in the epidermis leads to a disruption of skin hydration (Papakonstantinou et al., 2012).

Andrographis paniculata (Burm. F.) Nees commonly called "king of bitters" is a plant of *Acanthaceae* family. This plant has been used in traditional medicine in Asia to treat inflammatory diseases such as respiratory diseases (Tan et al., 2017). *Andrographis paniculata* leaves have been regularly used for the extraction of biomolecules. Extract from the leaves of *Andrographis paniculata* with methanol has been shown antioxidant activities (Hussain et al., 2017; Radhika et al., 2012) and anti-inflammatory (Sheeja et al., 2006). Andrographolide (ANDRO) is the main bioactive compound of *Andrographis paniculata* (Sareer et al., 2014). In the context of skin aging, ANDRO is interesting for its antioxidant (Tan et al., 2018) and anti-inflammatory (Yang et al., 2019) activities. Others diterpenoids present in this plant are neoandrographolide (NEO), 14-deoxyandrographolide (14DAP) and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (14DAP11-12). Antioxidant and anti-inflammatory effects of these derivatives have been reported (Batkhuu et al., 2002; Liu et al., 2007; Mandal et al., 2013; Parichatikanond et al., 2010).

No *in vitro* scientific report is currently available to validate the anti-aging properties of ME, ANDRO, NEO, 14DAP and 14DAP11-12 (Fig. 1). In this study, our objective was to evaluate their potential for protection against oxidative stress and inflammation in a human keratinocyte line.

RESULTS

Analysis of methanolic extract from *Andrographis paniculata*

ANDRO peak from ME were identified at 11.9 min by comparing the retention times obtained using a commercial standard of ANDRO. As shown in Fig.2, we detected a proportion of ANDRO in ME of 0.87 %. We tested this extract according to the ANDRO concentration.

Cytotoxicity assays

In preliminary experiments, we evaluated the effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 at various concentrations (0 to 5 µg/mL) on HaCaT viability and cytotoxicity for 24 h and 48 h. Cell viability was assimilated to the measure of mitochondrial activity by an MTT assay. To completed, cell cytotoxicity was performed by a dosage of the LDH release. Cell viability and cytotoxicity were not affected by ME, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 up to a concentration of 5 µg/mL (Fig. 3). However, ANDRO decreased significantly the cell viability from 24h (Fig. 3B). Therefore, ME, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 were used in subsequent experiments at 1, 2.5 and 5 µg/mL, except for ANDRO that was used at 1 and 2.5 µg/mL for the follow up.

Antioxidant activity

Next, we analyzed the effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on ROS production in H₂O₂-stimulated HaCaT for 1 h. H₂O₂ caused an increase in intracellular ROS levels in HaCaT compared to non-stimulated cells (Fig. 4). This increase in ROS production under H₂O₂ pression was significantly reduced by ME treatment at 5 µg/mL (Fig. 4A) and by 14DAP at 1 µg/mL (Fig. 4D) compare to H₂O₂ condition (72% and 14% of decrease, respectively). In contrast, ANDRO, NEO and 14DAP11-12 had been unsuccessful in decreasing ROS levels (Fig. 4B, C, and E) under oxidative stress.

Anti-inflammatory activities

To explore *TNF- α* expression, we pretreated HaCaT with ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12 for 18 h and then stimulated cells with LPS at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for an additional 6 h. Under pro-inflammatory condition, we observed that ME at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ significantly decreased *TNF- α* mRNA level (Fig. 5A). However, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 treatments didn't lead to a decrease of *TNF- α* mRNA expression (Fig. 5B, C, D and E).

We observed an increase of IL-8 secretion in HaCaT treated by *TNF- α* compared to non-stimulated cells (Fig. 6). However, IL-6 secretion wasn't reduced by our treatments in HaCaT under *TNF- α* stimulation (Fig. 6).

Hyaluronic acid production

Finally, we measured the HA synthesis in HaCaT after incubation with ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12 for 48 h (Fig. 7). As shown in Fig. 7, there was no effect in HA production for all treatments.

DISCUSSION

Andrographis paniculata is a traditional plant that has been used in Asia to treat various diseases such as intestinal disorders, influenza epidemics and other respiratory infections (Kligler et al., 2006; Negi et al., 2008). Phytochemical studies have identified labdane diterpenes as its main constituents (Cheung et al., 2001; Matsuda et al., 1994; Pholphana et al., 2004). Among them, ANDRO has been identified as its main active ingredient (Jayakumar et al., 2013). Indeed, ANDRO is known for its anti-inflammatory activities (Tan et al., 2017). This property makes ANDRO a potential anti-aging agent. In another study, a synthetic analog of ANDRO prevented UVB-induced premature aging in mouse skin (Zhan et al., 2016).

However, there aren't *in vitro* data on the anti-aging effect of ANDRO and its analogs: NEO, 14DAP, and 14DAP11-12. Some studies have been performed to demonstrate their protective activities in other cell such as platelet cells and whole blood cells (Parichatikanond et al., 2010) but never in keratinocytes. In this study, we investigated whether an extract of *Andrographis paniculata*, ANDRO, NEO, 14DAP, 14DAP11-12 were able to counteract the deleterious effects of skin aging in human keratinocytes.

In our study, the extract of *Andrographis paniculata* contained 0.87% ANDRO active ingredient (Fig. 2). Other studies have identified more than 20 diterpenes and more than 10 flavonoids in plant extracts with methanol (Chao and Lin, 2010). As for ANDRO, it has been isolated and identified up to 4% in whole plants, between 0.8 and 1.2% in stems and between 0.5 and 6% in dried leaves (Chao and Lin, 2010; Jayakumar et al., 2013; Pholphana et al., 2004). Our efficiency ratio is relatively low but within the isolation range found in the scientific literature.

In our experiments, ME showed a high antioxidant effect in keratinocytes (Fig. 4). Antioxidant ingredients are given special attention to prevent skin damage. And indeed, *Andrographis paniculata* extracts with methanol seem to be a source of effective antioxidants. *In vitro* and *in vivo* evidence has shown that such an extract reduces oxidative stress (Akowuah et al., 2009; Sheeja et al., 2006). Depending on the solvent used during extraction, the antioxidant capacities of the plant are different. Indeed, inhibition of lipid peroxidation and free radical scavenging activity are more effective with methanol extraction than with water extraction (Akowuah et al., 2006). These results would be explained by a higher concentration of ANDRO and 14DAP11-12. Our results differ from this study since in our study ANDRO and 14DAP11-12 don't decrease free radical scavenging activity.

The effects observed on the inflammatory response show that ME significantly reduced TNF- α expression (Fig. 5) but not IL-8 secretion in HaCaT (Fig. 6). Our results on TNF- α were in agreement with several studies, including a human monocyte cell line THP-1 (Low et al., 2015). Contrary to our results, many studies have shown a negative regulation of TNF- α by ANDRO (Tan et al., 2017). For example, in mouse skin, TNF- α induced by UVB exposure decreased in the group of mice treated with ANDRO sodium bisulfate in a dose-dependent manner (Zhan

et al., 2016). Concerning IL-8, it was reported that ANDRO inhibited TNF- α -stimulated IL-8 expression in HCT116 cells by suppressing NADPH oxidase activation and ROS generation (Yuan et al., 2018).

Our data indicate that our treatments did not affect HA secretion (Fig. 7). In a primary cartilage culture treated with IL-1b, ANDRO reduced the HA level (Yuan et al., 2018). On the contrary, the water content in mice skin photoaging induced by UV irradiation increases in the group treated with andrographolide sodium bisulfate (Zhan et al., 2016). As HA is a powerful water sensor (Papakonstantinou et al., 2012), the hypothesis of an increase in HA secretion may explain these results.

CONCLUSION

In this study, we demonstrated a positive effect of ME against oxidative stress and inflammation in keratinocytes. Herein, ME decreased ROS production and TNF- α expression in HaCaT under pro-oxidant and pro-inflammatory condition, respectively. We suggest that *Andrographis paniculata* could be of potential interest in skin protection. In ME, an active ingredient or a combination of biomolecules could explain the reported effects. If in the study of Zhan et al, ANDRO could be considered as the active compound of *Andrographis paniculata* responsible for its protective effects against skin photo-aging; in our study, the ME extract seems more effective.

MATERIALS AND METHOD

Chemicals

Andrographolide was obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Neoandrographolide, 14-Deoxyandrographolide and 14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide were purchased from Carbosynth (Carbosynth, Compton,

Berkshire, UK). The molecules were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) as a stock solution at 10 mg/mL and stored at -20°C.

Preparation of *Andrographis paniculata* extract

The dried leaves of *Andrographis paniculata* were purchased from AYur-vana®. The leaf powder was extracted by maceration in methanol (15 mL / g) for 2h at RT and then sonicated for 1h in ice. The crude extract was filtered, and the methanol was evaporated overnight at RT. The extract was suspended in DMSO (0.6 g / mL) and filtered.

HPLC analysis

ME was analyzed by reverse-phase HPLC using a Zorbax Eclipse XDB-C18 column 4.6 x 150 mm (Agilent) on an Agilent 1220 Infinity II LC System. The mobile phase was delivered at a rate of 1 mL/min with a gradient from A (0.1% HCOOH in H₂O) to B (0.1% HCOOH in CH₃CN) (10% B for 4 min, 10% to 60% B in 10 min, 60% to 100% B in 2 min.). The column effluent was monitored at 250 nm.

The quantity of ANDRO contained in the ME was determined by comparison with a range of pure ANDRO (standard).

Cell culture

HaCaT was obtained from CLS (Cell line service, Eppelheim, Germany, ref. 3300493). HaCaT were cultured with DMEM (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 2% L-glutamine (Lonza, Basel, Switzerland) and 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Mixture (Lonza, Basel, Switzerland). HaCaT were seeded at a density of 10 000 cells/cm² and maintained at 37 °C in

5% CO₂. The medium was changed twice a week. Cell confluence at the time of experiment was approximately 80%.

Cell treatment

Experimental group cells were treated with ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12. The concentration range used were 1, 2.5 or 5 µg/mL for ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12, and equivalent to 1, 2.5 or 5 µg/mL of andrographolide for ME. The control cells were treated with 0.05% DMSO.

MTT assay

Cell viability was assessed using a colorimetric assay that reduces MTT (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) to formazan dye, producing a purple color. Briefly, HaCaT seeded in a 96-well plate at 14×10^3 cells/well. After 24 h of incubation, cells were treated with the concentration range of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 for 24 h or 48 h. Then, 10% (w/v) of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well and further incubated for 4 h at 37 °C, 5% CO₂. The medium was removed, and the blue crystals were dissolved in 100 µl SDS-acidic-isopropanol solution (0.5% SDS; 80 mM HCl). The optical density (OD) of each well was measured at 450 nm using 620 nm reference with a microplate reader (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific). The assay performed in 6 replicates of three independent experiments (n=3).

Lactate dehydrogenase activity

Cell cytotoxicity was assessed by determining released lactate dehydrogenase (LDH) into the medium by damaged cells, using Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). This method is based on the LDH-catalyzed reduction of pyruvate lactate by

NADH. HaCaT were seeded in 96-well plates at a density of 10×10^3 cells per well. After 24 h of incubation, cells were treated with the concentration range of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 for 24 h or 48 h. Briefly, equal amounts of culture supernatant were mixed with reaction mixture containing NADH. After 30 min at room temperature, the reaction was stopped by Stop Solution. The absorbance was measured with a microplate reader (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific) at 490 nm using 680 nm reference. LDH activity released in maximum LDH release by complete lysis of cells were determined. Data are presented as the percentage of LDH released into the medium relative to maximum LDH control. The assay performed in 6 replicates of three independent experiments (n=3).

Intracellular reactive oxygen species

The intercellular production of ROS levels was determined using DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). The permeable DCFH-DA is oxidized by ROS to the highly fluorescent compound 2',7'-chlorofluorescein (DCF). HaCaT were seeded in 96-well plates at 20×10^3 cells/well. After 24 h of incubation, the medium was replaced by DMEM containing 25 μ M DCFH-DA for 45 min at 37°C. Then DCFH-DA was removed, and the cells were washed with PBS. Afterwards, the cells were incubated with the concentration range of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12 with or without 0.5 mM H_2O_2 (as free radical generator) for 1 h at 37°C. Subsequently, fluorescence intensity per each well was detected using a microplate reader (EMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at an excitation wavelength of 485 nm and at an emission wavelength of 520 nm. The fluorescence intensity is directly proportional to the concentration of free radical compounds. The assay performed in 6 replicates of three independent experiments (n=3).

Quantitative RT-PCR

HaCaT were seeded in 6-well plates at 90×10^3 cells/well up to 80 % confluence. Then, cells were pretreated with the concentration range of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12

for 18 h and LPS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was added in the medium at 10 µg/mL for an additional time of 6 h. Total RNA was isolated from cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Nucleic acid concentration and purity were determined by µDrop™ plate (Thermo Fisher Scientific Inc.). One microgram of total RNA was retrotranscribed using QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's procedure. The reaction was performed according to the manufacturer's instructions of QuantiTect® SYBR Green Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany). Quantitative PCR was performed by C1000™ Thermal cycler (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad) under the following conditions: 10 min 95°C, followed by 40 cycles of 15 s 95°C and 1 min 60°C. Quantitative PCR reaction was performed using specific primers: human TNF-α (Invitrogen: forward, 5'-CTC TTC TGC CTG CTG CAC TT-3'; reverse, 5' CAG CTT GAG GGT TTG CTA CA3') and GAPDH (Qiagen cat. #QT00079247) as an internal control. Data were analyzed using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The assay performed in 2 replicates of three independent experiments (n=3).

Measurement of IL-8 secretion

HaCaT were seeded in 24-well plates at 19×10^3 cells/well up to 80 % confluence and then further cultured in fresh DMEM containing ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12, with or without TNF-α (10 ng/mL; as cytokines generator) for 24 h. Supernatants were collected and used in analysis of newly secreted interleukins. IL-8 was quantified using a sandwich ELISA assay kit (Peprotech, Rock Hill, NJ, USA), according to the manufacturer's protocol. The assay performed in 2 replicates of three independent experiments (n=3).

Measurement of hyaluronic acid secretion

HaCaT were seeded in 24-well plates at 19×10^3 cells/well overnight and then further cultured in fresh serum-free DMEM with or without ME, ANDRO, NEO, 14DAP, or 14DAP11-12 for 48 h. Collected cell-free supernatants were analyzed for the level of HA by an ELISA kit

(Echelon, Salt Lake City, USA) according to the manufacturer's recommended protocol. The assay performed in 2 replicates of three independent experiments (n=3).

Statistic test

All data are presented as mean \pm standard deviation (SD). Comparisons between groups were analyzed using GraphPad Prism software via ANOVA by Kruskal-Wallis statistic (Dunn's multiple comparisons test). Difference with p-value <0.05 was considered significant.

Acknowledgements

We sincerely thank Dr. Pierre Lafite for his scientific advice and Wendy Auchere for the realization of some experiments.

Funding

This research was supported by Cosmetosciences, a global training and research program dedicated to the cosmetic industry. Located in the heart of the cosmetic valley, this program led by University of Orléans is funded by the Région Centre-Val de Loire.

Conflicts of interests

The authors declare no conflict of interests.

REFERENCES

Akouwah, G.A., Zhari, I., Norhayati, I., and Mariam, A. (2006). HPLC and HPTLC densitometric determination of andrographolides and antioxidant potential of *Andrographis paniculata*. *J. Food Compos. Anal.* 19, 118–126.

Akouwah, G.A., Zhari, I., Mariam, A., and Yam, M.F. (2009). Absorption of andrographolides from *Andrographis paniculata* and its effect on CCl₄-induced oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2321–2326.

Batkhuu, J., Hattori, K., Takano, F., Fushiya, S., Oshiman, K., and Fujimiya, Y. (2002). Suppression of NO production in activated macrophages in vitro and ex vivo by neoandrographolide isolated from *Andrographis paniculata*. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1169–1174.

Cavinato, M., and Jansen-Dürr, P. (2017). Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp. Gerontol.* 94, 78–82.

Chang, T.-M., Tsen, J.-H., Yen, H., Yang, T.-Y., and Huang, H.-C. (2017). Extract from *Periostracum cicadae* Inhibits Oxidative Stress and Inflammation Induced by Ultraviolet B Irradiation on HaCaT Keratinocytes. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2017.

Chao, W.-W., and Lin, B.-F. (2010). Isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (*Chuanxinlian*). *Chin. Med.* 5, 17.

Cheung, H.Y., Cheung, C.S., and Kong, C.K. (2001). Determination of bioactive diterpenoids from *Andrographis paniculata* by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 930, 171–176.

Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., and Maibach, H.I. (2008). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 30, 87–95.

Hussain, R.M., Razak, Z.N.R.A., Saad, W.M.M., and Mustakim, M. (2017). Mechanism of antagonistic effects of *Andrographis paniculata* methanolic extract against *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, 685–695.

Jayakumar, T., Hsieh, C.-Y., Lee, J.-J., and Sheu, J.-R. (2013). Experimental and Clinical Pharmacology of *Andrographis paniculata* and Its Major Bioactive Phytoconstituent Andrographolide. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 846740.

Kligler, B., Ulbricht, C., Basch, E., Kirkwood, C.D., Abrams, T.R., Miranda, M., Singh Khalsa, K.P., Giles, M., Boon, H., and Woods, J. (2006). *Andrographis paniculata* for the treatment of upper respiratory infection: a systematic review by the natural standard research collaboration. *Explore N. Y. N* 2, 25–29.

Kondo, S., Kono, T., Sauder, D.N., and McKenzie, R.C. (1993). IL-8 Gene Expression and Production in Human Keratinocytes and Their Modulation by UVB. *J. Invest. Dermatol.* 101, 690–694.

Liu, J., Wang, Z.-T., and Ji, L.-L. (2007). In vivo and in vitro anti-inflammatory activities of neoandrographolide. *Am. J. Chin. Med.* 35, 317–328.

Low, M., Khoo, C.S., Münch, G., Govindaraghavan, S., and Sucher, N.J. (2015). An in vitro study of anti-inflammatory activity of standardised *Andrographis paniculata* extracts and pure andrographolide. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 18.

Mandal, S., Nelson, V.K., Mukhopadhyay, S., Bandhopadhyay, S., Maganti, L., Ghoshal, N., Sen, G., and Biswas, T. (2013). 14-Deoxyandrographolide targets adenylate cyclase and prevents ethanol-induced liver injury through constitutive NOS dependent reduced redox signaling in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 59, 236–248.

Matsuda, T., Kuroyanagi, M., Sugiyama, S., Umehara, K., Ueno, A., and Nishi, K. (1994). Cell differentiation-inducing diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 42, 1216–1225.

Morisaki, N., Moriwaki, S., Sugiyama-Nakagiri, Y., Haketa, K., Takema, Y., and Imokawa, G. (2010). Neprilysin Is Identical to Skin Fibroblast Elastase ITS ROLE IN SKIN AGING AND UV RESPONSES. *J. Biol. Chem.* 285, 39819–39827.

Negi, A.S., Kumar, J.K., Luqman, S., Shanker, K., Gupta, M.M., and Khanuja, S.P.S. (2008). Recent advances in plant hepatoprotectives: a chemical and biological profile of some important leads. *Med. Res. Rev.* 28, 746–772.

Papakonstantinou, E., Roth, M., and Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol.* 4, 253–258.

Parichatikanond, W., Suthisisang, C., Dhepakson, P., and Herunsalee, A. (2010). Study of anti-inflammatory activities of the pure compounds from *Andrographis paniculata* (burm.f.) Nees and their effects on gene expression. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1361–1373.

Pholphana, N., Rangkadilok, N., Thongnest, S., Ruchirawat, S., Ruchirawat, M., and Satayavivad, J. (2004). Determination and variation of three active diterpenoids in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. *Phytochem. Anal. PCA* 15, 365–371.

Pillai, S., Oresajo, C., and Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 27, 17–34.

Radhika, P., Annapurna, A., and Rao, S.N. (2012). Immunostimulant, cerebroprotective & nootropic activities of *Andrographis paniculata* leaves extract in normal & type 2 diabetic rats. *Indian J. Med. Res.* 135, 636–641.

Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M.K., Trost, A., and Richter, K. (2015). Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules* 5, 545–589.

Sareer, O., Ahmad, S., and Umar, S. (2014). *Andrographis paniculata*: a critical appraisal of extraction, isolation and quantification of andrographolide and other active constituents. *Nat. Prod. Res.* 28, 2081–2101.

Sheeja, K., Shihab, P.K., and Kuttan, G. (2006). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 28, 129–140.

Tan, W.S.D., Liao, W., Zhou, S., and Wong, W.S.F. (2017). Is there a future for andrographolide to be an anti-inflammatory drug? Deciphering its major mechanisms of action. *Biochem. Pharmacol.* 139, 71–81.

Tan, W.S.D., Liao, W., Peh, H.Y., Vila, M., Dong, J., Shen, H.-M., and Wong, W.S.F. (2018). Andrographolide simultaneously augments Nrf2 antioxidant defense and facilitates autophagic flux blockade in cigarette smoke-exposed human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 360, 120–130.

Tobin, D.J. (2017). Introduction to skin aging. *J. Tissue Viability* 26, 37–46.

Yang, M.-Y., Yu, Q.-L., Huang, Y.-S., and Yang, G. (2019). Neuroprotective effects of andrographolide derivative CX-10 in transient focal ischemia in rat: Involvement of Nrf2/AE and TLR/NF- κ B signaling. *Pharmacol. Res.* 144, 227–234.

Yuan, M., Meng, W., Liao, W., and Lian, S. (2018). Andrographolide Antagonizes TNF- α -Induced IL-8 via Inhibition of NADPH Oxidase/ROS/NF- κ B and Src/MAPKs/AP-1 Axis in Human Colorectal Cancer HCT116 Cells. *J. Agric. Food Chem.* 66, 5139–5148.

Zhan, J.Y.-X., Wang, X.-F., Liu, Y.-H., Zhang, Z.-B., Wang, L., Chen, J.-N., Huang, S., Zeng, H.-F., and Lai, X.-P. (2016). Andrographolide Sodium Bisulfate Prevents UV-Induced Skin Photoaging through Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016, 3271451.

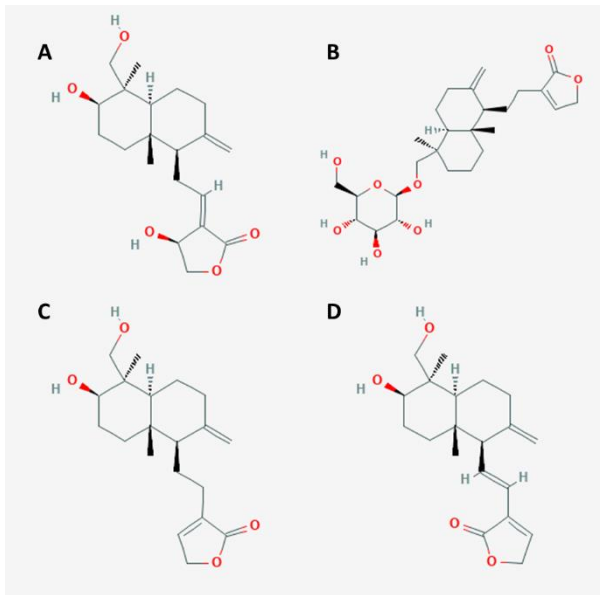


Fig. 1: Structure of diterpene lactones from *Andrographis paniculata*: ANDRO (A), NEO (B), 14DAP (C) and 14DAP11-12 (D).

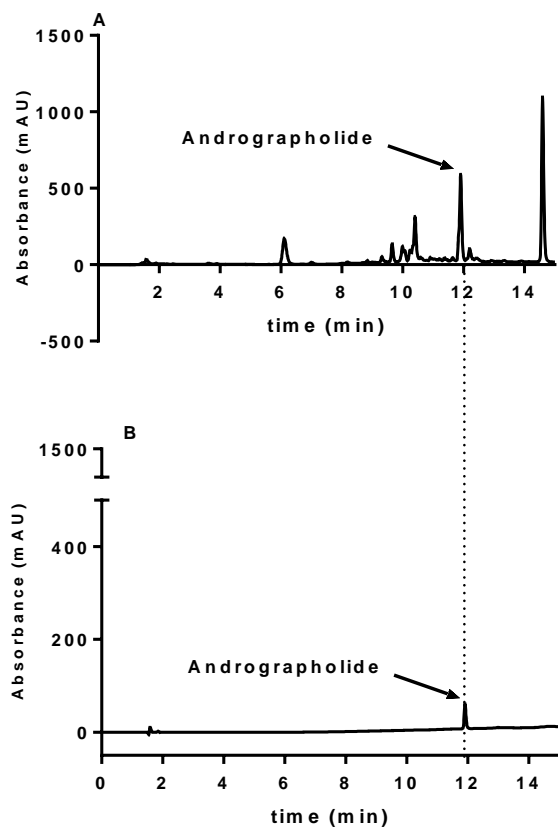


Fig. 2: HPLC results of ANDRO from ME of *Andrographis paniculata* (A); ANDRO standard (B).

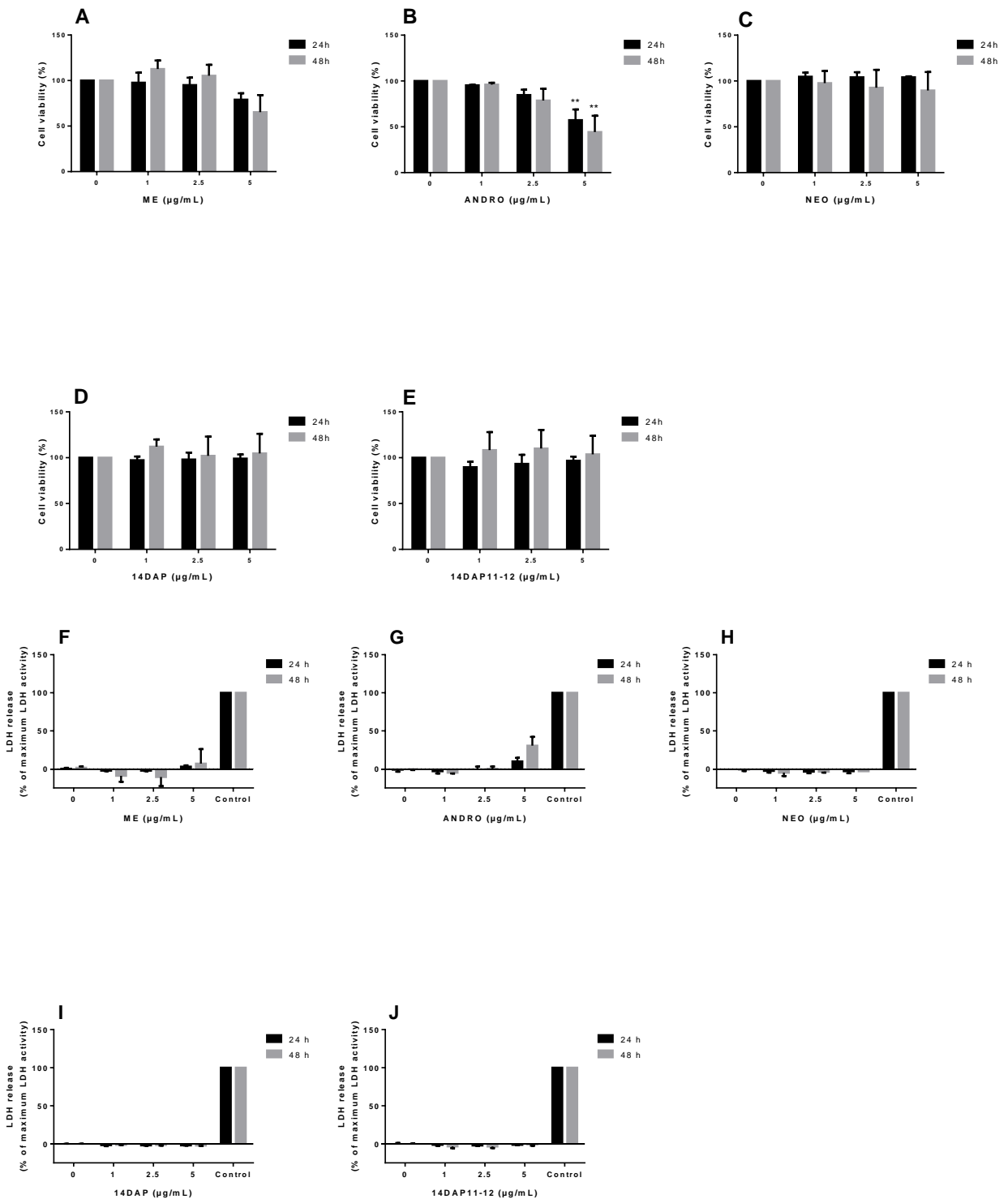


Fig. 3: Measure of cytotoxicity mediated by ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 in HaCaT. HaCaT were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 µg/mL) of ME (A and F), ANDRO (B and G), NEO (C and H), 14DAP (D and I), or 14DAP11-12 (E and J) for 24 h and 48 h. The control cells were treated with 0.05% DMSO. Cell viability was assimilated to mitochondrial metabolism and determined by an MTT assay (A, B, C, D, and E). Also, cell cytotoxicity was determined by a dosage of LDH release (F, G, H, I, and J). The values mean \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control group, $n=3$.

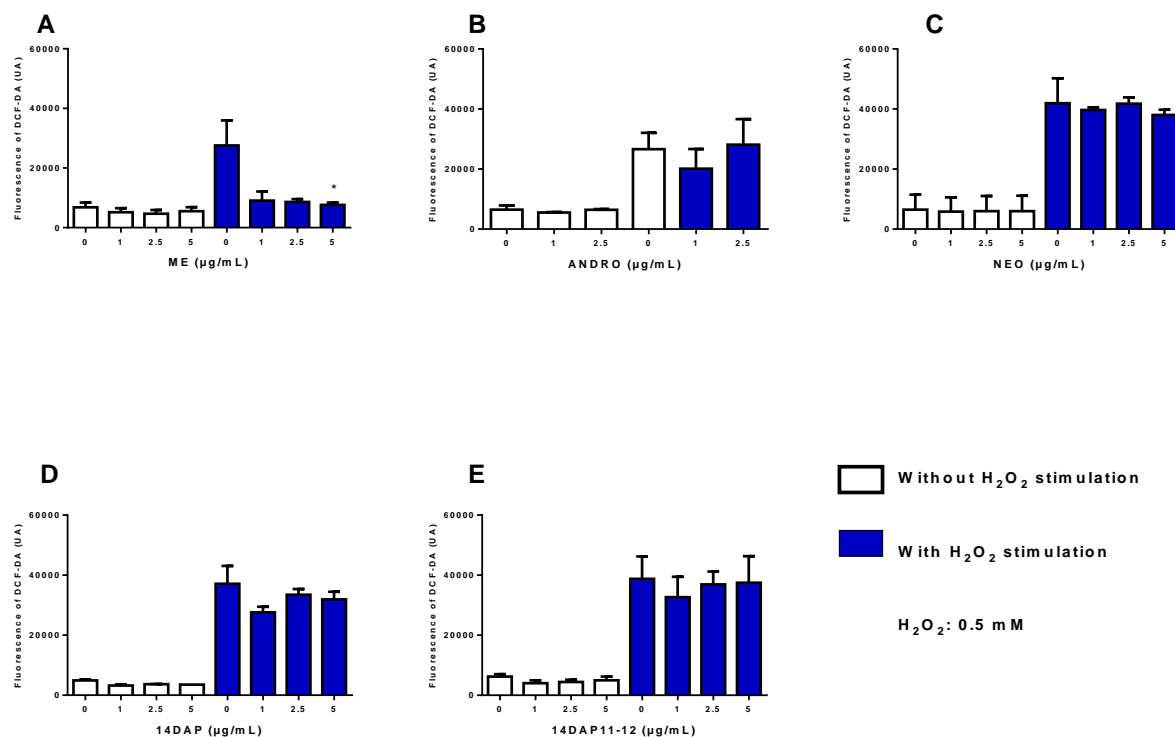


Fig. 4: Effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on oxidative stress. HaCaT were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 µg/mL) of ME (A), ANDRO (B), NEO (C), 14DAP (D), or 14DAP11-12 (E) for 1 h. The control cells were treated with 0.05% DMSO. ROS production was induced by 0.5 mM H₂O₂ and free radical scavenging activity was done using a DCFH-DA probe. The values mean ±S.D. * p < 0.05 compared with control group, n=3.

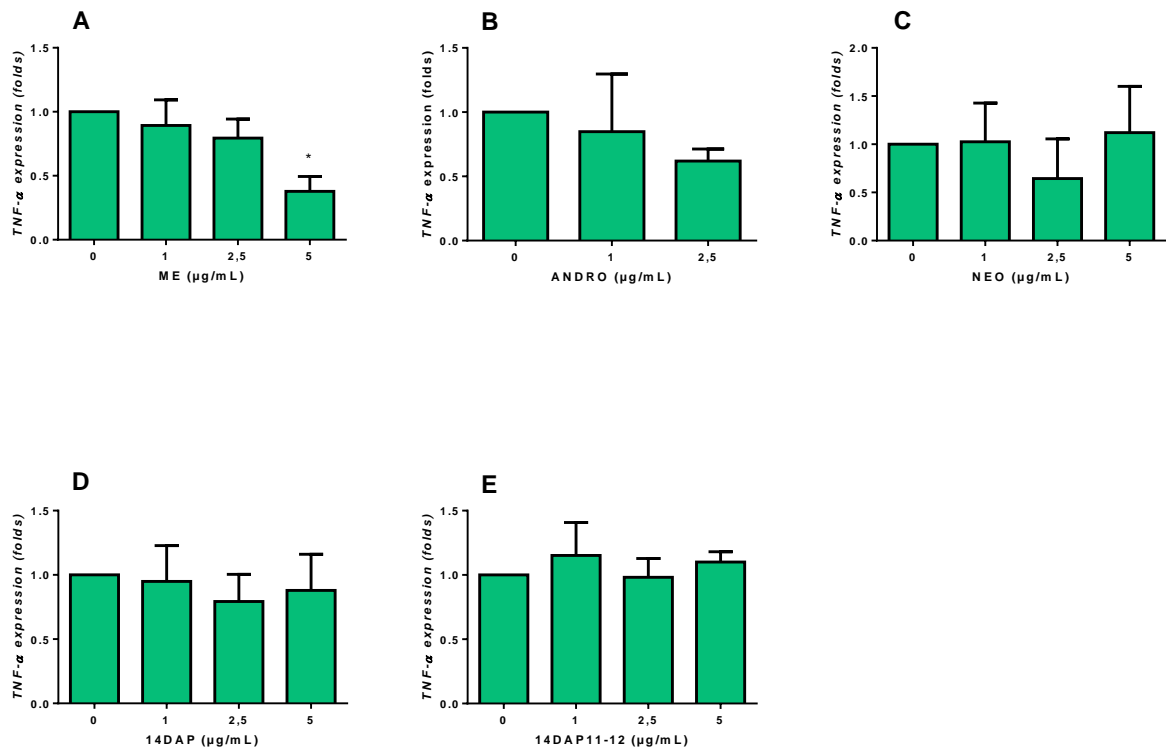


Fig. 5: Effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on *TNF-α* expression under pro-inflammation condition. HaCaT were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of ME (A), ANDRO (B), NEO (C), 14DAP (D), or 14DAP11-12 (E) for 24 h. The control cells were treated with 0.05% DMSO. Inflammation condition was induced by LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 h and *TNF-α* expression was determined by a RT-qPCR. The values mean \pm S.D. * $p < 0.05$ compared with control group, $n=3$.

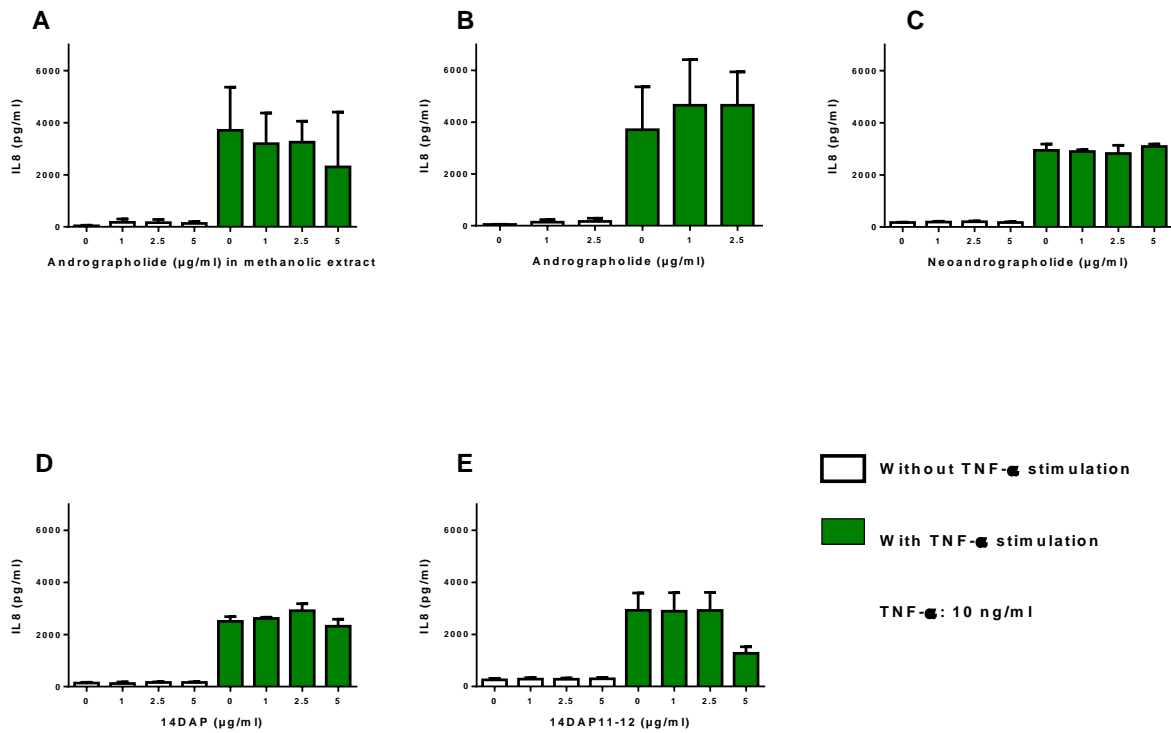


Fig. 6: Effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 on IL-8 secretion. HaCaT were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 μg/mL) of ME (A), ANDRO (B), NEO (C) 14DAP (D), or 14DAP11-12 (E) for 24h. The control cells were treated with 0.05% DMSO. Inflammation was induced by TNF-α (10 ng/mL) and IL-8 secretion was done using an ELISA assay. The values mean ±S.D. * $p < 0.05$ compared with control group, $n=3$.

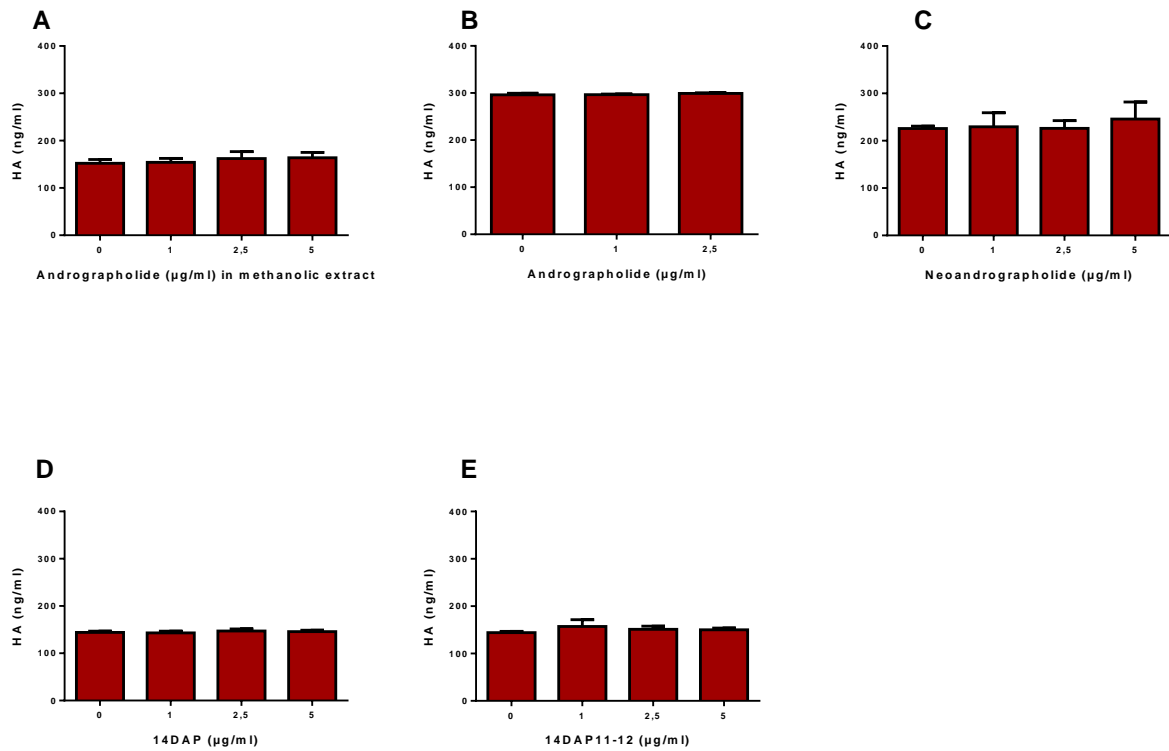


Fig. 7: Effect of ME, ANDRO, NEO, 14DAP, and 14DAP11-12 in HA production. HaCaT were treated with increasing concentration (1, 2.5 or 5 µg/mL) of ME (A), ANDRO (B), NEO (C) 14DAP (D), or 14DAP11-12 (E) for 48h. HA was determined by an ELISA. The values mean \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control group, $n=3$.

DISCUSSION

GENERALE



Discussion générale

Ce travail de thèse, constitué de deux parties, concerne l'activité dermo-cosmétique potentielle de différentes biomolécules et d'un extrait végétal, tous présents naturellement dans *Andrographis paniculata*. Les molécules testées font partie de la famille des diterpènes labdanes. Il s'agit de l'andrographolide, la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide, et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide. En ce qui concerne l'extrait végétal, il a été obtenu à partir d'une extraction au méthanol. La stratégie expérimentale s'est axée sur l'étude des activités antioxydantes et anti-inflammatoires, et de la capacité à activer la biosynthèse du collagène de type I et de l'acide hyaluronique dans des modèles cellulaires de peau. Le but étant de déterminer si *Andrographis paniculata* est susceptible d'être une source en substances anti-âges capables de réduire le vieillissement cutané.

L'*Andrographis paniculata* est une plante traditionnelle qui a été utilisée en Asie pour traiter diverses maladies telles que les troubles intestinaux, les épidémies de grippe et autres infections respiratoires (Kligler et al., 2006; Negi et al., 2008). Des études phytochimiques ont identifié des diterpènes lactone comme ses principaux constituants (Cheung et al., 2001; Matsuda et al., 1994; Pholphana et al., 2004). Parmi eux, l'andrographolide a été identifié comme son principal principe actif (Jayakumar et al., 2013). En effet, cette molécule est connue pour ses activités anti-inflammatoires (Tan et al., 2017). Cette propriété fait de l'andrographolide, un potentiel agent anti-âge. Il est à noter que cette molécule présente une faible solubilité dans l'eau et une faible biodisponibilité orale. Zhan et al., ont publié en 2016 une étude sur un analogue synthétique appelé andrographolide sodium bisulfate. Ce dernier a pour avantage d'améliorer sa solubilité dans l'eau et de présenter des activités pharmacologiques similaires à l'andrographolide (Guo et al., 2012; Tang et al., 2014). Dans leur étude, ce dérivé a empêché le vieillissement prématuré induit par les UVB dans la peau de souris (Zhan et al., 2016). Cependant, il n'existe aucune donnée *in vitro* sur l'effet anti-âge de l'andrographolide et de ses analogues sur la peau. Certaines études ont montré leurs

activités protectrices sur d'autres types cellulaires tels que les cellules plaquettaires et des cellules de sang total (Parichatikanond et al., 2010), mais jamais sur les fibroblastes cutanés ni les kératinocytes.

Dans ce travail de thèse, l'extrait végétal a été obtenu à partir d'une poudre de feuilles séchées d'*Andrographis paniculata*. Dans de nombreuses études, des composés bioactifs ont été identifiés dans des parties différentes de la plante : la plante entière, les feuilles, les tiges et les racines (Hossain et al., 2014). Les feuilles contiennent la quantité maximale de diterpènes, notamment l'andrographolide, suivie des tiges et des racines, tandis que les graines en contiennent le moins (Sareer et al., 2014). De manière générale, la composition en phytoconstituants est différente en fonction de la partie utilisée, la géographie, la saison et le moment de la récolte (Figure 23). En effet, il s'avère que les plus grandes quantités d'andrographolide aient été trouvées dans deux échantillons récoltés après 110 et 130 jours de culture (Sharma and Sharma, 2013). Dans notre étude nous n'avons pas pu obtenir ces informations.

LES PLANTES jouissent de propriétés curatives mais qui peuvent varier dans le même végétal suivant qu'on emploie les fleurs, les fruits, les feuilles ou les racines. C'est pour cela que nous indiquons soigneusement la partie du végétal à employer.

L'époque de la récolte et l'âge de la plante ont aussi leur influence.

Certains principes apparaissent ou disparaissent suivant l'âge du végétal le climat, la nature du terrain ont aussi leur répercussion sur l'activité du végétal.

Figure 23 : Extrait du livre « Les plantes et leurs vertus - un livre de chevet pour les malades - un guide pour ceux qui les soignent », du Docteur L. Cafford, 1930.

Différents solvants sont utilisés pour l'extraction de bioactifs comme le méthanol, l'éthanol, l'hexane, l'acétone et le chloroforme (Hossain et al., 2014). Nous avons choisi le méthanol pour l'étape de macération car il s'agit du solvant le plus approprié pour une extraction maximale de l'andrographolide (Andri Cahyo et al., 2009; Saxena et al., 2000; Srivastava et al., 2004). Après la macération, une étape d'extraction par ultrason a été réalisée. L'extraction par ultrasons ou sonication, est un processus doux et non thermique qui présente une efficacité élevée. Cette technique est basée sur le principe des forces de cisaillement et des micro-turbulences qui cassent mécaniquement les parois cellulaires sans dégradation chimique. Le mélange a été extrait par sonication dans un bain de glace afin de réduire au maximum les dégradations des composés actifs. L'extraction s'est terminée après l'évaporation du méthanol et la solubilisation de l'extrait dans le diméthylsulfoxyde. Nous

avons choisi le DMSO car l'andrographolide est miscible avec la plupart des solvants organiques. Nous aurions pu également utiliser de l'éthanol ou du diméthylformamide.

La teneur en andrographolide présente dans l'extrait a été obtenue à l'aide d'une analyse par HPLC en comparant les résultats obtenus avec un standard d'andrographolide pur à 98%. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait d'*Andrographis paniculata* contenait 0.87 % de principe actif andrographolide. L'extraction au méthanol est efficace pour l'obtention de l'andrographolide et ses analogues. En effet, d'autres études ont identifié plus de 20 diterpénoïdes dans des extraits au méthanol (Chao and Lin, 2010). En ce qui concerne l'andrographolide, il a été isolé et identifié jusqu'à 4 % dans la plante entière, entre 0.8 et 1.2 % dans les tiges et entre 0.5 et 6 % dans les feuilles séchées (Chao and Lin, 2010; Cheung et al., 2001; Pholphana et al., 2004). Notre rendement est peu satisfaisant mais entre dans la fourchette d'isolation retrouvée dans la littérature. Pour la suite des expériences, cet extrait sera utilisé en fonction de sa concentration en andrographolide.

Dans la première partie, l'étude a permis de cibler les effets anti-âges de nos traitements au niveau du derme à l'aide d'une culture primaire de fibroblastes cutanés humains nommée HDFa.

Dans la première partie de l'étude sur les fibroblastes, une gamme de concentrations non cytotoxiques de l'extrait méthanolique, de l'andrographolide, de la neoandrographolide, de la 14-deoxyandrographolide et de la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, a été établie afin de tester ultérieurement les activités biologiques. En effet, il est important de s'accommoder des potentiels biais liés à des modifications métaboliques des cellules en souffrance, tels que l'initiation de l'apoptose ou la synthèse anormale de médiateurs inflammatoires.

La viabilité et la prolifération cellulaires ont été assimilées à la mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale, par un test MTT. Cette activité enzymatique est basée sur la conversion du composé hydrosoluble MTT jaune en un produit

insoluble violet, appelé formazan, détectable par densité optique. La quantité de précipités formés est donc proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Nous avons choisi d'utiliser les concentrations de 1 µg/ml (3 µM), 2,5 µg/ml (7 µM) et 5 µg/ml (14 µM). Pour l'ensemble des expériences, ces concentrations ont été les mêmes pour toutes les molécules de notre étude afin de pouvoir les comparer entre elles. Nos résultats montrent que dans les HDFa, l'extrait méthanolique, l'andrographolide, la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide n'ont pas diminué l'activité mitochondriale dans la gamme de concentrations choisie après 24h et 48h de traitement. Des concentrations de 10 µg/ml (29 µM) et 30 µg/ml (86 µM) avaient été testées pour l'andrographolide mais la prolifération des HDFa avait diminué dès 24h de traitement. Dans la littérature, on retrouve par exemple des études où l'andrographolide a été utilisée jusqu'à 10 µM dans une culture primaire de cellules endothéliales (Yen et al., 2016) et jusqu'à 120 µM dans la lignée HEK293T (Wong et al., 2018). Dans les fibroblastes cutanés, il n'existe pas à ce jour de données publiées sur la cytotoxicité de ces molécules.

Pour compléter l'étude de la cytotoxicité, un dosage de la souffrance cellulaire a été réalisé à l'aide d'un dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH). Il s'agit d'un test colorimétrique qui mesure l'activité de cette enzyme dans le surnageant cellulaire. En effet, la LDH étant intracellulaire, sa présence dans le milieu extracellulaire indique des dommages au niveau de la membrane cytoplasmique. En utilisant les mêmes concentrations, l'extrait méthanolique, l'andrographolide, la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide n'ont pas été nocifs pour les HDFa à 24h et 48h.

Nous avons pu déduire que l'extrait méthanolique, l'andrographolide, la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide ne diminuaient pas la viabilité et la souffrance des HDFa aux concentrations 1, 2,5 et 5 µg/ml à 24h et 48h. Cette gamme de concentration a pu être utilisée pour la suite des expériences.

Dans la deuxième partie de l'étude sur les fibroblastes, le stress oxydant a été analysé via la mesure de la production d'ERO. Cette production a été dosée à l'aide de la sonde DCFH-DA. La sonde diffuse librement dans les cellules puis elle est désacétylée par les estérases cellulaires en un composé non fluorescent qui est ensuite oxydé par les ERO en DCF (2',7'-dichlorofluorescéine), hautement fluorescent. L'intensité de la fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'ERO présents dans les cellules.

Nos résultats ont montré que dans les HDFa traités uniquement avec nos biomolécules, la production d'ERO n'avait pas augmenté. Nos traitements ne présentent donc pas de caractère pro-oxydant dans ce type cellulaire. Les HDFa soumis à un stress oxydant avec l'ajout d'H₂O₂ produisent une grande quantité d'ERO. Les traitements ont permis une diminution de cette production ou leur neutralisation avec l'extrait méthanolique et la 14-deoxyandrographolide. Cette diminution a été significative au bout d'1h de co-traitement à 5µg/ml et 1 µg/ml, respectivement.

Dans la littérature, les propriétés antioxydantes de la plante sont bien établies (Akowuah et al., 2008). Des études montrent qu'elle augmente l'activité des enzymes antioxydantes telles que la SOD, la CAT et la GST et diminue la peroxydation des lipides (Trivedi et al., 2007). Nos données sont en accord avec la littérature puisque les extraits méthanoliques présentent effectivement des propriétés efficaces contre le stress oxydant (Akowuah et al., 2009; Sheeja et al., 2006). Selon le solvant utilisé lors de l'extraction, les capacités antioxydantes des extraits végétaux sont différentes. En effet, l'inhibition de la peroxydation des lipides et la neutralisation directe des radicaux libres sont plus efficaces avec les extraits méthanoliques qu'avec les extraits aqueux (Akowuah et al., 2006). Ces résultats s'expliqueraient par une concentration plus élevée en andrographolide et en 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide. Des données sur des astrocytes confirment le caractère antioxydant de ces deux molécules (Tzeng et al., 2012). Dans une autre analyse, ce sont l'andrographolide et la neoandrographolide qui ont permis une protection contre le stress oxydant (Singh et al., 2001). Pourtant dans notre étude, l'andrographolide, la neoandrographolide, le 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide ne diminuent pas la production d'ERO.

En résumé, l'extrait méthanolique et la 14-deoxyandrographolide diminuent le stress oxydant induit par l' H_2O_2 via la neutralisation directe des ERO dans les HDFa.

Dans la troisième partie de l'étude sur les fibroblastes, les phénomènes d'inflammation ont été étudiés via la quantification relative de l'expression de *TNF- α* par RT-qPCR et le dosage de la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8 par un test ELISA. Pour induire un stress inflammatoire, les cellules ont été traitées avec du LPS (expression *TNF- α*) ou du *TNF- α* (sécrétion IL-6 et IL-8).

Les effets observés sur la réponse inflammatoire montrent que seuls l'andrographolide et l'extrait méthanolique ont réduit significativement l'expression de *TNF- α* et la sécrétion de l'IL-6 en condition inflammatoire. Ces diminutions sont significatives aux plus fortes concentrations pour les deux traitements. Il n'y a pas eu d'effets observés sur la sécrétion de l'IL-8 avec tous nos traitements.

Selon la littérature, il est bien rapporté que le système immunitaire de la peau subit de multiples changements avec l'âge. En effet, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-8 et le *TNF- α* augmentent avec l'âge, produisant ainsi une inflammation chronique de bas grade (Pillai et al., 2005). Les fibroblastes sont des cellules non immunes, mais elles ont la capacité de produire des cytokines pro-inflammatoires et de participer aux réponses inflammatoires locales (Smith et al., 1997).

Nos résultats sur le caractère modulateur de l'andrographolide sur le *TNF- α* sont en accord avec la littérature récente (Ding et al., 2017 ; Wong et al., 2016 ; Xu et al., 2019 ; Yang et al., 2019). Dans la lignée macrocytaire RAW 264.7, l'andrographolide a inhibé la production du *TNF- α* et de l'IL-6 suite à une stimulation avec du LPS (Lee et al., 2011). Dans la lignée monocyttaire THP-1, l'andrographolide et des extraits de la plante ont également réduit la sécrétion du *TNF- α* (Low et al., 2015). Un analogue synthétique, l'andrographolide bisulfate de sodium a réduit significativement la sécrétion de *TNF- α* (1,2 et 3,6 mg/souris) et d'IL-6 (3,6 mg/souris) dans la peau de souris exposées aux rayons UVB (Zhan et al., 2016).

Contrairement à nos résultats, l'andrographolide a réduit l'ARNm, la protéine et l'activité du promoteur IL-8 dans une lignée colorectale HCT116 traitée par TNF- α , en supprimant l'activation de la NADPH oxydase et la génération de ROS (Yuan et al., 2018).

Dans la dernière partie de l'étude sur les fibroblastes, la biosynthèse du procollagène de type I a été mesurée par un dosage immunoenzymatique. Ce test est utilisé dans le but de quantifier un peptide présent uniquement dans le précurseur du collagène de type I via un dosage ELISA sandwich. Dans la cellule, ce propeptide facilite l'enroulement du procollagène dans une conformation tridimensionnelle donnée (en triple hélice) dans le réticulum endoplasmique. Ce dernier est alors clivé au cours de la sécrétion du collagène. Le collagène mature polymérise alors en fibrilles de collagène extracellulaire. Ainsi, la quantité de propeptides libres est directement corrélée à la synthèse du collagène. Ce kit est utilisé dans de nombreuses études afin de quantifier le collagène de type I par les fibroblastes humains.

Dans cette étude, seul la 14-deoxyandrographolide testée à une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$ a diminué significativement le procollagène de type I dans la culture primaire de fibroblastes dermiques. La 14-deoxyandrographolide n'ayant pas d'impact sur la vitesse de croissance des fibroblastes jusqu'à 48h de traitement, la diminution de la production de procollagène de type I correspond donc à une diminution globale de sa production et non une diminution due à une densité plus faible de cellule.

Le collagène de type I étant la protéine la plus abondante de la MEC du derme (environ 90% du poids sec de la peau) et jouant un rôle primordial dans les propriétés biophysiques de la peau, sa présence est donc essentielle à l'architecture du derme (Meigel et al., 1977). En effet, le vieillissement cutané est dû en partie au déséquilibre entre la génération et la dégradation des protéines de la MEC dont le collagène, entraînant une grave altération du tissu conjonctif cutané (Hwang et al., 2014b, 2014c). Des études histologiques de la peau de personnes âgées ont révélé que l'altération principale est la perte massive de collagène de type I dans le derme humain, considéré comme l'une des principales causes de la formation de rides (Quan and Fisher, 2015b). Il est important de noter les différences qui se produisent

en fonction du type de vieillissement étudié. En effet, si l'expression du collagène de type I diminue dans le vieillissement intrinsèque, son expression dans le vieillissement extrinsèque est en générale fortement augmentée. Dans ce cas, un dépôt de collagène se forme induisant ainsi une fibrose dermique (Quan and Fisher, 2015b). L'application de neoandrographolide pourrait alors être intéressante afin de réduire l'excès de collagène dans la peau endommagée par le photovieillissement.

Fait intéressant, nous n'avons pas observé de changement de la production de procollagène de type I avec l'andrographolide. Or une étude a montré que l'andrographolide sodium bisulfate avait augmenté la production de collagène de type I et réduit les lésions aux collagènes induites par les UV en inhibant les augmentations de l'expression des MMP-1 et MMP-3 dans la peau des souris exposées aux UV et traitées avec des concentrations de 1,2 et 3,6 mg/souris (Zhan et al., 2016).

En perspective de notre étude, la biosynthèse du collagène pourrait être analysée par un western blot ciblant le collagène de type I mature. Une autre approche pourrait être menée à travers l'exploration du système de dégradation du collagène.

Nous savons que l'irradiation aux UV induit une synthèse accrue de MMP-1, MMP-3 et MMP-9 par les fibroblastes du derme, via la génération excessive d'ERO (Chiang et al., 2013b). Et pour rappel, les MMP sont responsables de la dégradation des protéines de la MEC, dont le collagène, ainsi que la fibronectine, l'élastine et les PG, et contribuent donc au vieillissement cutané (Kim et al., 2011b; Quan et al., 2009). Rappelons également, qu'ils sont sécrétés par les kératinocytes et les fibroblastes cutanés en réponse à de multiples stimuli tels que le stress oxydant, les rayons UV et les cytokines (Pittayapruek et al., 2016b). Donc, nous pourrions cultiver les cellules HDFa en présence de l'extrait méthanolique, de l'andrographolide, de la neoandrographolide, de la 14-deoxyandrographolide ou de la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, exposées ou non aux rayonnements UV ou traitées avec du peroxyde d'hydrogène afin d'induire des ERO. Par la suite, l'objectif serait de quantifier les ARNm et/ou les protéines MMP-1, MMP-3 et MMP-9 présents dans les HDFa.

Les ERO, jouant le rôle de messenger secondaire, activent la famille des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) (Chiang et al., 2013b). Par conséquent, nous pourrions aussi détecter par western blot : ERK, p38 et JNK. ERK est important pour stimuler l'expression de c-Fos, alors que l'activation de p38 et de JNK est cruciale pour l'expression de c-Jun. L'association C-Jun/c-Fos forme le facteur de transcription AP-1, qui joue un rôle essentiel dans la régulation de la transcription de MMP-1, MMP-3 et MMP-9, ce qui entraîne la dégradation du collagène (Park et al., 2014b). De plus, AP-1 inhibe la signalisation du TGF- β , un régulateur majeur de la production de procollagène de type I dans la peau humaine (Chen et al., 2015b; Yun et al., 2019).

De plus, le facteur de transcription NF- κ B est également activé en réponse à l'irradiation UV (Pittayapruek et al., 2016b). Il régule l'expression des facteurs de croissance, des chimiokines, des cytokines et des molécules d'adhésion cellulaire. L'activation de NF- κ B serait responsable de l'augmentation des MMPS, tels que MMP-1 et MMP-3 (Lee et al., 2012; Park et al., 2014b).

En résumé, il serait intéressant d'analyser par western blot la phosphorylation de MAPK et la quantité de protéines ERK, p38, JNK, AP-1, TGF- β , NF- κ B et collagène de type I dans les HDFa exposées aux UV ou traitées à l'H₂O₂ avec nos molécules d'intérêt.

La Figure 24 illustre les principaux résultats obtenus sur les fibroblastes cutanés traités avec l'andrographolide, ses dérivés et l'extrait d'*Andrographis paniculata*.

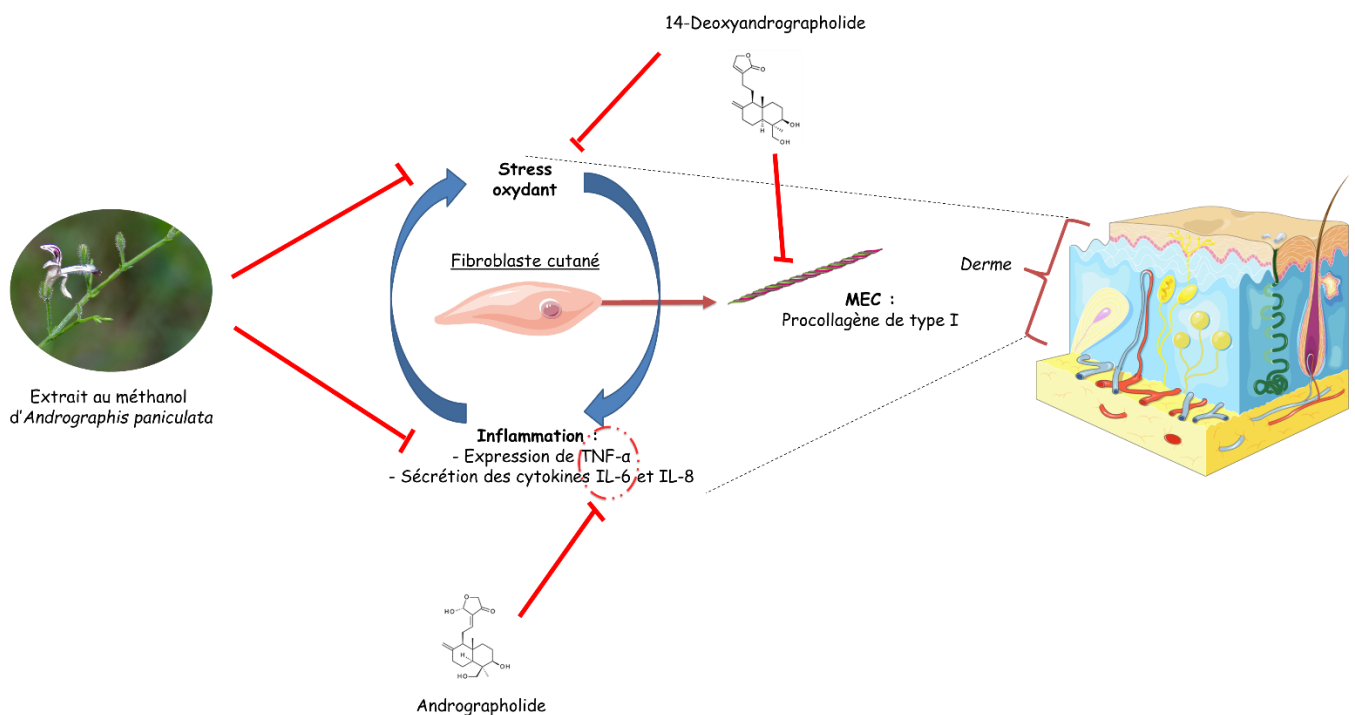


Figure 24 : Schéma bilan de l'étude des molécules et de l'extrait *d'Andrographis paniculata* sur le principal type cellulaire du derme.

Dans la seconde partie, la même stratégie a été utilisée pour étudier l'épiderme sur une lignée de kératinocytes humains appelée HaCaT.

Dans la première partie de l'étude sur les kératinocytes, la gamme de concentrations 1, 2,5 et 5 µg/ml pour l'extrait méthanolique, l'andrographolide, la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, a été vérifiée par un test MTT et un dosage de l'activité de la LDH.

Nos résultats montrent que dans les HaCaT, nos traitements n'ont pas diminué la viabilité cellulaire dans la gamme de concentrations choisie après 24h et 48h d'incubation, à l'exception de l'andrographolide. En effet, l'andrographolide a diminué significativement le métabolisme mitochondrial dès 24h de traitement. Pour la suite des expériences, l'andrographolide a donc été utilisé à 1 et 2,5 µg/ml uniquement.

Il existe donc une différence de toxicité entre les deux types cellulaires étudiés. Dans les HaCaT traitées à l'andrographolide, une tendance à l'augmentation de l'activité LDH dans les surnageants est observée à 24h et 48h. Il serait donc intéressant d'analyser la prolifération cellulaire et la mort cellulaire. Des marqueurs tels que PCNA, Ki67 ou MCM-2 peuvent nous renseigner sur la prolifération cellulaire. En ce qui concerne la mort cellulaire, une coloration de l'annexine V et l'utilisation de l'iodure de propidium permettent d'identifier différents types de mort cellulaire, soit la nécrose ou l'apoptose. L'annexine V étant une protéine présente uniquement dans le feuillet interne de la membrane cytoplasmique, qui se retrouve externaliser au cours des premiers stades de l'apoptose. L'iodure de propidium est quant à lui, un colorant liant l'ADN, qui ne peut pénétrer dans les cellules que lorsque leurs membranes sont rompues. La dislocation membranaire peut avoir lieu lors de la nécrose et lors de l'apoptose tardive. C'est pourquoi, un dosage de l'activité des caspases peut être intéressant afin de vérifier la présence d'une apoptose cellulaire. L'activité des caspases peut être détectée à l'aide d'anticorps spécifiques par western blot ou cytométrie en flux.

Dans la deuxième partie de l'étude sur les kératinocytes, les capacités antioxydantes des molécules ont été analysées via un dosage de la production des ERO par la sonde DCFH-DA. L'extrait méthanolique (5µg/ml) et la 14-deoxyandrographolide (1µg/ml) ont diminué significativement la production d'ERO induite par l'H₂O₂ au bout d'1h de co-traitement.

Ces résultats sont donc similaires à ceux obtenus pour les HDFa. Afin d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes mis en jeu par l'extrait méthanolique et la 14-deoxyandrographolide, nous pourrions réaliser d'autres tests sur les HDFa et les HaCaT. En effet, des techniques existent pour mesurer la production du superoxyde, du radical hydroxyle et du peroxyde d'hydrogène dans les cellules vivantes. Ces dernières utilisent différentes sondes fluorescentes qui sont détectables par microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux.

Le stress oxydant peut être également mesuré indirectement en dosant les dommages induits par les ERO. L'avantage du dosage indirect est la durabilité dans le temps de ces dégâts

par rapport à celle des ERO. Les trois principaux marqueurs du stress oxydant sont l'oxydation des acides nucléiques, la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines. Premièrement, les altérations au niveau des acides nucléiques peuvent être détectées par la détection de l'oxydation de la guanosine, le test des comètes et l'analyse de sites apuriniques/apyrimidiniques. Ces tests se font respectivement par ELISA compétitif, l'utilisation d'un intercalant de l'ADN et l'utilisation d'une sonde réactive au groupement aldéhyde. Deuxièmement, les atteintes au niveau des lipides peuvent être étudiées par des marqueurs de la peroxydation des lipides tels que les dosages des TBARS, du 4-hydroxynéonanal, du 8-isoprostane, des hydroperoxydes lipidiques et des LDL oxydés. Le test le plus couramment utilisé est le test TBARS. Il permet de détecter la malondialdéhyde, le produit final de la peroxydation des lipides. La malondialdéhyde réagit avec le thiobarbiturique et forme alors un composé intermédiaire qui est mesuré par colorimétrie ou par fluorescence. Et troisièmement, l'oxydation des protéines peut être analysée par la détection de la carbonylation et de la nitration de protéines.

Enfin, nous pourrions évaluer le système antioxydant des HDFa et des HaCaT en émettant l'hypothèse que l'extrait méthanolique et la 14-deoxyandrographolide pourraient augmenter l'expression, la synthèse et/ou l'activité des enzymes et des molécules antioxydantes endogènes. Nos molécules pourraient aussi mimer l'activité des enzymes antioxydantes. Pour ce faire, nous pourrions réaliser des RT-qPCR, western blot ou bien utiliser des kits spécifiques de la détection des activités enzymatiques. Les cibles sont nombreuses comme par exemple : la SOD, la CAT, la GR, la GPx, la NQO1, la GST, et le ratio GSH/GSSG (réduit/oxydé), et les thiols.

Le premier système de défense antioxydant mis en place par la cellule est l'activation de la voie NRF2 qui répond en se liant aux séquences ARE. Cette liaison va permettre la transcription des cibles de NRF2 évoquées dans la partie « 3.4.2 NRF2, le régulateur de la signalisation redox » de l'introduction. Nous pourrions analyser le facteur NRF2 via : son expression, sa synthèse, sa translocation nucléaire, sa phosphorylation (Ser⁴⁰), sa liaison à la séquence ARE, la présence de son inhibiteur (KEAP-1) et son taux de renouvellement.

Dans la troisième partie de l'étude sur les kératinocytes, l'inflammation a été analysée via la quantification relative de l'expression de *TNF- α* par RT-qPCR et le dosage de la sécrétion d'IL-8 par un test ELISA. Pour induire un stress inflammatoire, les cellules ont été traitées avec du LPS (expression *TNF- α*) ou du *TNF- α* (sécrétion IL-8).

Les effets observés sur la réponse inflammatoire montrent que seul l'extrait méthanolique (5 μ g/ml) a réduit significativement l'expression de *TNF- α* , mais pas la sécrétion de l'IL-8 en condition inflammatoire. Nous n'avons pas analysé la sécrétion de l'IL-6 car les HaCaT réagissait moins bien que les HDFa suite à un traitement avec du *TNF- α* .

En comparaison avec les résultats obtenus pour les HDFa, l'andrographolide ne diminue pas l'expression du *TNF- α* dans les HaCaT. La plus forte concentration en andrographolide n'a pas été testée sur les HaCaT à cause de sa toxicité. Ces résultats peuvent s'expliquer par la différence du type cellulaire et les mécanismes mis en jeu. La diminution du *TNF- α* dans le modèle *in vivo* de Zhan et al, est peut-être due en partie à la sécrétion des fibroblastes et non des kératinocytes (référence). Il serait intéressant dans notre étude de doser la production en protéine *TNF- α* afin de confirmer les effets observés sur l'ARNm. Si la quantité d'ARNm varie en fonction des stimulations appliquées, les effets sur la protéine peuvent également avoir un intérêt. La traduction et le temps de demi-vie de la protéine peut varier dans les cellules même si son expression ne change pas. Dans le cadre de ce projet, un test ELISA ciblant *TNF- α* avait été expérimenté sans succès. Le western blot pourrait nous renseigner sur la quantité de protéine *TNF- α* présente dans les deux types cellulaires.

Le LPS étant une molécule retrouvée dans la membrane externe des bactéries à Gram positif, il induit donc une inflammation de type infectieux. Un modèle inflammatoire plus pertinent pour le vieillissement cutané est l'exposition aux rayonnements UV. L'exposition chronique aux UVA est une cause majeure du vieillissement cutané (Rittié and Fisher, 2015). Ces derniers pénètrent profondément dans les couches cutanées, jusqu'au derme. Alors que les UVB atteignent uniquement l'épiderme et sont responsables des coups de soleil (Hua et al., 2019). L'irradiation aux UV génère des ERO qui jouent un rôle central dans le déclenchement des voies de signalisation dépendantes des UV (Rittié and Fisher, 2002). En effet, ces ERO vont activer la signalisation MAPK et les facteurs de transcription AP-1 et NF-

κB, qui induisent en outre l'inflammation et l'apoptose dans les cellules et provoquent le vieillissement de la peau (Subedi et al., 2017). Il aurait été intéressant d'étudier par des techniques de western blot ces deux facteurs de transcription afin d'affiner nos connaissances sur l'inflammation.

Dans la dernière partie de l'étude sur les kératinocytes, la biosynthèse de l'acide hyaluronique a été mesurée par un dosage ELISA compétitif. Ce test sert à quantifier l'acide hyaluronique à l'aide d'un signal colorimétrique inversement proportionnel à la quantité d'acide hyaluronique présente dans les échantillons.

Dans cette étude, aucun de nos traitements n'a eu d'effets sur la production d'acide hyaluronique dans les cellules HaCaT. L'étude de l'acide hyaluronique par les kératinocytes est intéressante puisqu'il a été rapporté que le changement histologique le plus drastique observé dans la peau sénescence est la disparition de l'acide hyaluronique dans l'épiderme, alors qu'il reste toujours présent dans le derme (Meyer and Stern, 1994). Ainsi, l'épiderme perd la principale molécule responsable de la liaison et de la rétention des molécules d'eau, entraînant une déshydratation cutanée (Longas et al., 1987).

Contrairement à nos résultats, Zhan et al., ont montré que la teneur en eau dans la peau des souris exposées aux UV, augmente dans le groupe traité par l'andrographolide bisulfate de sodium (Zhan et al., 2016). Comme l'acide hyaluronique est le principal capteur d'eau (Papakonstantinou et al., 2012), l'hypothèse d'une augmentation de la sécrétion d'acide hyaluronique peut expliquer ces résultats.

En perspective, l'hydratation cutanée pourrait être mesurée dans les HaCaT via l'expression des facteurs hydratants naturels tels que la filaggrine et la transglutaminase-1.

La Figure 25 illustre les principaux résultats obtenus sur les fibroblastes cutanés traités avec l'andrographolide, ses dérivés et l'extrait d'*Andrographis paniculata*.

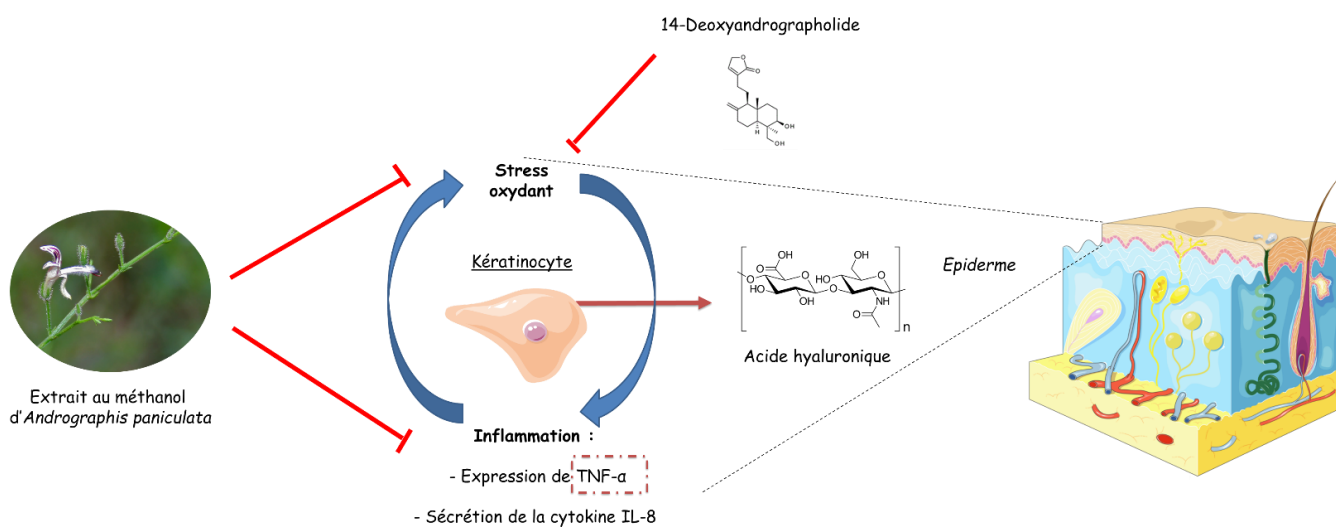


Figure 25 : Schéma bilan de l'étude des molécules et de l'extrait *d'Andrographis paniculata* sur le principal type cellulaire de l'épiderme.

Tableau 1 : Récapitulatif des effets des différents composés sur les fibroblastes et les kératinocytes

Viabilité cellulaire	Traitements non cytotoxiques sauf ANDRO (5 µg/ml) pour <u>les HaCaT</u> . Pas de souffrance cellulaire
Stress oxydant	Diminution de la production des ERO : → EM (5 µg/ml) → 14DAP (1 µg/ml) <u>HDFa et HaCaT</u>
Inflammation	Diminution de la sécrétion de l'IL-6 <u>dans les HDFa</u> : → EM (5 µg/ml) → ANDRO (5 µg/ml) Diminution de l'expression du $TNF-\alpha$: → EM (5 µg/ml) : <u>HDFa et HaCaT</u> → ANDRO (5 µg/ml) : <u>HDFa</u>

En ce qui concerne le métabolisme des cellules, les différents composés agissent de la même façon dans les deux types cellulaires étudiés sauf pour l'ANDRO (Tableau 1). Ce dernier abaisse l'activité mitochondriale dans à la plus forte concentration (5µg/ml) dès 24h de traitement. A l'exception de cette condition, toutes les autres concentrations pourront être utilisées pour tester nos actifs sur les HDFa et les HaCaT. Nous aurions pu nous attendre à ce que les HaCaT soient plus résistantes étant donné que ce sont des cellules provenant d'une lignée de kératinocytes. Le métabolisme des HaCaT diminue en présence d'ANDRO à 5 µg/ml mais nous ne détectons pas de souffrance cellulaire via le dosage de l'activité LDH. D'ailleurs aucune de nos conditions n'a entraîné d'augmentation de cette activité. Nos composés ne sont pas toxiques pour nos cellules.

Pour l'étude sur la production d'ERO dans une condition pro-oxydante induite par l'H₂O₂, nous observons une similitude dans l'activité de nos composés (Tableau 1). En effet, l'extrait EM et le 14DAP diminuent la production d'ERO en condition pro-oxydante dans les deux types cellulaires. Dans le premier cas, nous l'observons à la plus forte concentration (5 µg/ml). Ce qui pourrait correspondre à l'activité des polyphénols ou autres composés anti-oxydants présents dans cet extrait. Dans le second cas, le 14DAP semble agir à faible concentration (1 µg/ml). Ce composé régulerait finement des processus impliqués dans la diminution des ERO qui ne seraient plus observés à plus forte concentration.

Au niveau de l'inflammation, seul les HDFa ont sécrété de l'IL-6 en présence du TNF-α. Nos conditions ne semblent pas optimales afin d'induire une sécrétion significative de cette cytokine par les HaCaT. L'extrait EM et l'ANDRO ont permis de diminuer significativement la sécrétion de l'IL-6 à 5 µg/ml (Tableau 1). Lorsque l'on s'intéresse à l'expression du TNF-α induit par la présence de LPS, nous observons une diminution de son expression par l'extrait EM et l'ANDRO dans les HDFa avec la plus forte concentration. Cette diminution n'est observée qu'avec l'extrait EM dans les HaCaT à la concentration 5 µg/ml également (Tableau 1). N'ayant pas tester cette concentration pour l'ANDRO, nous ne pouvons conclure sur son effet.

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES



Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse s'intéressaient aux activités dermo-cosmétiques de la plante *Andrographis paniculata* à partir d'un extrait végétal et de composés bioactifs. Bien que l'extrait brut ait montré des effets significatifs, l'étude des molécules a fourni des connaissances plus spécifiques, en particulier sur le mécanisme d'action des composés.

L'objectif global de ce travail de thèse était alors d'élucider le potentiel anti-âge d'un extrait méthanolique d'*Andrographis paniculata*, de l'andrographolide, de la neoandrographolide, de la 14-deoxyandrographolide, et de la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide sur deux modèles cellulaires cutanés.

Ce projet de thèse a permis de (1) développer nos connaissances sur les diterpènes labdanes présents dans la plante *Andrographis paniculata*, (2) développer une méthode simple et rapide d'extraction végétale à l'aide du méthanol et, (3) identifier des activités biologiques à visée dermo-cosmétique permettant ainsi une valorisation industrielle de ces bioactifs.

La première partie du travail de thèse a porté sur le potentiel anti-âge de nos molécules et notre extrait végétal d'intérêts sur une culture primaire de fibroblastes humains. Ces cellules étant majoritaires dans le derme, les résultats obtenus sur ce type cellulaire a permis de cibler les activités biologiques bénéfiques contre le stress oxydant et l'inflammation, et pour l'homéostasie de la MEC. Dans la seconde partie de la thèse, la même stratégie a été suivie sur une lignée de kératinocytes afin de cibler les activités biologiques dans l'épiderme. De la même façon, le stress oxydant et l'inflammation ont été ciblés, ainsi que l'hydratation via le dosage de l'acide hyaluronique.

En conclusion pour les HDFa, l'extrait méthanolique et la 14-deoxydandrographolide ont agi positivement contre la production d'ERO en condition pro-oxydante. De plus, l'extrait méthanolique et l'andrographolide ont réduit la sécrétion d'IL-6 et l'expression du *TNF- α* en condition pro-inflammatoire. Enfin, la 14-deoxydandrographolide a réduit la sécrétion du pro-collagène de type I. En ce qui concerne les HaCaT, l'extrait méthanolique a réduit la production d'ERO et l'expression du *TNF- α* en condition pro-oxydante et pro-inflammatoire, respectivement. De plus, la 14-deoxydandrographolide a également réduit la production d'ERO dans les mêmes conditions. Aucune variation n'a été observée pour la production d'acide hyaluronique avec nos traitements. Nous suggérons donc qu'*Andrographis paniculata* pourrait présenter un intérêt potentiel pour l'industrie cosmétique.

Il existe de nombreux produits cosmétiques contenant des molécules chimiques synthétiques, des agents botaniques ou des mélanges. Dans la plupart des cas, il existe peu ou pas d'informations sur la justification scientifique de leur efficacité et leurs mécanismes. À cet égard, notre étude apporte donc des données scientifiques pertinentes en faveur de l'utilisation d'*Andrographis paniculata* comme source de composés phytochimiques pour les préparations cosmétiques anti-âges.

Perspectives

En perspectives de ce projet de thèse, il serait pertinent d'optimiser des techniques d'extraction plus efficaces. Car en effet, la technique que nous avons utilisée présente certaines limites, notamment l'utilisation d'un solvant nocif qui s'évapore et l'obtention d'un faible rendement en principe actif. Afin de pallier à ces problèmes, de nouvelles technologies d'assistance à l'extraction se développent. Il peut s'agir par exemple d'extraction assistée par : ultrasons, enzymes, micro-ondes, champ électrique pulsé, fluide supercritique et hautes pressions (Azmir et al., 2013). Aussi, il serait intéressant de réaliser des fractionnements de notre extrait méthanolique afin de caractériser de manière plus précise les activités biologiques observées. Il faudrait notamment identifier les caractéristiques structurales (composition en acides aminés, poids moléculaire, interactions synergiques ou antagonistes), ainsi que les cibles et les mécanismes à l'origine de ces activités. Par exemple, suite à l'extraction au méthanol, une étape de séparation pourrait être effectuée à l'aide d'un mélange eau/chloroforme (Wu et al., 2008b). Trois résidus pourraient être issus de cette séparation : un résidu soluble dans le chloroforme, un résidu soluble et aqueux et un résidu insoluble. Les résidus pourraient être ensuite chromatographiés pour obtenir des fractions spécifiques. Ces fractions permettraient par la suite d'identifier des composés spécifiques.

La peau est une véritable barrière de protection qui ne facilite pas la pénétration des principes actifs à travers ses différentes couches (Nielsen et al., 2016). C'est pourquoi, l'une des perspectives essentielles à la suite du projet serait d'étudier la perméabilité de nos molécules et de notre extrait végétal à travers la peau. Ces derniers devront être appliqués dans un véhicule qui pourra être un solvant, un gel ou une formulation pâteuse. Afin d'étudier *in vitro*, le passage de nos molécules dans les différentes couches cutanées, on pourrait utiliser un dispositif appelé cellule de diffusion ou cellule de Franz (Ng et al., 2010; Pineau et al., 2012). Ce dispositif permet de déterminer la pénétration de substances exogènes et de calculer la vitesse de passage à travers les différentes couches de la peau. Les

composés se dirigent d'un compartiment donneur vers un milieu receveur en passant par une membrane. Ils sont alors dosés dans le milieu receveur par des techniques analytiques adéquates (HPLC, CPG-MS, ICP, RAMAN...). En ce qui concerne le type de membrane, il existe des dispositifs comprenant de la peau excisée, de la peau humaine reconstituée ou des membranes synthétiques. En général, les échantillons de peaux excisées proviennent des services de chirurgie (chirurgie plastique, amputations...) ou de cadavres. L'utilisation de la peau humaine pose des problèmes d'éthique, de coût et de disponibilité. Une des alternatives est l'utilisation de peau humaine reconstituée à partir de kératinocytes cultivés *in vitro* sur une matrice de collagène, ou un filtre inerte contenant ou non des fibroblastes. Des milieux spécifiques permettent la différenciation des kératinocytes, ce qui donne une reconstitution proche de la peau humaine sans les annexes cutanées (exemples : EpiSkin® et Epiderm® (MatTek). Enfin les membranes synthétiques actuellement disponibles sont des membranes de type silicone, cellulose, polycarbonates ou filtre de nylon). Ces dernières peuvent être disposées dans des plaques de culture cellulaire permettant ainsi des études de criblage.

Enfin, nous pourrions tester d'autres effets anti-âges potentiels de nos traitements via des immunomarquages révélateurs d'une activité régénérante. En ce qui concerne l'épiderme, nous pourrions étudier le marqueur de la division mitotique (Ki67), les cytokératines (CK10, CK14...), les marqueurs de la différenciation des kératinocytes (Involucrine, Loricrine, Caspase 14). Au niveau du derme, nous pourrions approfondir l'étude de la MEC avec le marquage des GAG et l'évaluation de la synthèse de l'acide hyaluronique via HAS1 et HAS2. D'autres marqueurs du derme pourraient être étudiés tels que les héparanases, l'élastine, la fibrilline, la vimentine et d'autres types de collagènes (types III, IV, V, VII, VIII et XII). Nous pourrions également doser les produits de glycation avancée ou AGE (pour *advanced glycation end-products*, en anglais). Ces derniers se forment lors de la réaction de Maillard où les glucides réducteurs réagissent avec les chaînes latérales de diverses macromolécules, en particulier de protéines. De plus, les AGE peuvent se fixer à des récepteurs qui provoquent une réponse cellulaire pro-inflammatoire. Nous pourrions tester l'effet inhibiteur potentiel de nos

molécules sur la glycation en émettant l'hypothèse que nos molécules casseraient la liaison sucre-protéine ou bloqueraient les interactions entre les AGE et leurs récepteurs.

Nous observons des effets sur les cellules à court terme. Il serait intéressant de regarder les effets de nos composés sur des traitements chroniques. Des études sur des modèles murins pourraient nous apporter des informations complémentaires sur l'activité biologique. A long terme, l'effet antioxydant et/ou anti-inflammatoire apporterait des bénéfices sur le vieillissement cutané. Par exemple, des souris exposées aux rayonnements UV ayant été traitées avec de l'andrographolide ou l'un de ses analogues, nous renseigneraient sur leurs capacités potentielles à lutter contre le vieillissement de la peau.

REFERENCES



Références

- Aaron, B.B., and Gosline, J.M. (1981). Elastin as a random-network elastomer: A mechanical and optical analysis of single elastin fibers. *Biopolymers* 20, 1247–1260.
- Abu-Ghefreh, A.A., Canatan, H., and Ezeamuzie, C.I. (2009). In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of andrographolide. *Int. Immunopharmacol.* 9, 313–318.
- Addabbo, F., Montagnani, M., and Goligorsky, M.S. (2009). Mitochondria and Reactive Oxygen Species. *Hypertension* 53, 885–892.
- Aebi, H. (1984a). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Aebi, H. (1984b). [13] Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 121–126.
- Aizen, E., and Gilhar, A. (2001). Smoking effect on skin wrinkling in the aged population. *Int. J. Dermatol.* 40, 431–433.
- Akbar, S. (2011). *Andrographis paniculata*: a review of pharmacological activities and clinical effects. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* 16, 66–77.
- Akhtar, K., Broekelmann, T.J., Miao, M., Keeley, F.W., Starcher, B.C., Pierce, R.A., Mecham, R.P., and Adair-Kirk, T.L. (2010). Oxidative and Nitrosative Modifications of Tropoelastin Prevent Elastic Fiber Assembly in Vitro. *J. Biol. Chem.* 285, 37396–37404.
- Akowuah, G.A., Zhari, I., Norhayati, I., and Mariam, A. (2006). HPLC and HPTLC densitometric determination of andrographolides and antioxidant potential of *Andrographis paniculata*. *J. Food Compos. Anal.* 19, 118–126.
- Akowuah, G.A., Zhari, I., and Mariam, A. (2008). Analysis of urinary andrographolides and antioxidant status after oral administration of *Andrographis paniculata* leaf extract in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 46, 3616–3620.
- Akowuah, G.A., Zhari, I., Mariam, A., and Yam, M.F. (2009). Absorption of andrographolides from *Andrographis paniculata* and its effect on CCl₄-induced oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 47, 2321–2326.
- Al Batran, R., Al-Bayat, F., Al-Obaidi, M.M.J., and Abdulla, M.A. (2013). Acute toxicity and the effect of andrographolide on *Porphyromonas gingivalis*-induced hyperlipidemia in rats. *BioMed Res. Int.* 2013, 594012.
- Al Batran, R., Al-Bayat, F., Al-Obaidi, M.M.J., and Ashrafi, A. (2014). Insights into the antiatherogenic molecular mechanisms of andrographolide against *Porphyromonas gingivalis*-induced atherosclerosis in rabbits. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 387, 1141–1152.
- Alzaharna, M., Alqouqa, I., and Cheung, H.-Y. (2017). Taxifolin synergizes Andrographolide-induced cell death by attenuation of autophagy and augmentation of caspase dependent and independent cell death in HeLa cells. *PloS One* 12, e0171325.

- Amano, S. (2016). Characterization and mechanisms of photoageing-related changes in skin. Damages of basement membrane and dermal structures. *Exp. Dermatol.* *25*, 14–19.
- Anderegg, U., Simon, J.C., and Averbeck, M. (2014). More than just a filler - the role of hyaluronan for skin homeostasis. *Exp. Dermatol.* *23*, 295–303.
- Andri Cahyo, K., Masitah, H., and Harcharan, S. (2009). Effects of solvent properties on the Soxhlet extraction of diterpenoid lactones from *Andrographis paniculata* leaves.
- Aragane, Y., Yamada, H., Schwarz, A., Poppelmann, B., Luger, T.A., Tezuka, T., and Schwarz, T. (1996). Transforming growth factor- α induces interleukin-6 in the human keratinocyte cell line HaCaT mainly by transcriptional activation. *J. Invest. Dermatol.* *106*, 1192–1197.
- Arrigo, A.-P. (2005). Chaperons moléculaires et repliement des protéines : L'exemple de certaines protéines de choc thermique. *médecine/sciences* *21*, 619–625.
- Ashida, M., Bito, T., Budiyo, A., Ichihashi, M., and Ueda, M. (2003). Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in HaCaT keratinocytes after UVB. *Exp. Dermatol.* *12*, 445–452.
- Ashworth, J.L., Murphy, G., Rock, M.J., Sherratt, M.J., Shapiro, S.D., Shuttleworth, C.A., and Kielty, C.M. (1999). Fibrillin degradation by matrix metalloproteinases: implications for connective tissue remodelling. *Biochem. J.* *340*, 171–181.
- Averbeck, M., Gebhardt, C.A., Voigt, S., Beilharz, S., Anderegg, U., Termeer, C.C., Sleeman, J.P., and Simon, J.C. (2007). Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 687–697.
- Axelsson, J., Sundelin, T., Ingre, M., Van Someren, E.J.W., Olsson, A., and Lekander, M. (2010). Beauty sleep: experimental study on the perceived health and attractiveness of sleep deprived people. *BMJ* *341*, c6614.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., and Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* *117*, 426–436.
- Bachelor, M.A., and Bowden, G.T. (2004). UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin. Cancer Biol.* *14*, 131–138.
- Bae, Y.S., Oh, H., Rhee, S.G., and Yoo, Y.D. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol. Cells* *32*, 491–509.
- Baker, D.J., Perez-Terzic, C., Jin, F., Pitel, K.S., Pitel, K., Niederländer, N.J., Jeganathan, K., Yamada, S., Reyes, S., Rowe, L., et al. (2008). Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat. Cell Biol.* *10*, 825–836.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236.

Barb, W.G., Baxendale, J.H., George, P.M., and Hargrave, K.R. (1949). Reactions of Ferrous and Ferric Ions with Hydrogen Peroxide. *Nature* 163, 692–694.

Barbusiński, K. (2009). Fenton reaction - controversy concerning the chemistry. *Ecol. Chem. Eng. S* 347–358.

Baron, J.M., Höller, D., Schiffer, R., Frankenberg, S., Neis, M., Merk, H.F., and Jugert, F.K. (2001). Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 116, 541–548.

Barrantes, E., and Guinea, M. (2003). Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. *Life Sci.* 72, 843–850.

Barrera, G., Pizzimenti, S., Daga, M., Dianzani, C., Arcaro, A., Cetrangolo, G.P., Giordano, G., Cucci, M.A., Graf, M., and Gentile, F. (2018). Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. *Antioxidants* 7.

Bashir, M.M., Sharma, M.R., and Werth, V.P. (2009a). TNF-alpha production in the skin. *Arch. Dermatol. Res.* 301, 87–91.

Bashir, M.M., Sharma, M.R., and Werth, V.P. (2009b). UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF-alpha production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *J. Invest. Dermatol.* 129, 994–1001.

Basisty, N., Meyer, J.G., and Schilling, B. (2018). Protein Turnover in Aging and Longevity. *PROTEOMICS* 18, 1700108.

Batkhuu, J., Hattori, K., Takano, F., Fushiya, S., Oshiman, K., and Fujimiya, Y. (2002). Suppression of NO production in activated macrophages in vitro and ex vivo by neoandrographolide isolated from *Andrographis paniculata*. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1169–1174.

Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., and Francz, P.I. (1988). Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5112–5116.

Beak, S.M., Lee, Y.S., and Kim, J.-A. (2004). NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor- κ B in HaCaT human keratinocytes. *Biochimie* 86, 425–429.

Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.

Bera, R., Ahmed, S.K.M., Sarkar, L., Sen, T., and Karmakar, S. (2014). Pharmacokinetic analysis and tissue distribution of andrographolide in rat by a validated LC-MS/MS method. *Pharm. Biol.* 52, 321–329.

Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kürten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H., and Krutmann, J. (1999). Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J. Biol. Chem.* *274*, 15345–15349.

Bernstein, E.F., Fisher, L.W., Li, K., LeBaron, R.G., Tan, E.M., and Uitto, J. (1995). Differential expression of the versican and decorin genes in photoaged and sun-protected skin. Comparison by immunohistochemical and northern analyses. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *72*, 662–669.

Bernstein, E.F., Underhill, C.B., Hahn, P.J., Brown, D.B., and Uitto, J. (1996). Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *Br. J. Dermatol.* *135*, 255–262.

Bhandary, B., Marahatta, A., Kim, H.-R., and Chae, H.-J. (2012). An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 434–456.

Birch-Machin, M.A., and Swalwell, H. (2010). How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. *Mutagenesis* *25*, 101–107.

Birkedal-Hansen, H. (1987). Catabolism and turnover of collagens: collagenases. *Methods Enzymol.* *144*, 140–171.

Bissett, D.L., Chatterjee, R., and Hannon, D.P. (1991). Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators. *Photochem. Photobiol.* *54*, 215–223.

Block, K., Gorin, Y., and Abboud, H.E. (2009). Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14385–14390.

Boulais, N., and Misery, L. (2007). Merkel cells. *J. Am. Acad. Dermatol.* *57*, 147–165.

Branchet, M.C., Boisnic, S., Frances, C., and Robert, A.M. (1990). Skin thickness changes in normal aging skin. *Gerontology* *36*, 28–35.

Brennan, M., Bhatti, H., Nerusu, K.C., Bhagavathula, N., Kang, S., Fisher, G.J., Varani, J., and Voorhees, J.J. (2003). Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem. Photobiol.* *78*, 43–48.

Brenneisen, P., Wlaschek, M., Wenk, J., Blaudschun, R., Hinrichs, R., Dissemmond, J., Krieg, T., and Scharffetter-Kochanek, K. (1999). Ultraviolet-B induction of interstitial collagenase and stromelysin-1 occurs in human dermal fibroblasts via an autocrine interleukin-6-dependent loop. *FEBS Lett.* *449*, 36–40.

Brincat, M.P., Baron, Y.M., and Galea, R. (2005). Estrogens and the skin. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* *8*, 110–123.

Bulteau, A.-L., Petropoulos, I., and Friguet, B. (2000). Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp. Gerontol.* *35*, 767–777.

Canitrot, Y., Falinski, R., Louat, T., Laurent, G., Cazaux, C., Hoffmann, J.-S., Lautier, D., and Skorski, T. (2003). p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation. *Blood* 102, 2632–2637.

Casamonti, M., Risaliti, L., Vanti, G., Piazzini, V., Bergonzi, M.C., and Bilia, A.R. (2019). Andrographolide Loaded in Micro- and Nano-Formulations: Improved Bioavailability, Target-Tissue Distribution, and Efficacy of the “King of Bitters.” *Engineering* 5, 69–75.

Cavinato, M., and Jansen-Dürr, P. (2017). Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. *Exp. Gerontol.* 94, 78–82.

Cenizo, V., André, V., Reymermier, C., Sommer, P., Damour, O., and Perrier, E. (2006). LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: a dill extract induces the LOXL gene expression. *Exp. Dermatol.* 15, 574–581.

Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: An overview. *Mol. Cell. Biochem.* 253, 269–285.

Chakravarti, R.N., and Chakravarti, D. (1951). Andrographolide, the Active Constituent of *Andrographis Paniculata* Nees. A Preliminary Communication. *Indian Med. Gaz.* 86, 96–97.

Chang, T.-M., Tsen, J.-H., Yen, H., Yang, T.-Y., and Huang, H.-C. (2017). Extract from *Periostracum cicadae* Inhibits Oxidative Stress and Inflammation Induced by Ultraviolet B Irradiation on HaCaT Keratinocytes. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2017.

Chao, W.-W., and Lin, B.-F. (2010). Isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian). *Chin. Med.* 5, 17.

Chen, B., Chen, B., Li, R., Li, R., Yan, N., Yan, N., Chen, G., Chen, G., Qian, W., Qian, W., et al. (2015a). Astragaloside IV controls collagen reduction in photoaging skin by improving transforming growth factor- β /Smad signaling suppression and inhibiting matrix metalloproteinase-1. *Mol. Med. Rep.* 11, 3344–3348.

Chen, B., Li, R., Yan, N., Chen, G., Qian, W., Jiang, H.-L., Ji, C., and Bi, Z.-G. (2015b). Astragaloside IV controls collagen reduction in photoaging skin by improving transforming growth factor- β /Smad signaling suppression and inhibiting matrix metalloproteinase-1. *Mol. Med. Rep.* 11, 3344–3348.

Chen, H.-W., Huang, C.-S., Li, C.-C., Lin, A.-H., Huang, Y.-J., Wang, T.-S., Yao, H.-T., and Lii, C.-K. (2014). Bioavailability of andrographolide and protection against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 1–9.

Chen, L., Hu, J.Y., and Wang, S.Q. (2012a). The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 67, 1013–1024.

Chen, W., Feng, L., Nie, H., and Zheng, X. (2012b). Andrographolide induces autophagic cell death in human liver cancer cells through cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition pore. *Carcinogenesis* 33, 2190–2198.

Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L.A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *J. Biol. Chem.* *267*, 166–172.

Chern, C.-M., Liou, K.-T., Wang, Y.-H., Liao, J.-F., Yen, J.-C., and Shen, Y.-C. (2011). Andrographolide inhibits PI3K/AKT-dependent NOX2 and iNOS expression protecting mice against hypoxia/ischemia-induced oxidative brain injury. *Planta Med.* *77*, 1669–1679.

Cheung, H.Y., Cheung, C.S., and Kong, C.K. (2001). Determination of bioactive diterpenoids from *Andrographis paniculata* by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* *930*, 171–176.

Chiang, H.-M., Chen, H.-C., Chiu, H.-H., Chen, C.-W., Wang, S.-M., and Wen, K.-C. (2013a). *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr Stimulates Skin Regeneration after UVB Exposure via ROS Scavenging and Modulation of the MAPK/MMPs/Collagen Pathway. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM 2013*, 324864.

Chiang, H.-M., Chen, H.-C., Chiu, H.-H., Chen, C.-W., Wang, S.-M., and Wen, K.-C. (2013b). *Neonauclea reticulata* (Havil.) Merr Stimulates Skin Regeneration after UVB Exposure via ROS Scavenging and Modulation of the MAPK/MMPs/Collagen Pathway. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM 2013*, 324864.

Chinnathambi, S., Tomanek-Chalkley, A., and Bickenbach, J.R. (2008). HSP70 and EndoG modulate cell death by heat in human skin keratinocytes in vitro. *Cells Tissues Organs* *187*, 131–140.

Cho, S., Shin, M.H., Kim, Y.K., Seo, J.-E., Lee, Y.M., Park, C.-H., and Chung, J.H. (2009). Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* *14*, 15–19.

Christiano, A.M., Anhalt, G., Gibbons, S., Bauer, E.A., and Uitto, J. (1994). Premature Termination Codons in the Type VII Collagen Gene (COL7A1) Underlie Severe, Mutilating Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Genomics* *21*, 160–168.

Chua, L.S. (2014). Review on Liver Inflammation and Antiinflammatory Activity of *Andrographis paniculata* for Hepatoprotection. *Phytother. Res.* *28*, 1589–1598.

Chung, J.H., Youn, S.H., Koh, W.S., Eun, H.C., Cho, K.H., Park, K.C., and Youn, J.I. (1996). Ultraviolet B irradiation-enhanced interleukin (IL)-6 production and mRNA expression are mediated by IL-1 alpha in cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *106*, 715–720.

Chung, J.H., Seo, J.Y., Lee, M.K., Eun, H.C., Lee, J.H., Kang, S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2002). Ultraviolet Modulation of Human Macrophage Metalloelastase in Human Skin In Vivo. *J. Invest. Dermatol.* *119*, 507–512.

Churiyah, Pongtuluran, O.B., Rofaani, E., and Tarwadi (2015). Antiviral and Immunostimulant Activities of *Andrographis paniculata*. *HAYATI J. Biosci.* *22*, 67–72.

Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin–proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* *17*, 7151–7160.

Cleaver, J.E., and Crowley, E. (2002). UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *7*, d1024-1043.

Codriansky, K.A., Quintanilla-Dieck, M.J., Gan, S., Keady, M., Bhawan, J., and Runger, T.M. (2009). Intracellular Degradation of Elastin by Cathepsin K in Skin Fibroblasts— A Possible Role in Photoaging. *Photochem. Photobiol.* *85*, 1356–1363.

Cosgrove, M.C., Franco, O.H., Granger, S.P., Murray, P.G., and Mayes, A.E. (2007). Dietary nutrient intakes and skin-aging appearance among middle-aged American women. *Am. J. Clin. Nutr.* *86*, 1225–1231.

Craven, N.M., Watson, R.E.B., Jones, C.J.P., Shuttleworth, C.A., Kielty, C.M., and Griffiths, C.E.M. (1997). Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII. *Br. J. Dermatol.* *137*, 344–350.

Crawford, H.C., and Matrisian, L.M. (1996). Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enzyme Protein* *49*, 20–37.

Cristofalo, V.J., and Pignolo, R.J. (1993). Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol. Rev.* *73*, 617–638.

Dahlback, K., Ljungquist, A., Lofberg, H., Dahlback, B., Engvall, E., and Sakai, L.Y. (1990). Fibrillin Immunoreactive Fibers Constitute a Unique Network in the Human Dermis: Immunohistochemical Comparison of the Distributions of Fibrillin, Vitronectin, Amyloid P Component, and Orcein Stainable Structures in Normal Skin and Elastosis. *J. Invest. Dermatol.* *94*, 284–291.

Dai, G., Freudenberger, T., Zipper, P., Melchior, A., Grether-Beck, S., Rabausch, B., de Groot, J., Twarock, S., Hanenberg, H., Homey, B., et al. (2007). Chronic Ultraviolet B Irradiation Causes Loss of Hyaluronic Acid from Mouse Dermis Because of Down-Regulation of Hyaluronic Acid Synthases. *Am. J. Pathol.* *171*, 1451–1461.

Das, S., Gautam, N., Dey, S.K., Maiti, T., and Roy, S. (2009a). Oxidative stress in the brain of nicotine-induced toxicity: protective role of *Andrographis paniculata* Nees and vitamin E. *Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appl. Nutr. Metab.* *34*, 124–135.

Das, S., Neogy, S., Gautam, N., and Roy, S. (2009b). In vitro nicotine induced superoxide mediated DNA fragmentation in lymphocytes: protective role of *Andrographis paniculata* Nees. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* *23*, 90–98.

Das, S., Pradhan, G.K., Das, S., Nath, D., and Das Saha, K. (2015). Enhanced protective activity of nano formulated andrographolide against arsenic induced liver damage. *Chem. Biol. Interact.* *242*, 281–289.

D’Autreaux, B., and Toledano, M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 813–824.

- Diffey, B.L. (1998). Ultraviolet radiation and human health. *Clin. Dermatol.* *16*, 83–89.
- Diffey, B.L. (2002). What is light? *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* *18*, 68–74.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 9363–9367.
- Diridollou, S., de Rigal, J., Querleux, B., Leroy, F., and Holloway Barbosa, V. (2007). Comparative study of the hydration of the stratum corneum between four ethnic groups: influence of age. *Int. J. Dermatol.* *46 Suppl 1*, 11–14.
- Doggett, D.L., Rotenberg, M.O., Pignolo, R.J., Phillips, P.D., and Cristofalo, V.J. (1992). Differential gene expression between young and senescent, quiescent WI-38 cells. *Mech. Ageing Dev.* *65*, 239–255.
- Dos Santos, M., Metral, E., Boher, A., Rousselle, P., Thepot, A., and Damour, O. (2015). In vitro 3-D model based on extending time of culture for studying chronological epidermis aging. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *47*, 85–97.
- Doshi, D.N., Hanneman, K.K., and Cooper, K.D. (2007). Smoking and skin aging in identical twins. *Arch. Dermatol.* *143*, 1543–1546.
- Doubal, S., and Klemra, P. (2002). Visco-elastic response of human skin and aging. *J. Am. Aging Assoc.* *25*, 115–117.
- Dukan, S., Farewell, A., Ballesteros, M., Taddei, F., Radman, M., and Nyström, T. (2000). Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 5746–5749.
- Eckert, R.L., and Rorke, E.A. (1989). Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environ. Health Perspect.* *80*, 109–116.
- Edwards, M.J., Marks, R., Dykes, P.J., Merrett, V.R., Morgan, H.E., and O'Donovan, M.R. (1991). Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* *96*, 392–396.
- El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., Brown, D., Birk, D.E., Gasparro, F., Ahmad, H., and Uitto, J. (2002). Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp. Dermatol.* *11*, 398–405.
- El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., Brown, D., Birk, D.E., Gasparro, F., Ahmad, H., and Uitto, J. (2002). Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp. Dermatol.* *11*, 398–405.
- Epel, E.S., Blackburn, E.H., Lin, J., Dhabhar, F.S., Adler, N.E., Morrow, J.D., and Cawthon, R.M. (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17312–17315.

Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., and Maibach, H.I. (2007). Structural Characteristics of the Aging Skin: A Review. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 26, 343–357.

Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., and Maibach, H.I. (2008a). Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 30, 87–95.

Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., and Maibach, H.I. (2008b). Functional and physiological characteristics of the aging skin. *Aging Clin. Exp. Res.* 20, 195–200.

Farage, M.A., Miller, K.W., Elsner, P., and Maibach, H.I. (2013). Characteristics of the Aging Skin. *Adv. Wound Care* 2, 5–10.

Farage, M.A., Miller, K.W., and Maibach, H.I. (2017). Degenerative Changes in Aging Skin. In *Textbook of Aging Skin*, M.A. Farage, K.W. Miller, and H.I. Maibach, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 15–30.

Feliciani, C., Gupta, A.K., and Sauder, D.N. (1996). Keratinocytes and cytokine/growth factors. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* 7, 300–318.

Fenske, N.A., and Lober, C.W. (1986). Structural and functional changes of normal aging skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 15, 571–585.

Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.

Fisher, G.J., Datta, S.C., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J.J. (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379, 335–339.

Fisher, G.J., Wang, Z., Datta, S.C., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J.J. (1997). Pathophysiology of Premature Skin Aging Induced by Ultraviolet Light. *N. Engl. J. Med.* 337, 1419–1429.

Fisher, G.J., Talwar, H.S., Lin, J., Lin, P., McPhillips, F., Wang, Z., Li, X., Wan, Y., Kang, S., and Voorhees, J.J. (1998). Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J. Clin. Invest.* 101, 1432–1440.

Fisher, G.J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., and Voorhees, J.J. (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol.* 138, 1462–1470.

Fisher, G.J., Varani, J., and Voorhees, J.J. (2008). Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch. Dermatol.* 144, 666–672.

Fisher, G.J., Quan, T., Purohit, T., Shao, Y., Cho, M.K., He, T., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J.J. (2009). Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am. J. Pathol.* 174, 101–114.

Fisher, G.J., Shao, Y., He, T., Qin, Z., Perry, D., Voorhees, J.J., and Quan, T. (2016). Reduction of fibroblast size/mechanical force down-regulates TGF- β type II receptor: implications for human skin aging. *Aging Cell* 15, 67–76.

Flament, F., Bazin, R., Laquieze, S., Rubert, V., Simonpietri, E., and Piot, B. (2013). Effect of the sun on visible clinical signs of aging in Caucasian skin. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 6, 221–232.

Flohe, L., Günzler, W.A., and Schock, H.H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32, 132–134.

Flores, I., Cayuela, M.L., and Blasco, M.A. (2005). Effects of Telomerase and Telomere Length on Epidermal Stem Cell Behavior. *Science* 309, 1253–1256.

Folkes, L.K., Candeias, L.P., and Wardman, P. (1995). Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 323, 120–126.

Fonager, J., Beedholm, R., Clark, B.F.C., and Rattan, S.I.S. (2002). Mild stress-induced stimulation of heat-shock protein synthesis and improved functional ability of human fibroblasts undergoing aging in vitro. *Exp. Gerontol.* 37, 1223–1228.

Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., and Apanasets, O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1363–1373.

Fridovich, I. (1975a). Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 147–159.

Fridovich, I. (1975b). Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 147–159.

Friedman, O. (2005). Changes associated with the aging face. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.* 13, 371–380.

Fujimura, T., Haketa, K., Hotta, M., and Kitahara, T. (2007). Loss of skin elasticity precedes to rapid increase of wrinkle levels. *J. Dermatol. Sci.* 47, 233–239.

Fukuda, S., Baba, S., and Akasaka, T. (2015). Psychological stress has the potential to cause a decline in the epidermal permeability barrier function of the horny layer. *Int. J. Cosmet. Sci.* 37, 63–69.

Garg, A., Chren, M.M., Sands, L.P., Matsui, M.S., Marenus, K.D., Feingold, K.R., and Elias, P.M. (2001). Psychological stress perturbs epidermal permeability barrier homeostasis: implications for the pathogenesis of stress-associated skin disorders. *Arch. Dermatol.* 137, 53–59.

Geng, J., Liu, W., Xiong, Y., Ding, H., Jiang, C., Yang, X., Li, X., Elgehama, A., Sun, Y., Xu, Q., et al. (2018). Andrographolide sulfonate improves Alzheimer-associated phenotypes and mitochondrial dysfunction in APP/PS1 transgenic mice. *Biomed. Pharmacother. Biomedicine Pharmacother.* 97, 1032–1039.

Giacomoni, P.U., and Rein, G. (2010). Skin Aging: A Generalization of the Micro-inflammatory Hypothesis. In *Textbook of Aging Skin*, M.A. Farage, K.W. Miller, and H.I. Maibach, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 789–796.

Gilchrest, B.A. (1983). In Vitro Assessment of Keratinocyte Aging. *J. Invest. Dermatol.* *81*, S184–S189.

Gilhar, A., Ullmann, Y., Karry, R., Shalaginov, R., Assy, B., Serafimovich, S., and Kalish, R.S. (2004). Aging of human epidermis: reversal of aging changes correlates with reversal of keratinocyte fas expression and apoptosis. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *59*, 411–415.

Girotti, A.W. (2001). Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B* *63*, 103–113.

Gkogkolou, P., and Böhm, M. (2012). Advanced glycation end products. *Dermatoendocrinol.* *4*, 259–270.

Godar, D.E. (2005). UV doses worldwide. *Photochem. Photobiol.* *81*, 736–749.

Golden, T.R., Hinerfeld, D.A., and Melov, S. (2002). Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* *1*, 117–123.

Goodsell, D.S. (2001). The Molecular Perspective: Ultraviolet Light and Pyrimidine Dimers. *The Oncologist* *6*, 298–299.

Gorbunova, V., Seluanov, A., Mao, Z., and Hine, C. (2007). Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res.* *35*, 7466–7474.

Gorsky, L.D., Koop, D.R., and Coon, M.J. (1984). On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. *J. Biol. Chem.* *259*, 6812–6817.

Grove, G.L. (1989). Physiologic changes in older skin. *Clin. Geriatr. Med.* *5*, 115–125.

Grune, T., Reinheckel, T., and Davies, K.J. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* *11*, 526–534.

Gu, L., Yu, Q., Li, Q., Zhang, L., Lu, H., and Zhang, X. (2018). Andrographolide Protects PC12 Cells Against β -Amyloid-Induced Autophagy-Associated Cell Death Through Activation of the Nrf2-Mediated p62 Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.

Gu, L.-L., Zhang, X.-Y., Xing, W.-M., Xu, J.-D., and Lu, H. (2016). Andrographolide-induced apoptosis in human renal tubular epithelial cells: Roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* *45*, 257–264.

Guan, S.P., Tee, W., Ng, D.S.W., Chan, T.K., Peh, H.Y., Ho, W.E., Cheng, C., Mak, J.C., and Wong, W.S.F. (2013). Andrographolide protects against cigarette smoke-induced oxidative lung injury via augmentation of Nrf2 activity. *Br. J. Pharmacol.* *168*, 1707–1718.

Guo, H., Zhang, Z., Su, Z., Sun, C., Zhang, X., Zhao, X., Lai, X., Su, Z., Li, Y., and Zhan, J.Y. (2016). Enhanced anti-tumor activity and reduced toxicity by combination andrographolide and bleomycin in ascitic tumor-bearing mice. *Eur. J. Pharmacol.* 776, 52–63.

Guo, S., Wharton, W., Moseley, P., and Shi, H. (2007). Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress Chaperones* 12, 245–254.

Guo, W., Liu, W., Chen, G., Hong, S., Qian, C., Xie, N., Yang, X., Sun, Y., and Xu, Q. (2012). Water-soluble andrographolide sulfonate exerts anti-sepsis action in mice through down-regulating p38 MAPK, STAT3 and NF- κ B pathways. *Int. Immunopharmacol.* 14, 613–619.

Haake, A.R., Roublevskaia, I., and Cooklis, M. (1998). Apoptosis: A Role in Skin Aging? *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 3, 28–35.

Hall, M.-C., Young, D.A., Waters, J.G., Rowan, A.D., Chantry, A., Edwards, D.R., and Clark, I.M. (2003). The Comparative Role of Activator Protein 1 and Smad Factors in the Regulation of Timp-1 and MMP-1 Gene Expression by Transforming Growth Factor- β 1. *J. Biol. Chem.* 278, 10304–10313.

Hanh, T.T.H., My, N.T.T., Cham, P.T., Quang, T.H., Cuong, N.X., Huong, T.T., Nam, N.H., and Minh, C.V. (2020). Diterpenoids and Flavonoids from *Andrographis paniculata*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 68, 96–99.

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.

Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 20, 145–147.

Hašová, M., Crhák, T., Šafránková, B., Dvořáková, J., Muthný, T., Velebný, V., and Kubala, L. (2011). Hyaluronan minimizes effects of UV irradiation on human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 277.

Hayflick, L. (1974). The Longevity of Cultured Human Cells. *J. Am. Geriatr. Soc.* 22, 1–12.

Heath, M.L., and Sidbury, R. (2006). Cutaneous manifestations of nutritional deficiency. *Curr. Opin. Pediatr.* 18, 417–422.

Heim, A.J., Matthews, W.G., and Koob, T.J. (2006). Determination of the elastic modulus of native collagen fibrils via radial indentation. *Appl. Phys. Lett.* 89, 181902.

Hellemans, L., Corstjens, H., Neven, A., Declercq, L., and Maes, D. (2003). Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery. *J. Invest. Dermatol.* 120, 434–439.

Hossain, M.S., Urbi, Z., Sule, A., and Hafizur Rahman, K.M. (2014). *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees: a review of ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology. *ScientificWorldJournal* 2014, 274905.

Hu, C., Egger, A.L., Mesecar, A.D., and van Breemen, R.B. (2011). Modification of keap1 cysteine residues by sulforaphane. *Chem. Res. Toxicol.* *24*, 515–521.

Hua, H., Cheng, J.-W., Bu, W.-B., Liu, J., Ma, W.-W., Ni, N., Shi, J., Zhou, B.-R., and Luo, D. (2019). 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy inhibits ultraviolet B-induced skin photodamage. *Int. J. Biol. Sci.* *15*, 2100–2109.

Humbert, P.G., Haftek, M., Creidi, P., Lapière, C., Nusgens, B., Richard, A., Schmitt, D., Rougier, A., and Zehouani, H. (2003). Topical ascorbic acid on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: double-blind study vs. placebo. *Exp. Dermatol.* *12*, 237–244.

Hussain, R.M., Razak, Z.N.R.A., Saad, W.M.M., and Mustakim, M. (2017). Mechanism of antagonistic effects of *Andrographis paniculata* methanolic extract against *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* *10*, 685–695.

Hussein, M.R. (2005). Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J. Cutan. Pathol.* *32*, 191–205.

Hwang, E., Lee, D.-G., Park, S.H., Oh, M.S., and Kim, S.Y. (2014a). Coriander leaf extract exerts antioxidant activity and protects against UVB-induced photoaging of skin by regulation of procollagen type I and MMP-1 expression. *J. Med. Food* *17*, 985–995.

Hwang, E., Lee, D.-G., Park, S.H., Oh, M.S., and Kim, S.Y. (2014b). Coriander Leaf Extract Exerts Antioxidant Activity and Protects Against UVB-Induced Photoaging of Skin by Regulation of Procollagen Type I and MMP-1 Expression. *J. Med. Food* *17*, 985–995.

Hwang, E., Park, S.-Y., Sun, Z., Shin, H.-S., Lee, D.-G., and Yi, T.H. (2014c). The Protective Effects of Fucosterol Against Skin Damage in UVB-Irradiated Human Dermal Fibroblasts. *Mar. Biotechnol.* *16*, 361–370.

Hwang, J.S., Hwang, J.S., Chang, I., and Kim, S. (2007). Age-Associated Decrease in Proteasome Content and Activities in Human Dermal Fibroblasts: Restoration of Normal Level of Proteasome Subunits Reduces Aging Markers in Fibroblasts From Elderly Persons. *J. Gerontol. Ser. A* *62*, 490–499.

Ighodaro, O.M., and Akinloye, O.A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex. J. Med.* *54*, 287–293.

Ikehata, H., and Ono, T. (2007). Significance of CpG methylation for solar UV-induced mutagenesis and carcinogenesis in skin. *Photochem. Photobiol.* *83*, 196–204.

Ives, A., Nomura, J., Martinon, F., Roger, T., LeRoy, D., Miner, J.N., Simon, G., Busso, N., and So, A. (2015). Xanthine oxidoreductase regulates macrophage IL1 β secretion upon NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* *6*, 1–11.

Jablonski, N.G., and Chaplin, G. (2013). Epidermal pigmentation in the human lineage is an adaptation to ultraviolet radiation. *J. Hum. Evol.* *65*, 671–675.

Jayakumar, T., Hsieh, C.-Y., Lee, J.-J., and Sheu, J.-R. (2013). Experimental and Clinical Pharmacology of *Andrographis paniculata* and Its Major Bioactive Phytoconstituent Andrographolide. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM 2013*, 846740.

Jia, Q., and Nash, J.F. (2015). Pathology of Aging Skin. In *Textbook of Aging Skin*, M.A. Farage, K.W. Miller, and H.I. Maibach, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–23.

Jonak, C., Mildner, M., Klosner, G., Paulitschke, V., Kunstfeld, R., Pehamberger, H., Tschachler, E., and Trautinger, F. (2011). The hsp27kD heat shock protein and p38-MAPK signaling are required for regular epidermal differentiation. *J. Dermatol. Sci. 61*, 32–37.

Jones, E.M., Cochrane, C.A., and Percival, S.L. (2014). The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms. *Adv. Wound Care 4*, 431–439.

Kadono, S., Manaka, I., Kawashima, M., Kobayashi, T., and Imokawa, G. (2001). The role of the epidermal endothelin cascade in the hyperpigmentation mechanism of lentigo senilis. *J. Invest. Dermatol. 116*, 571–577.

Kammeyer, A., and Luiten, R.M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev. 21*, 16–29.

Kanaki, T., Makrantonaki, E., and Zouboulis, C.C. (2016). Biomarkers of skin aging. *Rev. Endocr. Metab. Disord. 17*, 433–442.

Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol. EJD 12*, 390–399; quiz 400–401.

Kasai, H., Crain, P.F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A., and Tanooka, H. (1986). Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis 7*, 1849–1851.

Keene, D.R., Sakai, L.Y., Lunstrum, G.P., Morris, N.P., and Burgeson, R.E. (1987). Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J. Cell Biol. 104*, 611–621.

Kelley, E.E. (2019). Diminishing Inflammation by Reducing Oxidant Generation: Nitrated Fatty Acid-Mediated Inactivation of Xanthine Oxidoreductase. *Adv. Exp. Med. Biol. 1127*, 59–65.

Khan, I., Khan, F., Farooqui, A., and Ansari, I.A. (2018). Andrographolide Exhibits Anticancer Potential Against Human Colon Cancer Cells by Inducing Cell Cycle Arrest and Programmed Cell Death via Augmentation of Intracellular Reactive Oxygen Species Level. *Nutr. Cancer 70*, 787–803.

Khole, S., Mittal, S., Jagadish, N., Ghosh, D., Gadgil, V., Sinkar, V., and Ghaskadbi, S. (2019). Andrographolide enhances redox status of liver cells by regulating microRNA expression. *Free Radic. Biol. Med. 130*, 397–407.

Kim, S., and Chung, J.H. (2008). Berberine prevents UV-induced MMP-1 and reduction of type I procollagen expression in human dermal fibroblasts. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 15, 749–753.

Kim, E.J., Kim, M.-K., Jin, X.-J., Oh, J.-H., Kim, J.E., and Chung, J.H. (2010). Skin aging and photoaging alter fatty acids composition, including 11,14,17-eicosatrienoic acid, in the epidermis of human skin. *J. Korean Med. Sci.* 25, 980–983.

Kim, J., Lee, C.-W., Kim, E.K., Lee, S.-J., Park, N.-H., Kim, H.-S., Kim, H.-K., Char, K., Jang, Y.P., and Kim, J.-W. (2011a). Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* 137, 427–433.

Kim, J., Lee, C.-W., Kim, E.K., Lee, S.-J., Park, N.-H., Kim, H.-S., Kim, H.-K., Char, K., Jang, Y.P., and Kim, J.-W. (2011b). Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* 137, 427–433.

Kim, M.-S., Kim, Y.K., Cho, K.H., and Chung, J.H. (2006). Infrared exposure induces an angiogenic switch in human skin that is partially mediated by heat. *Br. J. Dermatol.* 155, 1131–1138.

Kim, S., Kim, Y., Kim, J.E., Cho, K.H., and Chung, J.H. (2008). Berberine inhibits TPA-induced MMP-9 and IL-6 expression in normal human keratinocytes. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 15, 340–347.

Kligler, B., Ulbricht, C., Basch, E., Kirkwood, C.D., Abrams, T.R., Miranda, M., Singh Khalsa, K.P., Giles, M., Boon, H., and Woods, J. (2006). *Andrographis paniculata* for the treatment of upper respiratory infection: a systematic review by the natural standard research collaboration. *Explore N. Y. N* 2, 25–29.

Kobayashi, Y. (1997). Langerhans' cells produce type IV collagenase (MMP-9) following epicutaneous stimulation with haptens. *Immunology* 90, 496–501.

Köck, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J.C., and Luger, T.A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J. Exp. Med.* 172, 1609–1614.

Koh, J.S., Kang, H., Choi, S.W., and Kim, H.O. (2002). Cigarette smoking associated with premature facial wrinkling: image analysis of facial skin replicas. *Int. J. Dermatol.* 41, 21–27.

Kohen, R. (1999). Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress--new approaches for their evaluation. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 53, 181–192.

Kohl, E., Steinbauer, J., Landthaler, M., and Szeimies, R.-M. (2011). Skin ageing. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 25, 873–884.

Kolarsick, P.A.J., Kolarsick, M.A., and Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *J. Dermatol. Nurses Assoc.* 3, 203–213.

Kondo, S., Kono, T., Sauder, D.N., and McKenzie, R.C. (1993). IL-8 Gene Expression and Production in Human Keratinocytes and Their Modulation by UVB. *J. Invest. Dermatol.* 101, 690–694.

Kosmadaki, M.G., and Gilchrest, B.A. (2004). The role of telomeres in skin aging/photoaging. *Micron* 35, 155–159.

Kraemer, K.H., Patronas, N.J., Schiffmann, R., Brooks, B.P., Tamura, D., and DiGiovanna, J.J. (2007). Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* 145, 1388–1396.

Krieg, T., Hein, R., Hatamochi, A., and Aumailley, M. (1988). Molecular and clinical aspects of connective tissue. *Eur. J. Clin. Invest.* 18, 105–123.

Kriegenburg, F., Poulsen, E.G., Koch, A., Krüger, E., and Hartmann-Petersen, R. (2011). Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2265–2299.

Krithika, R., Verma, R.J., and Shrivastav, P.S. (2013). Antioxidative and cytoprotective effects of andrographolide against CCl₄-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 530–543.

Krutmann, J., Bouloc, A., Sore, G., Bernard, B.A., and Passeron, T. (2017). The skin aging exposome. *J. Dermatol. Sci.* 85, 152–161.

Kumazaki, T., Kobayashi, M., and Mitsui, Y. (1993). Enhanced Expression of Fibronectin during in Vivo Cellular Aging of Human Vascular Endothelial Cells and Skin Fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 205, 396–402.

Lahmann, C., Bergemann, J., Harrison, G., and Young, A.R. (2001a). Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. *Lancet Lond. Engl.* 357, 935–936.

Lahmann, C., Young, A.R., Wittern, K.-P., and Bergemann, J. (2001b). Induction of mRNA for Matrix Metalloproteinase 1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 in Human Skin in vivo by Solar Simulated Radiation. *Photochem. Photobiol.* 73, 657–663.

Langton, A.K., Sherratt, M.J., Griffiths, C.E.M., and Watson, R.E.B. (2012). Differential expression of elastic fibre components in intrinsically aged skin. *Biogerontology* 13, 37–48.

Lapière, C.M. (1990). The ageing dermis: the main cause for the appearance of “old” skin. *Br. J. Dermatol.* 122 Suppl 35, 5–11.

Lee, D.H., Oh, J.-H., and Chung, J.H. (2016a). Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *J. Dermatol. Sci.* 83, 174–181.

Lee, D.H., Oh, J.-H., and Chung, J.H. (2016b). Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *J. Dermatol. Sci.* *83*, 174–181.

Lee, J.-C., Tseng, C.-K., Young, K.-C., Sun, H.-Y., Wang, S.-W., Chen, W.-C., Lin, C.-K., and Wu, Y.-H. (2014). Andrographolide exerts anti-hepatitis C virus activity by up-regulating haeme oxygenase-1 via the p38 MAPK/Nrf2 pathway in human hepatoma cells. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 237–252.

Lee, Y.-R., Noh, E.-M., Han, J.-H., Kim, J.-M., Hwang, J.-K., Hwang, B.-M., Chung, E.-Y., Kim, B.-S., Lee, S.-H., Lee, S.J., et al. (2012). Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* *674*, 80–86.

Lephart, E.D. (2016). Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res. Rev.* *31*, 36–54.

Leun, J.C.V.D. (2004). The ozone layer. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* *20*, 159–162.

Li, B., Jiang, T., Liu, H., Miao, Z., Fang, D., Zheng, L., and Zhao, J. (2018). Andrographolide protects chondrocytes from oxidative stress injury by activation of the Keap1-Nrf2-Are signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* *234*, 561–571.

Li, M., Vierkötter, A., Schikowski, T., Hüls, A., Ding, A., Matsui, M.S., Deng, B., Ma, C., Ren, A., Zhang, J., et al. (2015). Epidemiological evidence that indoor air pollution from cooking with solid fuels accelerates skin aging in Chinese women. *J. Dermatol. Sci.* *79*, 148–154.

Li, Y., Liu, Y., Xia, W., Lei, D., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2013). Age-dependent alterations of decorin glycosaminoglycans in human skin. *Sci. Rep.* *3*, 2422.

Li, Z., Wu, J., and DeLeo, C.J. (2006). RNA damage and surveillance under oxidative stress. *IUBMB Life* *58*, 581–588.

Liang, E., Liu, X., Du, Z., Yang, R., and Zhao, Y. (2018). Andrographolide Ameliorates Diabetic Cardiomyopathy in Mice by Blockage of Oxidative Damage and NF- κ B-Mediated Inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2018*, 9086747.

Liao, H.-C., Chou, Y.-J., Lin, C.-C., Liu, S.-H., Oswita, A., Huang, Y.-L., Wang, Y.-L., Syu, J.-L., Sun, C.-M., Leu, C.-M., et al. (2019). Andrographolide and its potent derivative exhibit anticancer effects against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells by downregulating the Bcr-Abl oncoprotein. *Biochem. Pharmacol.* *163*, 308–320.

Lieber, M.R. (2010). NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 393–395.

Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., et al. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* *13*, 757–772.

Lim, J.C.W., Chan, T.K., Ng, D.S.W., Sagineedu, S.R., Stanslas, J., and Wong, W.S.F. (2012). Andrographolide and its analogues: versatile bioactive molecules for combating inflammation and cancer. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *39*, 300–310.

Lin, F.L., Wu, S.J., Lee, S.C., and Ng, L.T. (2009). Antioxidant, antioedema and analgesic activities of *Andrographis paniculata* extracts and their active constituent andrographolide. *Phytother. Res. PTR* *23*, 958–964.

Lin, H.-C., Su, S.-L., Lu, C.-Y., Lin, A.-H., Lin, W.-C., Liu, C.-S., Yang, Y.-C., Wang, H.-M., Lii, C.-K., and Chen, H.-W. (2017). Andrographolide inhibits hypoxia-induced HIF-1 α -driven endothelin 1 secretion by activating Nrf2/HO-1 and promoting the expression of prolyl hydroxylases 2/3 in human endothelial cells. *Environ. Toxicol.* *32*, 918–930.

Liu, J., Wang, Z.-T., and Ji, L.-L. (2007). In vivo and in vitro anti-inflammatory activities of neoandrographolide. *Am. J. Chin. Med.* *35*, 317–328.

Liu, Y.-H., Zhang, Z.-B., Zheng, Y.-F., Chen, H.-M., Yu, X.-T., Chen, X.-Y., Zhang, X., Xie, J.-H., Su, Z.-Q., Feng, X.-X., et al. (2015). Gastroprotective effect of andrographolide sodium bisulfite against indomethacin-induced gastric ulceration in rats. *Int. Immunopharmacol.* *26*, 384–391.

Ljungman, M., and Zhang, F. (1996). Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis. *Oncogene* *13*, 823–831.

Longas, M.O., Russell, C.S., and He, X.Y. (1987). Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. *Carbohydr. Res.* *159*, 127–136.

Lu, C.-Y., Yang, Y.-C., Li, C.-C., Liu, K.-L., Lii, C.-K., and Chen, H.-W. (2014). Andrographolide inhibits TNF α -induced ICAM-1 expression via suppression of NADPH oxidase activation and induction of HO-1 and GCLM expression through the PI3K/Akt/Nrf2 and PI3K/Akt/AP-1 pathways in human endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* *91*, 40–50.

Lu, H., Zhang, X., Zhou, Y., Wen, X., and Zhu, L. (2011). Proteomic alterations in mouse kidney induced by andrographolide sodium bisulfite. *Acta Pharmacol. Sin.* *32*, 888–894.

Lu, W.J., Lin, K.H., Hsu, M.J., Chou, D.S., Hsiao, G., and Sheu, J.R. (2012). Suppression of NF- κ B signaling by andrographolide with a novel mechanism in human platelets: Regulatory roles of the p38 MAPK-hydroxyl radical-ERK2 cascade. *Biochem. Pharmacol.* *84*, 914–924.

Luo, S., Li, H., Liu, J., Xie, X., Wan, Z., Wang, Y., Zhao, Z., Wu, X., Li, X., Yang, M., et al. (2020). Andrographolide ameliorates oxidative stress, inflammation and histological outcome in complete Freund's adjuvant-induced arthritis. *Chem. Biol. Interact.* *319*, 108984.

Madav, S., Tripathi, H.C., and Mishra, S.K. (1995). Analgesic, Antipyretic And Antiulcerogenic Effects Of Andrographolide. *Indian J. Pharm. Sci.* *57*, 121.

Madison, K.C. (2003). Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* *121*, 231–241.

Makrantonaki, E., Schönknecht, P., Hossini, A.M., Kaiser, E., Katsouli, M.-M., Adjaye, J., Schröder, J., and Zouboulis, C.C. (2010). Skin and brain age together: The role of hormones in the ageing process. *Exp. Gerontol.* *45*, 801–813.

Mandal, S., Nelson, V.K., Mukhopadhyay, S., Bandhopadhyay, S., Maganti, L., Ghoshal, N., Sen, G., and Biswas, T. (2013). 14-Deoxyandrographolide targets adenylate cyclase and prevents ethanol-induced liver injury through constitutive NOS dependent reduced redox signaling in rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *59*, 236–248.

Manjula, S., Kalaiarasi, C., Pavan, M.S., Hathwar, V.R., and Kumaradhas, P. (2018). Charge density and electrostatic potential of hepatitis C anti-viral agent andrographolide: an experimental and theoretical study. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* *74*, 693–704.

Marks, R. (2004). The stratum corneum barrier: the final frontier. *J. Nutr.* *134*, 2017S-2021S.

Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *424*, 83–95.

Martin, P., and Feng, Y. (2009). Inflammation: Wound healing in zebrafish. *Nature* *459*, 921–923.

Martini, F., Nath, J.L., and Bartholomew, E.F. (2004). *Fundamentals of anatomy & physiology* 6th edition (San Francisco: Benjamin Cummings).

Masaki, H. (2010). Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J. Dermatol. Sci.* *58*, 85–90.

Matsuda, T., Kuroyanagi, M., Sugiyama, S., Umehara, K., Ueno, A., and Nishi, K. (1994). Cell differentiation-inducing diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* *42*, 1216–1225.

Matsumura, Y., and Ananthaswamy, H.N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *195*, 298–308.

Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M.P., Correa, G., Ono, Y., and Goodarzi, H. (2010). Light, including ultraviolet. *J. Autoimmun.* *34*, J247–J257.

Maytin, E.V. (2016). Hyaluronan: More than just a wrinkle filler. *Glycobiology* *26*, 553–559.

McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* *244*, 6049–6055.

McLafferty, E., Hendry, C., and Alistair, F. (2012). The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs. Stand. R. Coll. Nurs. G. B.* *1987* *27*, 35–42.

Medrano, E.E., Yang, F., Boissy, R., Farooqui, J., Shah, V., Matsumoto, K., Nordlund, J.J., and Park, H.Y. (1994). Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte:

repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes. *Mol. Biol. Cell* 5, 497–509.

Meigel, W.N., Gay, S., and Weber, L. (1977). Dermal architecture and collagen type distribution. *Arch. Dermatol. Res.* 259, 1–10.

Menon, G.K. (2002). New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 Suppl 1, S3-17.

Mera, S.L., Lovell, C.R., Jones, R.R., and Davies, J.D. (1987). Elastic fibres in normal and sun-damaged skin: an immunohistochemical study. *Br. J. Dermatol.* 117, 21–27.

Meyer, L.J., and Stern, R. (1994). Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 102, 385–389.

Montagna, W., and Carlisle, K. (1979). Structural changes in aging human skin. *J. Invest. Dermatol.* 73, 47–53.

Morange, M. (2000). Protéines chaperons. *MS Médecine Sci. Rev. Pap.* ISSN 0767-0974 2000 Vol 16 N° 5 P630-4.

Morisaki, N., Moriwaki, S., Sugiyama-Nakagiri, Y., Haketa, K., Takema, Y., and Imokawa, G. (2010). Neprilysin Is Identical to Skin Fibroblast Elastase ITS ROLE IN SKIN AGING AND UV RESPONSES. *J. Biol. Chem.* 285, 39819–39827.

Mostafa, W.Z., and Hegazy, R.A. (2015). Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. *J. Adv. Res.* 6, 793–804.

Mukherjee, P.K., Maity, N., Nema, N.K., and Sarkar, B.K. (2011). Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 19, 64–73.

Mussbacher, M., Salzmann, M., Brostjan, C., Hoesel, B., Schoergenhofer, C., Datler, H., Hohensinner, P., Basílio, J., Petzelbauer, P., Assinger, A., et al. (2019). Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. *Front. Immunol.* 10.

Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69, 562–573.

Naik, R.R., Munipally, P.K., and Nagaraju, T. (2017). Andrographolide reorganise hyperglycaemia and distorted antioxidant profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*

Natarajan, V.T., Ganju, P., Ramkumar, A., Grover, R., and Gokhale, R.S. (2014). Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nat. Chem. Biol.* 10, 542–551.

Nauseef, W.M. (2008). Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.* 283, 16961–16965.

Naylor, E.C., Watson, R.E.B., and Sherratt, M.J. (2011a). Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 69, 249–256.

Naylor, E.C., Watson, R.E.B., and Sherratt, M.J. (2011b). Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 69, 249–256.

Negi, A.S., Kumar, J.K., Luqman, S., Shanker, K., Gupta, M.M., and Khanuja, S.P.S. (2008). Recent advances in plant hepatoprotectives: a chemical and biological profile of some important leads. *Med. Res. Rev.* 28, 746–772.

Ng, S.-F., Rouse, J.J., Sanderson, F.D., Meidan, V., and Eccleston, G.M. (2010). Validation of a Static Franz Diffusion Cell System for In Vitro Permeation Studies. *AAPS PharmSciTech* 11, 1432–1441.

Nichols, J.A., and Katiyar, S.K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* 302, 71–83.

Nicolai, S., Rossi, A., Di Daniele, N., Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., and Raschellà, G. (2015). DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging* 7, 1050–1065.

Nielsen, J.B., Benfeldt, E., and Holmgaard, R. (2016). Penetration through the Skin Barrier. *Curr. Probl. Dermatol.* 49, 103–111.

Noblesse, E., Cenizo, V., Bouez, C., Borel, A., Gleyzal, C., Peyrol, S., Jacob, M.-P., Sommer, P., and Damour, O. (2004). Lysyl Oxidase-Like and Lysyl Oxidase Are Present in the Dermis and Epidermis of a Skin Equivalent and in Human Skin and Are Associated to Elastic Fibers. *J. Invest. Dermatol.* 122, 621–630.

Oh, H.-I., Shim, J.-S., Gwon, S.-H., Kwon, H.-J., and Hwang, J.-K. (2009). The effect of xanthorrhizol on the expression of matrix metalloproteinase-1 and type-I procollagen in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *Phytother. Res. PTR* 23, 1299–1302.

Oh, J.-H., Chung, A.-S., Steinbrenner, H., Sies, H., and Brenneisen, P. (2004). Thioredoxin secreted upon ultraviolet A irradiation modulates activities of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 218–226.

Oh, J.-H., Kim, Y.K., Jung, J.-Y., Shin, J.-E., and Chung, J.H. (2011a). Changes in glycosaminoglycans and related proteoglycans in intrinsically aged human skin in vivo. *Exp. Dermatol.* 20, 454–456.

Oh, J.-H., Kim, Y.K., Jung, J.-Y., Shin, J., Kim, K.H., Cho, K.H., Eun, H.C., and Chung, J.H. (2011b). Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 62, 192–201.

Okhuarobo, A., Falodun, J.E., Erharuyi, O., Imieje, V., Falodun, A., and Langer, P. (2014). Harnessing the medicinal properties of *Andrographis paniculata* for diseases and beyond: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4, 213–222.

Ortonne, J.-P. (2002). Photoprotective properties of skin melanin. *Br. J. Dermatol.* 146, 7–10.

Oyetaikin-White, P., Suggs, A., Koo, B., Matsui, M.S., Yarosh, D., Cooper, K.D., and Baron, E.D. (2015). Does poor sleep quality affect skin ageing? *Clin. Exp. Dermatol.* *40*, 17–22.

Paemanee, A., Hitakarun, A., Wintachai, P., Roytrakul, S., and Smith, D.R. (2019). A proteomic analysis of the anti-dengue virus activity of andrographolide. *Biomed. Pharmacother.* *109*, 322–332.

Pageon, H., Bakala, H., Monnier, V.M., and Asselineau, D. (2007). Collagen glycation triggers the formation of aged skin in vitro. *Eur. J. Dermatol. EJD* *17*, 12–20.

Pan, C.-W., Yang, S.-X., Pan, Z.-Z., Zheng, B., Wang, J.-Z., Lu, G.-R., Xue, Z.-X., and Xu, C.-L. (2017). Andrographolide ameliorates d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver injury by activating Nrf2 signaling pathway. *Oncotarget* *8*, 41202–41210.

Papakonstantinou, E., Roth, M., and Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermatoendocrinol.* *4*, 253–258.

Parichatikanond, W., Suthisisang, C., Dhepakson, P., and Herunsalee, A. (2010). Study of anti-inflammatory activities of the pure compounds from *Andrographis paniculata* (burm.f.) Nees and their effects on gene expression. *Int. Immunopharmacol.* *10*, 1361–1373.

Parisi, A.V., and Turner, J. (2006). Variations in the short wavelength cut-off of the solar UV spectra. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* *5*, 331–335.

Park, J.-E., Pyun, H.-B., Woo, S.W., Jeong, J.-H., and Hwang, J.-K. (2014a). The protective effect of *Kaempferia parviflora* extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* *30*, 237–245.

Park, J.-E., Pyun, H.-B., Woo, S.W., Jeong, J.-H., and Hwang, J.-K. (2014b). The protective effect of *Kaempferia parviflora* extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* *30*, 237–245.

Parks, W.C. (1999). Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* *7*, 423–432.

Pattison, D.I., and Davies, M.J. (2006). Evidence for rapid inter- and intramolecular chlorine transfer reactions of histamine and carnosine chloramines: implications for the prevention of hypochlorous-acid-mediated damage. *Biochemistry* *45*, 8152–8162.

Pedersen, L., and Jemec, G.B.E. (2006). Mechanical Properties and Barrier Function of Healthy Human Skin.

Peng, S., Gao, J., Liu, W., Jiang, C., Yang, X., Sun, Y., Guo, W., and Xu, Q. (2016). Andrographolide ameliorates OVA-induced lung injury in mice by suppressing ROS-mediated NF- κ B signaling and NLRP3 inflammasome activation. *Oncotarget* *7*, 80262–80274.

Petropoulos, I., Conconi, M., Wang, X., Hoemel, B., Brégère, F., Milner, Y., and Friguet, B. (2000). Increase of Oxidatively Modified Protein Is Associated With a Decrease of Proteasome Activity and Content in Aging Epidermal Cells. *J. Gerontol. Ser. A* 55, B220–B227.

Pfeifer, G.P., You, Y.-H., and Besaratinia, A. (2005). Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat. Res.* 571, 19–31.

Pholphana, N., Rangkadilok, N., Thongnest, S., Ruchirawat, S., Ruchirawat, M., and Satayavivad, J. (2004). Determination and variation of three active diterpenoids in *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. *Phytochem. Anal. PCA* 15, 365–371.

Piconi, L., Quagliaro, L., and Ceriello, A. (2003). Oxidative stress in diabetes. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 1144–1149.

Piérard, G.E., Piérard-Franchimont, C., Nizet, J.-L., and Delvenne, P. (2014). Physiological Variations During Aging. In *Textbook of Aging Skin*, M.A. Farage, K.W. Miller, and H.I. Maibach, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–14.

Pillai, S., Oresajo, C., and Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 27, 17–34.

Pineau, A., Guillard, O., Fauconneau, B., Favreau, F., Marty, M.-H., Gaudin, A., Vincent, C.M., Marraud, A., and Marty, J.-P. (2012). In vitro study of percutaneous absorption of aluminum from antiperspirants through human skin in the Franz™ diffusion cell. *J. Inorg. Biochem.* 110, 21–26.

Pittayapruek, P., Meehansan, J., Prapapan, O., Komine, M., and Ohtsuki, M. (2016a). Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

Pittayapruek, P., Meehansan, J., Prapapan, O., Komine, M., and Ohtsuki, M. (2016b). Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

Pokala, N., Alasyam, N., and Rasamal, K. (2019). Evaluation and comparison of antipyretic activity of aqueous leaf extracts of *Vitex negundo* and *Andrographis paniculata* in rabbits. *Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol.* 9, 1.

Prost-Squarcioni, C. (2006). [Histology of skin and hair follicle]. *Med. Sci.* MS 22, 131–137.

Purba, M.B., Kouris-Blazos, A., Wattanapenpaiboon, N., Lukito, W., Rothenberg, E.M., Steen, B.C., and Wahlqvist, M.L. (2001). Skin wrinkling: can food make a difference? *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 71–80.

Puri, A., Saxena, R., Saxena, R.P., Saxena, K.C., Srivastava, V., and Tandon, J.S. (1993). Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *J. Nat. Prod.* 56, 995–999.

Qin, Z., Balimunkwe, R.M., and Quan, T. (2017). Age-related reduction of dermal fibroblast size upregulates multiple matrix metalloproteinases as observed in aged human skin in vivo. *Br. J. Dermatol.* 177, 1337–1348.

Quan, T., and Fisher, G.J. (2015a). Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology* 61, 427–434.

Quan, T., and Fisher, G.J. (2015b). Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review. *Gerontology* 61, 427–434.

Quan, C., Cho, M.K., Perry, D., and Quan, T. (2015). Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging. *J. Biomed. Sci.* 22, 62.

Quan, T., He, T., Kang, S., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2004). Solar Ultraviolet Irradiation Reduces Collagen in Photoaged Human Skin by Blocking Transforming Growth Factor- β Type II Receptor/Smad Signaling. *Am. J. Pathol.* 165, 741–751.

Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2009). Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 14, 20–24.

Quan, T., Shao, Y., He, T., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2010). Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* 130, 415–424.

Quan, T., Little, E., Quan, H., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2013). Elevated Matrix Metalloproteinases and Collagen Fragmentation in Photodamaged Human Skin: Impact of Altered Extracellular Matrix Microenvironment on Dermal Fibroblast Function. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1362–1366.

Rabe, J.H., Mamelak, A.J., McElgunn, P.J.S., Morison, W.L., and Sauder, D.N. (2006). Photoaging: mechanisms and repair. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55, 1–19.

Radhika, P., Annapurna, A., and Rao, S.N. (2012). Immunostimulant, cerebroprotective & nootropic activities of *Andrographis paniculata* leaves extract in normal & type 2 diabetic rats. *Indian J. Med. Res.* 135, 636–641.

Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012). Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non homologues alternative. *Cancer/Radiothérapie* 16, 1–10.

Rattan, S.I.S. (1996). Synthesis, modifications, and turnover of proteins during aging. *Exp. Gerontol.* 31, 33–47.

Reilly, D.M., Ferdinando, D., Johnston, C., Shaw, C., Buchanan, K.D., and Green, M.R. (1997). The epidermal nerve fibre network: characterization of nerve fibres in human skin by confocal microscopy and assessment of racial variations. *Br. J. Dermatol.* 137, 163–170.

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603–1616.

- Rhee, S.G. (2006). H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science* 312, 1882–1883.
- Rhie, G., Shin, M.H., Seo, J.Y., Choi, W.W., Cho, K.H., Kim, K.H., Park, K.C., Eun, H.C., and Chung, J.H. (2001). Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 117, 1212–1217.
- Rinnerthaler, M., Büttner, S., Laun, P., Heeren, G., Felder, T.K., Klinger, H., Weinberger, M., Stolze, K., Grousl, T., Hasek, J., et al. (2012). Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8658–8663.
- Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M.K., Trost, A., and Richter, K. (2015). Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomolecules* 5, 545–589.
- del Río, L.A., Sandalio, L.M., Palma, JoséM., Bueno, P., and Corpas, F.J. (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 557–580.
- Rittié, L., and Fisher, G.J. (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res. Rev.* 1, 705–720.
- Rittié, L., and Fisher, G.J. (2015). Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, a015370.
- Robert, C., Lesty, C., and Robert, A.M. (1988). Ageing of the skin: study of elastic fiber network modifications by computerized image analysis. *Gerontology* 34, 291–296.
- Robert, L., Labat-Robert, J., and Robert, A.-M. (2009). Physiology of skin aging. *Pathol. Biol.* 57, 336–341.
- Rochette, P.J., and Brash, D.E. (2010). Human Telomeres Are Hypersensitive to UV-Induced DNA Damage and Refractory to Repair. *PLoS Genet.* 6.
- Roh, B.H., Kim, D.H., Cho, M.K., Park, Y.L., and Whang, K.U. (2008). Expression of Heat Shock Protein 70 in Human Skin Cells as a Photoprotective Function after UV Exposure. *Ann. Dermatol.* 20, 184–189.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., and Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588–590.
- Roy, D.N., Sen, G., Chowdhury, K.D., and Biswas, T. (2011). Combination therapy with andrographolide and d-penicillamine enhanced therapeutic advantage over monotherapy with d-penicillamine in attenuating fibrogenic response and cell death in the periportal zone of liver in rats during copper toxicosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 250, 54–68.

Ruzicka, T., Simmet, T., Peskar, B.A., and Ring, J. (1986). Skin levels of arachidonic acid-derived inflammatory mediators and histamine in atopic dermatitis and psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *86*, 105–108.

Rzepecki, A.K., Murase, J.E., Juran, R., Fabi, S.G., and McLellan, B.N. (2019). Estrogen-deficient skin: The role of topical therapy. *Int. J. Womens Dermatol.* *5*, 85–90.

Sanyal, D.C., and Maji, N.K. (2001). Thermoregulation through Skin under Variable Atmospheric and Physiological Conditions. *J. Theor. Biol.* *208*, 451–456.

Sárdy, M. (2009). Role of Matrix Metalloproteinases in Skin Ageing. *Connect. Tissue Res.* *50*, 132–138.

Sareer, O., Ahmad, S., and Umar, S. (2014). *Andrographis paniculata*: a critical appraisal of extraction, isolation and quantification of andrographolide and other active constituents. *Nat. Prod. Res.* *28*, 2081–2101.

Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S., Hosokawa, N., and Nagata, K. (1996). Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J. Cell Biol.* *133*, 469–483.

Sator, P.-G., Schmidt, J.B., Sator, M.O., Huber, J.C., and Hönigsmann, H. (2001). The influence of hormone replacement therapy on skin ageing: A pilot study. *Maturitas* *39*, 43–55.

Saxena, S., Jain, D.C., Gupta, M.M., Bhakuni, R.S., Mishra, H.O., and Sharma, R.P. (2000). High-Performance Thin-Layer Chromatographic analysis of hepatoprotective diterpenoids from *Andrographis paniculata*. *Phytochem. Anal.* *11*, 34–36.

Scalbert, A., and Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J. Nutr.* *130*, 2073S–2085S.

Schäfer, M., and Werner, S. (2015). Nrf2—A regulator of keratinocyte redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* *88*, 243–252.

Schäfer, M., Dütsch, S., auf dem Keller, U., and Werner, S. (2010). Nrf2: a central regulator of UV protection in the epidermis. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 2917–2918.

Schallreuter, K.U., and Wood, J.M. (1989). Free radical reduction in the human epidermis. *Free Radic. Biol. Med.* *6*, 519–532.

Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C., and Wlaschek, M. (2000). Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.* *35*, 307–316.

Seluanov, A., Mittelman, D., Pereira-Smith, O.M., Wilson, J.H., and Gorbunova, V. (2004). DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7624–7629.

Seo, J.Y., and Chung, J.H. (2006). Thermal aging: A new concept of skin aging. *J. Dermatol. Sci. Suppl.* 2, S13–S22.

Seo, J.Y., Pyo, E., An, J.-P., Kim, J., Sung, S.H., and Oh, W.K. (2017). Andrographolide Activates Keap1/Nrf2/ARE/HO-1 Pathway in HT22 Cells and Suppresses Microglial Activation by A β 42 through Nrf2-Related Inflammatory Response. *Mediators Inflamm.* 2017, 5906189.

Shah, P., and He, Y.-Y. (2015). Molecular Regulation of UV-Induced DNA Repair. *Photochem. Photobiol.* 91, 254–264.

Sharma, M., and Sharma, R.G. (2013). Identification, purification and quantification of Andrographolide from *Andrographis paniculata* (BURM. F.) NEES by HPTLC at different stages of life cycle of crop. 10.

Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131–E136.

Shay, J.W. (2016). Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discov.* 6, 584–593.

Shay, J.W., and Wright, W.E. (1996). Telomerase activity in human cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 8, 66–71.

Sheeja, K., Shihab, P.K., and Kuttan, G. (2006). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 28, 129–140.

Shen, Y.-C., Chen, C.-F., and Chiou, W.-F. (2002). Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *Br. J. Pharmacol.* 135, 399–406.

Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W., and Packer, L. (1994). Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 102, 122–124.

Shukla, B., Visen, P.K., Patnaik, G.K., and Dhawan, B.N. (1992). Choleric effect of andrographolide in rats and guinea pigs. *Planta Med.* 58, 146–149.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295.

Singh, R.P., Banerjee, S., and Rao, A.R. (2001). Modulatory influence of *Andrographis paniculata* on mouse hepatic and extrahepatic carcinogen metabolizing enzymes and antioxidant status. *Phytother. Res. PTR* 15, 382–390.

Singh, U., Devaraj, S., and Jialal, I. (2005). Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 151–174.

Singha, P.K., Roy, S., and Dey, S. (2007). Protective activity of andrographolide and arabinogalactan proteins from *Andrographis paniculata* Nees. against ethanol-induced toxicity in mice. *J. Ethnopharmacol.* 111, 13–21.

Soroka, Y., Ma'or, Z., Leshem, Y., Verochovsky, L., Neuman, R., Brégégère, F.M., and Milner, Y. (2008). Aged keratinocyte phenotyping: Morphology, biochemical markers and effects of Dead Sea minerals. *Exp. Gerontol.* *43*, 947–957.

Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., and LLeonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res. Rev.* *12*, 376–390.

Srivastava, A., Misra, H., Verma, R.K., and Gupta, M.M. (2004). Chemical fingerprinting of *Andrographis paniculata* using HPLC, HPTLC and densitometry. *Phytochem. Anal.* *15*, 280–285.

Stadtman, E.R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* *257*, 1220–1224.

Stadtman, E.R. (1995). Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability. *Methods Enzymol.* *258*, 379–393.

Starcher, B., and Conrad, M. (1995). A Role for Neutrophil Elastase in the Progression of Solar Elastosis. *Connect. Tissue Res.* *31*, 133–140.

Stingl, G., Tamaki, K., and Katz, S.I. (1980). Origin and Function of Epidermal Langerhans Cells. *Immunol. Rev.* *53*, 149–174.

Südel, K.M., Venzke, K., Mielke, H., Breitenbach, U., Mundt, C., Jaspers, S., Koop, U., Sauer mann, K., Knussman-Hartig, E., Moll, I., et al. (2005). Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract. *Photochem. Photobiol.* *81*, 581–587.

Sulaiman, I., Tan, K., Mohtarrudin, N., Lim, J.C.W., and Stanslas, J. (2018). Andrographolide prevented toluene diisocyanate-induced occupational asthma and aberrant airway E-cadherin distribution via p38 MAPK-dependent Nrf2 induction. *Pulm. Pharmacol. Ther.* *53*, 39–51.

Sun, Z., Hwang, E., Lee, H.J., Lee, T.Y., Song, H.G., Park, S.-Y., Shin, H.-S., Lee, D.-G., and Yi, T.H. (2015). Effects of *Galla chinensis* extracts on UVB-irradiated MMP-1 production in hairless mice. *J. Nat. Med.* *69*, 22–34.

Sundelin, T., Lekander, M., Kecklund, G., Van Someren, E.J.W., Olsson, A., and Axelsson, J. (2013). Cues of fatigue: effects of sleep deprivation on facial appearance. *Sleep* *36*, 1355–1360.

Svobodova, A., Walterova, D., and Vostalova, J. (2006). Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* *150*, 25–38.

Talwar, H.S., Griffiths, C.E.M., Fisher, G.J., Hamilton, T.A., and Voorhees, J.J. (1995). Reduced Type I and Type III Procollagens in Photodamaged Adult Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* *105*, 285–290.

Tamai, Y., Tsuji, M., Wada, K., Nakamura, K., Hayashi, M., Takeda, N., Yasuda, K., and Nagata, C. (2014). Association of cigarette smoking with skin colour in Japanese women. *Tob. Control* *23*, 253–256.

Tan, W.S.D., Peh, H.Y., Liao, W., Pang, C.H., Chan, T.K., Lau, S.H., Chow, V.T., and Wong, W.S.F. (2016). Cigarette Smoke-Induced Lung Disease Predisposes to More Severe Infection with Nontypeable *Haemophilus influenzae*: Protective Effects of Andrographolide. *J. Nat. Prod.* *79*, 1308–1315.

Tan, W.S.D., Liao, W., Zhou, S., and Wong, W.S.F. (2017). Is there a future for andrographolide to be an anti-inflammatory drug? Deciphering its major mechanisms of action. *Biochem. Pharmacol.* *139*, 71–81.

Tan, W.S.D., Liao, W., Peh, H.Y., Vila, M., Dong, J., Shen, H.-M., and Wong, W.S.F. (2018). Andrographolide simultaneously augments Nrf2 antioxidant defense and facilitates autophagic flux blockade in cigarette smoke-exposed human bronchial epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *360*, 120–130.

Tang, C., Gu, G., Wang, B., Deng, X., Zhu, X., Qian, H., and Huang, W. (2014). Design, synthesis, and biological evaluation of andrographolide derivatives as potent hepatoprotective agents. *Chem. Biol. Drug Des.* *83*, 324–333.

Taylor, K.R., and Gallo, R.L. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 9–22.

Terzi, M.Y., Izmirli, M., and Gogebakan, B. (2016). The cell fate: senescence or quiescence. *Mol. Biol. Rep.* *43*, 1213–1220.

Thakur, A.K., Rai, G., Chatterjee, S.S., and Kumar, V. (2016). Beneficial effects of an *Andrographis paniculata* extract and andrographolide on cognitive functions in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm. Biol.* *54*, 1528–1538.

Thangathirupathi, A., Ali, N., Natarajan, P., and Ramesh kumar, D. (2013). Molecular docking studies of andrographolide with xanthine oxidase. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* *6*, 295–297.

Tobiishi, M., Sayo, T., Yoshida, H., Kusaka, A., Kawabata, K., Sugiyama, Y., Ishikawa, O., and Inoue, S. (2011). Changes in epidermal hyaluronan metabolism following UVB irradiation. *J. Dermatol. Sci.* *64*, 31–38.

Tobin, D.J. (2017). Introduction to skin aging. *J. Tissue Viability* *26*, 37–46.

Tommasi, S., Denissenko, M.F., and Pfeifer, G.P. (1997). Sunlight Induces Pyrimidine Dimers Preferentially at 5-Methylcytosine Bases. *Cancer Res.* *57*, 4727–4730.

Trautinger, F., Trautinger, I., Kindas-Mügge, I., Metze, D., and Luger, T.A. (1993). Human keratinocytes in vivo and in vitro constitutively express the 72-kD heat shock protein. *J. Invest. Dermatol.* *101*, 334–338.

Trautinger, F., Kindas-Mügge, I., Dekrout, B., Knobler, R.M., and Metze, D. (1995a). Expression of the 27-kDa heat shock protein in human epidermis and in epidermal neoplasms: an immunohistological study. *Br. J. Dermatol.* *133*, 194–202.

Trautinger, F., Kindås-Mügge, I., Barlan, B., Neuner, P., and Knobler, R.M. (1995b). 72-kD heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet B light. *J. Invest. Dermatol.* *105*, 160–162.

Trenam, C.W., Blake, D.R., and Morris, C.J. (1992). Skin Inflammation: Reactive Oxygen Species and the Role of Iron. *J. Invest. Dermatol.* *99*, 675–682.

Trivedi, N.P., Rawal, U.M., and Patel, B.P. (2007). Hepatoprotective effect of andrographolide against hexachlorocyclohexane-induced oxidative injury. *Integr. Cancer Ther.* *6*, 271–280.

Trojahn, C., Dobos, G., Schario, M., Ludriksone, L., Blume-Peytavi, U., and Kottner, J. (2015). Relation between skin micro-topography, roughness, and skin age. *Skin Res. Technol.* *21*, 69–75.

Tu, Y., and Quan, T. (2016). Oxidative Stress and Human Skin Connective Tissue Aging. *Cosmetics* *3*, 28.

Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* *552*, 335–344.

Tzellos, T.G., Klagas, I., Vahtsevanos, K., Triaridis, S., Printza, A., Kyrgidis, A., Karakiulakis, G., Zouboulis, C.C., and Papakonstantinou, E. (2009). Extrinsic ageing in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. *Exp. Dermatol.* *18*, 1028–1035.

Tzeng, Y.-M., Lee, Y.-C., Cheng, W.-T., Shih, H.-N., Wang, H.-C., Rao, Y.K., and Lee, M.-J. (2012). Effects of andrographolide and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide on cultured primary astrocytes and PC12 cells. *Life Sci.* *90*, 257–266.

Uitto, J. (2008). The role of elastin and collagen in cutaneous aging: intrinsic aging versus photoexposure. *J. Drugs Dermatol.* *JDD* *7*, s12-16.

Varani, J., Warner, R.L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S.H., Kang, S., Chung, J.H., Wang, Z.Q., Datta, S.C., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2000). Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* *114*, 480–486.

Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligel, S.E.G., Kang, S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2006a). Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin. *Am. J. Pathol.* *168*, 1861–1868.

Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligel, S.E.G., Kang, S., Fisher, G.J., and Voorhees, J.J. (2006b). Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am. J. Pathol.* *168*, 1861–1868.

Varga, J., Rosenbloom, J., and Jimenez, S.A. (1987). Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem. J.* *247*, 597–604.

Velarde, M.C., Flynn, J.M., Day, N.U., Melov, S., and Campisi, J. (2012). Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging* *4*, 3–12.

Verbeke, P., Clark, B.F., and Rattan, S.I. (2001). Reduced levels of oxidized and glycosylated proteins in human fibroblasts exposed to repeated mild heat shock during serial passaging in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* *31*, 1593–1602.

Verma, R.P., and Hansch, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg. Med. Chem.* *15*, 2223–2268.

Vermeij, W.P., Alia, A., and Backendorf, C. (2011). ROS Quenching Potential of the Epidermal Cornified Cell Envelope. *J. Invest. Dermatol.* *131*, 1435–1441.

Vidal Magalhães, W., Gouveia Nogueira, M.F., and Kaneko, T.M. (2012). Heat shock proteins (HSP): dermatological implications and perspectives. *Eur. J. Dermatol. EJD* *22*, 8–13.

Vierkötter, A., Schikowski, T., Ranft, U., Sugiri, D., Matsui, M., Krämer, U., and Krutmann, J. (2010). Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 2719–2726.

Voegeli, R., Gierschendorf, J., Summers, B., and Rawlings, A.V. (2019). Facial skin mapping: from single point bio-instrumental evaluation to continuous visualization of skin hydration, barrier function, skin surface pH, and sebum in different ethnic skin types. *Int. J. Cosmet. Sci.* *41*, 411–424.

Wallace, D.C., Brown, M.D., Melov, S., Graham, B., and Lott, M. (1998). Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *BioFactors Oxf. Engl.* *7*, 187–190.

Waller, J.M., and Maibach, H.I. (2006). Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. *Skin Res. Technol.* *12*, 145–154.

Wang, A.S., and Dreesen, O. (2018). Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging. *Front. Genet.* *9*, 247.

Wang, X., and Wu, J. (2019). Modulating effect of fatty acids and sterols on skin aging. *J. Funct. Foods* *57*, 135–140.

Wang, A.S., Ong, P.F., Chojnowski, A., Clavel, C., and Dreesen, O. (2017). Loss of lamin B1 is a biomarker to quantify cellular senescence in photoaged skin. *Sci. Rep.* *7*, 15678.

Wang, W., Guo, W., Li, L., Fu, Z., Liu, W., Gao, J., Shu, Y., Xu, Q., Sun, Y., and Gu, Y. (2016). Andrographolide reversed 5-FU resistance in human colorectal cancer by elevating BAX expression. *Biochem. Pharmacol.* *121*, 8–17.

- Wang, X.-J., Sun, Z., Chen, W., Li, Y., Villeneuve, N.F., and Zhang, D.D. (2008). Activation of Nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1-Cul3 interaction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *230*, 383–389.
- Watson, R.E.B., Gibbs, N.K., Griffiths, C.E.M., and Sherratt, M.J. (2013). Damage to Skin Extracellular Matrix Induced by UV Exposure. *Antioxid. Redox Signal.* *21*, 1063–1077.
- Weiherrmann, A.C., Lorencini, M., Brohem, C.A., and Carvalho, C.M. de (2017). Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int. J. Cosmet. Sci.* *39*, 241–247.
- Wilson, N., McArdle, A., Guerin, D., Tasker, H., Wareing, P., Foster, C.S., Jackson, M.J., and Rhodes, L.E. (2000). Hyperthermia to normal human skin in vivo upregulates heat shock proteins 27, 60, 72i and 90. *J. Cutan. Pathol.* *27*, 176–182.
- Wintachai, P., Kaur, P., Lee, R.C.H., Ramphan, S., Kuadkitkan, A., Wikan, N., Ubol, S., Roytrakul, S., Chu, J.J.H., and Smith, D.R. (2015). Activity of andrographolide against chikungunya virus infection. *Sci. Rep.* *5*, 14179.
- Winyard, P.G., Moody, C.J., and Jacob, C. (2005). Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 453–461.
- Wong, D.P.W., Ng, M.Y., Leung, J.Y., Boh, B.K., Lim, E.C., Tan, S.H., Lim, S., Seah, W.H., Hu, C.Z., Ho, B.C., et al. (2018). Regulation of the NRF2 transcription factor by andrographolide and organic extracts from plant endophytes. *PLoS One* *13*, e0204853.
- Wong, S.Y., Tan, M.G.K., Wong, P.T.H., Herr, D.R., and Lai, M.K.P. (2016). Andrographolide induces Nrf2 and heme oxygenase 1 in astrocytes by activating p38 MAPK and ERK. *J. Neuroinflammation* *13*, 251.
- Wood, L.C., Elias, P.M., Calhoun, C., Tsai, J.C., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (1996). Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J. Invest. Dermatol.* *106*, 397–403.
- Wortmann, F.-J., and Zahn, H. (1994). The Stress/Strain Curve of α -Keratin Fibers and the Structure of the Intermediate Filament. *Text. Res. J.* *64*, 737–743.
- Wu, S., Gao, J., Dinh, Q.T., Chen, C., and Fimmel, S. (2008a). IL-8 production and AP-1 transactivation induced by UVA in human keratinocytes: roles of D-alpha-tocopherol. *Mol. Immunol.* *45*, 2288–2296.
- Wu, T.-S., Chern, H.-J., Damu, A.G., Kuo, P.-C., Su, C.-R., Lee, E.-J., and Teng, C.-M. (2008b). Flavonoids and ent-labdane diterpenoids from *Andrographis paniculata* and their antiplatelet aggregatory and vasorelaxing effects. *J. Asian Nat. Prod. Res.* *10*, 17–24.
- Wu, Y., Nieuwenhoff, M.D., Huygen, F.J.P.M., van der Helm, F.C.T., Niehof, S., and Schouten, A.C. (2017). Characterizing human skin blood flow regulation in response to different local skin temperature perturbations. *Microvasc. Res.* *111*, 96–102.

Xu, L., Xiao, D., Lou, S., Zou, J., Zhu, Y., Fan, H., and Wang, G. (2009). A simple and sensitive HPLC-ESI-MS/MS method for the determination of andrographolide in human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *877*, 502–506.

Xu, Y., Shao, Y., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2006). Oxidative Inhibition of Receptor-type Protein-tyrosine Phosphatase κ by Ultraviolet Irradiation Activates Epidermal Growth Factor Receptor in Human Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* *281*, 27389–27397.

Yakes, F.M., and Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 514–519.

Yan, G.-R., Zhou, H.-H., Wang, Y., Zhong, Y., Tan, Z.-L., Wang, Y., and He, Q.-Y. (2013). Protective effects of andrographolide analogue AL-1 on ROS-induced RIN-m β cell death by inducing ROS generation. *PLoS One* *8*, e63656.

Yan, H., Li, Y., Yang, Y., Zhang, Z., Zhang, G., Sun, Y., Yu, P., Wang, Y., and Xu, L. (2016). Protective effects of andrographolide derivative AL-1 on high glucose-induced oxidative stress in RIN-m cells. *Curr. Pharm. Des.* *22*, 499–505.

Yan, H., Huang, Z., Bai, Q., Sheng, Y., Hao, Z., Wang, Z., and Ji, L. (2018). Natural product andrographolide alleviated APAP-induced liver fibrosis by activating Nrf2 antioxidant pathway. *Toxicology* *396–397*, 1–12.

Yanagisawa, H., Davis, E.C., Starcher, B.C., Ouchi, T., Yanagisawa, M., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2002). Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* *415*, 168.

Yang, G., Zhang, C., Liu, X., Qian, G., and Deng, D. (2013a). Effects of cigarette smoke extracts on the growth and senescence of skin fibroblasts in vitro. *Int. J. Biol. Sci.* *9*, 613–623.

Yang, M.-Y., Yu, Q.-L., Huang, Y.-S., and Yang, G. (2019). Neuroprotective effects of andrographolide derivative CX-10 in transient focal ischemia in rat: Involvement of Nrf2/AE and TLR/NF- κ B signaling. *Pharmacol. Res.* *144*, 227–234.

Yang, N., Liu, Y.-Y., Pan, C.-S., Sun, K., Wei, X.-H., Mao, X.-W., Lin, F., Li, X.-J., Fan, J.-Y., and Han, J.-Y. (2014). Pretreatment with andrographolide pills[®] attenuates lipopolysaccharide-induced pulmonary microcirculatory disturbance and acute lung injury in rats. *Microcirc. N. Y.* *N 1994 21*, 703–716.

Yang, T., Sheng, H.-H., Feng, N.-P., Wei, H., Wang, Z.-T., and Wang, C.-H. (2013b). Preparation of andrographolide-loaded solid lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo evaluations: characteristics, release, absorption, transports, pharmacokinetics, and antiatherosclerotic activity. *J. Pharm. Sci.* *102*, 4414–4425.

Yasaka, N., Furue, M., and Tamaki, K. (1995). CD44 Expression in Normal Human Skin and Skin Tumors. *J. Dermatol.* *22*, 88–94.

Yasui, T., Yonetsu, M., Tanaka, R., Tanaka, Y., Fukushima, S., Yamashita, T., Ogura, Y., Hirao, T., Murota, H., and Araki, T. (2013). In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen-sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser. *J. Biomed. Opt.* *18*, 31108.

Yen, T.-L., Chen, R.-J., Jayakumar, T., Lu, W.-J., Hsieh, C.-Y., Hsu, M.-J., Yang, C.-H., Chang, C.-C., Lin, Y.-K., Lin, K.-H., et al. (2016). Andrographolide stimulates p38 mitogen-activated protein kinase-nuclear factor erythroid-2-related factor 2-heme oxygenase 1 signaling in primary cerebral endothelial cells for definite protection against ischemic stroke in rats. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* *170*, 57–72.

Yengi, L.G., Xiang, Q., Pan, J., Scatina, J., Kao, J., Ball, S.E., Fruncillo, R., Ferron, G., and Roland Wolf, C. (2003). Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Anal. Biochem.* *316*, 103–110.

Yokose, U., Hachiya, A., Sriwiriyanont, P., Fujimura, T., Visscher, M.O., Kitzmiller, W.J., Bello, A., Tsuboi, R., Kitahara, T., Kobinger, G.P., et al. (2012). The endogenous protease inhibitor TIMP-1 mediates protection and recovery from cutaneous photodamage. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 2800–2809.

Youn, U.J., Nam, K.-W., Kim, H.-S., Choi, G., Jeong, W.S., Lee, M.Y., and Chae, S. (2011). 3-Deoxysappanchalcone inhibits tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression in human keratinocytes through activated protein-1 inhibition and nuclear factor-kappa B DNA binding activity. *Biol. Pharm. Bull.* *34*, 890–893.

Young, A.R. (1997). Chromophores in human skin. *Phys. Med. Biol.* *42*, 789–802.

Yu, A.-L., Lu, C.-Y., Wang, T.-S., Tsai, C.-W., Liu, K.-L., Cheng, Y.-P., Chang, H.C., Lii, C.-K., and Chen, H.-W. (2010). Induction of heme oxygenase 1 and inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule expression by andrographolide in EA.hy926 cells. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 7641–7648.

Yuan, M., Meng, W., Liao, W., and Lian, S. (2018). Andrographolide Antagonizes TNF- α -Induced IL-8 via Inhibition of NADPH Oxidase/ROS/NF- κ B and Src/MAPKs/AP-1 Axis in Human Colorectal Cancer HCT116 Cells. *J. Agric. Food Chem.* *66*, 5139–5148.

Yun, M.-S., Kim, C., and Hwang, J.-K. (2019). *Agastache rugosa* Kuntze Attenuates UVB-Induced Photoaging in Hairless Mice through the Regulation of MAPK/AP-1 and TGF- β /Smad Pathways. *J. Microbiol. Biotechnol.* *29*, 1349–1360.

Zhan, J.Y.-X., Wang, X.-F., Liu, Y.-H., Zhang, Z.-B., Wang, L., Chen, J.-N., Huang, S., Zeng, H.-F., and Lai, X.-P. (2016). Andrographolide Sodium Bisulfate Prevents UV-Induced Skin Photoaging through Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation. *Mediators Inflamm.* *2016*, 3271451.

Zhang, D.D., and Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8137–8151.

Zhang, B., Yan, L., Zhou, P., Dong, Z., Feng, S., Liu, K., and Gong, Z. (2013). CHP1002, a novel andrographolide derivative, inhibits pro-inflammatory inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expressions in RAW264.7 macrophages via up-regulation of heme oxygenase-1 expression. *Int. Immunopharmacol.* *15*, 289–295.

Zhao, Y., Kao, C.-P., Wu, K.-C., Liao, C.-R., Ho, Y.-L., and Chang, Y.-S. (2014). Chemical compositions, chromatographic fingerprints and antioxidant activities of *Andrographis Herba*. *Mol. Basel Switz.* *19*, 18332–18350.

Ziboh, V.A., Miller, C.C., and Cho, Y. (2000). Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites. *Am. J. Clin. Nutr.* *71*, 361S–6S.

Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., and Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol. Lett.* *4*, 1247–1253.

Zouboulis, C.C. (2004). The human skin as a hormone target and an endocrine gland. *Horm. Athens Greece* *3*, 9–26.

Zouboulis, C.C., and Makrantonaki, E. (2011). Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clin. Dermatol.* *29*, 3–14.

Eugénie MUSSARD

***Andrographis paniculata* et ses diterpènes contre le stress oxydant et l'inflammation dans le vieillissement cutané**

Résumé :

Avec l'âge et l'exposition à des facteurs environnementaux tels que les rayons solaires, la peau subit une usure naturelle. Elle se caractérise par l'apparition de rides, d'une perte d'élasticité, d'un relâchement et d'un aspect rugueux. Ce projet vise à explorer de nouveaux agents actifs anti-âges issus de la plante *Andrographis paniculata* (AP). AP est une plante médicinale utilisée en Asie pour traiter les infections respiratoires et diverses maladies inflammatoires. Cette plante est riche en diterpènes labdanes, dont son principal agent bioactif est l'andrographolide. Un extrait méthanolique des feuilles d'AP, l'andrographolide, la neoandrographolide, la 14-deoxyandrographolide et la 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide ont été utilisés dans une culture primaire de fibroblastes dermiques (HDFa) et une lignée cellulaire de kératinocytes (HaCaT). Pour l'étude du stress oxydant, ces cellules traitées dans des conditions pro-oxydantes ont révélé l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique et de la 14-deoxyandrographolide. Dans des conditions pro-inflammatoires, l'expression du *TNF-α* a été diminuée par l'andrographolide et par l'extrait méthanolique dans les HDFa et par l'extrait méthanolique dans les HaCaT. L'andrographolide et l'extrait méthanolique ont également diminué la sécrétion d'IL-6 dans la HDFa dans des conditions inflammatoires. Enfin, la 14-désoxyandrographolide a réduit la production de procollagène de type I dans les HDFa. Nos données confirment leur potentiel régénérateur contre les dommages cutanés causés par le stress oxydant et l'inflammation. D'autres recherches sont nécessaires afin d'explorer ses voies.

Mots clés : Cosmétique, Vieillissement cutané, *Andrographis paniculata*, Andrographolide, Stress oxydant, Inflammation

***Andrographis paniculata* and its diterpenes against oxidative stress and inflammation in skin aging**

Summary:

With age and exposure to environmental factors such as sunlight, the skin suffers natural wear and tear. It is characterized by development of wrinkles, loss of elasticity, laxity, and rough-textured appearance. The present project aims to explore new anti-aging active agents from *Andrographis paniculata* (AP) plant. AP is a medicinal plant used in Asia to treat respiratory infections and various inflammatory diseases. It is enriched in labdane diterpenes, including andrographolide, as its main bioactive agent. A methanolic extract from AP leaves, andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxyandrographolide, and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide were used in a primary culture of dermal fibroblasts (HDFa) and a keratinocyte cell line (HaCaT). For the oxidative stress study, HDFa and HaCaT treated under pro-oxidant conditions revealed the antioxidant activity of methanolic extract and 14-deoxyandrographolide. Under pro-inflammatory conditions, *TNF-α* expression was decreased in HDFa with andrographolide and methanolic extract, and in HaCaT with methanolic extract only. Andrographolide and methanolic extract also decreased IL-6 secretion in HDFa under inflammatory conditions. Finally, 14-deoxyandrographolide reduced the production of type I procollagen in HDFa. Our data confirm the AP potential skin damage regeneration induced by oxidative stress and inflammation. Further research is required to explore its pathways.

Keywords: Cosmetic, Skin aging, *Andrographis paniculata*, Andrographolide, Oxidative stress, Inflammation

Laboratoire I3MTO, Université d'Orléans

