

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire (CBM, UPR 4301)
Equipe Biologie Cellulaire, Cibles Moléculaires et Thérapies Innovantes

THÈSE présentée par : **Elodie HENRIET**

soutenue le : **24 Juin 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Criblage bioluminescent microARN spécifique d'une
bibliothèque d'extraits naturels de plantes pour des
applications dans le remodelage cutané**

THÈSE dirigée par :
Patrick BARIL

Maître de Conférences, Univ. Orléans

RAPPORTEURS :
Jérôme LAMARTINE
Michel SIMON

Professeur, Univ. Claude Bernard, Lyon 1
Directeur de Recherche, INSERM, Toulouse

JURY :

Jérôme LAMARTINE
Michel SIMON
Emilie DESTANDAU
Iuliana POPA
Catherine GRILLON
Patrick BARIL

Professeur, Univ. Claude Bernard, Lyon 1
Directeur de Recherche, INSERM, Toulouse
Professeur, Univ. Orléans, Présidente du jury
Maître de Conférences, Univ. Paris Saclay, Examinatrice
Chargée de Recherche, CNRS, Orléans, Examinatrice
Maître de Conférences, Univ. Orléans, Directeur de thèse

Remerciements

« Soyons reconnaissants envers les gens qui nous rendent heureux.

Ils sont les jardiniers qui font fleurir notre âme »

Marcel Proust.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance au Pr. Chantal Pichon et au Dr. Patrick Baril pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, le Dr. Patrick Baril, pour m'avoir donné l'opportunité et la chance de réaliser mon doctorat. Je le remercie pour le soutien, la confiance et l'indépendance qu'il m'a accordés tout au long de ces trois années. Ses conseils avisés et ses critiques constructives m'ont fait progresser.

Je remercie Cosmétosciences et la région Centre-Val de Loire pour avoir financé mon doctorat. Je remercie le Dr. Emmanuelle Percheron (Directrice opérationnelle du Programme ARD 2020 Cosmétosciences) pour son soutien et sa sympathie.

J'adresse mes remerciements et ma gratitude au Pr. Jérôme Lamartine et au Dr. Michel Simon pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie chaleureusement le Pr. Emilie Destandau pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie sincèrement les Dr. Catherine Grillon et Iuliana Popa pour leur présence en qualité d'examinatrices au sein de mon jury.

Je remercie chaleureusement tous les partenaires académiques et industriels du Consortium ValBioCosm pour les discussions enrichissantes et constructives lors nos réunions : Sophie Bresch (Directrice, CDHR Centre-Val de Loire), Dr. Patrice André (Président, Botanicosm'ethic), Dr. Jean-Christophe Choulot (Directeur R&D, Caudalie), Dr. Alex Saunois (Directeur R&D et Technique, Sederma), Pr. Benoît Maunit (Institut de Chimie Organique et Analytique ICOA, Université d'Orléans), Pr. Emilie Destandau (Institut de Chimie Organique et Analytique ICOA, Université d'Orléans), Pr. Nathalie Guivarc'h (Laboratoire des Biomolécules et Biotechnologies Végétales BBV, Université de Tours), Dr. Christophe Hano

(Laboratoire de Biologie des Ligneux et Grandes Culture LBLGC, Université d'Orléans) et Dr. David Da Silva (Institut de Chimie Organique et Analytique ICOA, Université d'Orléans).

J'adresse mes remerciements au Pr. Emilie Destandau et à Souhila Messaili de l'équipe Stratégies Analytiques, Affinités et Bioactifs de l'Institut ICOA d'Orléans pour les échanges constants durant mon doctorat et leur participation active dans le projet.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe Thérapies innovantes et nanomédecine pour leur aide, conseils et bonne humeur : Dr. Patrick Midoux, Dr. Cristine Gonçalves, Dr. Anthony Delalande, Dr. Federico Perche, Dr. Jean-Marc Malinge, Dr. Philippe Germain, Virginie Malard, Alexia Perrin, Laëtitia Cobret, Delphine Maze, Amandine Suet et, en particulier, Yoan Laurent, mon binôme de la « Team RILES ».

Je remercie Rudy Cléménçon et Cyril Gimpied pour leur humour, bienveillance et aide durant mon expérimentation animale.

Je remercie David Gosset, responsable de la plateforme P@CIFIC du CBM, pour son aide en cytométrie en flux et en microscopie.

Je remercie les Dr. Martine Cadène et Guillaume Gabant, respectivement responsable scientifique et responsable technique de la plateforme de spectrométrie de masse et de protéomique du CBM, pour nos discussions intéressantes au sujet de l'analyse du sécrétome des cellules HaCaT.

Je remercie toute l'équipe du Centre d'Imagerie du Petit Animal (CIPA-TAAM-UPS 44, CNRS, Orléans), en particulier le Dr. Stéphanie Lerondel, Maryline Le Mee, Stéphanie Rétif et Julien Sobilo, pour m'avoir permis d'accéder à leur laboratoire et aider pendant mes acquisitions de bioluminescence avec l'IVIS.

Je remercie mes collègues et amis doctorants Caroline Girardin, Vinni Vijayarangan, Christophe Delehedde, Pinpin Wang, Fatma Elleuch, Geoffrey Casas, Chayma El Khamlichi, Nadira Chettouh, Valentin Beauvais, Skander Abboud, Julien Cros, Mohammed Bergoud,

Anton Kovalenko, Keyron Hickman-Lewis, Thao Nhi Le, Laurine Garros et Souhila Messaili pour tous les bons moments passés ensemble. Une mention spéciale pour Florence Abdallah (maintenant Dr.) pour notre belle complicité. Mon doctorat n'aurait pas été le même sans toi.

Je remercie les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer pendant mon doctorat : Aziz Smira, Quentin Mura et Hanadi Nahas (qui a maintenant intégré l'équipe 😊).

Je remercie Marie-Christine Perdereau pour sa gentillesse et son aide administrative.

Je remercie Christine Gabant, Anne Braconnier, Justine Corret, Jean-Baptiste Madinier, Justo Torres et Martial Bruno pour leur bienveillance, leurs encouragements et leur soutien.

Je remercie tous mes amis de France et d'ailleurs pour leur soutien distanciel ; loin des yeux mais toujours près du cœur.

Enfin je remercie infiniment ma famille, et tout particulièrement ma Maman et Ziad, l'homme de ma vie, pour leur soutien sans faille. Je leur témoigne ici tout mon amour.

Avant propos

Depuis la découverte du premier microARN chez le nématode *C.elegans* en 1993, les connaissances fondamentales sur la biogenèse, les mécanismes d'action et les rôles biologiques des microARNs n'ont cessé de progresser et continuent encore de s'enrichir. Plusieurs études ont permis de révéler la complexité de leur mode de régulation d'expression génique. Ces petits ARN intracellulaires longs de 22 nt sont capables d'induire l'extinction post-transcriptionnelle de gènes en s'hybridant par complémentarité de séquence à la région 3'-UTR des ARNm, provoquant l'arrêt de la traduction et/ou leur dégradation. Nous savons maintenant que plus de 2 600 microARNs contrôlent 60 % des gènes humains impliqués dans de grandes fonctions biologiques telles que le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire. En 2009, David P Bartel, un des pionniers de la découverte des microARNs cite « *it may prove difficult to find a biological function or process that is not influenced at least to some degree, in some cell type, by miRNAs* ». Il est, par conséquent, peu surprenant de constater que des défauts d'expression des microARNs soient systématiquement associés aux pathologies et, que la restauration de leur profil d'expression par des approches de thérapie génique soit suffisante pour corriger voire traiter ces pathologies. Les microARNs font donc partie des nouvelles classes thérapeutiques émergentes. Du fait de leur mode de régulation multi-cibles, ils peuvent être exploités comme outils de criblage pour la recherche de nouvelles structures bioactives capables de restaurer le phénotype altéré des cellules ou des tissus ciblés.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux de doctorat. Il est maintenant parfaitement établi que les microARNs contrôlent plusieurs voies de signalisation intracellulaire impliquées dans des fonctions biologiques adaptées et ciblées. Le microARN-34 en est une parfaite illustration. Il régule plus de 30 transcrits différents, impliqués dans le système de réparation de l'ADN en régulant p53, les réponses inflammatoires en régulant STAT3 ou encore l'apoptose en régulant l'axe PDL-1/Akt. De la même façon, le microARN-122 possède plus de 18 cibles transcriptomiques différentes, qui sont indispensables à un grand nombre de fonctions hépatiques, aussi diverses que variées telles que le métabolisme glucidique, les défenses antivirales ou encore la fibrose hépatique. Par conséquent, en développant une stratégie de criblage de composés bioactifs avec un microARN comme cible

biologique, il est possible, en théorie, d'identifier des composés avec un spectre d'action biologique plus large que ceux sélectionnés par des approches de criblage mettant en jeu une cible biologique jouant une unique fonction dans une voie de signalisation intracellulaire.

Un des challenges dans le domaine de la biologie des microARNs est de réussir à quantifier le profil d'expression de ces ARN non codants du fait de leur taille, leur faible abondance dans les cellules et leur mode de régulation génique, complexe, dynamique et finement orchestré au cours du temps et de l'espace. Un autre challenge de taille est de pouvoir discriminer la proportion des microARNs fonctionnels, c'est-à-dire ceux qui sont intégrés dans le complexe d'interférence à l'ARN, RISC, de ceux qui sont stockés dans des compartiments intracellulaires exempts de fonction d'interférence à l'ARN, comme les P-bodies, par exemple. Plusieurs études ont montré que seuls 60 % du miRNome des cellules possèdent une activité de répression post-transcriptionnelle des gènes. Pour pallier en partie à ces verrous, l'équipe dirigée par le Dr. Patrick Baril du laboratoire d'accueil a développé un système rapporteur bioluminescent appelé RILES pour « *RNAi-Inducible Luciferase Expression system* ». Il repose sur l'ingénierie moléculaire d'un système d'expression inductible similaire au système Tet ON/OFF. Cette sonde moléculaire a été conçue de telle façon que la configuration ON/OFF de l'opéron inductible soit directement placée sous contrôle d'un microRNA d'intérêt, générant ainsi des signatures optiques « positives » de l'expression fonctionnelle du microARN. Le laboratoire a montré que les données générées par le système RILES sont plus pertinentes que celles collectées par les méthodes de détection classiques (RT-qPCR par exemple). Ces méthodes conventionnelles tiennent difficilement compte de la dimension de régulation temporelle et individuelle des microARNs et, de ce fait, conduisent à des erreurs d'interprétations. Au vu des propriétés spécifiques du système RILES, l'équipe a émis l'hypothèse qu'il pouvait être utilisé comme sonde de criblage de libraires d'extraits de plantes pour identifier de nouveaux régulateurs de l'expression génique des microARNs.

La mise en place d'une telle stratégie de criblage méritait d'être évaluée dans un domaine d'application défini. L'enjeu s'est porté sur une des activités majeures en région Centre-Val de Loire : la recherche dans le secteur de la cosmétique. La région Centre-Val de

Loire est en effet le berceau de la cosmétique en France. Elle est aussi un pilier du pôle de compétitivité de la parfumerie-cosmétique dans l'hexagone, notamment grâce à l'implantation sur son territoire de sociétés cosmétiques de renom et de rayonnement international telles que LVMH, Shiseido, Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, Sederma, Caudalie, ou encore Solabia. Cette dynamique industrielle est soutenue par des collaborations et des partenariats scientifiques avec les laboratoires académiques de la région Centre-Val de Loire par l'intermédiaire de programmes de recherche portés par l'Université d'Orléans, la région Centre-Val de Loire et la Cosmetic Valley. Ce doctorat s'inscrit directement dans cet effort de partenariat entre la recherche académique et industrielle. Il s'intègre dans un projet collaboratif soutenu financièrement par le programme ARD « Ambition Recherche et Développement 2020 » piloté par le programme Cosmétosciences de l'Université d'Orléans et financé par la région Centre-Val de Loire et les programmes européens FEDER.

Ce projet appelé Valbiocosm, clôturé en décembre 2020 et coordonné par le Dr. Patrick Baril et le Pr. Benoît Maunit (Université Orléans, ICOA), a porté sur deux innovations principales. La première innovation a reposé sur l'optimisation des procédés de production de la biomasse végétale en région Centre-Val de Loire dans le but d'orienter le métabolisme des plantes vers la synthèse de métabolites à forte valeur ajoutée tant au niveau qualitatif que quantitatif. La deuxième innovation a concerné la mise en place de la plateforme de criblage microARN spécifique pour identifier des molécules bioactives d'intérêt aussi bien fondamental qu'appliqué dans le secteur de la cosmétique.

Ce projet s'est articulé autour d'un consortium réunissant quatre laboratoires académiques et quatre laboratoires industriels (Sederma, Caudalie, CDHRC-réseau Astredhor, Botanicosm'Ethic). Chaque laboratoire industriel représente un des segments de la filière cosmétique. Quant aux laboratoires académiques, ils bénéficient d'expertises dans les procédés de *sourcing* végétal (Laboratoire LBLGC, INRA USC1328, Chartres et Laboratoire BBV, EA2106, Tours), les méthodes d'éco-extraction et de caractérisation phytochimique (Laboratoire ICOA, UMR7311, Orléans) et les méthodes de criblage et de caractérisation biologique d'actifs cosmétiques et potentiellement pharmaceutiques (Laboratoire CBM, UPR 4301, Orléans).

J'ai été recrutée en tant que doctorante dans ce programme scientifique du consortium Valbiocosm, au sein du laboratoire CBM, UPR 4301 d'Orléans, sous la direction du Dr. Patrick Baril.

Mes objectifs principaux ont été de :

- 1) Mettre en place la plateforme de criblage microARN spécifique basée sur la sonde RILES.
- 2) Cribler la librairie d'extraits naturels de plantes fournie par le consortium Valbiocosm.
- 3) Identifier un actif d'intérêt fondamental en biologie cutanée et, potentiellement, valorisable par les industriels du secteur de la cosmétique rattachés au projet.

Les travaux que j'ai réalisés sont présentés en détail dans ce manuscrit de thèse. Ils reflètent un travail de longue haleine de trois années passées à la paillasse et d'études bibliographiques conséquentes. Un des faits marquants des travaux que j'ai effectué a été la caractérisation fonctionnelle et mécanistique de l'extrait de graines de Chardon-Marie (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) dans les kératinocytes humains. Cet extrait m'a permis d'attribuer à cette plante de nouvelles propriétés biologiques dans la prolifération, la différenciation et la synthèse des lipides par les kératinocytes pour des applications thérapeutiques, dans la prise en charge du psoriasis.

J'espère que vous prendrez plaisir à lire ce manuscrit et que vous trouverez des points d'intérêts dans vos domaines d'expertise respectifs.

En vous remerciant, à nouveau, pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et en vous souhaitant une bonne lecture.

Elodie HENRIET

Table des matières

1	Introduction.....	23
1.1	La peau	23
1.1.1	Les fonctions de la peau	23
1.1.2	La structure de la peau	23
1.1.2.1	L'épiderme.....	26
1.1.2.1.1	La couche basale (<i>stratum basale</i>)	29
1.1.2.1.2	La couche épineuse (<i>stratum spinosum</i>).....	30
1.1.2.1.3	La couche granuleuse (<i>stratum granulosum</i>).....	31
1.1.2.1.4	La zone de transition (<i>stratum lucidum</i>)	31
1.1.2.1.5	La couche cornée (<i>stratum corneum</i>)	32
1.1.2.2	Le derme.....	35
1.2	Les microARNs dans la peau.....	38
1.2.1	La localisation génomique et biogenèse des microARNs	38
1.2.2	Le mécanisme d'interaction moléculaire entre les microARNs et leurs cibles transcriptomiques	48
1.2.3	Les différents modes d'action des microARNs	50
1.2.4	L'importance des microARNs dans la peau	55
1.2.4.1	Dans la morphogenèse et l'homéostasie cutanée	55
1.2.4.2	Dans la cicatrisation cutanée.....	66
1.2.4.2.1	La phase vasculaire et inflammatoire	67
1.2.4.2.2	La phase de prolifération	72
1.2.4.2.3	La phase de remodelage	79
1.2.4.3	Dans le développement des pathologies cutanées.....	80
1.2.4.3.1	Les plaies chroniques	80
1.2.4.3.2	Le psoriasis	82
1.2.4.3.3	La sclérodermie systémique.....	86
1.3	Les plantes, sources de composés bioactifs d'intérêt pharmacologique et scientifique.....	88
1.3.1	La phytothérapie au travers les siècles	88
1.3.2	Les avantages des plantes dans le développement de produits bioactifs	92
1.3.3	Le processus d'identification de nouvelles molécules bioactives	98
1.3.3.1	La sélection du matériel végétal.....	98
1.3.3.1.1	L'approche ethnopharmacologique	98

1.3.3.1.2	L'approche écologique	100
1.3.3.1.3	L'approche chimiotaxonomique	101
1.3.3.1.4	L'approche systématique	101
1.3.3.1.5	L'approche bio-informatique	102
1.3.4	Les stratégies de criblage des banques de composés naturels et synthétiques.....	104
1.3.4.1	Les criblages basés sur des tests biochimiques.....	106
1.3.4.2	Les criblages basés sur des tests cellulaires	110
1.3.5	Les criblages cellulaires spécifiques basés sur l'expression des microARNs.....	113
1.3.5.1	Les stratégies de criblage cellulaire de banques d'extraits naturels de plantes.....	117
1.3.5.1.1	Les stratégies de criblage utilisant des gènes rapporteurs	119
1.3.5.1.2	Les stratégies de criblage utilisant des sondes fluorescentes.....	122
2	Projet de thèse	124
3	Matériels et méthodes	127
3.1	Culture cellulaire	127
3.2	Mise en place de la plateforme de criblage	128
3.2.1	Construction moléculaire de la sonde de criblage bioluminescente pRILES/21.5pT ..	128
3.2.2	Transformation bactérienne et maxi-préparation d'ADN plasmidique	129
3.2.3	Validation fonctionnelle du plasmide d'expression pRILES/21.5pT	130
3.2.3.1	Test de spécificité et de sensibilité.....	130
3.2.3.1.1	Transfection des cellules HaCaT avec des microARNs mimiques et inhibiteurs synthétiques	130
3.2.3.1.2	Traitement des cellules HaCaT par le TGF- β 1	131
3.2.3.1.3	Mesure de l'activité de la luciférase	132
3.2.3.2	Quantification des microARNs par RT-qPCR	133
3.3	Criblage bioluminescent de la librairie d'extraits de plantes ValBioCosm.....	134
3.3.1	Présentation générale de la stratégie de criblage.....	134
3.3.2	Optimisation des conditions expérimentales du criblage cellulaire	136
3.3.3	Criblage à petit débit de la librairie ValBioCosm	137
3.3.3.1	Présentation de la librairie ValBioCosm	137
3.3.3.2	Test de viabilité cellulaire	139
3.3.3.3	Criblage cellulaire avec des microplaques de 96 puits.....	140
3.3.3.3.1	Crible primaire avec l'imageur optique IVIS® Lumina II	140
3.3.3.3.2	Crible secondaire avec le luminomètre à microplaques Mithras	140
3.4	Validation des « touches »	141

3.4.1	Normalisation de l'activité de la luciférase en quantité de protéines	141
3.4.2	Analyse transcriptomique des cibles moléculaires du microARN-21-5p	141
3.4.3	Immunoprécipitation des microARNs fonctionnels par capture de la protéine Ago2	143
3.4.4	Détermination du mode de régulation génique du microARN-21-5p en réponse aux extraits de plantes	145
3.5	Analyse transcriptomique à haut débit RNA-seq	146
3.5.1	Présentation générale	146
3.5.2	Préparation des échantillons.....	147
3.5.3	Préparation des bibliothèques d'ADNc db à partir des ARN totaux.....	148
3.5.4	Amplification clonale sur la flow cell	151
3.5.5	Séquençage des bibliothèques par synthèse	153
3.6	Analyse bioinformatique des données brutes du RNA-seq	156
3.6.1	Des données brutes de séquençage à haut débit à l'analyse de l'expression différentielle	156
3.6.2	De l'analyse d'expression différentielle aux analyses d'enrichissement d'annotations	157
3.6.2.1	Analyse sur R	158
3.6.2.2	Analyse sous DAVID et GSEA	161
3.7	Etudes mécanistiques et fonctionnelles.....	163
3.7.1	Immunodosage de la cytokine pro-inflammatoire IL-6	163
3.7.2	Western blot.....	164
3.7.2.1	Préparation des échantillons protéiques	164
3.7.2.2	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert sur membrane de PVDF....	164
3.7.2.3	Immunodétection des protéines	164
3.7.3	Evaluation du stress oxydant.....	165
3.7.4	Etude de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription NF- κ B	166
3.7.5	Test de migration cellulaire.....	167
3.7.6	Dosage des collagènes.....	168
3.7.7	Analyse du cycle cellulaire.....	168
3.7.8	Test d'apoptose	170
3.7.9	Test de différenciation cellulaire.....	171
3.7.9.1	Analyse de la différenciation des kératinocytes par RT-qPCR.....	172
3.7.9.2	Analyse de la différenciation des kératinocytes par immunofluorescence	173
3.7.10	Test de production de lipides	173
3.7.11	Etude de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription PPAR- γ	174

3.8	Modèle expérimental murin de psoriasis induit par l'imiquimod.....	175
3.8.1	Les souris et les conditions d'hébergement.....	175
3.8.2	Traitements des souris	175
3.8.3	Evaluation de la sévérité de la maladie.....	176
3.8.4	Analyses transcriptomiques	176
3.8.5	Etude histologique de la peau de souris	178
3.8.5.1	Préparation des échantillons.....	178
3.8.5.2	Coloration H&E.....	178
3.9	Analyses statistiques	179
4	Résultats.....	180
4.1	Mise en place de la stratégie de criblage cellulaire par bioluminescence basé sur le système RILES/21.5p T	180
4.1.1	Construction moléculaire et validation de la sonde bioluminescente pRILES/21.5pT	180
4.1.2	Miniaturisation de la stratégie de criblage au format de microplaques de 96 puits ..	183
4.2	Identification de la touche <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn lors du criblage cellulaire basé sur le système RILES/21.5p T.....	186
4.3	Mise en évidence de l'effet de la silymarine isolée du <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn sur l'activité du microARN-21-5p	198
4.4	La silymarine inhibe l'expression des gènes cibles du microARN-21-5p dans les kératinocytes humains	203
4.5	La silymarine promeut l'incorporation du microARN-21-5p mature dans le complexe RISC	205
4.6	Etudes fonctionnelles de la silymarine dans les kératinocytes humains	207
4.6.1	La silymarine diminue l'inflammation dans les kératinocytes	207
4.6.2	La silymarine inhibe la migration des kératinocytes via la suppression du processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) induit par le TGF- β 1.....	211
4.6.3	La silymarine participe au remodelage de la MEC	216
4.6.4	Etude de l'effet de la silymarine sur les kératinocytes humains par analyse transcriptomique à haut débit (RNA-seq)	218
4.6.5	La silymarine bloque le cycle cellulaire	225
4.6.6	La silymarine n'induit pas l'apoptose	226
4.6.7	La silymarine bloque la différenciation des kératinocytes, en partie, via l'inhibition de l'expression du gène <i>Notch3</i>	227
4.6.8	La silymarine stimule la synthèse de lipides dans les cellules kératinocytes	236
4.7	Etude de l'effet de la silymarine dans un modèle murin de psoriasis induit par l'imiquimod (IMQ)	245

4.7.1	La silymarine améliore les lésions psoriasiques cutanées induites par l'IMQ chez la souris.....	245
4.7.2	La silymarine régule l'expression des marqueurs moléculaires de l'inflammation, la différenciation épidermique et la synthèse lipidique chez les souris traitées par l'IMQ.....	249
5	Discussion et perspectives	255
5.1	Les plantes : une source de composés bioactifs encore inexplorée	255
5.2	Justification de la stratégie de criblage placée sous contrôle de l'axe de régulation TGF- β 1/microARN-21-5p	256
5.3	Identification de l'extrait de plante <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn. puis de la silymarine comme étant des régulateurs du microARN-21-5p	258
5.4	Mécanisme de régulation du microRNA-21-5p par la silymarine en réponse au TGF- β 1... 260	
5.5	Effet de la silymarine sur la synthèse lipidique dans les kératinocytes humains.....	262
5.6	Evaluation thérapeutique de la silymarine dans le traitement du psoriasis.....	265
6	Références.....	269

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation schématique de la peau humaine.	25
Figure 2 : Structure de l'épiderme.	28
Figure 3 : L'orientation du fuseau mitotique dicte la stratification de l'épiderme.	30
Figure 4 : Organisation des lipides dans la couche cornée.	33
Figure 5 : Structure et composition du derme papillaire et réticulaire.	35
Figure 6 : Localisation génomique des microARNs.	38
Figure 7 : Structure du complexe DROSHA-DGCR8.	41
Figure 8 : La protéine Dicer.	42
Figure 9 : Formation du pré-miRNP immature.	43
Figure 10 : Voie canonique de biogénèse des microARN.	45
Figure 11 : Représentation schématique des différentes voies alternatives de biogénèse des microARNs.	47
Figure 12 : Différents sites d'interaction entre le microARN et son ARNm cible.	49
Figure 13 : Les différents mécanismes proposés dans la répression de la traduction des ARNm ciblés par les complexes miRNP/RISC.	51
Figure 14 : Mécanisme de destabilisation et de dégradation des ARNm ciblés par les complexes miRNP/RISC.	54
Figure 15 : Représentation schématique du développement embryonnaire de l'épiderme et de la morphogénèse du follicule pileux chez la souris.	56
Figure 16 : Rôle essentiel des microARNs dans la morphogénèse de la peau.	57
Figure 17 : Importance du microARN-203 dans la différenciation épidermique.	60
Figure 18 : Modèle de régulation du microARN-184 dans l'épiderme.	63
Figure 19 : Rôle du microARN-125b dans l'inhibition de la différenciation des cellules souches des follicules pileux.	65
Figure 20 : Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans le processus de cicatrisation cutanée.	66
Figure 21 : Le microARN-142 joue un rôle important dans la clairance du <i>Staphylococcus aureus</i> au cours de la cicatrisation des plaies cutanées.	69
Figure 22 : Importance des microARNs dans la polarisation des macrophages.	70
Figure 23 : Importance du microARN-21 dans la migration des kératinocytes.	73
Figure 24 : Rôle du microARN-210 dans l'angiogenèse.	77
Figure 25 : Implication du cluster microARN-17-92 dans les plaies chroniques.	81
Figure 26 : Implication du microARN-203 dans le psoriasis.	84
Figure 27 : Implication du microARN-125b dans le psoriasis.	85
Figure 28 : Implication de la famille microARN-29 dans la sclérodermie systémique (SS).	88
Figure 29 : Anciens documents témoignant de l'utilisation des plantes en Egypte et Mésopotamie antique.	89
Figure 30 : Les stress biotiques et abiotiques influencent la production qualitative et quantitative des métabolites secondaires par les plantes.	93
Figure 31 : Exemples de familles et sous-familles de métabolites secondaires.	93
Figure 32 : Comparaison des propriétés de différentes classes de molécules recensées dans une base de données.	94

Figure 33 : Exemple de docking moléculaire appliqué à l'hespéridine, un des principaux citroflavonoïdes présents chez les espèces du genre Citrus.....	104
Figure 34 : La prodiginine butylcycloheptyl bloque la prolifération des cellules du cancer du côlon en inhibant la maturation du pré-microARN-21 par Dicer.....	116
Figure 35 : Les criblages basés sur les microARNs.	118
Figure 36 : Représentation schématique de la stratégie de criblage utilisant un gène rapporteur développée par Hagiwara et al.	120
Figure 37 : Représentation schématique de la stratégie de criblage utilisant un gène rapporteur développée par Zhang et al.....	121
Figure 38 : Représentation schématique de la stratégie de criblage utilisant une sonde fluorescente développée par Ryoo et al.....	123
Figure 39 : Représentation schématique du pRILES/21.5pT.	129
Figure 40 : Représentation schématique du plan de microplaque de 96 puits optimisé pour le criblage cellulaire utilisant la sonde d'imagerie moléculaire pRILES/21.5pT spécifique du microARN-21-5p.	135
Figure 41 : Procédure expérimentale optimisée au format de microplaque de 96 puits pour le criblage cellulaire utilisant le système RILES.....	137
Figure 42 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour concevoir les amorces de qPCR spécifique du pri-miR-21, pré-miR-21 et miR-21-5p mature.	146
Figure 43 : Etapes nécessaires pour la construction des bibliothèques d'ADNc double brin.	149
Figure 44 : Schéma d'un ADNc db obtenu par enrichissement par PCR (Illumina®).....	151
Figure 45 : Principe de l'amplification clonale par pont permettant la formation de <i>clusters</i> sur la <i>flow cell</i> (Illumina®).	152
Figure 46 : Principe du séquençage de l'ADN par synthèse développé par la société Illumina®.	155
Figure 47 : Représentation de l'interface graphique RStudio.	158
Figure 48 : Exemples de scripts écrits avec le logiciel R	160
Figure 49 : Vue d'ensemble de la méthode de calcul GSEA.....	162
Figure 50 : Analyse du cycle cellulaire.....	169
Figure 51 : Représentation schématique du principe de la sonde bioluminescente pRILES/21.5pT sous contrôle du microARN-21-5p.	181
Figure 52 : Validation de la spécificité et sensibilité du pRILES/21.5pT pour le microARN-21-5p en plaque de 24 puits.	182
Figure 53 : Détermination du facteur Z' pour le test cellulaire basé sur le système RILES/21.5p T optimisé au format de microplaques de 96 puits.	185
Figure 54 : Diagramme de flux de travail général suivi pour identifier des touches bioactives capables de réguler l'activité du microARN-21-5p.....	186
Figure 55 : Evaluation de la cytotoxicité des extraits bruts de plantes fournis par le Consortium ValBioCosm.....	187
Figure 56 : Touches identifiées par le crible primaire utilisant le système RILES/21.5p T au format de microplaques de 96 puits.	188
Figure 57 : Résultats d'un crible primaire basé sur le système RILES/21.5p T au format de microplaques de 96 puits montrant l'absence de régulation positive de l'activité du microARN-21-5p par 4 extraits de plantes dans les kératinocytes humains traités par le TGF- β 1.	189
Figure 58 : Résultats d'un crible primaire basé sur le système RILES/21.5p T au format de microplaques de 96 puits montrant une touche (<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn) capable de réguler	

positivement l'activité du microARN-21-5p et un hit non-spécifique (<i>Eclipta alba</i>) dans les kératinocytes humains traités par le TGF- β 1.	190
Figure 59 : Résultats d'un crible secondaire basé sur le système RILES/21.5p T confirmant les résultats du crible primaire.	191
Figure 60 : Validation de la relation effet-dose des touches identifiées lors du crible primaire et secondaire.	193
Figure 61 : Identification de 3 touches bioactives (<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn., <i>Centella asiatica</i> (L.), <i>Molinea caerulea</i> (L.)) lors du criblage cellulaire RILES/21.5p T et microARN-21-5p spécifique de la librairie ValBioCosm.....	194
Figure 62 : Description du Chardon-Marie (<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn) et de la silymarine.	199
Figure 63 : Comparaison de l'effet de la silymarine et la silibinine sur l'activité du miARN-21-5p dans les kératinocytes humains traités au TGF- β 1.	200
Figure 64 : L'inhibition du microARN-21-5p abroge l'activité de la luciférase induite par la silymarine dans les kératinocytes humains traités au TGF- β 1.....	201
Figure 65 : L'effet de l'extrait brut de Chardon-Marie (<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn) et de la silymarine sur l'activité du microARN-21-5p dans les kératinocytes humains est dépendant du TGF- β 1.	202
Figure 66 : La silymarine inhibe l'expression des gènes cibles du microARN-21-5p dans les kératinocytes humains traités par le TGF- β 1.	204
Figure 67 : La silymarine augmente l'activité du microARN-21-5p induit par le TGF- β 1 dans les kératinocytes humains.	206
Figure 68 : La silymarine inhibe les réponses pro-inflammatoires induites par le TNF- α , l'IL-22 et les UVB dans les kératinocytes humains.	210
Figure 69 : La silymarine abroge la migration des kératinocytes en régulant négativement la voie canonique du TGF- β 1 et l'expression des gènes impliqués dans l'EMT.....	212
Figure 70 : Confirmation de l'activité intracellulaire de la silymarine sur l'inhibition de l'EMT induite par le TGF- β 1 dans les kératinocytes humains.....	215
Figure 71 : La silymarine régule l'expression de gènes codant des enzymes impliquées dans le remodelage de la MEC, la synthèse d'acide hyaluronique et la réticulation des fibres de collagène dans les kératinocytes humains.	217
Figure 72 : La silymarin augmente la synthèse de collagène par les kératinocytes.....	218
Figure 73 : Résultats de l'analyse différentielle de l'expression des gènes extraits des cellules traitées par le TGF- β 1 et la silymarine <i>versus</i> cellules traitées par le TGF- β 1 seul.	220
Figure 74 : L'analyse d'enrichissement révèle que la silymarine inhibe l'expression de gènes impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire et la différenciation des kératinocytes, au profit de ceux impliqués dans le métabolisme lipidique dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1.....	223
Figure 75 : Exemple de graphiques générés par l'analyse d'enrichissement GSEA.	224
Figure 76 : La silymarine provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 sans induire l'apoptose dans les kératinocytes humains.	226
Figure 77 : La silymarine régule négativement le programme de différenciation des kératinocytes humains déjà différenciés.	228
Figure 78 : Modèle de différenciation induite par le calcium des kératinocytes humains.	230
Figure 79 : La silymarine inhibe l'entrée en différenciation des kératinocytes humains.	232
Figure 80 : La silymarine modifie le profil d'expression des gènes codant Notch1, Notch2 et Notch3 dans les kératinocytes déjà différenciés.	233

Figure 81 : La silymarine inhibe l'expression de Notch3 dans les kératinocytes humains induits en différenciation.	235
Figure 82 : La silymarine régule positivement le métabolisme des lipides dans les kératinocytes humains déjà différenciés.	237
Figure 83 : La silymarine régule positivement le métabolisme des lipides dans les kératinocytes humains induits en différenciation.	238
Figure 84 : La silymarine inhibe la phosphorylation d'AMPK dans les kératinocytes humains induits en différenciation.	240
Figure 85 : Représentation schématique du modèle de régulation du facteur de transcription SREBP1 par AMPK.	241
Figure 86 : La silymarine diminue l'expression et la maturation de SREBP-1 dans les kératinocytes humains induits en différenciation.	242
Figure 87 : La silymarine active la voie de signalisation de PPAR.	245
Figure 88 : La silymarine atténue la sévérité du psoriasis induit par l'IMQ chez les souris C57BL/6..	247
Figure 89 : Photographies macroscopiques de la peau du dos des souris au 6 ^{ième} après le début de traitement.	248
Figure 90 : La silymarine diminue l'hyperplasie épidermique induite par l'IMQ chez les souris C57BL/6..	249
Figure 91 : La silymarine inhibe l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire psoriasique induite par l'IMQ chez les souris C57BL/6.	250
Figure 92 : La silymarine restaure l'expression des marqueurs de différenciation des kératinocytes dans le modèle murin de psoriasis induit par l'IMQ.	251
Figure 93 : La silymarine restaure l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique dans le modèle murin de psoriasis induit par l'IMQ.	253

Table des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques générales des fibroblastes papillaires et réticulaires.	37
Tableau 2 : Liste de quelques produits naturels de plantes utilisés pour leur usage thérapeutique Adapté de (Atanasov et al., 2015).	97
Tableau 3 : Exemples de techniques utilisées pour les criblages basés sur des tests biochimiques. .	107
Tableau 4 : Exemples de touches identifiées lors des campagnes de criblages biochimiques d'extraits et/ou composés naturels de plantes.....	109
Tableau 5 : Exemples de touches identifiées lors des campagnes de criblages cellulaires d'extraits et/ou composés naturels de plantes.....	112
Tableau 6 : Liste des composés phytochimiques régulant l'expression des microARNs dans la peau.....	115
Tableau 7 : Liste des microARN mimiques et inhibiteurs synthétiques.....	130
Tableau 8 : Liste des amorces/sonde TaqMan® utilisées.....	134
Tableau 9 : Liste des paramètres optimisés et des conditions testées pour définir le protocole de criblage optimal au format de microplaque de 96 puits.....	136
Tableau 10 : Librairie ValBioCosm	138
Tableau 11 : Liste des amorces spécifiques des cibles moléculaires	142
Tableau 12 : Liste des amorces spécifiques du pri-miR-21 et pré-miR-21	145
Tableau 13 : Liste des anticorps primaires	165
Tableau 14 : Liste des anticorps secondaires	165
Tableau 15 : Liste des amorces spécifiques des gènes impliqués dans la différenciation des kératinocytes et le métabolisme lipidique	172
Tableau 16 : Liste des amorces spécifiques des gènes de souris impliqués dans la différenciation des kératinocytes, métabolisme lipidique et l'inflammation	177
Tableau 17 : Résultats obtenus à l'issue du criblage primaire et secondaire ainsi que des tests de validation de la relation effet-dose des touches identifiées.....	197
Tableau 18 : Liste des 15 gènes les plus différentiellement surexprimés et sous-exprimés impliqués dans le métabolisme des lipides, la différenciation kératinocytaire et la progression du cycle cellulaire en fonction de leur fold change et p-valeur ajustée.	225

Liste des abréviations

ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOC	Désoxycholate de sodium
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
KI	Knock-in
KO	Knock-out
LB	Lysogeny broth
MEC	Matrice extracellulaire
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldéhyde
NGS	Next generation sequencing
Nt	Nucléotides
pb	Paire de bases
PBS	Phosphate buffer saline
SM	Silymarine
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SVF	Sérum de veau fœtal
NHEK	Normal human epidermal keratinocytes
RLU	Relative light unit
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodium dodecylsulfate
UFC	Unité formant colonie
UTR	Untranslated region
UV	Ultra-violets

1 Introduction

1.1 La peau

1.1.1 Les fonctions de la peau

Depuis plus de 150 ans, la peau n'a de cesse de fasciner la communauté scientifique.

La peau fait partie du système tégumentaire avec les annexes cutanées et est l'organe le plus étendu et le plus lourd de notre organisme. Chez l'adulte, elle s'étend sur plus de 2 m² et pèse en moyenne 4 kg.

A l'interface entre l'organisme et son environnement, la peau assure la fonction vitale de barrière contre les agressions extérieures (rayonnement solaire, substances chimiques et microorganismes pathogènes), pouvant causer de multiples dommages cellulaires (Madison, 2003). Elle joue également un rôle essentiel dans la thermorégulation. Elle veille à l'équilibre interne entre l'eau et les électrolytes (Blank, 1952). Par ailleurs, la peau est un organe sensoriel majeur. Elle héberge de nombreux nerfs sensoriels spécialisés dans la détection de stimuli externes, tels que des variations thermiques et les pressions mécaniques. Les fibres nerveuses communiquent avec les cellules cutanées par l'intermédiaire de neuromédiateurs, comme le CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*), la substance P et l'acétylcholine (Misery, 1997). La peau est également un lieu important de synthèse métabolique d'hormones, de vitamine D et de pigments naturels. Ces substances naturelles sont essentielles non seulement pour le maintien de l'homéostasie cutanée mais aussi pour le bon fonctionnement de nos organes (Maranduca et al., 2019; Zouboulis, 2004).

1.1.2 La structure de la peau

La peau est formée de trois tissus superposés d'origines embryologiques distinctes, du plus interne au plus externe : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. L'épiderme et le derme sont reliés entre eux par une jonction dermo-épidermique (JDE), qui assure la cohésion tissulaire et participe aux échanges moléculaires et cellulaires entre ces deux compartiments (Briggaman and Wheeler, 1975).

La peau est également composée d'annexes cutanées situées dans le derme et l'hypoderme. Elles regroupent les glandes sudoripares eccrines et apocrines, les glandes sébacées et les phanères, constitués des ongles et des follicules pileux. Les glandes sébacées sont généralement associées aux poils, formant ainsi les follicules pilo-sébacés. Elles contribuent à la lubrification des poils et de la peau en produisant du sébum. Les glandes sudoripares participent à la thermorégulation du corps en sécrétant de la sueur (Prost-Squarcioni, 2006). Les ongles assurent, quant à eux, un rôle de protection mécanique et thermique à l'extrémité des doigts et orteils.

Enfin, la peau est recouverte d'un film hydrolipidique de surface peuplé d'une flore commensale abondante et variée, appelée microbiote cutané, faisant l'objet de nombreuses études ces dernières années (Grice and Segre, 2011) (**Figure 1**).

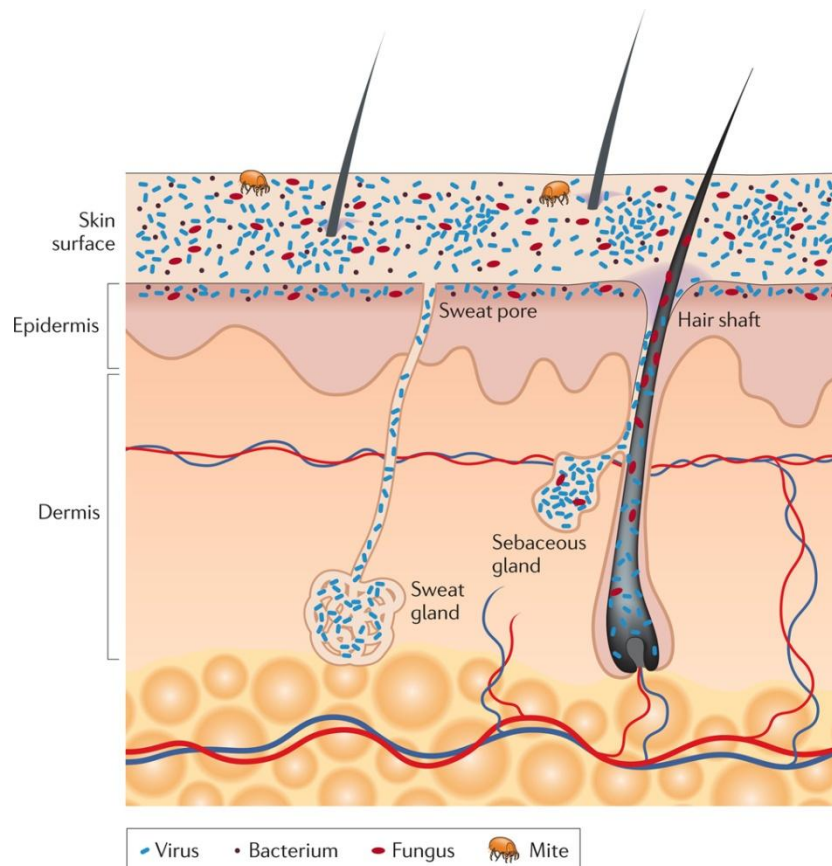


Figure 1 : Représentation schématique de la peau humaine.

La peau est constituée de trois tissus superposés (épiderme, derme et hypoderme) et contient des annexes cutanées, tels que les follicules pileux et les glandes sébacées et sudoripares. La surface de la peau et les annexes cutanées hébergent des milliers de microorganismes (virus, bactéries et champignons) et d'acariens. Les bactéries *Proteobacteria* et *Staphylococcus spp.* forment des communautés fortement entrelacées entre elles et avec d'autres microorganismes. Les champignons commensaux tels que *Malassezia spp.* se développent sur leur substrat nutritif à la fois individuellement et en tant que système de filaments ramifiés (hyphes). Les particules virales vivent soit librement soit dans les cellules bactériennes. Enfin, les acariens cutanés tels que *Demodex folliculorum* et *Demodex brevis* font partie des plus petits arthropodes et vivent dans ou à proximité des follicules pileux. D'après (Grice and Segre, 2011).

1.1.2.1 L'épiderme

D'origine ectodermique, l'épiderme est un épithélium polarisé et pluristratifié qui se renouvelle toutes les 2 à 3 semaines. Son épaisseur varie en fonction de sa localisation anatomique : de 0,03 mm sur les paupières jusqu'à 1 mm sur la paume de la main et la plante des pieds.

L'épiderme est majoritairement constitué de kératinocytes (80 à 90 %) qui produisent des protéines structurales riches en acides aminés soufrés, les kératines (K), au cours d'un processus complexe de différenciation (ou kératinisation) (McGrath et al., 2004). Les kératines confèrent à l'épiderme sa résistance mécanique et son imperméabilité. De ce fait, les kératinocytes jouent un rôle crucial dans la fonction de barrière cutanée (Freedberg and Fitzpatrick, 1999).

D'autres cellules telles que les mélanocytes (2 à 4 %) synthétisent les mélanines (eumélanine et phéomélanine) dans des organites spécialisés, appelés mélanosomes. Les mélanines sont responsables de la pigmentation de la peau et de sa protection contre les rayonnements UV. Grâce à leurs prolongements cytoplasmiques, les mélanocytes distribuent les mélanosomes aux kératinocytes environnants selon un mécanisme encore mal compris (Van Den Bossche et al., 2006). Néanmoins, une fois délivrés dans le cytoplasme des kératinocytes, ces vésicules ovoïdes se disposent en périphérie du noyau où ils forment une calotte périnucléaire qui protège l'ADN contre les dommages causés par les UV (Hearing, 2005).

Les cellules de Langerhans (2 à 4 %) dérivent de précurseurs médullaires CD34+ et jouent un rôle clé dans la réponse immunitaire innée en protégeant la peau contre les pathogènes. Ces cellules dendritiques sont capables de capturer les antigènes cutanés, les apprêter et les présenter aux lymphocytes T situés dans les ganglions lymphatiques régionaux (West and Bennett, 2018).

Enfin les cellules de Merkel (0,5 à 2 %), associées à des terminaisons nerveuses libres, sont des acteurs-clés du système neuro-endocrino-immuno-cutané. Elles sont

particulièrement abondantes dans l'épiderme des paumes et des palmes où elles agissent comme des récepteurs sensoriels (Abraham and Mathew, 2019).

Les cellules de l'épiderme baignent dans une MEC dense, participant activement à leur polarisation, cohésion et communication intercellulaire. La MEC de l'épiderme régule de nombreuses fonctions cellulaires. Elle est essentiellement constituée de protéines fibrillaires (collagène de type IV, VII et XVII, élastine), de glycoprotéines (laminine-511, laminine-332, fibronectine (FN), ténascine), de nidogène, de protéoglycanes (syndécans, perlécan, décorine) et de glycosaminoglycanes (héparane sulfate, kératane sulfate, dermatane sulfate, chondroïtine sulfate et l'acide hyaluronique (HA)). Ces ligands de la MEC ne sont pas répartis de manière uniforme dans les différentes couches de l'épiderme, contribuant ainsi à la fonction de barrière mécanique de la peau (Behrens et al., 2012; Chermnykh et al., 2018; Watanabe et al., 2017). L'HA, seul glycosaminoglycane non rattaché à un core protéique et non sulfaté, possède d'incroyables capacités d'hydratation. Il peut retenir jusqu'à 1 000 fois son poids en eau. D'autre part, en se fixant à des récepteurs membranaires spécifiques, comme le CD44 (*Cluster of differentiation 44*), le RHAMM (*Receptor for hyaluronan-mediated motility*) et l'ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule 1*), l'HA active des voies de signalisation intracellulaire et modifie le comportement cellulaire des kératinocytes (Turley et al., 2002). Des travaux ont démontré le rôle de l'HA dans le processus de différenciation des kératinocytes mais aussi dans la prolifération et la migration de ces derniers lors de la cicatrisation d'une plaie (Aya and Stern, 2014; Bourguignon et al., 2006; D'Agostino et al., 2015).

Des protéases, telles que les MMP (*Matrix metalloproteinases*), participent au remodelage de la MEC en organisant celle-ci dans l'espace de façon à la rendre fonctionnelle (Lu et al., 2011).

En fonction du stade de différenciation terminale des kératinocytes, l'épiderme peut être sous-divisé en quatre couches successives : la couche basale (*stratum basale*), la couche épineuse (*stratum spinosum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*) et la couche cornée (*stratum corneum*) (**Figure 2**).

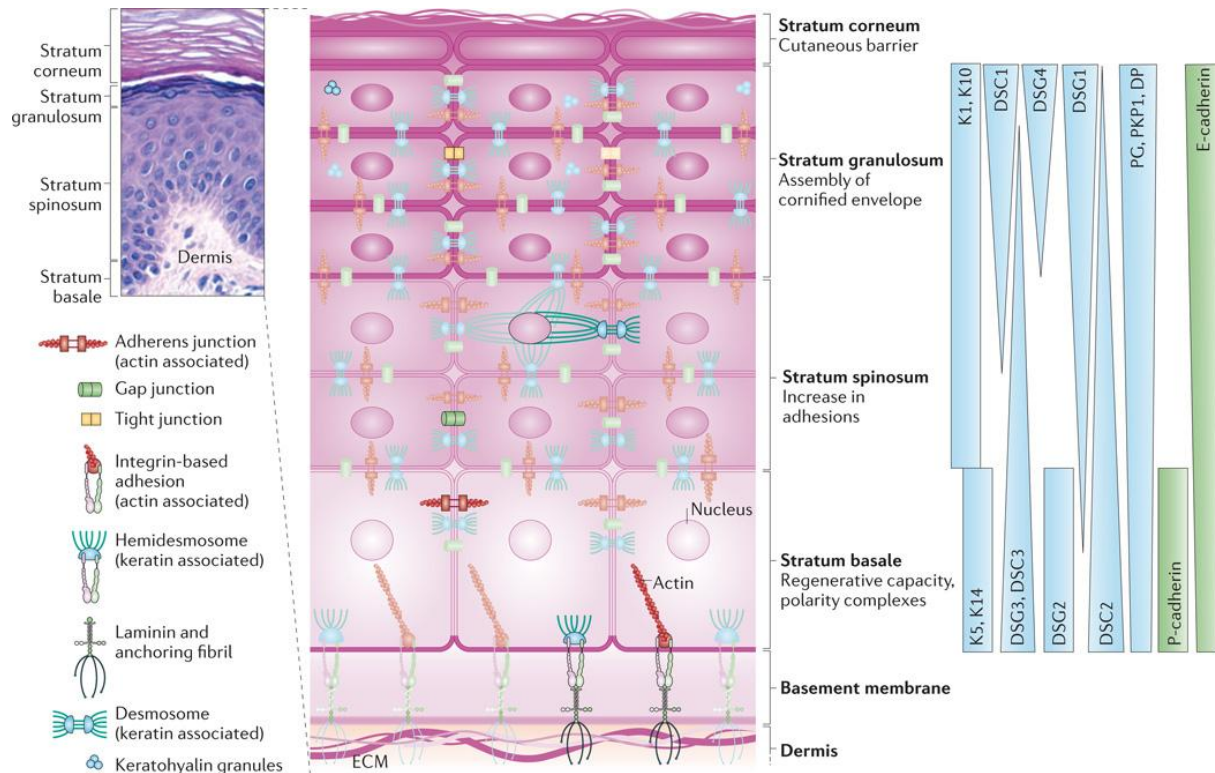


Figure 2 : Structure de l'épiderme.

L'épiderme est composé de quatre couches cellulaires superposées reposant sur une membrane basale. Dans la couche basale (*stratum basale*), les kératinocytes sont ancrés à une membrane basale sous-jacente, également appelée jonction dermo-épidermique, au moyen d'hémidesmosomes et d'intégrines. Dotés d'une intense activité mitotique, les kératinocytes basaux permettent l'auto-renouvellement de l'épiderme. Au cours de leur différenciation, les kératinocytes subissent d'importantes modifications biochimiques et structurales, aboutissant à l'assemblage de l'enveloppe cornée essentielle pour la formation d'une barrière cutanée (*stratum corneum*). La distribution et la teneur des composants spécifiques du cytosquelette (kératines (K), molécules d'adhérence et jonctions intercellulaires (composées de desmocollines (DSC), desmogléines (DSG), cadhérines, desmoplakines (DPs) et placoglobines (PGs)) varie en fonction des différentes couches de l'épiderme. Ces molécules jouent un rôle important dans la morphogénèse de l'épiderme. D'après (Simpson et al., 2011).

1.1.2.1.1 La couche basale (*stratum basale*)

La couche basale est la plus profonde de l'épiderme. Il s'agit d'un compartiment germinatif formé d'une monocouche de kératinocytes basaux, de forme cylindrique ou cubique, issus de cellules souches (CS) de l'épiderme inter-folliculaire (IF) (Cotsarelis et al., 1990; Fuchs, 2007; Morris and Potten, 1994).

Les kératinocytes basaux sont ancrés à la membrane basale sous-jacente au moyen d'hémidesmosomes, et sont reliés entre eux par des desmosomes et des jonctions adhérentes composées d'occludines, de claudines et d'immunoglobulines, dont les JAM (*Junctional Adhesion Molecule*). En raison de la forte activité mitotique des kératinocytes basaux, leur noyau est volumineux et dense. Ils expriment des K5 et K14, qui s'assemblent en filaments intermédiaires dans le cytoplasme, entourent le noyau et s'unissent aux desmosomes et héli-desmosomes en périphérie cellulaire (Moll et al. 1982; Nelson and Sun 1983; Fuchs 1998).

Les cellules souches de l'épiderme IF sont essentielles au processus d'auto-renouvellement et de stratification de l'épiderme. Elles garantissent un équilibre dynamique entre la production de CS et de cellules capables de se différencier. Leur mode de division conditionne l'organisation spatiale des kératinocytes basaux et leur devenir. Lors d'une division cellulaire symétrique (20 % des cas), la CS génère deux CS filles au potentiel prolifératif illimité, comparable à celui de la CS mère. Ces cellules restent confinées dans la couche basale. Au contraire, lors d'une division cellulaire asymétrique (80% des cas), le fuseau mitotique est réorienté perpendiculairement à l'axe de polarité de la CS. Cette dernière donne naissance à une CS fille et une cellule progénitrice dite « cellule d'amplification transitoire » ou « TA ». (Clayton et al., 2007; Lechler and Fuchs, 2005) (**Figure 3**).

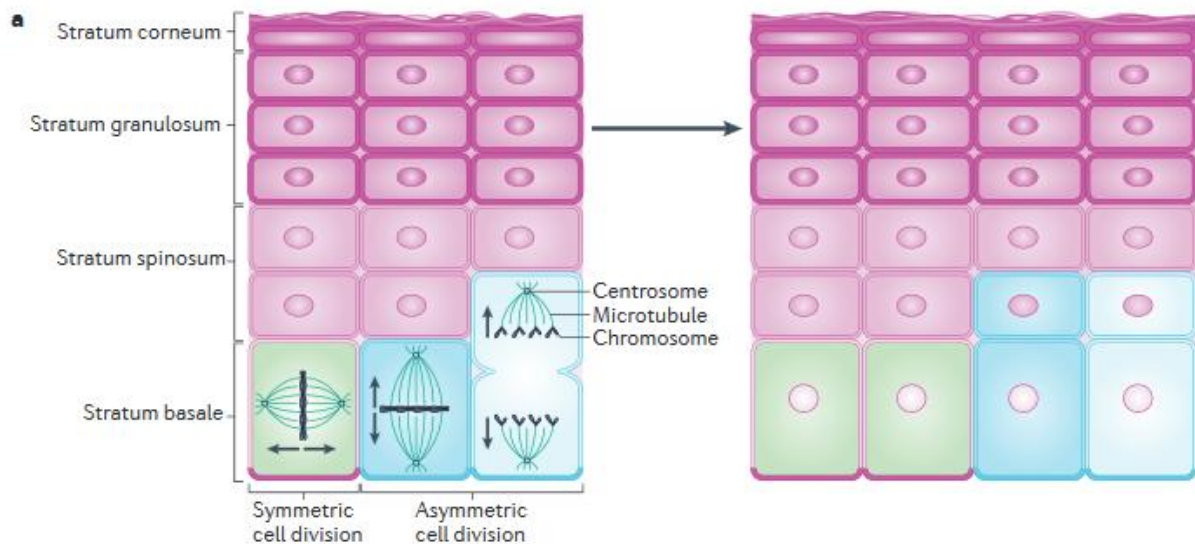


Figure 3 : L'orientation du fuseau mitotique dicte la stratification de l'épiderme.

Dans les cellules basales, les fuseaux mitotiques parallèles à la membrane basale favorisent la division symétrique permettant l'expansion latérale de l'épiderme. En revanche, les fuseaux mitotiques perpendiculaires à la membrane basale dirigent la division asymétrique contribuant à l'expansion verticale de l'épiderme. D'après (Simpson et al., 2011).

Après quelques divisions cellulaires (< 15 cycles), la cellule progénitrice TA perd son aptitude à se diviser et s'engage dans un processus de différenciation. Elle se détache alors de la membrane basale et migre vers la couche épineuse supérieure. Elle entame son programme de différenciation terminale à l'origine de la stratification de l'épiderme. Celui-ci consiste en la migration progressive des kératinocytes des couches profondes de l'épiderme vers les couches superficielles, où ils finissent *in fine* par dégénérer et se détacher de la surface cutanée par desquamation (Blanpain and Fuchs, 2009; Fuchs and Raghavan, 2002).

1.1.2.1.2 La couche épineuse (*stratum spinosum*)

La couche épineuse est constituée de 8 à 10 assises de kératinocytes de taille variable. Dans les couches profondes, les kératinocytes sont polyédriques et pourvus d'un gros noyau vésiculeux et clair. A mesure qu'ils progressent dans les couches suprabasales, leur volume augmente et ils finissent par s'aplatir. Leur profil d'expression génique change. Les kératinocytes cessent d'exprimer les K5 et K14 au profit des K1 et K10, qui s'assemblent en filaments intermédiaires et s'agrègent en faisceaux pour former les tonofilaments (Eichner et al., 1986). Outre les kératines, les kératinocytes de cette couche synthétisent

l'involucrine (IVL) (68 kDa), une protéine riche en glutamine et lysine entrant dans la composition de la future enveloppe cornée (Ekanayake-Mudiyanselage et al., 1998). Ils sont reliés entre eux par un plus grand nombre de desmosomes, leur conférant un aspect « épineux » au microscope. Des jonctions adhérentes composées notamment de la protéine E-cadhérine viennent renforcer la cohésion cellulaire et contribuent à la résistance mécanique de l'épiderme (Tunggal et al. 2005; Niessen 2007).

En poursuivant leur programme de différenciation, les kératinocytes se déplacent vers la couche granuleuse supérieure.

1.1.2.1.3 La couche granuleuse (*stratum granulosum*)

La couche granuleuse représente la dernière couche « vivante » de l'épiderme. Elle est formée de 3 à 5 assises de kératinocytes aplatis, organisés parallèlement à la surface cutanée. Leur cytoplasme renferme des structures intracellulaires spécifiques : les granules de kératohyaline et les corps lamellaires d'Odland (ou kératinosomes). Les premières sont volumineuses (0,5 à 2 μm) et basophiles, et sont dépourvues de membrane externe. Elles contiennent des agrégats de protéines insolubles, comme la profilaggrine (granules F) et la loricine (granules L) (Mehrel et al., 1990; Rothnagel and Steinert, 1990). Les secondes, en revanche, sont plus petites (0,2 à 0,3 μm) et sont entourées d'une double membrane. Les corps lamellaires d'Odland sont remplis de lipides (glycosylcéramides, cholestérol et phospholipides), d'hydrolases acides (sphingomyélinase acide et phospholipase A2 (PLA2)), de peptides antimicrobiens et d'inhibiteurs de protéases (Odland and Holbrook, 1981). Ces structures tubo-vésiculaires proviennent de l'appareil de Golgi (Madison et al., 1998; Yamanishi et al., 2019) et migrent peu à peu vers la périphérie de la cellule, avant de déverser leur contenu dans l'espace extracellulaire par exocytose.

1.1.2.1.4 La zone de transition (*stratum lucidum*)

En continuant leur processus de différenciation, les kératinocytes granuleux subissent un processus de mort cellulaire programmée particulier, appelé cornification, aboutissant à la formation de cellules mortes, les cornéocytes (Eckhart et al., 2013). Durant cette phase, les cellules perdent leur noyau et leurs organites intracellulaires par autolyse. Le contenu

des granules de kératohyaline est déversé dans le cytoplasme. La profilaggrine est alors déphosphorylée puis clivée en plusieurs monomères de filaggrine d'environ 36 kDa chacun (Sandilands et al., 2009). Cette dernière agrège les filaments intermédiaires de kératine en macrofibrilles, transformant le cytoplasme en une matrice fibreuse dense et amorphe. Les desmosomes sont transformés en cornéodesmosomes (Jonca et al., 2002). Une étude récente a montré que la sous-expression de la filaggrine dans un modèle de peau reconstruite altère la différenciation des kératinocytes (Pendaries et al., 2014).

Lors des stades ultimes de la différenciation terminale des kératinocytes, la membrane plasmique est remplacée par une enveloppe cornée d'environ 7 à 15 nm d'épaisseur. Les transglutaminases (TG1, TG3 et TG5), des enzymes appartenant à la famille des aminoacyltransférases, jouent un rôle important dans ce processus (Eckert et al., 2005). Elles sont activées par l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et catalysent la formation de liaisons isopeptidiques entre les résidus de lysine et de glutamine des protéines de loricine (LOR), d'IVL, de kératohyaline et de cornifine (Rice and Green, 1977). Ces protéines intracellulaires deviennent alors insolubles et sont piégées dans l'enveloppe cornée. La filaggrine, quant à elle, est entièrement dégradée par protéolyse et génère des acides aminés hydrophiles, de l'acide urocanique (UCA) et de l'acide pyrrolidone carboxylique (PCA) entrant dans la composition d'un complexe de rétention hydrique appelé NMF (*Natural Moisturizing Factor*) (Rawlings and Harding, 2004; Rawlings et al., 1994). Le NMF favorise la rétention d'eau au sein de cornéocytes et contrôle en partie le pH de la couche cornée.

1.1.2.1.5 La couche cornée (*stratum corneum*)

Suivant sa localisation anatomique (paupières, plantes des pieds et paumes des mains), la couche cornée est formée de 4 à 30 assises de cornéocytes aplatis au contenu condensé. L'architecture de la couche cornée est généralement comparée à un mur de briques. Les cornéocytes représentent les briques tandis que les lipides intercornéocytaires constituent le ciment (Michaels et al., 1975).

Les lipides majoritairement retrouvés dans l'espace intercellulaire sont des céramides (45-50%), du cholestérol (25%) et des acides gras libres (15%) (Madison, 2003; Wertz et al., 1987). Ils s'auto-assemblent et se structurent en bicouches lamellaires autour des cornéocytes (Grubauer et al., 1987) (**Figure 4**). Des études de microscopie électronique ont révélé la présence de deux types d'arrangements de lipides dans la couche cornée. Dans les couches les plus profondes, les lipides adoptent un état cristallin très dense (arrangement orthorhombique). En surface, ils sont moins organisés et adoptent un état sous forme de gel (arrangement hexagonal) (Bouwstra et al., 1995; Pilgram et al., 1999).

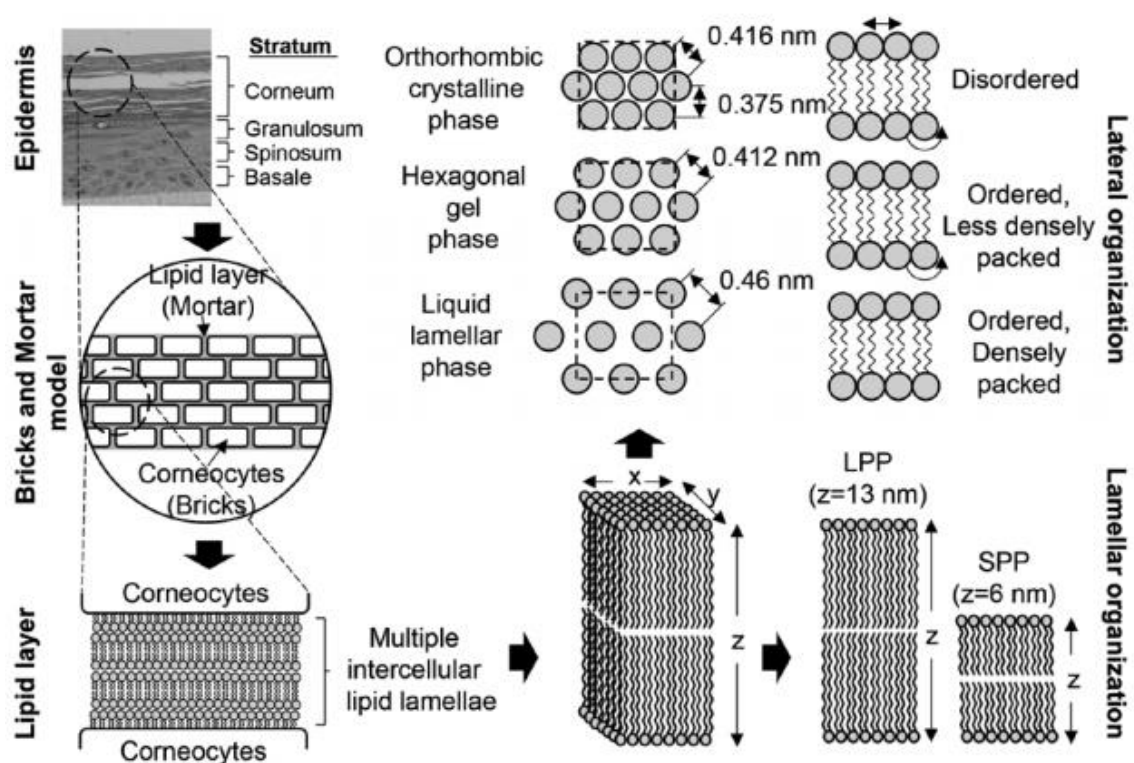


Figure 4 : Organisation des lipides dans la couche cornée.

La couche cornée ressemble à un mur de briques. Elle contient des cornéocytes entourés de lipides intercellulaires organisés en lamelles lipidiques. Les lamelles lipidiques ont différents niveaux d'organisation spatiale. L'organisation latérale comprend trois états distincts (cristallin orthorhombique, gélifié hexagonal et liquide lamellaire) en fonction de la température. L'organisation lamellaire est assurée par des lipidiques organisés en structure compacte étanche, contribuant à une fonction de barrière optimale. D'après (Cha et al., 2016).

Chaque jour près de 500 millions de cornéocytes se détachent de la surface cutanée. L'exfoliation imperceptible de ces cellules mortes anuclées résulte de la protéolyse des protéines constitutives des cornéodesmosomes (DSG1, DSC1 et cornéodesmosine). Les

enzymes impliquées dans ce processus sont majoritairement des protéases sensibles aux variations de pH. On distingue les protéases à sérine (kallikréines 5, 7, 8 et 14), localisées dans les zones profondes de la couche cornée, qui agissent à des pH neutres et alcalins, des protéases lysosomales à cystéine et à aspartate (cathepsine D et la protéine SCTP (*stratum corneum thiol protease*), localisées dans les couches supérieures de la couche cornée, qui agissent à pH plus acide.

La desquamation des cornéocytes est compensée par la différenciation de nouveaux kératinocytes basaux qui entament un nouveau cycle de différenciation kératinocytaire. Ce cycle en perpétuel renouvellement permet donc de renouveler l'épiderme et de maintenir l'intégrité de ce tissu de revêtement.

Plusieurs études ont démontré le rôle clé du calcium et des dérivés vitaminiques dans la régulation de la différenciation kératinocytaire (Bikle et al., 1996, 2001; Hennings et al., 1980; Törmä, 2011). La délétion du gène codant le récepteur CaSR (*Calcium sensing receptor*) dans les kératinocytes de souris provoque une perte du gradient calcique dans l'épiderme, une augmentation de la prolifération, une diminution significative de l'expression des marqueurs précoces et tardifs de la différenciation, ainsi qu'une diminution de la synthèse de corps lamellaires à l'interface entre le *stratum granulosum* et le *stratum corneum* (Tu et al., 2012). La répartition anormale du calcium dans l'épiderme conduit au développement de plusieurs maladies telles que le psoriasis et la dermatite atopique.

Par ailleurs, il a été démontré que des mutations du gène ATP2A2 (*ATPase sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺*) codant la protéine SERCA2 (*sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase type 2 isoform*), appartenant à la famille des pompes à calcium, induit la maladie de Darier. Cette génodermatose autosomique dominante se caractérise par un stress chronique du réticulum endoplasmique, entraînant la rétention des protéines intervenant dans l'ultra-structure des desmosomes (DSG3, DSC3, desmoplakine et-cadhérine E) dans ce compartiment cellulaire. Les anomalies de répartition spatiale de ces molécules d'adhésion réduisent par conséquent la force d'adhérence intercellulaire et perturbent le processus de kératinisation (Sakuntabhai et al., 1999; Savignac et al., 2014).

1.1.2.2 Le derme

Le derme est un tissu conjonctif épais de 0.6 à 3 mm en moyenne. Il est constitué d'une MEC riche en collagènes, fibres élastiques (élastine et microfibrilles de fibrilline), protéoglycanes et glycosaminoglycanes (Frantz et al., 2010; Krieg and Aumailley, 2011).

Ce tissu conjonctif est composé de deux parties distinctes : le derme papillaire et le derme réticulaire (Weber et al., 1984). Le derme papillaire, est un tissu conjonctif lâche situé directement sous l'épiderme. Il est majoritairement constitué de fibres de collagène de type III qui s'orientent perpendiculairement à la membrane basale de l'épiderme. Le derme réticulaire, plus profond et dense, est composé principalement de fibres de collagène de type I entrecroisées dans des fibres élastiques épaisses. La proportion de la MEC et le nombre de cellules conjonctives dans le derme réticulaire diminue au profit de la densification des faisceaux de collagènes, assurant ainsi la fonction mécanique ou de soutien de la peau (Tracy et al., 2016) (**Figure 5**).

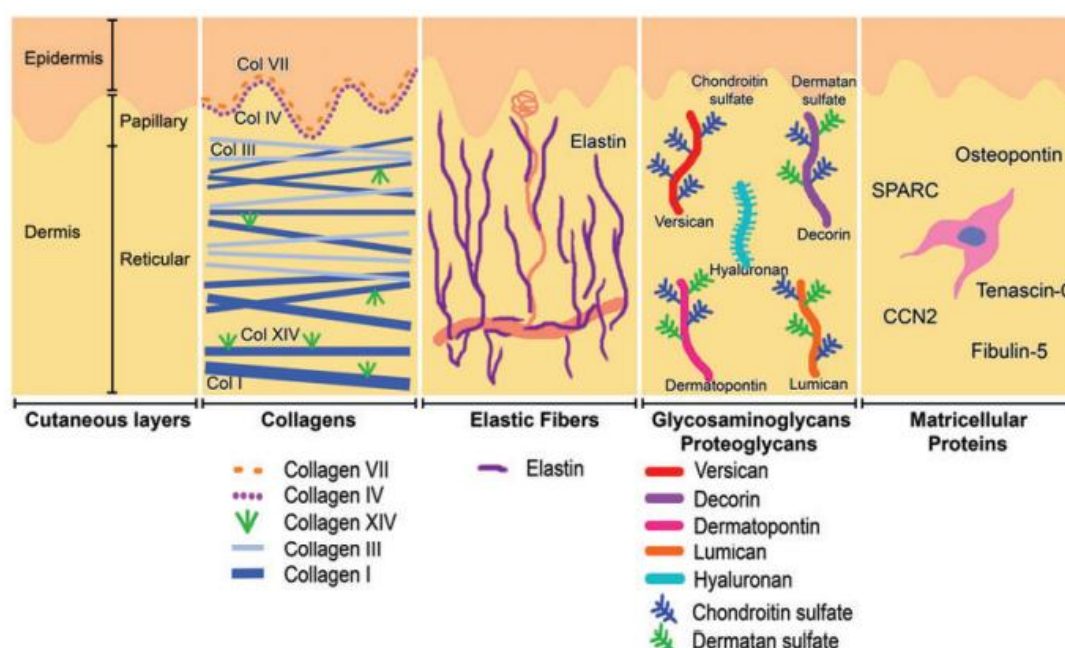


Figure 5 : Structure et composition du derme papillaire et réticulaire.

Dans le derme, les fibres de collagènes (essentiellement de type I) sont majoritairement distribuées dans le derme réticulaire profond et confèrent à la peau sa résistance mécanique. A l'inverse, les fibres élastiques sont principalement distribuées dans le derme papillaire et assurent l'élasticité de la peau. Les protéoglycanes et les glycoprotéines créent un espace interstitiel hydraté. Les protéines matricielles agissent comme des molécules de signalisation et influencent les fonctions biologiques des cellules du derme telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales. D'après (Tracy et al., 2016).

De part sa teneur élevée en fibres élastiques, composées d'élastine (90 %) et de microfibrilles riches en fibriline (10 %), le derme assure l'élasticité de la peau. Le derme sert également d'implantation aux annexes cutanées.

Outre son rôle de soutien et d'élasticité, le derme assure une fonction nutritive. En effet, contrairement à l'épiderme, le derme est richement vascularisé. Le réseau vasculaire du derme est organisé en plexus superficiel situé au niveau du derme papillaire et en plexus profond situé dans le derme réticulaire. Ces deux plexus sont reliés par des anastomoses artério-veineuses qui permettent la diffusion passive des nutriments, de l'oxygène et des différents dérivés sanguins au sein même du derme mais également vers l'épiderme supérieur (Sorrell and Caplan, 2004).

Au-delà de son rôle nutritif, le réseau vasculaire du derme participe à la thermorégulation, à la cicatrisation, aux réactions immunitaires et au contrôle de la pression artérielle.

De nombreux types cellulaires coexistent dans le derme, tels que les fibroblastes, macrophages, mastocytes, cellules de Schwann et CS. Les fibroblastes sont les cellules majoritaires du derme. Ils jouent un rôle essentiel dans la régulation de la physiologie de la peau en sécrétant des protéines de la MEC du derme et en communiquant avec les autres types cellulaires en libérant des facteurs de croissance, interleukines et prostaglandines. En fonction de leur localisation dans ce tissu, deux sous-populations de fibroblastes coexistent : les fibroblastes papillaires et les fibroblastes réticulaires. Ces cellules se distinguent par leur taille, leur activité mitotique, leur fonction immunomodulatrice, leur capacité de contraction et le type de molécules qu'elles synthétisent (protéases, facteurs de croissance, cytokines, molécules d'adhésion, protéines de structure) (Stunova and Vistejnova, 2018) (**Tableau 1**).

Dans le derme papillaire, les fibroblastes sont fusiformes et dotés de longs prolongements cytoplasmiques. Ils se divisent rapidement et sont principalement impliqués dans les réponses immunitaires. Dans le derme réticulaire, en revanche, les fibroblastes adoptent une morphologie plus étoilée. Ils prolifèrent lentement et interviennent dans la cicatrisation des plaies cutanées, notamment durant la phase d'inflammation et de

prolifération, en sécrétant des constituants de la MEC et un ensemble de molécules de signalisation juxtacrine et paracrine, modulant ainsi les fonctions des cellules immunitaires, des cellules endothéliales, des mastocytes et des kératinocytes (Stunova and Vistejnova, 2018).

	Papillary fibroblast	Reticular fibroblasts
GENERAL CHARACTERISTICS		
Size (diameter of cells in suspension)	small	large
Shape	spindle	stellate, flattened
Edge of the cell	smooth	rough
Proliferation rate	high	low
Collagen contraction	low	high
Density in monoculture	high	low – contact inhibition
Focal adhesions	rare	abundant
Effect on keratinocytes	complete keratinocyte differentiation, thicker keratinocyte layer	defective keratinocyte differentiation, thinner keratinocyte layer
Angiogenesis	promote angiogenesis	no effect
Gene expression (GO term analysis)	genes involved in immune response	genes involved in cytoskeletal organization, cell motility
ECM PRODUCTION		
Collagen I	low	high
Collagen VI alpha 1	high	low
Collagen VI alpha 2	low	high
Collagen XVI	high	low
Versican	low	high
Decorin	high	low
Fibromodulin	high	low
GAG	high	low
SPECIFIC PROTEIN SYNTHESIS		
α -SMA	low	high
KGF	low	high
MMPs, TIMPs	higher with donor age	constant with donor age
HGF	high	low
TGF- β	low	high
CTGF, Hsp47	low	high
Podoplanin	high	no production
Transglutaminase 2	no production	high

Tableau 1 : Caractéristiques générales des fibroblastes papillaires et réticulaires.
D'après (Stunova and Vistejnova, 2018).

1.2 Les microARNs dans la peau

1.2.1 La localisation génomique et biogenèse des microARNs

Localisation génomique

Les gènes de microARNs peuvent être classés en quatre groupes selon leur localisation génomique : présents dans un intron ou un exon, dans une région codante ou non codante pour une protéine (**Figure 6**). La majorité des gènes de microARNs sont localisés dans les introns de gènes codant des protéines (Ambros, 2001; Lagos-Quintana et al., 2001; Mourelatos et al., 2002). De ce fait, ils peuvent être soit co-transcrits avec leur gène hôte (Rodriguez et al., 2004), soit transcrits de manière indépendante grâce à leur propre promoteur (Ozsolak et al., 2008). Dans le cas où les gènes de microARNs sont localisés dans les exons de gènes codant une protéine, leur expression est intimement liée à l'expression de leur gène hôte.

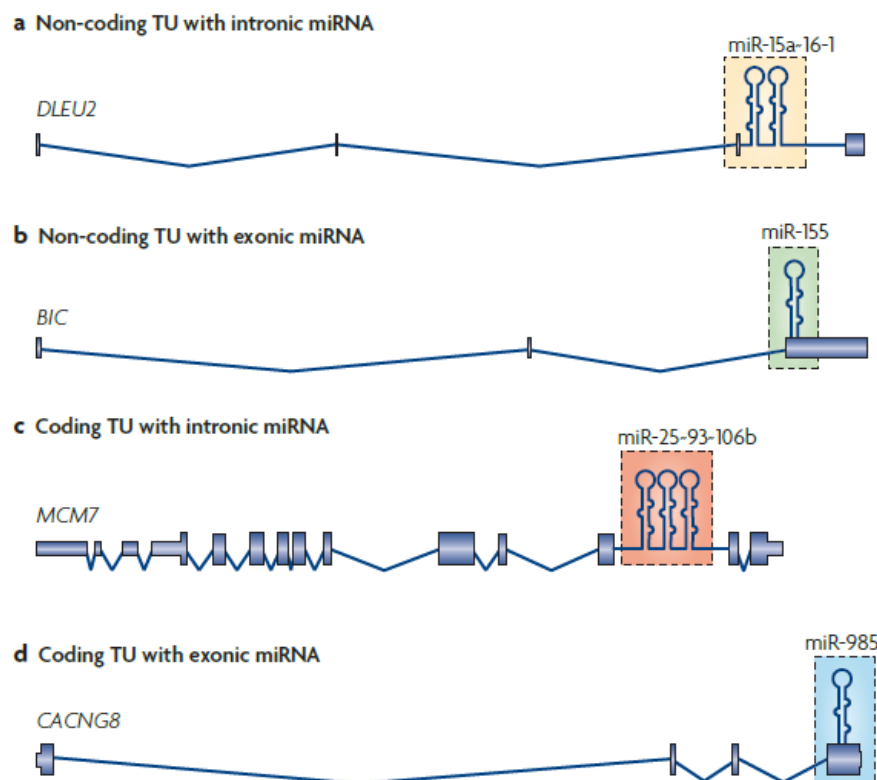


Figure 6 : Localisation génomique des microARNs.

Les séquences géniques des microARNs peuvent être localisées dans (A) l'intron d'un gène non codant (microARN-15a-16-1), ou (B) l'exon d'un gène non codant (microARN-155) ou (C) dans l'intron d'un gène codant (microARN-25-93-106b) ou (D) dans l'exon d'un gène codant (microARN-985). D'après (Kim et al., 2009b).

Biogenèse des microARNs

L'expression des microARNs est régulée par de nombreux facteurs de transcription, tels que p53, MYC, ZEB1/2 (*Zinc finger E-box homeobox*), HIF1 α (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) et AP-1 (*Activator protein 1*), et des facteurs de remodelage de la chromatine (Ali Syeda et al., 2020). Saito et ses collègues ont notamment montré que le promoteur du microARN-127 est hyperméthylé au niveau des îlots CpG dans le cancer de la vessie (Saito et al., 2006). Cette modification épigénétique entraîne l'inactivation de la transcription du microARN-127 et par conséquent, la dérégulation de sa cible transcriptomique, le proto-oncogène Bcl-6 (*B Cell Lymphoma 6*), impliqué dans la différenciation des lymphocytes T helper folliculaires et la progression tumorale.

Dans la plupart des cas, la transcription des gènes de microARNs est effectuée par l'ARN polymérase de type II (Lee et al., 2004). Cette étape permet la production d'un transcrit primaire (pri-miARN ou pri-miR) pouvant être monocistronique (**Figure 6B et Figure 6D**) ou polycistronique (**Figure 6A et Figure 6C**).

Du point de vue de la structure, le pri-miR est long de plusieurs milliers de pb et se caractérise par la présence d'une ou plusieurs structures secondaires en tige-boucle d'environ 80 nt (Kim et al., 2009b; Lee et al., 2003). Il possède une coiffe 7-méthyl-guanosine (m⁷GpppN) en extrémité 5' et une queue polyadénylée en extrémité 3' (Cai et al., 2004).

La **voie de biogenèse canonique** des microARNs implique que le pri-miR subit deux étapes successives de maturation avant de pouvoir être incorporé au sein d'un complexe effecteur et exercer sa fonction de régulation post-transcriptionnelle.

Dans un premier temps, la structure en tige boucle du pri-miR est reconnue par un complexe nucléaire hétérotrimérique de 364 kDa, désigné Microprocesseur (*Microprocessor*). Ce complexe est composé de la RNase III DROSHA et de deux molécules de DGCR8 (*DiGeorge syndrom Chromosomal Region 8*) (Han et al., 2004). Le domaine de liaison de l'hème (Rhed) de DGCR8 favorise la dimérisation de la protéine, tandis que ses deux domaines de liaison à l'ARN bicaténaire (dsRBD) permettent son interaction avec la jonction entre la tige d'ARN double brin (ARNdb) et les extrémités d'ARN simple brin flexibles en 5' et 3', et la tige d'ARNdb du pri-miR (Lee et al., 2003; Nguyen et al., 2015). La protéine DGCR8 contient

également une région C-terminale (CTT) qui sert d'ancre moléculaire à DROSHA, incapable de lier l'ARNdb directement (**Figure 7A, Figure 7C et Figure 7D**). DROSHA possède en position C-terminale un domaine de liaison à l'ARNdb (dsRBD) ainsi que deux domaines catalytiques RNase III (RIIIda et RIIIDb) en tandem, qui s'organisent en un dimère intramoléculaire. Grâce à son domaine dsRBD, DROSHA peut interagir transitoirement avec la tige du pri-miR. Les RIIIda et RIIIDb clivent respectivement le pri-miR sur le brin en 3' et en 5' à environ 11 nt de la base de sa tige (**Figure 7A, Figure 7C et Figure 7D**) (Gregory et al., 2004; Han et al., 2006; Yeom et al., 2006). Chez l'Homme, le clivage du pré-miR par DROSHA est stimulé par la présence de trois motifs : UG proche de la base de la tige, CNNC à l'extrémité 3' et UGUG dans la boucle des microARNs (**Figure 7B**) (Auyeung et al., 2013). Cette première étape de maturation génère un microARN précurseur (pré-miARN ou pré-miR), long d'environ 70 nt, caractérisé par une structure en épingle à cheveux avec une extrémité 5' phosphate et une extrémité 3'-hydroxyle sortante de 2 nt (Gregory et al., 2004; Lee et al., 2003).

Le pré-miR est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme grâce au complexe Exportine-5 (Exp5)-Ran-GTP, où il subit une deuxième étape de maturation (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003).

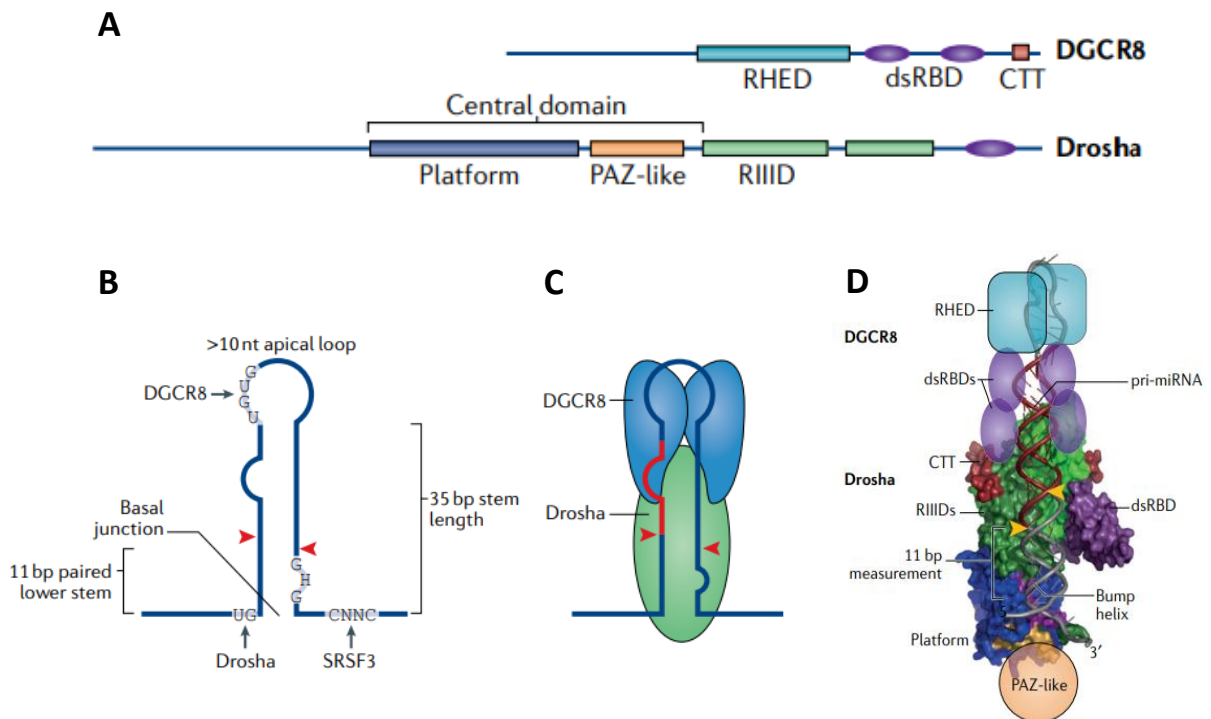


Figure 7 : Structure du complexe DROSHA-DGCR8.

(A) Représentation schématisée des domaines fonctionnels des protéines DROSHA et DGCR8 humaines. PAZ, *Piwi-Argonaute-Zwille* ; RIIID, domaine RNase III ; dsRBD, domaine de liaison à l'ARN double brin ; Rhed, domaine de liaison de l'hème ; CTT, extrémité C-terminale. (B) Représentation schématisée de la séquence du pri-miR et des sites de clivage par DROSHA. Les sites de clivage sont indiqués par des flèches rouges. (C-D) Modélisation du pri-miR au sein du complexe Microprocesseur composé de deux molécules de DGCR8 et d'une molécule de DROSHA. D'après (Treiber et al., 2019).

Dans le cytoplasme, le pré-miR est incorporé dans un complexe formé de la RNase III Dicer, et de ses deux co-facteurs : TRBP (*TAR RNA binding protein 2*) et PACT (*Protein activator of PKR*).

Dicer est composée d'un domaine de liaison à l'ATP (Adénosine triphosphate), d'un domaine de liaison à l'ARN hélicase, d'un domaine PAZ (*Piwi-Argonaute-Zwille*), d'un domaine dsRBD et de deux domaines RIIIDa et RIIIDb en tandem. Ces derniers se dimérisent pour former le cœur catalytique de l'enzyme (**Figure 8A et Figure 8B**). Dicer clive le pré-miR à la base de sa boucle, à environ deux tours d'hélice de la base de la tige, libérant ainsi un duplex composé de deux brins d'ARN, longs de 20 nt environ, partiellement complémentaires et possédant deux nt libres aux extrémités 3' (Chendrimada et al., 2005; Grishok et al., 2001; Ketting et al., 2001) (**Figure 8C**).

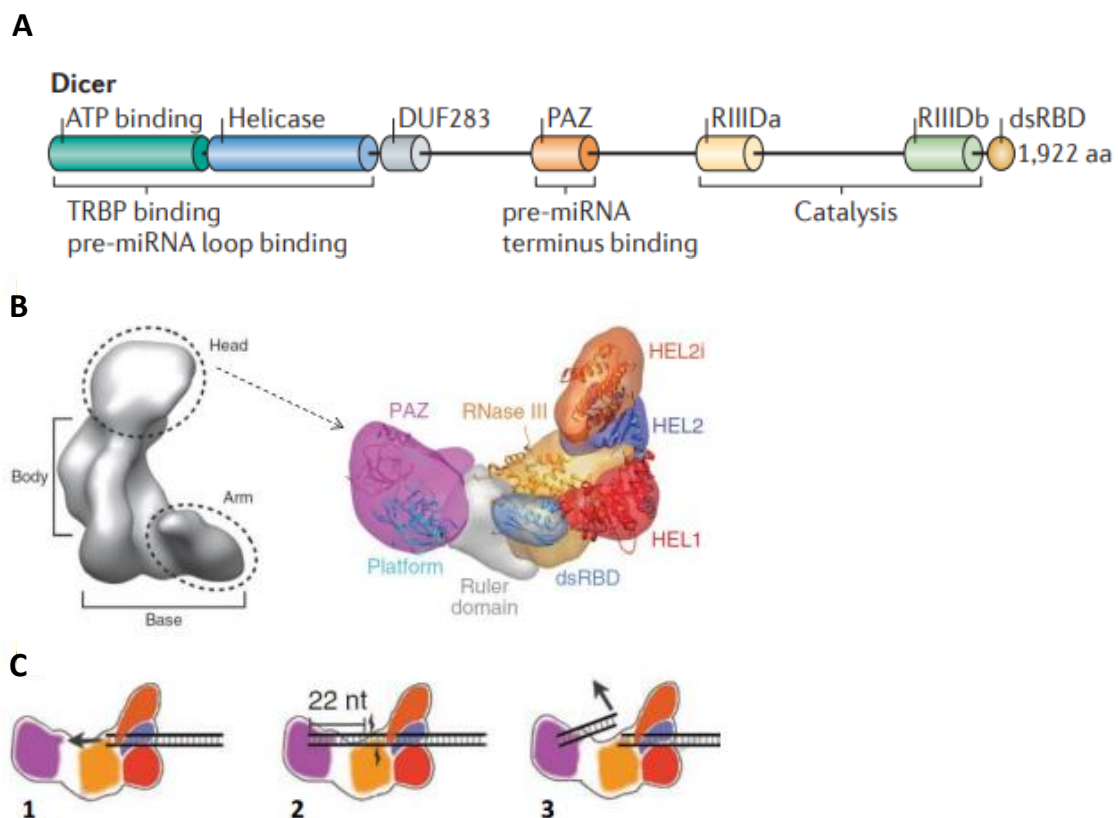


Figure 8 : La protéine Dicer.

(A) Représentation schématisée des domaines fonctionnels de la protéine Dicer humaine. Domaine de liaison à l'ATP ; domaine Helicase ; DUF283, domaine de fonction inconnue ; PAZ, Piwi-Argonaute-Zwille ; RIIID, domaine RNase III ; dsRBD, domaine de liaison à l'ARN double brin. D'après (Ha and Kim, 2014). (B) Structure tridimensionnelle de Dicer humaine. D'après (Lau et al., 2012). (C) Mode d'action de Dicer. D'après (Lau et al., 2012).

Bien que Dicer soit capable de cliver les pré-miR indépendamment de ses co-facteurs, plusieurs études ont montré le rôle clé de TRBP et PACT dans la stabilisation de l'interaction de Dicer avec le pré-miR. En augmentant l'affinité de Dicer pour son substrat, TRBP augmente non seulement la précision du site de clivage mais aussi la cinétique de clivage des pré-miR par Dicer (Chakravarthy et al., 2010; Lee and Doudna, 2012). Par ailleurs, la délétion ou la sous-expression des gènes *TRBP* ou *PACT* induisent un défaut de maturation des pré-miR et entraîne, par conséquent, une diminution des niveaux d'expression des microARNs matures (Kok et al., 2007; Koscianska et al., 2011; Lee and Doudna, 2012).

Le duplex de microARN ainsi formé est ensuite transféré à une protéine de la famille des Argonautes (Ago) afin de former un complexe ribonucléoprotéique précurseur immature appelé pré-miRNP (*miRNA ribonucleoprotein*), pré-miRISC (*miRNA-induced silencing complex*) ou encore miRLC (*microRNA RISC loading Complex*) (Gregory et al., 2005) (**Figure 9**).

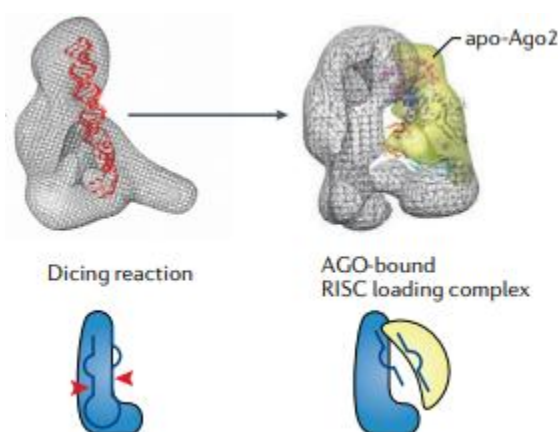


Figure 9 : Formation du pré-miRNP immature. D'après (Treiber et al., 2019).

Chez les mammifères, il existe quatre protéines Ago (Ago1-4), chacune possédant deux domaines de liaison aux ARN en position N-terminal : PAZ et MID (*Middle*). Le domaine PAZ contient une cavité hydrophobe impliquée dans la reconnaissance des deux nt sortants de l'extrémité 3' du duplex de microARN (Lingel et al., 2004; Ma et al., 2004). Le domaine MID, quant à lui, se lie fermement à l'extrémité 5' phosphate du duplex. Cette interaction crée une torsion au niveau du premier nt du microARN (Elkayam et al., 2012). Seule la protéine Ago2 contient un domaine endonucléase fonctionnel PIWI (*P-Element induced*

wimpy testis) permettant le clivage des ARNm parfaitement appariés aux microARNs (Hammond et al., 2001; Meister et al., 2004; Jo et al., 2015). L'activité catalytique d'Ago2 est conférée par une triade catalytique constituée des acides aminés : acide aspartique, acide aspartique, histidine (DDH) et d'un quatrième acide aminé aléatoire, pour former une tétrade catalytique (DEDH) (Liu et al., 2004; Nakanishi et al., 2012). Des analyses quantitatives ont révélé que dans la peau les microARNs interagissaient très souvent avec Ago2 (60 %), parfois avec Ago1 (30 %) et rarement avec Ago3 (<10%) (Wang et al., 2012a). Kawamata et ses collègues ont mis en évidence les déterminants structuraux impliqués dans ces interactions moléculaires (Kawamata et al., 2009). L'existence d'un mésappariement central dans le duplex dirige le duplex vers Ago1 tandis que les duplex présentant des mésappariements aux extrémités 3' sont incorporés dans Ago2. L'étape d'assemblage du duplex à l'intérieur de la protéine Ago nécessite l'intervention de protéines chaperonnes, telles que HSC70 (*Heat Shock Cognate 70kDa protein*) et HSP90 (*Heat Shock 90KDa Protein*) ainsi que l'hydrolyse de l'ATP. Cette hydrolyse induit des changements conformationnels de la protéine Ago, lui permettant d'accepter plus facilement le duplex (Mourelatos et al., 2002; Czech and Hannon, 2011).

Lorsque le complexe Ago2-duplex de microARN est formé, les deux brins du microARN sont dissociés par l'activité hélicase du complexe pré-miRNP. L'un des deux brins, généralement celui dont l'extrémité 5' est la plus thermostable, est éliminé (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Ce brin est communément appelé brin passager et dénoté miARN*. A l'inverse, le brin le moins thermostable est sujet à une meilleure torsion moléculaire, favorisant son ancrage dans la poche PAZ/MID d'Ago. Ce brin est communément appelé brin guide ou microARN mature. Toutefois, lorsque les deux brins du microARN présentent des niveaux de stabilité thermodynamique très similaires, la sélection du brin passager est déterminée par d'autres facteurs, encore mal compris. De récents travaux ont démontré la fonctionnalité du brin passager du microARN-21 dans la régulation de la prolifération et de l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes (Báez-Vega et al., 2016; Degueurce et al., 2016; Ge et al., 2016), la progression des carcinomes à cellules squameuses (Ge et al., 2016) et l'inflammation de la peau (Degueurce et al., 2016) (Abdallah et al., Cellular and Molecular Life Sciences, en révision).

Depuis la mise en évidence de la capacité du brin passager à moduler l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel, la base de données miRBase a abandonné l'ancienne nomenclature des brins de microARN (miR/miR*). Désormais, la nouvelle nomenclature utilise les suffixes -5p et -3p, selon si les brins proviennent de l'extrémité 5' ou 3' du pré-miR.

La **Figure 10** récapitule la voie canonique de biogenèse des microARNs.

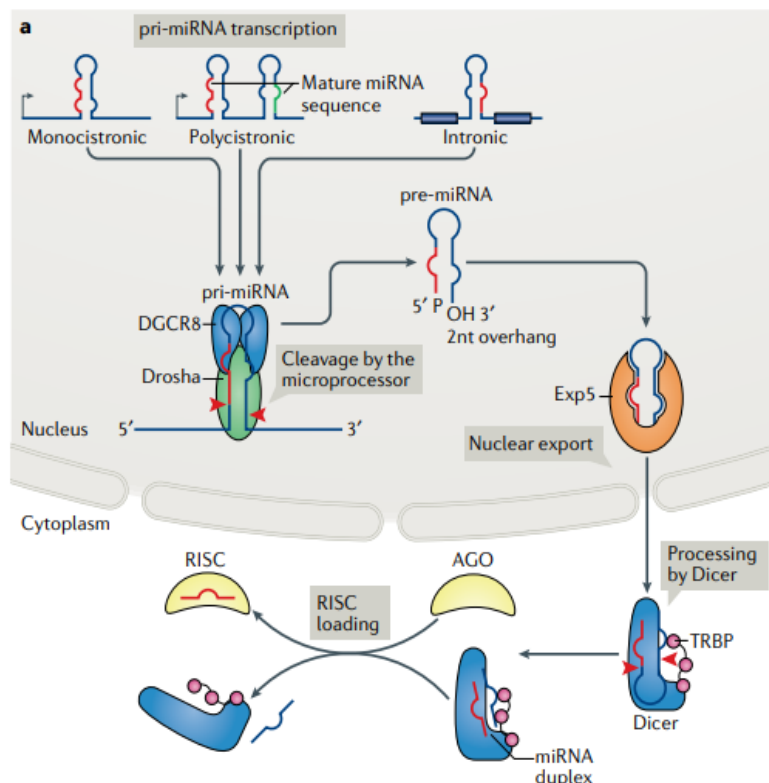


Figure 10 : Voie canonique de biogenèse des microARNs.

Le transcrit primaire de microARN (pri-miR) est d'abord clivé par le complexe Microprocesseur, composé de la RNase III Drosha et de son co-facteur DGCR8, pour générer un microARN précurseur (pré-miR) d'environ 70 nt de long. Celui-ci est ensuite exporté du noyau vers le cytoplasme par l'intermédiaire du complexe Exportine-5 (Exp5)/Ran-GTP avant d'être clivé par le complexe formé de la RNase III Dicer et d'un de ses co-facteurs TRBP (*TAR RNA binding protein 2*), générant un duplex d'une vingtaine de pb. La protéine TRBP recrute alors une protéine de la famille des Argonaute (Ago) pour former un complexe précurseur immature, appelé *RNA induced silencing complex* (RISC) ou pré-RISC. Lorsque les deux brins du duplex sont parfaitement complémentaires, un des brins (brin passager) est éliminé par clivage endonucléolytique par Ago2. Dans le cas où l'appariement entre les deux brins est imparfait, le brin possédant l'extrémité 5' la plus thermostable est éliminé par déroulement des deux brins grâce au domaine N-terminal de la protéine Ago et au domaine hélicase de Dicer. L'élimination du brin passager permet la dissociation des protéines Dicer et TBP et la formation d'un complexe RISC mature fonctionnel contenant le brin mature. D'après (Treiber et al., 2019).

Bien que la majorité des microARNs soient synthétisés par la voie de biogenèse canonique, des **voies alternatives de biogenèse non canonique des microARNs**, indépendantes de DROSHA ou de DICER, ont été décrites (Kim et al., 2016).

- La voie de biogenèse indépendante de DROSHA concerne les mirtrons (**Figure 11A**). Ces petits microARNs, initialement identifiés chez *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*, dérivent d'introns de très petite taille. Ils sont produits durant la réaction d'épissage des pré-ARNm par le spliceosome (Ruby et al., 2007). L'intron comprenant le précurseur de mirtron (pré-mirtron) est libéré sous forme de lasso avant d'être linéarisé par DBR1 (*Debranching enzyme 1*) pour permettre le repliement du pré-mirtron en épingle à cheveux. Le pré-mirtron est ensuite directement exporté dans le cytoplasme par l'intermédiaire de l'Exp5 où il poursuit sa maturation en empruntant la même voie de biogénèse que le microARN canonique (Okamura et al., 2007). Une étude récente a montré qu'il existe environ 240 mirtrons chez l'Homme et 237 chez la souris (Ladewig et al., 2012).

- La voie de biogenèse indépendante de Dicer concerne le microARN-451 (**Figure 11B**). Le pri-miR-451 est pris en charge par le Microprocesseur par la voie classique avant d'être exporté dans le cytoplasme à l'aide de l'Exp5. Contrairement aux pré-miR conventionnels, le pré-miR-451 est plus court. Sa tige forme un duplex de 17 pb, trop court pour être clivé par Dicer. Le pré-miR-451 est par conséquent directement incorporé au sein de la protéine effectrice Ago2, qui, grâce à son domaine endonucléase fonctionnel, est capable de cliver le pré-miR-451 pour finaliser sa maturation. Ago2 clive le pré-miR-451 dans son brin 3', générant un ARN de 30 nt de long. Ce dernier subit, par un mécanisme encore mal compris, une résection de l'extrémité 5' pour donner naissance à un microARN mature de 23 nt (Cheloufi et al., 2010; Yang et al., 2010).

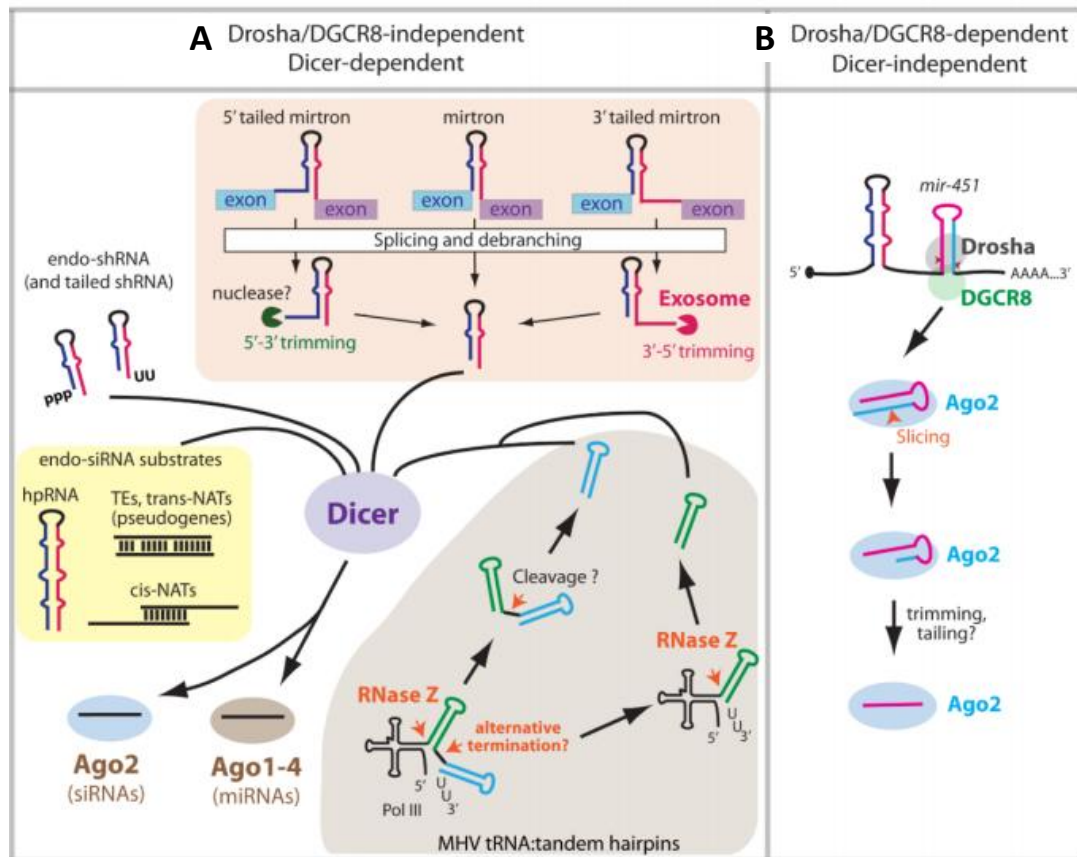


Figure 11 : Représentation schématique des différentes voies alternatives de biogenèse des microARNs.

(A) Voie de biogenèse indépendante de DROSHA/DGCR8. (B) Voie de biogenèse indépendante de Dicer. Adaptée de (Yang and Lai, 2011).

1.2.2 Le mécanisme d'interaction moléculaire entre les microARNs et leurs cibles transcriptomiques

Chez les animaux, les sites de liaison aux microARNs, appelés MRE (*microRNA response elements*), se situent le plus souvent dans la région 3'-UTR des ARNm, dans des régions peu structurées, riches en AU et au-delà des 15 premiers nucléotides en aval du codon d'arrêt de la traduction (Lee et al., 1993; Grimson et al., 2007; Bartel, 2009). D'autres MRE non conservés, localisés dans la région 5'-UTR et la séquence codante ont été identifiés (Forman et al., 2008; Dharap et al., 2013; Xu et al., 2014; Zhang et al., 2018). Reczko et ses collègues ont notamment montré, grâce à une approche computationnelle, que les ARNm possédant une courte région 3'-UTR sont préférentiellement ciblés par les microARNs au niveau de leur séquence codante (Reczko et al., 2012).

Plusieurs modes d'appariement entre le microARN et son ARNm cible ont été décrits (Bartel, 2009, 2018). Chez les mammifères, contrairement aux plantes, l'appariement du microARN par complémentarité des bases aux MRE n'est pas parfait et donc partiel. Dans la plupart des cas, une région conservée du microARN, appelée *seed*, est parfaitement complémentaire au MRE. Cette région comprend les nucléotides 2 à 7 situés à l'extrémité 5' du microARN (Ellwanger et al., 2011; Xu et al., 2014). Les microARNs possédant la même *seed* sont regroupés en familles et peuvent réguler l'expression des mêmes ARNm (Bartel, 2009, 2018). Des études ont montré qu'une substitution de nucléotides dans la *seed* perturbe l'appariement du microARN avec le MRE, entraînant une perte de fonction des microARN (Doench and Sharp, 2004; Lai et al., 2005). Des appariements additionnels en 3' du microARN sont parfois observés et renforcent l'interaction du microARN avec sa cible (Bartel, 2009; Broughton et al., 2016) (**Figure 12**). Ainsi, deux microARN d'une même famille pourront réguler différemment l'expression génique d'une même cible. Le microARN possédant une plus forte complémentarité des bases en 3' avec la cible exercera un effet inhibiteur plus important (Brennecke et al., 2005).

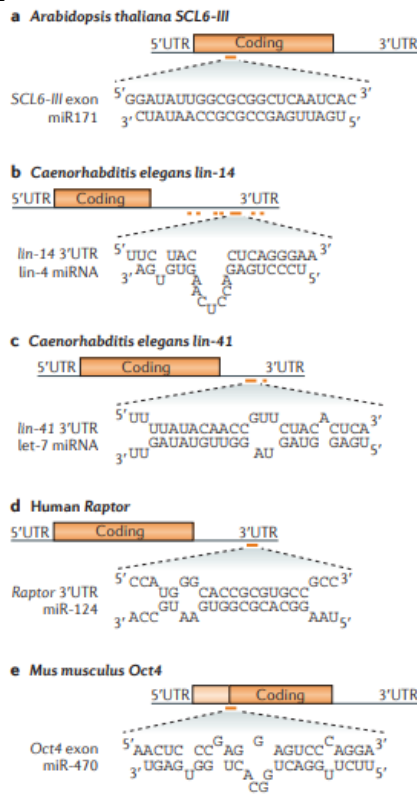
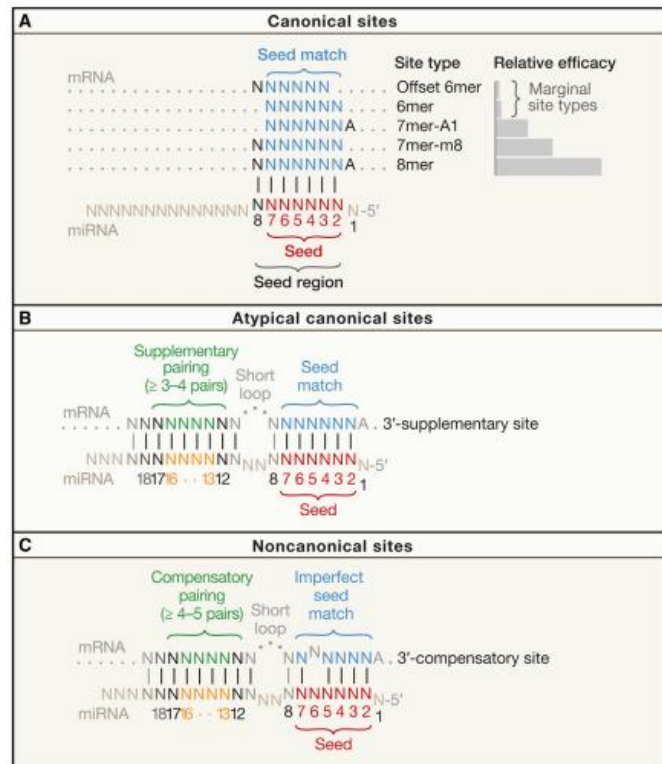
A**B**

Figure 12 : Différents sites d'interaction entre le microARN et son ARNm cible.

(A) Chez les plantes, l'appariement entre la séquence du microARN et celle de sa cible est parfaite (exemple a), tandis que chez les animaux l'appariement est généralement imparfait (exemples b, c, d et e). Les microARNs reconnaissent très souvent des sites de liaison dans la région 3'-UTR de leurs transcrits cibles. Dans certains cas, ils peuvent lier la région 5'-UTR et la région codante des ARNm ciblés. D'après (Pasquinelli, 2012). (B) Les sites de reconnaissance canoniques consistent en un appariement parfait entre la région *seed*, composée des nucléotides 2 à 7 en 5' (en rouge), et le site de liaison situé dans la région 3'-UTR de l'ARNm (en bleu). La présence d'une Adénine (A) en 3' de la région complémentaire de la seed favorise la liaison du complexe miRNP à l'ARNm. Une petite fraction des sites canoniques (< 5%) bénéficient d'un appariement supplémentaire à l'ARNm au niveau des nucléotides 13 à 16 dans la séquence 3' du microARN. D'après (Bartel, 2018).

1.2.3 Les différents modes d'action des microARNs

Les microARNs exercent leur activité régulatrice par deux mécanismes principaux : la répression de la traduction, et la déstabilisation de l'ARNm cible suivie de sa dégradation (Pasquinelli, 2012).

Bien que la prédominance de l'un ou l'autre de ces mécanismes soit encore débattue, des travaux menés sur le poisson zèbre et la drosophile ont suggéré que ces deux mécanismes de régulation peuvent être consécutifs (Bazzini et al., 2012; Djuranovic et al., 2012).

Répression de la traduction

Plusieurs mécanismes de répression traductionnelle par les microARNs ont été proposés : l'inhibition de l'initiation de la traduction de l'ARNm ciblé (Pillai et al., 2005; Wang et al., 2006; Mathonnet et al., 2007), l'inhibition de l'élongation de la chaîne polypeptidique (Olsen and Ambros, 1999; Lytle et al., 2007), la dégradation des polypeptides naissants par le protéasome (Giraldez et al., 2006; Nottrott et al., 2006; Wu et al., 2006) et la dissociation prématurée des deux sous unités ribosomiques durant l'élongation (Petersen et al., 2006) (**Figure 13**).

Les premières études menées chez *C.elegans* ont permis de mettre en évidence que le microARN lin-4 régule l'expression de *lin-14* et *lin-28* sans affecter leurs niveaux d'ARNm (Olsen and Ambros, 1999; Seggerson et al., 2002). Plusieurs laboratoires ont révélé la présence d'ARNm ciblés par les microARNs dans les fractions polysomales lourdes après le fractionnement d'extraits de cellules mammifères sur un gradient continu de sucrose (Maroney et al., 2006; Nottrott et al., 2006; Petersen et al., 2006). Ces observations ont favorisé dans un premier temps l'hypothèse que le mécanisme d'inhibition par les microARNs a lieu après que la traduction ait été initiée.

Cependant, en dépit de ces résultats, Pillai et al. ont suggéré que la répression traductionnelle s'effectue lors de l'initiation de la traduction (Pillai et al., 2005). Les auteurs

ont montré que dans les cellules HeLa, le microARN let-7 inhibe la traduction des ARNm de gènes rapporteurs contenant des MRE pour let-7 dans leur région 3'-UTR.

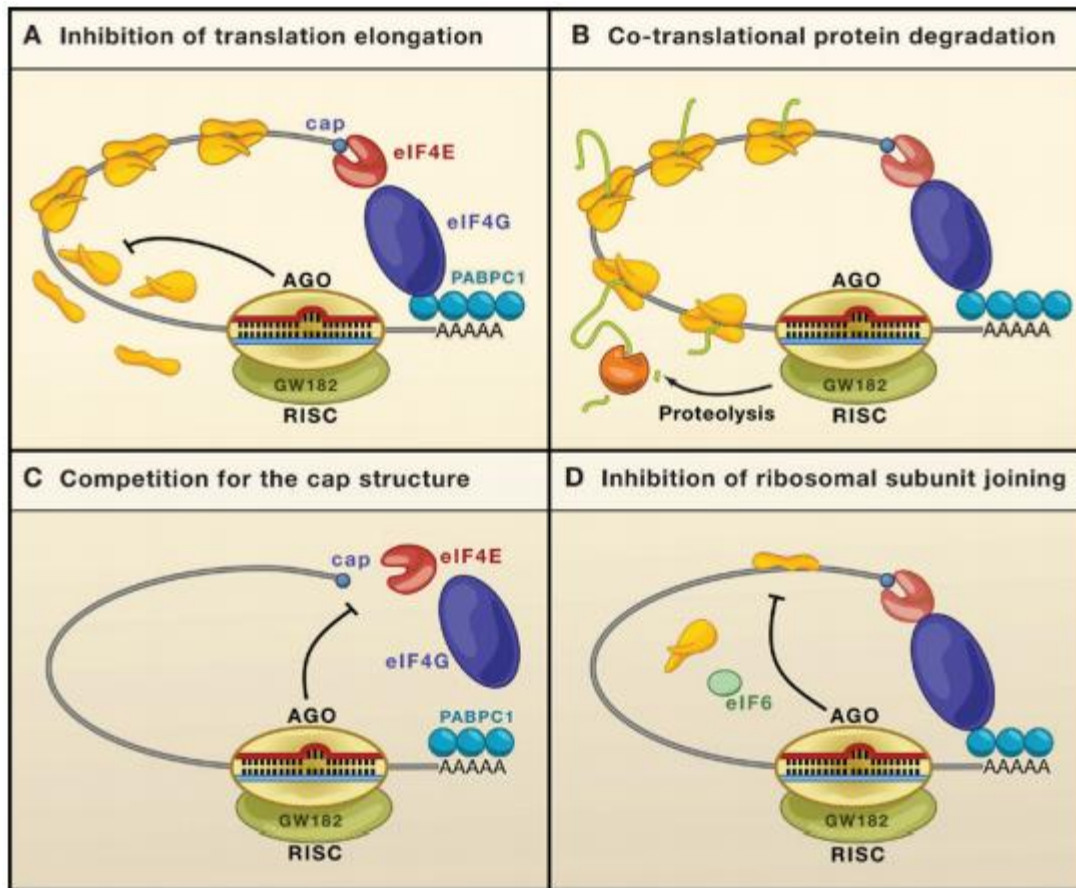


Figure 13 : Les différents mécanismes proposés dans la répression de la traduction des ARNm ciblés par les complexes miRNP/RISC.

L'interaction entre un microARN présent au sein du complexe miRNP/RISC (*micronucleoprotein/RNA induced silencing complex*) et le site de liaison d'un ARN peut réprimer la traduction soit (A) en inhibant l'élongation de la traduction ou induisant la dissociation des sous-unités ribosomiques (*ribosome drop-off*), soit (B) en causant la dégradation cotraductionnelle des chaînes polypeptidiques naissantes par une protéase inconnue, soit (C) en bloquant l'initiation de la traduction en interagissant avec la coiffe de l'ARNm en 5'-UTR, soit (D) en empêchant l'association des deux sous-unités formant le ribosome mature via le recrutement du facteur d'initiation eIF6 (*eukaryotic initiation factor 6*) liant la sous-unité ribosomique 60S. D'après (Eulalio et al., 2008).

Les ARNm ciblés par let-7 ne co-sédimentent pas avec les polysomes dans les gradients de sucrose, mais plutôt dans les fractions plus légères, appauvries en ribonucléoprotéines. De manière intéressante, l'utilisation d'ARNm de virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) ou de l'hépatite C (HCV), dont la traduction démarre au niveau des séquences IRES (*Internal ribosome entry site*), rend les ARNm insensibles à la répression traductionnelle (Pillai et al., 2005). Ces données expérimentales ont conduit les chercheurs à supposer que le mécanisme d'inhibition de l'initiation de la traduction dépend de la présence de la coiffe fonctionnelle m⁷GpppN en 5' des ARNm ciblés. Cette théorie a été confirmée par plusieurs études, montrant que les ARNm pourvus d'une coiffe non fonctionnelle m⁷ApppN ne sont pas sujets à la répression par les microARNs (Humphreys et al., 2005; Mathonnet et al., 2007; Thermann and Hentze, 2007). Kiriakidou et al. ont montré qu'Ago2 possède un sous-domaine conservé (acides aminés 468 à 520) dans son domaine MID capable d'entrer en compétition avec la protéine du complexe d'initiation eIF4E (*Eukaryotic initiation factor 4E*) pour lier la coiffe m⁷GpppN de l'ARNm ciblé. Les auteurs ont démontré que ce domaine, appelé MC, est indispensable pour réprimer l'initiation de la traduction puisque la substitution de deux phénylalanines par deux tryptophanes (F470W et F505W) abolit l'inhibition de la traduction médiée par Ago2 (Kiriakidou et al., 2007). La surexpression du facteur d'initiation eIF4E et eIF4F lève la répression de la traduction par les microARNs et active la traduction (Mathonnet et al., 2007; Nissan and Parker, 2008). L'ensemble de ces résultats a permis d'établir le modèle mécaniste selon lequel le microARN bloque l'initiation de la traduction en interférant avec la formation du complexe d'initiation eIF4E (Jackson and Standart, 2007; Eulalio et al., 2008; Filipowicz et al., 2008).

Chez les mammifères, le mécanisme de répression traductionnelle des ARNm par les microARNs nécessite le recrutement par Ago d'une protéine de la famille TNRC6 (*Trinucleotide containing 6*, existant sous trois paralogues TNRC6A/B/C). La plupart des travaux publiés à ce jour se sont intéressés au rôle la protéine TNRC6A, également appelée GW182 (*GW repeats proteins of 182 kDa*), dans le processus d'interférence par l'ARN. L'association de GW182 est indispensable à la répression des ARNm par les miRNP. Afin d'inhiber l'initiation de la traduction, la protéine GW182 interagit avec la protéine de liaison à la queue poly(A) (PABPC) de manière à empêcher sa liaison au complexe d'initiation eIF4F (eIF4E/eIF4G/eIF4A), et ainsi bloquer la circularisation de l'ARNm. Une étude récente a mis

en évidence la capacité de GW182 à recruter directement le facteur d'initiation eIF4E2 sur la coiffe de l'ARNm. Contrairement à son homologue eIF4E, ce facteur inhibe la traduction du transcrit (Chen and Gao, 2017).

Destabilisation et de dégradation des ARNm ciblés

Outre son rôle dans la répression traductionnelle, la protéine GW182 joue un rôle important dans la destabilisation des ARNm ciblés par le complexe miRNP/RISC (**Figure 14**). Suite à l'interaction du microARN avec le MRE, GW182 recrute des complexes de déadénylation PAN2/PAN3 (*Poly(A)-deadenylase*) et CCR4-NOT1 (*Carbon catabolite repressor protein 4-negative on TATA*) (Fabian et al., 2011; Christie et al., 2013). Doté de l'exonucléase CAF1 (*Chromatin assembly factor-1*), le complexe CCR4-NOT1 digère la queue poly(A) dans la direction 3' vers 5'. La déadénylation de l'ARNm destabilise la structure de l'ARNm et initie l'étape de décoiffage de l'ARNm par le complexe DCP1-DCP2 et ses partenaires protéiques, tels que l'hélicase ATP-dépendante DDX6 (*DEAD box helicase 6*). Le décoiffage de l'ARNm entraîne sa dégradation dans la direction 5' vers 3' par l'exonucléase XRN1 (Behm-Ansmant et al., 2006; Chu and Rana, 2006; Chen and Shyu, 2011; Jonas and Izaurralde, 2015). Kamenska et al. ont récemment montré que dans les cellules HEK293 (*Human embryonic kidney 293 cells*), DDX6 induit la répression traductionnelle et la dégradation des ARNm ciblés des microARNs en interagissant directement avec la protéine eIF4E-T (*eIF4E-Transporter*). Cette dernière entre en compétition avec eIF4G pour la liaison à eIF4E (Kawamata et al., 2009). L'inhibition de la traduction par l'interaction DDX6-eIF4E-T s'accompagne de la formation de *P-bodies* (*Processing bodies*) dans le cytoplasme des cellules HeLa (Kawamata et al., 2009).

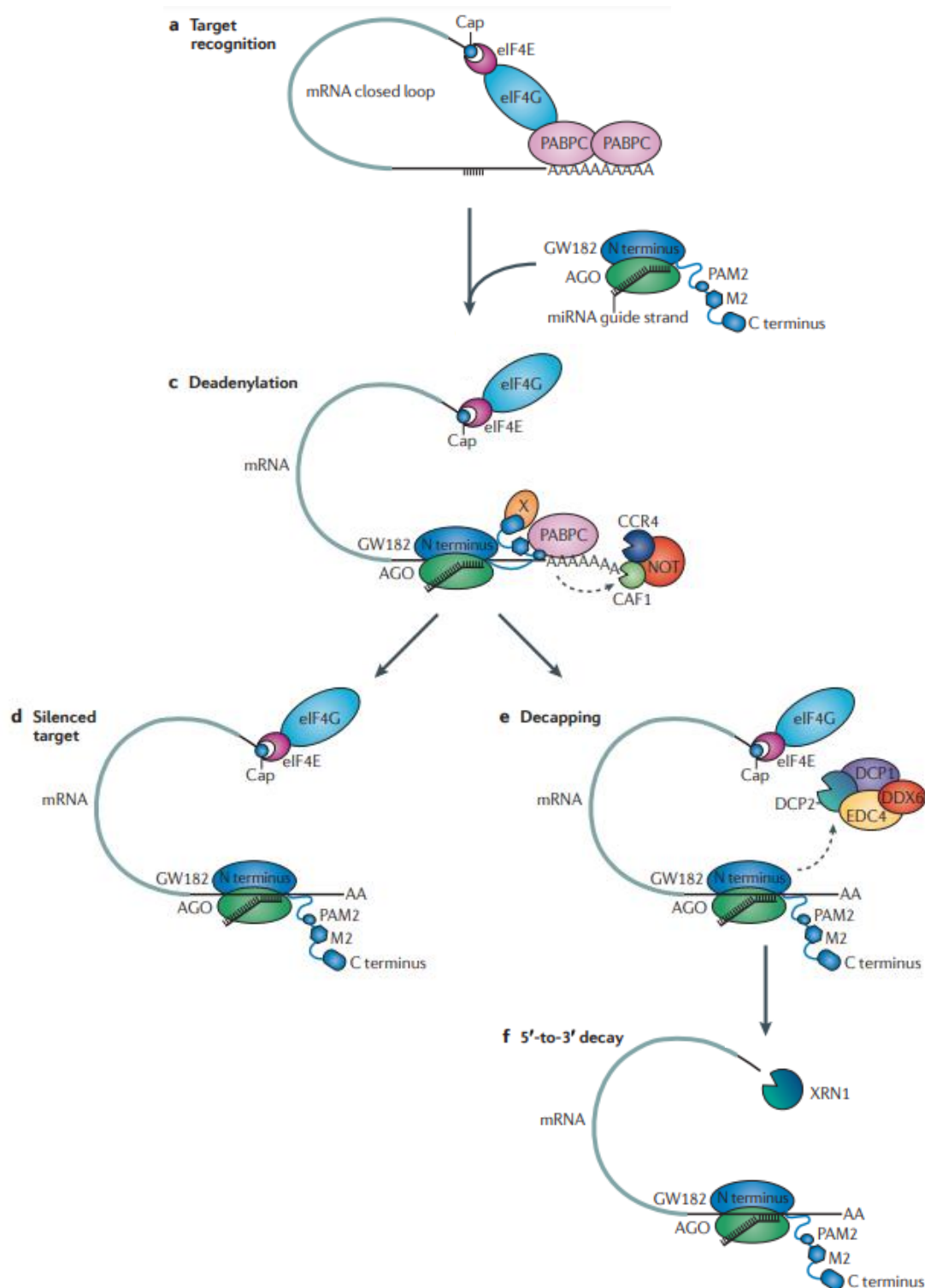


Figure 14 : Mécanisme de destabilisation et de dégradation des ARNm ciblés par les complexes miRNP/RISC.

Le complexe miRNP/RISC contenant le microARN mature simple brin et les protéines Ago et GW182 se fixe sur le MRE de l'ARNm ciblé. La protéine GW182 recrute des complexes de déadénylation dont CCR4-NOT afin de dégrader la queue poly(A) des ARNm. L'ARNm dépourvu de queue poly(A) est ensuite stocké temporairement ou décoiffé par un complexe contenant les enzymes DCP1, DCP2 et DDX6. L'ARNm étant destabilisé, il est rapidement dégradé par l'exonucléase XRN1. D'après (Huntzinger and Izaurralde, 2011).

Chez les animaux, bien qu'une grande majorité des microARN soient impliqués dans le mécanisme d'inhibition de l'expression génique de manière post-transcriptionnelle, des mécanismes d'action alternatifs ont été mis en évidence. Ils concernent la dégradation de l'ARNm par Ago2 (Yekta et al., 2004), l'activation de la traduction des ARNm (Vasudevan et al., 2007; Truesdell et al., 2012; Bukhari et al., 2016; Ni and Leng, 2016) ou encore l'inhibition/activation de la transcription (Kim et al., 2008a; Place et al., 2008; Catalanotto et al., 2016).

1.2.4 L'importance des microARNs dans la peau

1.2.4.1 Dans la morphogenèse et l'homéostasie cutanée

Au début des années 2000, grâce au progrès de la génétique, plusieurs travaux ont mis en évidence l'importance des microARNs dans la morphogenèse cutanée.

Chez la souris, au stade de développement embryonnaire E12.5 (soit E40 chez l'Homme), une ébauche épidermique unicellulaire recouvre le corps de l'embryon. Il s'agit d'un épithélium composé d'une monocouche de CS épidermiques multipotentes en contact avec le liquide amniotique. Très rapidement, cette structure subit une importante maturation. Du stade E12.5 à E15.5, certaines CS de l'épiderme s'engagent dans le processus de différenciation kératinocytaire. D'autres CS en revanche, sous l'influence de signaux moléculaires en provenance du mésenchyme sous-jacent, s'orientent vers un destin différent (Blanpain and Fuchs, 2009). Ces CS s'organisent en placodes ectodermiques et se multiplient pour créer un bourgeon primaire, avant de s'invaginer dans le derme pour former le futur follicule pileux (**Figure 15**). L'espacement et l'orientation des follicules pileux est contrôlé, entre autres, par les voies de signalisation Wnt (*Wingless-related integration site*) et Shh (*Sonic hedgehog*), des inhibiteurs de BMP (*Bone morphogenic protein*) et des facteurs de transcription appartenant à la famille des homéoprotéines, tel que Lhx2 (*LIM homeobox 2*). Dans la peau adulte, la présence de CS dans la membrane basale de l'épiderme IF et dans le bulge du follicule pileux assure le renouvellement cellulaire, la cicatrisation cutanée ainsi que la régénération folliculaire (Blanpain and Fuchs, 2009; Yi and Fuchs, 2010).

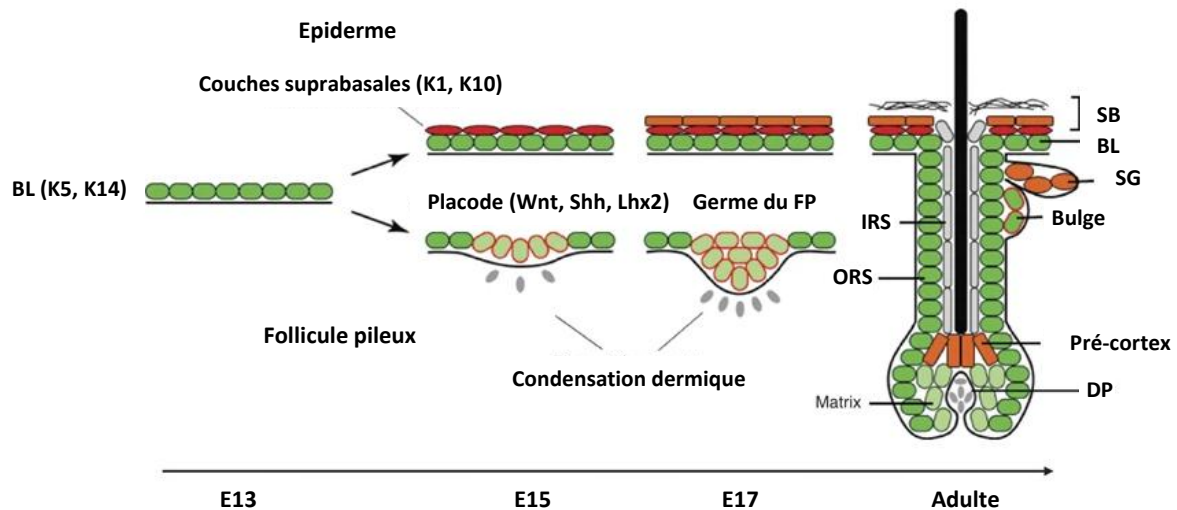


Figure 15 : Représentation schématique du développement embryonnaire de l'épiderme et de la morphogenèse du follicule pileux chez la souris.

Note : BL : membrane basale, ORS : gaine externe du follicule pileux, IRS : gaine interne du follicule pileux, SB : couche suprabasale, SG : glande sébacée, DP : papille dermique. Sur cette figure, les CS épidermiques sont représentées en vert, les CS du follicule pileux sont en vert entourées de rouge, les cellules différenciées de l'épiderme et des glandes sébacées sont en rouge et orange, les cellules différenciées de la gaine interne du bulbe sont en gris et celles de la matrice en vert clair. Adapté de (Yi and Fuchs, 2010).

Yi et ses collègues ont été les premiers à cloner et séquencer des petits ARNnc (18-25 nt) isolés de l'épiderme IF et des follicules pileux d'embryons de souris au stade E17.5. Ils ont montré l'existence de différents profils d'expression de microARNs dans ces deux lignages (**Figure 16A**). Alors que les microARN-16, -20, -21, -24 et -125b sont exprimés dans les deux structures cutanées, les microARN-200a, -141 et -429 sont préférentiellement exprimés dans l'épiderme IF. Les microARN-199a, -199b, -214, -126, -143 et -152 sont quant à eux exclusivement exprimés dans les follicules pileux (Yi et al., 2006).

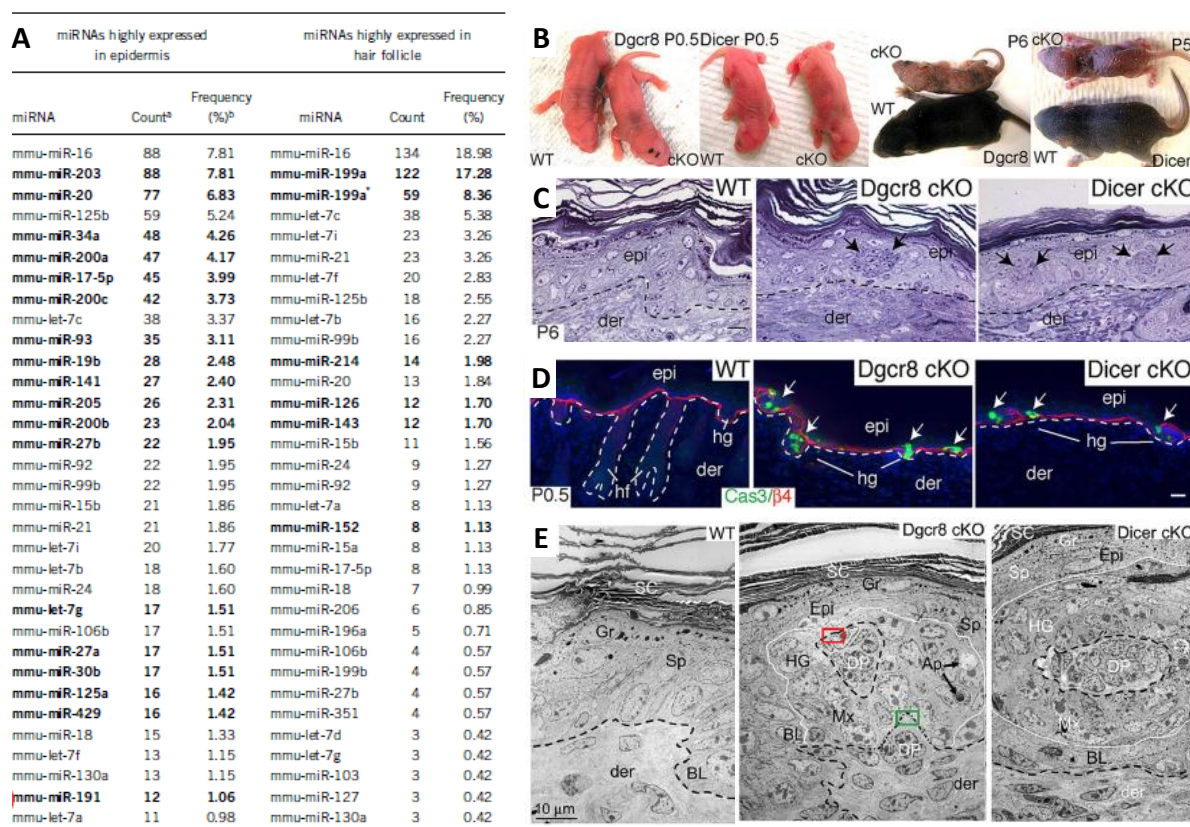


Figure 16 : Rôle essentiel des microARNs dans la morphogénèse de la peau.

(A) Comparaison des différents profils d'expression des microARNs dans l'épiderme et le follicule pileux chez la souris au stade embryonnaire E17.5. D'après (Yi et al., 2006). (B) Similitudes phénotypiques des souris *Dgcr8* et *Dicer* cKO. En comparaison des souris sauvages, les souris *Dgcr8* et *Dicer* cKO présentent des signes de déshydratation sévère ayant pour conséquence l'absence de prise de poids et le développement d'une peau rêche et spameuse. D'après (Yi et al., 2009). (C) Evagination des follicules pileux dans l'épiderme des souris *Dgcr8* et *Dicer* cKO au stade P6. Ces annexes cutanées adoptent un aspect structural en « boules de cellules indifférenciées » déformant l'épiderme (flèches). D'après (Yi et al., 2009). (D) Détection de la Caspase-3 (Cas3) par immunofluorescence démontrant l'enrichissement des cellules apoptotiques dans les follicules pileux des souris *Dgcr8* et *Dicer* cKO. D'après (Yi et al., 2009). (E) Anomalies ultrastructurales de la peau de souris *Dgcr8* et *Dicer* cKO observés au microscope électronique. D'après (Yi et al., 2009).

L'invalidation conditionnelle des gènes *Dgcr8* ou *Dicer1* dans l'épiderme IF et les follicules pileux via l'expression de la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur humain de la kératine K14 (souris KO conditionnel [cKO] *Dgcr8*^{fl/fl}/K14-Cre ou *Dicer1*^{fl/fl}/K14-Cre) a permis d'établir le rôle clé des microARNs dans le développement de la peau et le maintien de l'homéostasie cutanée (Yi et al., 2009) (**Figure 16B**).

En effet, la perte de fonction de DGCR8 ou Dicer1 conduit à des événements apoptotiques massifs dans le bourgeon des follicules pileux dès le stade E17.5 et conduit à l'évagination des follicules pileux dans l'épiderme des souriceaux nouveaux-nés (Yi et al., 2006) (Andl et al., 2006) (Yi et al., 2009) (**Figure 16C-E**). Chez les souris *Dicer1* cKO, une hyper-kératinisation et hyper-prolifération de l'épiderme apparaît dès le 7^{ème} jour post-natal (Andl et al., 2006). Ces altérations morphologiques perturbent l'organisation de l'épiderme, provoquant une perte de la fonction barrière et la mort prématurée de ces souris transgéniques *Dicer* et *Dgcr8* cKO (Yi et al., 2006) (Andl et al., 2006) (Yi et al., 2009).

En comparant le profil d'expression spatiotemporelle de plus de 100 microARNs dans l'épiderme IF de souris du stade E13.5 au P4.5, l'équipe d'Elaine Fuchs (Université Rockefeller, NY, USA) a fait une découverte inédite (Yi et al., 2008). Alors qu'il est quasi inexistant au stade E13.5, le microARN-203 apparaît fortement exprimé au stade E15.5 et est maintenu à un niveau d'expression élevé jusqu'au stade P4.5, aussi bien dans les couches suprabasales de l'épiderme IF que dans les cellules différenciées des follicules pileux et les glandes sébacées (**Figure 17A-E**). Des études complémentaires *in vitro* et *in vivo*, utilisant notamment un modèle de souris transgénique surexprimant le microARN-203 sous le contrôle du promoteur du gène humain codant la K14 ont permis de comprendre son activité biologique. Comme pour les souris transgéniques *Dicer* et *Dgcr8* cKO, ces souris meurent de déshydratation et de malnutrition peu après la naissance en raison d'un défaut sévère de la fonction de barrière cutanée. Au stade E18.5, contrairement aux animaux sauvages, l'embryon de souris transgénique possède un épiderme aminci caractérisé par la présence anormale de cellules exprimant le marqueur de différenciation précoce K10 au niveau de la membrane basale (**Figure 17F-G**). Durant le développement de l'embryon, les cellules exprimant la K10 remplacent les cellules souches épidermiques qui expriment des taux élevés de K5 et du facteur de transcription p63 (**Figure 17H**).

Il a été démontré que p63, appartenant à la famille p53 et p73, joue un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement des cellules souches et la prolifération des cellules basales de l'épiderme, en régulant notamment l'expression de p21, un inhibiteur de kinases cycline-dépendantes (CDK) (Mills et al., 1999; Yang et al., 1999; Pellegrini et al., 2001; Westfall et al., 2003). Des souris mutantes p63^{+/-} ont une durée de vie limitée en lien avec la sénescence et le vieillissement cutané (Keyes et al., 2005; Senoo et al., 2007; Guo et al., 2009).

Pour déterminer si le microARN-203 réduit le potentiel prolifératif des CS épidermiques et orchestre la transition entre la prolifération et la différenciation des kératinocytes, les auteurs ont comparé le potentiel clonogénique des kératinocytes primaires d'embryons de souris transgéniques et sauvages au stade E18.5 (Yi et al., 2008). Comme attendu, contrairement aux kératinocytes sauvages qui forment des holoclones composés de petites cellules indifférenciées, les kératinocytes transgéniques ne produisent que des paraclones constitués de cellules larges et aplaties (**Figure 17I-J**). Par ailleurs, l'injection sous-cutanée d'un antagomir-203 (antagoniste ciblant le microARN-203) dans le dos des souris néonatales entraîne la surexpression du p63 dans les cellules suprabasales de l'épiderme. Des analyses bioinformatiques ont permis d'identifier deux éléments de réponse au microARN-203 dans la région 3'-UTR de l'ARNm de $\Delta Np63\alpha$, l'isoforme de p63 la plus exprimée dans l'épiderme, suggérant ainsi un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de ce facteur de transcription par ce microARN (**Figure 17K**). Cette hypothèse a été confirmée par des tests de gène rapporteur. En présence d'une concentration élevée en calcium dans le milieu de culture, mimant l'engagement des cellules dans la différenciation, la transfection d'un vecteur codant le gène de la luciférase fusionné avec une séquence nucléotidique de 599 pb couvrant une partie de région 3'-UTR de $\Delta Np63\alpha$ dans des kératinocytes primaires a pour effet de réduire de façon très significative l'activité de la luciférase. Des mutations nucléotidiques au niveau du site d'appariement du microARN-203 n'induisent aucun changement de l'activité de la luciférase, prouvant l'interaction physique entre ces deux molécules d'ARN (**Figure 17K**).

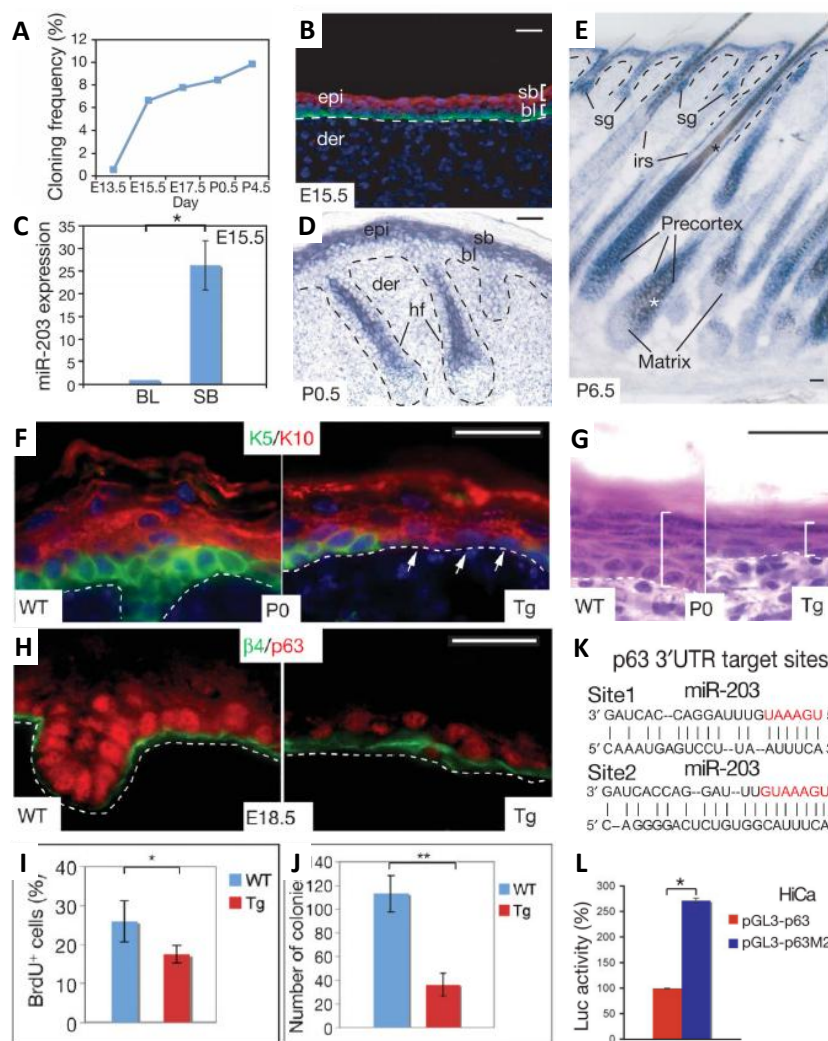


Figure 17 : Importance du microARN-203 dans la différenciation épidermique.

(A) Expression spatiotemporelle du microARN-203 durant le développement embryonnaire et postnatal chez la souris. (B-D-E) Restriction de l'expression du microARN-203 dans les couches suprabasales de l'épiderme. Abréviations : sb, couches suprabasales ; bl, couche basale ; der, derme ; sg, glande sébacée ; irs, gaine intérieure de la racine ; hf, follicules pileux. (C) Analyse de l'expression du microARN-203 par RT-qPCR dans les cellules basales et suprabasales isolées de l'épiderme d'embryon de souris au stade E15.5. (F-H) Diminution de l'expression de p63 et K5 dans les cellules de la couche basale de l'épiderme chez les souris transgéniques surexprimant le *microARN-203* sous le contrôle du promoteur K14 (*K14-miR-203*) comparé aux souris sauvages. (G) L'expression ectopique du microARN-203 induit un amincissement de l'épiderme. (I) Diminution du nombre de cellules progénitrices dans l'épiderme des souris transgéniques *K14-miR-203*. (J) Réduction du potentiel clonogénique des kératinocytes primaires isolés de l'épiderme des souris transgéniques *K14-miR-203* par rapport aux souris sauvages au stade E18.5. (K) Identification des sites de liaison du microARN-203 dans la région 3'-UTR de p63. (L) L'insertion de la région 3'-UTR de p63 en aval de la séquence codante du gène de la F-Luciférase (F-Luc) diminue l'activité de la F-Luc dans les kératinocytes primaires isolés des souris transgéniques *K14-miR-203* comparé au plasmide mutant, contenant deux sites de liaison mutés pour le microARN-203. D'après (Yi et al., 2008).

Le rôle du microARN-203 dans la régulation de l'expression de p63 a été indépendamment confirmé par l'équipe d'Eleonora Candi (Lena et al., 2008). Les auteurs ont eux aussi mis en évidence la corrélation inverse entre l'expression du microARN-203 et p63 dans des kératinocytes primaires murins et humains induits en différenciation dans un milieu riche en calcium. La transfection des cellules avec un vecteur exprimant la luciférase contenant la totalité des 2 772 nt de la région 3'-UTR de $\Delta Np63\alpha$ réduit par 45 % l'activité de la luciférase, tandis qu'une mutation dans le site de liaison pour le microARN-203 n'a aucun effet sur l'activité de ce gène rapporteur. Les auteurs ont toutefois remarqué que le microARN-203 n'est pas suffisant à lui seul pour induire la différenciation des kératinocytes. L'expression des marqueurs précoces (IVL) et tardifs (TG1 et TG5) de la différenciation kératinocytaire est en effet plus faible dans les cellules surexprimant le microARN-203 en comparaison des cellules traitées au calcium.

Depuis ces travaux, d'autres microARNs impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de p63 ont été identifiés. Chikh et ses collègues ont mis en évidence la colocalisation de p63 et d'un inhibiteur de p53, l'iASPP (Inhibitor of *apoptosis-stimulating protein of p53*), dès le stade E12.5, marquant le début de la stratification, jusqu'au stade P7 où l'épiderme est totalement stratifié chez la souris (Chikh et al., 2011). Cette étude suggère le rôle négatif d'iASPP dans le processus de différenciation des kératinocytes. Des essais d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis de montrer que p63 est capable de se lier directement au promoteur du gène humain *PPP1R13L* codant la protéine iASPP, apportant ainsi une preuve expérimentale du rôle de p63 dans le contrôle transcriptionnel de cette cible. Par ailleurs, les auteurs ont montré que dans les kératinocytes primaires humains, les microARN-574-3p et -720 inhibent l'expression de p63, en liant une séquence nucléotidique conservée dans sa région 3'-UTR, et répriment par conséquent la transcription d'iASPP. L'extinction du gène codant iASPP dans un modèle d'épiderme humain reconstruit *in vitro* à partir de kératinocytes humains infectés avec un shARN ciblant iASPP, perturbe considérablement le programme de différenciation des kératinocytes. L'inhibition d'iASPP est corrélée avec une diminution de l'expression de p63, se traduisant par une différenciation prématurée des kératinocytes, et par conséquent, une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme. A l'inverse, la transfection des cellules avec des antagomir-574-3p et antagomir-720 avant l'induction des cellules en différenciation restaure l'expression

endogène de p63. L'expression des marqueurs de différenciation précoces (K1) et tardifs (IVL et LOR) diminue au profit de l'augmentation de l'expression des marqueurs de prolifération, tels que K14 et Ki67, et la protéine transmembranaire β 1-intégrine, impliquée dans l'adhérence des cellules à la MEC (Chikh et al., 2011).

Une étude récente a montré que le microARN-184 induit l'engagement des cellules progénitrices de la couche basale de l'épiderme dans le processus de différenciation (Nagosa et al., 2017) (**Figure 18**). Chez la souris, au 8^{ème} jour après la naissance (P8), le *microARN-184* apparaît fortement exprimé dans la couche épineuse de l'épiderme. La délétion du *microARN-184* provoque une hyperplasie de l'épiderme, caractérisée par augmentation du nombre de cellules exprimant p63 et Ki67. Bien que toutes les couches de l'épiderme soient représentées chez les souris *microARN-184* KO, l'épaisseur de la couche épineuse est 30 % plus épaisse que chez les souris sauvages. A l'inverse, chez les souris transgéniques surexprimant le *microARN-184* sous le contrôle du promoteur K14, l'épiderme est caractérisée par une hypoplasie. Par ailleurs, les auteurs ont montré que la transfection de précurseurs synthétiques du microARN-184 dans les kératinocytes primaires humains diminue la taille et le nombre des clones, notamment via la répression des marqueurs de prolifération $\Delta Np63\alpha$ et K14 et la surexpression des marqueurs de différenciation *Hes1*, *K10*, *KrtDap*, *FLG* et *IVL*. Un phénotype inverse est observé lorsque les cellules sont transfectées avec un antagomir-584. Grâce aux algorithmes TargetScan, miRanda et MicroCosm, les chercheurs ont pu identifier des sites d'interaction conservés du microARN-184 dans la région 3-UTR de p63, K15 et FIH1 (*Factor inhibiting HIF-1*). FIH1 est une asparaginyl hydroxylase décrite pour réguler négativement la voie de signalisation Notch, laquelle est impliquée dans la différenciation des kératinocytes via la répression de p63 (Rangarajan et al., 2001; Nguyen et al., 2006; Zheng et al., 2008).

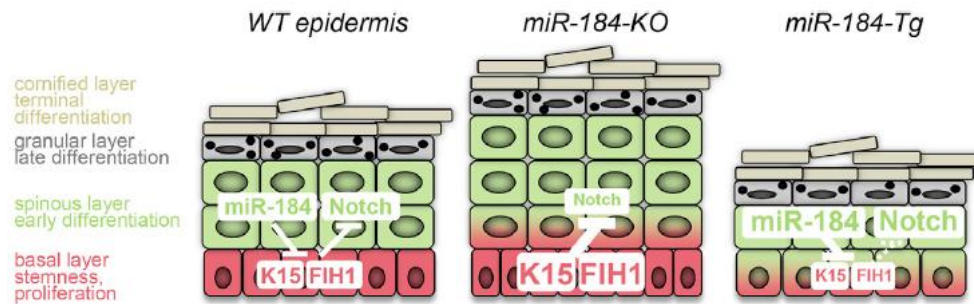


Figure 18 : Modèle de régulation du microARN-184 dans l'épiderme.

Le microARN-184 régule la transition entre la prolifération et la différenciation des kératinocytes. En réprimant K15 et FIH1, le microARN-184 inhibe la prolifération des cellules souches et progénitrices situées dans la couche basale et induit la voie de signalisation Notch. D'après (Nagosa et al., 2017).

De la même façon, d'autres microARNs ont été identifiés comme des régulateurs clés de morphogénèse et du maintien de l'homeostasie cutanée.

Wang et al. ont démontré en effet que le microARN-205 est finement régulé dans l'espace au cours du développement embryonnaire (Wang et al., 2013). Détecté au stade E10 dans le cytoplasme des CS multipotentes d'embryon de souris, l'expression de ce microARN est ensuite restreinte dans les CS épidermiques et cellules progénitrices dans la couche basale de l'épiderme au stade E14. Lorsque le lignage du follicule pileux apparaît au stade P0, le *microARN-205* est alors surexprimé dans la placode. Puis de la naissance jusqu'à l'âge adulte (P28), ce microARN est abondamment exprimé dans les cellules progénitrices de l'épiderme IF et dans le bulge des follicules pileux. L'analyse du transcriptome global par puce à ADN (*microarray*) des CS du bulge des follicules pileux de souris WT et des souris transgéniques *microARN-205* KO a permis d'identifier les ARNm cibles régulés par ce microARN. Des études fonctionnelles *in vitro* ont permis ensuite de préciser son mécanisme d'action moléculaire. En inhibant l'expression des gènes *Frk* (*Fyn related Src family tyrosine kinase*), *Inpp1* (*Inositol polyphosphate-1-phosphatase*), *Inpp4b* (*Inositol polyphosphate-4b-phosphatase*) et *Phlda3* (*Pleckstrin homology like domain family A member 3*) au niveau post-transcriptionnel, le microARN-205 permettrait l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt et pourrait ainsi promouvoir l'expansion des CS multipotentes et cellules progénitrices de la peau. A l'inverse la délétion du *microARN-205* dans les souris par transgénèse entraîne une désorientation et un raccourcissement de la longueur des

follicules pileux, une atrophie de l'épiderme et une mort prématurée des animaux vers le stade P10.

Dans une autre étude, Zhang et ses collègues ont proposé un modèle selon lequel l'orthologue du microARN lin-4 chez les mammifères, le microARN-125b, réprime la différenciation des CS localisées dans le bulge du follicule pileux (Zhang et al., 2011). En effet, les auteurs ont mis en évidence son expression dans la gaine folliculaire externe ORS (*Outer root sheath*) (**Figure 19A**). Chez des souris transgéniques surexprimant le *microARN-125b* sous le contrôle du promoteur K14 inducible par la doxycycline (désignées DTG), la maturation des follicules pileux est altérée. Contrairement aux souris sauvages, les souris DTG sont en effet dépourvues de poils (**Figure 19B**). L'examen histologique de la peau du dos de souris transgéniques DTG a révélé une diminution significative de l'expression des marqueurs de la tige capillaire (Cytokératines AE13 et AE15) et de la gaine folliculaire interne (GATA3, cadhérine E). A l'inverse, une augmentation des marqueurs du bulge (Lhx2, Sox9, Tcf4 et Nfatc1) a été observée en comparaison des souris sauvages. La surexpression du *microARN-125b* dans l'ORS chez les souris DTG se traduit par une augmentation du nombre de cellules en phase S dans cette zone du follicule pileux et un épaississement du bulge (**Figure 19C**). De manière intéressante, les auteurs ont montré que l'arrêt de l'administration de la doxycycline aux souris pendant 5 semaines restaure le phénotype des souris sauvages (**Figure 19B**). Ces données apportent ainsi un lien de causalité entre l'expression du *microARN-125b* et le ralentissement de la différenciation des CS du bulge. Une analyse microarray réalisée à partir des cellules de l'ORS, isolées des souris sauvages et DTG au stade P4, a permis d'identifier le récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR) comme cible du microARN-125b. En liant la β -caténine, le récepteur VDR active la transcription de gènes impliqués dans la différenciation des follicules pileux (Shah et al., 2006; Pálmer et al., 2008; Bikle, 2011). La délétion du VDR chez la souris induit une alopécie postnatale en raison d'une perte progressive des CS, et par conséquent une absence de renouvellement des cellules différenciées (Li et al., 1997; Cianferotti et al., 2007; Oda et al., 2018). Les auteurs ont pu confirmer la régulation négative du microARN-125b sur le VDR par des tests luciférase et des analyses fonctionnelles (**Figure 19D**). Enfin l'application topique et l'injection intrapéritonéale d'un analogue de la vitamine D, l'EB1089, restaure en partie la croissance normale des poils chez les souris DTG.

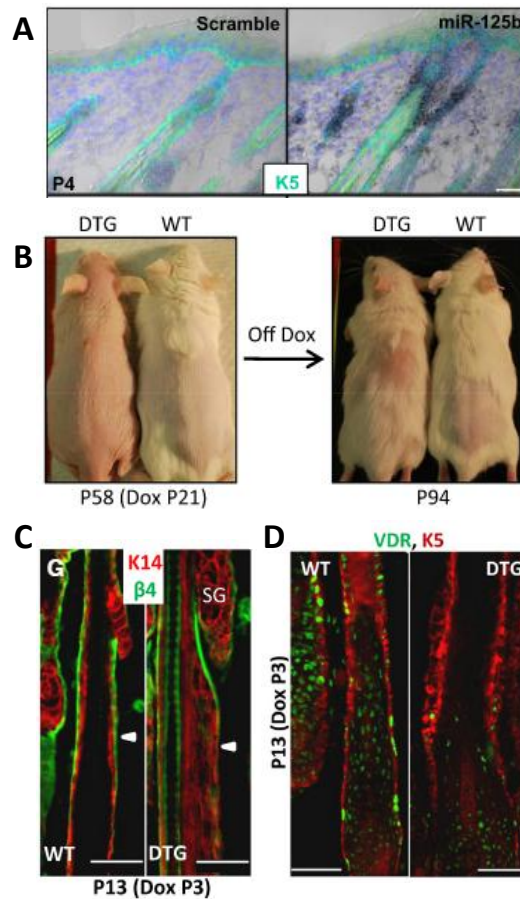


Figure 19 : Rôle du microARN-125b dans l'inhibition de la différenciation des cellules souches des follicules pileux.

(A) Hybridation *in situ* montrant l'expression du microARN-125b (en noir) dans la partie supérieure de la gaine externe du follicule pileux (ORS) chez des souris sauvages au stade P4. (B) L'arrêt de l'administration de doxycycline aux souris transgéniques DTG, surexprimant le *microARN-125b* sous le contrôle du promoteur K14 et en présence de doxycycline, peut induire la croissance des follicules pileux et restaurer le phénotype des souris sauvages. (C) Immunofluorescence montrant une augmentation du nombre de cellules positives pour la kératine 14 (K14, en rouge) dans la partie supérieure de l'ORS et un épaissement de la région bulge des follicules pileux (tête de flèche). (D) Diminution de l'expression du récepteur de la vitamine D (VDR, en vert) dans l'ORS chez les souris DTG en comparaison des souris sauvages. D'après (Zhang et al., 2011).

1.2.4.2 Dans la cicatrisation cutanée

Une des propriétés fondamentales des organismes multicellulaires est la capacité de réparer naturellement les tissus lésés.

La cicatrisation d'une plaie est un processus complexe et dynamique pouvant se décomposer en trois étapes distinctes qui se chevauchent : la phase vasculaire et inflammatoire, la prolifération et le remodelage de la MEC (Mori et al., 2018) (**Figure 20**).

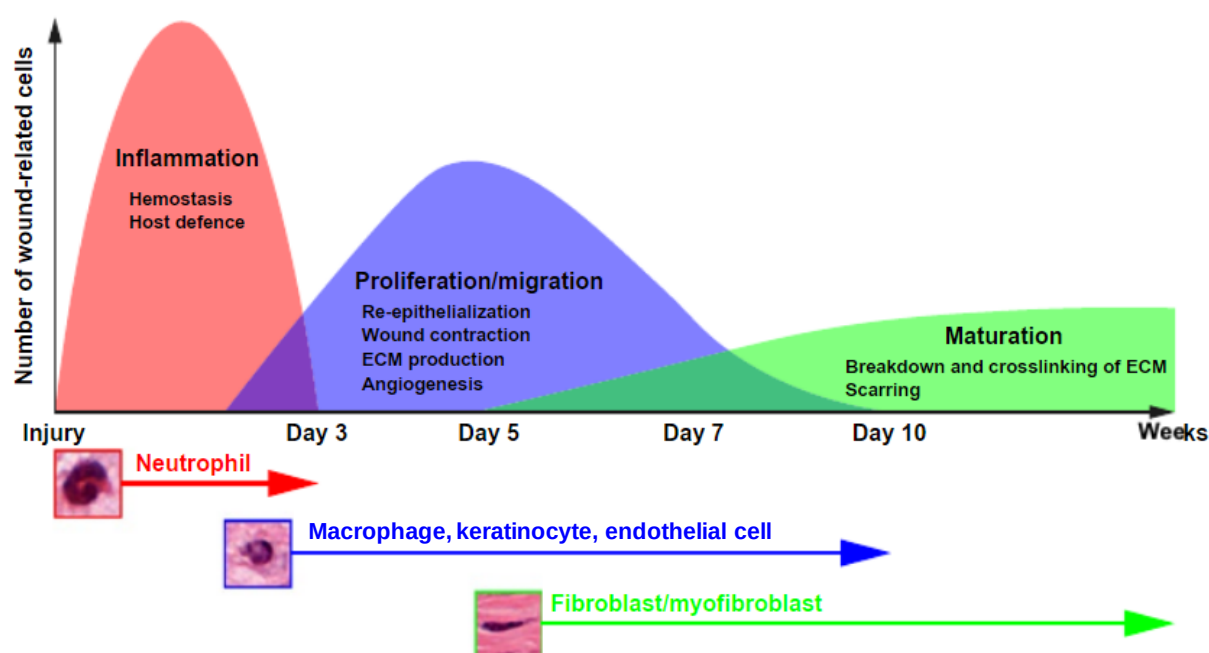


Figure 20 : Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans le processus de cicatrisation cutanée. Adaptée de (Mori et al., 2018).

Chacune de ces phases est caractérisée par une série d'interactions coordonnées entre différents types cellulaires (cellules immunitaires, cellules endothéliales, cellules épithéliales, fibroblastes) et des médiateurs biochimiques (facteurs de croissance, cytokines, molécules de la MEC) (Broughton et al., 2006; Eming et al., 2007; Gurtner et al., 2008).

Chaque année, de nouveaux médiateurs sont découverts et contribuent ainsi à une meilleure compréhension de la cicatrisation cutanée. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études ont montré l'implication des microARNs dans la régulation du processus cicatriciel (Banerjee and Sen, 2013; Herter and Xu Landén, 2017; Mori et al., 2018; Soliman et al., 2018).

1.2.4.2.1 La phase vasculaire et inflammatoire

L'étape vasculaire

Dès les premiers instants qui suivent la blessure, la phase hémostasique se met en place. Au contact de la paroi vasculaire lésée, les plaquettes sont rapidement activées par des agonistes solubles, tels que l'adénosine 5'-diphosphate (ADP), le thromboxane A₂ (TXA₂), la sérotonine et la thrombine, afin de déclencher la cascade de coagulation. Sous l'action de la thrombine, le fibronogène soluble est clivé en monomères qui forment par polymérisation un réseau de fibrine insoluble. Celui-ci emprisonne les érythrocytes et les plaquettes pour créer un maillage serré et résistant, appelé caillot sanguin fibrino-plaquettaire. Ce caillot sanguin permet de rétablir rapidement et en partie la fonction barrière cutanée (Siess, 1989; Smith et al., 2015).

L'étape inflammatoire

Les plaquettes activées relarguent des chimiokines, cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL(*Interleukin*)-1 et le TNF- α (*Tumor necrosis factor alpha*), et des facteurs de croissance, tels que le TGF- β 1 (*Transforming growth factor beta 1*), l'EGF (*Epidermal growth factor*), le FGF (*Fibroblast growth factor*) et le PDGF (*Platelet-derived growth factor*) afin d'initier le recrutement des leucocytes vers le foyer lésionnel (Massagué, 1990).

Les neutrophiles infiltrent en premier la zone lésée afin de phagocyter les débris cellulaires et lutter efficacement contre les infections bactériennes, virales et fongiques (Kim et al., 2008b; Kolaczowska and Kubes, 2013; Eming et al., 2014). Ils sécrètent notamment des enzymes protéolytiques (sérine protéases et MMP), des peptides antimicrobiens (cathélicidines et β -défensines), et génèrent des ROS dont l'oxyde nitrique pour inhiber la croissance des microorganismes pathogènes (MacLeod and Mansbridge, 2016).

Une étude récente a mis en évidence le rôle majeur du microARN-142 dans la clairance du *Staphylococcus aureus* au cours de la cicatrisation de plaies (Tanaka et al., 2017). Les auteurs ont montré que les plaies cutanées des souris *microARN-142*^{-/-} infectées avec *S.aureus* cicatrisaient plus beaucoup lentement que les plaies cutanées de souris

sauvages infectées avec le même pathogène (**Figure 21A**). La quantité de *S.aureus* dans la zone lésionnelle des animaux *microARN-142*^{-/-} est 6.2 fois supérieure à celle mesurée chez les animaux sauvages. La persistance de ce pathogène chez les souris déficientes pour le *microARN-142* résulte d'une diminution de la vitesse de migration des neutrophiles au niveau du site lésionnel associée à un défaut de phagocytose, et se manifeste par la formation d'un abcès, qui persiste au-delà du 10^{ième} jour après la blessure (**Figure 21B**). *In vitro*, la stimulation des neutrophiles *microARN-142*^{-/-} dérivés de la moelle osseuse des souris *microARN-142*^{-/-} avec un peptide chimiotactique N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) induit un changement morphologique de ces cellules, la surexpression d'actine-F dans leurs lamellipodes et des défauts de rétractation de l'uropode (**Figure 21C**). Contrairement aux neutrophiles des souris sauvages (WT), les neutrophiles *microARN-142*^{-/-} se déplacent plus rapidement vers le fMPL mais perdent aussi plus rapidement leur polarité, donnant lieu à une trajectoire migratoire aléatoire. De manière intéressante, la délétion du *microARN-142* chez les neutrophiles corrèle avec la surexpression des petites GTPases telles que Rac, Cdc42 et Rho, connues pour être impliquées dans la polarisation des hémocytes de drosophile dans le cadre de leur migration via la rétractation de l'uropode (**Figure 21D**) (Stramer et al., 2005). Tanaka et ses collègues ont ainsi émis l'hypothèse que le défaut de cicatrisation cutanée observé chez les souris *microARN-142*^{-/-} serait lié, en partie, à une incapacité des neutrophiles à transiter de la phase de migration à la phase de sécrétion (Tanaka et al., 2017).

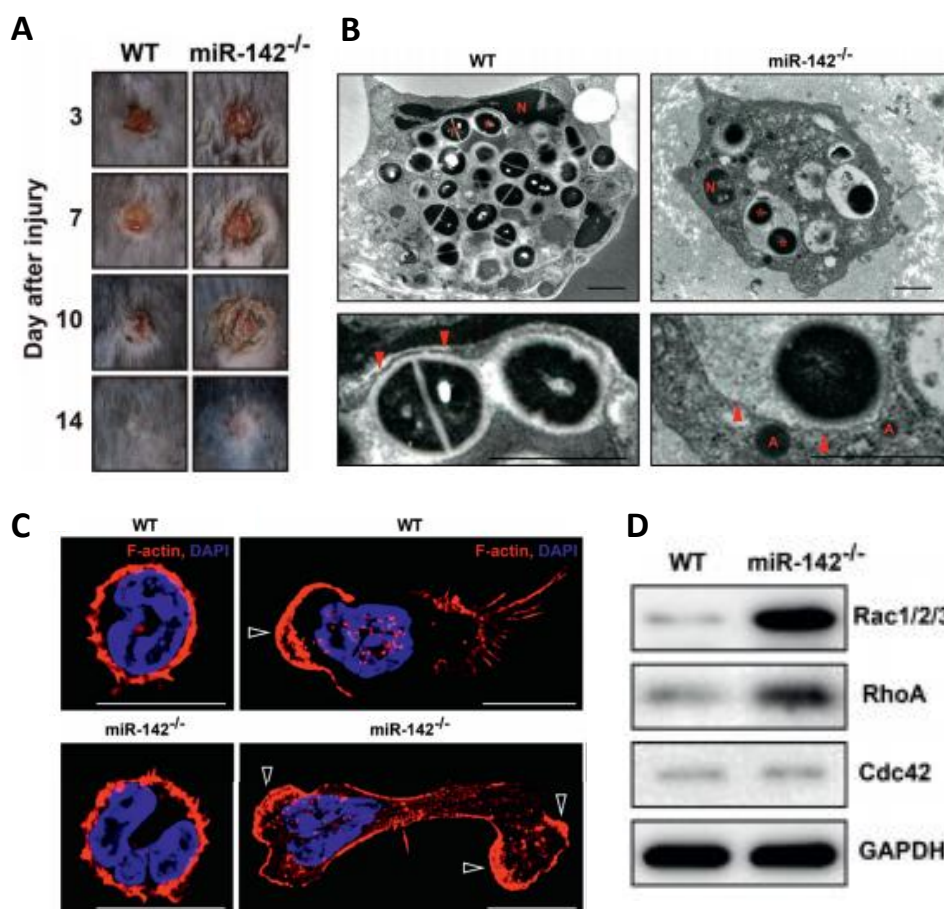


Figure 21 : Le microARN-142 joue un rôle important dans la clairance du *Staphylococcus aureus* au cours de la cicatrisation des plaies cutanées.

(A) La délétion du *microARN-142* chez les souris transgéniques retarde la cicatrisation des plaies infectées par *S. aureus*. (B) La phagocytose de *S. aureus* par les neutrophiles est altérée chez les souris *microARN-142*^{-/-} en comparaison des souris sauvages (WT). Images acquises par microscopie électronique à transmission (TEM) de neutrophiles situés dans les plaies au premier jour suivant la blessure et l'infection par *S. aureus*. Les pointes de flèches indiquent les phagosomes intacts et les membranes de phagosomes. Les astérisques indiquent la présence de *S. aureus* (en blanc) dans des vacuoles cloisonnées par une membrane clairement définie. N : noyau. (C) Les neutrophiles isolés des souris transgéniques *microARN-142*^{-/-} migrent anormalement en réponse à un stimulus chimiotactique, le N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine et expriment de grandes quantités de F-actine, localisée sur les côtés des lamellipodes. (D) L'invalidation du *microARN-142* dans les neutrophiles de ces animaux transgéniques est corrélée avec une expression supraphysiologique de Rac1/2/3, RhoA et Cdc42. D'après (Tanaka et al., 2017).

De manière intéressante, la polarisation des macrophages est elle aussi contrôlée par plusieurs microARNs (Curtale et al., 2019) (**Figure 22**). Dans une étude de Zhang et al. il a été établi que le profil d'expression des microARNs est différent selon la polarisation des macrophages M1 et M2, dérivés de cellules BMDM (*Bone marrow-derived macrophages*) stimulées respectivement par le LPS (*Lipopolysaccharide*) et l'IFN- γ (*Interferon gamma*), et l'IL-4 (Zhang et al., 2013). Parmi les 109 microARNs identifiés comme étant différentiellement exprimés entre les macrophages M1 et M2, les auteurs ont montré que les microARN-181a, -155-5p, -204-5p et -451 étaient les plus surexprimés dans les macrophages M1 alors que le microARN-146a-3p, -125-5p et -145-5p étaient les plus enrichis dans les macrophages de type M2. Des études postérieures à ce travail ont confirmé le niveau d'expression élevé du microARN-155-5p dans les macrophages M1 et du microARN-146a-3p, -145-5p et -127 dans les macrophages de type M2 (Liu and Abraham, 2013). A ce jour, les microARN-155 et -146a-3p sont les microARNs les plus étudiés dans la polarisation des macrophages et l'inflammation.

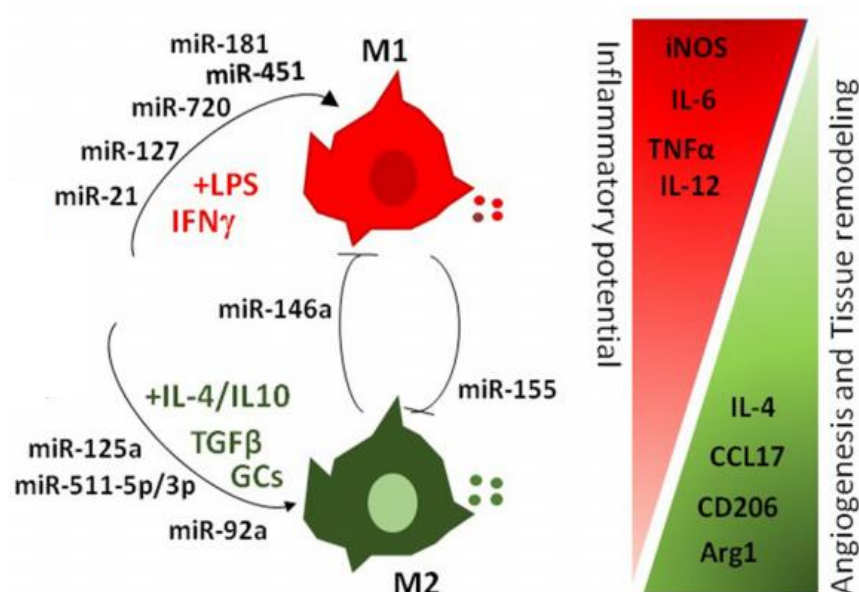


Figure 22 : Importance des microARNs dans la polarisation des macrophages. D'après (Zhang et al., 2013).

Le mécanisme d'action exact du microARN-155 dans l'induction de la polarisation des macrophages M1 n'est pas encore complètement élucidé. Toutefois, des expériences *in vitro* ont montré que ce microARN est capable d'inhiber l'activation du facteur de transcription STAT6 (*Signal transducer and activator of transcription 6*) en réprimant l'expression du

récepteur IL13R α 1 (*Interleukin-13 receptor alpha-1*) au niveau post-transcriptionnel. Par ailleurs, le microARN-155 inhibe indirectement l'expression de gènes impliqués dans la polarisation M2, dont SOCS1 (*Suppressor of cytokine signaling 1*), CDC23 (*Cell division cycle protein 23*), DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*), CCL18 (*chemokine (C-C motif) ligand 18*) et SERPINE (Martinez-Nunez et al., 2011). Dans un modèle murin de cicatrisation d'une plaie par excision (*Punch biopsy*), Van Solingen et ses collègues ont mis en évidence l'accélération de la cicatrisation des tissus lésés chez des souris *microARN-155*^{-/-} en comparaison des souris WT (van Solingen et al., 2014). De manière intéressante, les auteurs ont montré que le gène *FIZZ1* (*Finding in inflammatory zone-1*), qui est un marqueur spécifique du phénotype M2, était exprimé à des taux plus élevés dans les plaies des souris *microARN-155*^{-/-} que dans les plaies de souris WT. Des résultats similaires ont été obtenus *in vitro* à partir de cellules BMDM prélevées chez les souris *microARN-155*^{-/-} et induites en polarisation M2 avec l'IL-4. Chez les souris *microARN-155*^{-/-}, la surexpression de *FIZZ1* corrèle avec l'augmentation du dépôt de collagène de type 1 dans la MEC, favorisant ainsi le processus de cicatrisation (Hunt et al., 1984). De manière intéressante, il a été observé que l'inactivation génique du *microARN-155* par transgénèse chez des souris et rats diabétiques (Ye et al., 2017) ainsi que l'application topique d'un inhibiteur du microARN-155 (Moura et al., 2019) favorise la résolution de l'inflammation durant la cicatrisation des blessures. L'inhibition du microARN-155 a pour effet de limiter l'infiltration des neutrophiles, lymphocytes T et macrophages M1 et de stimuler la prolifération des fibroblastes et la production de collagène de type I, TGF- β 1 et α -SMA (*Alpha-smooth muscle actin*).

Le microARN-146a, quant à lui, est le premier microARN à avoir été associé avec la polarisation M2 des macrophages. Li et ses collègues ont montré que la surexpression du microARN-146a dans la lignée monocyttaire humaine THP-1 différenciée en macrophage par du PMA (Phorbol 12-myristate 13-acétate) et polarisée en M1 par l'IFN- γ , conduit à une diminution de l'expression des marqueurs de phénotype M1, dont IL-6, IL-12, TNF- α , CXCL9 (*Chemokine (C-X-C motif) ligand*), CXCL10, iNOS (*Inducible nitric oxide synthase*), CD80 (*Cluster of differentiation*) et CD86, au profit de l'augmentation de l'expression des marqueurs du phénotype M2, tels que Arg1 (*Arginase 1*), CCL17, CCL22, CD163 et CD206 (Li et al., 2016). A l'inverse, la sous-expression du microARN-146a induit la polarisation M1 et

diminue la polarisation M2. D'un point de vue mécanistique, le microARN-146a pourrait en partie promouvoir la polarisation M2 en réprimant INHBA (*Inhibin β A subunit of activin A*) au niveau post-transcriptionnel (Li et al., 2016). Depuis, il a été montré par le laboratoire de David Baltimore que la stimulation des cellules THP-1 par le LPS, l'IL- β et le TNF- α active le facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear factor-kappa B*) (Taganov et al., 2006). Après translocation dans le noyau, NF- κ B se lie au promoteur du gène du microARN-146a et induit la transcription de ce dernier. En interagissant avec la 3'-UTR de l'ARNm de IRAK1 (*Interleukin 1 receptor associated kinase 1*) et TRAF6 (*Tumor necrosis factor receptor associated factor 6*), le microARN-146a empêche l'activation exacerbée de la voie de signalisation de NF- κ B et AP-1 par un système de boucle de rétroaction négative inhibant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires.

1.2.4.2.2 La phase de prolifération

La phase de prolifération survient entre le 2^{ème} et le 10^{ème} jour suivant la blessure et perdure en moyenne deux semaines. Elle est orchestrée par un grand nombre des cytokines et de facteurs de croissance présents dans la zone cicatricielle, dont l'EGF, KGF (*Keratinocyte growth factor*), TNF- α , le TGF- α/β et le PDGF, produit au cours de la phase inflammatoire précente. Ces médiateurs solubles ont pour effet de stimuler à leur tour cette phase de prolifération comprenant la ré-épithélialisation, la néoangiogenèse et la formation du tissu de granulation.

La ré-épithélialisation

Durant la ré-épithélialisation, les kératinocytes adjacents aux marges de la plaie migrent progressivement dans le lit de la plaie en formant une « langue de migration » (*migrating tongue*). La migration des kératinocytes est un processus dynamique impliquant la réorganisation du cytosquelette d'actine, le désassemblage des jonctions d'ancrage et l'acquisition de manière transitoire et réversible d'un phénotype mésenchymateux. A ce titre, les kératinocytes expriment les intégrines α 3 β 1 et sécrètent la laminine 332, servant de substrat d'adhésion aux kératinocytes au cours de leur migration (Pastar et al., 2014).

Yang et ses collègues ont été les premiers à montrer que, dans un modèle de blessure *in vitro*, la surexpression du microARN-21 dans la lignée cellulaire HaCaT, issue de kératinocytes humains spontanément immortalisés, stimule la migration cellulaire via l'inhibition de l'expression de TIAM1 (*T-lymphoma invasion and metastasis inducing protein*) et de TIMP3 (*Tissue inhibitor of metalloproteinase-3*) (Yang et al., 2011) (**Figure 23**).

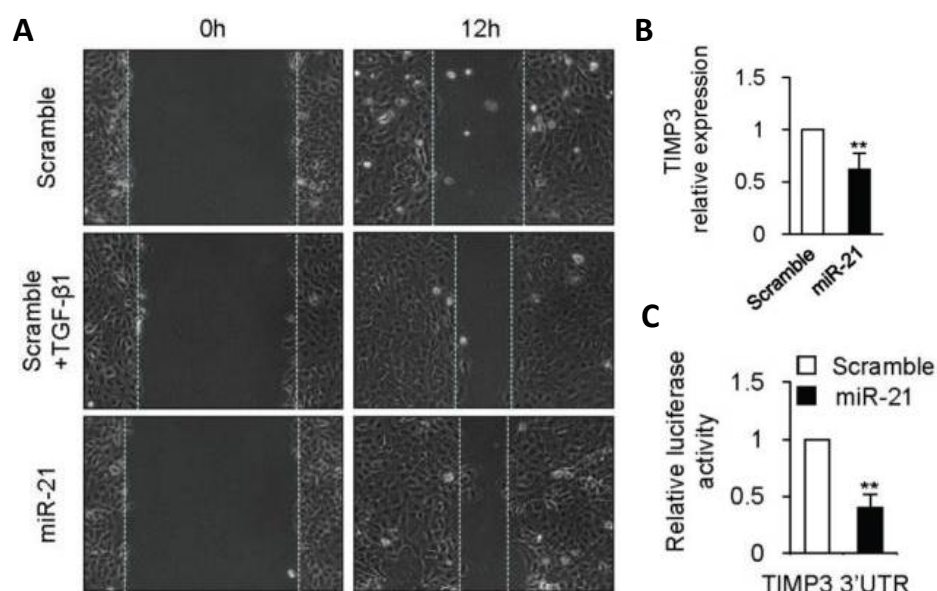


Figure 23 : Importance du microARN-21 dans la migration des kératinocytes.

(A) Dans un modèle de blessure *in vitro*, la transfection de mimiques de microARN-21 dans les cellules HaCaT accélère la migration cellulaire. (B) La surexpression du microARN-21 dans les cellules HaCaT inhibe l'expression de TIMP3. (C) TIMP3 est une cible directe du microARN-21. D'après (Yang et al., 2011).

Le rôle du microARN-21 dans la migration des kératinocytes a été confirmé dans un modèle murin de cicatrisation cutanée. Le microARN-21 est en effet fortement exprimé dans les kératinocytes de la langue de migration. Par ailleurs, l'administration d'un antagoniR-21 dans la plaie a pour effet de ralentir très significativement la vitesse de migration des kératinocytes (Wang et al., 2012b)

Au même titre que le microARN-21, le microARN-31 induit la migration des kératinocytes. Li et ses collègues ont établi la cinétique d'expression du microARN-31 dans un modèle de blessure par excision de peau chez des sujets sains (Li et al., 2015). Alors que le microARN-31 est peu exprimé dans la peau saine, son expression est induite dans l'épiderme dès le 1^{er} jour suivant la blessure (phase inflammatoire) et s'intensifie au 7^{ème}

jour (phase de prolifération). Des analyses *in silico* et des études fonctionnelles *in vitro* ont permis de comprendre son mécanisme d'action dans les kératinocytes. Après stimulation par le TGF- β 1 et le TGF- β 2, deux cytokines produites en grande quantité dans les plaies cutanées (Ramirez et al., 2014), les kératinocytes surexpriment le microARN-31 via l'activation de la voie SMAD. Le microARN-31 active ensuite la migration des kératinocytes en inhibant directement l'expression de l'EMP-1 (*Epithelial membrane protein 1*) au niveau post-transcriptionnel (Li et al., 2015). Il a été démontré dans des études indépendantes qu'EMP-1 est un régulateur négatif de la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Sun et al., 2014a, 2014b), confortant le rôle important de l'axe microARN-31/EMP-1 dans la migration cellulaire.

D'autres études ont mis en évidence le rôle du microARN-205 dans la migration des kératinocytes, en inhibant directement l'expression de SHIP2 (*SH2 domain containing inositol 5-phosphatase 2*) (Yu et al., 2008, 2010). L'enzyme SHIP2 est décrite comme une lipide phosphatase ubiquitaire catalysant la déphosphorylation de PIP3 (*Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*), qui est un second messager lipidique impliqué dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire dont Akt, en PIP2 (*Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate*) (Aman et al., 1998; Cantley, 2002). Des travaux antérieurs ont notamment montré que PIP2 est capable de lier la cofiline, un régulateur clé de la dynamique de l'actine au cours de la motilité cellulaire, inhibant ainsi les interactions cofiline-actine *in vitro* et la migration cellulaire (Yonezawa et al., 1990). Par ailleurs, les auteurs ont montré que le microARN-205 facilite la migration des kératinocytes en diminuant la forme phosphorylée (et donc inactive) de la cofiline via l'inactivation de la RhoA GTPase. Ce microARN facilite ainsi la liaison de la forme active de la cofiline aux microfilaments d'actine afin d'induire leur dépolymérisation (Yu et al., 2010). A l'inverse, le microARN-205 diminue l'activation de la protéine FAK (*Focal adhesion kinase*) et un de ses substrats, la protéine d'ancrage paxilline, toutes deux des composantes des complexes d'adhérence focales, réduisant ainsi l'attachement des kératinocytes à la MEC et favorisant leur migration.

Jin et ses collègues ont révélé que la famille du microARN-99 (microARN-99a, -99b et -100) est sous-exprimée au cours de la cicatrisation de plaies cutanées chez les souris (Jin et al., 2013). Cette famille de microARN inhibe notamment l'expression post-transcriptionnelle

de mTOR (*Mammalian target of rapamycin*), IGF1R (*Insulin growth factor 1 receptor*) et AKT1, en interagissant directement avec des sites de liaison en 3'-UTR de leurs ARNm cibles. Selon les auteurs, la sous-expression de la famille du microARN-99 permettrait l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans les kératinocytes humains et favoriserait ainsi leur migration.

Le rôle majeur de la voie de signalisation dépendante du facteur de transcription NF- κ B dans la migration des kératinocytes a été récemment conforté (Yan et al., 2017). Les auteurs de cette étude ont montré que la modulation de l'expression du microARN-17-3p par des agonistes (mimiques) de ce microARN a pour effet de potentialiser la migration des cellules HaCaT *in vitro*, en inhibant l'expression de l'E-cadhérine au profit des marqueurs mésenchymateux que sont la vimentine et l' α -SMA. A l'échelle moléculaire, il est montré que la voie de signalisation dépendante de Notch1 et NF- κ B est activée en réponse à la transfection du microARN-17-3p dans les cellules HaCaT, et que l'expression relative du transcrit de MYOT (*Myotilin*) est régulée à la baisse. Ces résultats sont d'autant plus remarquables que le gène *MYOT* code une protéine du cytosquelette qui joue un rôle clé dans la stabilisation des filaments d'actine, en stimulant la polymérisation de l'actine globulaire (Actine G) soluble en actine filamenteuse (Actine-F) insoluble. Des mutations du gène *MYOT* ont été détectées dans des biopsies de patients atteints de myopathies myofibrillaires (Selcen and Engel, 2004). Ces observations pourraient ouvrir la voie à l'identification d'un nouvel axe de régulation majeur du cytosquelette des cellules placé sous contrôle d'un microARN. Des études complémentaires, notamment *in vivo*, sont toutefois nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Lorsque la plaie est recouverte par une monocouche de kératinocytes, la migration des kératinocytes s'arrête pour activer le programme de différenciation de ces cellules et donc assurer le renouvellement d'un épiderme. Une étude récente a montré que la surexpression du microARN-seq-915_x4024 dans les cellules kératinocytes HaCaT bloque leur capacité migratoire (Zhao et al., 2019). Sous l'influence de l'expression des microARN-203 et -210, les kératinocytes se différencient ensuite pour reformer un épithélium stratifié et fonctionnel (Viticchiè et al., 2012; Deppe et al., 2016; Zhou et al., 2018).

La néo-angiogenèse

En raison de l'hypoxie au niveau de la plaie, le processus de néo-angiogénèse est initié afin de fournir aux fibroblastes l'oxygène et les nutriments (vitamines, acides aminés et glucose) indispensables à leur croissance et leur fonction cellulaire (Broughton et al., 2006). L'activation des kératinocytes par l'IL-1, TNF- α , TGF- β 1 et KGF induit l'expression du VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), qui une fois sécrété, favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales adjacentes pour former un nouveau réseau vasculaire (Detmar et al., 1995; Johnson and Wilgus, 2014).

Chen et Gorski ont montré l'importance du microARN-130a dans l'induction de l'angiogénèse via l'inhibition de l'expression de GAX (*Growth arrest homeobox*) et HOXA5 dans les cellules HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cells*) (Chen and Gorski, 2008). Le gène *HOXA5* code un facteur de transcription qui interagit avec l'ADN par le biais d'un motif protéique de 60 acides aminés appelé homéodomaine. Il a été démontré que la protéine HOXA5 inhibe l'angiogénèse en réprimant des gènes pro-angiogéniques tels que le *VEGFR2* (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*) *EFNA1* (*Ephrin A1*), *HIF1A* (*Hypoxia-inducible factor 1 subunit alpha*) et *PTGS2* (*Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*). A l'inverse, HOXA5 induit la transcription des gènes anti-angiogéniques dont *THBS2* (*Thrombospondin 2*) (Rhoads et al., 2005).

En condition d'hypoxie, le facteur de transcription HIF α active l'expression du *microARN-210* dans les cellules HUVEC (**Figure 24A**) (Fasanaro et al., 2008). De manière intéressante, la transfection d'inhibiteurs de microARN-210 dans ces cellules empêche la formation de tubes pseudo-capillaires *in vitro*, diminue l'activité chimiotactique du VEGF et ralentit la prolifération cellulaire (**Figure 24B**). Des effets opposés ont été observés après transfection des cellules par des mimiques de microARN-210. Le microARN-210 participe à l'angiogénèse en régulant négativement l'expression du gène *EFNA3* codant l'éphrine A3 au niveau post-transcriptionnel (**Figure 24C**). Les éphrines sont des ligands des récepteurs Eph à activité tyrosine kinase et jouent un rôle important dans le développement du système cardiovasculaire et le remodelage vasculaire mais aussi dans la néovascularisation des tumeurs (Kuijper et al., 2007).

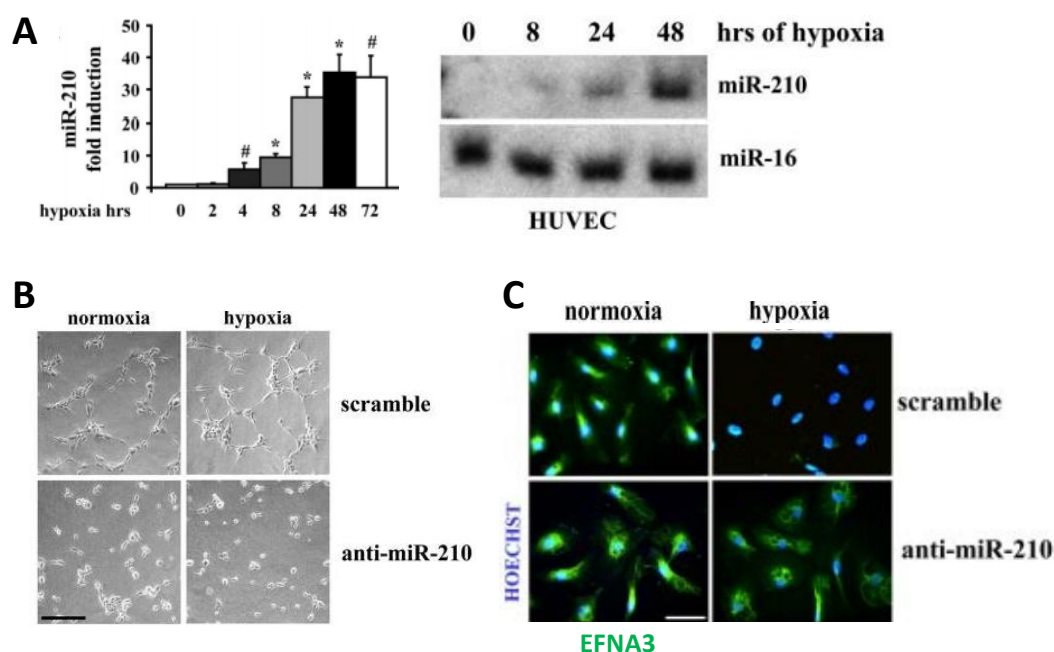


Figure 24 : Rôle du microARN-210 dans l'angiogenèse.

(A) Cinétique d'induction du microARN-210 dans les cellules HUVEC en conditions hypoxiques. (B) La transfection d'un inhibiteur du microARN-210 dans les cellules HUVEC inhibe la tubulogenèse *in vitro*. (C) Le microARN-210 régule négativement l'expression de la protéine EFNA3 (*ephrin A3*) en conditions hypoxiques. D'après (Fasanaro et al., 2008).

Une étude récente a révélé que la surexpression du microARN-148b induit la migration et la prolifération des cellules HUVEC ainsi que la néo-vascularisation *in vitro* en inhibant l'expression des gènes *TGFB2* (*Transforming growth factor beta 2*) et *SMAD2* (*SMAD family member 2*) ; codant deux modulateurs essentiels de la phase de transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT) (Miscianinov et al., 2018). Dans un modèle murin de cicatrisation de blessure par excision, la surexpression du microARN-148b accélère considérablement le processus de cicatrisation *in vivo* (Miscianinov et al., 2018).

A l'inverse, la surexpression du microARN-200b ralentit la vitesse de fermeture de la plaie en supprimant l'expression de *ETS-1* (*E26 transformation-specific-1*), *GATA2* et *VEGFR2* (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*) chez des souris WT et atteintes expérimentalement de diabète de type 2 (Chan et al., 2011a, 2012; Pizzino et al., 2018).

La formation du tissu de granulation

Suite à l'étape d'inflammation cutanée, les fibroblastes en périphérie de la lésion, envahissent le foyer lésionnel et sécrètent des MMP matricielles afin de remplacer la matrice de fibrine provisoire par le tissu de granulation, riche en collagène de type III, protéoglycanes et glycosaminoglycanes. La migration des fibroblastes est guidée par des médiateurs biochimiques, tels que le PDGF, FGF, LTB4 (*Leukotriene B4*), TGF- α , TGF- β et IL-1, des éléments de la MEC (FN et HA) et la pression partielle en oxygène.

Une analyse du profil d'expression complet des microARNs réalisée à partir d'explants de peau de souris prélevés au 7^{ième} jour suivant la création d'une plaie a confirmé la surexpression du microARN-21 dans le tissu de granulation (Wang et al., 2012b). Des expériences de perte et de gain de fonction *in vivo* ont également montré que le microARN-21 induit la migration des fibroblastes humains (Madhyastha et al., 2012). A l'inverse, les microARN-98, -141-3p, -185 et -29b régulent négativement la migration et la prolifération des fibroblastes dans la plaie (Madhyastha et al., 2012). Plusieurs études ont montré que le microARN-29b réprime l'expression de différents gènes codant des protéines de la MEC dont l'élastine et le collagène de type I et III (Kriegel et al., 2012; Guo et al., 2017). Dans un modèle murin de cicatrisation de blessures par excision ou de brûlures, la sous-expression du microARN-29b corrèle avec l'augmentation de l'expression de la HSP47 (Zhu et al., 2016). La HSP47 est une protéine chaperone nécessaire pour la maturation des procollagènes et leur sécrétion dans l'espace extracellulaire. Elle a été identifiée comme cible directe du microARN-29b par des algorithmes de prédiction *in silico* et des expériences de validation fonctionnelle *in vitro*. La transcription du microARN-29b est inhibée dans les fibroblastes humains par la voie de signalisation TGF- β /SMAD tandis qu'elle est activée par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α via la voie de signalisation NF- κ B (Zhu et al., 2016). Le microARN-98 et -185 régulent directement l'expression du gène *COL1A1* codant les chaînes α 1 du collagène de type I dans les fibroblastes, se traduisant par une diminution de la viabilité cellulaire et l'induction de l'apoptose (Bi et al., 2017; Xiao et al., 2017).

La contraction de la plaie est assurée par les fibroblastes qui se différencient en myofibroblastes, caractérisés par l'expression *de novo* de la protéine α -SMA (Diegelmann

and Evans, 2004; Vedrenne et al., 2012). Il a été démontré que le microARN-203 induit la différenciation des CS épidermiques en myofibroblastes en inhibant l'expression de Hes1 (*Hairy/Enhancer of split-1*) au niveau post-transcriptionnel (Zhou et al., 2018). L'expression de Hes1 est connue pour être régulée par la voie de signalisation Notch et joue un rôle essentiel dans la prolifération des CS épidermiques (Lampreia et al., 2017).

1.2.4.2.3 La phase de remodelage

La dernière étape de la cicatrisation cutanée correspond à la phase de remodelage, qui peut durer plusieurs semaines voire même une année selon le degré de sévérité de la plaie. Durant cette dernière phase, le tissu de granulation est progressivement remplacé par un tissu organisé et fonctionnel. Le collagène de type III est dégradé par les MMPs sécrétées par les fibroblastes et les macrophages et est remplacé par du collagène de type I.

Il a été démontré que le microARN-1908 est surexprimé dans le tissu cicatriciel humain. En inhibant l'expression du proto-oncogène Ski (*Sloan-kettering institute*) au niveau post-transcriptionnel dans les fibroblastes primaires humains, le microARN-1908 permet l'activation de la voie de signalisation du TGF- β 1. Le TGF- β 1, par l'intermédiaire des protéines effectrices intracellulaires SMADs, induit la transcription des gènes impliqués dans la prolifération (Meox2 (*Mesenchyme homeobox 2*)) et la différenciation (α -SMA) des fibroblastes, ainsi que ceux codants pour des ligands de la MEC (collagène de type I), contribuant ainsi au remodelage du derme (Xie et al., 2016).

Par ailleurs, la surexpression du microARN-145 induite par le TGF- β 1 chez des cultures primaires de fibroblastes humains conduit à l'inhibition de l'expression de KLF4 (*Kruppel-like factor 4*), un inhibiteur connu de la protéine α -SMA, favorisant ainsi la synthèse de collagène de type I (Gras et al., 2015).

Il a récemment été démontré que la surexpression du microARN-29b dans un modèle murin de brûlure thermique réduisait la formation excessive de tissu cicatriciel via l'inhibition de la voie de signalisation TGF- β 1-Smad-CTGF (*Connective tissue growth factor*) (Guo et al., 2017).

1.2.4.3 Dans le développement des pathologies cutanées

La dérégulation de l'expression des microARNs a été étudiée dans de nombreuses pathologies cutanées, telles que les cancers de la peau, l'acné, le vitiligo, la sclérodermie systémique, la dermatite atopique, la dermatomyosite, le psoriasis et les plaies chroniques (Schneider, 2012; Glavač and Ravnik-Glavač, 2015; Singhvi et al., 2018; Ross, 2018).

1.2.4.3.1 Les plaies chroniques

Comme détaillé dans les paragraphes précédents, la cicatrisation est un processus complexe, impliquant une cascade d'évènements moléculaires et cellulaires conduisant au maintien de l'intégrité de la fonction barrière de la peau. Lorsque la cicatrisation progresse anormalement, une plaie chronique peut survenir. Dououreuse et invalidante, la plaie chronique met en moyenne entre 147 et 271 jours pour cicatriser (<https://www.infci.fr/formation/prise-en-charge-des-plaies-chroniques/>). Il existe plusieurs étiologies à ce problème (insuffisance vasculaire, obésité, diabète sucré, vieillissement et affaiblissement du système immunitaire) et toutes représentent un lourd fardeau pour les patients et le système de santé publique (Eming et al., 2014). En France, près de 2 millions de personnes souffrent chaque année de plaies chroniques (Assurance Maladie, chiffres de 2018) et près de 42 % d'entre elles nécessitent une prise en charge médicale. Selon un rapport d'étude de marché réalisé en 2018, le marché mondial annuel des produits de soin des plaies chroniques devrait dépasser les 22 milliards de dollars d'ici 2024 (Sen, 2019).

Récemment, une analyse comparative des profils d'expression des microARNs (miRNome) extraits des marges de plaies aiguës de donneurs sains et de plaies de patients souffrants de différents types d'ulcères chroniques : escarres (*Pressure ulcer*, PU), ulcères veineux (*Veinous ulcer*, VU) et ulcères du pied diabétique (*Diabetic foot ulcer*, DFU), a mis en évidence une diminution significative du niveau d'expression du cluster polycistronique du microARN-17-92 qui contient les séquences codantes pour les microARN-17, -18a, -20a, -19a, -19b et -92a) (Li et al., 2017). La répression de ce cluster polycistronique dans les plaies chroniques chez les patients PU, VU et DFU a été confirmée par une étude indépendante publiée en Mars 2021 (Li et al., 2021) (**Figure 25A**).

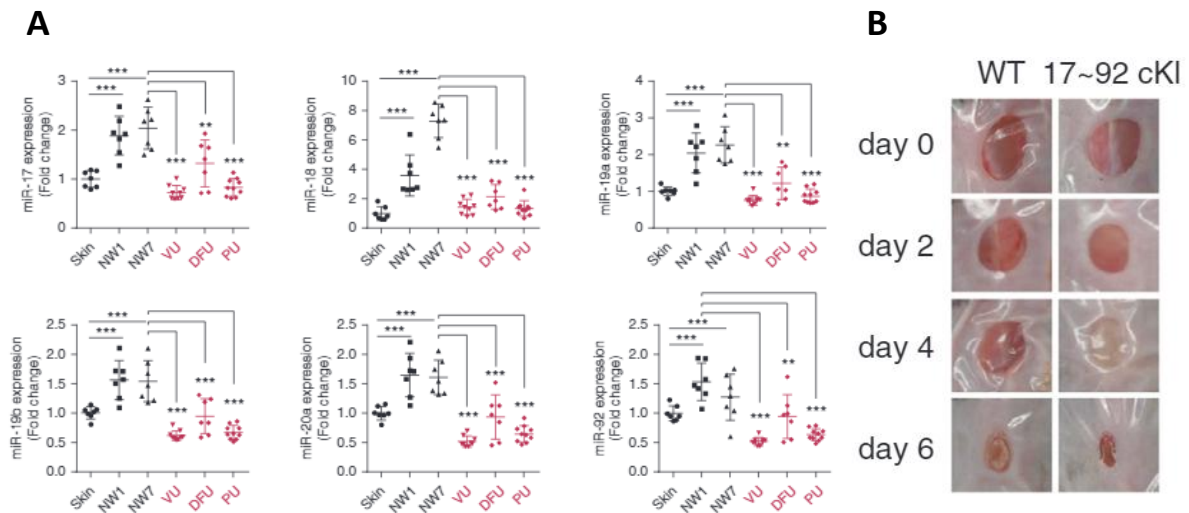


Figure 25 : Implication du cluster microARN-17-92 dans les plaies chroniques.

(A) Diminution de l'expression de l'ensemble des microARNs composant le cluster polycistronique du microARN-17-92 (microARN-17, -18a, -20a, -19a, -19b et -92a) dans les plaies des patients souffrant d'ulcères veineux (VU), ulcère du pied diabétique (DFU) et escarres (PU) par rapport aux plaies aiguës de volontaires sains (NW). (B) La surexpression du cluster microARN-17-92 dans les kératinocytes de l'épiderme (17-92 cKI) accélère la cicatrisation des plaies dans un modèle de souris diabétique de type 1. D'après (Li et al., 2021).

Dans cette étude, les auteurs ont montré que dans un modèle de souris diabétique de type 1 induit par l'injection de streptozotocine (STZ), un agent antinéoplasique alkylant naturel qui détruit les cellules β productrices d'insuline, la surexpression du cluster *microARN-17-92* dans les kératinocytes de l'épiderme (17-92 cKI) accélère la cicatrisation des plaies par rapport aux souris diabétiques contrôles (WT) (**Figure 25B**). A l'inverse, dans un modèle de souris *microARN-17-92* cKO, caractérisé par la délétion conditionnelle du cluster *microARN-17-92* dans les kératinocytes, la cicatrisation des plaies est significativement ralentie par rapport aux souris sauvages. Sachant que la sous-expression de trois des microARNs appartenant au cluster polycistronique *microARN-17-92* (microARN-19a, microARN-19b et microARN-20a) affecte ni la migration ni la prolifération des kératinocytes, les auteurs ont supposé que ces microARN pourraient réguler l'inflammation. Les kératinocytes épidermiques expriment à leur surface le TLR3 (*toll-like receptor 3*), dont l'activation est nécessaire pour induire une réponse inflammatoire lors de la cicatrisation. Le TLR3 peut être activé *in vitro* par un ARNdb synthétique : l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly[I:C]) (Lai et al., 2009). La transfection d'inhibiteurs des microARN-19a, -

19b et -20a dans les kératinocytes primaires humains stimulés par le poly[I:C], induit l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires telles que CXCL8, CXCL5, TNF- α et IL-1 α . Au contraire, la transfection des kératinocytes primaires avec des oligonucléotides synthétiques mimant ces mêmes microARNs diminue la production des marqueurs pro-inflammatoires. Des analyses fonctionnelles ont révélé que les microARN-19a, -19b et -20a suppriment l'inflammation induite par la poly[I:C] en régulant la voie de signalisation de NF- κ B via la diminution de la phosphorylation et la translocation nucléaire de la sous unité p65 de ce facteur de transcription. Grâce à des outils de prédiction *in silico* (TargetScan, MiRDB et DIANA-microT-CDS) et des tests de gène rapporteur luciférase, les auteurs ont démontré que le SHCBP1 (*SHC binding and spindle associated 1*) et le SEMA7A (*Semaphorin-7A*) sont des cibles respectives des microARN-19a/b et du microARN-20a. *In vivo*, l'expression de SHCBP1 et SEMA7A est en effet plus élevée dans les berges des plaies des souris microARN-17-92 cKO que dans les berges des plaies des souris sauvages. Par ailleurs, l'expression de SHCBP1 et SEMA7A est plus forte dans les plaies des patients DFU, VU et PU que dans les plaies des volontaires sains (Li et al., 2021).

L'ensemble de ces résultats indique que la sous-expression du cluster microARN-17-92 dans les plaies chroniques contribue à l'exacerbation de la phase inflammatoire via la surexpression de SHCBP1 et SEMA7A. Le cluster microARN-17-92 pourrait ainsi représenter une cible moléculaire d'intérêt thérapeutique.

1.2.4.3.2 Le psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau touchant près de 3 millions de personnes en France et 3 % de la population mondiale. Les causes exactes à l'origine du développement de la pathologie sont encore mal connues. L'hypothèse d'un dérèglement du système immunitaire chez des individus génétiquement prédisposés est aujourd'hui privilégiée. Cette maladie est caractérisée par des plaques érythémato-squameuses bien délimitées associées à une hyper-prolifération et une différenciation anormale des kératinocytes, une inflammation exacerbée et une hyper-vascularisation du derme superficiel (Lowe et al., 2007; Rendon and Schäkel, 2019) (**Figure 26A**).

En 2007, Sonkoly et ses collègues ont mis en évidence pour la première fois l'existence de signatures de microARNs spécifiques dans des peaux de patients atteints de psoriasis en comparaison des peaux de patients souffrant de dermatite atopique et des peaux normales (Sonkoly et al., 2007). Depuis, d'autres miRNomes ont été réalisés sur de larges cohortes de patients (Joyce et al., 2011; Delić et al., 2020). Parmi les microARNs particulièrement sur-exprimés dans le psoriasis, on retrouve les microARN-203, -19a, -142-3p, -223, -378, -100, -184, -146a, -21 et -31 tandis que les microARN-125b, -99a, -150, -197, -520 et -424 sont précisément sous-exprimés.

D'un point de vue mécanistique, Sonkoly et ses collègues ont démontré que le microARN-203 était capable de lier 10 nucléotides dans la région 3'-UTR de l'ARNm SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling-3*), empêchant ainsi sa traduction (Sonkoly et al., 2007). Dans la peau saine, la protéine SOCS3 est exprimée dans la couche basale de l'épiderme alors que le microARN-203 est exprimé dans les couches suprabasales. En revanche, dans les lésions psoriasiques, le microARN-203 est surexprimé dans toutes les couches épidermiques, y compris dans la couche basale, inhibant ainsi l'expression de SOCS3 dans ce compartiment germinatif (**Figure 26B**). La protéine SOCS3 est connue pour bloquer l'activation du facteur de transcription STAT3, impliqué dans l'hyperprolifération des kératinocytes dans l'épiderme des patients psoriasiques (Lowes et al., 2007). L'augmentation de la phosphorylation de STAT3 a été mise en évidence dans les lésions cutanées de patients souffrant de psoriasis. Par ailleurs, les souris transgéniques exprimant de manière constitutive la forme active de STAT3 dans les kératinocytes développent des lésions cutanées comparables à celles des patients souffrant de psoriasis (Sano et al., 2005). Plusieurs cytokines et facteurs de croissance surexprimés dans les lésions psoriasiques, telles que l'IL-6 et l'IL-20, activent STAT3 (Grossman et al., 1989). La perte de fonction de SOCS3 conduit à l'activation continue de STAT3 en réponse à l'IL-6 dans les macrophages (Crocker et al., 2003). Outre son rôle dans la régulation de la prolifération et l'inflammation, SOCS3 contrôle la différenciation des kératinocytes. Goren et ses collègues ont montré que la surexpression de SOCS3 induit la différenciation terminale des kératinocytes (Goren et al., 2006). Ainsi, la suppression de SOCS3 par le microARN-203 dans les kératinocytes induit l'activation prolongée de STAT3, provoquant l'hyperprolifération des kératinocytes, l'inhibition de la différenciation terminale des kératinocytes et la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires solubles. Ces derniers

favorisent l'infiltration des leucocytes dans l'épiderme qui stimulent les réponses inflammatoires. Ce processus est à l'origine d'un cercle vicieux d'activation cellulaire réciproque induisant des lésions psoriasiques et favorisant leur persistance.

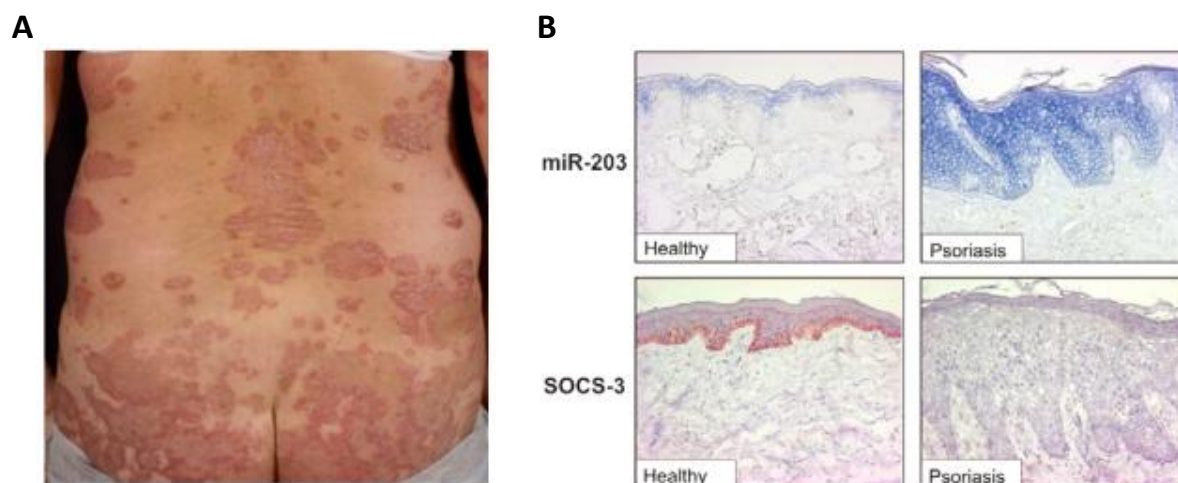


Figure 26 : Implication du microARN-203 dans le psoriasis.

(A) Manifestations cutanées du psoriasis se caractérisant par des plaques inflammatoires rouges, bien délimitées, rondes, ovales ou polylobées, recouvertes de squames. D'après (Rendon and Schäkel, 2019). (B) Dans les lésions psoriasiques, l'expression du microARN-203 dans la couche basale de l'épiderme (en bleu) provoque l'inhibition de SOCS3 dans ce compartiment germinatif (en rouge). D'après (Sonkoly et al., 2007).

Contrairement au microARN-203, Xu et al. ont montré que le microARN-125b est exprimé dans toutes les couches de l'épiderme chez les individus sains tandis que son expression est fortement diminuée dans l'épiderme des patients souffrant de psoriasis (Xu et al., 2011) (**Figure 27A**). La répression du microARN-125b dans les lésions psoriasiques pourrait inhiber la différenciation des kératinocytes au profit de leur prolifération. Il a été montré en effet que la surexpression du microARN-125b par transfection de pré-microARN-125b dans les kératinocytes primaires humains induit l'expression des marqueurs de différenciation (K10, IVL, FLG et microARN-203) et diminue de 47 % la prolifération des cellules. L'utilisation de trois algorithmes (PicTar, miRWalk et RNAhybrid) a permis aux auteurs d'identifier le gène *FGFR2* (*fibroblast growth factor receptor 2*) comme cible potentielle du microARN-125b. Des tests de validation fonctionnelle ont confirmé que le microARN-125b régule l'expression de *FGF2* au niveau post-transcriptionnel en se liant par complémentarité de bases à de courtes séquences situées dans la 3'-UTR de son transcrit

(**Figure 27B**). FGFR2 joue un rôle important dans la croissance des cellules épithéliales et la différenciation cellulaire (Katoh, 2009). La surexpression de son isoforme FGFR2-IIIb a été observée dans de nombreuses tumeurs d'origine épithéliale, pouvant être associée à un processus de transformation maligne (Finch and Rubin, 2006). Dans la peau saine, FGFR2 est principalement exprimée dans les kératinocytes basaux de l'épiderme, tandis que dans les lésions psoriasiques, son expression s'étend jusque dans les couches suprabasales de l'épiderme. De manière intéressante, les auteurs ont montré l'existence d'une corrélation positive entre l'expression du FGFR2 et l'hyperprolifération des kératinocytes dans les lésions psoriasiques. En effet, l'inhibition du FGFR2 par un siRNA (*small interfering RNA*) bloque la prolifération des kératinocytes. Ces observations sont en accord avec des études *in vivo* chez la souris indiquant que la délétion de FGFR2 cause une hypoplasie sévère (Revest et al., 2001; Petiot et al., 2003).

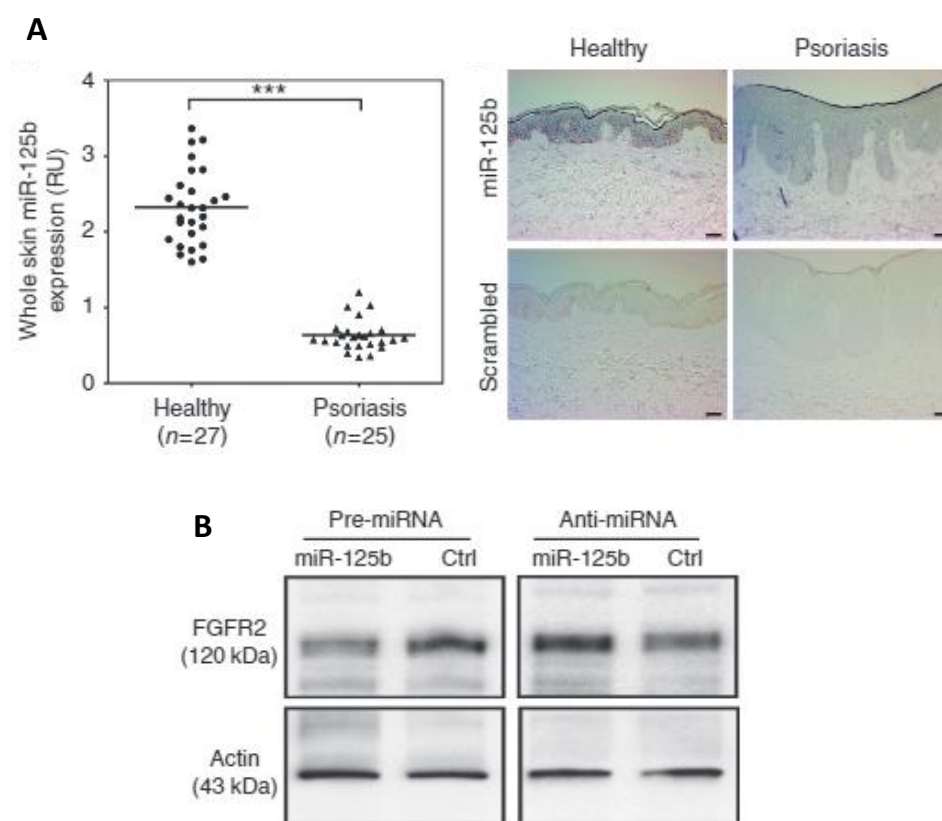


Figure 27 : Implication du microARN-125b dans le psoriasis.

(A) Mise en évidence de la sous-expression du microARN-125 dans les lésions psoriasiques. (B) La sur- ou sous-expression du microARN-125b est inversement corrélée avec celle de FGFR2. D'après (Xu et al., 2011).

1.2.4.3.3 La sclérodermie systémique

La sclérodermie systémique (SS) est une maladie auto-immune rare. Elle est caractérisée par une fibrose cutanée induite par l'activation incontrôlée des fibroblastes favorisant un excès de synthèse de protéines de la MEC, dont les collagènes de type I et III. Cette physiopathologie est complexe et son étiologie est encore inconnue. Le rôle des cytokines profibrotiques et des facteurs de croissance tels que l'IL-4, le TGF- β 1 et le PDGF dans l'activation des fibroblastes a été démontré. Plusieurs facteurs épigénétiques impliquant la méthylation de l'ADN et la déacétylation des histones ont également été mis en évidence (Shin et al., 2019). Le rôle des microARNs dans cette maladie orpheline a récemment été étudié.

Les microARN-16-5p, -21-5p, -29, -31, -34a, -146b, -130b et -155-5p ont été détectés comme étant surexprimés chez des patients souffrant de SS par rapport à des sujets sains. À l'inverse les microARN-145 et -10b ont été détectés à la baisse chez ces mêmes sujets (Zhou et al., 2017).

Maurer et ses collègues se sont particulièrement intéressés au rôle régulateur de la famille microARN-29 (microARN-29a, -29b et -29c) dans la SS (Maurer et al., 2010). Sa séquence *seed* est hautement conservée chez les vertébrés et contient des sites de liaison à la région 3'-UTR des ARNm de gènes profibrotiques, tels que le collagène de type I et III, le PDGF-B et son récepteur PDGFR β , Sp-1, et SPARC (*Thrombospondin and secreted protein acidic and rich in cysteine*) (Landgraf et al., 2007). Les auteurs ont montré que la diminution de l'expression de la famille microARN-29, et en particulier le microARN-29a, corrèle avec l'augmentation de l'expression du collagène de type I α 2 et III dans les peaux de patients souffrant de SS en comparaison des peaux de volontaires sains (**Figure 28A-B**) (Maurer et al., 2010). Des expériences de perte et gain de fonction de la famille microARN-29 par transfection de microARNs précurseurs ou inhibiteurs des microARN-29a, -29b et -29c dans les fibroblastes de patients souffrant de SS ont permis de confirmer l'implication de cette famille dans la fibrogenèse (**Figure 28C**). Par ailleurs, les auteurs ont démontré que la famille microARN-29 régule directement l'expression du collagène de type III au niveau post-transcriptionnel. En effet, la transfection d'un vecteur pGL3 contenant le gène de la

luciférase en amont de la région 3'-UTR de l'ARNm de *COL3A1* réduit de moitié l'activité de la luciférase dans les cellules HEK293 en présence de pré-microARN-29a, -29b ou -29c. Par ailleurs, les auteurs ont montré que la famille microARN-29 est un important médiateur en aval de l'activité profibrotique des cytokines TGF- β , PDGF-B et IL-4. En effet, l'inhibition de la signalisation PDGF- β et TGF- β par traitement des fibroblastes de patients souffrant de SS avec un inhibiteur de tyrosine kinase, l'imatinib, restaure l'expression du microARN-29a. Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo*. Dans modèle murin de fibrose cutanée induite par la bléomycine, le traitement des souris par l'imatinib induit la surexpression de la famille microARN-29 en comparaison des souris contrôles traitées par du chlorure de sodium. Ces données indiquent que la dérégulation de la famille microARN-29 dans la SS est médiée, en partie, par les cytokines et facteurs de croissance profibrotiques. Le mécanisme moléculaire exact impliqué dans la répression de la famille microARN-29 dans la SS reste encore mal compris. Il n'est pas exclu que des modifications épigénétiques contribuent à la baisse de l'expression de la famille microARN-29. Des études ont montré que dans les cellules de RMS (Rhabdomyosarcome) et de tumeurs primitives de RMS, où la différenciation est altérée, l'expression de la famille microARN-29 est inhibée par un mécanisme épigénétique impliquant la voie de signalisation NF- κ B-YY1 (*Ying Yang 1*) (Wang et al., 2008). Le NF- κ B induit l'expression du facteur de transcription YY1, qui se lie à l'ADN au niveau d'une séquence régulatrice (5'-CCGGCATNTT-3') située dans le promoteur du cluster microARN-29b/c. En tant que membre du groupe Polycomb (PcG), YY1 recrute et coopère avec des enzymes modificatrices de l'ADN, dont l'HDAC1 (*Histone déacetylase 1*) et l'Ezh2 (*Enhancer of Zeste 2*), pour remodeler la chromatine et inhiber ainsi la transcription du microARN-29b/c. D'autre part, les DNMT3A et DNMT3B (*DNA methyltransferases*) ont été validées expérimentalement comme étant des cibles du microARN-29 (Fabbri et al., 2007), suggérant que la famille microARN-29 pourrait jouer un rôle dans la régulation épigénétique des gènes profibrotiques dans la SS. Le développement des stratégies pour maintenir l'expression ou empêcher la répression de la famille microARN-29 semble être une option thérapeutique prometteuse pour la SS.

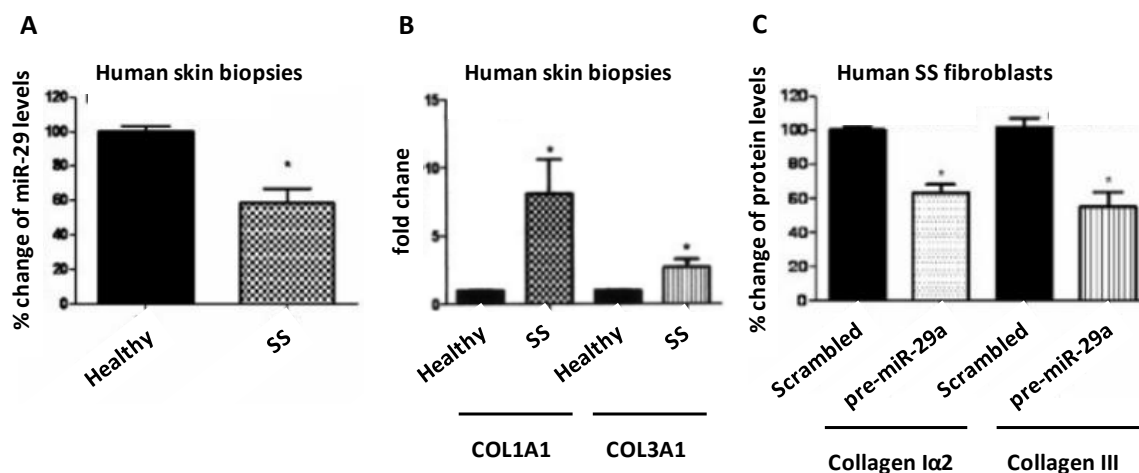


Figure 28 : Implication de la famille microARN-29 dans la sclérodémie systémique (SS).

(A) Diminution de l'expression de la famille microARN-29 dans la peau des patients souffrant de SS en comparaison des sujets sains. (B) Augmentation de l'expression du gène *COL1A1* et *COL3A1* codant respectivement les chaînes $\alpha 1$ du collagène de type I et les chaînes $\alpha 1$ du collagène de type III dans la peau des patients souffrant de SS en comparaison des sujets sains. (C) La surexpression du microARN-29a par transfection de pré-microARN-29a dans les fibroblastes de patients souffrant de SS diminue l'expression protéique du collagène de type I α 2 et III. D'après (Maurer et al., 2010).

1.3 Les plantes, sources de composés bioactifs d'intérêt pharmacologique et scientifique

1.3.1 La phytothérapie au travers les siècles

L'usage des plantes médicinales remonte à plus de 5 000 ans avant Jésus-Christ (J.-C.). En Chine, l'empereur Fu Hsi fut l'inspirateur de la médecine traditionnelle chinoise. Relayé par ses successeurs Shen Nong puis Huang Di, la culture des plantes et les principes de l'acupuncture furent renseignés dans les ouvrages *Pen T'sao* et *Huangdi Nei Jing* (Hou, 1977).

Vers le IV^e millénaire avant J.-C., les civilisations du Proche-Orient Antique, de l'Égypte et de la Mésopotamie, développèrent elles aussi un système médical sophistiqué (Borchardt, 2002). Le papyrus d'Ebers conservé à la bibliothèque de l'Université de Leipzig en Allemagne en est le principal témoignage (**Figure 29A**). Rédigé en écriture hiéroglyphique par un scribe anonyme vers 1580 avant J.-C. sous le règne d'Amenhotep 1^{er}, il fut découvert à Louxor en 1862 par le marchand et collectionneur Edwin Smith avant d'être vendu à

l'égyptologue allemand Georg Moritz Ebers, à qui il doit son nom et sa première traduction. Long de plus de 20 mètres, pour une largeur de 30 centimètres et un total de 876 paragraphes, ce document recense d'innombrables substances curatives d'origine végétale, animale et minérale destinées à soigner des affections somatiques ou psychiatriques. L'arnica (*Arnica nilotica* Del.) et l'aloès (*Aloe vera* L.) y figurent notamment dans une préparation contre les blépharites et orgelets sous forme de collyres. Ces remèdes naturels étaient souvent associés à des incantations aux divers dieux et démons. A l'époque, les essences de plantes étaient particulièrement appréciées pour leur pouvoir odorant et esthétique, mais aussi pour leurs vertus antibactériennes et antiputrides lors des cérémonies d'embaumement (Alamgir, 2017).

Outre les papyrus égyptiens, des tablettes d'argile sumériennes et akkadiennes rédigées en écriture cunéiforme entre le III^e et le I^{er} millénaire avant notre ère constituent une source d'information précieuse sur les pratiques médicales en Mésopotamie (**Figure 29B**). Ces textes, considérés comme les plus anciens écrits de l'humanité, dévoilent une liste de plus de mille végétaux utilisés pour la confection de pommades, poudres, pilules ou lotions, et leur mode de préparation (dessiccation, purification, extraction, cuisson, filtrage, etc.) (Fleurentin et al., 2014).

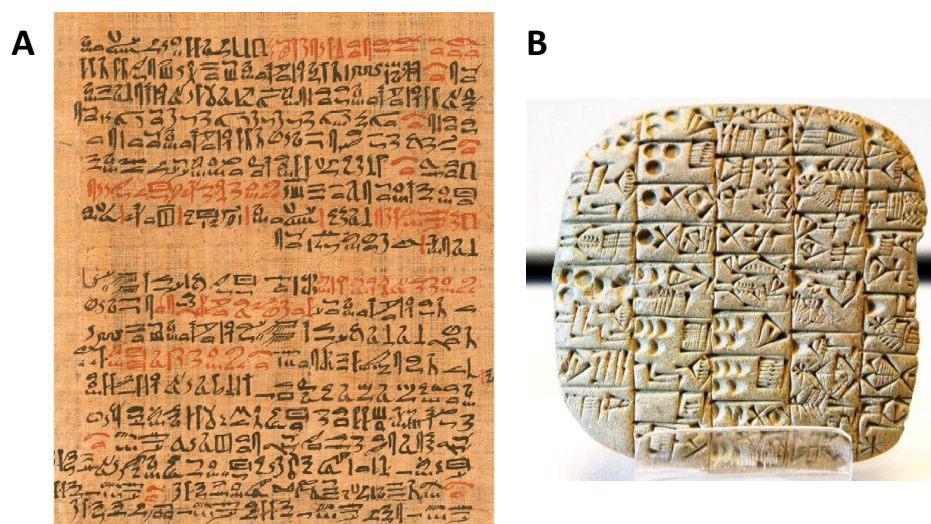


Figure 29 : Anciens documents témoignant de l'utilisation des plantes en Egypte et Mésopotamie antique.

(A) Illustration d'une partie du Papyrus d'Ebers (Musée Leipzig, Allemagne). Adapté de (Ursin et al., 2018) (B) Tablette d'Uruk (Musée du Louvre, France).

Au fil des siècles, les connaissances acquises sur les plantes se sont transmises aux nouvelles civilisations et se sont enrichies.

Au I^{er} siècle après J.-C., le médecin et apothicaire grec Pedanius Dioscorides, considéré comme le père de la pharmacologie, inventoria dans son célèbre ouvrage, *De Materia Medica*, plus de 500 espèces de plantes médicinales (Staub et al., 2016). Cet ouvrage fut traduit en plusieurs langues (arabe, latine et espagnole) et édité en plusieurs exemplaires, dont une précieuse édition fut enluminée pour être offerte au futur roi Philippe II alors qu'il était encore prince. Ce document majeur a constitué la base des études médico-botaniques pendant plus de 1 500 ans.

Au Moyen Âge, le monde végétal tient une place importante dans tous les domaines, qu'il soit politique, littéraire ou héraldique. La méconnaissance des plantes attribue à celles-ci des pouvoirs magiques et des superstitions. Classifiées en plusieurs catégories (guérisseuses, divinatoires, maléfiques, aphrodisiaques, etc.), elles entrent dans la composition de diverses potions, électuaires et onguents. En 1347, la peste bubonique frappa toute l'Europe. Pour se protéger et soigner la population, les médecins portent alors un masque au bec de canard rempli de plantes aromatiques censées éloigner le Mal. En vain. Contrairement à ce qui était pensé, la maladie se transmettait par piqure de puces de rongeurs infectés et non pas par voie aérienne. L'épidémie fit 7 millions de victimes en France (Blakemore, 2020).

Plus tard, l'invention de l'imprimerie par Johannes Gutenberg en 1454 permit l'écriture et la distribution de grands traités de botanique en Europe. Le premier, le *Herbarius Moguntinus*, fut édité à Mayence en 1484 par Peter Schöffer suivit du *German Herbal* (1485), *De Historia Stirpium* (Leonhart Fuchs, 1542) et *Kreütter Buch* (Hieronymus Bock, 1546) (Sneader, 2005).

Jusqu'au XVIII^e siècle, l'usage des plantes médicinales était basé sur des observations empiriques, sans aucune connaissance mécanistique de l'activité pharmacologique de leurs principes actifs. Il fallut attendre l'avènement de la chimie extractive au XIX^e siècle pour que la phytothérapie fasse un bond de géant (Atanasov et al., 2015). A cette époque,

l'apothicaire allemand Friedrich Wilhelm Adam Sertürner extrait une substance alcaloïde des graines du pavot (*Papaver somniferum*). Il expérimente alors les effets de celle-ci sur des rats et des chiens errants puis sur lui-même, et s'aperçoit qu'elle possède des propriétés analgésiques et sédatives. En référence au dieu des rêves Morphée, il la nomme morphine. A l'issue de ses recherches il établit le principe selon lequel les plantes contiennent des molécules actives qui, une fois isolées exercent de puissantes activités curatives (Hamilton and BAskett, 2000; Krishnamurti and Rao, 2016). Cette découverte fut la première d'une longue série (nicotine, caféine, codéine, cocaïne, quinine...) et constitua le point de départ de la révolution thérapeutique (Sneader, 2005). Certaines apothicaireries se spécialisèrent dans la purification de composés naturels et devinrent les précurseurs des laboratoires pharmaceutiques, à l'exemple de Merck (Darmstadt), la plus ancienne entreprise chimique et pharmaceutique au monde.

Progressivement les laboratoires entreprirent les premiers essais de fabrication de produits naturels par synthèse chimique afin d'augmenter les volumes de production tout en réduisant les coûts et contrôlant leur qualité (Hill, 2012). C'est dans ce contexte qu'en 1853 le chimiste français Charles-Frédéric Gehardt obtint le premier composé naturel de synthèse : l'acide acétylsalicylique, plus connu sous le nom commercial d'aspirine (Bayer). Avec une consommation annuelle mondiale de plus de 40 000 tonnes, l'aspirine fait aujourd'hui partie des médicaments les plus consommés au monde et est inscrite dans la liste des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Mikulic, 2021).

Depuis, l'Homme ne cesse de s'inspirer de la Nature pour imaginer les médicaments de demain (Cragg and Newman, 2013). D'après l'OMS, 80 % de la population mondiale a recours aux plantes pour se soigner, notamment en Afrique, Inde et Asie, et près de 60 % des molécules actives utilisées en thérapeutique humaine sont d'origine naturelle (Chin et al., 2006; Patridge et al., 2016; Newman and Cragg, 2020).

1.3.2 Les avantages des plantes dans le développement de produits bioactifs

« *When you have no idea where to begin in a drug discovery program, Nature is a good starting point* » (Caporale, 2003).

En effet, les plantes sont de formidables usines capables de produire des milliers des substances naturelles bioactives, appelées métabolites secondaires. A la différence des métabolites primaires qui sont indispensables au développement, à la croissance et à la reproduction du végétal, les métabolites secondaires sont étroitement impliqués dans l'adaptation de la plante à son environnement (Pavarini et al., 2012; Ramakrishna and Ravishankar, 2011). Le stress hydrique et salin, les changements de température, l'exposition à des organismes pathogènes et des insectes, sont autant de stimuli qui affectent de manière importante les végétaux (**Figure 30**). Les métabolites secondaires résultent ainsi d'un processus d'évolution biochimique souvent imposé par les phénomènes de co-évolution entre la plante et les autres organismes qui interagissent avec elle (Dias et al., 2012; Jamwal et al., 2018; Thakur et al., 2019).

En fonction de leur voie de biosynthèse, les métabolites secondaires peuvent se diviser en quatre principales familles : Les composés phénoliques, les terpènes et les composés soufrés et azotés (A. Hussein and A. El-Anssary, 2019). Chaque famille comprend elle-même une dizaine de milliers de structures chimiques différentes (**Figure 31**).

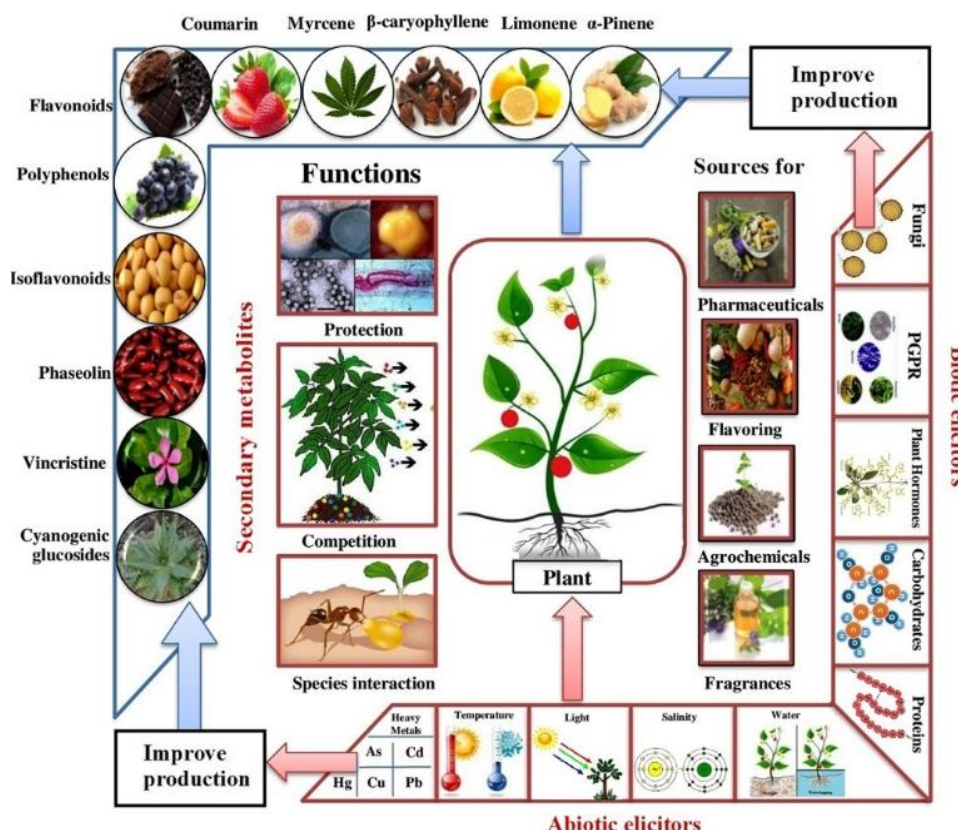


Figure 30 : Les stress biotiques et abiotiques influencent la production qualitative et quantitative des métabolites secondaires par les plantes. D'après (Thakur et al., 2019).

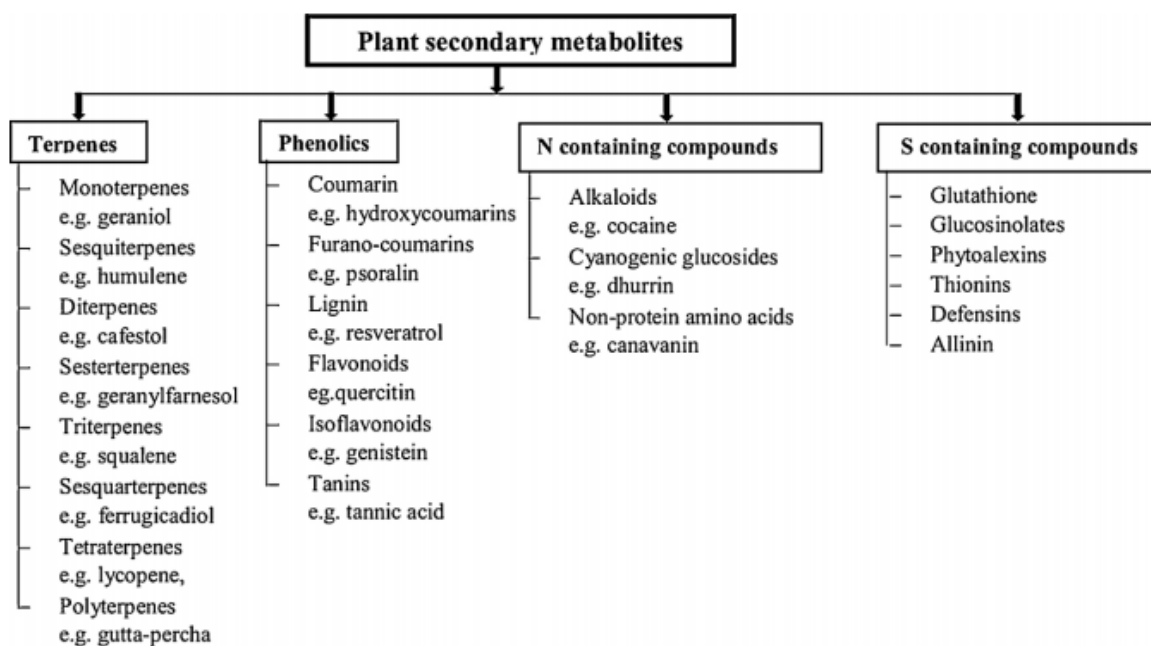


Figure 31 : Exemples de familles et sous-familles de métabolites secondaires. D'après (Jamwal et al., 2018).

De ce fait, cette « bibliothèque » de molécules originales renferme une multitude de candidats potentiels pour des cibles biologiques nouvelles et/ou difficiles à cibler (Koehn and Carter, 2005; Butler, 2008). De part leur diversité structurale sans égale, les métabolites secondaires occupent une part plus importante de l'espace chimique (*chemical space*) que les molécules synthétiques fabriquées artificiellement par les scientifiques (Feher and Schmidt, 2003; Dobson, 2004; Ertl and Schuffenhauer, 2008) (**Figure 32**).

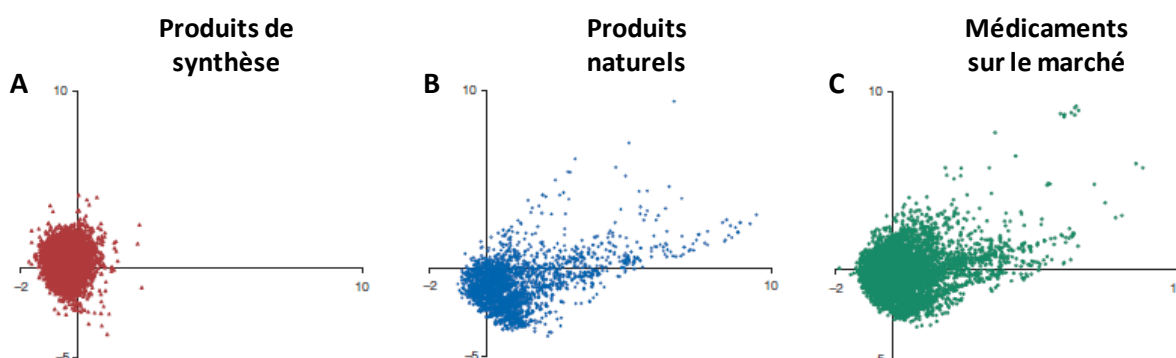


Figure 32 : Comparaison des propriétés de différentes classes de molécules recensées dans une base de données.

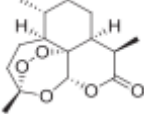
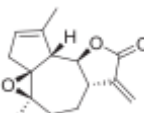
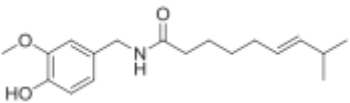
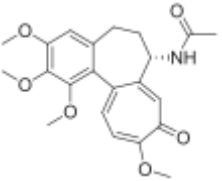
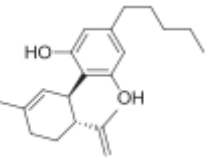
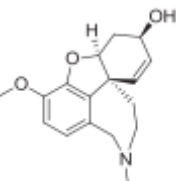
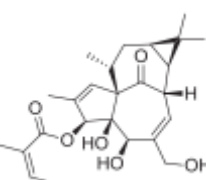
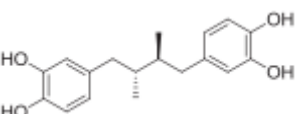
(A) Produits de synthèse, (B) Produits naturels et (C) Médicaments mis sur le marché. La diversité de ces molécules a été évaluée par l'Analyse des Composantes Principales (ACP). Les médicaments et les produits naturels couvrent l'espace chimique occupé par les produits de synthèse ainsi qu'un espace chimique additionnel. Adapté de (Dobson, 2004).

En effet, les molécules naturelles possèdent plus d'atomes d'oxygène et moins d'atomes d'azote, de soufre et d'halogène que les molécules synthétiques. Elles possèdent aussi plus de groupes fonctionnels (Henkel et al., 1999; Feher and Schmidt, 2003; Singh et al., 2009). En tant que molécules organiques, elles contiennent de nombreux centres chiraux qui leur confèrent une stabilité structurale et une rigidité conformationnelle, favorable à la fixation et l'activation de leurs cibles moléculaires (Feher and Schmidt, 2003). De nombreuses études ont montré que ces substances naturelles peuvent moduler aussi bien l'expression que l'activité d'une grande variété de protéines intracellulaires comme les topoisomérases, les peptidyltransférases, les cyclooxygénases, les kinases, la HMG-CoAR (*Hydroxy-methyl-glutary-coenzyme A reductase*), etc. (Jain et al., 2017; Sun et al., 2019; Mahdavi et al., 2020). Elles ont des affinités élevées pour des récepteurs spécifiques, tels que les récepteurs de neurotransmetteurs et les récepteurs couplés aux protéines G (Song et al., 1999; Silva et al., 2019; Muratspahić et al., 2019; Serrano-Marín et al., 2020).

Toutefois, bien qu'un grand nombre de métabolites secondaires soient biologiquement actifs et aient un profil ADME/T (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité) favorable, ils ne remplissent pas systématiquement les critères de « ressemblance médicamenteuse ». En effet, selon la « règle de cinq » proposée par Lipinski, le candidat-médicament doit satisfaire plusieurs propriétés pour pouvoir être testé en recherche clinique. Il doit (1) avoir moins de cinq donneurs de liaison hydrogène, (2) moins de dix accepteurs de liaison hydrogène, (3) un poids moléculaire inférieur à 500 daltons (Da), et (4) un coefficient de partage log P inférieur à 5 (Lipinski et al., 2001). Par conséquent, les molécules naturelles posent une série de défis aux laboratoires pharmaceutiques désireux de synthétiser des analogues à forte valeur ajoutée satisfaisant la règle des cinq. En effet en tentant d'améliorer leur absorption, d'augmenter leur efficacité ou encore de diminuer leur toxicité, les chimistes ont souvent recours à l'addition ou suppression de certains groupes fonctionnels présents sur les molécules d'origine naturelle. Ces modifications réduisent considérablement la diversité et complexité structurale des molécules semi-synthétiques ou synthétiques nouvellement créées (Katiyar et al., 2012; Xiao et al., 2016).

De nos jours, seuls 20 à 30 % des cibles moléculaires thérapeutiques sont accessibles aux médicaments d'utilisation courante, tels que les petites molécules synthétiques et les anticorps thérapeutiques (Hennemann et al., 2015). Grâce à leurs propriétés uniques, et en dépit de leur non-conformité à la « règle des cinq », les molécules naturelles peuvent agir sur les cibles moléculaires pour lesquelles aucun traitement n'est efficace actuellement (« *undruggable* » *targets*). (Dandapani and Marcaurelle, 2010; Koehn, 2012). Leur mécanisme d'action leur permet de couvrir tous les domaines thérapeutiques allant du traitement des allergies, aux maladies cardiovasculaires et métaboliques, en passant par les scléroses multiples, les cancers et les maladies infectieuses et parasitaires (Butler, 2005).

Le tableau ci-dessous illustre quelques exemples de produits naturels dérivés de plantes approuvés par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour leur usage thérapeutique (Atanasov et al., 2015) (**Tableau 2**).

Nom générique et structure chimique	Espèce de plante	Nom et année de commercialisation	Indication (Mécanisme d'action)
Artémisinine 	<i>Artemisia annua</i> L.	Artémisinine (1987)	Paludisme (formation de radicaux libres)
Arglabin 	<i>Artemisia obtusiloba</i> var. <i>glabra</i> Ledeb.	Arglabin (1999)	Chimiothérapie (inhibition de la farnésyl transférase)
Capsaïcine 	<i>Capsicum annum</i> L.	Qutenza (2010)	Neurologie (Activateur de récepteur TRPV1)
Colchicine 	<i>Colchicum</i> spp.	Colcrys (2009)	Goutte (liaison à la tubuline)
Cannabidiol 	<i>Cannabis sativa</i> L.	Sativex (2005)	Douleurs neuropathiques chroniques (activation des récepteurs CB1 et CB2)
Galanthamine 	<i>Galanthus caucasicus</i> (Baker) Grossh.	Razadyne (2001)	Démence (ligand de récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (hAChRs))
Ingenol mebutane 	<i>Euphoria peplus</i> L.	Picato (2012)	Kératose actinique (activateur de la mort cellulaire)
Masoprocol 	<i>Larrea tridentata</i>	Actinex (1992)	Chimiothérapie (inhibiteur de la lipoxigénase)

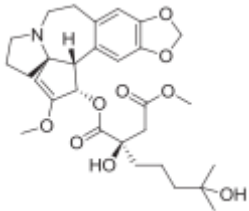
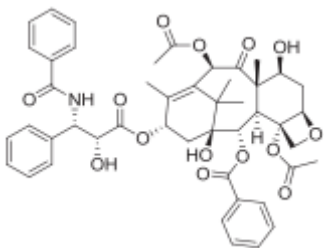
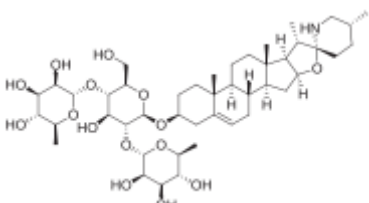
Homoharringtonine 	<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Synribo (2012)	Cancer (inhibiteur de la synthèse protéique)
Paclitaxel 	<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.	Taxol (1993), Abraxane (2005), Nanoxel (2007)	Chimiothérapie (inhibiteur de la mitose)
Solamargine 	<i>Solanum</i> spp	Curaderm (1989)	Chimiothérapie (activateur de l'apoptose)

Tableau 2 : Liste de quelques produits naturels de plantes utilisés pour leur usage thérapeutique
 Adapté de (Atanasov et al., 2015).

Notons que si la « règle des cinq » avait été strictement appliquée, 19 médicaments à base de substances naturelles approuvés par la FDA entre 1981 et 2011 n'auraient jamais pu voir le jour, dont le paclitaxel (Newman and Cragg, 2012). D'après l'organisation scientifique *Royal Botanic Gardens* de Kew, 28 187 espèces végétales seraient actuellement utilisées à des fins médicales (Allkin, 2017). Or la Nature met à notre disposition un patrimoine naturel remarquable, aussi bien par sa diversité que sa quantité, qui mérite d'être exploré et exploité. Parmi les 400 000 espèces de plantes supérieures recensées à travers le monde, seules 15 % d'entre elles ont fait l'objet d'études phytochimiques et 6 % d'entre elles ont été exploitées pour leur activité pharmacologique (Verpoorte, 1998; Rates, 2001). Ainsi, la découverte de nouvelles molécules naturelles à fort potentiel biologique est encore possible.

1.3.3 Le processus d'identification de nouvelles molécules bioactives

1.3.3.1 La sélection du matériel végétal

La sélection des plantes médicinales constitue une étape clé dans le développement de nouveaux produits. Si elle peut mener à la mise sur le marché de « *blockbusters* », elle peut aussi conduire à l'échec d'un projet commercial. Pour maximiser la recherche de nouvelles molécules actives, les laboratoires académiques et les industries pharmaceutiques et cosmétiques ont adopté différentes stratégies : ethnopharmacologique, écologique, chimiotaxonomique, aléatoire et bio-informatique.

1.3.3.1.1 L'approche ethnopharmacologique

Pour survivre dans les milieux hostiles, les populations primitives ont développé le sens de l'observation leur permettant de distinguer les plantes médicinales des plantes toxiques ou sans intérêt, et d'en faire des remèdes efficaces contre certaines maladies. En s'appuyant sur les connaissances de ces peuples, Fleurentin et Dos Santos, ont introduit pour la première fois en 1991 le concept d'ethnopharmacologie. Cette science peut se définir comme « *l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, que les cultures vernaculaires mettent en œuvre pour modifier les états à des fins thérapeutiques, curatives, préventives ou diagnostiques* » (Fleurentin and Dos Santos, 1991). Mêlant la botanique, la chimie, la biochimie, la pharmacologie à d'autres sciences telles que l'anthropologie, l'archéologie, l'histoire et la linguistique, l'ethnopharmacologie a permis la découverte de nombreuses molécules d'intérêt pharmaceutique (Corson and Crews, 2007; Heinrich et al., 2014a). L'artémisinine extraite des feuilles d'armoise (*Artemisia annua* L.) en est un exemple inspirant. Utilisée contre le paludisme dans la médecine chinoise ancestrale depuis plus de 2 000 ans, l'artémisinine fut isolée pour la première fois en 1972 par l'équipe du Professeur Tu Youyou. Des traitements ACT (*Artemisinin-based Combination Therapies*) ont été utilisés en Asie et Afrique dans les années 90 pour traiter la maladie. Au début des années 2000, les prix de l'artémisinine s'envolent entraînant une pénurie mondiale en 2004. Pour faire face à la demande, Jay Keasling, Professeur de bio-ingénierie à l'Université de Berkeley (Californie, USA) conçoit une souche de *S. cerevisiae* génétiquement modifiée capable de produire

l'acide artémisininique, précurseur de l'artémisinine, à partir du glucose. Cette levure 2.0 fut brevetée par la start-up Amyris avant d'être exploitée par le géant pharmaceutique Sanofi pour industrialiser la fabrication biosynthétique d'acide artémisininique et sa transformation en artémisinine. Pour cette découverte majeure, la Professeur Tu Youyou a été récompensée par le Prix Nobel de Médecine en 2015 à l'âge de 84 ans (Bourgain and Jean, 2016; Mazier and Thellier, 2016).

Bien que la recherche de candidat-médicament par l'ethnopharmacologie ait fait ses preuves, elle n'est pas sans difficultés. D'une part, les médecines traditionnelles quelles soient ayurvédique, chinoise, africaine ou encore indienne, utilisent des mélanges de plantes pour soigner. La complexité du totum d'une plante favorise l'action synergique des plantes et complique l'identification des principes actifs (Houghton and Mukherjee, 2009). D'autre part, les écosystèmes mondiaux sont aujourd'hui fragilisés par les catastrophes naturelles et les pressions exercées par les activités humaines (déforestations, introduction d'espèces végétales invasives, réchauffement climatique et destruction des habitats). La biodiversité végétale s'appauvrit au même titre que certains savoir-faire ancestraux. D'après une étude récente publiée dans la revue *Nature Ecology & Evolution*, 571 plantes auraient définitivement disparu de notre planète depuis 1750 (Humphreys et al., 2019). L'entrée en vigueur le 12 Octobre 2014 de l'Accord International sur la Biodiversité, plus communément appelé Protocole de Nagoya sur l'accès et le partage des avantages (APA), permet désormais d'encadrer l'utilisation des ressources génétiques dans un but commercial et de recherche. L'accès aux ressources végétales nécessite le consentement au préalable des communautés autochtones et locales. De ce fait, le processus de collecte et d'étude des plantes identifiées sur la base ethnopharmacologique est devenu beaucoup plus long, fastidieux et réglementé. Si la synthèse chimique totale de certaines molécules naturelles isolées de plantes menacées d'extinction peut être une option envisageable, la synthèse totale de certains agents anticancéreux tels que le paclitaxel, étoposide, docétaxel, topotécan, et irinotécan est à ce jour inconcevable (Katiyar et al., 2012).

1.3.3.1.2 L'approche écologique

L'approche écologique est basée sur l'observation du végétal dans son écosystème. Pour survivre et assurer leur reproduction, les plantes ont dû élaborer un arsenal de systèmes de défense contre les herbivores. Elles peuvent changer de morphologie et développer des structures défensives externes comme les poils, épines et trichomes. Elles peuvent aussi agir à distance en libérant des composés organiques volatiles capables d'attirer les prédateurs des herbivores (Schnee et al., 2006; War et al., 2012). Enfin, elles peuvent synthétiser des métabolites secondaires toxiques qui interfèrent avec le métabolisme de l'animal (Freeman, 2008; War et al., 2012).

En Afrique, de nombreux cas d'intoxications ont été observés sur des troupeaux de bétail. Il a été montré que l'ingestion par les ruminants de la plante succulente *Sarcostemma viminale* provoque des convulsions et une paralysie musculaire, tandis que le broutage des feuilles caduques du *Melia azedarach* cause des tremblements, vomissements et diarrhées (Botha and Penrith, 2008). Sachant qu'un grand nombre de caractères biochimiques est conservé entre les organismes vivants, les métabolites secondaires toxiques sont susceptibles d'interagir avec les macromolécules de l'être humain. A ce titre, un extrait brut isolé de lianes d'Amazonie (*Chondodendron tomentosum* et *Strychnos toxifera*) induit une paralysie des muscles squelettiques chez l'Homme. L'extraction de son principal alcaloïde, la tubocurarine, a permis de mieux comprendre son mécanisme d'action. La molécule agit comme un antagoniste compétitif de l'acétylcholine sur les récepteurs nAChR (*Nicotinic acetylcholine receptor*). En bloquant les signaux excitateurs à la jonction neuromusculaire, elle rend impossible la coordination des mouvements (Prescott et al., 1946). Cette découverte majeure a permis l'utilisation de ce neurotoxique comme agent myorelaxant en anesthésie générale (Britannica, 2016). Depuis, le mécanisme moléculaire d'autres toxines a été étudié et a servi de base au développement d'antiparasitaires gastro-intestinaux (Sullivan et al., 2008). Par ailleurs, des chercheurs se sont intéressés au processus biologique utilisé par le végétal pour réparer les lésions causées par les stress biotiques. Pour cicatriser, les plantes ont développé un système performant appelé exsudation. Elles synthétisent une substance riche en terpénoïdes, alcaloïdes, protéases, chitinases et glucosidases qu'elles excrètent en surface de la zone blessée sous plusieurs formes (gomme, huile, résine ou

latex) (Konno, 2011). De nombreuses études menées sur le continent africain ont révélé les vertus cicatrisantes de certains exsudats de plantes sur des plaies ou d'autres affections de la peau (*Rauvolfia vomitoria*, *Tabernaemontana crassa Benth*, *Dialium pachyphyllum*, *Canarium schweinfurtii*) (Bouquet, 1969). Au Congo, le latex du safoutier (*Canarium schweinfurtii Engl*) permet notamment la cicatrisation du nombril des nouveaux-nés (Muluwa and Bostoen, 2010).

1.3.3.1.3 L'approche chimiotaxonomique

L'approche chimiotaxonomique consiste à sélectionner des plantes sur la base de leur contenu phytochimique et leur classification taxonomique. Généralement, les espèces végétales appartenant à la même famille contiennent des métabolites secondaires semblables (Rates, 2001; Dewick, 2009). Par exemple, les Apocynacées, les Rubiacées, les Solanacées et les Loganiacées sont riches en alcaloïdes, tandis que les Lamiacées renferment de nombreux diterpènes. Dans les Solanacées, la description botanique de la belladonne (*Atropa belladonna*) contenant l'alcaloïde hyoscyamine a conduit à l'identification du tropane, un autre alcaloïde, dans le datura (*Datura stramonium*) (Heinrich et al., 2014b).

1.3.3.1.4 L'approche systématique

L'échantillonnage systématique est basé sur un seul critère de sélection : la disponibilité du végétal. Cette approche est intéressante car elle est sans *a priori*, et donc idéale pour identifier de nouvelles molécules sans aucune connaissance empirique préalable. Néanmoins, cette stratégie est longue, onéreuse et requiert l'accès à de gigantesques collections de molécules naturelles.

Entre 1960 et 1982, le NCI (*National Cancer Institute*) des Etats-Unis d'Amérique a criblé plus de 120 000 extraits végétaux isolés de 35 000 espèces de plantes pour leurs propriétés anti-tumorales. Cette étude a été rendue possible grâce à la collaboration de plusieurs partenaires des secteurs publics et privés autorisant l'accès à leurs ressources végétales (Université d'Arizona, du Costa Rica, du Chili, du Brésil et d'Hawaï, le Centre Médical de Défense Nationale (Taïwan), l'Institut Central de Recherche sur les Médicaments (Inde), et l'Organisation du Commonwealth pour la Recherche Scientifique et Industrielle

(Australie)). Parmi les 35 000 espèces végétales testées, seules 10 % d'entre elles ont présenté des activités anti-tumorales *in vitro* et/ou *in vivo*. Cette étude d'ampleur internationale a permis d'identifier des molécules anticancéreuses notables tels que le paclitaxel (*Taxus brevifolia* Nutt.), l'indicine-n-oxide (*Heliotropium indicum* L.), le phyllanthoside (*Phyllanthus acuminatus* Vahl) ou encore l'homoharringtonine (*Cephalotaxus harringtonia* (Knight ex Forbes) K. Koch) (Douros and Suffness, 1980; Spjut, 1985; Cragg and Newman, 2005).

1.3.3.1.5 L'approche bio-informatique

Grâce à l'essor des « *Big data* » et à l'intelligence artificielle, l'approche computationnelle est devenue un outil puissant de criblage virtuel *in silico*. Il existe actuellement 123 bibliothèques virtuelles de composés naturels dans le monde, dont 92 qui sont en libre accès. Si certaines bases de données sont généralistes et peuvent recenser plus de 300 000 produits naturels (par exemple : SuperNatural II, Universal Natural Products Database (UNPD) et ZINC), d'autres sont en revanche très spécialisées et contiennent généralement moins de 3 000 produits naturels. Les bases de données spécialisées regroupent les composés naturels en fonction du type d'organisme qui les produit (plantes, champignons et bactéries), de l'origine géographique de l'organisme qui les synthétise (Europe, Asie, Afrique, etc.) ou encore de leur domaine d'application (médecine traditionnelle, agroalimentaire et pharmaceutique) (Sorokina and Steinbeck, 2020).

Deux approches de criblage virtuel existent : le criblage basé sur la structure de la protéine cible (*Structure-Based Drug Design*, SBDD) et le criblage basé sur la structure des ligands connus de la protéine cible (*Ligand-Based Drug Design*, LBDD) (Rollinger et al., 2008).

La **méthode SBDD** est directe. Elle requiert la connaissance préalable de la structure tridimensionnelle (3D) de la cible d'intérêt, résolue par cristallographie aux rayons X, résonance magnétique nucléaire (RMN) ou encore modélisation par homologie. Les structures de macromolécules biologiques résolues sont répertoriées dans la base de données spécialisée PDB (*Protein Data Bank*) implantée aux Etats-Unis d'Amérique depuis 1971, et sont accessibles via une interface graphique. Grâce à l'utilisation des programmes

de *docking*, tels qu'AutoDock, Gold, FlexX, Surflex et Glide, une chimiothèque d'intérêt peut être directement *dockée* dans la cavité du site actif de la protéine cible. Le logiciel de *docking* classe finalement les composés naturels en fonction de la présence d'interactions électrostatiques, stériques et hydrophobes entre les composés et le site catalytique de la protéine étudiée (Lionta et al., 2014). Les touches les plus prometteuses sont sélectionnées pour réaliser des études biochimiques et cellulaires ultérieures.

La **méthode LBDD** est indirecte. Elle est employée lorsque la structure 3D de la cible thérapeutique n'est pas encore résolue. En revanche, elle requiert la connaissance préalable des ligands connus de la cible thérapeutique. L'approche LBDD suppose que des composés naturels possédant une structure moléculaire similaire à celle des ligands de référence aient la même activité biologique et le même mode d'interaction envers la protéine d'intérêt. L'approche LBDD emploie des modèles statistiques pour établir les relations entre les propriétés physico-chimiques des ligands de référence avec leurs propriétés biologiques (activité enzymatique, solubilité, toxicité, etc.). Les relations structure-activité (*Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR) établies par ces modèles statistiques permettent ensuite de prédire par les propriétés biologiques des molécules naturelles à cribler. La méthode LBDD permet ainsi de rationaliser les évaluations *in vitro* et cliniques et maximiser leurs chances de succès.

Des criblages virtuels *in silico* de molécules naturelles sont actuellement réalisés pour lutter efficacement contre le coronavirus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), responsable de la maladie respiratoire virale Covid-19 (CoronaVirus Disease 2019). Wu et ses collègues ont effectué en Février 2020 un alignement de séquences génomiques du SARS-CoV-2 avec 22 coronavirus d'espèces différentes (Wu et al., 2020a). Après avoir prédit par modélisation par homologie la structure de 19 protéines du SARS-CoV-2, dont celle de la protéine Spike qui est impliquée dans le mécanisme de fusion virale avec les cellules humaines hôtes via le récepteur membranaire ACE2 (*Angiotensin Converting Enzyme 2*), les auteurs ont criblé deux bases de données de produits naturels contre ces différentes cibles thérapeutiques. Leur approche de type SBDD, utilisant le logiciel de *docking* ICM (MolSoft LLC), a permis d'identifier plusieurs composés naturels antiviraux (hespéridine, ribavirine, valganciclovir et thymidine), antibactériens (cefpiramide,

sulfasalazine, phénéthiiline, lymécycline, déméclocycline, doxycycline et tigécycline), antiasthmatiques (montelukast, fénotérol et reprotérol) et hépatoprotecteur (silibinine) ayant de fortes affinités de liaison avec les protéines virales d'intérêt (**Figure 33**).

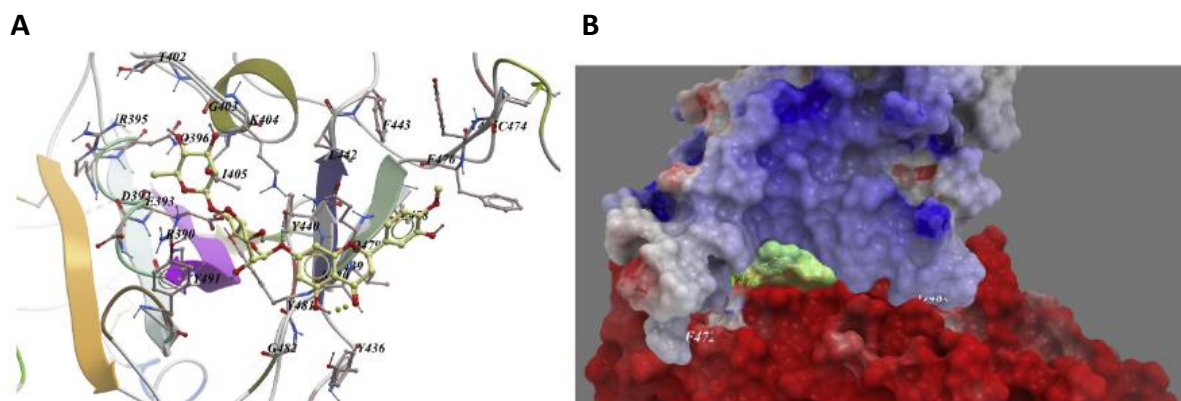


Figure 33 : Exemple de docking moléculaire appliqué à l'hespéridine, un des principaux citroflavonoïdes présents chez les espèces du genre Citrus, avec le domaine de liaison au récepteur ACE2 (Receptor Binding Domain, RBD) de la protéine Spike du coronavirus SARS-CoV-2.

(A) Visualisation détaillée du positionnement de l'hespéridine dans la poche du RBD de la protéine Spike du SARS-CoV-2. (B) L'hespéridine bloque la liaison du RBD de la protéine Spike du SARS-CoV-2 avec le récepteur ACE2. D'après (Wu et al., 2020a).

1.3.4 Les stratégies de criblage des banques de composés naturels et synthétiques

D'après les statistiques, seule 1 molécule sur 10 000 criblées est susceptible de devenir une source d'inspiration pour la recherche et d'offrir un nouvel espoir de traitement contre certaines maladies (Barthlott et al., 2001).

Une question essentielle se pose alors : Comment identifier rapidement et facilement cette perle rare à haut potentiel biologique parmi des dizaines de milliers de molécules ?

Dans les années 1990, sous l'impulsion du développement de la synthèse combinatoire (« *high throughput synthesis* »), des plateformes de criblage à haut débit (*High throughput Screening*, HTS) ont été créées. Ces technologies reposent sur la miniaturisation, l'optimisation et l'automatisation de tests expérimentaux au format de microplaques (généralement de 96 ou 384 puits) permettant de cribler simultanément une grande

collection de molécules en un minimum de temps. Quelque soit le format de microplaque choisi, les tests présentent des qualités de robustesse, de sensibilité et de reproductibilité compatibles avec les analyses statistiques de données. Les cribles de molécules naturelles sont particulièrement bien adaptés pour identifier des « *hits* » ou « touches » capables de moduler l'activité des cibles « *undruggable* ».

Les cribles HTS présentent l'avantage de n'utiliser que de très faibles volumes réactionnels ($\leq 50 \mu\text{L}$ pour une microplaque de 384 puits) réduisant les coûts et permettant d'analyser des molécules disponibles en petite quantité.

A ce jour, plusieurs banques d'extraits bruts et produits naturels existent dans le monde. La plus importante est sans aucun doute celle du NCI qui compte plus de 230 000 extraits bruts issus de 50 000 organismes d'origine végétale, marine et microbienne (Thornburg et al., 2018). Cet institut vient de lancer en Janvier 2019 un programme colossal baptisé « *NCI Program for Natural Product Discovery (NPNPD)* » visant à préfractionner plus de 125 000 extraits bruts en 1 000 000 sous-fractions indépendantes. Celles-ci seront par la suite disponibles gratuitement sous format de plaques de 384 puits pour les criblages HTS dans le but de redynamiser la recherche et le développement de médicaments à base d'actifs naturels (Thornburg et al., 2018).

En France, la Chimiothèque Nationale (CN) créée en 2003 référence une collection de 70 000 composés et 15 000 extraits naturels existants dans les laboratoires publics français. La constitution de la CN vise à offrir une « seconde vie » à des molécules naturelles initialement étudiées dans le cadre de programmes de recherche puis oubliées. Ces substances peuvent ainsi être sollicitées et testées sur de nouvelles cibles biologiques (<http://chimiotheque-nationale.cn.cnrs.fr/>). Face à l'essor des criblages dans le monde académique et industriel, de nombreuses sociétés de biotechnologies se sont spécialisées dans la préparation et la commercialisation de chimiothèques et extractothèques comme Sederma (France), Greenpharma (France), Greentech (France), Caithness Biotechnologies (Angleterre), AnalytiCon Discovery (Allemagne), Albany Molecular Research Inc (Albanie) et PhytoPharmacon (USA).

Les molécules sont généralement testées à une seule concentration (crible primaire) sur les plateformes de criblage puis les touches identifiées sont testées à plusieurs concentrations pour évaluer la relation dose-réponse (crible secondaire).

Deux catégories de criblage se distinguent : les criblages basés sur des tests biochimiques et les criblages basés sur des tests cellulaires.

1.3.4.1 Les criblages basés sur des tests biochimiques

Les criblages basés sur des tests biochimiques ont pour but d'étudier les interactions physiques entre les molécules à tester et les cibles thérapeutiques dans un environnement prédéterminé et simplifié. Ils apportent des connaissances précieuses sur les paramètres thermodynamiques, cinétiques et structuraux associés aux complexes formés.

Dans la cellule, certaines protéines sont solubles dans le cytosol, tandis que d'autres sont insolubles en raison, par exemple, de leur ancrage aux membranes cellulaires. En réponse à l'activation de voies de signalisation, de nombreuses protéines peuvent s'associer entre elles pour former des complexes multi-protéiques, statiques ou dynamiques. Une stratégie généralement utilisée pour identifier les partenaires protéiques entrant en interaction avec une cible moléculaire consiste à immobiliser celle-ci sur un support solide.

En fonction de la nature de la cible (kinase, protéase, récepteur, canal ionique, etc.), plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour étudier l'interaction entre les deux partenaires moléculaires (antigène/anticorps, récepteur/ligand et protéine/protéine) : les tests enzymatiques et les tests biophysiques (**Tableau 3**).

Tests biochimiques	Techniques
Enzymatiques	-Dosage d'immunoabsorption enzymatique (ELISA) -Etiquetage d'enzyme (fluorophore/chromophore/radioisotope)
Biophysiques	-Ligand fishing (LF) -Polarisation de fluorescence (FP) -Test de décalage thermique (<i>Thermal shift assay</i> , TSA) -Application de la scintillation de proximité (SPA) -Transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) -Interférométrie de biocouches (BLI) -Thermophorèse micro-échelle (MT) -Electrophorèse capillaire (CE)

Tableau 3 : Exemples de techniques utilisées pour les criblages basés sur des tests biochimiques.

A titre d'exemple, la plateforme de criblage « HTRF Transcreener™ », développée en 2008 en collaboration avec BellBrooks Labs, utilise une méthode universelle et flexible pour l'analyse des enzymes ATP dépendantes comme les kinases (<https://www.bellbrooklabs.com/products/transcreener-hts-assays/>). Elle repose sur l'immunodétection d'ADP grâce à un anticorps couplé à un traceur fluorescent. Le changement conformationnel du traceur, provoqué par la fixation de la molécule d'ADP sur l'anticorps, induit un signal fluorescent. D'autres techniques utilisent des sondes (« *molecular beacons* ») nucléotidiques en structure tige-boucle pour quantifier l'activité de l'ADN polymérase, par exemple. Au niveau de la tige, les brins sont complémentaires entre eux et possèdent à leur extrémité un émetteur fluorescent (fluorophore) d'un côté et un suppresseur (*quencher*) de l'autre. L'activité enzymatique conduit à la déshybridation des deux brins de la tige. L'éloignement de l'émetteur et du suppresseur permet l'émission d'un signal fluorescent facilement détectable par spectrofluorométrie (Acker and Auld, 2014; Wilson et al., 2020).

La méthode de « *ligand fishing* » s'est avérée être une technique pratique, rapide et efficace pour identifier des structures bioactives présentes dans des extraits complexes de plantes (Zhuo et al., 2016). Elle repose sur la chromatographie d'affinité couplée à la spectrométrie de masse. Grâce à cette stratégie, Qing et ses collègues ont pu montrer

l'interaction spécifique entre l'albumine humaine et trois saponines présentes dans les rhizomes de *Dioscorea nipponica*, une plante médicinale chinoise utilisée contre la maladie cardiaque coronarienne (Qinga et al., 2010).

Dans le domaine de la cosmétique, l'entrée en vigueur de la directive européenne 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques a conduit au développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Désormais, de nombreux tests biochimiques, adaptés au format de criblage haut débit, remplacent les tests d'irritation, de corrosion et de sensibilisation de la peau et de l'œil (Jeong et al., 2013; Avonto et al., 2015; Sakdiset et al., 2017; Avonto et al., 2018; Cho et al., 2019). L'évaluation de l'innocuité et la toxicité des substances chimiques s'effectue dans un cadre légal basé sur le respect de la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer).

La robotisation des tests biochimiques sur les plateformes de criblage HTS permet de cribler plusieurs centaines de milliers de composés chaque semaine dans le cadre de projets de recherche fondamentale et médicale. Depuis les quinze dernières années, des campagnes de criblages HTS ont permis l'identification d'extraits et composés naturels de plantes capables de moduler un large panel de cibles biologiques (**Tableau 4**).

Bien que les tests biochimiques renseignent sur le mécanisme d'action d'un composé sur sa cible biologique (activateur ou inhibiteur d'enzyme ; agoniste ou antagoniste de récepteurs), ils ne garantissent en aucun cas le maintien de l'activité fonctionnelle du composé dans les systèmes biologiques, par nature, plus complexes. Il est donc important de valider les touches par des tests orthogonaux, notamment par des tests cellulaires. De plus, les tests biochimiques ne tiennent pas compte des propriétés intrinsèques du composé, telles que sa perméabilité membranaire, ses effets « hors-cible » et sa cytotoxicité. Il s'avère en effet qu'un nombre non négligeable de touches identifiées par ces approches *in tubo* sont abandonnées lorsqu'elles sont évaluées sur des modèles de culture cellulaire 2D et 3D. (Acker and Auld, 2014; Atanasov et al., 2015; Wilson et al., 2020).

Famille de cibles biologiques	Exemples de cibles biologiques	Domaine d'application	Référence
Enzyme	E3 ubiquitine ligase (MDM2) Luciférase Protéases Kinase (Akt) Asparaginyl-ARNt synthétase PPAR γ Aromatase Neuraminidase du virus Influenza Tyrosinase Glutathione transférase (GST) Histone déacétylase Sirtuin-6 (SIRT6) α -Amylase pancréatique humaine (APH) ADN polymérase β HDAC Lactate dehydrogenase (LDH)-A	Cancer Recherche fondamentale Cancer Cancer Recherche fondamentale Recherche fondamentale Cancer Infections virales Cancer Cancer Maladies métaboliques Obésité, diabète Cancer Cancer Cancer	(Sasiela et al., 2008) (Cruz et al., 2011) (Grant et al., 2002) (Turek-Etienne et al., 2004) (Danel et al., 2011) (Wu et al., 2005) (Balunas et al., 2006) (Liu et al., 2018) (Azizuddin et al., 2011) (Huang et al., 2011) (Yasuda et al., 2011) (Tarling et al., 2008) (Boudsocq et al., 2005) (Mazzio and Soliman, 2017) (Deiab et al., 2013)
Récepteur	Récepteur de la sérotonine (5-HT _{2C}) Récepteur nicotinique de l'acétyl choline Récepteur nucléaire NR1F1 Récepteur « éboueur » A	Obésité Maladies neurologiques Recherche fondamentale Maladies auto-immunes	(Peng et al., 2018) (Brown et al., 2016) (Helleboid et al., 2014) (Raycroft et al., 2012)
Protéine	Intégrine $\alpha 5\beta 1$ Albumine humaine Glycoprotéine gp41 du VIH Facteur de transcription Hes1 TNF- α Semaphorine 3B	Angiothérapie Recherche fondamentale Infections virales Arthrite rhumatoïde Cancer	(Bang et al., 2007) (Qinga et al., 2010) (Beutler et al., 2002) (Arai et al., 2009) (Huang et al., 2015a) (Yong et al., 2014)

Tableau 4 : Exemples de touches identifiées lors des campagnes de criblages biochimiques d'extraits et/ou composés naturels de plantes

1.3.4.2 Les criblages basés sur des tests cellulaires

Dans les départements R&D des laboratoires industriels, les criblages cellulaires sont réalisés à haut débit dans le but d'identifier rapidement de nouvelles molécules bioactives et développer de nouveaux médicaments ou formulations innovantes. Dans les laboratoires académiques, les criblages sont généralement exécutés à plus petite échelle (petit et moyen débit) et ont surtout pour vocation d'étudier le vivant, comme par exemple comprendre le comportement des cellules souches (Ding and Schultz, 2004) ou encore la régulation de la mitophagie dépendante de PINK1 (*PTEN induced putative kinase 1*)/Parkin (Zhang et al., 2019b).

En fonction du domaine d'application, les criblages peuvent être réalisés sur des modèles cellulaires non-mammifères et mammifères (cellules souches, cellules primaires et lignées cellulaires), ainsi que sur des organismes modèles (levure *Saccharomyces cerevisiae*, ovocytes de *Xenopus laevis*, poisson-zèbre, bactérie *Escherichia coli* et nématode *Caenorhabditis elegans*). Les cribles sont basés sur la quantification de signaux d'absorbance, de fluorescence ou de luminescence.

Il existe deux types de criblages basés sur des tests cellulaires : Les criblages *in vitro* sur des cibles moléculaires et les criblages phénotypiques (An and Tolliday, 2010).

Les **criblages *in vitro* sur des cibles moléculaires** visent à identifier des composés capables d'interférer avec la fonction d'une protéine, l'interaction protéine-protéine ou une voie de signalisation préalablement définie en relation avec un processus physiologique ou pathologique. Cette approche « orientée » facilite la mise en œuvre des études fonctionnelles.

Les **criblages phénotypiques**, à l'inverse, vise à étudier l'effet du composé sur un système cellulaire sans hypothèse particulière quant au mécanisme d'action éventuellement mis en jeu. Les analyses recherchent d'éventuelles modifications du comportement cellulaire en réponse aux traitements (prolifération, apoptose, différenciation, adhésion, migration, etc.). Les criblages phénotypiques sont largement employés pour la recherche contre le

cancer. Contrairement aux criblages *in vitro* sur cibles moléculaires, les criblages phénotypiques nécessitent d'entreprendre par la suite de longues études mécanistiques.

Le tableau ci-dessous recense les touches identifiées lors des campagnes de criblages cellulaires d'extraits et/ou composés naturels de plantes (**Tableau 5**).

Type de criblage	Cible / comportement cellulaire		Touche	Domaine d'application	Référence
In vitro sur des cibles moléculaires	Voie de Signalisation	Ubiquitine-Protéasome (L)	<i>Physalis angulata</i> L.	Cancer	(Ausseil et al., 2007)
		B-amyloid-RAGE (F)	Matrine	Alzheimer	(Cui et al., 2017)
		JAK-STAT (L)	Nb-(α -hydroxynaphthoyl) sérotonine	Cancer	(Kim et al., 2010)
		Nrf2/ARE (L)	Extraits de la famille des Lauraceae	Cancer	(Shen et al., 2014)
	Interaction de protéines	Atg12-Atg15/Atg16 (F)	<i>Silybum marianum</i>	Virus (Influenza)	(Dai et al., 2013)
		CREB-CBP/p300 (L)	8 extraits de plantes japonaises	Troubles de la mémoire	(Ishimoto et al., 2012)
		PINK1-TOM20 (F)	Célastrol	Maladies neurodégénératives	(Zhang et al., 2019b)
		NMO IgG-AQP4	Isotetrandrine	Neuromyéélite optique	(Sun et al., 2016)
		GPCR- β 2AR (F)	3 extraits MTC	Recherche fondamentale	(Zhao et al., 2010)
	Protéines	UBXN2A (L)	Vératridine	Cancer	(Abdullah et al., 2015)
		AP-1 (L)	Quassinoides	Cancer	(Beutler et al., 2009)
		c-Myc (IF)	Baicalein	Cancer	(Han et al., 2015)
		GNMT (L)	PGG	Cancer	(Kant et al., 2016)
		C/EBP α (L)	Bisbenzyloquinolines	Cancer	(Klausmeyer et al., 2012)
		AP-1 (F)	Plusieurs extraits	Cancer	(Ruocco et al., 2007)
		COX-2 (L)	Shikonine et ses dérivés	Cancer	(Subbaramaiah et al., 2001)
		ABCG2 (F)	8 structures de plantes tropicales	Cancer	(Versiani et al., 2011)
		Fli-1	Composés diterpéniques	Cancer	
		EBOV glycoprotein (L)	Rhodiola rosea	Virus (Ebola)	(Cui et al., 2018)
		CXCR4 et CCR5 (L)	S. Prunellae et H. Andrographitis	Virus (VIH)	(Feng et al., 2012)
		hNMU2R (L)	Structures de TCM	Recherche fondamentale	(Li et al., 2007)
		CFTR (F)	Oridonine	Diarrhée sécrétoire	(Luan et al., 2015)
		CFTR (F)	trans-e-viniférine, r-2-viniférine	Diarrhée sécrétoire	(Zhang et al., 2014)
		PKA (L)	Polyphénols	Maladies chroniques	(Moskaug et al., 2008)
		EP-1 (F)	Extraits MTC	Maladies inflammatoires	(Chillar et al., 2011)
		R-D1 (F)	Extraits MTC	Hypertension	(Zhang et al., 2007)
		Kloto (L)	Extraits MTC	Vieillesse	(Xu et al., 2004)
Phénotypique	Viabilité / prolifération cellulaire (L) (A)		Dégueline et ses dérivés	Neurofibromatose	(Henrich et al., 2015)
			Avocatin B	Cancer	(Lee et al., 2015)
			Extraits	Virus (HSV-1)	(Matza-Porges et al., 2014)
			Extraits	Cancer	(Sammar et al., 2019)
			Deux extraits MTC	Maladies cardiovasculaires	(Zhou et al., 2016)
			Bufaline et lycorine	Fibrose cardiaque	(Schimmel et al., 2020)
	(F)		Extraits de MTC	Médecine régénérative	(Li et al., 2013)

(C) (IF)	Extraits MTC Sanguinarine <i>Q. indica</i> , <i>S. miltiorrhiza</i>	Cancer Cancer Cancer	(Mazzio et al., 2014) (Yang et al., 2016a) (Efferth et al., 2008)
	Tetra-O-galloyl-b Dglucopyranoside	Virus (Influenza)	(Chang et al., 2016)
Croissance du <i>Plasmodium falciparum</i> (A)	Structures de <i>Berberis thunbergii</i> et <i>Eugenia rigida</i>	Paludisme	(Zhang et al., 2016b)
Viabilité du trophozoite <i>E. histolytica</i> (C)	<i>Codiaeum variegatum</i>	Amébose	(Mfotie Njoya et al., 2014)
Longévité de <i>C. elegans</i> (C)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Vieillesse	(Fitzgerald et al., 2009)
Apoptose (F)	Déoxypodophyllotoxine tanshinone IIA	Cancer	(Tian et al., 2007)
(A)	<i>Angelica gigas</i> Nakai	Cancer	(Jeon et al., 2018)
(ES)	Extraits (médecine Bu-Shen-Yi-Zhi)	Alzheimer	(Hou et al., 2014)
Différenciation des cellules souches : -Embryonnaires humaines (hESCs) (F) -Neurales (CSN) (F)	Plusieurs structures Kuwanon V	Médecine régénérative Maladies neurodégénératives	(Desbordes et al., 2008) (Kong et al., 2015)
Potentiel membranaire mitochondrial (F)	Extraits (médecine Qi-Shen-Yi-Qi)	Cardiopathies	(Wang et al., 2011)
Contournement de l'activité du complexe I (S)	1,4-naphthoquinones	Maladies mitochondriales	(Vafai et al., 2016)
Lipolyse/lipogenèse (A)	Extraits bruts	Obésité	(Buehrer et al., 2012)
Absorption de glucose à travers l'action de l'insuline (A)	<i>Momordica charantia</i> L.	Diabète type 2	(Cheng et al., 2008)
Activité œstrogénique (L)	Extraits et structures	Ostéoporose	(Du et al., 2011)
Transition Epithélio-Mésenchymateuse (F)	Extraits et structures MTC	Insuffisance rénale	(Liu et al., 2016)
Adhésion cellulaire (F)	Jaspamide	Recherche fondamentale	(Paran et al., 2007)
Effet trophique des cellules endothéliales dans la prolifération des cellules de glioblastome (L)	Iridine, Tigogénine et Triacétylresvératrol	Cancer	(Sengupta et al., 2015)
Production de collagène type I et α -SMA (IF)	Extraits MTC	Fibrose rénale	(Hu et al., 2009)
Infection virale (L) (IF)	Extraits MTC Extraits 1,3,4,6-tetra-O-galloyl-b-Dglucopyranoside	Virus (H5N1, Ebola, Lassa) Virus (HSV-1) Virus (Influenza)	(Yang et al., 2017) (Matza-Porges et al., 2014) (Chang et al., 2016)
HEVA71 replication (IF)	2 flavonoïdes	Fièvre aphteuse	(Min et al., 2018)
Génotoxicité (L)	Acide ascorbique	Photoprotection	(Tienaho et al., 2018)
Recombinaison Homologue de l'ADN (IF)	β -thujaplicin	Cancer (ostéosarcome)	(Zhang et al., 2017)

Tableau 5 : Exemples de touches identifiées lors des campagnes de criblages cellulaires d'extraits et/ou composés naturels de plantes, notamment ceux de la médecine traditionnelle chinoise (MTC), utilisant différents modes de détection (C) comptage cellulaire au microscope, (A) absorbance, (F) fluorescence, (L) luminescence, (IF) immunofluorescence, (S) seahorse (consommation d'oxygène) et (ES) senseur micro-électronique.

De manière intéressante, dans le domaine de la biologie cutanée, seul un criblage à haut débit de composés naturels de plantes a été décrit (Tienaho et al., 2018). Il repose sur un test phénotypique utilisant une souche génétiquement modifiée d'*E.coli* DPD2794 (contenant le gène fusion *recA':luxCDABE*) capable d'évaluer par une simple mesure de luminescence non seulement la génotoxicité des substances naturelles mais aussi leur activité photoprotectrice vis-à-vis des UV-R. Ce criblage répond à une demande croissante des industriels désireux de développer de nouvelles crèmes solaires éco-responsables : 100 % biodégradables, sans filtres chimiques et plus respectueuses des océans et coraux. Cette stratégie a permis d'identifier un extrait d'aiguille de pin sylvestre (*Pinus sylvestris* L.) offrant une barrière physique contre les UV-R comparable à celle du dioxyde de titane (TiO₂) à une concentration de 5 mg/mL tout en garantissant l'absence d'effets génotoxiques. Ainsi, les aiguilles de pins représentent une opportunité unique pour les laboratoires cosmétiques et dermo-cosmétiques de valoriser une biomasse renouvelable jusqu'alors considérée comme un déchet.

1.3.5 Les criblages cellulaires spécifiques basés sur l'expression des microARNs

Des études récentes ont montré que les composés phytochimiques pouvaient réguler l'expression d'un grand nombre de microARNs impliqués dans l'homéostasie cutanée et le développement de diverses pathologies. Ces découvertes ont été rendues possibles grâce à l'analyse du profil d'expression complet des microARN (miRNome) extraits de cellules ou tissus par des plateformes technologiques de puces à ADN (microarrays Agilent et Affymetrix) et de séquençage à haut débit (Illumina, Oxford Nanopore MinION).

Par exemple, l'analyse du miRNome des fibroblastes dermiques humains (NDHF) pré-traités à l'arctiine extraite de la Grande bardane (*Arctium lappa* L.) pendant 4 heures puis irradiés aux UVB a permis d'identifier des profils d'expression spécifiques de microARNs en présence de cet extrait (Lee et al., 2014a). Ces signatures moléculaires ont largement contribué à la caractérisation des activités biologiques de l'arctiine. Ce lignane stimule l'expression du gène *COL1A1* dans les NHDF (*Normal human dermal fibroblasts*) en inhibant l'expression du microARN-378b, impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle du gène

codant l'histone déacétylase sirtuine 6 (SIRT6) (Kim et al., 2017b). SIRT6 a fait l'objet de plusieurs études. Elle participe notamment au mécanisme de réparation de l'ADN par BER (*Base excision repair*) en régulant l'accessibilité de la chromatine et l'activité des différentes protéines impliquées dans ce processus biologique, dont la PARP1 (Chang et al., 2020). De ce fait, SIRT6 joue un rôle important dans le contrôle de la longévité des mammifères. Il a été en effet démontré que des souris déficientes pour le gène *SIRT6* présentent un phénotype de vieillissement prématuré et des défauts métaboliques dus à une instabilité génomique (Mostoslavsky et al., 2006).

D'autres exemples sont renseignés dans le **Tableau 6**.

Au-delà de leur capacité à lutter efficacement contre le stress oxydant et la sénescence, les molécules naturelles peuvent exercer des activités anticancéreuses en induisant l'expression de microARNs suppresseurs de tumeurs et/ou en inhibant l'expression de microARNs oncogènes (Debnath et al., 2017).

Dans la peau, le développement tumoral du mélanome se caractérise, entre autres, par une diminution de l'expression du microARN-124. Le traitement de cellules de mélanome avec une anthraquinone isolée de la plante médicinale *Rumex japonicus* Houtt, le physcion 8-O- β -glucopyranoside, induit la mort des cellules de mélanome par apoptose et l'inhibition de l'invasion cellulaire via la surexpression du microARN-124 et la régulation post-transcriptionnelle de RLIP76 (*Ral interacting protein of 76 kDa*) (Zhang et al., 2016a).

Dans les cellules du cancer du sein, le resvératrol induit l'expression des microARN-125b-5p, -200c-3p, -409-3p -122-5p et -542-5p (Venkatadri et al., 2016) tandis que la curcumine inhibe l'expression des microARN-27a, -20a et -17-5p dans les cellules du cancer colorectal (Gandhy et al., 2012). Toutefois, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore mal connus.

Extrait ou composé de plante	Modèle cellulaire	microARNs	Signalisation cellulaire	Condition biologique	Référence
<i>Trichosanthes kirilowii</i>	Kératinocytes	↓ hsa-microARN-142-3p	↑ BMAL1	Photoprotection (UVB)	(Joo et al., 2018)
Centella asiatica (<i>Centella asiatica</i>)	Fibroblastes Kératinocytes	↑↓ hsa-microARNs			(An et al., 2012a)
Arctiine (<i>Arctium lappa</i>)	Fibroblastes	↑↓ hsa-microARNs			(Lee et al., 2014a)
Gallate d'épigallocatechine (<i>Camellia Sinensis</i>)	Fibroblastes	↑↓ hsa-microRNAs			(An et al., 2012b)
Troxérutine (<i>Sophora japonica</i>)	Kératinocytes	↑↓ hsa-microARNs			(Lee et al., 2014b)
Oridonine (<i>Rabdosia rubescens</i>)	Kératinocytes	↑↓ hsa-microARNs		Stress oxydant (H ₂ O ₂)	(Bae et al., 2014)
Schizandrine A (<i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill)	Kératinocytes	↓ hsa-microARN-127	Inhibition des MAPK, ERK, JNK	Inflammation (LPS)	(Li et al., 2018)
Arctiine (<i>Arctium lappa</i>)	Fibroblastes	↓ hsa-microARN-378b	↑ SIRT6	Vieillissement cutané	(Kim et al., 2017b)
Ginsénoside Rb1 (<i>Panax ginseng</i>)	Fibroblastes	↓ hsa-microARN-25	↑ COL1A2 via PPARδ		(Kwok et al., 2012)
<i>Narcissus tazetta</i> , <i>Schisandra chinensis</i>	Epiderme reconstruit	↑ hsa-microARN-146a, -22, -155, -16, -21			(Namkoong et al., 2018)
Curcumine (<i>Curcuma longa</i>)	Modèle murin	↑↓ mmu-microARNs		Mélanome	(Dahmke et al., 2013)
Physcion 8-O-β-glucopyranoside (<i>Rumex japonicus</i> Houtt.)	Modèle murin	↑ mmu-microR-124	↓ RLIP76		(Zhang et al., 2016a)
Acide butyrique, nicotinamide, calcium glucarate	Modèle murin	mmu-microARN-21, mmu-microARN-20a			(Tiwari et al., 2016)

Tableau 6 : Liste des composés phytochimiques régulant l'expression des microARNs dans la peau.

En 2008, un criblage cellulaire combiné à des approches de biologie structurale a permis de révéler pour la première fois le rôle de l'énoxacine, un composé antibactérien synthétique appartenant à la famille des fluoroquinolones, dans le mécanisme d'interférence par l'ARN (Shan et al., 2008). Dans les cellules HEK293, l'énoxacine induit le clivage de plusieurs pré-microARNs par Dicer grâce à l'augmentation de l'affinité de la protéine TRBP pour ces pré-microARNs.

Récemment, un criblage de 3 682 composés naturels basé sur la fluorimétrie différentielle à balayage (DSF) a montré l'interaction spécifique de la prodiginine butylcycloheptyl (bPGN), un pigment rouge naturel produit par les bactéries, avec le pré-microARN-21, provoquant l'augmentation de la stabilité thermodynamique du pré-microARN-21 et l'inhibition de son clivage par Dicer (Matarlo et al., 2019). Le traitement des cellules de la lignée humaine de cancer du côlon HCT-116 avec ce composé conduit à une rapide dérégulation de cibles connues du microARN-21, dont PTEN et PDCD4, et une inhibition de la prolifération cellulaire (**Figure 34**).

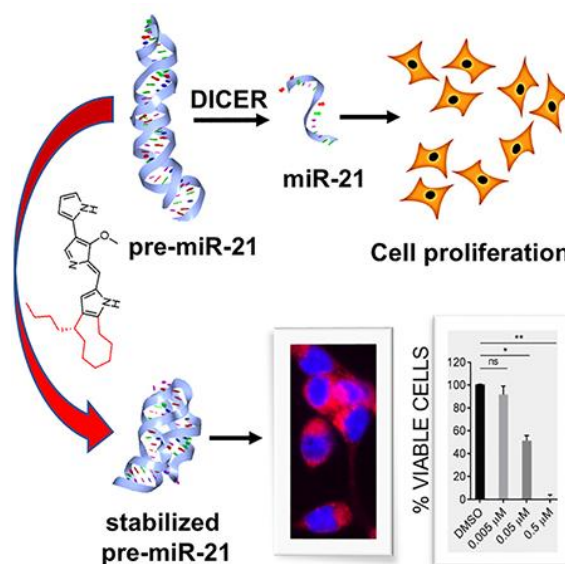


Figure 34 : La prodiginine butylcycloheptyl bloque la prolifération des cellules du cancer du côlon en inhibant la maturation du pré-microARN-21 par Dicer. D'après (Matarlo et al., 2019).

Une autre étude indique que les composés phénoliques de la famille des stilbènes, incluant le resvératrol et le ptérostilbène, peuvent inhiber le phénotype des cellules souches cancéreuses (CSC) et des cellules de la lignée d'adénocarcinome du sein humain de type mésenchyme, métastatique et invasif (MDA-MB-231) en induisant non seulement la transcription des microARNs suppresseurs de tumeurs (microARN-16, -141, -143 et -200c) mais aussi la surexpression de la protéine Ago2. L'augmentation de l'expression d'Ago2 s'accompagne d'une sur-activation du complexe RISC, et par conséquent d'une dégradation d'un grand nombre d'ARNm cibles, notamment ZEB-1, un facteur de transcription impliqué dans la dédifférenciation, la migration et l'invasion des cellules tumorales (Hagiwara et al., 2012).

Mazzio et Soliman ont démontré qu'un extrait de pépins de raisin (*Vitis Vinifera*) est capable d'inhiber l'activité des histones déacétylases (HDAC) dans les cellules HeLa, contribuant ainsi au remodelage de la chromatine et à la surexpression des microARN suppresseurs de tumeurs dont les microARN-23b-5p, -196a-5p, -629-5p, -1275 et -27b-5p (Mazzio and Soliman, 2017).

Sur la base de ces données mécanistiques, des stratégies de criblage utilisant les microARNs comme cibles thérapeutiques ont été développées depuis une dizaine d'années. Bien que ces nouvelles approches représentent qu'une faible proportion (2 %) de la totalité des criblages mis en place, elles sont toutefois en pleine expansion (**Figure 35**).

1.3.5.1 Les stratégies de criblage cellulaire de banques d'extraits naturels de plantes

A ce jour, les criblages cellulaires d'extraits et/ou composés naturels de plantes basés sur les microARNs sont exclusivement dédiés à la recherche sur les cancers. Ils emploient soit des systèmes de gènes rapporteurs optiques (luminescents ou fluorescents) soit des sondes moléculaires synthétiques fluorescentes. L'utilisation de ces approches de criblage ont permis l'identification des molécules isolées de plantes à fort potentiel anticancéreux.

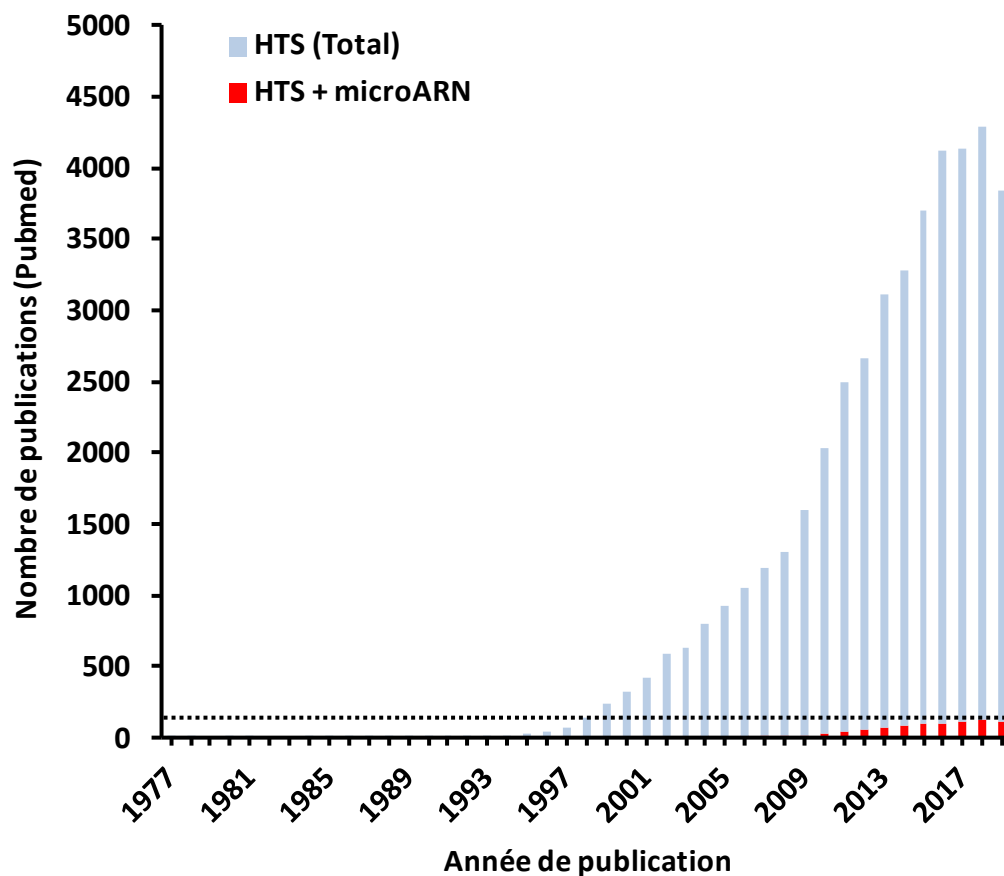


Figure 35 : Les criblages basés sur les microARNs.

Représentation graphique du nombre des publications recensées sur pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) comprenant les termes « *high throughput screening* » ou « *high throughput screening and microRNAs* » en fonction de l'année de publication.

1.3.5.1.1 Les stratégies de criblage utilisant des gènes rapporteurs

Le système de gène rapporteur couramment utilisé pour les criblages cellulaires repose sur le système miR-OFF. Ce système consiste à placer dans la région 3'-UTR d'un gène rapporteur (F-Luc ou EGFP) des séquences complémentaires à un microARN d'intérêt. Dans ces conditions, la modulation de l'expression du microARN par les composés bioactifs dans les cellules se caractérise par une diminution de l'expression du gène rapporteur, et donc du signal optique.

Deux stratégies de criblage miR-OFF de bibliothèques d'extraits naturels de plantes ont été utilisées avec succès.

La première a été développée en 2015 par Hagiwara et ses collègues. Les auteurs ont généré une lignée cellulaire stable à partir de cellules dérivées du cancer du sein (MCF7) co-exprimant le gène rapporteur R-luc (*Renilla Luciferase*) et le gène rapporteur F-luc (*Firefly luciferase*) contenant dans sa région 3'-UTR une séquence complémentaire au microARN-200c (Hagiwara et al., 2015). Dans cette étude, le gène *R-Luc* est utilisé comme contrôle interne pour la normalisation des résultats. Cette approche a permis de cribler 139 substances naturelles et d'identifier trois structures (énoxolone, magnolol et chlorure de palmitine) capables d'induire l'expression du microARN-200c (**Figure 36**). La surexpression de ce suppresseur de tumeur entraîne l'inhibition de l'expression de ZEB1, augmentant ainsi l'expression de l'E-cadhérine, un composant central des jonctions adhérentes. Les cellules tumorales acquièrent un phénotype épithélial et cessent de migrer. Un modèle d'invasion *in vitro* a permis de confirmer l'activité anti-invasive des molécules naturelles identifiées, offrant de nouvelles perspectives dans le développement de médicaments anticancéreux.

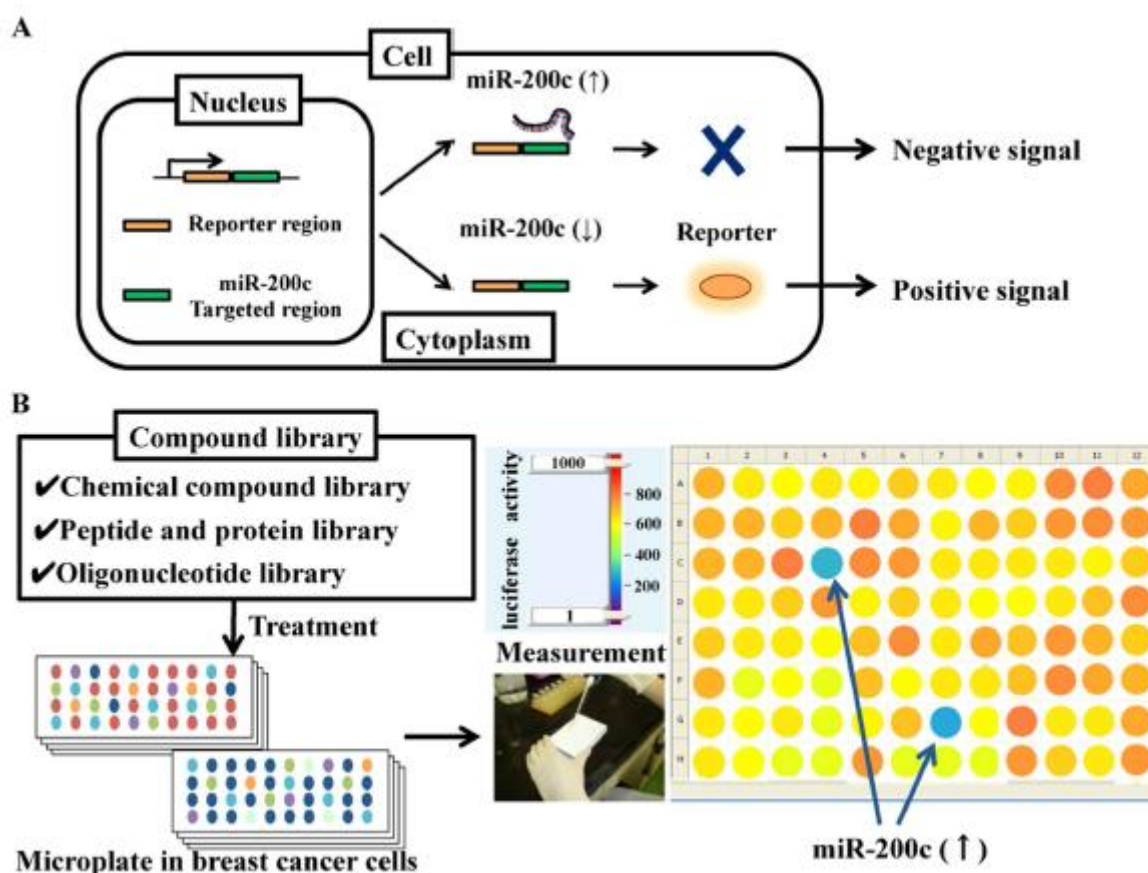


Figure 36 : Représentation schématique de la stratégie de criblage utilisant un gène rapporteur développée par Hagiwara et al. D'après (Hagiwara et al., 2015).

Plus récemment, Zhang et ses collègues ont développé une stratégie de criblage luminescent similaire, basée sur la co-transfection de deux plasmides d'expression contenant l'un le gène rapporteur de normalisation R-luc et l'autre le gène rapporteur F-luc contenant dans sa région 3'-UTR trois sites de liaison au microARN-16-2 (Zhang et al., 2019a) (**Figure 37**). Ce microARN a été choisi pour sa fréquente sous représentation dans de nombreux cancers, dont le carcinome humain hépatocellulaire (HCC). Des études fonctionnelles ont permis de lui attribuer un rôle potentiel de suppresseur de tumeurs. En effet, sa sur-expression par transfection conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose en réprimant l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire tels que *CCND1* (*cyclin D1*), *CCNE1* (*cyclin E*) et *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*) (Liu et al., 2008; Wang et al., 2009a). Grâce à cette approche, 140 métabolites secondaires de plantes ont été criblés (Zhang et al., 2019a). Ce crible a permis d'identifier un alcaloïde extrait de la racine de *Sanguinaria canadensis*, la sanguinarine (SG), capable d'induire la surexpression du

microARN-16-2 dans deux lignées cellulaires de HCC (HepG2 et Huh7). Des analyses d'immunofluorescence et d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont clarifié son mécanisme d'action. La SG stimule la translocation nucléaire du facteur de transcription p53 et augmente l'occupation de ce dernier sur le promoteur du *microARN-16-2*. La sur-expression du microARN-16-2 par la SG conduit à l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, la production de ROS et l'apoptose dans les cellules HepG2 et Huh7. Dans un modèle murin de HCC, l'administration par voie intrapéritonéale de la SG (10 mg/kg) pendant deux semaines réduit significativement la croissance de la masse tumorale via un mécanisme impliquant une inhibition de la prolifération cellulaire et l'activation de la machinerie apoptotique.

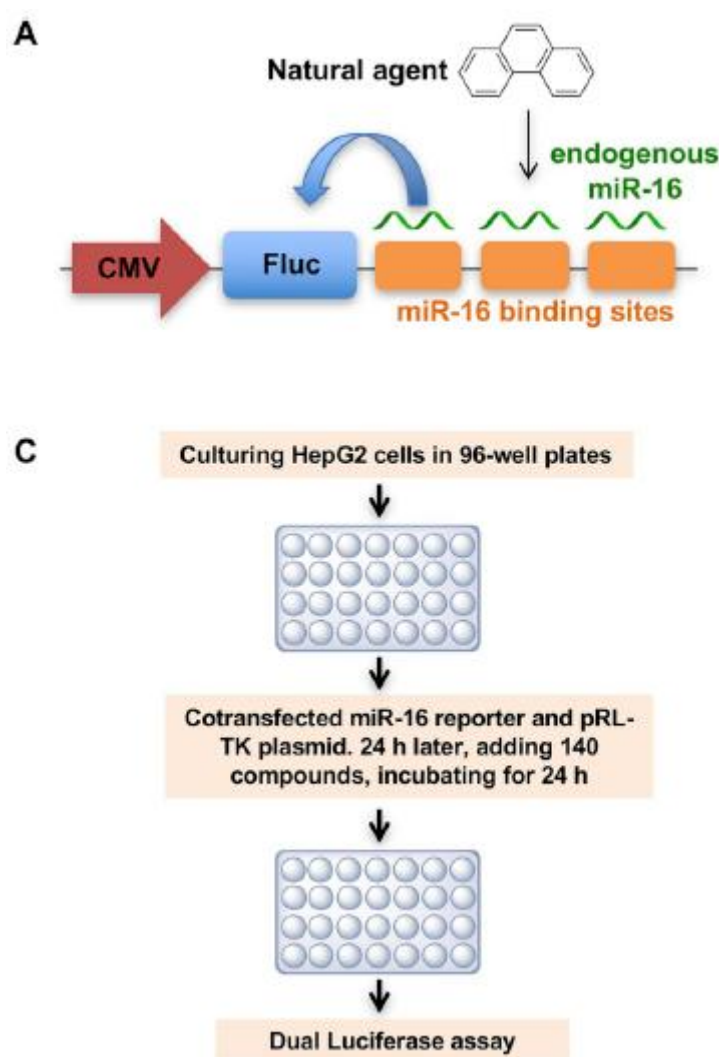


Figure 37 : Représentation schématique de la stratégie de criblage utilisant un gène rapporteur développée par Zhang et al. D'après (Zhang et al., 2019a).

1.3.5.1.2 Les stratégies de criblage utilisant des sondes fluorescentes

L'approche de criblage basée sur l'utilisation des sondes fluorescentes présente l'avantage d'être rapide à mettre en œuvre. En effet, contrairement aux sondes utilisant des gènes rapporteurs, les sondes fluorescentes ne nécessitent pas d'étape d'expression génique. Elle s'affranchissent par conséquent des nombreuses barrières cellulaires qui limitent le passage d'un plasmide d'expression du milieu extracellulaire vers le compartiment nucléaire (Kingwell, 2017).

Ryoo et ses collègues ont conçu en 2013 un senseur fluorescent de microARN, nommé PANGO (*Peptide Nucleic Acid and Nano Graphene Oxide*) (Ryoo et al., 2013). Ce système repose sur la liaison entre l'oxyde de graphène de taille nanométrique (NGO), utilisé comme vecteur de transfert de gène, et un acide nucléique peptidique (PNA) arborant des bases complémentaires à un microARN d'intérêt et marqué en 3' avec un fluorophore. Du fait du remplacement du squelette phosphodiester par une chaîne pseudo-peptidique sur laquelle vient se fixer les bases puriques et pyrimidiques, le PNA n'est pas chargé et peut s'apparier au microARN avec une très forte affinité et spécificité. Il présente également une grande stabilité et résistance aux protéases et nucléases. En absence de microARN d'intérêt, la fluorescence émise par la sonde est quenchée par le NGO. En revanche, une fois le système PANGO délivré dans les cellules, l'hybridation du microARN d'intérêt sur la sonde PNA permet de séparer la sonde du *quencher* NGO et ainsi induire l'émission de fluorescence. L'intensité de fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité de microARN d'intérêt exprimé dans la cellule. Récemment, le senseur PANGO a été exploité pour la recherche de molécules capables de moduler l'expression du microARN-21 dans une lignée cellulaire du cancer du sein MDA-MB-231 (Ryoo et al., 2018). Une collection de 967 petites molécules a été criblée sur des microplaques de 96 puits. Deux sondes PNA ont été utilisées, l'une spécifique du microARN-21 marquée à la Cyanine 3 (Cy3-PNA-21), et l'autre spécifique de l'ARNm de la GAPDH marquée à la Cyanine 5 (Cy5-PNA-GDH). La sonde Cy5-PNA-GDH a été utilisée comme sonde contrôle pour normaliser les efficacités de transfection (**Figure 38**). A l'issue du criblage, quatre classes de molécules ont pu être identifiées. Parmi ces molécules, 70 composés ont réduit à la fois l'expression du microARN-21 et la prolifération cellulaire, 65 composés ont induit l'expression du microARN-

21 et diminué la prolifération cellulaire, 2 composés ont inhibé l'expression du microARN-21 et induit la prolifération cellulaire et 21 composés ont augmenté à la fois l'expression du microARN-21 et la prolifération cellulaire. Une analyse bioinformatique a permis ensuite de regrouper, au sein d'une même classe, les molécules par rapport à leur fonction commune. Ainsi les auteurs ont identifié plusieurs hormones stéroïdiennes (estrogène et progestérone), génotoxiques (inhibiteurs de PI3K, HDAC, MEK) et composés anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens (acétaminophène, bétaméthasone dipropionate et lotéprednol etabonate) comme étant capables de réguler positivement l'expression du microARN-21. A l'inverse, des molécules inhibant la formation des microtubules (paclitaxel) et l'activité kinase (dasatinib, nilotinib) ont été identifiées comme étant capables de réguler négativement l'expression du microARN-21.

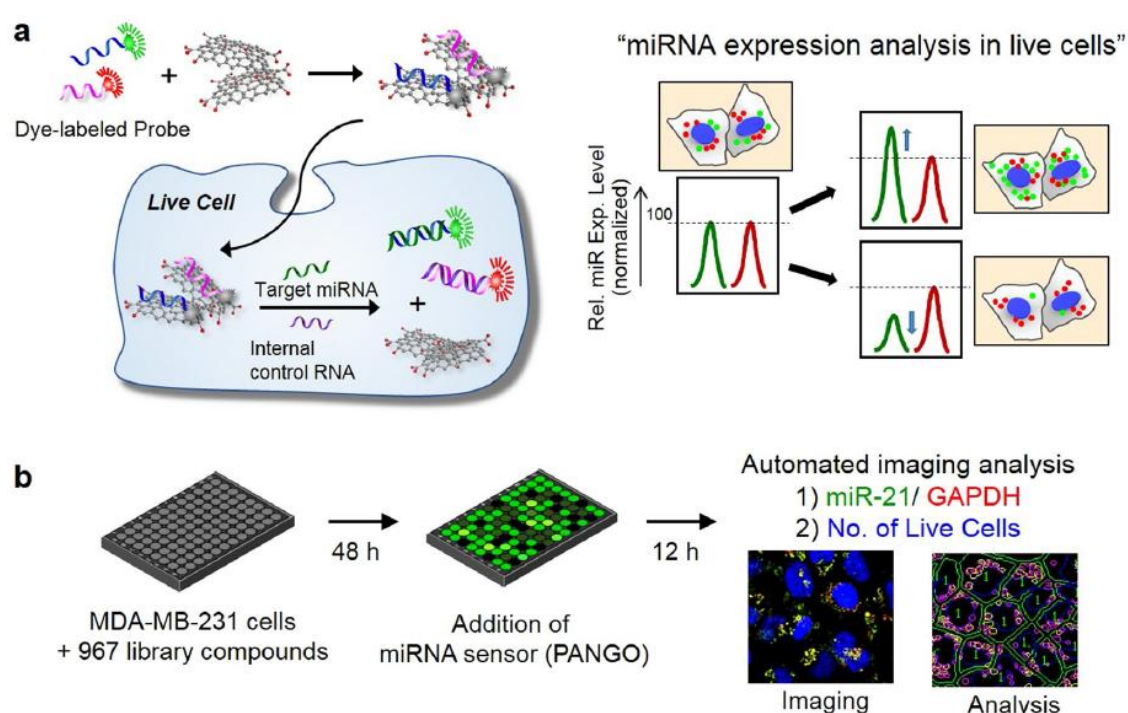


Figure 38 : Représentation schématique de la stratégie de criblage utilisant une sonde fluorescente développée par Ryoo et al. D'après (Ryoo et al., 2018).

2 Projet de thèse

Au laboratoire CBM, UPR 4301 d'Orléans, l'équipe d'accueil a développé un système rapporteur « positif » de l'activité des microARNs basé sur l'ingénierie moléculaire de systèmes de régulation génique inductible ON/OFF des opérons Cumate et Tetracycline. Ce système appelé RILES (pour « *RNAi-Inducible Luciferase Expression System* ») ne repose pas sur l'extinction de l'expression du gène rapporteur de la F-Luciférase, utilisé comme témoin de l'activité fonctionnelle des microARNs tel qu'évoqué dans le paragraphe précédent (système miR-OFF), mais au contraire, sur l'induction de ce gène rapporteur (système miR-ON). Par conséquent, ce capteur moléculaire miR-ON permet de générer dans les cellules *in vitro* ou dans les tissus *in vivo* des signatures optiques positives de l'expression des microARNs. Ces signatures sont facilement détectables par des équipements d'imagerie par bioluminescence disponibles dans la plupart des laboratoires de recherche.

Les travaux du groupe ont montré que le système RILES permet de générer des données beaucoup plus pertinentes et représentatives de la fonctionnalité des microARNs que celles collectées par les méthodes conventionnelles de détection, telles que la qRT-PCR par exemple. Du fait de leur nature invasive, relative à la lyse des échantillons, ces méthodes conventionnelles peuvent difficilement appréhender la dimension temporelle et individuelle de régulation des microARNs. Pourtant ces composantes sont essentielles à la fonctionnalité des microARNs. Le groupe a été le premier à imager la dynamique d'expression spatiale et temporelle d'un microARN dans un modèle chronique de pathologie et, plus récemment, à décrypter les principales étapes d'internalisation, de prise en charge cytosolique et d'exportation extracellulaire des microARNs transfectés dans les cellules de glioblastome (Ezzine et al., 2013; Simion et al., 2017, 2020). Ces données se sont avérées particulièrement utiles pour définir les modalités d'administration optimales de microARNs synthétiques suppresseurs de tumeurs dans un modèle préclinique du glioblastome (publications soumises pour considération).

Dans le cadre de ces travaux, et en amont de ce projet de doctorat, le groupe avait apporté une première preuve de concept à l'utilisation du système RILES comme plateforme de criblage de molécules synthétiques de microARNs et de systèmes de transfection

disponibles commercialement. Les résultats ont montré que le système RILES remplissait les principaux prérequis aux stratégies de criblage cellulaire de banques de composés tels que la spécificité, la sensibilité, la reproductibilité et la facilité d'utilisation. Ces résultats avaient été toutefois générés dans des conditions optimales. En effet, la transfection de microARNs synthétiques dans des cellules conduit à des niveaux d'expression de ces molécules exogènes beaucoup plus élevés que les niveaux d'expression des microARNs exprimés de façon endogène et donc physiologique. L'amplitude de régulation génique des microARNs endogènes en réponse à des stimuli est également relativement modérée, de l'ordre de 2 fois. Ceci représente un verrou supplémentaire à l'exploitation des microARNs comme sonde de criblage pour identifier des composés bioactifs.

Ce travail de doctorat présenté dans la suite de ce document s'inscrit dans cet axe de développement du système RILES. Il avait pour objectif principal de mettre en place une plateforme de criblage d'activité endogène des microARNs pour cribler une librairie d'extraits naturels de plantes pour des applications aussi bien fondamentales, en biologie cutanée, que potentiellement thérapeutiques en pharmacutique et/ou cosmétique.

Nous avons choisi de placer la plateforme de criblage sous contrôle du microARN-21 et dans un contexte de ré-épithélialisation cutanée, mimé en partie, par le traitement des kératinocytes par le TGF- β 1. Ce choix a été motivé d'une part parce que le microARN-21 est un microARN « phare » jouant de multiples rôles fonctionnels, très bien documentés, aussi bien en conditions physiologiques, notamment au cours de la phase de ré-épithélialisation, que pathologiques dans les cancers par exemple. D'autre part parce que la phase ré-épithélialisation est essentielle pour la cicatrisation des plaies et met en jeu plusieurs fonctions biologiques importantes telles que la survie, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Ainsi, en plaçant la plateforme de criblage RILES dans un contexte « physiologique », nous pensions être en mesure de faciliter l'identification de(s) composé(s) bioactif(s) pouvant potentialiser la voie de signalisation intracellulaire du TGF- β 1, essentielle au remodelage tissulaire et plus spécifiquement cutané.

Ce travail de doctorat s'est articulé autour des objectifs suivants :

- 1) Mise en place la plateforme de criblage RILES sous contrôle de l'axe de régulation TGF- β 1/microARN-21-5p.
- 2) Criblage d'une extratothèque de 33 extraits de plantes médicinales connues pour leurs vertus thérapeutiques dans d'autres modèles d'études.
- 3) Caractérisation mécanistique et fonctionnelle d'un des extraits de plantes pour enrichir les connaissances scientifiques en lien avec la régulation de l'homéostasie cutanée.

3 Matériels et méthodes

3.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire HaCaT issue des kératinocytes humains spontanément immortalisés (AddexBio, Cat #T002000) a été cultivée sur support solide dans un incubateur thermostaté à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% d'humidité. La culture cellulaire a été effectuée dans du milieu DMEM contenant 4.5 g/L de glucose et 0.584 g/L de L-Glutamine (Sigma-Aldrich, Cat #5796), supplémenté par 10 % de SVF décomplémenté (Invitrogen, Cat #F7524) et une solution d'antibiotiques contenant 10 000 U/mL de pénicilline et 10 mg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich, Cat #P0781). Ce milieu de culture est dit « DMEM-High glucose complet ».

Les kératinocytes épidermiques humains normaux (NHEK) (Lonza, Cat #00192907) ont été cultivés sur support solide dans un incubateur thermostaté à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité. La culture cellulaire a été effectuée dans du milieu spécifique pour la culture des kératinocytes humains primaires KGM™ Gold™ (*Keratinocyte Growth Medium*, Lonza, Cat #00192151), supplémenté par de le BPE (*Bovine Pituitary Extract*), le hEGF (*human Epidermal Growth Factor*), un cocktail de protéines (insuline, hydrocortisone, épinéphrine, transferrine) et une solution d'antibiotiques (gentamicine et amphotéricine). L'ensemble de ces compléments de culture cellulaire ont été fournis par la société Lonza et référencés sous le nom de KGM™ Gold™ SingleQuots supplements (Cat #00192152). Ce milieu de culture est dit « KGM Gold complet ».

La croissance des cellules HaCaT et NHEK a été contrôlée quotidiennement au microscope à contraste de phase (Zeiss, Allemagne). Lorsque les cellules ont atteint 80 % de confluence, elles ont été récoltées par traitement enzymatique à la trypsine/EDTA (Sigma-Aldrich, Cat #59418C) et cultivées dans un nouveau flacon de culture à raison de 35 000 cellules/cm² et 7 800 cellules/cm², respectivement. Les cellules HaCaT ont été cultivées jusqu'au 35^{ième} passage, tandis que les cellules NHEK ont été cultivées jusqu'au 3^{ième} passage. L'absence de contamination cellulaire par les mycoplasmes a été régulièrement contrôlée (MycoAlert™ Mycoplasme Detection Kit, Lonza, Cat #LT07-318).

3.2 Mise en place de la plateforme de criblage

3.2.1 Construction moléculaire de la sonde de criblage bioluminescente

pRILES/21.5pT

La construction du plasmide pRILES/21.5pT a été réalisée en suivant un protocole expérimental utilisé en routine au laboratoire (Ezzine *et al.*, 2013 ; Simion *et al.*, 2017, Simion *et al.*, 2020). La stratégie consiste à générer dans un premier temps une structure oligonucléotidique double brin de 120 paires de bases (pb) à partir 1) d'une première séquence oligonucléotidique sens, comprenant quatre blocs de séquences parfaitement complémentaires au microARN-21-5p, séparés par de courtes séquences de quatre nucléotides aléatoires (appelées espaceurs ou « *spacer* »), et 2) d'une deuxième séquence oligonucléotidique anti-sens totalement complémentaire à l'oligonucléotide sens. Pour faciliter l'insertion de cette structure oligonucléotidique dans le vecteur de clonage pRILES, des extrémités 5' sortantes compatibles avec les sites de restriction Not I et Mlu I ont été ajoutées aux séquences oligonucléotides sens et anti-sens. Les deux oligonucléotides ont été synthétisés séparément par la société Sigma-Aldrich, linéarisés par un traitement à 95°C pendant 5 minutes puis hybridés à 37°C pendant 1 heure. La structure oligonucléotidique double brin (db) ainsi formée, correspondant à la cassette miR-21.5p T, a été liguée dans le plasmide d'expression purifié pRILES préalablement linéarisé par digestion enzymatique avec les enzymes de restriction Not I et Mlu I. A noter que le site de clonage est localisé en aval du site d'arrêt de la traduction du répresseur transcriptionnel CymR et en amont du site de polyadénylation de la séquence codante du gène CymR (**Figure 39**).

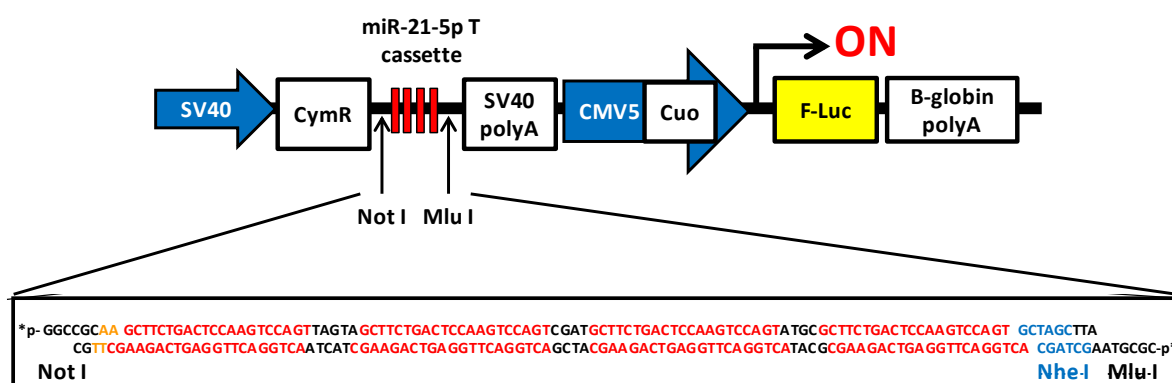


Figure 39 : Représentation schématique du pRILES/21.5pT.

En rouge sont représentées les séquences parfaitement complémentaires au microARN-21-5p. En noir sont représentées les séquences « *spacer* » qui séparent les 4 blocs de séquences complémentaires au microARN-21-5p. Un site Nhe I, en bleu, a été ajouté pour faciliter l'identification des clones recombinants par digestion enzymatique. Les extrémités sortantes 5' et 3' contiennent respectivement les sites Not I et Mlu I. Adapté de (Ezzine et al., 2013).

3.2.2 Transformation bactérienne et maxi-préparation d'ADN plasmidique

Les bactéries compétentes *E.coli* DH5α (50 µL à 1-3x10⁹ UFC/µg d'ADN plasmidique (ADNp), NEB, Cat #C2987H) ont été transformées avec 5 ng de plasmide d'expression (pRILES/21.5pT) par choc thermique à 42°C pendant 30 secondes. Les bactéries ont ensuite été resuspendues dans un milieu SOC et incubées sous agitation à 37°C pendant 1 heure, avant d'être étalées sur un milieu de culture nutritif LB (Sigma Aldrich, Cat #3522), solidifié par addition d'agar à une concentration finale de 15 g/L et d'ampicilline comme agent de sélection (100 µg/mL). Les bactéries étalées sur cette gélose ont été ensuite cultivées à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, une dizaine de colonies bactériennes recombinantes ont été prélevées et amplifiées dans le milieu LB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) à 37°C pendant une nuit sous agitation. Le lendemain, l'extraction des plasmides d'expression pRILES/21.5pT a été réalisée par la méthode de lyse alcaline à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid, Mini kit (Macherey-Nagel, Cat #740588.50). Après vérification de la présence de la cassette miR-21.5p T par digestion du plasmide par les enzymes de restriction Not I, Mlu I et Nhe I, le plasmide pRILES/21.5pT a été amplifié à partir d'une culture bactérienne de 500 mL et purifié en utilisant le kit NucleoBond Xtra Maxi EF Buffer Set I (Macherey-Nagel, Cat #740427). La concentration et la pureté de la préparation plasmidique a été déterminée par

spectrophotométrie (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) en mesurant l'absorbance à 260 nm, 280 nm et 230 nm. Le plasmide a été envoyé au service de séquençage Sanger de GATC (<https://www.eurofinsgenomics.eu/en/custom-dna-sequencing/gatc-services/>) pour contrôler l'intégrité de la cassette miR-21.5p T clonée dans le plasmide d'expression pRILES. Les plasmides d'expression ont été aliquotés et conservés à -20°C avant utilisation.

3.2.3 Validation fonctionnelle du plasmide d'expression pRILES/21.5pT

3.2.3.1 Test de spécificité et de sensibilité

La spécificité et la sensibilité du pRILES/21.5pT ont été appréciées soit 1) par transfection des cellules HaCaT avec des quantités croissantes de microARNs synthétiques agonistes (mimiques) ou antagonistes (inhibiteurs) spécifiques du microARN-21-5p, soit 2) par traitement des cellules HaCaT avec le TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor- β 1*), pour induire l'expression endogène du microARN-21-5p dans ces cellules (Yang et al., 2011; Wang et al., 2012c).

3.2.3.1.1 Transfection des cellules HaCaT avec des microARNs mimiques et inhibiteurs synthétiques

Deux quantités de microARNs synthétiques mimiques ou inhibiteurs (1 et 10 nM) ont été transfectées dans les cellules HaCaT en utilisant la lipofectamine RNAimax (Invitrogen, Cat #13778075) comme agent de transfection et en suivant les recommandations du fournisseur. Le **Tableau 7** recense les différents microARNs synthétiques utilisés pour les expériences.

Tableau 7 : Liste des microARN mimiques et inhibiteurs synthétiques	
microARN (Ambion, Life Technologies)	Référence catalogue
mimiques de hsa-microARN-21-5p	#MC10206
mimiques de hsa-microARN-122-5p	#MC11012
mimiques de hsa-microARN-133a-5p	#MC11478
mimiques de microARN-contrôle négatif	#4464060
inhibiteurs de hsa-microARN-21-5p	#MH10206
Inhibiteurs de microARN-contrôle négatif	#4464076

Brièvement évoqué, 1 ou 10 μL d'une solution concentrée à 0.5 μM en microARNs mimiques ou inhibiteurs synthétiques été déposés dans un premier tube eppendorf en présence de 2 μg de pRILES ou pRILES/21.5pT. Le volume final a été ajusté à 50 μL avec du milieu de culture OptiMEM™ pauvre en sérum (ThermoFisher Scientific, Cat #11058021). Un deuxième tube eppendorf a été préparé en ajoutant 1.5 μL de lipofectamine RNAimax suivi de 48.5 μL d'OptiMEM™. Après 5 minutes d'incubation, la totalité du volume du tube eppendorf contenant les microARNs synthétiques et les plasmides RILES a été déposé dans le deuxième tube eppendorf contenant la lipofectamine. La formation des complexes a été réalisée par cinq cycles d'aspiration-refoulement à l'aide d'une micropipette, suivie d'une incubation de 10 minutes à température ambiante. Au terme de cette incubation, 450 μL d'OptiMEM™ ont été ajouté dans le tube avant de générer une concentration finale en microARNs synthétiques ou inhibiteurs de 1 et 10 nM. Cette solution a été déposée sur les cellules HaCaT, cultivées en monocouche à 30 % de confluence dans un puit d'une plaque de culture de 24 puits. La transfection a été réalisée pendant 6 heures à 37°C, 5 % CO_2 . Au terme de cette transfection, le milieu de culture OptiMEM™ a été renouvelé par du milieu DMEM-High glucose complet. L'expression relative de la luciférase induite par les microARNs synthétiques a été quantifiée 48 heures après transfection à l'aide d'un luminomètre à tube Lumat (LB 9507, Berthold), comme décrit dans le paragraphe 3.2.3.1.3.

3.2.3.1.2 Traitement des cellules HaCaT par le TGF- β 1

La sensibilité de la sonde pRILES/21.5pT a été appréciée en évaluant la réactivité du système RILES/21.5p T pour le microARN-21-5p, exprimé de façon endogène dans les cellules HaCaT et régulé positivement par le TGF- β 1. Brièvement évoqué, la veille de la transfection, les cellules HaCaT ont été déposées en plaques de culture de 24 puits (3.5×10^5 cellules/puits, 500 μL /puits) et incubées à 37°C, 5% CO_2 . Le lendemain, 2.5 μg de pRILES ou pRILES/21.5pT ont été transfecté dans les cellules à l'aide d'un agent de transfection développé par le laboratoire, constitué de polyéthylèneimine substituée par 16 % de résidus histidine (PTG1, Polytheragène SAS, Evry, France, lot #527C), et en utilisant un rapport de complexation ADNp/PTG1 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) de 1/4 comme décrit précédemment (Ezzine et al., 2013; Simion et al., 2017). La transfection a été réalisée pendant 4 heures à 37°C, 5% CO_2 dans du milieu de culture DMEM exempt d'antibiotique et de sérum. Au terme de la transfection, le

milieu de culture a été remplacé par du milieu de culture DMEM-High glucose supplémenté par 0.5 % de SVF. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec des concentrations croissantes de TGF- β 1 (2, 10 et 20 ng/mL) dans le même milieu de culture pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂. L'expression relative de la luciférase induite par le microARN-21-5p a été quantifiée 48 heures après la transfection à l'aide d'un luminomètre à tube Lumat (LB 9507, Berthold) et d'un imageur optique IVIS® Lumina II (Perkin Elmer) présent sur la plateforme d'imagerie du Centre d'Imagerie du Petit Animal du campus du CNRS d'Orléans (CIPA, TAAM-UPS44, CNRS, Orléans), en suivant le protocole décrit dans le paragraphe 3.2.3.1.3.

3.2.3.1.3 Mesure de l'activité de la luciférase

a) Avec le luminomètre à tube Lumat

Brièvement évoqué, les tapis cellulaires ont été lavés une fois avec du PBS avant d'ajouter 200 μ L de tampon de lyse à pH 7.8 (25 mM de Tris-phosphate, 1 mM de DTT, 1 mM d'EDTA, 15% de glycérol, 8 mM de MgCl₂ et 1% de Triton X-100) dans chacun des puits. Au terme d'une incubation de 10 minutes sur la glace, les cellules ont été lysées mécaniquement à l'aide d'un cône des micropipettes 200 μ L avant d'être transférées dans un tube eppendorf, vortexées et centrifugées à 1 500 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Un volume de 50 μ L de lysat cellulaire a été déposé dans un tube à luminescence contenant au préalable 5.26 μ L d'une solution d'ATP utilisée à la concentration finale de 2 mM. Le substrat de la luciférase, la D-luciférine (Promega, Cat #E1603), préparé à la concentration finale de 0.33 mg/mL dans du PBS, a été déposé dans l'injecteur automatique du luminomètre à tube Lumat (LB 9507, Berthold) pour permettre un dépôt extemporané de 150 μ L de substrat dans chaque tube. Le temps d'intégration pour la quantification du signal luminescent a été standardisé à 4 secondes. Les résultats ont été exprimés en RLU.

L'activité relative de la luciférase a ensuite été normalisée à la quantité de protéines totales contenue dans chacun des puits grâce à un test colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique (BCA) (Smith et al., 1985) (BCA assay protein quantification kit, Interchim, Cat #UP40840A). Les résultats ont été exprimés en RLU/mg de protéines. Les résultats finaux ont été exprimés en *Luciferase fold change* en normalisant la valeur moyennée en RLU/mg

quantifiée dans les puits des cellules transfectées avec le pRILES/21.5pT à la valeur moyennée en RLU/mg quantifiée dans les puits des cellules transfectées avec le plasmide pRILES.

b) Avec l'imageur optique IVIS® Lumina II

Brièvement évoqué, les tapis cellulaires ont été lavés une fois avec du PBS avant d'ajouter dans chacun des puits la D-Luciférine (Promega, Cat #E1603), préparée à la concentration finale de 0.33 mg/mL dans du PBS. La plaque de culture contenant les cellules a été ensuite introduite dans l'imageur optique IVIS® Lumina II (Perkin Elmer) (CIPA, TAAM-UPS44, CNRS, Orléans). Le temps d'intégration du signal optique émis par les cellules a été standardisé à 2 minutes pour chacune des plaques. Après une étape de reconstitution des images de bioluminescence avec celles prises en lumière visible, la quantité de photons émis dans les puits d'intérêt a été quantifiée à partir de ROI (*Regions Of Interest*) dessinées manuellement à l'aide du logiciel d'analyse d'image Live Imaging (Perkin Elmer). Les résultats finaux ont été exprimés en *Luciferase fold change* en normalisant, pour chaque condition, la quantité de photons détectés dans les puits des cellules transfectées avec le pRILES/21.5pT par rapport à la quantité de photons détectés dans les puits des cellules transfectées avec le plasmide pRILES.

3.2.3.2 Quantification des microARNs par RT-qPCR

La procédure pour quantifier l'expression relative des microARN par RT-qPCR repose sur l'utilisation du kit mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Life Technologies, Cat #AM1560) qui permet d'enrichir les petits ARNs (< 200 nt). Brièvement évoqué, la procédure a consisté à lyser les cellules dans un tampon de lyse fourni par le fabricant dans des conditions réductrices (β -mercaptoéthanol) pour dénaturer, entre autres, les RNases, puis à extraire les protéines et l'ADN génomique en ajoutant 0.1 volume d'un mélange contenant du phénol acide, chloroforme et alcool isoamylique (AIA) à pH 4.5 au rapport 125:24:1. Après une étape de centrifugation à 10 000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante, la phase aqueuse supérieure contenant les microARNs a été soigneusement récupérée, avant d'être déposée sur une colonne contenant un filtre en fibre de verre pour

immobiliser ces derniers. Après des étapes de lavage, les microARNs ont été élués de la colonne par addition de 50 µL d'eau stérile, exempte de RNase.

Deux microlitres de la solution de microARNs purifiés ont ensuite été rétro-transcrits en ADNc et amplifiés en utilisant le kit TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis (Applied Biosystems, Cat #A28007). Les ADNc générés ont ensuite été amplifiés par qPCR en utilisant un couple d'amorces et une sonde d'hydrolyse TaqMan® spécifiques du microARN d'intérêt (**Tableau 8**). L'expression du microARN-21-5p dans les échantillons a été normalisée à celle du microARN de « ménage », le microARN-16-5p, en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ décrite par (Livak and Schmittgen, 2001). Les résultats ont été exprimés en expression relative.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ avec } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{microARN-21-5p})} - \Delta Ct_{(\text{microARN-16-5p})}$$

Tableau 8 : Liste des amorces/sonde TaqMan® utilisées pour l'amplification du microARN-21-5p	
TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems)	Référence catalogue
hsa-miR-21-5p	#000397
hsa-miR-16-5p	#000391

3.3 Criblage bioluminescent de la librairie d'extraits de plantes

ValBioCosm

3.3.1 Présentation générale de la stratégie de criblage

La stratégie de criblage a été conçue selon plusieurs critères :

- Le premier étant de miniaturiser le test cellulaire basé sur le système RILES du format de plaques de 24 puits utilisé en routine au laboratoire au format de microplaques de 96 puits, tout en s'assurant de reproduire les mêmes performances en termes de sensibilité et spécificité qu'au format de plaques de 24 puits.
- Le deuxième étant de mettre au point un protocole de quantification de l'émission de bioluminescence compatible avec les différents luminomètres présents au laboratoire.
- Le troisième étant de définir un plan de microplaques de 96 puits adapté et suffisamment robuste (**Figure 40**) pour 1) limiter les « effets de bord » qui correspondent

aux variabilités de quantification des signaux optiques émis en fonction des positions sur la plaque, 2) d'inclure systématiquement dans les plaques un contrôle négatif, représenté par la transfection des cellules transfectées avec le plasmide contrôle pRILES pour s'affranchir des faux positifs et 3) de privilégier une approche de criblage « dose-réponse » impliquant l'évaluation de trois concentrations par extrait de plante par microplaques au détriment d'une approche de criblage à plus haut débit, qui consisterait à évaluer une seule concentration par extrait de plante, soit 12 extraits contre seulement 4 dans notre stratégie.

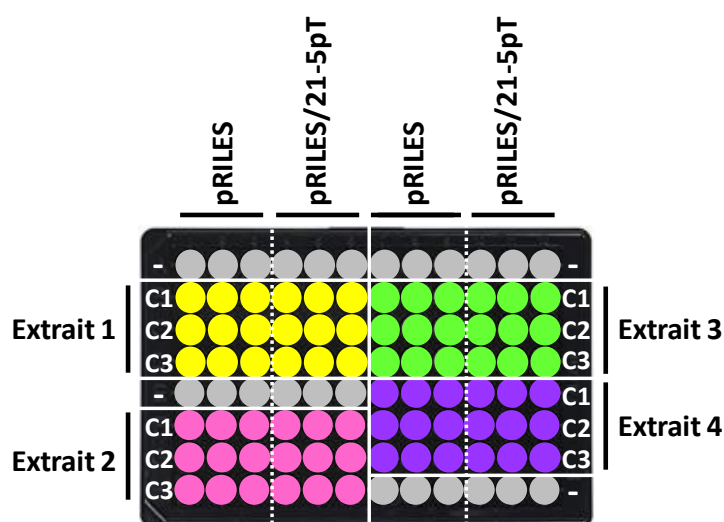


Figure 40 : Représentation schématique du plan de microplaque de 96 puits optimisé pour le criblage cellulaire utilisant la sonde d'imagerie moléculaire pRILES/21.5pT spécifique du microARN-21-5p.

Les contrôles négatifs correspondant au traitement des cellules uniquement par le TGF- β 1 (-, *sur le schéma*) ont été positionnés à différents endroits de la microplaque de 96 puits pour limiter l'« effet de bord », lié à l'émission d'un signal optique non homogène dans l'ensemble de la microplaque. Le plasmide contrôle pRILES (*pRILES, sur le schéma*) a été systématiquement inclus dans chaque série de tests pour éliminer, dès les premiers essais de criblage, les extraits de plantes pouvant augmenter l'expression de la luciférase de façon non spécifique, c'est-à-dire indépendamment de la régulation positive de l'activité du microARN-21-5p. Pour pouvoir évaluer la relation dose-réponse d'un extrait de plante sur l'activité du microARN-21-5p, chaque extrait de plante a été distribué dans les puits de la microplaque en triplicata, à des concentrations croissantes (C1, C2, C3, *sur le schéma*) en présence de TGF- β 1. Cette démarche expérimentale a pour objectif d'identifier, dès les premiers criblages, les extraits de plantes capables d'induire l'activité du microARN-21-5p dans les cellules traitées au TGF- β 1 de façon dose-dépendante en comparaison du groupe contrôle (cellules uniquement traitées par le TGF- β 1).

3.3.2 Optimisation des conditions expérimentales du criblage cellulaire

Une série d'optimisations a été réalisée pour déterminer les conditions expérimentales permettant de reproduire, au format de microplaques de 96 puits, la même spécificité et sensibilité du système RILES initialement développé au format de plaques de 24 puits. Les paramètres évalués sont récapitulés dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Liste des paramètres optimisés et des conditions testées pour définir le protocole de criblage optimal au format de microplaque de 96 puits	
Paramètres optimisés	Conditions testées
Nombre de cellules par puits	5×10^4 ; 7.5×10^4
Quantité de plasmide RILES (μg) par puits	0.2 ; 0.3 ; 0.4 ; 0.5
Ratio d'ADNp/PTG1	1/4 ; 1/5 ; 1/6
% de sérum dans le milieu de culture	0.5 ; 10
Temps de traitement au TGF- β 1 (10 ng/mL)	1x 24 h ; 2x 24 h ; 3x 24 h
Temps de mesure de l'activité de la luciférase	48 heures après transfection 72 heures après transfection 96 heures après transfection

Au terme de ces différentes optimisations une démarche expérimentale optimale de criblage a été retenue (**Figure 41**).

Brièvement évoqué, la veille de la transfection, les cellules HaCaT ont été déposées en microplaques de culture de 96 puits noires à fond transparent (Lumox, Cat #6120096) à raison de 7.5×10^4 cellules par puits (100 μL par puits) à 37°C, 5% CO_2 . Le lendemain, les cellules ont été transfectées avec 0.5 μg par puits de plasmide contrôle pRILES et pRILES/21.5pT à l'aide de l'agent de transfection PTG1 et en utilisant un rapport de complexation de 1/6 (μg plasmide/ μg de PTG1). La transfection a été réalisée pendant 4 heures dans du milieu de culture DMEM exempt d'antibiotique et de sérum à 37°C, 5% CO_2 . Au terme de la transfection, le milieu de culture a été remplacé par 100 μL de milieu DMEM-High glucose supplémenté avec 0.5 % de SVF. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec 10 ng/mL de TGF- β 1 en présence ou absence des extraits de plantes pendant 24 heures (37°C, 5% de CO_2). L'activité de la luciférase a été quantifiée 48 heures après transfection, soit à l'aide d'un imageur optique IVIS® Lumina II (Perkin Elmer) (CIPA, TAAM-UPS44, CNRS, Orléans) (paragraphe 3.3.3.3.1), soit en utilisant un luminomètre pour microplaques Mithras

(Berthold) présent sur la plateforme de spectrophotométrie P@CIFIC du CBM (paragraphe 3.3.3.3.2).

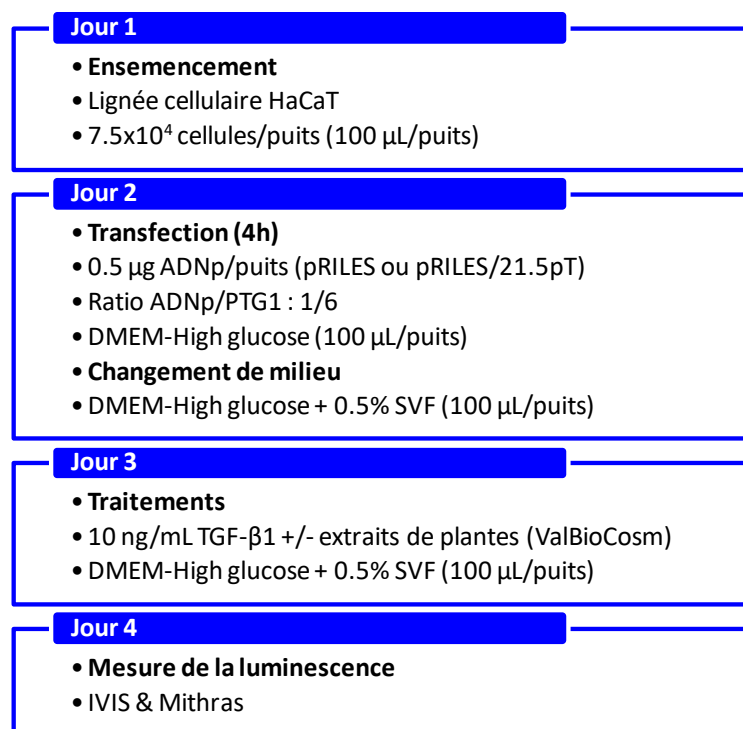


Figure 41 : Procédure expérimentale optimisée au format de microplaque de 96 puits pour le criblage cellulaire utilisant le système RILES.

3.3.3 Criblage à petit débit de la librairie ValBioCosm

3.3.3.1 Présentation de la librairie ValBioCosm

Le Consortium ValBioCosm a mis à notre disposition une librairie de 37 extraits de plantes (**Tableau 10**) cultivées dans le laboratoire LBLGC (Dr. Christophe Hano, Laboratoire de Biologie des Ligneux et Grandes Cultures, UPRES EA 1207, INRA, Orléans) et au CDHRC (Sophie Bresch, Comité de Développement Horticole de la Région Centre, Réseau ASTREDHOR Loire-Bretagne, Saint-Cyr-en-Val). La stratégie générale a consisté à broyer 10 g de parties aériennes des plantes (feuilles et tiges) ou des graines puis d'extraire les métabolites primaires contenus dans ces organes de plantes par la méthode d'extraction assistée par ultrasons. La procédure de préparation des extraits de plantes à partir ces biomasses végétales a été réalisée par l'équipe de Chimie analytique de l'ICOA (Pr. Emilie Destandau, Institut de Chimie et Organique et Analytique, UMR 7311, Orléans). Pour les

expériences, une solution d'éthanol/eau 70/30 (v/v) a été choisie comme solvant d'extraction. L'extraction des molécules d'intérêt a été réalisée pendant 1 heure à température ambiante. Les extraits ont ensuite été centrifugés à 10 000 rpm pendant 15 minutes à température ambiante afin de séparer le surnageant contenant les métabolites d'intérêt du résidu végétal. Le surnageant clarifié a été finalement évaporé à sec sous flux d'azote pendant 24 heures. Le lendemain, l'extrait sec a été solubilisé dans du DMSO à une concentration finale de 100 mg/mL. Cet extrait végétal, dit « extrait brut », a été utilisé pour la suite des expériences.

Tableau 10 : Librairie ValBioCosm			
Sourcing	Nom de plante	Nom latin	Organe végétal
LBLGC	Alchémille vulgaire	<i>Alchemilla vulgaris</i> L.	Feuilles
LBLGC	Bardane	<i>Arctium lappa</i> L.	Racines
LBLGC	Chicorée	<i>Cichorium intybus</i> L.	Racines
LBLGC	Chardon marie	<i>Silybum marianum</i> L. Gaertn	Akènes
LBLGC	Coleus (CV. Dragon)	<i>Coleus blumei</i>	Feuilles
LBLGC/CDHRC	Echinacée pourpre	<i>Echinacea purpurea</i> L. Moench	Racines
LBLGC	Gentiane	<i>Gentiana lutea</i> L.	Racines
LBLGC	Vigne	<i>Vitis vignifera</i>	Feuilles
LBLGC	Cerise	<i>Prunus cerasus</i>	Queues
LBLGC	Lin	<i>Linum usitatissimum</i>	Feuilles
LBLGC	Ortie	<i>Urtica dioica</i> L.	Feuilles
LBLGC	Pensées sauvages	<i>Viola tricolor</i> L.	Parties aériennes fleuries
LBLGC	Trèfle rouge	<i>Trifolium pratense</i> L.	Parties aériennes fleuries
CDHRC	Coléus	<i>Coleus forskhlii</i>	Racines
CDHRC	Armoise annuelle	<i>Artemisia annua</i> L.	Feuilles
CDHRC	Hysope d'eau	<i>Bacopa monnieri</i>	Feuilles
CDHRC	Ashwagandha	<i>Withania somnifera</i> L.	Racines et fruits
CDHRC	Eclipta	<i>Eclipta alba</i>	Feuilles
CDHRC	Téphrosie pourpre	<i>Tephrosia purpurea</i>	Feuilles
CDHRC	Echinacée angustifolia	<i>Echinacea angustifolia</i>	Racines
CDHRC/ICOA	Bois de roses	<i>Rosa</i>	Tiges
CDHRC/ICOA	Ginseng indien	<i>Whitania somnifera</i>	Feuilles
ICOA	Centella asiatica	<i>Centella asiatica</i>	Feuilles
ICOA	Arnica	<i>Arnica chamassonis</i>	Feuilles
ICOA	Jussie	<i>Ludwigia grandiflorum</i>	Feuilles
ICOA	Flûteau nageant	<i>Luronium natans</i> L.	Feuilles
ICOA	Iris	<i>Iris pseudacorus</i> L.	Feuilles
ICOA	Armoise commune	<i>Artemisia vulgaris</i>	Feuilles
ICOA	Souchet cosmétique	<i>Cyperus esculentus</i>	Feuilles

3.3.3.2 Test de viabilité cellulaire

L'étape en amont du criblage cellulaire a consisté à déterminer les concentrations des extraits de plantes parfaitement bien tolérées par les cellules HaCaT.

Pour cela, la cytotoxicité relative des extraits de plantes a été évaluée à l'aide d'une méthode de dosage colorimétrique utilisant le XTT (sodium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) comme réactif (Scudiero *et al.*, 1988). Le principe repose sur la capacité des cellules viables à réduire le XTT de couleur légèrement jaunâtre, en un dérivé soluble orangé, le formazan, par les enzymes déshydrogénases mitochondriales. La quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules viables et peut être quantifiée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 450 nm. Brièvement évoqué, les cellules HaCaT ont été déposées dans des microplaques de culture de 96 puits (2×10^4 cellules/puits) et cultivées dans du milieu DMEM-High glucose complet pendant 24 heures à 37°C, 5 % de CO₂. Le lendemain, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS et cultivées dans du milieu DMEM-High glucose supplémenté par 0.5 % de SVF pendant une nuit à 37°C, 5 % de CO₂. Les cellules ont été ensuite traitées pendant 24 ou 48 heures avec différentes concentrations d'extraits bruts de plantes dilués dans le même milieu de culture. Des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif. Au terme de cette incubation, le tapis cellulaire a été lavé avec du PBS, avant d'ajouter la solution de XTT diluée dans le milieu DMEM-High glucose exempt de sérum et d'antibiotique à la concentration finale de 0.3 mg/mL (Cell Proliferation kit II, Roche, Cat #11465015001). Après 4 heures d'incubation, la quantité de formazan produite dans chacun des puits a été quantifiée par mesure de l'absorbance à 450 nm en utilisant le lecteur de microplaques multi-modes VICTOR 3VTM, (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de viabilité en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = \left(\frac{\text{moyenne d'absorbance des cellules traitées avec un extrait de plante}}{\text{moyenne d'absorbance des cellules non traitées}} \right) \times 100$$

3.3.3.3 Criblage cellulaire avec des microplaques de 96 puits

3.3.3.3.1 Crible primaire avec l'imageur optique IVIS® Lumina II

Les cellules HaCaT ont été déposées et transfectées dans des microplaques de culture de 96 puits noires à fond transparent en suivant le protocole optimisé et détaillé dans le paragraphe 3.3.2. Au terme du traitement des cellules par le TGF- β 1 en présence des extraits de plantes, l'activité de la luciférase dans chacun des puits a été quantifiée à l'aide d'un imageur optique IVIS® Lumina II (Perkin Elmer) comme décrit dans le paragraphe 3.2.3.1.3. Seuls les extraits de plantes capables de potentialiser plus de 1.5 fois l'activité du microARN-21-5p induite par le TGF- β 1 ont été retenus pour la suite des expériences :

$$\text{Luciferase fold change (TGF}\beta\text{1 + extrait de plante)} \geq 1.5X \text{ Luciferase fold change (TGF}\beta\text{1)}$$

Ce crible primaire, rapide, a été répété au minimum trois fois.

3.3.3.3.2 Crible secondaire avec le luminomètre à microplaques Mithras

Les extraits candidats issus du crible primaire (touches ou *hits* primaires) ont été confirmés en utilisant un autre système de lecture de la bioluminescence pour s'affranchir des artefacts potentiellement liés à la première méthode de mesure.

Le protocole expérimental utilisé a été rigoureusement le même que celui mis en œuvre pour la lecture des microplaques avec l'imageur optique IVIS® Lumina II (Perkin Elmer), hors mis l'utilisation de microplaques de culture de 96 puits de couleur blanche à fond transparent et du luminomètre pour microplaques Mithras (Berthold) de la plateforme P@CIFIC du CBM. Avant de placer les microplaques dans le luminomètre, le fond des puits des microplaques ont été recouvert avec un film adhésif opaque pour réfléchir des photons émis par les cellules vers la caméra du lecteur de microplaques Mithras. Les tapis cellulaires ont été lavés deux fois avec du PBS avant de déposer 50 μ L de PBS par puits. Les microplaques de criblage ont été placées dans le lecteur de microplaques Mithras. La luciférine, préparée à la concentration de 0.66 mg/mL dans du PBS, a été déposée dans l'injecteur automatique pour permettre un dépôt extemporané de 50 μ L de substrat dans chacun des puits. Le temps d'intégration pour la quantification du signal bioluminescent dans chacun des puits a été standardisé au cours d'une cinétique de 40 secondes, avec des intervalles de mesure de 10 secondes. De la même façon que pour la quantification à l'aide

de l'imageur optique IVIS® Lumina II, décrite dans le paragraphe 3.2.3.1.3, les résultats finaux ont été exprimés en *Luciferase fold change*. Ce crible secondaire, plus long à mettre en œuvre, a été répété au minimum trois fois.

3.4 Validation des « touches »

3.4.1 Normalisation de l'activité de la luciférase en quantité de protéines

Les touches identifiées lors des campagnes de criblage primaire et secondaire ont été validées en plaques de culture de 24 puits en normalisant l'activité de la luciférase (RLU) à la quantité de protéines contenues dans chacun des puits (mg de protéines/puits). Cette étape de validation avait pour objectif d'exclure la présence éventuelle de faux positifs, liés, par exemple, à une augmentation du signal bioluminescent dans les cellules HaCaT transfectées avec la sonde pRILES/21.5pT en raison d'une augmentation du nombre de cellules en culture en réponse au traitement avec les extraits de plantes plutôt qu'une modulation spécifique de l'activité du microARN-21-5p.

Le protocole de culture, de transfection cellulaire et de normalisation de l'activité de la luciférase des cellules en plaques de 24 puits a été rigoureusement le même que celui décrit dans les paragraphes 3.2.3.1.2 et 3.2.3.1.3.

Les résultats ont alors été exprimés en *Luciferase fold change* :

$$\text{Luciferase fold change} = \frac{\{(RLU/mg \text{ protéines (pRILES/21.5pT)}) / (RLU/mg \text{ protéines (pRILES)})\} \text{ dans les cellules traitées TGF}\beta 1 + \text{touche}}{\{(RLU/mg \text{ protéines (pRILES/21.5pT)}) / (RLU/mg \text{ protéines (pRILES)})\} \text{ dans les cellules traitées TGF}\beta 1}$$

3.4.2 Analyse transcriptomique des cibles moléculaires du microARN-21-5p

Une analyse transcriptomique a été menée pour apprécier le niveau d'expression des ARNm cibles du microARN-21-5p dans les cellules HaCaT et NHEK en réponse au traitement par le TGF- β 1 et les extraits de plantes d'intérêt

Pour cela, les cellules ont été déposées en plaques de culture de 24 puits à raison de 2×10^5 cellules par puits dans du milieu DMEM-High glucose complet. Le lendemain, le milieu de culture a été renouvelé par du milieu DMEM-High glucose supplémenté par 0.5% de SVF

pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été traitées par 10 ng/mL de TGF- β 1 en présence ou absence des extraits de plantes dans le même milieu de culture pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂. Au terme de cette incubation, les ARN totaux présents dans les cellules ont été extraits en utilisant le kit RNeasy mini (Qiagen, Cat #74104) avec quelques modifications. Brièvement évoqué, les cellules ont été lysées à l'aide d'une solution de TRIzol™ (Life Technologies, Cat #15596018) contenant l'agent chaotropique isothiocyanate de guanidine pour dénaturer les RNases endogènes et du phénol acide pour extraire les protéines et l'ADN génomique, avant d'ajouter 1/10 (v/v) de chloroforme pour éliminer les traces de phénol aqueux. Après une étape de centrifugation à 11 400 rpm pendant 15 minutes à 4°C, la phase aqueuse supérieure contenant les ARN totaux a été soigneusement récupérée avant d'être mélangée à 1 volume d'éthanol à 70 %. Cette solution a ensuite été déposée sur une colonne fournie par le fabricant contenant un filtre en silice pour immobiliser les ARN totaux. Après des étapes de lavage, les ARNs totaux ont été élués par addition de 30 μ L d'eau stérile exempte de RNase. La concentration et la pureté de la solution d'ARN totaux obtenue a été estimée par dosage spectrophotométrique en mesurant l'absorbance à 260, 280 et 230 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Les échantillons dont les valeurs des rapports d'absorbance A260/A280 et A260/A230 étaient comprises, respectivement, entre 1.8 - 2 et proche de 2.2 ont été retenus pour la suite des études.

Les ARN totaux (100 ng) ont ensuite été rétro-transcrits en ADNc à l'aide d'amorces hexamères aléatoires en utilisant le kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Cat #1622). Les ADNc (100 ng) ont ensuite été amplifiés par qPCR en utilisant des amorces nucléotidiques spécifiques de chaque gène cible (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Liste des amorces spécifiques des cibles moléculaires du microARN-21-5p	
Gène	Séquences des amorces (5'-3')
CDC25A humain	Sens : TACATTCCCTACCTCAGAAGCTG Anti-sens : GCAGCCACGAGATACAGGTC
IGFBP3 humain	Sens : GCCAGCGCTACAAAGTTGAC Anti-sens : ATGTGTACACCCCTGGGACT
PDCD4 humain	Sens : TGA CTCTCTCTTTCCGGTGA Anti-sens : GTCCCGGGATGAGTTTTTCCT
GAPDH humain	Sens : CCAAAGGGTCATCATCTC Anti-sens : GGCCATCCACAGTCTTCT

Les couples d'amorces CDC25A, IGFBP3, PCDC4 et GAPDH ont été conçues à l'aide du logiciel Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) en tenant compte de plusieurs critères : la longueur des amorces de 18-24 nucléotides, la taille de l'amplicon de 150-200 pb, la température d'hybridation (T_m) proche de 55°C, la teneur en GC comprise entre 40 et 60 % et enfin l'absence de structures secondaires internes (épingles à cheveux) évaluée à l'aide du logiciel Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). L'ensemble de ces amorces ont été synthétisées par la société Eurogentec. L'expression relative de chaque gène d'intérêt a été calculée par la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant la GAPDH comme gène de ménage.

3.4.3 Immunoprécipitation des microARNs fonctionnels par capture de la protéine Ago2

Le dernier test de validation des touches identifiées au cours des étapes précédentes a consisté à quantifier directement par RT-qPCR la quantité de microARN-21-5p pris en charge par le complexe RISC dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 en présence ou absence des extraits de plantes d'intérêt. Pour cela, nous avons privilégié la méthode RIP (*RNA immunoprecipitation*), qui consiste à immunoprécipiter la protéine Ago2 des lysats totaux des cellules HaCaT, puis à quantifier l'abondance relative du microARN-21-5p complexé à cette protéine par RT-qPCR. Ce test ultime de validation fonctionnelle présente l'énorme avantage de s'assurer de la véracité des résultats du crible mais est en revanche long et fastidieux à mettre en place. Par conséquent, j'ai réalisé ce test uniquement avec notre « hit » d'intérêt la silymarine (SM, Sigma, Cat #S0292).

Le protocole expérimental a consisté à cultiver pendant 24 heures les cellules HaCaT en flacons de culture cellulaire de 75 cm² (3.5x10⁶ cellules par flacons ; n = 4 flacons par conditions) dans du milieu DMEM-High glucose complet. Le lendemain, les cellules ont été lavées avec du PBS avant de renouveler le milieu de culture par du milieu DMEM-High glucose supplémenté par 0.5 % de SVF à 37°C, 5% CO₂. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été traitées avec 10 ng/mL de TGF- β 1 en présence ou absence de 31 μ g/mL de SM dilué dans le même milieu de culture à 37°C, 5% CO₂. Des cellules non traitées ont été

utilisées comme contrôle négatif. Après 24 heures de traitement, les cellules ont été lysées dans un tampon de lyse constitué de 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES à pH 7.0, 1 mM DTT, et 0.5% de Triton X-100, supplémenté extemporanément par un mélange d'inhibiteurs de ribonucléases (Vanadyl ribonucleoside complexes solution, Sigma-Aldrich, Cat #94742) utilisé à la concentration finale de 2 mM, 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma, Cat #P-7626), 1% de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF, Sigma, Cat #P-7626) et 50 mM de fluorure de sodium (NaF, Sigma, Cat #S1504) utilisés respectivement comme inhibiteur des protéases à sérine et des sérine/thréonine phosphatases. Les microARNs fonctionnels, c'est-à-dire ceux incorporés dans le complexe RISC, ont été immunoprécipités pendant une nuit sur agitateur rotatif à 4°C à l'aide de 5 µg d'anticorps polyclonal anti-Ago2 (Abcam, Cat #ab32381) et à partir de 5 mg de lysat protéique en solution. Le contrôle négatif de cette expérience a été réalisé dans les mêmes conditions expérimentales mais en présence d'un anticorps de même isotype (IgG de lapin, Invitrogen, Cat #10500C) que l'anticorps anti-Ago2. Le lendemain, 80 µL de billes magnétiques couplées à la protéine G (Dynabeads, Invitrogen, Cat #10004D) ont été ajoutées et incubées à 4°C pendant 5 heures sous agitation pour capturer les complexes Ago2-microARNs. Au terme de l'incubation, les complexes immunoprécipités ont été extraits des lysats cellulaires à l'aide d'un aimant magnétique, avant d'être lavés quatre fois dans le tampon de lyse. Pour réduire les interactions non-spécifiques entre des protéines et les billes magnétiques, les billes ont été lavées à nouveau quatre fois en conditions dénaturantes dans du tampon de lyse contenant cette fois-ci 1 M d'urée. Une aliquote de billes a été prélevée et conservée à -80°C en vue d'une analyse par western blot, pour confirmer l'immunoprécipitation de la protéine Ago2. Les billes restantes ont été resuspendues dans 100 µL de tampon de lyse contenant 0.1 % de SDS et 30 µg de protéinase K puis incubées à 50°C pendant 30 minutes. Les microARNs immunoprécipités ont ensuite été extraits à l'aide d'une solution de phénol acide:chloroforme:AIA (125:24:1) à pH 4.5 (Invitrogen, Cat #AM9720) puis purifiés à l'aide du kit mirVanaTM miRNA Isolation tel que décrit précédemment dans le paragraphe 3.2.3.2. L'éluat contenant les microARNs a été conservé à -80°C en vue de la quantification des microARNs par RT-qPCR tel que décrit dans le paragraphe 3.2.3.2.

3.4.4 Détermination du mode de régulation génique du microARN-21-5p en réponse aux extraits de plantes

L'effet de la silymarine (SM) sur la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'expression du microARN-21 a été étudié dans les cellules HaCaT traitées par 10 ng/mL de TGF- β 1 en présence ou absence de 31 μ g/mL de SM. Des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif pour cette expérience. L'expression du transcrit primaire du microARN-21 (pri-miR-21) et précurseur (pré-miR-21) a été quantifiée par RT-qPCR comme décrit dans le paragraphe 3.4.2. L'expression de la forme mature du microARN-21-5p (miR-21-5p) a elle été quantifiée par RT-qPCR comme décrit précédemment dans le paragraphe 3.2.3.2.

Afin de pouvoir discriminer le pri-miR-21 du pré-miR-21, des amorces ont été définies de manière à ce qu'elles soient chacune spécifiques de leurs cibles respectives (**Tableau 12**). Les amorces spécifiques du microARN-21-5p mature ont été obtenues auprès de la société Applied Biosystems (TaqMan microRNA Assays, Cat #4427975, Assay ID #000397).

Tableau 12 : Liste des amorces spécifiques du pri-miR-21 et pré-miR-21	
	Séquences des amorces (5'-3')
pri-miR-21	Sens : TTTTGTGTTTGCTTGGGAGGA Anti-sens : AGCAGACAGTCAGGCAGGAT
pré-miR-21	Sens : TGTCGGGTAGCTTATCAGAC Anti-sens : TGTCAGACAGCCCATCGACT

La stratégie utilisée pour la conception des amorces est détaillée dans la **Figure 42**.

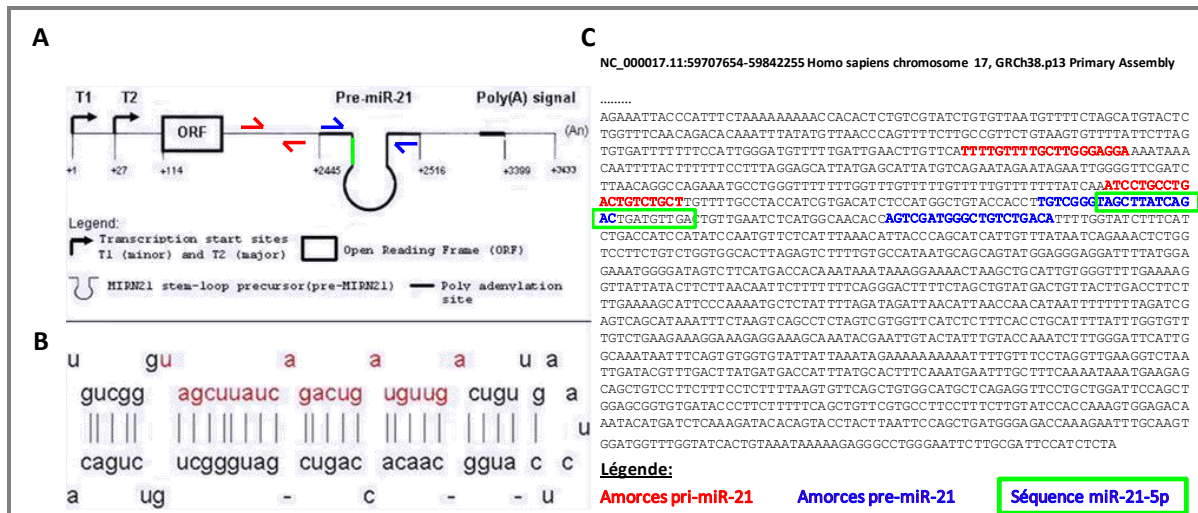


Figure 42 : Représentation schématique de la stratégie utilisée pour concevoir les amorces de qPCR spécifique du pri-miR-21, pré-miR-21 et miR-21-5p mature.

(A) Caractérisation génomique du microARN-21. (B) Structure tige-boucle du microARN-21. (C) Localisation des séquences complémentaires aux couples d'amorces choisis pour amplifier le pri-miR-21, le pré-miR-21 et le miR-21-5p mature. Adaptée de http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MIR21.html et de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000017.11?report=fasta&from=59707654&to=5984225.

3.5 Analyse transcriptomique à haut débit RNA-seq

3.5.1 Présentation générale

Pour avoir une idée précise des gènes différentiellement exprimés dans les cellules HaCaT co-traitées par le TGF- β 1 et la SM par rapport aux cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1, nous avons privilégié une analyse du transcriptome global par séquençage à haut débit (*RNA sequencing*, RNA-seq). Cette approche présente de nombreux avantages. Premièrement, contrairement aux puces à ADN (*microarrays*) qui permettent de quantifier l'expression de gènes prédéfinis, l'approche RNA-seq permet de quantifier la totalité des transcrits contenus dans les cellules sans connaissance préalable de leur séquence. Deuxièmement, l'approche RNA-seq est beaucoup plus résolutive que celle des puces à ADN. En déterminant avec précision la séquence de chaque transcrit, au nucléotide près, cet outil permet l'identification de nouveaux transcrits, des variants d'épissage, des mutations ponctuelles dans la région codante des gènes ou encore des fusions de gènes.

Troisièmement, l'approche RNA-seq autorise le multiplexage de plusieurs échantillons en une seule analyse par l'ajout de code-barres, réduisant ainsi les coûts et le temps d'analyse.

Pour réaliser le RNA-seq, nous avons fait appel à la plateforme de séquençage à haut débit de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) située à Gif-sur-Yvette sur le campus du CNRS. Pour cela, j'ai préalablement extrait les ARN totaux à partir des cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 en présence ou absence de SM, avant de les envoyer à la plateforme de l'I2BC. Le personnel de la plateforme I2BC a ensuite procédé à la construction des bibliothèques, au séquençage et à l'analyse de l'expression différentielle des gènes (alignement, assemblage et quantification) à partir des données brutes du RNA-seq. J'ai ensuite réalisé des analyses d'enrichissement d'annotations en utilisant des bases de données bioinformatiques. Pour cela, j'ai suivi une formation intitulée « Initiation au traitement des données de génomique obtenues par séquençage à haut débit » dispensée par l'Institut Français de Bioinformatique (IFB) et l'Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé (AVIESAN). Cette formation intensive s'est tenue à la Station Biologique de Roscoff au cours de la période du 03 au 08 Novembre 2019. Cette formation m'a permis de me familiariser avec l'utilisation de commandes en ligne (terminal Linux) et du langage R pour pouvoir traiter efficacement mes données RNA-seq. Ce travail d'analyse long et fastidieux m'a ainsi permis d'avoir une idée prédictive de l'effet global de la SM dans les cellules HaCaT traitées au TGF- β 1 par rapport au groupe contrôle. Cette étape a été une étape décisive dans le déroulement de mon doctorat notamment pour orienter les études mécanistiques de l'effet de SM dans le comportement des cellules HaCaT.

Les principales étapes du RNA-seq ainsi que les analyses bioinformatiques que j'ai réalisées sont présentées dans les paragraphes suivants.

3.5.2 Préparation des échantillons

Les ARN totaux des cellules HaCaT traitées par 10 ng/mL de TGF- β 1 en présence ou absence de 31 μ g/mL de SM dans du milieu DMEM-High glucose supplémenté par 0.5% de SVF ont été extraits à l'aide du kit RNeasy mini (Qiagen, Cat #74104) comme décrit dans le paragraphe 3.4.2. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triplicata biologique ($n =$

3 par condition), soit 6 échantillons au total. La concentration et la pureté des ARN totaux extraits ont été déterminées par dosage spectrophotométrique (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) en mesurant l'absorbance des échantillons à 260 nm, 280 nm et 230 nm. La quantité et la qualité des ARN totaux extraits ont été évaluées avec plus de précision par électrophorèse capillaire en microfluidique à l'aide de l'appareil Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Ce système, couplé à un logiciel d'analyse, permet d'attribuer à chacun des échantillons une valeur de RIN (*RNA Integrity Number*) déterminée à partir du profil électrophorétique des populations d'ARN déposées sur gel d'agarose. Le logiciel d'analyse d'image permet de générer des rapports d'aires de surface correspondant aux bandes des ARN ribosomiques 28S et 18S. Plus la valeur de RIN est élevée (sur une échelle de 0 à 10), plus l'intégrité de l'échantillon est bonne. Dans notre étude, seuls les échantillons dont la valeur de RIN était supérieure ou égale à 8 ont été envoyés à la plateforme de séquençage.

3.5.3 Préparation des librairies d'ADNc db à partir des ARN totaux

Les librairies d'ADNc db compatibles avec la technologie Illumina® ont été préparées par la plateforme de séquençage à haut débit de l'I2BC à partir de 0.5 µg d'ARN totaux par échantillon en utilisant le kit TruSeq® Stranded mRNA Library Prep (Illumina®). Les principales étapes nécessaires à la construction des librairies sont résumées dans la **Figure 43**.

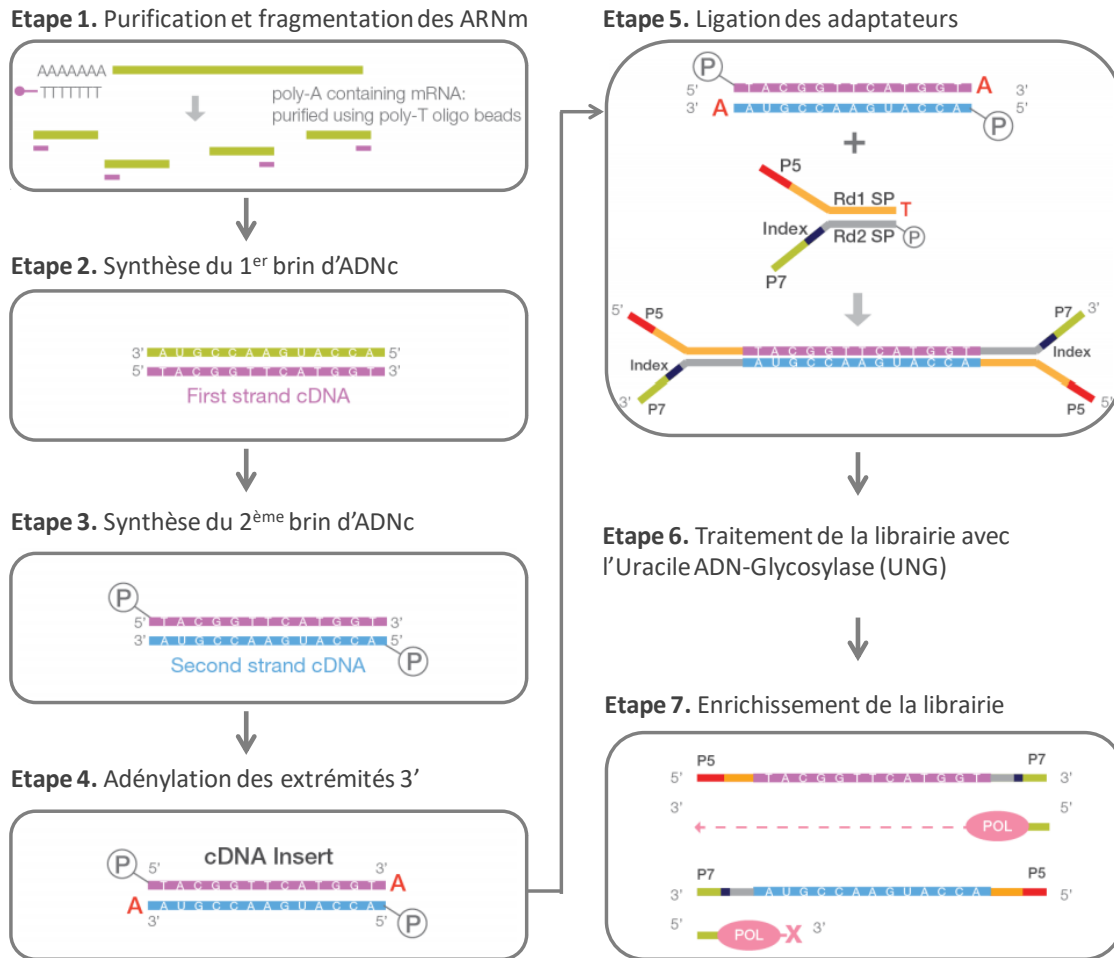


Figure 43 : Etapes nécessaires pour la construction des librairies d'ADNc double brin. (Adapté du TruSeq Stranded mRNA reference guide d'Illumina® : document # 1000000040498 v00. Adaptée de https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseq-stranded-mrna-workflow/truseq-stranded-mrna-workflow-reference-1000000040498-00.pdf

Brièvement évoqué, la première étape a consisté à purifier les ARNm polyadénylés des ARN totaux à l'aide de billes magnétiques couplées de manière covalente à des oligonucléotides constitués de désoxythymidines (oligo-dT). Les ARNm ont ensuite été fragmenté à haute température (94°C) en présence de cations divalents (tel que le Mg^{2+}), avant d'être rétro-transcrits en ADNc grâce à une transcriptase inverse en présence d'amorces aléatoires. Les brins d'ARNm dans les hybrides ARNm/ADNc ont été partiellement dégradés par la RNase H. Les fragments d'ARNm restant hybridés à l'ADNc ont servi d'amorces à l'ADN polymérase I pour synthétiser le second brin d'ADNc en utilisant le premier brin d'ADNc comme matrice. L'activité exonucléase 5'-3' de l'ADN polymérase I a permis la dégradation des amorces d'ARNm, tandis que son activité polymérase 5-3' a

permis de remplacer le brin d'ARNm d'origine par des déoxyribonucléotides. Des déoxyuridines triphosphates (dUTP) ont été incorporés à la place des déoxythymidines triphosphates (dTTP) afin de bloquer la synthèse du second brin d'ADNc lors de l'étape ultérieure d'amplification par PCR. Au terme de la réplication, les fragments d'ADNc nouvellement synthétisés par l'ADN polymérase I ont été ligués par une ADN ligase. Les extrémités cohésives des molécules d'ADNc db ont été rendues franches à l'aide d'une ADN polymérase dotée d'une activité exonucléase 5'-3' et d'une activité polymérase 5'-3'. Les extrémités 3' des ADNc db ont ensuite été adénylées pour empêcher la concatémérisation des différentes molécules d'ADNc db et permettre la ligation d'adaptateurs possédant une extrémité 3' protubérante flanquée d'une thymidine. La forme particulière des adaptateurs en Y est optimisée pour minimiser leur dimérisation. Ces adaptateurs contiennent (1) des séquences (Rd1 SP et Rd2 SP) de liaison spécifique aux amorces de séquençage, (2) séquences « code-barres » (Index) d'une longueur de 8 à 10 bases, uniques pour chaque échantillon, permettant de multiplexer plusieurs échantillons dans un seul passage (*run*) de séquençage et (3) des séquences (P5 et P7) complémentaires aux oligonucléotides recouvrant la surface de la lame de verre (*flow cell*) pour permettre leur immobilisation.

Les librairies d'ADNc db ont ensuite été traitées par l'enzyme Uracil-ADN-glycosylase (UNG) avant d'être enrichies par PCR. En hydrolysant la liaison N-glycosylique entre l'uracile et le désoxyribose présent dans l'ADN, l'UNG empêche l'amplification des seconds brins d'ADNc. Ainsi, seuls les premiers brins d'ADNc portant des adaptateurs à chaque extrémité ont été pré-amplifiés par 15 cycles de PCR à l'aide d'un mélange réactionnel contenant un cocktail d'amorces spécifiques des adaptateurs. Après une étape de purification, la qualité des librairies finales d'ADNc db a été contrôlée avec l'appareil Bioanalyzer 2100. La taille attendue des produits de PCR a été de 260 pb environ. La **Figure 44** représente un exemple d'ADNc db enrichi par PCR.

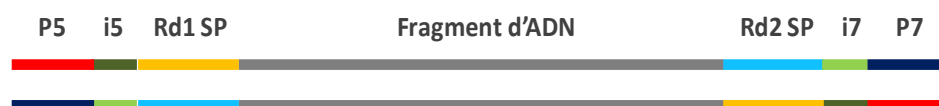


Figure 44 : Schéma d'un ADNc db obtenu par enrichissement par PCR (Illumina®).

Chaque fragment d'ADN contient à ses extrémités des séquences complémentaires aux oligonucléotides fixés sur la *flow cell* (P5 et P7), des séquences index (i5 et i7) uniques à chaque échantillon et permettant le multiplexage de plusieurs échantillons dans un seul *run* de séquençage, et des sites d'hybridation pour les amorces de séquençage (Rd1 SP et Rd2 SP). Adaptée de l'Indexed Sequencing Overview Guide d'Illumina® : Document # 15057455 v06).

Les librairies d'ADNc db obtenues ont ensuite été dénaturées pour générer des librairies d'ADNc simple brin (sb). Ces dernières ont été déposées sur la *flow cell* afin qu'elles s'hybrident par complémentarité de leurs séquences adaptatrices P5 et P7 avec les oligonucléotides greffés de manière covalente à la *flow cell*. Une fois immobilisées sur ce support solide, les librairies d'ADNc sb ont subi une étape d'amplification clonale avant d'être séquencées par synthèse comme décrit dans le paragraphe suivant.

3.5.4 Amplification clonale sur la flow cell

La technologie Illumina® repose sur une étape d'amplification clonale des librairies d'ADNc sb immobilisées sur la *flow cell* par PCR en pont (*bridge PCR*). Cette étape d'amplification clonale est nécessaire à l'obtention d'un signal suffisamment fort au moment de l'étape de séquençage par synthèse des fragments d'ADN amplifiés (**Figure 45**).

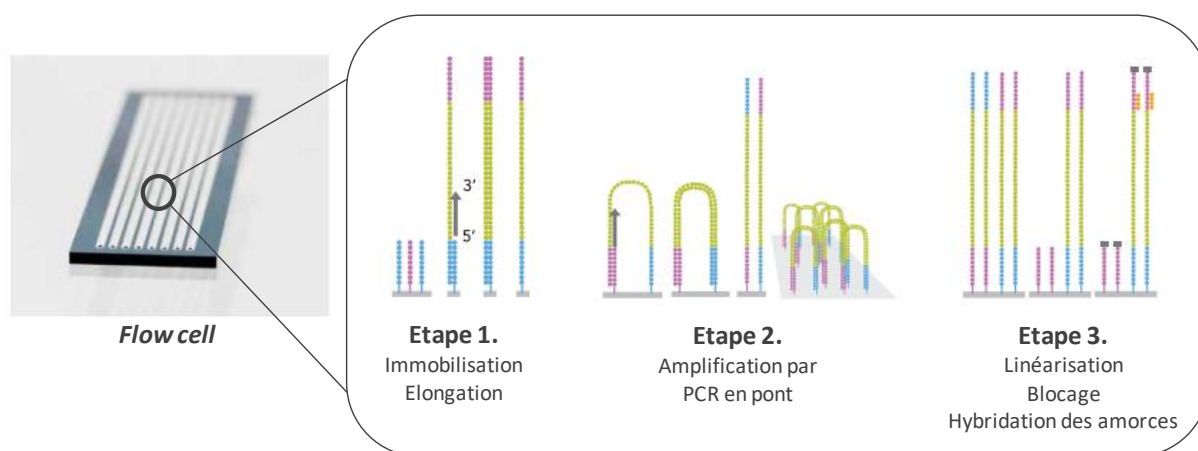


Figure 45 : Principe de l'amplification clonale par pont permettant la formation de *clusters* sur la *flow cell* (Illumina®).

La *flow cell* est constituée de 8 lignes permettant l'amplification de plusieurs librairies d'ADNc db en même temps. La surface en verre de la *flow cell* est recouverte de deux types d'oligonucléotides (représentés en bleu et violet sur le schéma) complémentaires aux séquences adaptatrices P5 et P7 respectivement situées aux extrémités 5' et 3' des librairies d'ADN db. Après une étape de dénaturation des librairies d'ADNc db, les librairies d'ADNc sb (représentée en vert sur le schéma) se sont hybridées de manière aléatoire sur la *flow cell* par complémentarité des séquences adaptatrices P5 et P7 avec les oligonucléotides immobilisés sur la *flow cell*. Les brins complémentaires des librairies d'ADNc sb sont synthétisés directement sur la *flow cell* à l'aide d'une ADN polymérase haute fidélité puis les brins matrices d'origine (correspondant aux librairies d'ADNc sb) sont dissociés des brins néo-synthétisés par dénaturation. Les brins d'ADN nouvellement synthétisés se sont hybridés à leur tour à des oligonucléotides adjacents fixés sur la *flow cell* par l'intermédiaire de leur séquence adaptatrice libre, formant des ponts. Des brins d'ADN complémentaire sont de nouveau synthétisés par l'ADN polymérase haute fidélité générant des ADNdb en pont. La dénaturation des ADNdb sépare les deux brins d'ADN, qui sont restés fixés côte à côte sur la *flow cell*. L'amplification par pont est répétée un grand nombre de fois afin d'aboutir à la formation de *clusters*. Chaque *cluster* contient des milliers de molécules d'ADNsb de séquence identique aux librairies d'ADNc sb d'origine ainsi que des molécules d'ADNsb de séquence complémentaire aux librairies d'ADNc sb d'origine. Pour permettre un séquençage unidirectionnel, les brins complémentaires aux librairies d'ADNc sb sont éliminés par clivage chimique d'un nucléotide modifié dans un type d'oligonucléotide fixé sur la *flow cell*. De plus, les extrémités 3' des brins d'ADN et des oligonucléotides liés à la *flow cell* sont bloquées pour empêcher toute interférence avec la réaction de séquençage. Des amorces de séquençage (représentées en orange sur le schéma) se sont hybridées par complémentarité des bases à tous les brins d'ADN recouvrant la *flow cell* afin d'initier l'étape de séquençage. Adaptée de https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_cbol.pdf.

Dans un premier temps, une ADN polymérase haute-fidélité a synthétisé les brins complémentaires aux bibliothèques d'ADNc sb. Après une étape de dénaturation, les bibliothèques d'ADNc sb ont été dissociées des brins complémentaires néo-synthétisés et éliminées par lavage. Les brins complémentaires néo-synthétisés, restés fixés à la *flow cell*, ont ensuite été amplifiés par PCR en pont. Durant ce processus, la séquence adaptatrice libre de chaque brin complémentaire néo-synthétisé s'est hybridée à un oligonucléotide complémentaire immobilisé à proximité sur la *flow cell* pour former un pont d'amplification. L'ADN polymérase haute-fidélité a de nouveau synthétisé un brin d'ADN complémentaire, identique au brin matrice d'origine. L'ADNdb obtenu a ensuite été dénaturé afin de séparer les deux brins d'ADN et d'obtenir deux molécules d'ADN monocaténares ancrées, côte à côte, sur la *flow cell*. Le cycle d'amplification par PCR en pont a été répété plusieurs fois jusqu'à la formation de plusieurs millions de groupes (*clusters*) de molécules d'ADN sb contenant des brins d'ADN identiques aux bibliothèques d'ADNc sb d'origine et leur brins complémentaires.

A la dernière étape du cycle d'amplification clonale, un clivage chimique d'un nucléotide modifié dans un des deux types d'oligonucléotides attachés à la *flow cell* a permis d'éliminer les brins complémentaires aux bibliothèques d'ADNc sb, générant des *clusters* clonaux individualisés et de même séquence. Chaque *cluster* contient environ 2 000 molécules d'ADNsb identiques sur une surface de moins de $1 \mu\text{m}^2$. Les extrémités 3' des brins d'ADN et des oligonucléotides liés à la *flow cell* ont ensuite été bloquées pour empêcher toute interférence avec la réaction de séquençage.

3.5.5 Séquençage des bibliothèques par synthèse

Le séquençage par synthèse des millions de *clusters* d'ADNsb a été réalisé directement sur la *flow cell* grâce au séquenceur NextSeq 500 (Illumina®). La technologie de séquençage par synthèse développée par la société Illumina® s'inspire de la méthode de séquençage de Sanger, dite par terminaison de chaîne (*cyclic reversible termination*, CRT), et intègre des outils informatiques de pointe pour permettre l'acquisition, le traitement et l'analyse des images (**Figure 46**).

Son principe repose sur l'utilisation de quatre nucléotides modifiés dits « terminateurs réversibles ». Ces nucléotides sont marqués par un fluorophore spécifique et sont modifiés chimiquement par addition d'un groupe inhibiteur de terminaison clivable. Cette modification empêche l'incorporation d'un nucléotide en aval. Ainsi, à chaque cycle de séquençage, une polymérase incorpore séquentiellement et dans l'ordre un nucléotide modifié complémentaire au brin d'ADN immobilisé sur la *flow cell*. Dans chaque cluster, l'incorporation de ces nucléotides terminateurs génère un signal lumineux qui est détecté en temps réel par un capteur photographique CCD de l'automate. Une image digitalisée de la *flow cell* est alors enregistrée. A la fin de chaque cycle, la surface de la *flow cell* est lavée pour éliminer le mélange réactionnel contenant, entre autres, les nucléotides non incorporés en excès. Le fluorophore et le groupement de protection du nucléotide sont ensuite détruits par photo-clivage par irradiation aux UV. Cette étape critique a pour objectif de restaurer le groupement fonctionnel du nucléotide incorporé et permettre ainsi à l'ADN polymérase d'ajouter le nucléotide suivant. Les cycles de séquençage sont alors répétés afin de générer des séries d'« images » permettant de déterminer la séquence nucléotidique en cours de synthèse, et ceci jusqu'au séquençage de la totalité du brin d'ADN.

Une fois le séquençage terminé, les fragments d'ADN nouvellement synthétisés sont éliminés. Le processus d'amplification clonale est répété afin de générer et séquencer les brins d'ADNc des brins matrice d'origine, c'est-à-dire des librairies d'ADNc sb. Ce type de séquençage, dit « *paired-end* », permet de séquencer chaque librairie d'ADNc sb à partir de leur extrémité 3' et 5'. L'intégralité des signaux de fluorescence capturés par la caméra sont convertis en séquences nucléotidiques (*reads*) au format FASTQ, grâce à des programmes informatiques.

Puisque la longueur d'un *read* est préalablement définie, le séquençage *paired-end* permet un alignement plus rigoureux des *reads* sur le génome humain, notamment dans les régions génomiques répétées. Cette approche permet également l'identification de variants d'épissage alternatif lors des analyses bioinformatiques ultérieures.

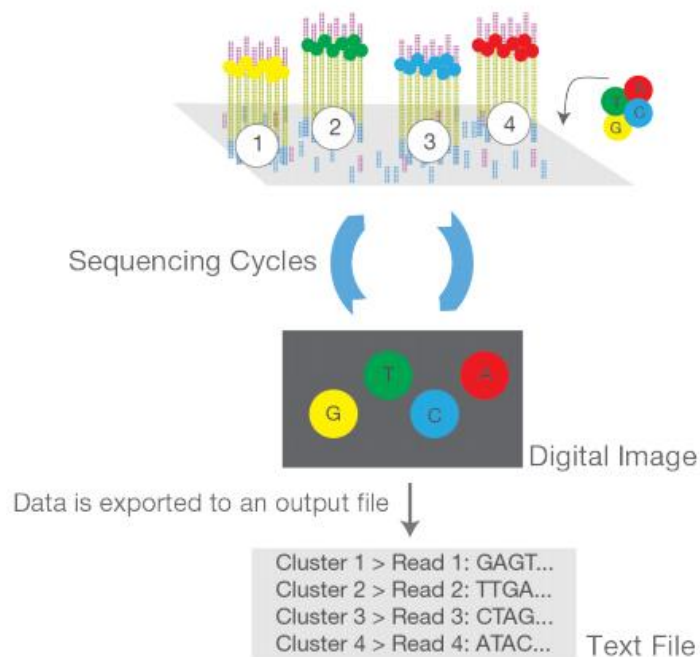
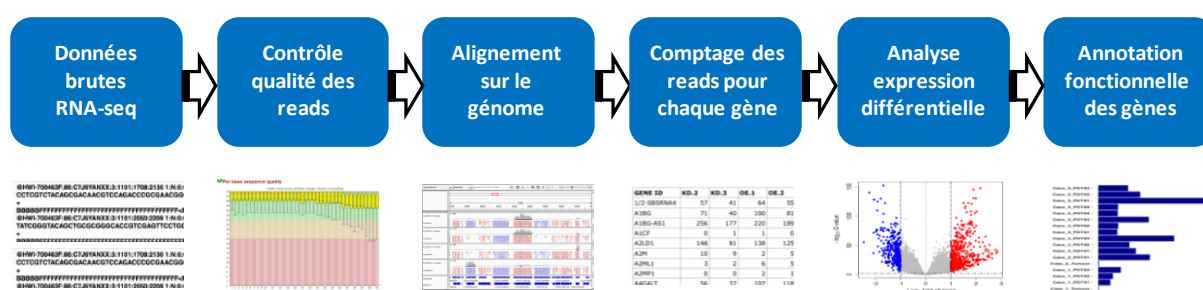


Figure 46 : Principe du séquençage de l'ADN par synthèse développé par la société Illumina®.

Un mélange réactionnel de séquençage contenant quatre nucléotides terminateurs réversibles marqués par un fluorochrome spécifique de chacun d'entre eux est injecté directement sur la *flow cell*. A chaque cycle de séquençage, un nucléotide complémentaire d'un brin d'ADN immobilisé sur la *flow cell* est incorporé dans chaque cluster, générant un signal de fluorescence. Ce signal est mesuré en temps réel par le capteur photographique CCD du séquenceur et une image digitalisée de la *flow cell* est enregistrée. La longueur d'onde d'émission du fluorophore est utilisée pour identifier le nucléotide ayant été incorporé dans le cluster. A la fin de chaque cycle, le groupement de protection du nucléotide incorporé est éliminé par photoclivage utilisant les UV, restaurant son groupement fonctionnel et permettant à l'ADN polymérase d'incorporer le prochain nucléotide. Le cycle est répété « n » fois jusqu'à ce que la totalité du brin d'ADN soit séquençé, générant ainsi des séquences composées de « n » nucléotides. Les données brutes de séquençage sont finalement exportées en fichier TXT pour être analysées. Adaptée de https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf

3.6 Analyse bioinformatique des données brutes du RNA-seq

L'interprétation des données transcriptomiques issues du RNA-seq a consisté à réaliser dans un premier temps une analyse de l'expression différentielle pour comparer les profils d'expression de gènes entre les deux conditions expérimentales : les cellules co-traitées par 10 ng/mL de TGF- β 1 et 31 μ g/mL de SM et les cellules HaCaT traitées par 10 ng/mL de TGF- β 1 seul. Dans un deuxième temps, l'approche a consisté à effectuer une annotation fonctionnelle des gènes préalablement identifiés pour prédire leurs fonctions biologiques. Le schéma général de l'analyse bioinformatique est représenté ci-dessous.



3.6.1 Des données brutes de séquençage à haut débit à l'analyse de l'expression différentielle

La qualité des *reads* obtenus en sortie de séquençage a été vérifiée par la plateforme de séquençage de l'I2BC à l'aide du programme FastQC. Les nucléotides présentant une faible qualité de lecture (score Phred ≤ 30) ont été éliminés de même que les adaptateurs de séquençage (étape de « *trimming* ») avec le logiciel Cutadapt (v1.15).

Les *reads* trimmés ont ensuite été alignés sur le génome humain de référence (hg19 de l'Université de Californie à Santa Cruz, UCSC) en tenant compte de l'épissage alternatif et en utilisant le programme TopHat2 (v2.1.1). Le nombre de *reads* trimmés alignés sur chaque gène a été comptabilisé avec le programme FeatureCounts (v1.5.2).

La normalisation des données de comptage et la recherche de gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions expérimentales (TGF- β 1 + SM *versus*

TGF- β 1) a été réalisé à l'aide du logiciel libre d'analyse statistique R créé par (Ihaka and Gentleman, 1996) et en utilisant la librairie DESeq2.

Au final, l'analyse de l'expression différentielle, basée sur une modélisation de la distribution des gènes par une loi Binomiale Négative, a permis de comparer les niveaux d'expression génique entre les deux conditions expérimentales par la méthode du *Fold Change*. Ainsi, un gène a été considéré comme étant statistiquement différentiellement exprimé lorsque son niveau d'expression variait par plus d'un facteur (positif ou négatif) de 2 (équivalent à un $\log_2\text{FoldChange} > 1$ ou < -1) entre les deux conditions et avec une p-value ajustée < 0.01 .

3.6.2 De l'analyse d'expression différentielle aux analyses d'enrichissement d'annotations

Les gènes présentant des profils d'expression différentielle similaires ont été regroupés par clusterisation hiérarchique. La signification biologique de ces métadonnées a été ensuite explorée au moyen de la méthode d'annotation fonctionnelle « Gene Ontology » (GO) (<http://geneontology.org/>) décrite par les chercheurs Michael Ashburner et Suzanna Lewis en 1998.

L'ontologie GO peut être représentée comme un graphe orienté acyclique constitué d'un ensemble de termes et de concepts qui sont hiérarchisés selon trois domaines de connaissances complémentaires :

- **Processus biologique** (*Biological process*, BP) : décrit le processus biologique général dans lequel intervient le produit de gène (exemple : cycle cellulaire).
- **Fonction moléculaire** (*Molecular function*, MF) : décrit l'activité individuelle accomplie par le produit de gène (exemple : activité ATPase).
- **Composante cellulaire** (*Cellular component*, CC) : décrit la structure, localisation sub-cellulaire et le complexe macromoléculaire dans lequel se situe le produit de gène (exemple : noyau, ribosome, télomères...).

Plusieurs outils bioinformatiques existent pour annoter les gènes différentiellement exprimés avec l'ontologie GO et réaliser les analyses d'enrichissement des termes GO. Certains outils exigent le téléchargement d'une application ou l'installation d'un environnement local, tandis que d'autres sont en accès libre sur le web (GORilla, g:PROFILER, PANTHER, DAVID, GSEA, etc.). Ces outils d'analyse diffèrent par les algorithmes utilisés pour traiter les données, les tests statistiques effectués et la fréquence à laquelle les bases de données GO sous-jacentes sont mises à jour.

Pour ma part, j'ai utilisé le logiciel R ainsi que les outils DAVID et GSEA pour traiter les données RNA-seq à partir du fichier d'analyse différentielle au format TXT, généré par la plateforme de séquençage I2BC.

3.6.2.1 Analyse sur R

Dans un premier temps, j'ai utilisé le logiciel R hébergé sur le Core Cluster de l'Institut Français de Bioinformatique (IFB, <https://rstudio.cluster.france-bioinformatique.fr>) avec son interface utilisateur graphique RStudio afin de manipuler les données RNA-seq (Figure 47).

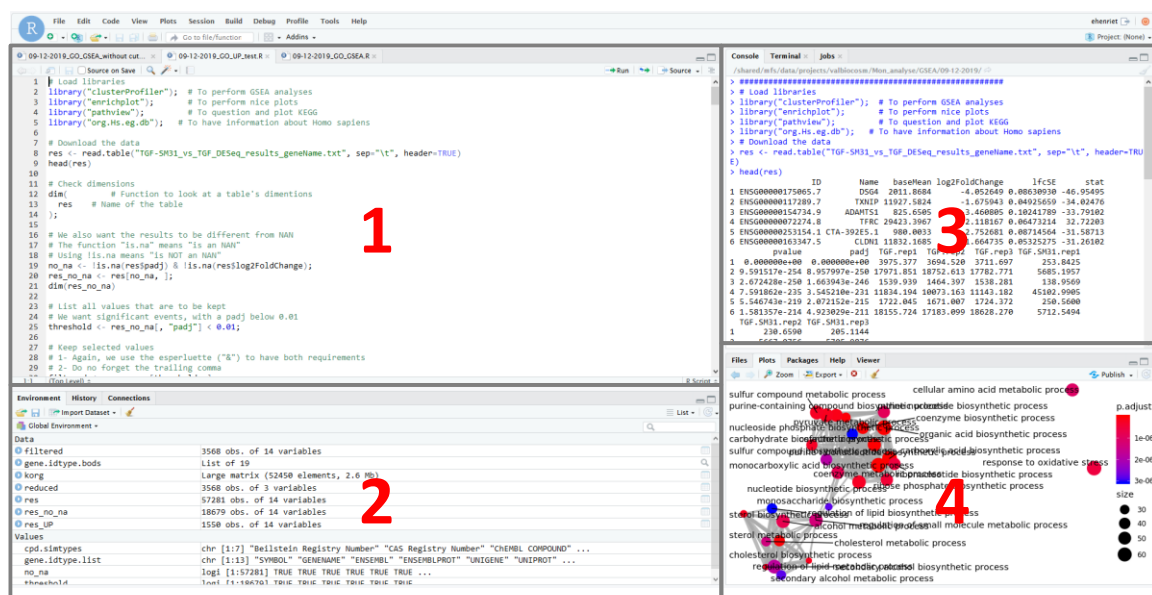


Figure 47 : Représentation de l'interface graphique RStudio.

La fenêtre de RStudio est divisée en quatre sous-fenêtres. La première, en haut à gauche, correspond à un éditeur de texte où sont écrites les lignes de commandes. La seconde, en bas à gauche, est un espace de travail, d'historique et d'importation. La troisième, en haut à droite, représente la console, où sont réalisées par défaut les entrées des commandes et sorties de résultats en mode texte. La quatrième, en bas à droite, est un espace de visualisations des objets créés et d'aide.

Sur R, j'ai installé les packages « clusterProfiler » et « org.Hs.eg.db » qui sont particulièrement bien adaptés pour 1) annoter des gènes différentiellement exprimés avec l'ontologie GO et 2) pour réaliser un enrichissement des termes GO de l'ontologie BP avec la fonction `enrichGO`. J'ai ensuite écrit des scripts, c'est-à-dire à une suite d'instructions codées dans un langage de programmation, afin d'exécuter les commandes par le logiciel R (**Figure 48**). Ces commandes m'ont notamment permis 1) d'importer la liste de gènes différentiellement exprimés au format TXT, 2) de filtrer précisément les gènes statistiquement sur- et sous-exprimés en appliquant des seuils (*thresholds*) de $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ et p-valeur ajustée, 3) de convertir les identifiants Ensembl en symboles de gènes pour annoter correctement les gènes par des termes GO et enfin 4) de réaliser l'analyse d'enrichissement des annotations fonctionnelles des gènes basée sur un test hypergéométrique (Boyle et al., 2004).

L'analyse d'enrichissement a pour but de calculer la probabilité que la totalité ou une partie des gènes annotés dans les bases de données avec un terme GO spécifique de l'ontologie BP soit représentée dans ma liste de gènes différentiellement exprimés.

Les résultats de l'analyse ont été affichés dans une fenêtre sous différents formats tels que le diagramme en barres (*barplots*) ou encore la cartographie d'enrichissement (*emapplots*). La sur-représentation d'une annotation fonctionnelle, autrement dit l'enrichissement, se caractérise par un score d'enrichissement. Ce score correspond au ratio entre le nombre de gènes différentiellement exprimés annotés par un terme GO spécifique de l'ontologie BP (« *number of candidate genes* ») et le nombre total de gènes connus dans le génome humain comme étant annotés par ce même terme (« *number of background genes* »). Par exemple, dans une représentation en cartographie d'enrichissement, chaque terme GO est schématisé par un nœud. La taille du nœud est directement corrélée avec le nombre de gènes différentiellement exprimés annotés pour ce même terme. La spécificité d'un terme GO de l'ontologie BP pour un groupe de gènes est, quant à elle, évaluée au moyen de tests statistiques et appréciée au moyen d'une p-valeur ajustée. La p-value ajustée représente la probabilité que le terme GO ait été affecté à ces gènes par hasard. Les termes GO possédant une p-value ajustée < 0.05 sont considérés comme significativement enrichis. Ainsi, dans la représentation en cartographie d'enrichissement, la couleur des nœuds indique le niveau de significativité des résultats. Plus l'intensité de couleur est rouge et plus l'annotation fonctionnelle est robuste.



Figure 48 : Exemples de scripts écrits avec le logiciel R

3.6.2.2 Analyse sous DAVID et GSEA

Pour m'assurer de la spécificité des résultats obtenus sur R, j'ai ensuite effectué une analyse d'enrichissement des termes GO avec des outils bioinformatiques disponibles en libre accès sur internet :

- Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) (Huang et al., 2009)
- Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) (Subramanian et al., 2005)

Contrairement aux autres approches d'analyse d'enrichissement qui se focalisent sur des gènes particulièrement sur- et/ou sous-exprimés, l'outil GSEA prend généralement en considération l'intégralité de la liste de gènes provenant du RNA-seq, quelle que soit leur p-valeur ajustée et leur niveau d'expression. Cette approche est justifiée par le fait qu'il est probable que de nombreuses différences phénotypiques observées entre deux échantillons résultent de faibles variations d'expression génique. De plus, les processus biologiques sont souvent régulés par plusieurs gènes. Une hausse de 20 % de l'expression de l'ensemble des gènes codant des protéines impliquées dans une voie métabolique d'intérêt peut avoir des conséquences beaucoup plus significatives sur cette voie métabolique qu'une augmentation d'environ 20 fois de l'expression d'un seul gène (Subramanian et al., 2005).

La **Figure 49** représente une vue d'ensemble de la méthode GSEA.

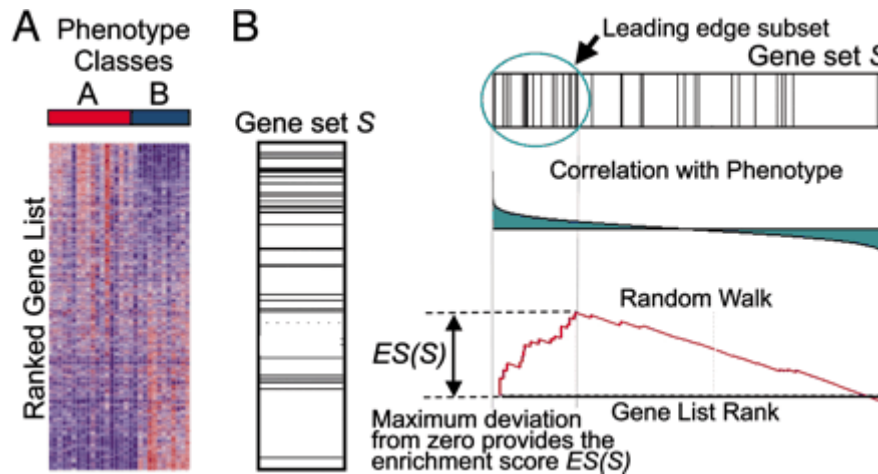


Figure 49 : Vue d'ensemble de la méthode de calcul GSEA.

L'analyse GSEA utilise la base de données des signatures moléculaires (MSigDB) qui répertorie des ensembles de gènes impliqués dans des voies de signalisation. L'outil GSEA permet de déterminer si un ensemble de gènes associés à une même fonction biologique (*Gene Set S*) est distribué de manière aléatoire dans une liste prédéfinie de gènes différentiellement exprimés (*Ranked Gene List, L*) ou bien s'il est surreprésenté en haut ou en bas de cette liste. Pour cela, la première étape de l'analyse consiste à classer les gènes de la liste L en fonction de leur expression différentielle entre deux échantillons (A et B). Un algorithme calcule ensuite un score d'enrichissement (ES), qui correspond à une statistique pondérée de type Kolmogorov-Smirnov, et reflète le degré de surreprésentation d'un ensemble de gènes S aux extrêmes (haut et bas) de la liste L . Le score ES est calculé en parcourant la liste L (*random walk*) : la valeur statistique cumulative augmente lorsqu'un gène de la liste L se trouve être présent dans l'ensemble de gènes S et à l'inverse diminue lorsqu'il n'y apparaît pas. La magnitude de l'incrément dépend de la corrélation du gène avec le phénotype. Le score ES correspond à l'écart maximal par rapport au 0 dans la marche aléatoire et associé à une valeur statistique, chiffrée en p-valeur ou FDR. Un score ES positif indique que l'ensemble de gènes S associés à un processus biologique donné est enrichi dans la partie supérieure de la liste L (gènes surexprimés dans l'échantillon A par rapport à l'échantillon B, par exemple) ; un score ES négatif indique que l'ensemble de gènes S associés à ce même processus biologique est enrichi dans la partie inférieure de la liste L (gènes sous-exprimés dans l'échantillon A par rapport à l'échantillon B, par exemple). Adaptée de (Subramanian et al., 2005).

3.7 Etudes mécanistiques et fonctionnelles

3.7.1 Immunodosage de la cytokine pro-inflammatoire IL-6

La quantité d'IL-6 sécrétée par les cellules a été dosée par la technique immuno-enzymatique sur support solide (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA). Ce test repose sur l'utilisation de deux anticorps qui réagissent spécifiquement contre des épitopes différents de l'IL-6. Le premier anticorps dit de « capture » est immobilisé sur un support solide, ici une plaque de 96 puits, pour lier l'IL-6 présente dans les échantillons à doser. Après une étape de lavage pour éliminer les interactions non spécifiques, l'anticorps de « détection » couplé à la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*, HRP) a été ajouté pour révéler les complexes immuns préalablement formés. L'IL-6 est ainsi prise en « sandwich » entre les deux anticorps. L'addition du substrat de l'enzyme HRP permet la formation d'un composé soluble et coloré pouvant être quantifié par spectrophotométrie. Les valeurs d'absorbance sont directement proportionnelles à la quantité d'IL-6 présente dans les échantillons.

Le protocole expérimental a consisté à déposer les cellules HaCaT en microplaques de culture de 96 puits à raison de 2.5×10^4 cellules par puits et à les incuber pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂. Les cellules ont ensuite été traitées par du TNF- α (1 ng/mL) en présence ou absence de SM (15 et 31 μ g/mL) dans du milieu DMEM-High glucose supplémenté par 0.5 % de SVF pendant 24 heures. Le lendemain, le milieu de culture a été renouvelé par du milieu frais DMEM-High glucose supplémenté par 0.5 % de SVF. Après 8 heures d'incubation à 37°C, 5% CO₂, le milieu conditionné a été récupéré afin de doser l'IL-6, produite par les cellules en réponse aux traitements à l'aide du kit DuoSet ELISA kit (R&D Systems, Cat #DY206) en suivant les recommandations du fabricant. L'absorbance des puits a été mesurée à 450 nm avec le lecteur de microplaques multi-modes VICTOR 3VTM (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). La quantité d'IL-6 a enfin été déterminée à l'aide d'une gamme étalon préparée à partir d'une solution purifiée d'IL-6 humaine recombinante fournie par le fabricant (R&D Systems, Cat #DY206).

3.7.2 Western blot

3.7.2.1 Préparation des échantillons protéiques

Les cellules ont été lysées dans le tampon de lyse de radio-immunoprécipitation (RIPA) (Thermo Scientific, Cat #89901) supplémenté par 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma, Cat #P-7626) et des inhibiteurs de phosphatases (1 % PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl, Sigma, Cat #P-7626) et 50 mM de NaF (sodium fluoride, Sigma, Cat #S1504). Le tampon RIPA permet la solubilisation de la totalité des protéines cellulaires (membranaires, cytoplasmiques, mitochondriales et nucléaires) grâce à sa composition riche en détergents notamment le NP-40 (1 %), le SDS (0.1 %) et le DOC (1 %). Après clarification des lysats cellulaires par centrifugation à 12 500 rpm pendant 10 minutes à 4°C, la teneur totale en protéines en solution a été déterminée par la méthode de (Bradford, 1976). Une quantité de 20 µg de protéines totales a été dénaturée à 95°C pendant 5 minutes dans un tampon de charge Laemmli (BioRad, Cat #1610747) supplémenté extemporanément par 1/10 (v/v) de 2-mercaptoéthanol utilisé comme agent réducteur des ponts disulfures.

3.7.2.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert sur membrane de PVDF

Les protéines ont été séparées en fonction de leur masse moléculaire par migration électrophorétique à 100 V sur gel de polyacrylamide à 10 % en présence de SDS (SDS-PAGE). Après la migration, les protéines ont été électrotransférées sur une membrane PVDF (fluorure de polyvinylidène, Bio-Rad, Cat #170-4275) à l'aide du système Trans-Blot® Turbo™ Transfer (Bio-Rad, Cat #170-4275) pendant 7 minutes à 25 V.

3.7.2.3 Immunodétection des protéines

Après saturation des sites de liaison non spécifiques de la membrane de PVDF dans une solution contenant 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 (p/v) et 5 % lait écrémé en poudre (p/v) pendant 1 heure à température ambiante, la membrane a été incubée sous agitation pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (**Tableau 13**) dilué dans la solution de saturation. Après trois lavages de 10 minutes dans une solution de TBS-T contenant 20

mM Tris, 150 mM NaCl et 0.1% Tween 20 (p/v), la membrane a été incubée sous agitation pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP (**Tableau 14**) dans la solution de saturation. Après trois lavages de 10 minutes dans du TBS-T, la membrane a été révélée par chimiluminescence à l'aide du kit « *Clarity Western ECL Substrate* » (Bio-Rad, Cat #170-560) et du développeur automatique ChemiDoc (Bio-Rad).

Tableau 13 : Liste des anticorps primaires			
Protéine ciblée	Dilution	Fournisseur	Référence catalogue
AMPK α 1/2	1:500	abcam	#ab80039
β -actin	1:5000	Sigma-Aldrich	#A2066
COX-2	1:500	Cell Signaling	#12282T
Cytokératine 1	1:500	abcam	#ab93652
Cytokératine 10	1:500	abcam	#ab9025
GAPDH	1:5000	abcam	#ab9485
Involucrine	1:1000	Sigma Aldrich	#I9018
Loricrine	1:500	abcam	#ab24722
Phospho-AMPK α 1/2 (Thr183/172)	1:1000	Santa Cruz	#sc-101630
Phospho-Smad2 Ser465/467	1:1000	Cell Signaling	#3108S
Smad2/3	1:1000	Cell Signaling	#3102S
Notch3	1:1000	Cell Signaling	#5276S
SREBP1	1:250	Santa Cruz	#sc-13551

Tableau 14 : Liste des anticorps secondaires			
Description	Dilution	Fournisseur	Référence catalogue
Anticorps de chèvre anti-lapin IgG (H+L)	1:10000	Invitrogen	#65-6120
Anticorps de chèvre anti-souris IgG (H+L)	1:10000	Invitrogen	#61-6520

3.7.3 Evaluation du stress oxydant

Les ROS intracellulaires ont été détectés par une méthode de spectrofluorimétrie sur cellules vivantes grâce à la sonde DCFH-DA (*2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*). Lorsque la sonde DCFH-DA (non fluorescente) traverse la membrane plasmique, elle est dé-acétylée par des estérases intracellulaires pour former un produit intermédiaire, DCFH

(*dichlorofluorescein*). L'oxydation de la DCFH par les ROS intracellulaires génère un composé fluorescent, DCF (*2'7'-dichlorofluorescein*), qui peut être quantifié par spectrofluorimétrie.

Le protocole expérimental a consisté à déposer les cellules HaCaT en plaques de culture de 24 puits à raison de 2.5×10^4 cellules par puits à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain matin, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de SM (15, 31 et 62 µg/mL) dans du milieu de culture DMEM-High glucose supplémenté par 0.5% de SVF pendant 6 heures. Après une étape de lavage au PBS, les cellules ont été incubées avec la sonde DCFH-DA à la concentration finale de 10 µM (Fluorometric intracellular ROS kit, Sigma-Aldrich, Cat #MAK143) pendant 20 minutes à 37°C. Au terme de cette incubation, les cellules ont été irradiées aux UVB (25 mJ/cm²) en utilisant un simulateur solaire (Vilber Lourmat). Après 30 minutes d'incubation, l'intensité de fluorescence émise (λ excitation = 490 nm, λémission = 535 nm) a été quantifiée avec le lecteur de microplaques multi-modes VICTOR 3V™ (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de production de ROS selon la formule suivante :

$$\% \text{ de ROS} = \left(\frac{\text{moyenne de fluorescence des cellules traitées}}{\text{moyenne de fluorescence des cellules non traitées}} \right) \times 100$$

3.7.4 Etude de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription NF-κB

L'activité transcriptionnelle du facteur de transcription NF-κB dans les cellules HaCaT en réponse au traitement avec la SM a été étudiée par transfection transitoire du plasmide pNF-CMV-luc, exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous contrôle d'un promoteur contenant un site de liaison spécifique au NF-κB (Gonçalves et al., 2009).

Brièvement évoqué, la veille de la transfection les cellules HaCaT ont été déposées en plaques de culture de 24 puits à raison de 3.5×10^5 cellules par puits à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, 2.5 µg de plasmide pNF-CMV-luc ont été transfectés dans les cellules à l'aide de l'agent de transfection PTG1 comme décrit dans le paragraphe 3.2.3.1.2. Après 4 heures de transfection, le milieu de culture a été remplacé par du milieu DMEM-High glucose supplémenté par 0.5% de SVF. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec 50 µg/mL d'IL-22 (interleukine-22 humaine recombinante, R&D systems, Cat #782-IL-010) en présence ou

absence de différentes concentrations de SM (15, 31 et 62 $\mu\text{g/mL}$) dans le même milieu de culture pendant 24 heures. Des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif pour cette expérience. L'expression relative de la luciférase (RLU) a été quantifiée 48 heures après la transfection avec le luminomètre à tube Lumat (LB 9507, Berthold) comme décrit dans le paragraphe 3.2.3.1.3. Les RLU ont été normalisés à la quantité de protéines totales contenue dans chacun des puits en suivant le protocole décrit dans le paragraphe 3.2.3.1.3. Les résultats ont alors été exprimés en *Luciferase fold change*.

3.7.5 Test de migration cellulaire

La migration cellulaire a été évaluée à l'aide du test de cicatrisation de blessure *in vitro* (*In vitro scratch assay*) (Liang et al., 2007). Le principe consiste à créer artificiellement une brèche sur un tapis cellulaire à confluence et à évaluer la capacité des cellules à coloniser cette brèche au cours du temps. Ce test permet donc de mimer l'étape de migration des kératinocytes des berges d'une plaie vers les zones profondes du tissu lésé au cours de l'étape de ré-épithélialisation du processus de cicatrisation cutanée.

Les cellules HaCaT ont été déposées en plaques de culture de 24 puits à raison de 3.5×10^5 cellules par puits et cultivées jusqu'à l'obtention d'une monocouche cellulaire confluente à 100 % à 37°C, 5% CO_2 . Le milieu de culture a été renouvelé par du milieu DMEM-High glucose supplémenté par 0.5 % de SVF. Le lendemain, une brèche cellulaire verticale a été créée mécaniquement à l'aide de la pointe d'un cône de micropipette 1 mL. Les tapis cellulaires ont été ensuite lavés délicatement avec du PBS avant de traiter les cellules avec 10 ng/mL de TGF- β 1 en présence ou absence de différentes concentrations de SM (15 et 31 $\mu\text{g/mL}$) dans du milieu DMEM-High glucose supplémenté par 0.5 % de SVF. Des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif pour cette expérience. La plaque de culture a été immédiatement placée sur la platine motorisée du vidéo-microscope Zeiss-Axiovert 200 M (Carl Zeiss Inc.) de la plateforme P@CIFIC du CBM équipé d'une chambre thermostatée à 37°C et 5% de CO_2 . La migration cellulaire (ou comblement de la brèche) a été suivie en temps réel pendant une période de 72 heures. Des photos des tapis cellulaires ont été prises automatiquement toutes les 2 heures à l'aide de la caméra numérique intégrée au vidéo-microscope. Pour chacune des images, les aires des surfaces

des brèches ont été quantifiées à l'aide du logiciel Axiovision Rel. 4.7 (Carl Zeiss Inc.). Les résultats ont été exprimés en pourcentage de fermeture de la brèche en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ de fermeture de la brèche à } Tx = 100 - \left(\frac{\text{Aire normalisée de la brèche à } Tx}{\text{Aire normalisée de la brèche à } T0} \right) \times 100$$

3.7.6 Dosage des collagènes

Les collagènes fibrillaires (de type I, II, III, IV, V et XI) produites par les cellules HaCaT ont été dosés par colorimétrie à l'aide du réactif rouge Sirius (RS). Le RS est un colorant anionique pouvant se fixer à la séquence d'acides aminés Gly-X-Y répétée tout au long des chaînes alpha des collagènes fibrillaires.

Le dosage a consisté, dans un premier temps, à cliver et extraire les télépeptides des fibres de tropocollagène présents dans le surnageant de culture avec une solution contenant de la pepsine utilisée à la concentration finale de 0.1 mg/mL préparée dans 0.5 M d'acide acétique. Les télépeptides ont été ensuite complexés avec le RS (Sircol™ Soluble Collagen Assay kit, Biocolor, Cat #S1000) par addition d'un volume de ce réactif. Au terme d'une étape d'incubation de 2 heures, les complexes télépeptide-RS ont été culottés par centrifugation à 12 500 rpm pendant 10 min. L'élution des télépeptides lié au RS a été réalisée avec une solution contenant de 0.5 M de NaOH (hydroxyde de sodium). L'éluat a ensuite été dosé par mesure de l'absorbance à 555 nm en utilisant le lecteur de microplaques multi-modes (VICTOR 3V™, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). La quantité des collagènes fibrillaires contenus dans les échantillons a été déterminée à l'aide d'une gamme étalon préparée à partir d'une solution purifiée de collagène de type I fournie par le fabricant (Sircol™ Soluble Collagen Assay kit, Biocolor, Cat #S1000).

3.7.7 Analyse du cycle cellulaire

L'analyse du cycle cellulaire a été effectuée par cytométrie en flux en quantifiant le contenu en ADN des cellules fixées. La quantité d'ADN dans les cellules asynchrones reflète la progression des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. En théorie, à un instant t donné, la teneur en ADN intracellulaire se répartit de la manière suivante : un grand

nombre de cellules ont un contenu en ADN (2C, C étant une unité arbitraire) correspondant à la phase G0/G1, un faible nombre de cellules ont un contenu en ADN (4C) correspondant à la phase G2+M et un certain nombre de cellules ont un contenu en ADN intermédiaire (compris entre 2C et 4C) correspondant à la phase S (**Figure 50A**). Après élimination des doublets de cellules en phase G1 qui pourraient être comptabilisés en phase G2 ou M et ainsi fausser l'interprétation des résultats, l'analyse par cytométrie en flux permet d'obtenir un histogramme dont le profil est représenté dans la **Figure 50B**. Le pourcentage des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été déterminé à l'aide de la méthode du miroir (Barlogie *et al.*, 1976) (**Figure 50C**). Elle postule que le nombre de cellules en G0/G1 équivaut au double des événements présents à gauche de la moitié du pic G0/G1. De la même manière, le nombre de cellules en G2+M équivaut au double des événements présents à droite de la moitié du pic G2+M. Enfin, le nombre de cellules en S se calcule par la formule suivante :

$$\% \text{ cellules en S} = 100 - (\% \text{ cellules en G0/G1}) - (\% \text{ cellules en G2 + M})$$

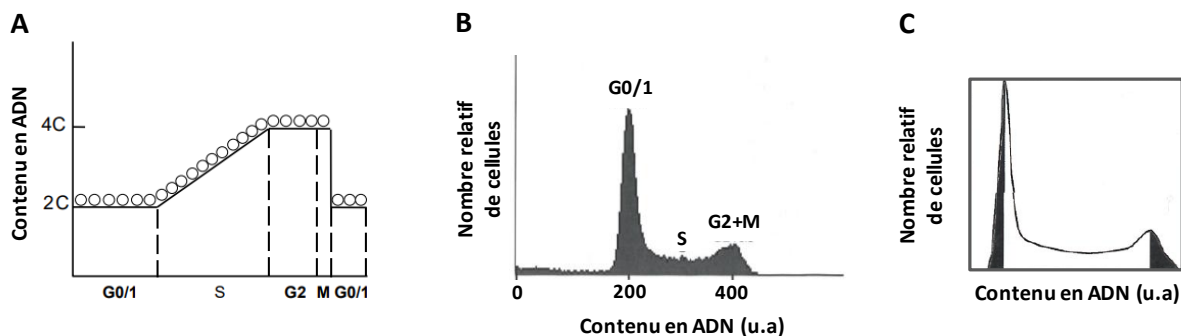


Figure 50 : Analyse du cycle cellulaire. (A) Distribution des cellules en fonction de leur contenu en ADN et leur progression dans les différentes phases du cycle cellulaire. (B) Histogramme de répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. (C) Modélisation mathématique du contenu en ADN par la méthode du miroir. Adaptée de (Ronot *et al.*, 2006).

Brièvement évoqué, les cellules HaCaT ont été déposées en plaques de culture de 6 puits à raison de 6×10^5 cellules par puits et cultivées pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec différentes concentrations de SM (15, 31 et 62 µg/mL) dans du milieu DMEM-High glucose complet. Des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif pour cette expérience. Les cellules ont ensuite été récoltées par traitement enzymatique à la trypsine/EDTA, lavées au PBS et fixées avec une solution d'éthanol glacial à 70 % préparé dans du PBS (vol/vol) à -20°C pendant 2

heures. Les cellules ont ensuite été traitées à la RNase A (100 µg/mL) à 37°C pendant 30 minutes pour quantifier strictement le contenu cellulaire en ADN avant d'être perméabilisées avec une solution de Triton X-100 à 0.2 % diluée dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été marquées en ajoutant 10 µL d'une solution d'Iodure de Propidium (IP) préparée dans du PBS à la concentration finale de 1 mg/mL. L'IP est une molécule fluorescente lipophile (λ_{max} excitation = 535 nm, λ_{max} émission = 617 nm) capable de s'intercaler entre les bases des acides nucléiques des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Après une incubation de 15 minutes à 37°C, le contenu en ADN des cellules a été enfin analysé à l'aide du cytomètre en flux BD FACSort (Becton-Dickinson) équipé du logiciel BD CellQuest™ Pro (Becton-Dickinson) de la plateforme P@CYFIC du CBM.

3.7.8 Test d'apoptose

L'induction de l'apoptose a été détectée et quantifiée par cytométrie en flux selon la méthode de double marquage des cellules à l'Annexine V et à l'IP (Gardai *et al.*, 2006). L'Annexine V (AV) couplée au fluorophore FITC (AV-FITC, (λ excitation = 495 nm, λ émission = 521 nm)) permet la détection de la phosphatidylsérine exposée à la surface des cellules apoptotiques. Ainsi, l'utilisation conjointe des deux marqueurs AV et IP permet de différencier les cellules viables (AV-/IP-), des cellules en apoptose précoce (AV+/IP-) ou en apoptose tardive/nécrose secondaire (AV+/IP+).

Brièvement évoqué, les cellules HaCaT ont été déposées en plaques de culture de 6 puits à raison de 6×10^5 cellules par puits et cultivées pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec 10 ng/mL de TGF- β 1 en présence ou absence de différentes concentrations de SM (15, 31 et 62 µg/mL) dans du milieu DMEM-High glucose supplémenté par 0.5 % de SVF. Des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif pour cette expérience. Les cellules ont ensuite été récoltées par traitement enzymatique à la trypsine/EDTA en prenant soin de conserver les cellules mortes, en suspension dans le milieu de culture. Après centrifugation (1500 rpm, 5 minutes) et lavage au PBS, les cellules ont été marquées à l'AV et à l'IP en suivant les recommandations du fabricant (eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit,

ThermoFisher Scientific, Cat #BMS500FI-300). L'analyse quantitative des cellules a été réalisée à l'aide du cytomètre en flux BD FACSsort (Becton-Dickinson équipé du logiciel BD CellQuest™ Pro (Becton-Dickinson) disponible sur la plateforme P@CYFIC du CBM.

3.7.9 Test de différenciation cellulaire

La différenciation des kératinocytes a été induite en augmentant la concentration de calcium (CaCl₂) dans le milieu de culture des cellules comme décrit par (Colombo et al., 2017).

Brièvement évoqué, les cellules HaCaT ont été cultivées dans du milieu DMEM-High glucose initialement dépourvu de calcium (Gibco, Cat #21068028) et supplémenté par 0.07 mM de CaCl₂, 10 % de SVF (Invitrogen, Cat #F7524), 2 mM de glutamine et une solution d'antibiotiques contenant 10 000 U/mL pénicilline et 10 mg/mL streptomycine (Sigma-Aldrich, Cat #P0781). Ce milieu est dit LC-DMEM-High glucose complet pour *low calcium*-DMEM-High glucose complet.

Pour évaluer l'effet de la SM sur la différenciation des kératinocytes, les cellules ont été induites en différenciation en ajustant la concentration extracellulaire en CaCl₂ à 1.8 mM. Pour cela, les cellules cultivées dans le milieu LC-DMEM-High glucose complet ont été déposées en plaques de culture de 24 puits à raison de 5.7×10^3 cellules par puits, et cultivées pendant 24 heures à 37°C, 5 % CO₂. Le lendemain, le milieu de culture a été renouvelé par le même milieu de culture supplémenté par 1.8 mM de CaCl₂. Ce milieu de différenciation, appelé HC-DMEM-high glucose pour *high calcium*-DMEM-High glucose complet, a été supplémenté par différentes concentrations de SM (15, 31 et 62 µg/mL). Des cellules traitées avec 1 µM d'acide *tout-trans* rétinolique (ATRA) (Sigma-Aldrich, Cat #R2625) ont été utilisées comme contrôle négatif de la différenciation des kératinocytes pour cette expérience. Le milieu de culture a été renouvelé tous les 3 jours. L'induction de la différenciation des kératinocytes par le CaCl₂ a été suivie au cours du temps (3, 6 et 9 jours). La cinétique de différenciation des kératinocytes a été analysée par trois méthodes différentes : la RT-qPCR, le western blot et l'immunofluorescence.

3.7.9.1 Analyse de la différenciation des kératinocytes par RT-qPCR

Après traitement des cellules comme décrit dans le paragraphe précédent, les cellules ont été lysées à différents intervalles de temps dans une solution de TRIzol™ (Life Technologies, Cat #15596018). Les ARN totaux ont été extraits, rétro-transcrits en ADNc et l'expression relative de gènes impliqués dans le programme de différenciation des kératinocytes a été déterminée par RT-qPCR comme décrit précédemment dans le paragraphe 3.4.2. Les séquences des amorces de PCR utilisées pour quantifier l'expression de ces marqueurs de différenciation sont listées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Liste des amorces spécifiques des gènes impliqués dans la différenciation des kératinocytes et le métabolisme lipidique	
Gène	Séquence des amorces (5'-3')
IVL humain	Sens : TGAAACAGCCAACTCCAC Anti-sens : TTCCTCTTGCTTTGATGGG
K1 humain	Sens : GATTGCCACCTACAGGACCC Anti-sens : ACAGACACACTCACGTTCGG
K10 humain	Sens : GCATGGCAACTCACATCAGG Anti-sens : CAGCCTGGCATTGTGATCT
FLG humain	Sens : GGATGAAGCCTATGACACCACT Anti-sens : AACTCTGGATCCCCTACGCT
LOR humain	Sens : ACGTCTCCTCGCAGCAGG Anti-sens : CTATTTGGACGGCCAGGT
NOTCH1 humain	Sens : GAATGGCGGGAAGTGTGAAGC Anti-sens : TAGTCTGCCACGCCTCTGC
NOTCH2 humain	Sens : TACAGTTGTCGCTGCTTGCC Anti-sens : CGACGAAGGTTTCACAGTGC
NOTCH3 humain	Sens : AGGGACGTCAGTGTGAACTC Anti-sens : GTCCACATCCTGCTGGCATC
ACLY humain	Sens : TGAGGAAGCATCCGGAGGTA Anti-sens : TCCGATGATGGTCACTCCCT
ACSS2 humain	Sens : CAGGAGGAAGCTGGAGCC Anti-sens : GGTGCAGCTCGCGGTAG
FASN humain	Sens : TCGTGGGCTACAGCATGGT Anti-sens : GCCCTCTGAAGTCGAAGAAGAA
GAPDH humain	Sens : CCAAAGGGTCATCATCTC Anti-sens : GGCCATCCACAGTCTTCT

3.7.9.2 Analyse de la différenciation des kératinocytes par immunofluorescence

Les cellules ont été déposées sur des lamelles de verre et traitées comme décrit dans le paragraphe précédent 3.7.9. Elles ont été fixées pendant 15 minutes à température ambiante à différents intervalles de temps à l'aide d'une solution de PFA (paraformaldéhyde) diluée dans du PBS à la concentration finale de 4 %. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois pendant 5 minutes au PBS avant d'être perméabilisées pendant 1 heure à température ambiante avec une solution de PBS contenant du Triton X-100 à la concentration finale de 0.2 % (vol/vol). Après saturation des sites de liaison non spécifiques des anticorps avec une solution de saturation constituée de 1 % (w/v) BSA (*bovine serum albumin*), 10 % SVF, 0.3 M glycine et 0.1 % Tween dilués dans du PBS pendant 30 minutes à température ambiante, des solutions d'anticorps primaires dirigés soit contre la cytokératine 10 (dilution 1:100, abcam, Cat #9025), ou la cytokératine 1 (dilution 1:100, abcam, Cat #93652) ont été déposées sur le tapis cellulaire à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, les cellules ont été lavées trois fois au PBS et incubées pendant 1 heure à température ambiante dans l'obscurité avec des anticorps secondaires de chèvre anti-souris IgG(H+L) (ThermoFisher Scientific, Cat #A-11034) ou chèvre anti-lapin IgG(H+L) (Thermo-Fisher, Cat #10680), conjugués à l'Alexa Fluor 488 et dilués au 1/200 dans la solution de saturation. Après trois lavages de 5 minutes au PBS, les échantillons ont été montés avec un milieu de montage Vectashield contenant du DAPI (Vector Laboratories, Cat #H-1200) avant d'observer le marquage fluorescent avec le microscope à épifluorescence (Zeiss Axiovert 200, Carl Zeiss Inc.) de la plateforme P@CIFIC du CBM.

3.7.10 Test de production de lipides

Les lipides neutres intracellulaires ont été mis en évidence par coloration des cellules fixées à l'aide du colorant lipophile et azoïque rouge intense, l'Oil Red O.

Le protocole expérimental a consisté à déposer les cellules HaCaT en microplaques de culture de 96 puits à raison de 9.5×10^3 cellules par puits puis à les traiter avec différentes concentrations de SM (15, 31 et 62 $\mu\text{g/mL}$) comme décrit précédemment dans la section 3.7.8 et 3.7.9. Après une étape de lavage au PBS, les cellules ont été fixées pendant 30

minutes à température ambiante à l'aide d'une solution de PFA diluée dans du PBS à la concentration finale de 4 %. Les lipides neutres ont été révélés par coloration avec une solution d'Oil Red O (Lipid (Oil Red O) Staining Kit, Sigma-Aldrich, Cat #MAK194) préparée en mélangeant 60 mg d'Oil red O avec 20 mL d'isopropanol. Les noyaux ont été contre-colorés à l'aide d'une solution d'hématoxyline prête à l'emploi et fournie par le fabricant (Lipid (Oil Red O) Staining Kit, Sigma-Aldrich, Cat #MAK194). Après coloration, les cellules ont été observées au microscope optique à contraste de phase (Carl Zeiss Inc.) avec l'objectif x600 de la plateforme P@CIFIC du CBM. Des photos des tapis cellulaires ont été prises à l'aide de la caméra numérique intégrée au microscope.

3.7.11 Etude de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription PPAR- γ

L'activité transcriptionnelle du facteur de transcription PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) dans les cellules HaCaT en réponse au traitement avec la SM a été étudiée par transfection transitoire du plasmide d'expression PPRE X3-TK-luc (Addgene, Cat #1015), exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous contrôle d'un promoteur contenant des éléments de réponse au PPAR- γ (*PPAR response element*, PPRE).

Brièvement évoqué, la veille de la transfection les cellules HaCaT ont été déposées en plaques de culture de 24 puits à raison de 3.5×10^5 cellules par puits à 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, 2.5 μ g de plasmide PPRE X3-TK-luc ont été transfectés dans les cellules à l'aide de l'agent de transfection PTG1 comme décrit dans le paragraphe 3.2.3.1.2. Après 4 heures de transfection, le milieu de culture a été remplacé par du milieu DMEM-High glucose supplémenté par 0.5% de SVF. Le lendemain, les cellules ont été traitées avec 10 μ g/mL de TGF- β 1 en présence ou absence de différentes concentrations de SM (15, 31 et 62 μ g/mL) dans le même milieu de culture pendant 24 heures à 37°C, 5% CO₂. Des cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle négatif pour cette expérience. L'expression de la luciférase a été quantifiée 48 heures après transfection avec le luminomètre à tube Lumat (LB 9507, Berthold) comme décrit dans le paragraphe 3.2.3.1.3. L'activité relative de la luciférase a été normalisée à la quantité de protéines totales contenue dans chacun des puits en suivant le protocole décrit dans le paragraphe 3.2.3.1.3. Les résultats ont alors été exprimés en *Luciferase fold change*.

3.8 Modèle expérimental murin de psoriasis induit par l'imiquimod

3.8.1 Les souris et les conditions d'hébergement

Les souris C57BL/6J femelles âgées de 8 à 10 semaines (Janvier, Saint Berthevin, France) ont été utilisées pour cette étude. Elles ont été hébergées dans un environnement exempt de pathogènes (animalerie du CBM, Orléans) et dans des conditions de température et d'hygrométrie constantes. La nourriture et l'eau ont été fournies *ad libitum* pendant toute la durée de l'expérimentation. Les procédures expérimentales ont été approuvées par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale du Campus du CNRS d'Orléans avant d'être validées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (numéro de saisine APAFiS 1109).

3.8.2 Traitements des souris

L'induction de l'inflammation cutanée mimant le psoriasis a été réalisée selon le modèle décrit par (van der Fits et al., 2009). Après anesthésie des animaux par inhalation d'isoflurane à la concentration finale de 2 % dans l'oxygène, le dos des souris a été rasé sur une surface d'environ 3 cm² à l'aide d'une tondeuse. Les poils restants ont été éliminés avec de la crème dépilatoire (Veet, Reckitt Benckiser, France), suivi d'un rinçage à l'eau tiède. Le lendemain, 62.5 mg de crème à base d'imiquimod (IMQ) (Aldara 5%, 3M Pharmaceuticals) ont été répartis quotidiennement à l'aide d'une spatule sur le dos de chaque souris (n = 7) pendant 6 jours. Les souris contrôles (n = 7) ont été traitées de façon identique mais avec 0.2 mL d'acétone. Pour évaluer l'innocuité cutanée de la SM, un groupe de souris (n = 7) a été traité de façon similaire avec une solution contenant 9 mg de SM dissous dans 0.2 mL d'acétone (solution SM). Enfin, pour étudier l'effet de la silymarine sur le développement du psoriasis, la peau du dos des souris (n = 7) a été traitée avec la solution SM pendant 45 minutes avant l'application de 62.5 mg de crème à base d'IMQ.

Pour compenser les phénomènes de déshydratation observés chez les souris ayant reçu des applications d'IMQ, toutes les souris ont reçu une injection intra-péritonéale de 300 µL de sérum physiologique au 3^{ème} jour de traitement. Les souris ont été sacrifiées par

dislocation cervicale au 7^{ième} jour. La peau du dos a été immédiatement prélevée à l'aide d'un scalpel et fractionnée en fragments de 0.5 cm² pour réaliser ensuite des analyses transcriptomiques et histologiques.

3.8.3 Evaluation de la sévérité de la maladie

La sévérité de l'inflammation cutanée a été évaluée au moyen d'un score clinique basé sur l'index PASI (*Psoriasis Area Severity Index*). L'érythème, la desquamation et l'épaississement de la peau ont été évalués sur une échelle de 0 à 4 (0 : absence ; 1 : légère ; 2 : modérée ; 3 : sévère et 4 : très sévère). L'addition de ces trois paramètres indique la sévérité de la maladie sur une échelle de 0 à 12. Le poids corporel des souris dans chacun des groupes de souris a été également suivi quotidiennement.

3.8.4 Analyses transcriptomiques

Les fragments de peau ont été directement déposés dans des tubes de lyse contenant des billes en céramique (Ozyme, Cat #P000911-LYSK0-A.0) avant d'ajouter 500 µL d'une solution de TRIzolTM (Life Technologies, Cat #15596018). Les fragments ont ensuite été découpés en plus petits fragments à l'aide de ciseaux, puis broyés mécaniquement avec l'homogénéisateur Precellys[®] 24 (Bertin Instruments) en utilisant trois cycles de broyage de 30 secondes à 5 500 rpm. Les broyats ont ensuite été centrifugés à 2 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants ont été prélevés et les ARN totaux ont été extraits, rétro-transcrits en ADNc et amplifiés par qPCR comme décrit précédemment dans la section 3.4.2 en utilisant des amorces spécifiques de chaque gène cible (**Tableau 16**). L'expression relative de chaque gène d'intérêt a été calculée par la méthode du 2^{-ΔΔCt} (Livak and Schmittgen, 2001) en utilisant la GAPDH comme gène de ménage.

Tableau 16 : Liste des amorces spécifiques des gènes de souris impliqués dans la différenciation des kératinocytes, métabolisme lipidique et l'inflammation

Gène	Séquences des amorces (5'-3')
IVL souris	Sens : CACCAGGAGTGTCTCAGGAACC Anti-sens : CAGTTCTGGTTCAGGTGGCT
K10 souris	Sens : AGTGGTACGAGAAGCATGGC Anti-sens : GCACGTTGGCATTGTCTAGTT
LOR souris	Sens : AACAGTATCAGTGCCAGAGC Anti-sens : TCTGACTGGTCTGCTGAGAG
SREBF1 souris	Sens : GGAACAGACACTGGCCGAGA Anti-sens : CGGGAAGTCACTGTCTTGTT
ACLY souris	Sens : CAGCTATGCCCCAAGGAAAGA Anti-sens : CGTCTCGGGAACACACGTAG
ACSS2 souris	Sens : GGGATCATGCGCACAGTCTA Anti-sens : AAGTGCCGATTCCACCTCTG
FASN souris	Sens : CTGTGCCCGTCGTCTATACC Anti-sens : AACCTGAGTGGATGAGCACG
IL23A souris	Sens : AGCAACTTCACACCTCCCTAC Anti-sens : ACTGCTGACTAGAACTCAGGC
IL22 souris	Sens : TCCAGCAGCCATACATCGTC Anti-sens : CCTCGGAACAGTTTCTCCCC
CCL20 souris	Sens : AGGCAGAAGCAGCAAGCAAC Anti-sens : CAAGCTTCATCGGCCATCTG
CXCL1 souris	Sens : GACCATGGCTGGGATTACCC Anti-sens : CGCGACCATTCTTGAGTGTG
S100A8 souris	Sens : AAATCACCATGCCCTCTACAAG Anti-sens : CCCACTTTTATCACCATCGCAA
S100A9 souris	Sens : CACCCTGAGCAAGAAGGAAT Anti-sens : TGTCATTTATGAGGGCTTCATTT
GAPDH souris	Sens : CCAAAGGGTCATCATCTC Anti-sens : GGCCATCCACAGTCTTCT

3.8.5 Etude histologique de la peau de souris

3.8.5.1 Préparation des échantillons

Les coupes histologiques de peaux de chacun des groupes de souris ont été réalisées par la société NovaXia (Saint-Laurent-Nouan, France). Brièvement évoqué, les peaux des souris fraîchement prélevées au CBM ont été fixées pendant une nuit à température ambiante dans une solution de PBS contenant 4 % de formaline (vol/vol) (Sigma, Cat #HT501128 avant d'être incluses dans de la paraffine par le personnel de NovaXia. Des coupes de tissus de 6 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées à l'aide d'un microtome puis déposées sur des lames en verre (SuperFrost Plus®, Kindler GmbH, Allemagne) avant d'être conservées à température ambiante en vue des études histologiques.

3.8.5.2 Coloration H&E

Les coupes de peau ont été déparaffinées en plongeant les lames histologiques dans deux bains successifs de xylène pendant 5 minutes, avant d'être réhydratées par une série de bains d'éthanol de concentration décroissante (100 %, 95 %, 80 %) pendant 5 minutes. Après un lavage de 5 minutes à l'eau distillée, les lames ont été incubées pendant 2 minutes dans un bain d'hématoxyline de Mayer (Sigma-Aldrich, Cat #MHS80). Ce colorant cationique se fixe aux groupes phosphate chargés négativement des acides nucléiques et colore ainsi les noyaux des cellules en bleu/violet. Après un rinçage à l'eau distillée pour éliminer l'excès d'hématoxyline, les lames ont été placées sous l'eau du robinet courante pendant 5 minutes pour « bleuir » la coloration. Les lames ont ensuite été incubées pendant 30 secondes dans une solution aqueuse à 0.5 % d'éosine J (Sigma-Aldrich, Cat #109844). Ce colorant anionique se fixe aux protéines chargées positivement et colore ainsi le cytoplasme et substances intercellulaires en rose. Après déshydratation des coupes de tissus en immergeant les lames dans deux bains successifs d'éthanol de concentration croissante (95 % et 100 %) pendant 20 secondes chacun, les coupes ont été clarifiées dans du xylène. Les échantillons ont finalement été montés entre lames et lamelles dans du milieu Permount™ (Fisher Scientific, Cat #15832544) avant d'être observés au microscope optique (Zeiss). Des photos des tissus ont été prises grâce à la caméra numérique intégrée au microscope Zeiss de la plateforme P@CIFIC du CBM.

3.9 Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et ont été répétées au minimum 3 fois. Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ écart type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Excel. Le test t de Student a été utilisé lorsque la distribution des échantillons suivait une loi normale, évaluée grâce aux tests de Shapiro-Wilk et Anderson-Darling. Seules les p-valeurs (P) inférieures à 0.05 ont été considérées comme statistiquement significatives. Trois niveaux de significativité sont représentés : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

4 Résultats

4.1 Mise en place de la stratégie de criblage cellulaire par bioluminescence basé sur le système RILES/21.5p T

4.1.1 Construction moléculaire et validation de la sonde bioluminescente pRILES/21.5pT

Pour développer la plateforme de criblage cellulaire spécifique du microARN-21-5p, j'ai exploité le système RILES développé au laboratoire avant mon arrivée. J'ai produit le plasmide d'expression pRILES/21.5pT comme schématisé sur la **Figure 39**, en clonant dans la région 3'UTR du gène codant pour le répresseur transcriptionnel CymR, une structure oligonucléotidique double brin contenant quatre blocs de séquences parfaitement complémentaires du microARN-21-5p. Cette séquence oligonucléotidique de 120 pb est appelée cassette microARN-21.5p T (pour « *Targeting sequence to microRNA-21-5p* »). Ainsi, lorsque le microARN-21-5p est exprimé fonctionnellement par les kératinocytes, c'est-à-dire pris en charge par le complexe RISC, il va se fixer par complémentarité de séquence à l'ARNm du CymR. Cette hybridation va conduire à la dégradation de l'ARNm de ce répresseur transcriptionnel, et donc à la répression traductionnelle de la protéine CymR. Par conséquent, en l'absence de la protéine CymR liée à l'opérateur Cuo, localisé dans le promoteur inducible CMV.Cuo, l'ARN polymérase peut transcrire le gène rapporteur *firefly luciférase* (F-Luc) placé en aval de ce promoteur inducible. Dans ces conditions, la configuration du système RILES/21.5p T passe en mode « ON ». L'addition de luciférine dans le milieu de culture des cellules va conduire à l'émission de signaux bioluminescents facilement quantifiables par des lectures de bioluminescence, tel qu'un luminomètre ou un imageur optique (**Figure 51**).

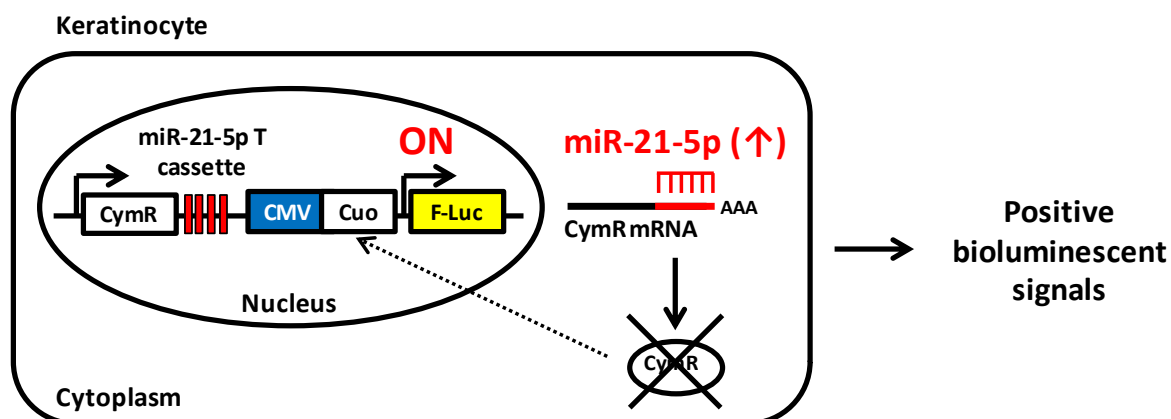


Figure 51 : Représentation schématique du principe de la sonde bioluminescente pRILES/21.5pT sous contrôle du microARN-21-5p.

Pour vérifier la spécificité du pRILES/21.5pT pour le microARN-21-5p, j'ai transfecté les cellules HaCaT avec le pRILES/21.5pT ou le plasmide contrôle pRILES, en présence de deux concentrations (1 et 10 nM) de mimiques synthétiques du microARN-21-5p ou de microARNs contrôles. L'activité de la luciférase a été mesurée 48 heures après transfection. Mes résultats de la **Figure 52A** montrent que la transfection de mimiques de microARN-21-5p a pour effet d'induire l'activité de la luciférase dans les cellules, et ceci de façon spécifique et dose dépendante. L'effet inducteur maximal des mimiques de microARN-21-5p sur l'activité de la luciférase est atteint à la concentration de 10 nM, et conduit à une augmentation de 2 fois de la valeur de l'activité de la luciférase quantifiée dans les cellules non transfectées avec des mimiques ou transfectées avec des mimiques de microARN contrôle négatif (**Figure 52A**). Comme attendu, les mimiques de microARN-122 et -133 n'ont pas régulé l'activité de la luciférase comparativement aux cellules non transfectées avec des mimiques de microARNs ou transfectées avec des mimiques de microARN contrôle négatif (**Figure 52A**). A l'inverse, la transfection d'inhibiteurs de microARN-21-5p a diminué par 2.6 fois l'expression de la luciférase par rapport aux inhibiteurs de microARN contrôle négatif (**Figure 52B**). Ces résultats montrent donc que le système RILES/21.5p T peut être utilisé comme un senseur moléculaire non invasif pour suivre l'activité du microARN-21-5p dans les cellules HaCaT.

J'ai par la suite évalué la sensibilité du système RILES/21.5p T à détecter des changements d'activité du microARN-21-5p exprimé, cette fois ci, de façon endogène dans

les cellules HaCaT. Pour cela, j'ai traité les cellules HaCaT avec des doses croissantes de TGF- β 1 (2, 10, 20 ng/mL) pendant 24 heures. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la **Figure 52C**. Ils montrent que le traitement des cellules par le TGF- β 1 conduit à une induction de l'activité de la luciférase de manière dose dépendante. Un niveau d'induction maximal, égal à 1.8 fois la valeur de l'activité de luciférase mesurée dans les cellules non traitées, a été détecté dans les cellules traitées par le TGF- β 1 à la concentration de 10 ng/mL (**Figure 52D**). Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus par PCR en temps réel (RT-qPCR, **Figure 52E**). Les résultats de cette analyse comparative montrent que les deux systèmes de quantification de l'expression du microARN-21-5p (RILES/21.5p T et RT-qPCR) offrent quasiment le même niveau de sensibilité de détection. En effet, les résultats de la RT-qPCR indiquent que l'expression relative du microARN-21-5p est augmentée par 2.1 fois après traitement des cellules HaCaT par 10 ng/mL de TGF- β 1 comparativement aux cellules non traitées contre 1.8 fois pour le système RILES/21.5p T.

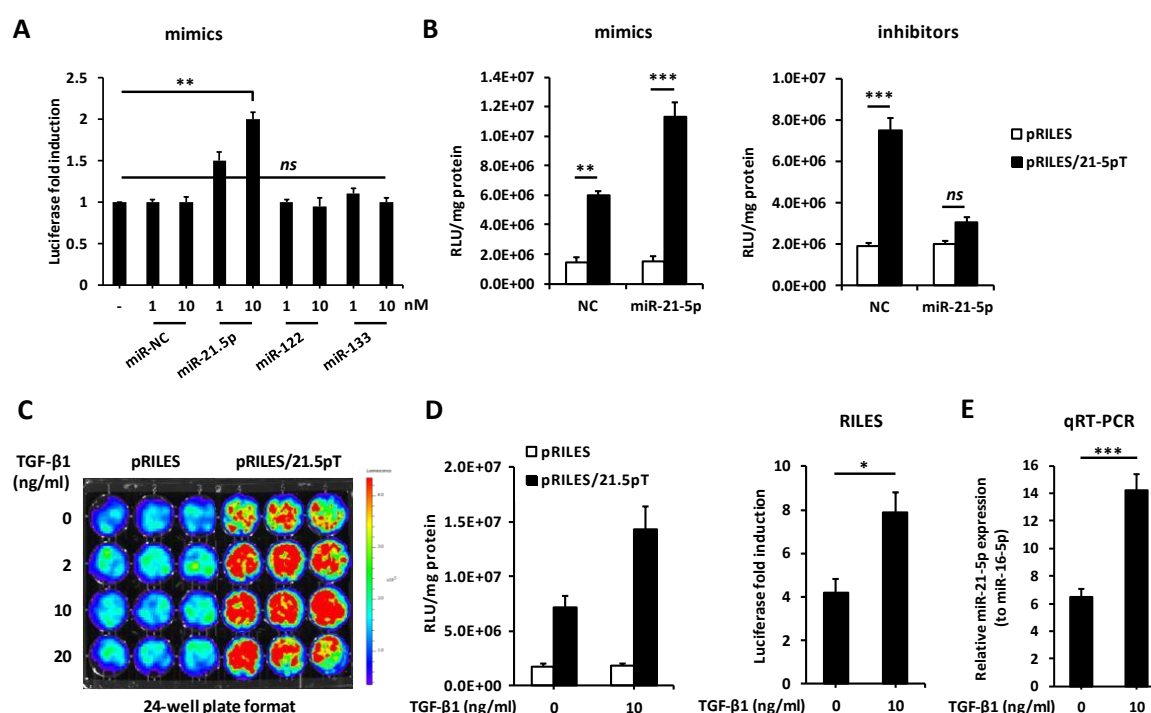


Figure 52 : Validation de la spécificité et sensibilité du pRILES/21.5pT pour le microARN-21-5p en plaque de 24 puits.

(A) Les cellules HaCaT ont été co-transfecté avec le pRILES ou pRILES/21.5pT avec deux concentrations de mimiques synthétiques de microARN-21-5p et microARNs contrôles ($n=3$). L'activité de la luciférase a été mesurée 48 heures après la transfection et a été exprimée en niveau d'induction de l'expression de la luciférase par rapport aux cellules transfectées avec les plasmides en absence de mimiques de microARNs. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. *ns* (pas de différence statistique significative),

**** $P < 0.01$, t-test bilatéral.** (B) Les cellules HaCaT ont été co-transfectées avec le pRILES ou pRILES/21.5pT avec 10 nM de mimiques et inhibiteurs synthétiques de microARN-NC ou microARN-21-5p. L'activité de la luciférase a été mesurée 48 heures après la transfection et a été normalisée par rapport à la teneur en protéines totales dans les lysats cellulaires analysés (RLU/mg de protéines). Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. *ns* (pas de différence statistique significative), **** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, t-test bilatéral.** (C) Les cellules HaCaT ont été transfectées avec le pRILES ou pRILES/21.5pT puis traitées avec différentes concentrations de TGF- β 1 (0, 2, 10, 20 ng/mL) pendant 24 heures. L'activité de la luciférase a été mesurée 48 heures après la transfection dans les cellules en temps réel à l'aide du système d'imagerie par bioluminescence IVIS® Lumina II. Image d'une plaque de 24 puits représentative d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires. (D) Les cellules HaCaT ont été transfectées avec le pRILES ou pRILES/21.5pT puis traitées en présence ou absence de 10 ng/mL de TGF- β 1 pendant 24 heures. L'activité de la luciférase a été mesurée 48 heures après transfection. Les résultats ont été exprimés en RLU/mg de protéines et niveau d'induction de l'expression de la luciférase par rapport aux cellules transfectées avec le pRILES. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. *** $P < 0.05$, t-test bilatéral.** (E) L'expression relative du microARN-21-5p par rapport au microARN-16-5p a été quantifiée dans les cellules HaCaT traitées en présence ou absence de 10 ng/mL de TGF- β 1 pendant 24 heures. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes. ***** $P < 0.001$, t-test bilatéral.** (RLU: unités relatives de lumière; TGF- β 1: facteur de croissance transformant bêta-1, NC: contrôle négatif).

4.1.2 Miniaturisation de la stratégie de criblage au format de microplaques de 96 puits

Un autre facteur clé au succès de ce projet a été la capacité de miniaturiser les conditions d'utilisation du système RILES/21.5p T, initialement optimisées au format de plaques de 24 puits, au format de microplaques de 96 puits.

J'ai optimisé plusieurs paramètres expérimentaux de culture cellulaire tels que la densité cellulaire par puits, l'effet de la concentration de sérum dans le milieu de culture, les conditions de transfection et le temps de lecture de l'activité de la luciférase après addition du TGF- β 1. Ce travail laborieux, dont les principales étapes sont résumées dans le paragraphe 3.3.2, avait pour objectif de garantir un rapport signal sur bruit élevé, une faible variabilité entre les essais et une bonne sensibilité de lecture de l'activité de la luciférase par les différents lecteurs de bioluminescence à notre disposition. Les résultats, non montrés dans ce manuscrit, m'ont permis de sélectionner 1) la densité cellulaire de 7.5×10^4 cellules par puits comme densité cellulaire optimale pour collecter suffisamment de signaux

optiques, 2) la culture de cellules dans du milieu de culture supplémenté par 0.5 % de SVF pour limiter l'émission de bioluminescence dans les cellules contrôles, transfectées avec le plasmide pRILES et 3) un rapport de complexation ADNp/PTG1 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) de 1/6 pour générer suffisamment de signaux optiques tout en limitant l'apparition de toxicité liée à l'utilisation d'un agent de transfection, bien qu'il soit très peu toxique (Gonçalves et al., 2014). Enfin, 4) des analyses de cinétique de l'activité de la luciférase au cours du temps m'ont permis de sélectionner le temps optimal pour quantifier l'activité de la luciférase. Soit 24 heures post-traitement des cellules par le TGF- β 1, correspondant à 48 heures post-transfection des cellules avec les plasmides pRILES/21.5pT et pRILES. A ces temps, l'expression transitoire du pRILES/21.5pT dans les cellules est toujours suffisante pour être quantifiée.

Afin de valider la robustesse de ces conditions expérimentales de criblage et leurs utilisations à des fins de criblage à petit débit, j'ai calculé le facteur Z' . Le facteur Z' est un paramètre statistique utilisé pour évaluer la qualité globale des systèmes de criblage à haut débit (Zhang et al., 1999). Il combine la plage dynamique de signal (c'est-à-dire la moyenne du signal pour l'échantillon d'intérêt par rapport à celle du contrôle), ainsi que la variation des données associées aux mesures du signal (c'est-à-dire l'écart-type pour l'échantillon d'intérêt par rapport à celui du contrôle) pour un système donné. Le facteur Z' se calcule de la manière suivante : $Z' = 1 - \frac{3\sigma_{e+} + 3\sigma_{e-}}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$, où σ_{e+} et σ_{e-} sont les écarts-types des contrôles positifs et négatifs, respectivement, et μ_{c+} et μ_{c-} leurs moyennes. Selon Zhang et al. cinq catégories existent pour décrire la qualité des systèmes de criblage : (i) idéal ($Z' = 1$), (ii) excellent ($0.5 \leq Z' < 1$), (iii) acceptable ($0 < Z' < 0.5$), (iv) oui ou non ($Z' = 0$) et (v) impossible ($Z' < 0$). Par exemple, un essai avec un facteur Z' égal à 1 est idéal. Il correspond à un test avec une très grande plage dynamique de signal (qui se rapproche de l'infini), et une très petite variabilité des données (écart-type égal à 0). A l'inverse, un facteur Z' égal à 0 représente un test binaire de type oui ou non. Pour calculer le facteur Z' , les cellules HaCaT ont été déposées dans des microplaques de 96 puits et transfectées avec le pRILES ou le pRILES/21.5pT. Elles ont ensuite été traitées en présence ou absence de TGF- β 1 (10 ng/mL) pendant 24 heures, puis l'activité de la luciférase a été mesurée avec le système d'imagerie par bioluminescence IVIS® Lumina II. Les résultats de la **Figure 53** montrent que la stratégie d'optimisation que j'ai mis en place a permis d'obtenir d'excellents facteurs Z' (> 0.5),

attestant l'adéquation de notre plateforme de criblage aux critères d'exigence de spécificité, sensibilité et de reproductibilité requis pour le criblage à haut débit de molécules d'intérêt.

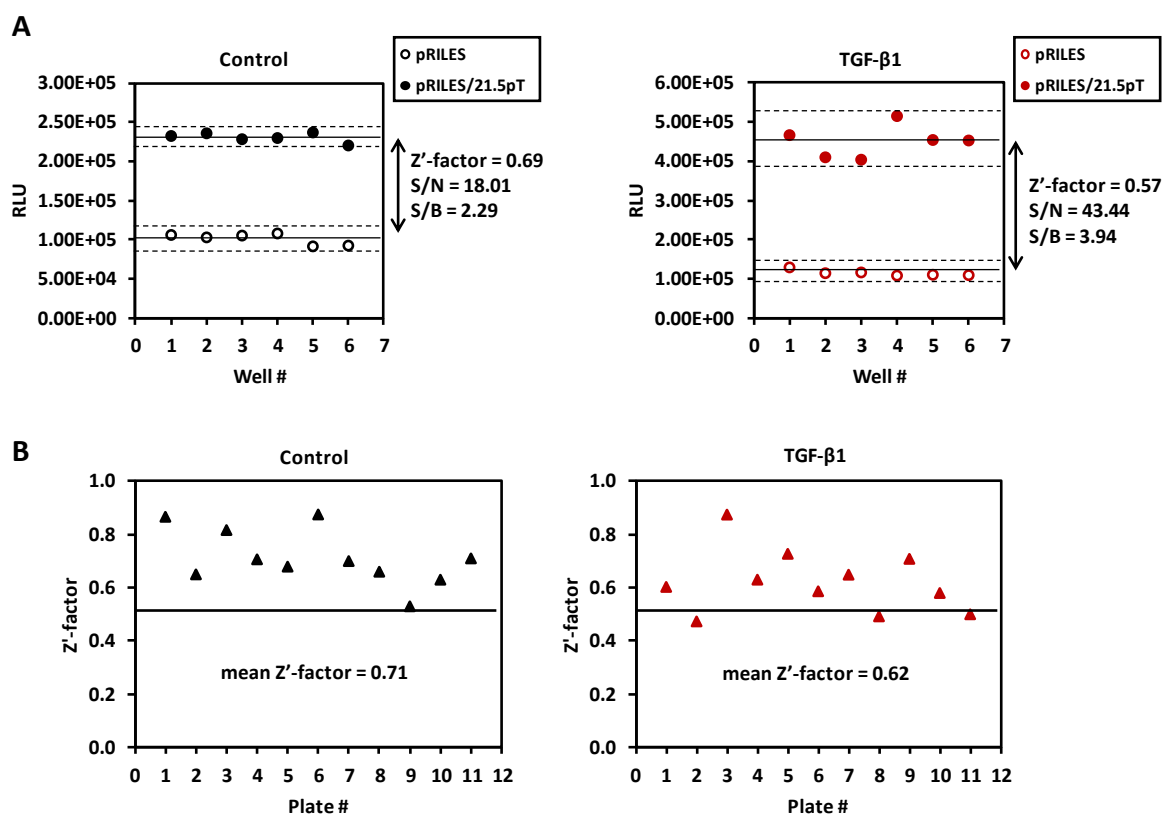


Figure 53 : Détermination du facteur Z' pour le test cellulaire basé sur le système RILES/21.5p T optimisé au format de microplaques de 96 puits.

Les cellules HaCaT ont été ensemencées à raison de 7.5×10^4 cellules par puits dans des microplaques de 96 puits à fond transparent ($n = 24$ puits). Le lendemain, elles ont été transfectées avec $0.5 \mu\text{g}$ par puits de plasmide d'expression pRILES (contrôle négatif, $n = 12$ puits) ou pRILES/21.5pT (contrôle positif, $n = 12$ puits) en utilisant le rapport de complexation ADNp/PTG1 de 1/6. Les cellules ont ensuite été traitées pendant 24 heures en présence ou absence de TGF-β1 (10 ng/mL) dans un milieu de culture supplémenté par 0.5% de SVF (cellules transfectées avec le pRILES, $n = 6$ puits non traités et $n = 6$ puits traités par le TGF-β1; cellules transfectées avec le pRILES/21.5pT, $n = 6$ puits non traités et $n = 6$ puits traités par le TGF-β1). L'activité de la luciférase a été mesurée après 48 heures de transfection avec le système d'imagerie par bioluminescence IVIS® Lumina II. (A) Exemple de résultats obtenus pour une microplaque de 96 puits. Les lignes horizontales pleines correspondent à la moyenne des valeurs en RLU pour le contrôle négatif et positif, tandis que les lignes en pointillé indiquent la valeur des écarts-types pour chacune des conditions. Selon Zhang et al. les valeurs acceptables de facteur Z', rapport S/N et S/B doivent être >0.5 , >10 , >2 , respectivement. (B) Le facteur Z' a été calculé pour un total de 11 microplaques de 96 puits. Ce paramètre statistique est représenté par des triangles noirs (cellules non traitées) et rouges (cellules traitées par le TGF-β1). La ligne horizontale indique la valeur seuil de 0.5. (RLU: unités relatives de lumière; TGF-β1: Transforming growth factor beta-1; S/N: signal to noise ratio; S/B: signal to background ratio).

4.2 Identification de la touche *Silybum marianum* (L.) Gaertn lors du criblage cellulaire basé sur le système RILES/21.5p T

J'ai par la suite criblé l'extractothèque fournie par le Consortium ValBioCosm dans le but d'identifier des extraits bruts de plantes capables de moduler l'activité du microARN-21-5p dans les cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1. La **Figure 54** illustre le diagramme de flux de travail général que j'ai suivi.

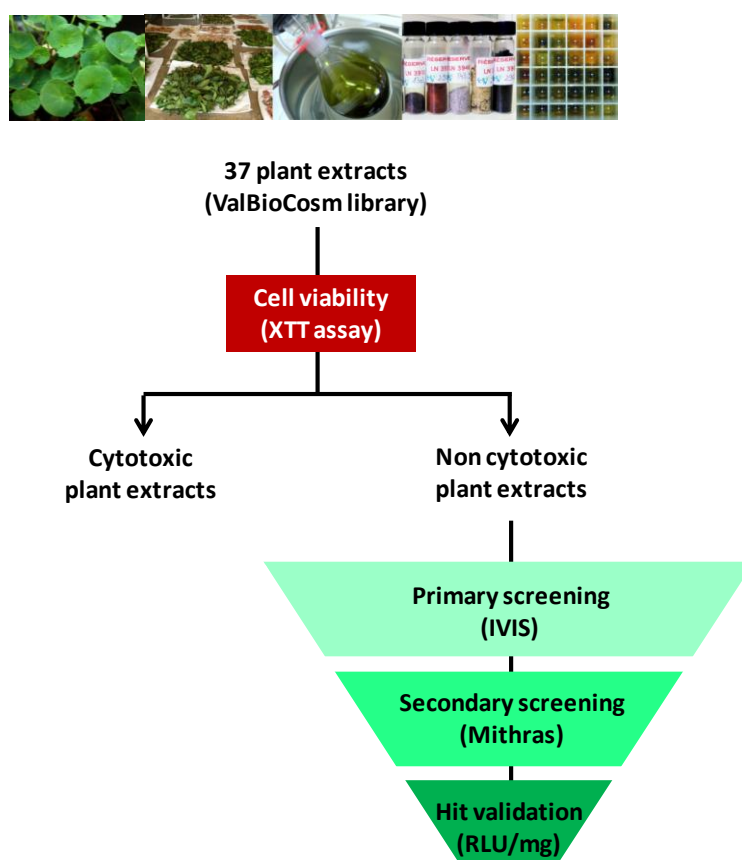


Figure 54 : Diagramme de flux de travail général suivi pour identifier des touches bioactives capables de réguler l'activité du microARN-21-5p.

Après avoir évalué la cytotoxicité de l'ensemble des extraits bruts de plantes fournis par le Consortium ValBioCosm sur les cellules HaCaT par un test XTT, les extraits non cytotoxiques ont été criblés sur les cellules HaCaT préalablement transfectées avec le pRILES ou pRILES/21.5pT dans des microplaques de 96 puits. Les touches potentielles identifiées lors du crible primaire avec le système d'imagerie par bioluminescence IVIS® Lumina II ont été ensuite criblées une seconde fois avec le lecteur de microplaques à luminescence Mithras. Pour discriminer les candidats faux-positifs des vrais-positifs, un test de validation finale des touches permettant de normaliser l'activité de la luciférase à la quantité de protéines totales (RLU/mg) dans les échantillons a été effectuée (Image adaptée de <https://icsn.cnrs.fr/en/platforms/extract-library>).

Dans un premier temps, j'ai évalué la cytotoxicité relative de chaque extrait à l'aide d'un test colorimétrique au XTT. Seules les concentrations des extraits végétaux induisant une baisse ou hausse de viabilité cellulaire de $\pm 10\%$ par rapport aux cellules contrôles, traitées avec le solvant DMSO utilisé à la concentration finale inférieure à 0.1 % (vol/vol), ont été retenues pour le criblage cellulaire. Parmi les 37 extraits bruts de plantes analysés, seul l'extrait de *Whitania somnifera* L. a été exclu de notre étude en raison de sa forte cytotoxicité ($36.5\% \pm 0.2\%$ de toxicité à la concentration de 31 $\mu\text{g/mL}$) (**Figure 55**).

Plant extract n°	Scientific name
1	<i>Achillea millefolium</i> L.
2	<i>Alchemilla vulgaris</i> L.
3	<i>Arctium lappa</i> L.
4	<i>Arnica chamassonis</i>
5	<i>Artemisia annua</i> L.
6	<i>Artemisia vulgaris</i>
7	<i>Bacopa monnieri</i>
8	<i>Calendula officinalis</i>
9	<i>Centaurea cyanus</i>
10	<i>Centella asiatica</i> (L.)
11	<i>Cichorium intybus</i> (L.)
12	<i>Coleus blumei</i>
13	<i>Coleus forskohlii</i>
14	<i>Cyperus esculentus</i>
15	<i>Eclipta alba</i>
16	<i>Echinacea angustifolia</i>
17	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench
18	<i>Gentiana lutea</i> (L.)
19	<i>Iris pseudacorus</i> (L.)
20	<i>Lamium album</i>
21	<i>Lotus corniculatus</i>
22	<i>Ludwigia grandiflorum</i>
23	<i>Luronium natans</i> (L.) Raf
24	<i>Meconopsis betonicifolia</i>
25	<i>Melissa officinalis</i> L.
26	<i>Mentha piperita</i> (L.)
27	<i>Molinia caerulea</i> (L.)
28	<i>Physalis alkekengi</i>
29	<i>Prunus cesarus</i>
30	<i>Rosa</i>
31	<i>Salvia officinalis</i> (L.)
32	<i>Sylbium marianum</i> (L.) Gaertn
33	<i>Tephrosia purpurea</i>
34	<i>Trifolium pratense</i> (L.)
35	<i>Urtica dioica</i> (L.)
36	<i>Viola tricolor</i> (L.)
37	<i>Whitania somnifera</i> (L.)

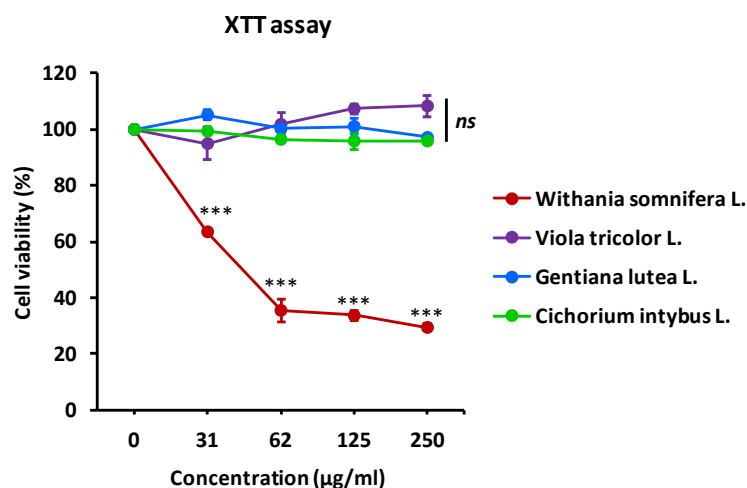


Figure 55 : Evaluation de la cytotoxicité des extraits bruts de plantes fournis par le Consortium ValBioCosm.

Les cellules HaCaT ont été traitées avec des concentrations croissantes d'extraits bruts de plantes pendant 24 heures, puis leur cytotoxicité a été déterminée à l'aide d'un test XTT. Le graphique met en évidence la cytotoxicité de l'extrait brut de *Whitania somnifera* L. en comparaison de trois autres extraits non toxiques (*Viola tricolor* (L.), *Gentiana lutea* (L.), *Cichorium intybus* (L.)). Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. ns (pas de différence statistique significative), *** $P < 0.001$, t-test bilatéral.

Pour maximiser les chances d'identifier des touches, chaque extrait a été criblé à trois concentrations différentes et en triplicata. Pour réaliser des analyses statistiques robustes,

chaque opération de criblage a été répétée au minimum trois fois. Le mode opératoire de la stratégie de criblage a consisté à réaliser un crible primaire de l'ensemble des extraits de plantes non cytotoxiques pour pré-sélectionner rapidement une première série de touches potentielles. Sur les 36 extraits bruts testés, nous avons pu identifier 3 extraits bruts de plantes, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., *Centella asiatica* (L.) et *Molinea caerulea* (L.), pour leur capacité à moduler de plus de 1.5 fois l'activité du microARN-21-5p induite par le TGF- β 1 par rapport aux cellules contrôles, traitées uniquement par le TGF- β 1 (**Figure 56**).

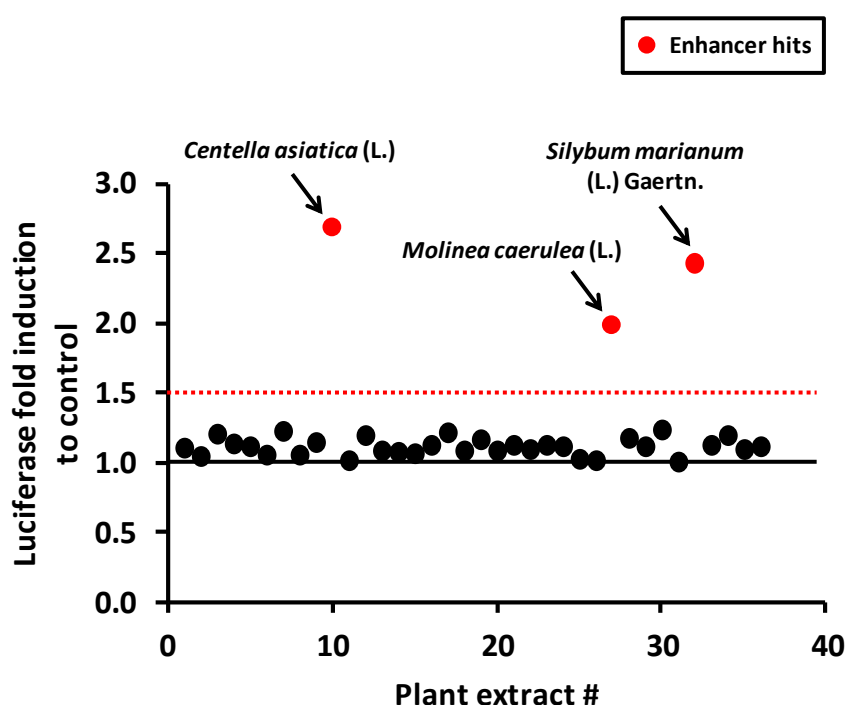


Figure 56 : Touches identifiées par le crible primaire utilisant le système RILES/21.5p T au format de microplaques de 96 puits.

Diagramme de dispersion représentant l'augmentation relative de l'activité de la luciférase dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 et les extraits bruts de plantes par rapport aux cellules contrôles, traitées uniquement par le TGF- β 1. Chaque point représente un extrait brut de plante de la librairie ValBioCosm à la concentration induisant un effet maximal sur l'expression de la luciférase. La ligne horizontale en pointillé de couleur rouge indique la valeur d'induction seuil fixée à 1.5. Les extraits bruts de plantes capables de réguler positivement (luciferase fold induction > 1.5) l'expression de la luciférase dans les cellules traitées par le TGF- β 1 ont été surlignés en rouge.

Les **Figure 57** et **Figure 58** illustrent de façon représentative les résultats de mes cribles primaires.

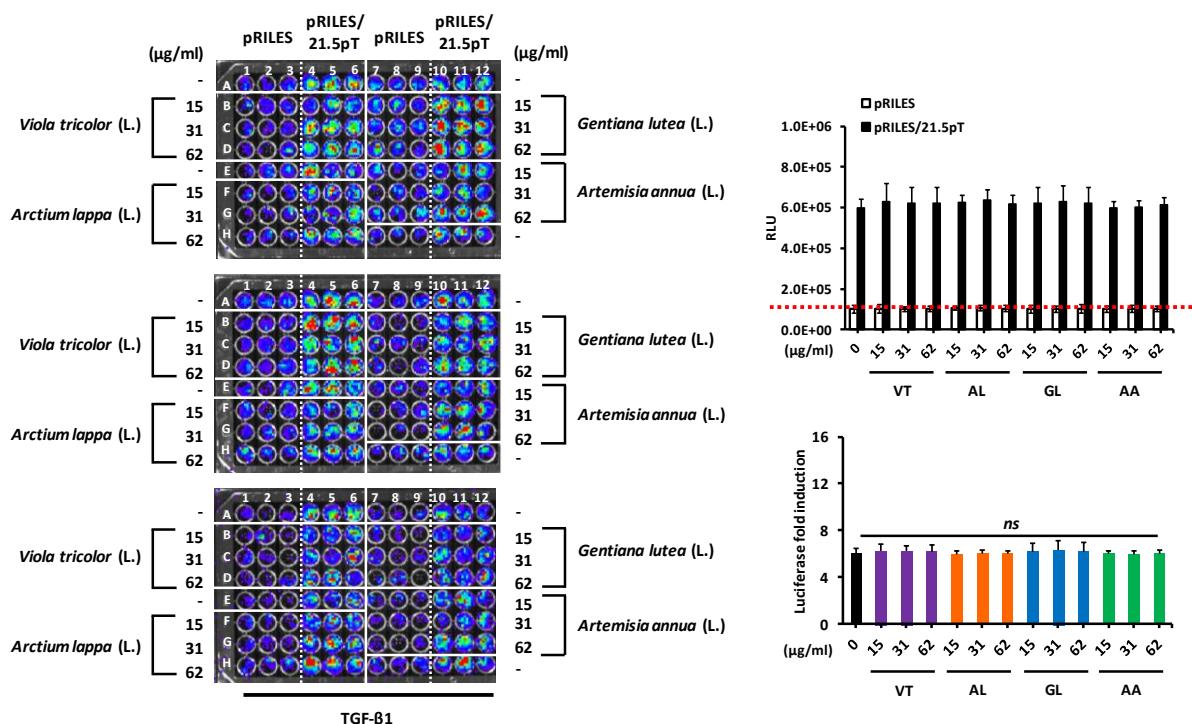


Figure 57 : Résultats d  un crible primaire basé sur le système RILES/21.5p T au format de microplaques de 96 puits montrant l  absence de régulation positive de l  activit   du microARN-21-5p par 4 extraits de plantes dans les kératinocytes humains traités par le TGF-  1.

Les cellules HaCaT déposées dans les puits des colonnes 1-3 et 7-9 ont été transf  ct  es avec le pRILES contrôle, tandis que les cellules déposées dans les puits des colonnes 4-6 et 10-12 ont été transf  ct  es avec le pRILES/21.5pT. Le lendemain de la transfection, les cellules cultivées dans les puits A1-A12, E1-E6 et H7-H12 ont été traitées par 10 ng/mL de TGF-  1 (groupe contrôle) tandis que dans les puits restants, les cellules ont été traitées par 10 ng/mL de TGF-  1 et des extraits bruts de plantes. Chaque microplaque de 96 puits a permis dévaluer l  effet de 4 extraits bruts de plantes différents (ici, *Viola tricolor* L., *Arctium lappa* L., *Gentiana lutea* L., ou *Artemisia annua* L.) sur l  activit   du microARN-21-5p. Chaque extrait a été criblé    3 concentrations non cytotoxiques. L  activit   de la luciférase a été déterminée 48 heures après transfection avec le système d  imagerie IVIS   Lumina II et exprimée en RLU. L  expression de la luciférase dans les cellules transf  ct  es avec le pRILES/21.5pT a été rapportée à celle mesurée dans les cellules transf  ct  es avec le pRILES (*luciferase fold induction*). Les données correspondent à la moyenne à écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. ns (pas de différence statistique significative), t-test bilatéral. (RLU: unités relatives de lumière; TGF-  1: *Transforming growth factor beta-1*, VT: *Viola tricolor* L.; AL: *Arctium lappa* L.; GL: *Gentiana lutea* L.; AA: *Artemisia annua* L.).

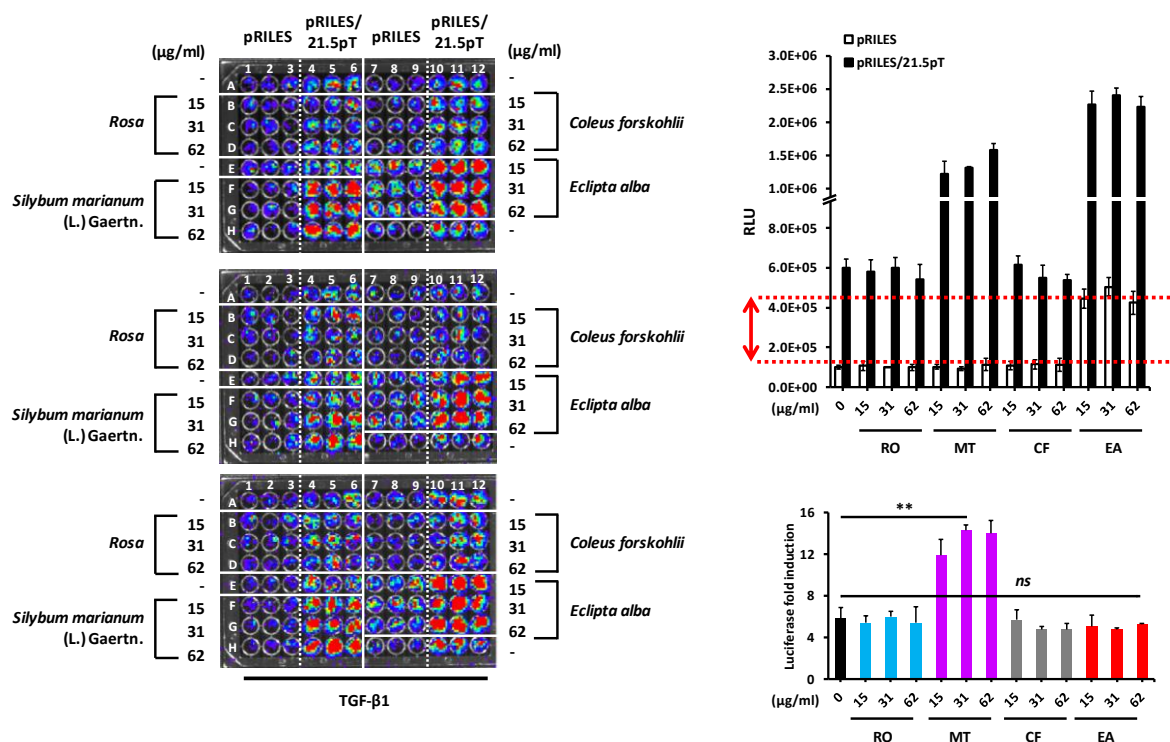


Figure 58 : Résultats d'un crible primaire basé sur le système RILES/21.5p T au format de microplaques de 96 puits montrant une touche (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) capable de réguler positivement l'activité du microARN-21-5p et un hit non-spécifique (*Eclipta alba*) dans les kératinocytes humains traités par le TGF- β 1.

Les cellules HaCaT déposées dans les puits des colonnes 1-3 et 7-9 ont été transfectées avec le pRILES contrôle, tandis que les cellules déposées dans les puits des colonnes 4-6 et 10-12 ont été transfectées avec le pRILES/21.5pT. Le lendemain de la transfection, les cellules cultivées dans les puits A1-A12, E1-E6 et H7-H12 ont été traitées par 10 ng/mL de TGF- β 1 (groupe contrôle) tandis que dans les puits restants, les cellules ont été traitées par 10 ng/mL de TGF- β 1 et des extraits bruts de plantes. Chaque microplaque de 96 puits a permis d'évaluer l'effet de 4 extraits bruts de plantes (ici, *Rosa*, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., *Coleus forskohlii* ou *Eclipta alba*) sur l'activité du microARN-21-5p. Chaque extrait a été criblé à 3 concentrations non cytotoxiques. L'activité de la luciférase a été déterminée 48 heures après transfection avec le système d'imagerie IVIS® Lumina II et exprimée en RLU. L'expression de la luciférase dans les cellules transfectées par le pRILES/21.5pT a été rapportée à celle mesurée dans les cellules transfectées avec le pRILES (*luciferase fold induction*). Les résultats de ce crible primaire ont permis de classer les 4 extraits en 3 catégories : extrait sans effet par rapport au groupe contrôle (*Rosa* et *Coleus forskohlii*), candidat non-spécifique (*Eclipta alba*) et touche potentielle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn). Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. ns (pas de différence statistique significative), ** $P < 0.01$, t-test bilatéral. (RLU: unités relatives de lumière; TGF- β 1: *Transforming growth factor beta-1*, RO: *Rosa*; MT: *Silybum marianum* (L.) Gaertn.; CF: *Coleus forskohlii* ; EA: *Eclipta alba*).

Un crible secondaire utilisant un autre système d'acquisition du signal de bioluminescence, le lecteur de microplaques à luminescence Mithras, a permis de confirmer la relation dose-réponse des 3 candidats potentiels sur l'activité du microARN-21-5p (**Figure 59**).

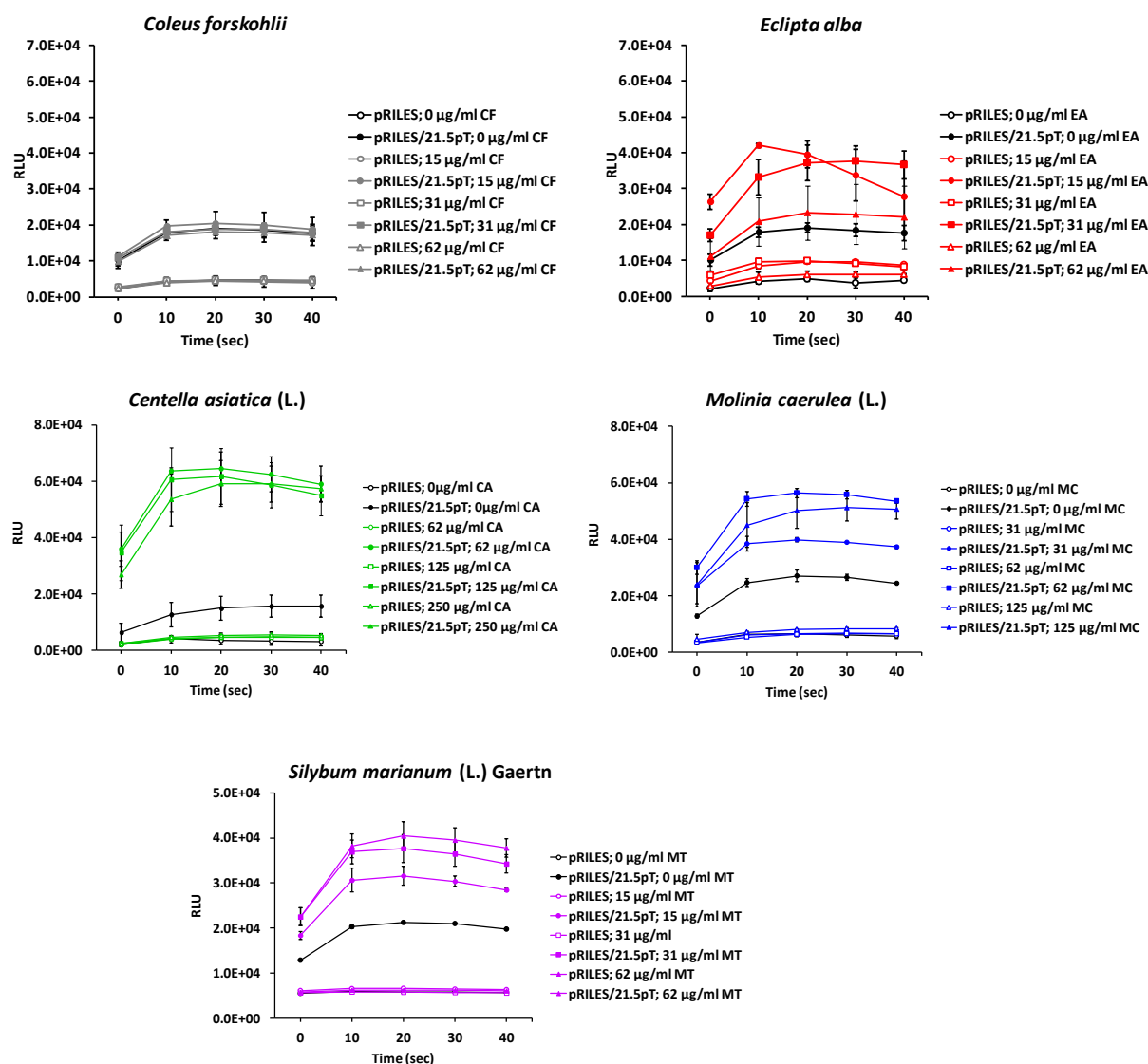


Figure 59 : Résultats d'un crible secondaire basé sur le système RILES/21.5p T confirmant les résultats du crible primaire.

L'activité de la luciférase a été déterminée avec le lecteur de microplaques à luminescence Mithras. Les résultats de ce crible secondaire ont permis de confirmer le profil d'activité de 5 extraits bruts de plantes de la librairie ValBioCosm : extrait sans effet par rapport au groupe témoin (*Coleus forskohlii*), candidat non-spécifique (*Eclipta alba*) et touches potentielles (*Centella asiatica* (L.), *Molinia caerulea* (L.) et *Silybum marianum* (L.) Gaertn). Les données correspondent à la moyenne à écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. (RLU: unités relatives de lumière; TGF-  1: *Transforming growth factor beta-1*; CF: *Coleus forskohlii*, EA: *Eclipta alba*, CA: *Centella asiatica* (L.), MC: *Molinia caerulea* (L.), MT: *Silybum marianum* (L.) Gaertn.).

Pour exclure définitivement les faux positifs, l'activité de la luciférase quantifiée dans chacun des puits a été normalisée, lors d'un test de validation finale, à la quantité de protéines contenue dans chacun des échantillons. Grâce à cette approche méthodique et rigoureuse, nous avons ainsi pu identifier 3 extraits bruts de plantes, à savoir *Silybum marianum* (L.) Gaertn, *Centella asiatica* (L.) et *Molinia caerulea* (L.) Moench comme régulateurs positifs de l'expression du microARN-21-5p dans les cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1 (**Figure 60**).

A noter que deux extraits bruts de plantes, *Eclipta alba* et *Iris pseudacorus* (L.) ont été également identifiées lors de cette campagne de criblage (**Figure 58** et **Figure 59**). Nous avons toutefois classé ces extraits de plantes dans la catégorie « *hits* non-spécifiques ». Ils se sont en effet distingués des 3 autres extraits de plantes par leur capacité à induire l'expression de la luciférase dans les cellules transfectées avec le pRILES contrôle, alors que ce vecteur ne contient pas de site de liaison au microARN-21-5p.

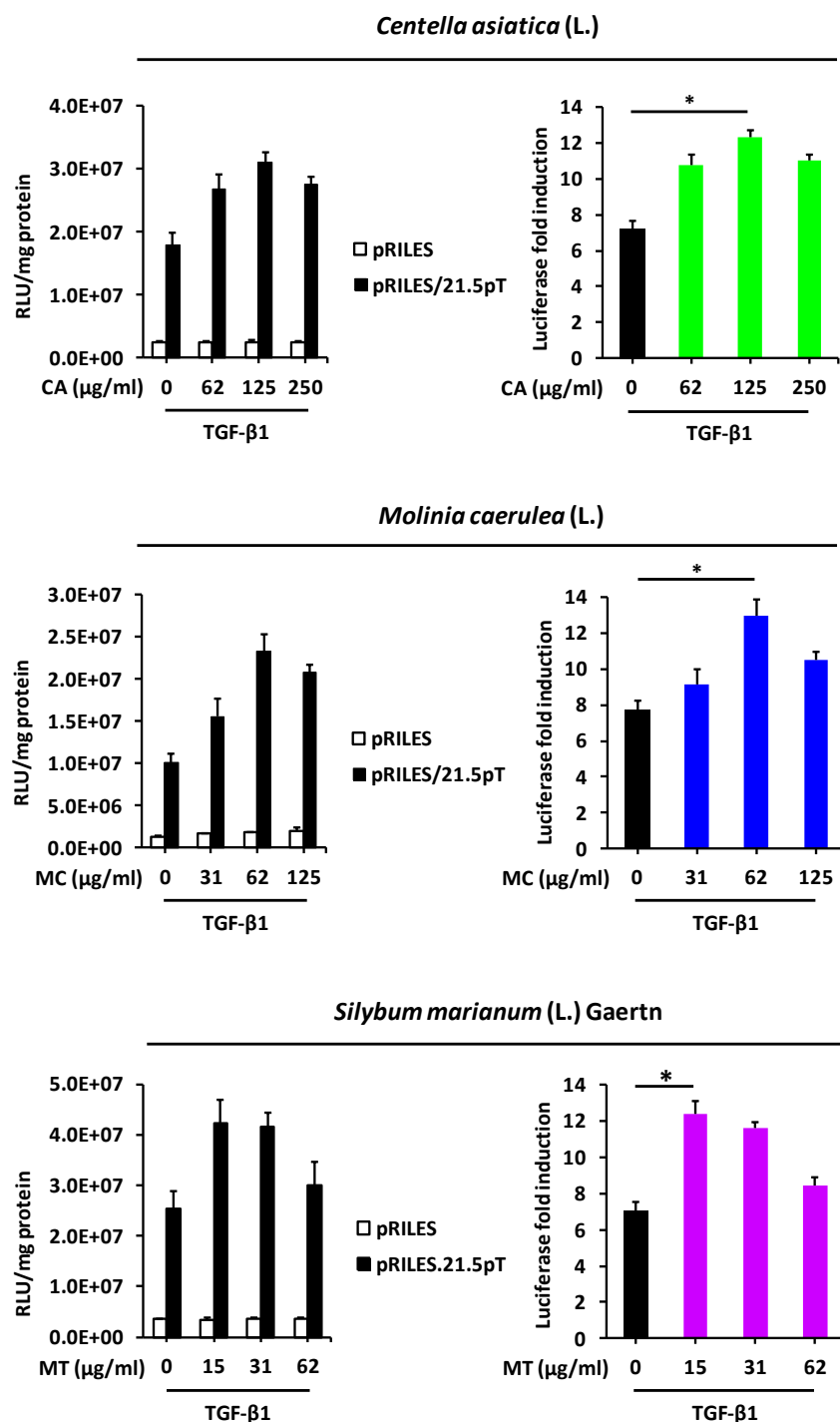


Figure 60 : Validation de la relation effet-dose des touches identifiées lors du crible primaire et secondaire.

Les cellules HaCaT ont été ensemencées sur des plaques de 24 puits, transfectées avec le pRILES ou le pRILES/21.5pT et traitées pendant 24 h par le TGF- β 1 (10 ng/mL) en présence ou absence des touches identifiées par les cribles primaires et secondaires. L'activité de la luciférase a été déterminée 48 heures après transfection dans les cellules et a été normalisée à la quantité de protéines contenues dans chacun des échantillons. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. * $P < 0.05$, t-test bilatéral. (RLU: unités relatives de lumière; TGF- β 1: *Transforming growth factor beta-1*; CA: *Centella asiatica* (L.), MC: *Molinea caerulea* (L.); MT: *Silybum marianum* (L.) Gaertn).

L'ensemble des résultats de notre stratégie de criblage en deux temps ainsi que nos tests de validation finale sont répertoriés dans la **Figure 61** et le **Tableau 17**. Le pourcentage d'extraits de plantes capables de moduler l'expression du microARN-21-5p dans les cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1 est de 8.3%.

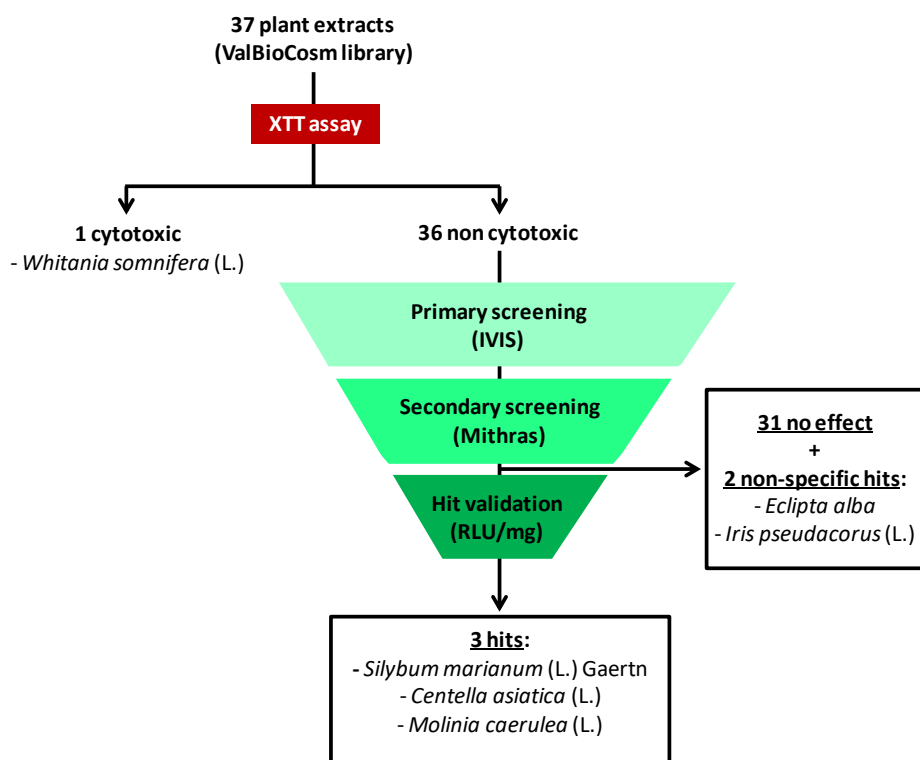


Figure 61 : Identification de 3 touches bioactives (*Silybum marianum* (L.) Gaertn., *Centella asiatica* (L.), *Molinea caerulea* (L.)) lors du criblage cellulaire RILES/21.5p T et microARN-21-5p spécifique de la librairie ValBioCosm.

Le test XTT a permis d'identifier un extrait cytotoxique (*Whitania somnifera* (L.) parmi les 37 extraits bruts inclus dans l'extractothèque ValBioCosm. Les extraits bruts non cytotoxiques ont été criblés sur des cellules HaCaT préalablement transfectées avec le pRILES ou pRILES/21.5pT dans des microplaques de 96 puits. Les touches potentielles identifiées lors du crible primaire avec le système d'imagerie par bioluminescence IVIS® Lumina II ont été criblées une seconde fois avec le lecteur de microplaques à luminescence Mithras. Pour discriminer les candidats faux-positifs des vrais-positifs, un test de validation finale des touches permettant de normaliser l'activité de la luciférase à la quantité de protéines totales (RLU/mg) dans les échantillons a été effectué. Cette stratégie séquentielle en trois temps a permis d'écarter 2 candidats non-spécifiques (*Eclipta alba* et *Iris pseudococus*) et d'identifier 3 vraies touches (*Silybum marianum* (L.) Gaertn., *Centella asiatica* L. et *Molinea caerulea* L.), soit un taux de succès de 8.3%.

Plant extract n°	Scientific name	Abbreviation	Concentration (µg/mL)	Cytotoxicity (Yes/No)	Fold induction to control		
					Primary screening (IVIS)	Secondary screening (Mithras)	Hit validation (RLU/mg)
1	<i>Achillea millefolium</i> L.	AM	15	No	1.00	1.03	
			31	No	1.02	1.00	
			62	No	1.10	1.02	
2	<i>Alchemilla vulgaris</i> L.	AV	15	No	1.03	1.05	
			31	No	1.04	1.00	
			62	No	1.01	1.00	
3	<i>Arctium lappa</i> L.	AL	15	No	1.00	1.05	
			31	No	1.20	1.08	
			62	No	1.10	1.15	
4	<i>Arnica chamassonis</i>	AC	15	No	1.13	1.02	
			31	No	1.08	1.00	
			62	No	1.02	1.00	
5	<i>Artemisia annua</i> L.	AA	15	No	1.00	1.07	
			31	No	1.09	1.15	
			62	No	1.11	1.17	
6	<i>Artemisia vulgaris</i>	ArV	15	No	1.05	1.14	
			31	No	1.02	1.07	
			62	No	1.04	1.15	
7	<i>Bacopa monnieri</i>	BM	15	No	1.22	1.31	
			31	No	1.20	1.22	
			62	No	1.13	1.20	
8	<i>Calendula officinalis</i>	CO	15	No	1.04	1.00	
			31	No	1.03	1.04	
			62	No	1.05	1.01	
9	<i>Centaurea cyanus</i>	CC	15	No	1.14	1.06	
			31	No	1.13	1.08	
			62	No	1.12	1.05	
10	<i>Centella asiatica</i> (L.)	CA	62	No	2.69	3.20	1.50
			125	No	2.67	3.10	1.71
			250	No	1.78	2.60	1.52
11	<i>Cichorium intybus</i> (L.)	CI	15	No	1.01	1.00	
			31	No	1.00	1.00	
			62	No	1.00	1.00	
12	<i>Coleus blumei</i>	CB	15	No	1.08	1.12	
			31	No	1.18	1.25	
			62	No	1.19	1.21	
13	<i>Coleus forskohlii</i>	CF	15	No	1.00	1.07	
			31	No	1.00	1.01	
			62	No	1.08	1.05	

14	<i>Cyperus esculentus</i>	CE	15	No	1.00	1.00	
			31	No	1.07	1.01	
			62	No	1.06	1.03	
15	<i>Eclipta alba</i>	EA	15	No	1.06	1.00	
			31	No	1.02	1.07	
			62	No	1.05	1.01	
16	<i>Echinacea angustifolia</i>	EcA	15	No	1.12	1.15	
			31	No	1.05	1.11	
			62	No	1.09	1.05	
17	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench	EPM	15	No	1.21	1.09	
			31	No	1.18	1.11	
			62	No	1.13	1.10	
18	<i>Gentiana lutea</i> (L.)	GL	15	No	1.01	1.14	
			31	No	1.04	1.17	
			62	No	1.08	1.09	
19	<i>Iris pseudacorus</i> (L.)	IP	15	No	1.12	1.07	
			31	No	1.15	1.18	
			62	No	1.16	1.11	
20	<i>Lamium album</i>	LA	15	No	1.08	1.00	
			31	No	1.07	1.00	
			62	No	1.00	1.00	
21	<i>Lotus corniculatus</i>	LC	15	No	1.06	1.03	
			31	No	1.04	1.06	
			62	No	1.12	1.10	
22	<i>Ludwigia grandiflorum</i>	LG	15	No	1.09	1.12	
			31	No	1.02	1.08	
			62	No	1.03	1.07	
23	<i>Luronium natans</i> (L.) Raf	LN	15	No	1.12	1.07	
			31	No	1.08	1.04	
			62	No	1.04	1.03	
24	<i>Meconopsis betonicifolia</i>	MB	15	No	1.11	1.09	
			31	No	1.08	1.05	
			62	No	1.07	1.03	
25	<i>Melissa officinalis</i> L.	MO	15	No	1.02	1.00	
			31	No	1.01	1.01	
			62	No	1.02	1.00	
26	<i>Mentha piperita</i> (L.)	MP	15	No	1.00	1.00	
			31	No	1.01	1.00	
			62	No	1.00	1.00	
27	<i>Molinia caerulea</i> (L.)	MC	31	No	1.38	1.44	1.18
			62	No	1.99	2.06	1.68
			125	No	1.48	1.49	1.35
28	<i>Physalis alkekengi</i>	PA	15	No	1.17	1.22	

			31	No	1.15	1.19	
			62	No	1.06	1.16	
29	<i>Prunus cesarus</i>	PC	15	No	1.06	1.01	
			31	No	1.08	1.02	
			62	No	1.11	1.08	
30	<i>Rosa</i>	RO	15	No	1.01	1.11	
			31	No	1.19	1.24	
			62	No	1.23	1.29	
31	<i>Salvia officinalis</i> (L.)	SO	15	No	1.00	1.00	
			31	No	1.00	1.00	
			62	No	1.00	1.00	
32	<i>Sylibum marianum</i> (L.) Gaertn	SMG	15	No	2.02	1.70	1.76
			31	No	2.43	2.00	1.65
			62	No	2.38	2.03	1.21
33	<i>Tephrosia purpurea</i>	TP	15	No	1.12	1.03	
			31	No	1.08	1.05	
			62	No	1.03	1.02	
34	<i>Trifolium pratense</i> (L.)	TP	15	No	1.14	1.09	
			31	No	1.19	1.07	
			62	No	1.03	1.05	
35	<i>Urtica dioica</i> (L.)	UD	15	No	1.02	1.01	
			31	No	1.07	1.03	
			62	No	1.09	1.00	
36	<i>Viola tricolor</i> (L.)	VT	15	No	1.06	1.15	
			31	No	1.11	1.17	
			62	No	1.10	1.09	
37	<i>Withania somnifera</i> (L.)	WS	15	Yes			
			31	Yes			
			62	Yes			

Tableau 17 : Résultats obtenus à l'issue du criblage primaire et secondaire ainsi que des tests de validation de la relation effet-dose des touches identifiées.

Nous avons décidé de focaliser la suite de nos études sur l'extrait brut de *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Chardon-Marie). En effet, le rôle fonctionnel de cet extrait de plante dans l'homéostasie de l'épiderme humain a fait l'objet d'un nombre relativement faible d'études mécanistiques précises.

4.3 Mise en évidence de l'effet de la silymarine isolée du *Silybum marianum* (L.) Gaertn sur l'activité du microARN-21-5p

Le Chardon-Marie (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) est une plante herbacée annuelle à bisannuelle de la famille des Astéracées reconnaissable à ses feuilles vert pâle et épineuses marbrées de blanc (**Figure 62A**). L'usage médicinal du Chardon-Marie remonte à plus de 2 000 ans pour le traitement d'une grande variété de pathologies du foie, de la rate et de la vésicule biliaire grâce à ses puissantes activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires (Abenavoli et al., 2010, 2018). Les effets protecteurs du Chardon-Marie ont été récemment démontrés contre les cancers, maladies neurodégénératives, auto-immunes, cardiovasculaires et métaboliques (Oi et al., 2012; Lee et al., 2013).

Les données de la littérature, de plus en plus fournies, indiquent que les vertus pharmacologiques du Chardon-Marie sont attribuées à la silymarine (SM). La SM représente à elle seule 80 % de l'ensemble des constituants de l'extrait brut des graines du Chardon-Marie (**Figure 62B**). Elle est composée d'un mélange de six flavonolignanes : silibinine (mélange de deux isomères, silibinine A et silibinine B), isosilibinine (mélange de deux isomères, isosilibinine A et isosilibinine B), silychristine, isosilychristine, silydianine et silimonine (Kim et al., 2003; Lee and Liu, 2003) (**Figure 62C**). Parmi l'ensemble de ces flavonolignanes, il a été démontré que la silibinine (SB) possède la plus grande activité biologique (Kren and Walterová, 2005).

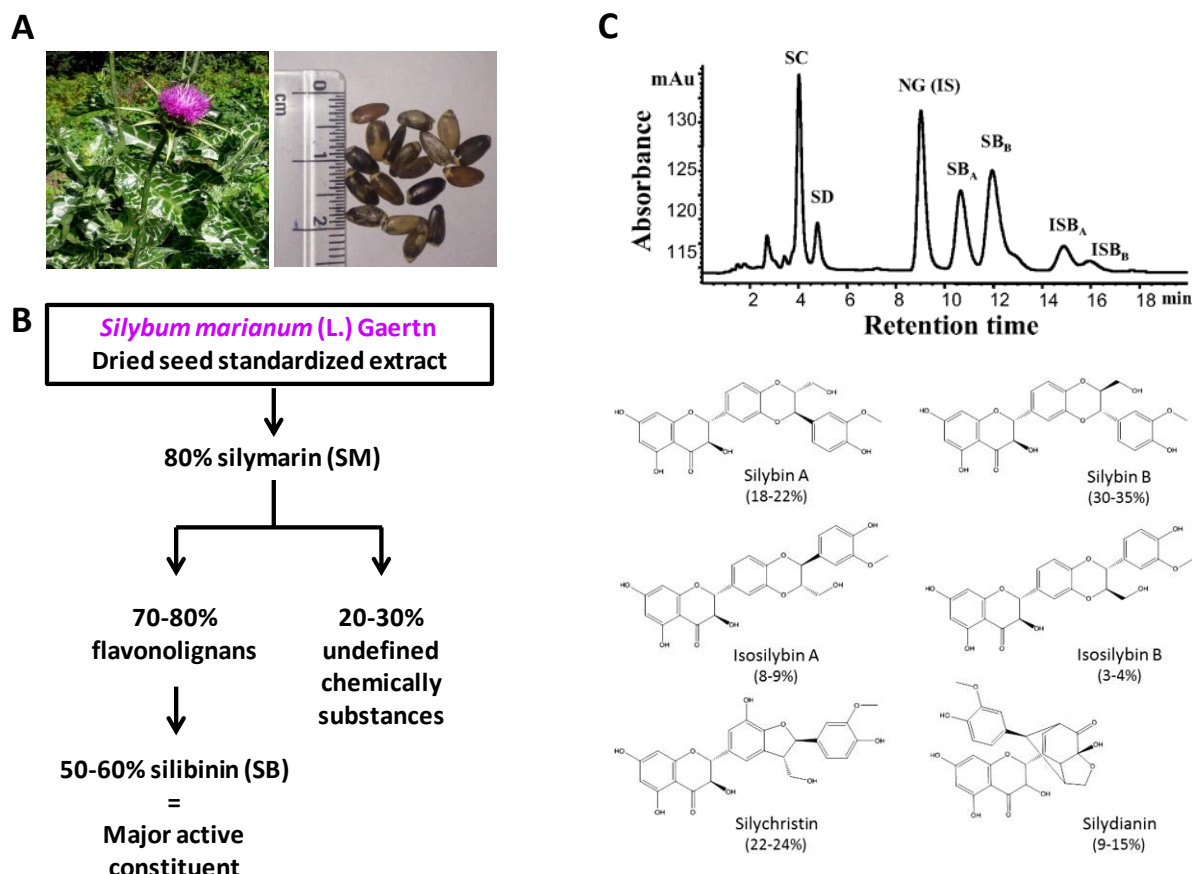
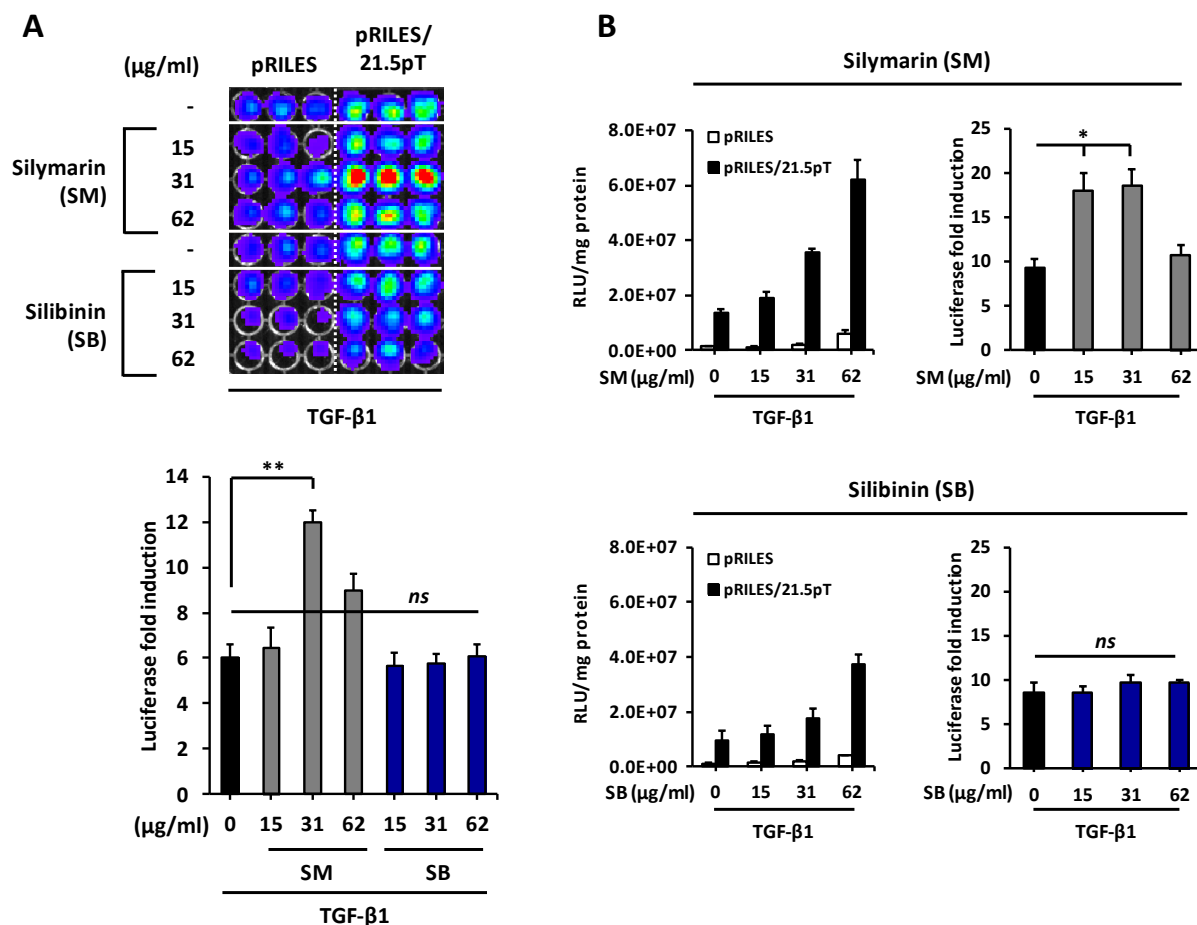


Figure 62 : Description du Chardon-Marie (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) et de la silymarine.

(A) Photographie des feuilles, de la fleur et des graines de la plante Chardon-Marie. D'après (Zonoubi et al., 2019). (B) Composition des graines du Chardon-Marie. La silymarine représente 4-6% du poids sec de la fleur de Chardon-Marie et l'extrait standardisé obtenu à partir de graines séchées de Chardon-Marie contient 80% de silymarine (SM). La silibinine (SB) est le constituant majoritaire et aussi le plus actif de la silymarine. (C) Analyse HPLC de la silymarine. D'après (Wen et al., 2008) et formules chimiques de cinq de ses flavonolignanes. (SC: silychristine; SD: silydianine; SB: silibinine; ISB : isosilibinine). D'après (K ock et al., 2013).

Nous avons donc cherché à déterminer si l'effet de l'extrait brut de *Silybum marianum* (L.) Gaertn sur l'expression du microARN-21-5p dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- 1 était dépendante de la SM, et plus précisément de la SB. Les résultats de cette analyse menée avec nos deux systèmes de quantification de l'activité de la luciférase (imageur optique IVIS[ ] Lumina II et luminomètre Lumat) indiquent que seule la SM induit l'expression de la luciférase de manière significative et dose dépendante (**Figure 63A** et **Figure 63B**).



En effet, un niveau d'induction maximum, égal à 2 fois la valeur de l'activité de luciférase mesurée dans les cellules traitées par le TGF- β 1, a été détecté dans les cellules traitées par le TGF- β 1 et la SM utilisée à la concentration de 31 μ g/mL. Pour exclure la possibilité d'une régulation de l'expression de la luciférase non-spécifique au microARN-21-5p par la SM, j'ai transfecté les cellules HaCaT avec des inhibiteurs synthétiques de ce microARN en amont du traitement des cellules par le TGF- β 1 en présence ou absence de la SM. Comme montré dans la **Figure 64**, l'inhibition de l'activité du microARN-21-5p a pour effet d'abroger complètement l'expression de la luciférase induite par le traitement des cellules par le TGF- β 1 et la SM.

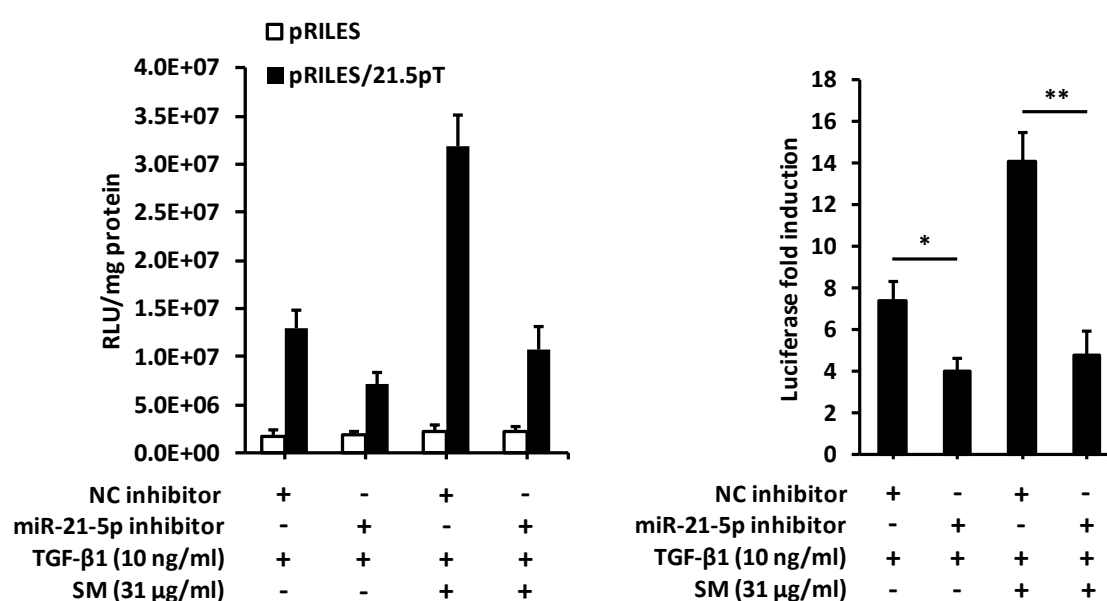


Figure 64 : L'inhibition du microARN-21-5p abroge l'activité de la luciférase induite par la silymarine dans les kératinocytes humains traités au TGF- β 1.

L'activité de la luciférase dans les cellules HaCaT co-transfectées avec le pRILES ou pRILES/21.5pT et des inhibiteurs synthétiques de microARN-21-5p ou microARN-contrôle négatif a été mesurée après 24 heures de traitement par le TGF- β 1 (10 ng/mL) en présence ou absence de silymarine (31 μ g/mL). Les valeurs en RLU ont été normalisées par rapport à la teneur en protéines totales dans les lysats cellulaires (RLU/mg). Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test bilatéral. (NC : contrôle négatif; RLU: unités relatives de lumière; TGF- β 1: Transforming growth factor beta-1; SM: silymarine).

Il est important de souligner que ni le Chardon-Marie ni la SM ne sont capables d'activer l'expression du microARN-21-5p en condition basale, c'est-à-dire en l'absence de stimulation des cellules par le TGF- β 1 (**Figure 65**).

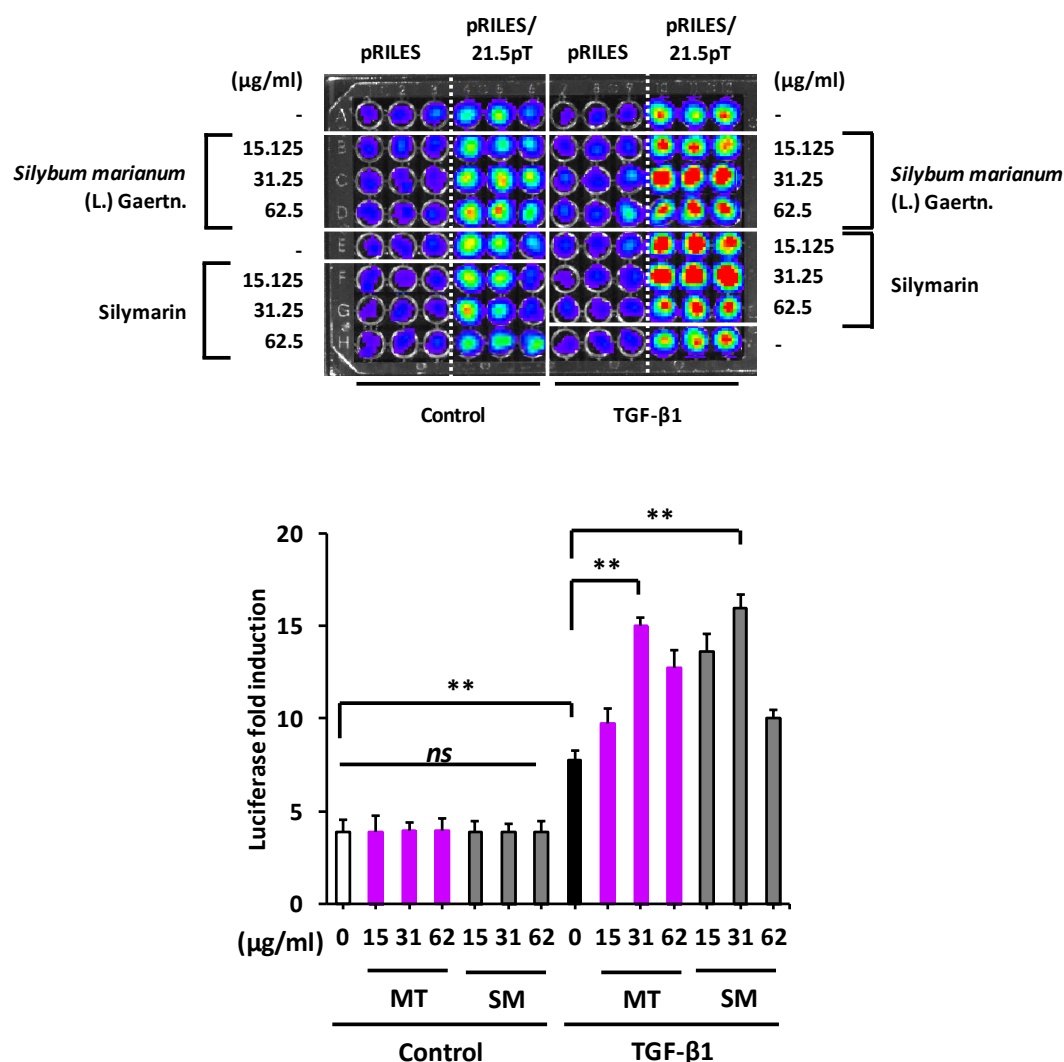


Figure 65 : L'effet de l'extrait brut de Chardon-Marie (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) et de la silymarine sur l'activité du microARN-21-5p dans les kératinocytes humains est dépendant du TGF-β1.

Les cellules HaCaT ont été transfectées avec le pRILES ou le pRILES/21.5pT puis traitées pendant 24 heures avec l'extrait brut de Chardon-Marie ou la silymarine, en présence ou absence TGF-β1 (10 ng/mL). L'activité de la luciférase a été mesurée 48 heures après transfection avec le système d'imagerie par bioluminescence IVIS® Lumina II et exprimée en niveau d'induction de l'expression de la luciférase par rapport aux cellules transfectées avec le pRILES. L'image est représentative d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires (panneau supérieur). L'histogramme correspond à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (panneau inférieur). *ns* (pas de différence statistique significative), **P*<0.05, ***P*<0.01, t-test bilatéral. (RLU: unités relatives de lumière; TGF-β1: Transforming growth factor beta-1; MT: *Silybum marianum* (L.) Gaertn.; SM: silymarine).

4.4 La silymarine inhibe l'expression des gènes cibles du microARN-21-5p dans les kératinocytes humains

Plusieurs gènes régulés par le TGF- β 1, tels que *PDCD4* (*Programmed cell death protein 4*) (Asangani et al., 2008; Yao et al., 2011; Wang et al., 2012c), *IGFBP3* (*Insulin-like growth factor binding protein-3*) (Edmondson et al., 1999; Yang et al., 2014) et *CDC25A* (*Cell division cycle 25A*) (Wang et al., 2009b) ont été validés comme des cibles directes du microARN-21-5p dans différents types cellulaires. Le *PDCD4* est un suppresseur de tumeurs capable d'interagir avec le facteur d'initiation eIF4A, conduisant à l'inhibition de la synthèse protéique (Yang et al., 2004; Zakowicz et al., 2005). Il inhibe la prolifération cellulaire, l'invasion tumorale et le développement de métastases en supprimant l'activation du facteur de transcription AP-1 et en réprimant les protéines anti-apoptotiques XIAP et Bcl-x(L) (Liwak et al., 2012). L'*IGFBP3*, quant à lui, joue un rôle majeur dans l'homéostasie de l'épiderme. Il régule la prolifération des kératinocytes basaux en inhibant l'expression du marqueur de prolifération Ki67. Il favorise ainsi la différenciation kératinocytaire (Edmondson et al., 2005; Wraight et al., 1997). Enfin, le *CDC25A* intervient dans la progression du cycle cellulaire en régulant positivement l'activité des complexes cycline/CDK par déphosphorylation des CDK1 (*Cyclin dependent kinase*), 2, 4 et 6 (Shen and Huang, 2012). Sa surexpression a été observée dans de nombreux types de cancers (Boutros et al., 2007).

Pour confirmer l'effet fonctionnel de la SM sur l'activité du microARN-21-5p induit par le TGF- β 1, j'ai évalué par RT-qPCR le niveau d'expression relatif de *PDCD4*, *IGFBP3* et *CDC25A* dans les cellules HaCaT non traitées et traitées par le TGF- β 1 (10 ng/mL) en présence ou absence de SM à la concentration finale de 31 μ g/mL. Comme attendu, le traitement des cellules par le TGF- β 1 induit une diminution de l'expression de ces gènes cibles de manière significative (**Figure 66**). De manière remarquable, le traitement des cellules par le TGF- β 1 en présence de SM a pour effet d'augmenter plus significativement le niveau de répression de deux des trois cibles transcriptomiques évaluées, *IGFBP3* et *PDCD4*, de l'ordre de 2.2 fois ($P = 0.048$) et 1.5 fois ($P = 0.009$) la valeur du contrôle obtenue avec les cellules traitées par le TGF- β 1 seul. En revanche, aucune modification significative de

l'expression relative de *CDC25A* n'est observée dans ces conditions. Ces résultats prouvent donc que la modulation de l'expression du microARN-21-5p par la SM dans les cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1 est belle et bien spécifique, et conduit à des modifications transcriptomiques dans les cellules HaCaT. Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules NHEK (**Figure 66**).

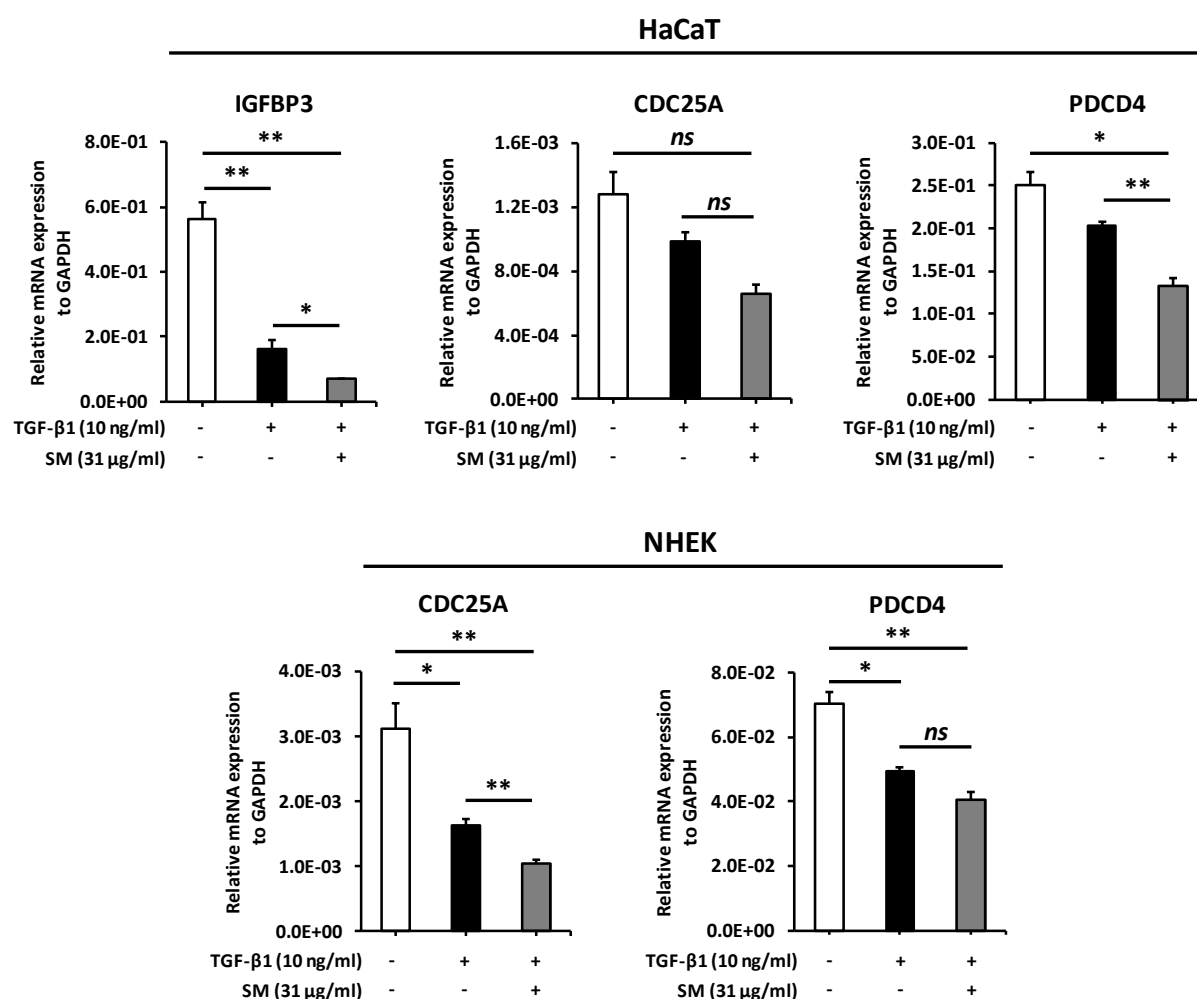


Figure 66 : La silymarine inhibe l'expression des gènes cibles du microARN-21-5p dans les kératinocytes humains traités par le TGF- β 1.

L'expression relative des gènes *IGFBP3*, *CDC25A* et *PDCD4* par rapport au gène *GAPDH* a été quantifiée par RT-qPCR dans les cellules (A) HaCaT et (B) NHEK traitées pendant 24 heures par le TGF- β 1 (10 ng/mL) en présence ou absence de silymarine (31 μ g/mL). Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes. *ns* (pas de différence statistique significative), * P <0.05, ** P <0.01, t-test bilatéral. (TGF- β 1: *Transforming growth factor beta-1*; IGFBP3: *Insulin-like growth factor binding protein-3*; CDC25A: *Cell division cycle 25A*; PDCD4: *Programmed cell death protein 4*; GAPDH: *GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase*; NHEK: *Normal human epidermal keratinocytes*).

4.5 La silymarine promeut l'incorporation du microARN-21-5p mature dans le complexe RISC

Pour déterminer à quel niveau de régulation génique s'exerçait l'activité régulatrice de la SM sur l'expression du microARN-21-5p, j'ai évalué le niveau d'expression relatif du transcrit primaire (pri-microARN-21), précurseur (pré-microARN-21) et mature (microARN-21-5p) du microARN-21 dans les cellules HaCaT en réponse au traitement par le TGF- β 1 et la SM. Les résultats de cette analyse menée par RT-qPCR indiquent, comme attendu, que le traitement des cellules par le TGF- β 1 conduit à une augmentation de l'ordre de 9-, 5- et 2- fois du niveau d'expression relatif du pri-microARN-21 ($P = 0.009$), du pré-microARN-21 ($P = 0.019$) et du microARN-21-5p mature ($P = 0.045$) (**Figure 67A**). En revanche, et de façon totalement inattendue, aucun changement significatif de l'expression de la forme mature du microARN-21-5p n'a été détecté dans ces conditions par RT-qPCR. Ces résultats sont donc en contradiction avec les données quantitatives d'expression du microARN-21-5p générées par le système RILES/21.5p T (paragraphe 4.3).

Nous avons alors cherché à comprendre les raisons de cette divergence de résultats générés par les deux systèmes de quantification d'expression du microARN-21-5p. Nous avons émis l'hypothèse que la régulation positive du microARN-21-5p par la SM pouvait s'opérer au niveau post-transcriptionnel, et notamment à l'étape de prise en charge du microARN-21-5p mature par le complexe RISC.

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai traité les cellules HaCaT par le TGF- β 1 en présence ou absence de la SM à la concentration finale de 31 μ g/mL, puis isolé les complexes RISC par immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps spécifique d'Argonaute 2 (Ago2) (Liu et al., 2004; Rand et al., 2004; Rivas et al., 2005). J'ai ensuite quantifié le taux d'enrichissement relatif du microARN-21-5p associé à la protéine Ago2 par RT-qPCR. La procédure expérimentale d'immunoprécipitation des microARNs (*RNA immunoprecipitation*, RIP) est schématisée sur la **Figure 67B**. De manière intéressante, les résultats montrent que le traitement des cellules HaCaT par le TGF- β 1 et la SM augmente par 1.92 fois la quantité de microARN-21-5p associés à la protéine Ago2 ($P = 0.026$) comparativement aux cellules traitées par le TGF- β 1 seul (**Figure 67C**). Pour s'assurer de la spécificité de ces résultats, j'ai

confirmé que cet enrichissement du microARN-21-5p dans le complexe RISC n'était pas lié à une surexpression de la protéine Ago2 induite par la SM (**Figure 67D**).

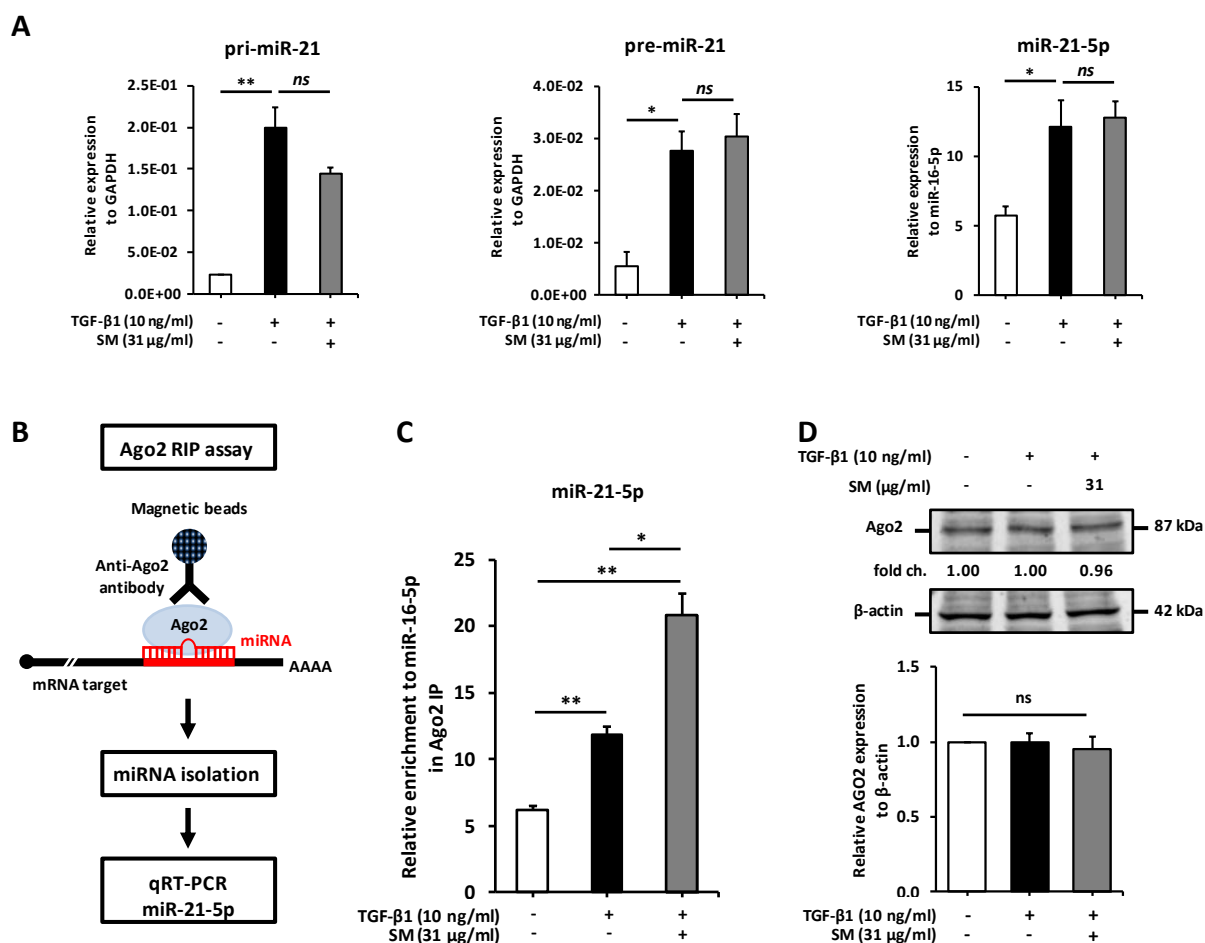


Figure 67 : La silymarine augmente l'activité du microARN-21-5p induit par le TGF-β1 dans les kératinocytes humains.

(A) L'expression relative du pri-microARN-21, pré-microARN-21 et microARN-21-5p par rapport à celle de la GAPDH et du microARN-16-5p a été quantifiée par RT-qPCR dans les cellules HaCaT traitées par le TGF-β1 (10 ng/mL) en présence ou absence de silymarine (31 μg/mL) pendant 24 heures. Les données correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. *ns* (pas de différence statistique significative), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test bilatéral. (B) Diagramme représentant la procédure d'immunoprécipitation des microARNs interagissant avec la protéine Ago2 (RIP). (C) L'enrichissement du microARN-21-5p dans le complexe RISC a été déterminé par RT-qPCR après la procédure RIP. Les données correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test bilatéral. (D) Image représentative d'un Western blot comparant le niveau d'expression de la protéine Ago2 dans les lysats de cellules HaCaT non traitées et traitées par le TGF-β1 (10 ng/mL) en présence ou absence de silymarine (31 μg/mL) pendant 24 heures. La β-actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires. L'histogramme est représentatif de l'analyse densitométrique de 3 expériences indépendantes (moyenne ± écart-type). *ns* (pas de différence statistique significative), t-test bilatéral. (TGF-β1: *Transforming growth factor beta-1*; GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; Ago2: Argonaute-2; RIP: Immunoprécipitation des complexes ribonucléoprotéiques; RISC: complexe d'inhibition par l'ARN).

Ces résultats indiquent donc que la SM augmente l'activité fonctionnelle du microARN-21-5p plutôt que son expression et sa maturation par Drosha et Dicer, en facilitant notamment son incorporation dans le complexe enzymatique RISC.

Bien que l'élucidation du mécanisme d'action moléculaire par lequel la SM stimule la prise en charge du microARN-21-5p dans le complexe RISC soit digne d'intérêt et mériterait d'être exploré plus en détail, nous avons par la suite décidé de focaliser nos travaux sur des études mécanistiques et fonctionnelles pour établir précisément les rôles biologiques joués par la SM dans le comportement des cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1. Ce choix a été guidé d'une part, par les données de la littérature qui indiquaient que les rôles de la SM dans la biologie cutanée étaient peu documentés, et d'autre part par le cahier des charges du programme ValBioCosm, qui avait pour objectif de valoriser une biomasse végétale pour une potentielle application industrielle par nos partenaires industriels Caudalie, Sederma ou encore le CDHRC.

4.6 Etudes fonctionnelles de la silymarine dans les kératinocytes humains

Les études fonctionnelles que j'ai menées pour établir la fonction biologique de la SM dans les kératinocytes humains se sont organisées en deux phases. Dans un premier temps, j'ai réalisé un ensemble de tests fonctionnels en lien avec le processus de ré-épithélialisation *in vitro*, en concentrant mes études fonctionnelles sur des études mécanistiques ciblées basées sur les données de la littérature. Dans un deuxième temps, j'ai réalisé des études mécanistiques plus poussées, guidées par des données de séquençage à haut débit du transcriptome des cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1 et la SM. Cette seconde approche, sans a priori et donc non ciblée, avait pour objectif principal d'identifier l'ensemble des réseaux de gènes régulés par la SM de façon à explorer de nouvelles pistes mécanistiques.

4.6.1 La silymarine diminue l'inflammation dans les kératinocytes

La silymarine est largement décrite pour ses propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes dans le traitement des pathologies hépatiques et dans le cancer (Agarwal et al.,

2006; Ramasamy and Agarwal, 2008; Surai, 2015). Or, à notre connaissance, aucune étude n'a encore démontré son activité anti-inflammatoire sur les kératinocytes de l'épiderme humain. J'ai par conséquent évalué le rôle anti-inflammatoire de la SM sur les cellules HaCaT stimulées pendant 24 heures par le médiateur inflammatoire soluble, TNF- α . La production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 par les cellules HaCaT en réponse au TNF- α a été quantifiée dans le surnageant de culture par un dosage ELISA. Les résultats sont présentés dans la **Figure 68A**. Ils montrent, comme attendu, que le traitement des cellules par le TNF- α (1 ng/mL) a pour effet d'activer la production d'IL-6 (65.19 +/- 5.31 pg/mL) dans le milieu de culture des kératinocytes. De manière intéressante, la stimulation des cellules HaCaT par le TNF- α en présence de SM à faible (15 μ g/mL) et forte (62 μ g/mL) concentration a pour effet de diminuer très significativement, de l'ordre de 3 fois, la quantité d'IL-6 produite par les cellules HaCaT stimulées par le TNF- α ($P < 0.01$).

J'ai poursuivi cette étude fonctionnelle en évaluant l'effet de la SM sur le taux de production de la cyclooxygénase COX-2 en réponse aux UVB. Des études ont montré que les UVB induisent l'expression de COX-2, une protéine clé dans la régulation de l'inflammation aiguë chez les kératinocytes. Les résultats de cette analyse menée par Western blot montrent que le traitement des cellules HaCaT par la SM diminue de façon significative le niveau d'expression de la protéine COX-2 en réponse aux UVB (25 mJ/cm²) (**Figure 68B**). L'effet maximal de la SM contre la production de COX-2 induite par les UVB est atteint à la concentration de 31 μ g/mL, avec une diminution de l'ordre de 2.6 fois du niveau d'expression protéique de COX-2 dans les cellules traitées par la SM comparativement aux cellules non traitées.

Il a été décrit dans la littérature qu'au-delà de l'effet délétère des UVB dans la production des protéines inflammatoires, les UVB génèrent également des ROS intracellulaires pouvant causer de sévères dommages oxydatifs au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides. J'ai cherché à établir l'effet protecteur de la SM contre le stress oxydatif induit par une élévation de ROS en réponse aux UVB. Les résultats de cette étude, menée à l'aide d'une sonde fluorescente spécifique des ROS, montrent que le prétraitement des cellules HaCaT par la SM est suffisant pour inhiber de façon significative et dose-dépendante le taux de production de ROS par les cellules HaCaT en réponse aux UVB (**Figure**

68C). L'effet maximal de la SM contre le stress oxydatif induit par les UVB est atteint à la concentration de 62 µg/mL, avec une diminution de 49 % de la production de ROS dans les cellules prétraitées par la SM comparativement aux cellules non traitées.

Sur la base de ces résultats, j'ai ensuite cherché à élucider le mode d'action moléculaire de la SM dans les réponses anti-inflammatoires décrites dans les paragraphes précédents. Il a été démontré que l'irradiation des cellules HaCaT et des kératinocytes primaires humains par de fortes doses d'UVB conduit à la surexpression du récepteur membranaire de l'IL-22 (IL-22Rα) à la surface cellulaire (Cooper and Bowden, 2007; Lewis and Spandau, 2008). Par ailleurs, la production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6 et le TNF-α, par les kératinocytes irradiés aux UVB est fortement augmentée en réponse à l'IL-22 recombinante humaine (Kim et al., 2017c). Il a récemment été montré que l'IL-22 est impliquée dans plusieurs maladies cutanées inflammatoires chroniques et aiguës, telles que le psoriasis et le vitiligo, et que son niveau d'expression corrèle avec la sévérité de la maladie (Boniface et al., 2005; Ma et al., 2008; Dong et al., 2017). Une fois produite par les lymphocytes T CD4⁺ et les cellules *Natural Killer* (NK) activées, l'IL-22 se lie à son récepteur IL-22Rα et, active la voie de signalisation intracellulaire dépendante de NF-κB. La translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB conduit à l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse immune dont l'IL-6, TNF-α et COX-2 (Libermann and Baltimore, 1990; Kim et al., 2009a). J'ai donc cherché à déterminer si l'activité anti-inflammatoire de la SM sur les kératinocytes pouvait être liée à sa capacité à inhiber l'activité transcriptionnelle de NF-κB. Pour cela, les cellules HaCaT ont été transfectées avec le plasmide rapporteur pNF-CMV-luc exprimant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur contenant un site de liaison pour NF-κB (Gonçalves et al., 2009). Après 24 heures de stimulation par 50 ng/mL d'IL-22 en présence ou absence de différentes concentrations de SM, l'expression de la luciférase a été quantifiée. Les résultats montrent une diminution dose-dépendante significative de l'activité de la luciférase dans les cellules HaCaT traitées par l'IL-22 et la SM par rapport à celle mesurée dans les cellules stimulées par l'IL-22 seule (**Figure 68D**). L'effet inhibiteur maximum de la SM sur l'activité transcriptionnelle de NF-κB est observé à la concentration de 31 µg/mL, et conduit à une diminution de l'ordre de 2 fois de la valeur de l'activité de la luciférase quantifiée dans les cellules stimulées par l'IL-22 seule.

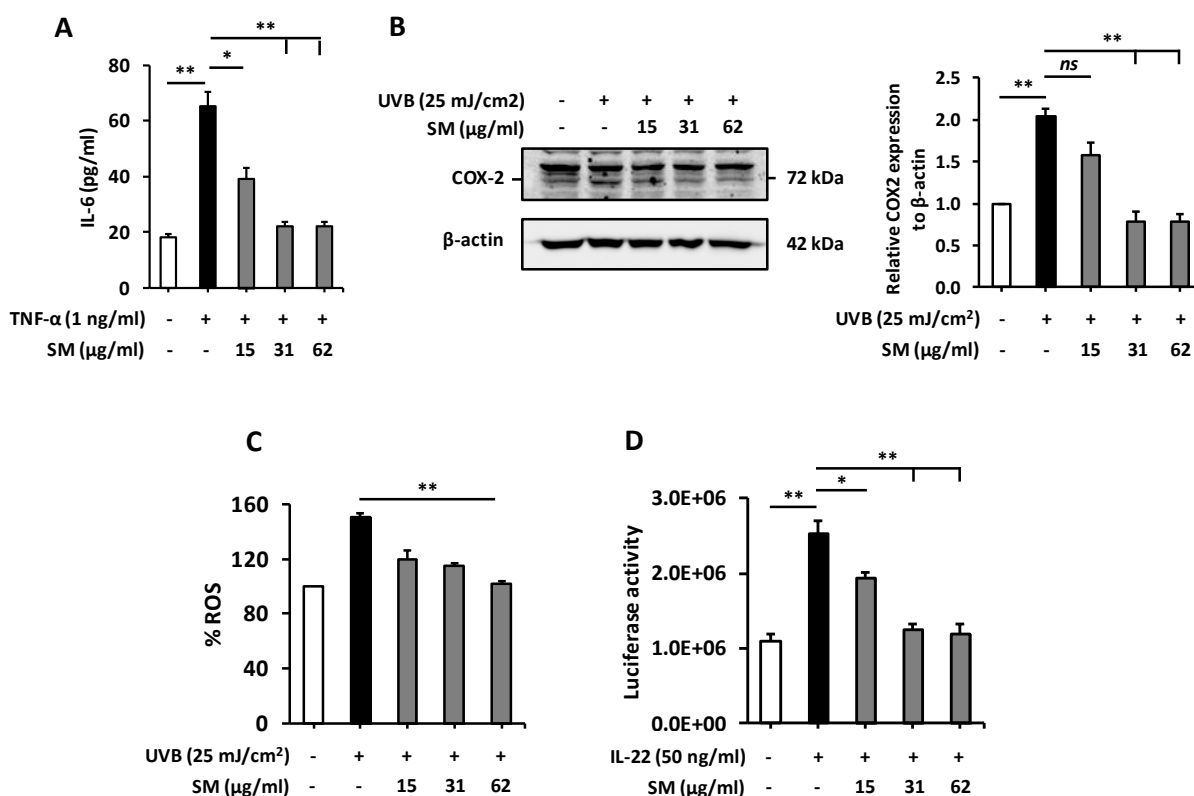


Figure 68 : La silymarine inhibe les réponses pro-inflammatoires induites par le TNF- α , l'IL-22 et les UVB dans les kératinocytes humains.

(A) La production d'IL-6 en réponse à la stimulation des cellules HaCaT par le TNF- α (1 ng/mL) en présence ou absence de différentes concentrations de silymarine a été évalué dans le milieu conditionné après 24 heures de traitement par un dosage ELISA. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. * P <0.05, ** P <0.01, t-test bilatéral. (B) L'expression de la protéine COX-2 par rapport à la β -actine (contrôle de charge) a été analysée par Western blot dans les lysats cellulaires de cellules HaCaT irradiées aux UVB (25 mJ/cm²) puis traitées avec différentes concentrations de silymarine pendant 8 heures. Les résultats de Western blot sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires (panneau de gauche). L'histogramme est représentatif de l'analyse densitométrique de 3 expériences indépendantes (moyenne $\pm$ écart-type) (panneau de droite). ns (pas de différence statistique significative), ** P <0.01, t-test bilatéral. (C) La formation de ROS intracellulaires a été déterminée dans les cellules HaCaT prétraitées pendant 6 heures avec différentes concentrations de silymarine puis irradiées aux UVB (25 mJ/cm²). Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. ** P <0.01, * P <0.05, t-test bilatéral. (D) L'activité du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules HaCaT transfectées avec le plasmide rapporteur exprimant le gène de la luciférase sous contrôle du NF- κ B a été mesurée après 24 h de stimulation par l'IL-22 (50 ng/mL) en présence ou absence de différentes concentrations de silymarine pendant 24 heures. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. * P <0.05, ** P <0.01, t-test bilatéral. (TGF- β 1: *Transforming growth factor beta-1*; SM: Silymarine; TNF- α : *Tumor necrosis factor-alpha*; UVB: Ultraviolets B; COX-2: Cyclooxygénase-2; IL-22: Interleukine-22; NF- κ B: *Nuclear factor-kappa B*).

L'ensemble de ces résultats indique par conséquent que la SM est dotée de propriétés anti-inflammatoires, en régulant négativement l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les kératinocytes et en protégeant ces cellules contre l'effet délétère des ROS. A l'échelle moléculaire, nous mettons en évidence que l'effet protecteur de la SM s'exerce à minima au niveau de la voie de signalisation intracellulaire sous contrôle de NF- κ B. Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour élucider les mécanismes moléculaires précis mis en jeu.

4.6.2 La silymarine inhibe la migration des kératinocytes via la suppression du processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) induit par le TGF- β 1

Etant donné que notre stratégie de criblage s'inscrivait dans un contexte de ré-épithélialisation des plaies cutanées, mimé en partie par le traitement des cellules HaCaT par le TGF- β 1, nous avons cherché ensuite à établir l'effet de la SM sur la migration des kératinocytes ainsi que d'autres événements cellulaires en lien avec cette étape clé du processus de cicatrisation cutanée (Hebda, 1988). Dans un premier temps, j'ai réalisé un test de cicatrisation de blessure *in vitro*, également connu sous le nom de « *Scratch assay* », pour évaluer l'effet de SM sur le potentiel migratoire des cellules HaCaT. Mes résultats confirment les données de la littérature, notamment l'effet potentialisateur du TGF- β 1 sur la vitesse de migration des kératinocytes. En effet le traitement des cellules par le TGF- β 1 (10 ng/mL) a pour effet d'accélérer considérablement la migration des cellules HaCaT en comparaison des cellules contrôles, non stimulées par le TGF- β 1 (+56.24 % à 24 heures ; $P = 0.001$). En revanche, et de façon surprenante, le traitement des cellules par le TGF- β 1 en présence de la SM utilisée à la concentration de 31 μ g/mL a pour effet d'inhiber la migration des kératinocytes induite par le TGF- β 1, et ceci dès les premières heures suivant la création de la brèche (-50.78 % à 24 h ; $P = 0.0085$) (**Figure 69A** et **Figure 69B**).

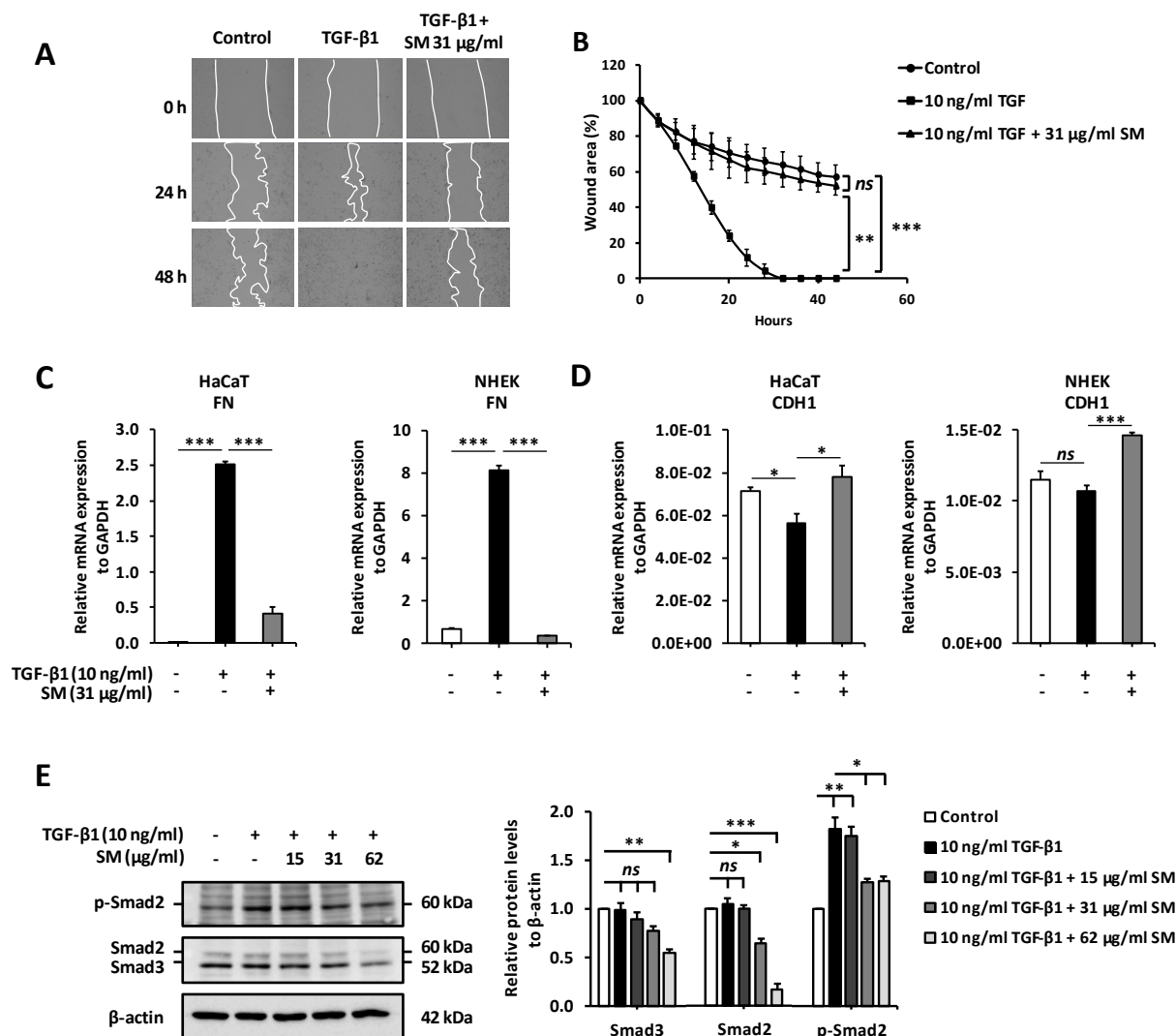


Figure 69 : La silymarine abroge la migration des kératinocytes en régulant négativement la voie canonique du TGF- 1 et l'expression des gènes impliqués dans l'EMT.

(A) Des tests de cicatrisation de blessure *in vitro* ont été réalisés sur des cellules HaCaT ayant atteint une confluence de 100%. Après avoir rayé le tapis cellulaire, les cellules ont été traitées par du TGF- 1 (10 ng/mL) en présence ou absence de silymarine (31  g/mL) pendant 48 heures. La migration des kératinocytes a été suivie en temps réel avec un vid omicroscope. Les photographies ont été prises juste avant et 24 et 48 heures après le début du test de cicatrisation des blessures. Les résultats sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires. Les lignes en pointillées de couleur blanche indiquent la zone cicatricielle. (B) L'aire de la blessure a été calculée avec le logiciel ZEN 2.3 SP1, Zeiss. Les données correspondent à la moyenne à écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. *ns* (pas de différence statistique significative), ***P*<0.01, ****P*<0.001, t-test bilatéral. (C) L'expression relative du gène *FN* et (D) *CDH1* par rapport à celui de *GAPDH* a été quantifiée par RT-qPCR dans les cellules HaCaT et NHEK traitées par le TGF- 1 (10 ng/mL) en présence ou absence de silymarine (31  g/mL) pendant 24 heures. Les données correspondent à la moyenne à écart-type de 3 expériences indépendantes. *ns* (pas de différence statistique significative), **P*<0.05, ****P*<0.001, t-test bilatéral. (E) L'expression de la protéine p-Smad2, Smad2 et Smad3 totale par rapport à la  -actine (contrôle de charge) a été analysée par Western blot dans les lysats de cellules HaCaT traitées par le TGF- 1 (10 ng/mL) en présence ou

absence de différentes concentrations (15, 31, 62 $\mu\text{g/mL}$) de silymarine pendant 1 heure. Les résultats de Western blot sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires. (panneau de gauche). L'histogramme est représentatif de l'analyse densitométrique de 3 expériences indépendantes (moyenne $\pm$ écart-type) (panneau de droite). *ns* (pas de différence statistique significative), $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, t-test bilatéral. (EMT: Transition épithélio-mésenchymateuse; TGF- β 1: *Transforming growth factor beta-1*; GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; FN: Fibronectine; CDH1: E-cadhérine; p-Smad2 : Smad2 phosphorylée; NHEK: *Normal human epithelial keratinocytes*; SM: Silymarine).

J'ai par conséquent cherché à déterminer si la SM pouvait bloquer la migration cellulaire via l'inhibition de la phase de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) induite par le TGF- β 1 (Xu et al., 2009). Les expressions relatives des gènes *CDH1* (*E-cadherin*) et *FN* (*Fibronectin*), choisis respectivement comme marqueur du phénotype épithélial et mésenchymateux, ont été évaluées par RT-qPCR. Mes résultats confirment que l'augmentation du potentiel migratoire des cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1 est directement corrélée avec une augmentation relative de l'expression du gène *FN* (177.1 fois sur-régulé, $P < 0.001$) et une diminution de l'expression du gène *CDH1* (1.3 fois sous-régulé, $P < 0.05$). En revanche, le traitement des cellules par le TGF- β 1 et la SM a pour effet de diminuer par 6.1 fois ($P < 0.001$) l'expression du gène *FN* et de restaurer par 1.4 fois ($P < 0.05$) l'expression du gène *CDH1* (**Figure 69C**). Des résultats similaires ont été obtenus avec les kératinocytes primaires NHEK (**Figure 69D**).

Il a été démontré que la voie canonique du TGF- β , faisant intervenir les protéines Smad, régule le processus de TEM chez les kératinocytes (Levy and Hill, 2005; Shi and Massagué, 2003). J'ai par conséquent évalué l'effet de la SM sur l'activation de cette voie de signalisation en analysant le niveau de phosphorylation des protéines Smad2/3. Les cellules HaCaT ont été traitées par le TGF- β 1 en présence ou absence de différentes concentrations de SM pendant 1 heure, avant d'être lysées dans un tampon de lyse approprié pour maintenir les niveaux de phosphorylation des protéines intracellulaires. Les profils de phosphorylation des protéines Smad2/3 ont ensuite été évalués par Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques. Les résultats présentés dans la **Figure 69E** montrent que le traitement des cellules avec la SM a pour effet de diminuer de manière significative et dose dépendante le niveau d'expression des protéines Smad2 et Smad3 induit par le TGF- β 1, réduisant par la même occasion le niveau de phosphorylation de Smad2. Une diminution

maximale égale à 6.5 fois ($P < 0.001$) et 1.8 fois ($P < 0.01$) du niveau d'expression de la protéine Smad2 et Smad3, a été observée dans les cellules traitées par le TGF- β 1 en présence de la SM utilisée à la concentration de 62 $\mu\text{g/mL}$ comparativement aux cellules traitées par le TGF- β 1 seul. L'effet maximal de la SM sur l'inhibition du niveau de phosphorylation de Smad2 induite par le TGF- β 1 a été observé à la concentration de 31 $\mu\text{g/mL}$, et se caractérise par une diminution de l'ordre de 30 % du taux de Smad2 phosphorylée quantifié dans les cellules traitées par le TGF- β 1 seul. Au-delà de cette concentration, aucune inhibition supplémentaire du niveau de la phosphorylation de Smad2 n'est observée dans les kératinocytes.

Pour exclure la possibilité d'une capture de la protéine TGF- β 1 par la SM lors de son ajout dans le milieu de culture ou encore un effet inhibiteur par encombrement stérique de la SM lors de la liaison du TGF- β 1 sur son récepteur membranaire TGF β RII, j'ai répété cette même étude mais en traitant cette fois-ci les cellules par le TGF- β 1 pendant 6 heures avant de renouveler le milieu de culture par la SM utilisée à la concentration de 31 $\mu\text{g/mL}$. La **Figure 70A** est une illustration schématisée des différents scénarii envisagés. Pour vérifier ces hypothèses, j'ai évalué l'expression relative du gène *FBN* dans les cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1 et la SM (**Figure 70B**). Les résultats de cette étude menée par RT-qPCR montrent que le traitement des cellules HaCaT par le TGF- β 1 pendant 6 heures est suffisant pour activer la voie de signalisation intracellulaire du TGF- β . L'ajout de la SM dans le milieu de culture a eu pour effet de diminuer de l'ordre de 42 fois ($P < 0.001$) le niveau d'expression relative de *FBN*. Ces résultats indiquent donc que l'effet inhibiteur de la SM sur la migration des cellules est dépendante d'une inhibition de la voie de signalisation du TGF- β 1 par un mécanisme d'action intracellulaire et non pas extracellulaire (**Figure 70C**).

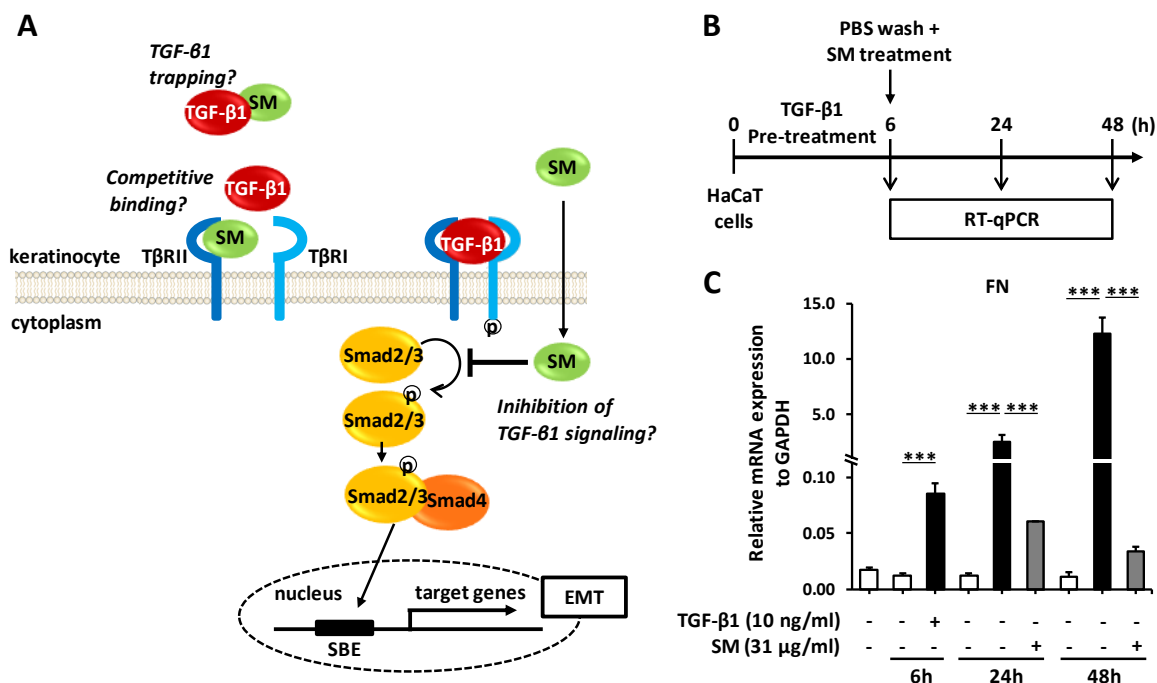


Figure 70 : Confirmation de l'activité intracellulaire de la silymarine sur l'inhibition de l'EMT induite par le TGF-β1 dans les kératinocytes humains.

(A) Schéma représentant les différents scénarii envisagés concernant le mécanisme d'action de la silymarine sur l'inhibition du processus de l'EMT. La silymarine peut soit (i) capturer le TGF-β1 dans le milieu de culture et empêcher sa liaison à son récepteur membranaire de type II, soit (ii) agir comme un inhibiteur compétitif du TGF-β1 en se fixant à son récepteur membranaire de type II, soit (iii) perturber la voie de signalisation du TGF-β1 au niveau intracellulaire. (B) Schéma de la démarche expérimentale suivie pour confirmer l'activité intracellulaire de la silymarine sur la voie de signalisation du TGF-β1. Les cellules HaCaT ont été prétraitées en présence ou absence de TGF-β1 pendant 6 heures puis les cellules ont été lavées trois fois au PBS avant de renouveler le milieu de culture par du milieu sans TGF-β1 en présence ou absence de silymarine (31 μg/mL). Les cellules ont été récoltées à différents temps (6, 24 et 48 heures). (C) Quantification de l'expression relative du gène *FN* par rapport à la *GAPDH* au cours du temps par RT-qPCR. Les données correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. *** $P < 0.001$, t-test bilatéral. (TGF-β1: *Transforming growth factor beta-1*; SM: Silymarine; SBE: Sites de liaison aux protéines Smads; FN: Fibronectine; GAPDH: Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase)

4.6.3 La silymarine participe au remodelage de la MEC

J'ai poursuivi les études fonctionnelles et mécanistiques en lien avec la ré-épithélialisation des plaies cutanées en évaluant le niveau d'expression relatif des gènes impliqués dans le remodelage de la MEC. Plusieurs études ont rapporté la surexpression transitoire du gène codant la protéase MMP3 par les kératinocytes aux marges des plaies cutanées durant la phase de ré-épithélialisation (Saarialho-Kere et al., 1994; Madlener et al., 1998; Caley et al., 2015). La MMP3 participe notamment à la dégradation des collagènes de type II, III, IV, VII, IX et X, la laminine, des protéoglycans et l'E-cadhérine, favorisant ainsi la migration des kératinocytes vers le foyer lésionnel. Les résultats présentés dans la **Figure 71A** et **Figure 71B** montrent qu'après 24 heures de traitement, l'expression du gène *MMP-3* induite par le TGF- β 1 est diminuée de l'ordre de 4.1 fois ($P < 0.05$) dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 et la SM utilisée à la concentration de 31 μ g/mL alors que l'expression de *TIMP-3* est, elle, augmentée de l'ordre de 1.3 fois ($P < 0.05$), comparativement aux cellules traitées par le TGF- β 1 seul. Des résultats similaires ont été obtenus avec les kératinocytes primaires NHEK (**Figure 71A** et **Figure 71B**).

Ces résultats nous ont amenés à évaluer l'effet de SM dans la production des ligands de la MEC. J'ai par conséquent quantifié le niveau d'expression relatif des gènes codant des enzymes responsables de la synthèse d'acide hyaluronique et de la réticulation des fibres de collagène. Les résultats de RT-qPCR montrent que les taux d'ARNm de *HAS3* (*Hyaluronan synthase 3*) et *LOXL2* (*Lysyl-oxydase like 2*) sont respectivement 2.0 et 3.5 fois plus élevés dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 en présence de la SM comparativement aux cellules contrôles, traitées par le TGF- β 1 seul (**Figure 71C** et **Figure 71D**). Des résultats similaires ont été obtenus avec les kératinocytes primaires NHEK (**Figure 71C** et **Figure 71D**).

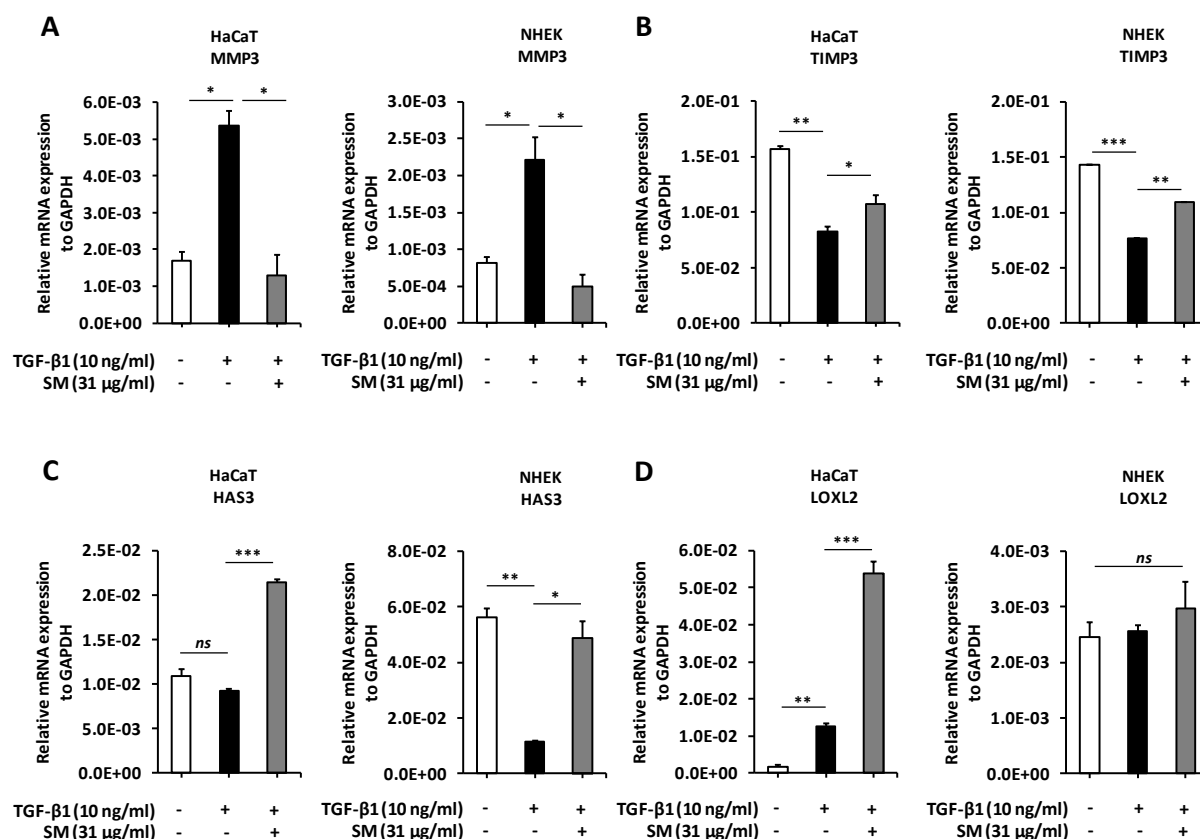


Figure 71 : La silymarine régule l'expression de gènes codant des enzymes impliquées dans le remodelage de la MEC, la synthèse d'acide hyaluronique et la réticulation des fibres de collagène dans les kératinocytes humains.

L'expression relative des gènes (A) *MMP3*, (B) *TIMP3*, (C) *HAS3* et (D) *LOXL2* par rapport à *GAPDH* a été quantifiée par RT-qPCR dans les cellules HaCaT et NHEK traitées pendant 24 heures par le TGF- 1 (10 ng/mL) en présence ou absence de silymarine (31  g/mL). Les données correspondent à la moyenne à écart-type de 3 expériences indépendantes. *ns* (pas de différence statistique significative), **P*<0.05, ***P*<0.01, t-test bilatéral. (TGF- 1: *Transforming growth factor beta-1*; MMP3: M talloprot ine matricielle 3; TIMP3: Inhibiteur tissulaire de la métalloprotéine 3; HAS3: Hyaluronane synthase 3; LOXL2: *Lysyl oxidase-like 2*; GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; NHEK: *Normal human epidermal keratinocytes*).

Par ailleurs, le traitement des cellules HaCaT par le TGF- β 1 et la SM a eu également pour effet d'augmenter de l'ordre de 30 % la production de collagènes par rapport aux cellules stimulées par le TGF- β 1 seul (**Figure 72**).

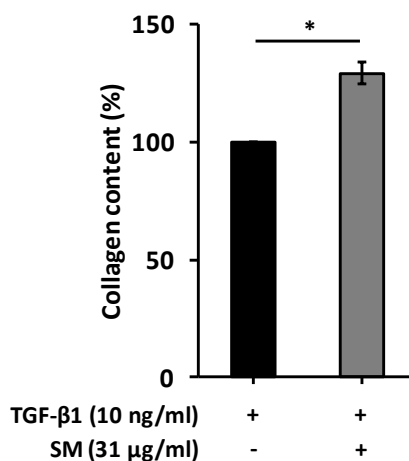


Figure 72 : La silymarine augmente la synthèse de collagène par les kératinocytes.

L'ensemble de ces résultats indiquent donc, qu'en dépit de son effet inhibiteur sur la migration des kératinocytes, la SM semble être capable de stimuler la synthèse de collagène et d'acide hyaluronique pouvant contribuer ainsi à la réparation cutanée.

4.6.4 Etude de l'effet de la silymarine sur les kératinocytes humains par analyse transcriptomique à haut débit (RNA-seq)

Comme explicité auparavant, nous avons privilégié dans un deuxième temps une analyse globale à haut débit du transcriptome des cellules HaCaT en réponse au traitement par le TGF- β 1 et la SM. Cette étude, non biaisée par les données de la littérature déjà publiées, devait nous permettre d'attribuer de nouvelles fonctions biologiques à la SM.

La distribution des gènes différentiellement exprimés dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 et la SM comparativement aux cellules traitées par le TGF- β 1 seul est représentée sous forme de volcano plot dans la **Figure 73A**. Les résultats indiquent que 605 gènes sont différentiellement exprimés par au moins 2 fois dans les cellules traitées par le TGF- β 1 et la SM par rapport aux cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 seul ; avec une

proportion de 434 gènes sous-exprimés et 171 gènes surexprimés ($1 < \log_2\text{FoldChange} < -1$; p-valeur corrigée < 0.01). La **Figure 73B** recense les 20 gènes les plus différentiellement surexprimés ($\log_2\text{FoldChange} > 1$, p-valeur corrigée < 0.01) et sous-exprimés ($\log_2\text{FoldChange} < -1$, p-valeur corrigée < 0.01) entre les deux conditions, avec des valeurs de $\log_2\text{FoldChange}$ comprises entre -5.9 et 4.8.

La visualisation par *heatmap* des 605 gènes les plus différentiellement exprimés a permis de révéler que l'amplitude de régulation génique de la majorité de ces gènes est modérée, avec un $\log_2\text{FoldChange}$ moyen de 1.4 pour les gènes surexprimés et de -1.6 pour les gènes sous-exprimés, bien que certains d'entre eux atteignent des niveaux de régulation élevés (**Figure 73C**). En effet, parmi les 171 gènes surexprimés dans les cellules traitées par le TGF- β 1 et la SM, 83.6 % d'entre eux sont sur-régulés entre 2 et 4 fois ($1 < \log_2\text{FoldChange} < 2$), 14.1 % de gènes sont sur-régulés entre 4 et 8 fois ($2 < \log_2\text{FoldChange} < 3$) et 2.3 % de gènes sont sur-régulés entre 8 et 28 fois ($3 < \log_2\text{FoldChange} < 4.8$). A l'inverse, parmi les 434 gènes sous-exprimés dans les cellules traitées par le TGF- β 1 et la SM, 74.9 % d'entre eux sont sous-régulés entre 2 et 4 fois ($-2 < \log_2\text{FoldChange} < -1$), 17.1 % de gènes sont sous-régulés entre 4 et 8 fois ($-3 < \log_2\text{FoldChange} < -2$) et 8.1 % de gènes sont sous-régulés entre 8 et 60 fois ($-5.9 < \log_2\text{FoldChange} < -3$) (**Figure 73D**).

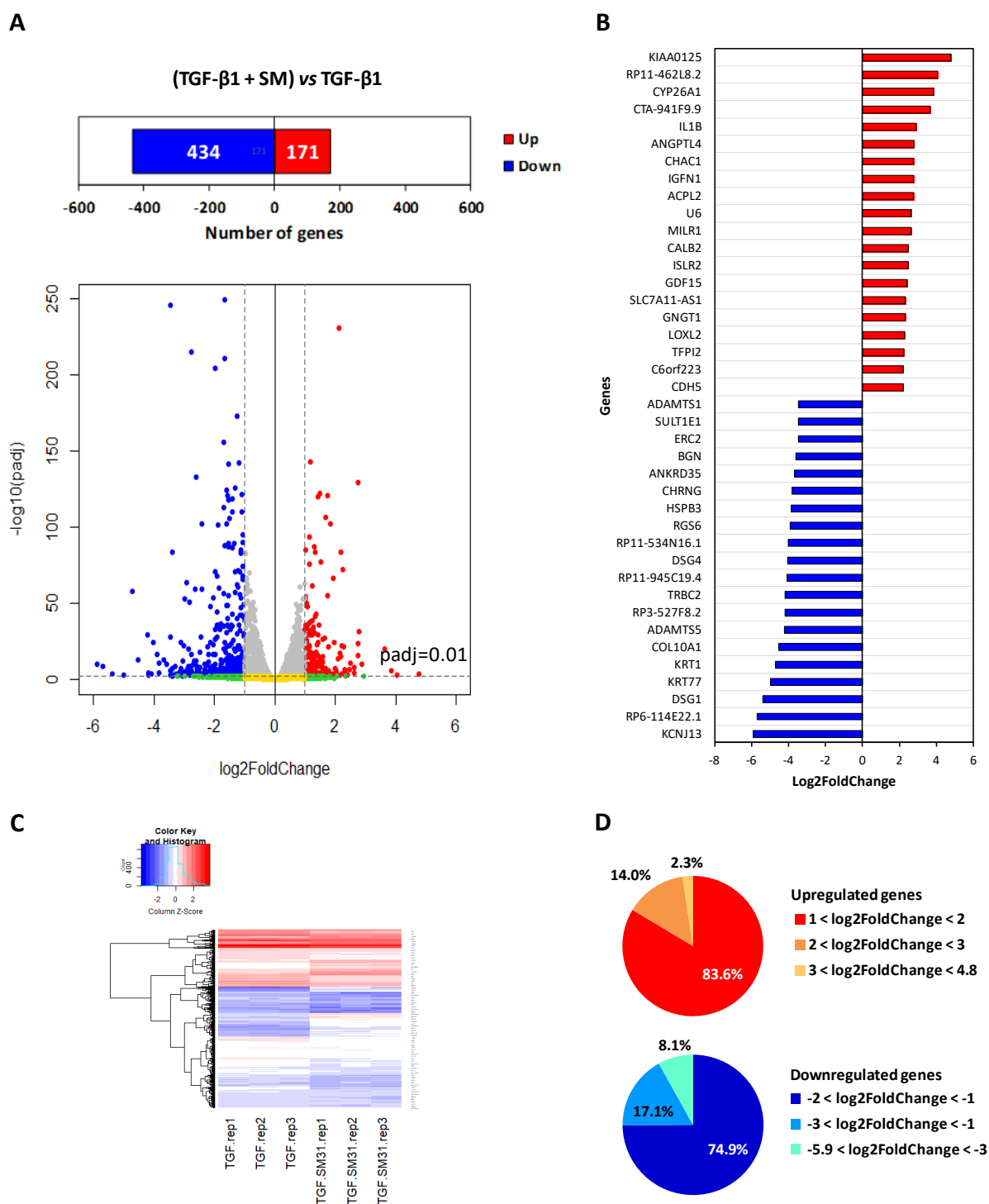


Figure 73 : Résultats de l'analyse différentielle de l'expression des gènes extraits des cellules traitées par le TGF- β 1 et la silymarine *versus* cellules traitées par le TGF- β 1 seul.

Les cellules HaCaT ont été traitées par le TGF- β 1 (10 ng/mL) en présence ou absence de silymarine (31 μ g/mL) pendant 24 heures (3 réplicats biologiques par conditions). Les ARN totaux ont été extraits, rétro-transcrits en ADNc simple brin puis double brin avant d'être amplifiés et séquencés avec la technologie du RNA-seq. (A) Visualisation sous forme de Volcano plot de l'ensemble des DEG entre les deux conditions. Chaque point représente un DEG. L'axe des abscisses correspond au log2(FoldChange) tandis que l'axe des ordonnées correspond au $-\log_{10}(\text{p-valeur ajustée})$. La ligne

horizontale en pointillés délimite le seuil de p-valeur ajustée fixé ($p_{adj}=0.01$) et les lignes verticales en pointillés marquent le $\log_2\text{FoldChange} \pm 1$. Les points rouges représentent les gènes significativement surexprimés (p -valeur ajustée < 0.01 et $\log_2\text{FoldChange} > 1$) et les points bleus représentent les gènes significativement sous-exprimés (p -valeur ajustée < 0.01 et $\log_2\text{FoldChange} < -1$). (B) Liste des 20 DEG les plus significativement surexprimés et sous-exprimés entre les deux conditions en fonction de leur valeur de $\log_2\text{FoldChange} \pm 1$ et p -valeur ajustée < 0.01 . (C) Heatmap des DEG significativement surexprimés ($n = 171$) et sous-exprimés ($n = 434$) entre les deux conditions. (D) Diagramme circulaire représentant la proportion de gènes significativement surexprimés ($n = 171$) et sous-exprimés ($n = 434$) entre les deux conditions en fonction de leur niveau de régulation en $\log_2\text{FoldChange}$. (RNA-seq: séquençage de l'ARN; DEG : *Differentially expressed genes*, p_{adj} : p-valeur ajustée après correction des tests multiples).

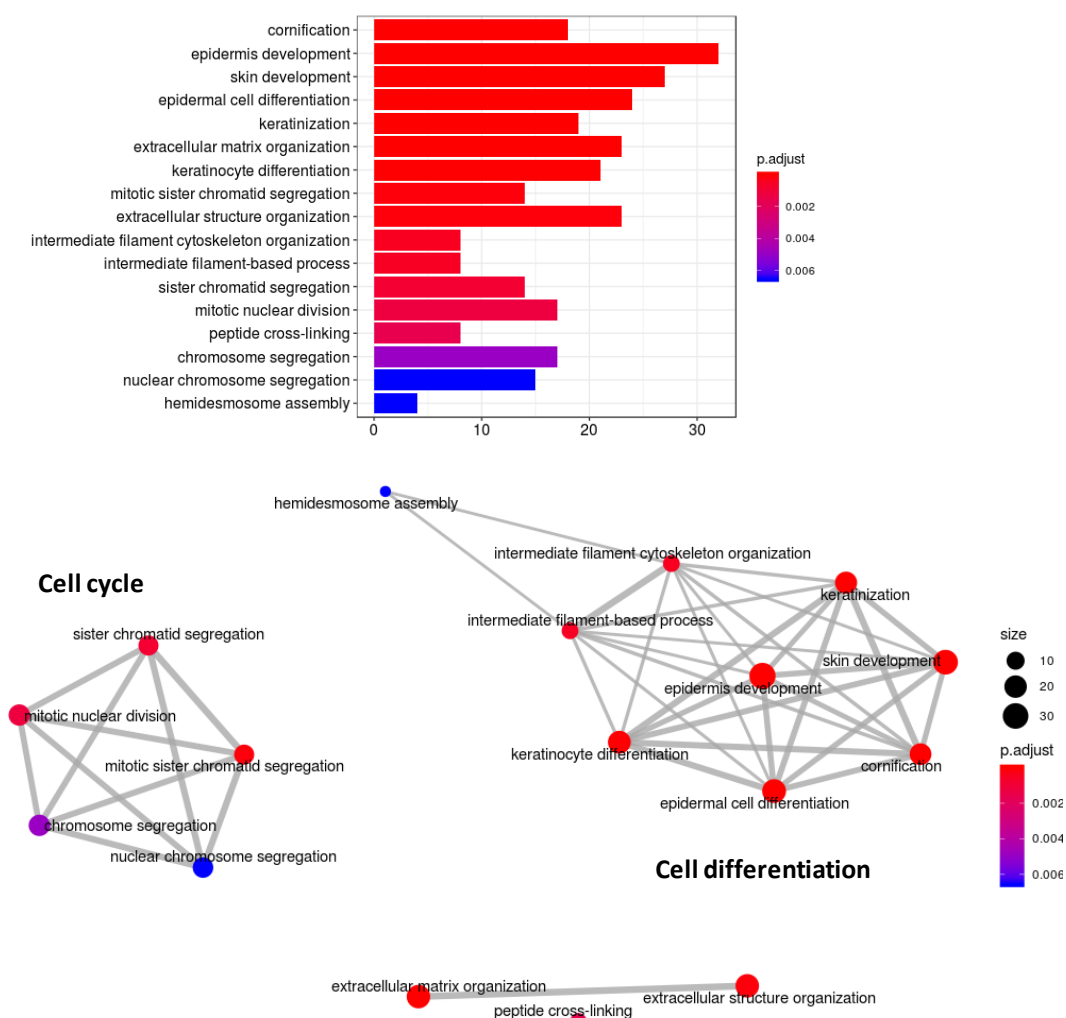
Afin de pouvoir appréhender les fonctions biologiques associées à cet ensemble de gènes différentiellement exprimés dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 et la SM comparativement aux cellules traitées par le TGF- β 1, une analyse fonctionnelle des gènes a été réalisée à l'aide d'outils bioinformatiques.

Celle-ci repose sur l'annotation des gènes différentiellement exprimés avec l'ontologie GO (*Gene Ontology*) grâce à des bases de données. Plutôt que de simplement lister les fonctions biologiques associées à chacun de ces gènes pris individuellement, l'analyse fonctionnelle permet de calculer la probabilité que la totalité ou une partie des gènes annotés dans les bases de données avec un terme GO spécifique de l'ontologie BP (*Biological process*) soit sur-représentée, autrement dit enrichie, dans l'ensemble des gènes différentiellement exprimés. J'ai effectué dans un premier temps une analyse d'enrichissement des termes GO de l'ontologie BP sur R avec des packages spécifiques. La sur-représentation d'une fonction biologique a été déclarée comme statistiquement significative lorsque la p-valeur ajustée était inférieure à 0.01. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la **Figure 74**. Ils montrent que les gènes les plus différentiellement sous-exprimés ($P < 0.01$; $\log_2\text{fold change} < -1$) sont associés principalement à des processus biologiques liés à la différenciation des kératinocytes (« *cornification* », « *epidermal cell differentiation* », « *keratinization* », « *keratinocyte differentiation* ») et au cycle cellulaire (« *mitotic sister chromatic segregation* », « *sister chromatid segregation* », « *mitotic nuclear division* », « *chromosome segregation* ») (**Figure 74A**). A l'inverse et de manière intéressante, les gènes les plus différentiellement surexprimés ($P < 0.01$; $\log_2\text{fold change} > 0$) sont quant

   eux associés à des processus biologiques impliqués dans le métabolisme des lipides (« *coenzyme metabolic process* », « *sterol metabolic process* », « *sterol biosynthetic process* », « *cholesterol biosynthetic process* ») (Figure 74B).

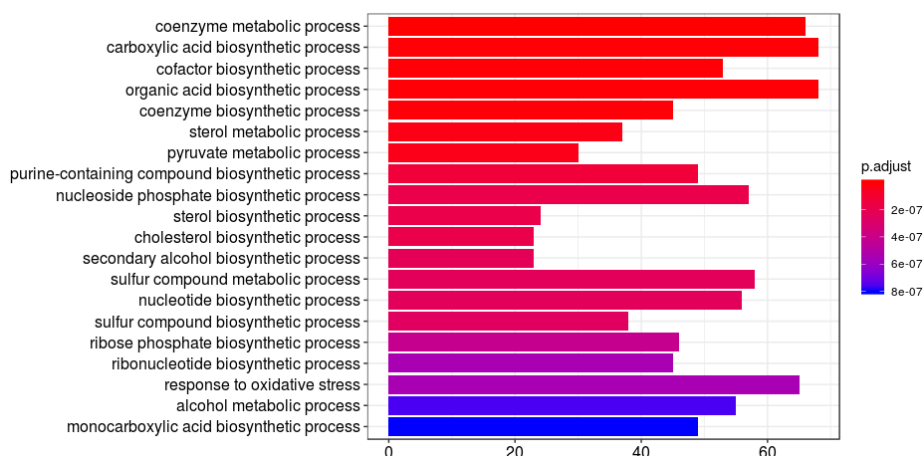
A

Downregulated DEG



B

Upregulated DEG



Lipid metabolism

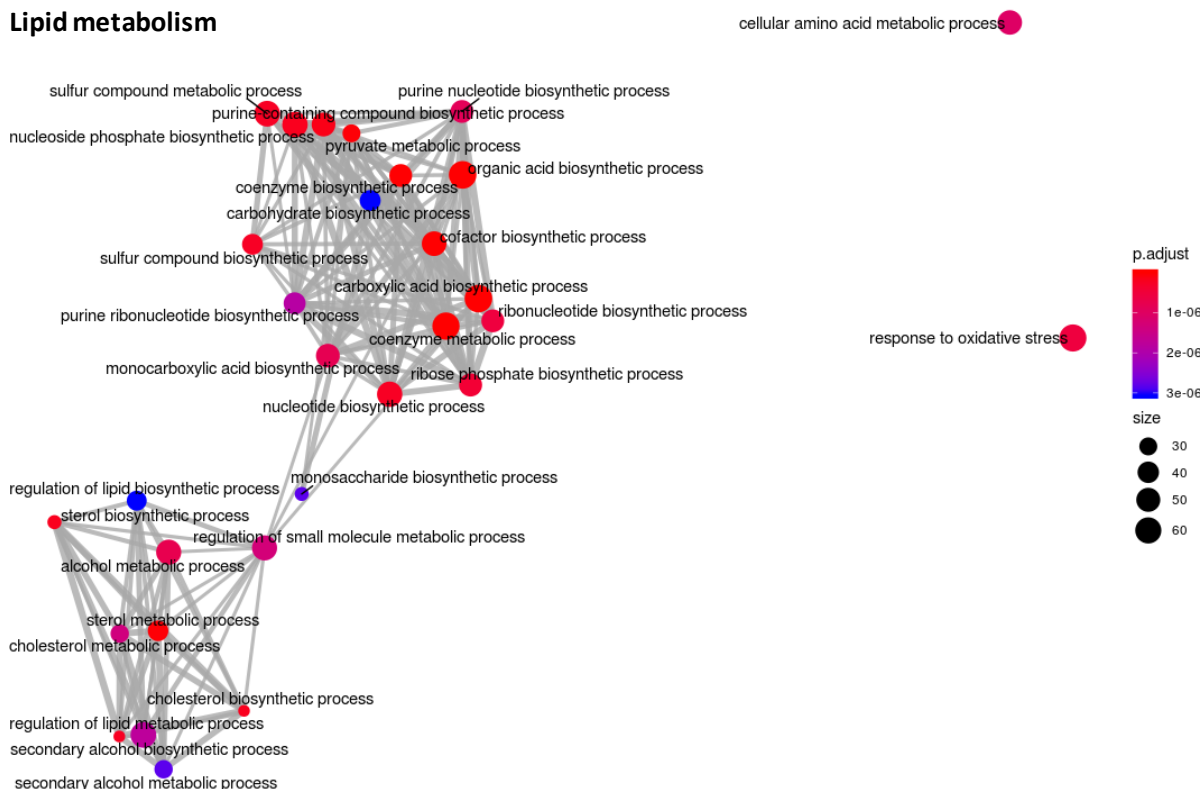


Figure 74 : L'analyse d'enrichissement révèle que la silymarine inhibe l'expression de gènes impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire et la différenciation des kératinocytes, au profit de ceux impliqués dans le métabolisme lipidique dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1.

Analyse d'enrichissement des 20 termes GO de la catégorie BP les plus enrichis (p-valeur ajustée < 0.01). Représentation des résultats sous forme de graphique à barres et nuage de points. La couleur renseigne sur la p-valeur ajustée du terme GO BP et la taille des barres ou points représente le nombre de gènes différentiellement exprimés DEG (significativement sous-exprimés et surexprimés, respectivement) associés aux termes GO BP. Les réseaux d'interactions entre les termes GO sont caractérisés par des arêtes.

Une analyse d'enrichissement des termes GO de l'ontologie BP à l'aide des outils bioinformatiques GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) et DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*), utilisant des algorithmes personnalisés et des bases de données GO distinctes, a permis de confirmer de manière indépendante ces résultats. Quelques exemples de graphiques générés avec l'outil GSEA sont présentés dans la **Figure 75**. Ils montrent l'enrichissement d'un ensemble de gènes différentiellement exprimés dans quatre processus biologiques d'intérêt. Les gènes différentiellement exprimés et associés aux termes GO « *Keratinocyte differentiation* » et « *Mitotic sister chromatid segregation* » de l'ontologie BP sont majoritairement distribués à droite de la barre horizontale de gradation, traduisant leur sous-expression (Score d'enrichissement négatif), tandis que les gènes associés aux termes GO « *cholesterol biosynthetic process* » et « *sterol biosynthetic process* » sont majoritairement distribués à gauche de la barre horizontale de gradation, traduisant leur surexpression (Score d'enrichissement positif).

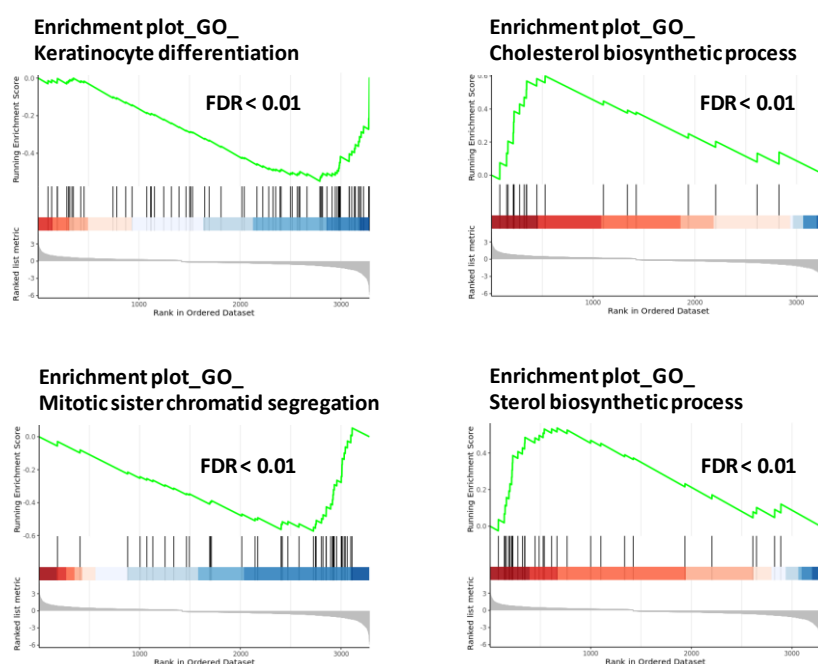


Figure 75 : Exemple de graphiques générés par l'analyse d'enrichissement GSEA montrant l'enrichissement d'un ensemble de gènes, inclus dans la liste des DEG, dans quatre processus biologiques d'intérêt (différenciation du kératinocyte, ségrégation des chromatides sœurs, régulation du processus de biosynthèse du cholestérol et du processus de biosynthèse des stérols) avec un FDR < 0.01.

Chaque ligne verticale du code-barres représente un gène inclus dans la liste des DEG et associé à un processus biologique donné. L'algorithme GSEA calcule un score ES pour chacun d'entre eux. Un ES positif indique l'enrichissement d'un gène surexprimé (à gauche de la barre horizontale de

gradation), tandis qu'un ES négatif indique l'enrichissement d'un gène sous-exprimé (à droite de la barre horizontale de gradation). La ligne verte illustre l'évolution du score ES lors du parcours de la liste des DEG. La valeur finale utilisée pour caractériser statistiquement le groupe de gènes enrichis dans le processus biologique d'intérêt correspond à la valeur ES maximale atteinte au cours de cette progression. (GSEA : *Gene set enrichment analysis*, ES : Score d'enrichissement, FDR : *False discovery rate*).

Le **Tableau 18** répertorie la liste des 15 gènes les plus différentiellement surexprimés et sous-exprimés impliqués dans les processus biologiques décrits ci-dessus.

Upregulated DEG			Downregulated DEG					
Lipid metabolism			Keratinocyte differentiation			Cell division		
Gene name	Fold change	Padj	Gene name	Fold Change	Padj	Gene name	Fold Change	Padj
ACSS2	2.38	9.74E-13	K1	-26.23	2.59e-58	HMCN1	-6.29	1.71E-59
FASN	2.38	3.30E-14	DSG4	-16.59	8.98e-250	FAM64A	-4.71	8.80E-10
ACLY	2.00	4.64E-33	FOXN1	-4.28	6.62E-07	KIF20A	-4.08	4.58E-54
IDI1	1.97	8.49E-54	SPRR1B	-3.93	2.60E-33	TTC28	-3.06	4.63E-49
TM7SF2	1.92	2.43E-15	SPRR1B	-3.93	2.60E-33	GTSE1	-2.92	5.55E-11
LIPE	1.89	2.50E-07	TXNIP	-3.20	8.96E-250	MKI67	-2.90	1.11E-88
MSMO1	1.83	1.74E-46	IVL	-3.05	8.48E-125	NCAPG	-2.86	4.73E-09
INSIG1	1.80	2.20E-49	TGM1	-2.97	1.76E-36	KIF2C	-2.78	9.27E-11
MVD	1.77	2.78E-04	SPINK5	-2.83	6.34E-16	KIF18B	-2.56	7.31E-07
DHCR7	1.77	1.85E-22	K16	-2.69	3.72E-36	CENPE	-2.45	6.81E-14
FDFT1	1.76	3.11E-39	K4	-2.68	1.27E-35	ASPM	-2.37	3.79E-40
G6PD	1.76	7.11E-19	ID3	-2.50	2.06E-71	NDC80	-2.30	1.41E-03
ELOVL7	1.75	8.48E-06	K3	-2.24	2.74E-05	BUB1B	-2.29	1.34E-06
STXBP1	1.68	5.61E-17	K14	-2.20	1.77E-83	KIF14	-2.27	4.64E-14
HMGCS1	1.68	5.43E-36	ABCA12	-2.08	4.64E-05	KIF4B	-2.13	7.29E-03

Tableau 18 : Liste des 15 gènes les plus différentiellement surexprimés et sous-exprimés impliqués dans le métabolisme des lipides, la différenciation kératinocytaire et la progression du cycle cellulaire en fonction de leur fold change et p-valeur ajustée.

4.6.5 La silymarine bloque le cycle cellulaire

Pour déterminer si la sous-expression des gènes impliqués dans le contrôle de division cellulaire dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 et la SM avait pour conséquence un arrêt du cycle cellulaire, les cellules HaCaT ont été traitées par différentes concentrations de SM pendant 24 heures. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été analysée par cytométrie en flux. Comme montré dans la **Figure 76A**, le traitement des cellules par la SM conduit à une accumulation des cellules dans la phase G0/G1 et à une diminution du pourcentage de cellules dans la phase S et G2/M de façon dose dépendante. L'effet maximal de la SM sur l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 est observé à la concentration de 62 μ g/mL, et se caractérise par 2.4 fois plus de

cellules en phase G0/G1 ($83.7 \pm 4 \%$), 5.4 fois moins de cellules en S ($6.8 \pm 2 \%$) et 2.9 fois moins de cellules en G2/M ($9.5 \pm 1 \%$) comparativement aux cellules non traitées.

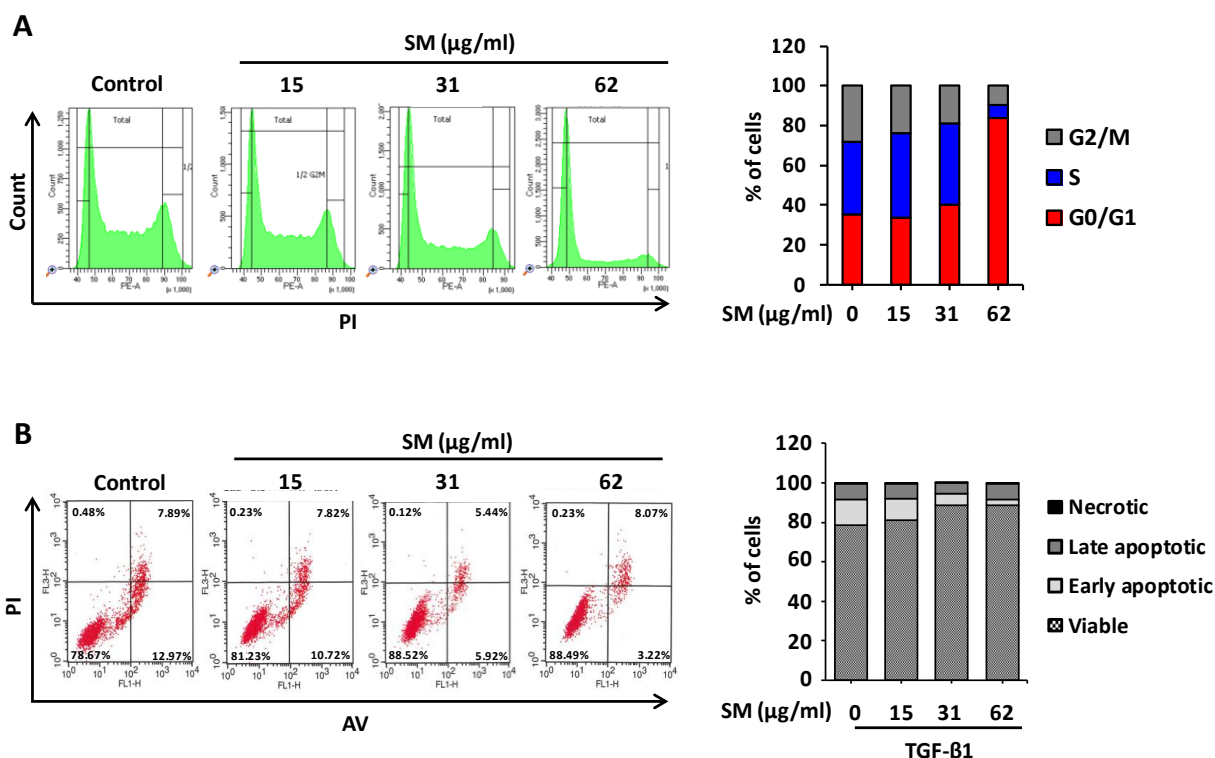


Figure 76 : La silymarine provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 sans induire l'apoptose dans les kératinocytes humains.

(A) Analyse par cytométrie en flux du cycle cellulaire des cellules HaCaT traitées avec différentes concentrations de silymarine (15, 31, 62 $\mu\text{g/ml}$) pendant 24 heures. Les résultats sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires. (B) Analyse par cytométrie en flux de l'apoptose des cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 en présence ou absence de différentes concentrations de silymarine (15, 31, 62 $\mu\text{g/ml}$) pendant 24 heures. Les résultats sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires. (TGF- β 1: *Transforming growth factor beta-1*; SM: Silymarine; AV: Annexine V; PI: Iodure de propidium).

4.6.6 La silymarine n'induit pas l'apoptose

Compte tenu 1) du pourcentage extrêmement élevé de cellules HaCaT en phase G0/G1 après un traitement par la SM et 2) de la présence de structures vésiculaires irrégulières d'aspect granuleux dans le cytoplasme des cellules traitées par le TGF- β 1 et la SM (62 $\mu\text{g/ml}$) facilement détectables par microscopie optique, j'ai cherché à évaluer l'effet de la SM dans le processus apoptotique des cellules HaCaT. Cette étude a été menée par cytométrie en flux à l'aide d'un co-marquage à l'Annexine V-FITC et à l'IP. L'Annexine V (AV) est utilisée comme marqueur des cellules apoptotiques, tandis que l'IP est utilisé comme

marqueur de mort cellulaire. Les données de cytométrie en flux de la **Figure 76B** montrent que le traitement des cellules HaCaT par le TGF- β 1 et la SM n'induit pas l'apoptose, quelque soit la concentration de SM testée. A l'inverse, nous avons pu observer un effet protecteur de la SM contre l'apoptose. En effet, le pourcentage de cellules en phase d'apoptose précoce (AV+/IP-) s'est avéré de l'ordre de 2 fois, voire même 4 fois inférieur, au pourcentage de cellules traitées par le TGF- β 1 seul lorsque la SM a été utilisée à la concentration de 31 et 62 μ g/mL. Cette diminution du pourcentage de cellules apoptotiques est corrélée avec une augmentation de l'ordre de 10 % du pourcentage de cellules viables. Ces résultats indiquent donc qu'à défaut d'induire l'apoptose, des concentrations élevées de SM augmentent même la viabilité des cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1 (**Figure 76B**).

4.6.7 La silymarine bloque la différenciation des kératinocytes, en partie, via l'inhibition de l'expression du gène *Notch3*

Les résultats de l'analyse de données RNA-seq suggéraient que la silymarine pouvait potentiellement inhiber la différenciation des cellules HaCaT en culture. Pour valider cette hypothèse, nous avons sélectionné un ensemble de marqueurs spécifiques du programme de différenciation des kératinocytes et quantifié leur niveau d'expression par RT-qPCR. Comme montré dans la **Figure 77**, le niveau d'expression relatif des gènes *K1*, *K10*, *IVL* et *FLG* est diminué de façon significative dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 et la SM comparativement aux cellules traitées par le TGF- β 1 seul, et ceci dès les premières 24 heures de traitement. L'effet inhibiteur maximum de la SM sur l'expression de ces marqueurs géniques est observé à la concentration de SM de 62 μ g/mL et conduit à une diminution de l'ordre de 38-, 24- et 5-fois du niveau d'expression de la *K10*, *IVL* et *K1* détecté dans les cellules traitées par le TGF- β 1 seul.

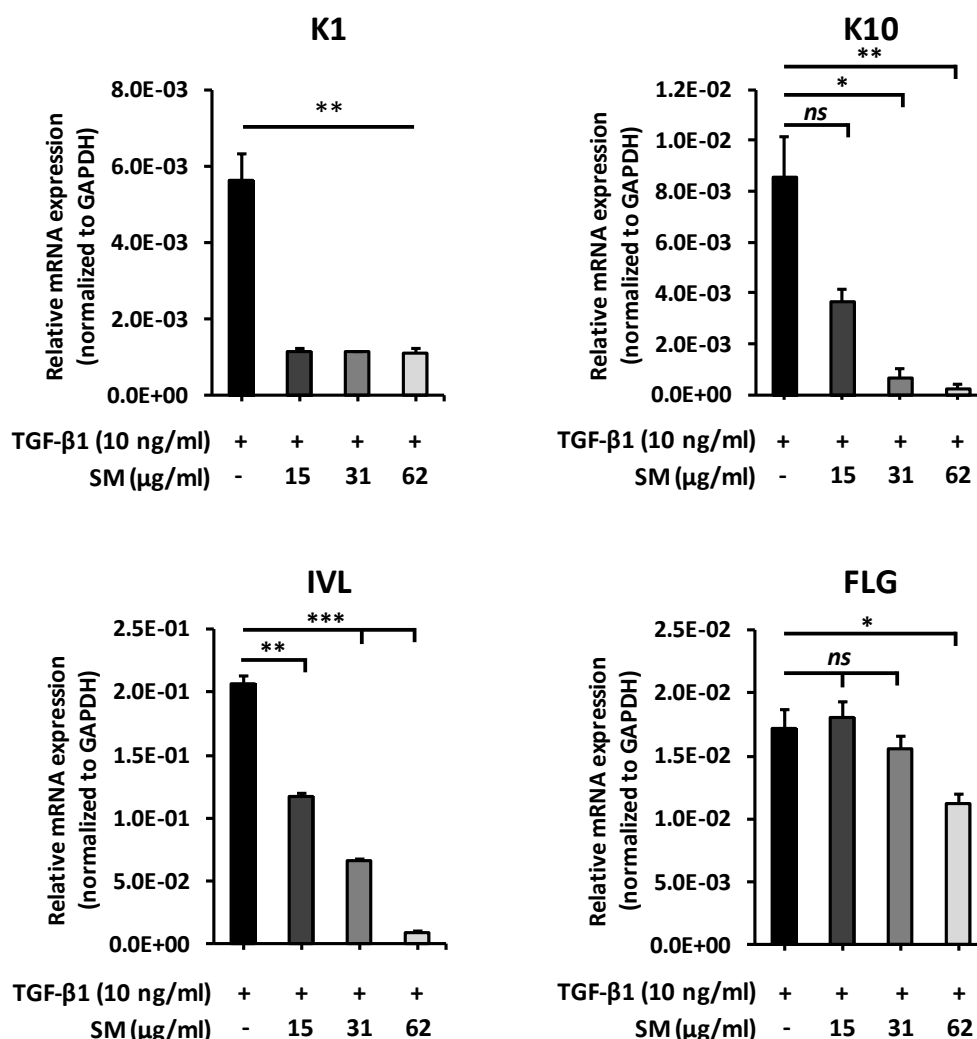


Figure 77 : La silymarine régule négativement le programme de différenciation des kératinocytes humains déjà différenciés.

L'expression relative des gènes *K1*, *K10*, *IVL* et *FLG* par rapport au gène *GAPDH* a été quantifiée par RT-qPCR dans les cellules HaCaT traitées pendant 24 heures par le TGF-β1 (10 ng/mL) en présence ou absence de silymarine (31 μg/mL) dans un milieu de culture riche en calcium (contenant par défaut de 1.8 mM de CaCl₂). Les données correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. *ns* (pas de différence statistique significative), **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, t-test bilatéral. (TGF-β1: *Transforming growth factor beta-1*; K1: kératine 1; K10: kératine 10; IVL: Involucrine; FLG: Filaggrine; GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase).

Il est important de rappeler que pour l'ensemble de mes expérimentations, les cellules HaCaT ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM-High glucose contenant par défaut une concentration en calcium de 1.8 mM. Or il est démontré expérimentalement que la culture des kératinocytes en présence d'une concentration extracellulaire en calcium supérieure à 1 mM conduit au processus de différenciation des kératinocytes (Boyce and

Ham, 1983). De plus, le rôle du TGF- β 1 dans l'induction de la différenciation des kératinocytes en présence d'un taux de calcium extracellulaire élevé (1.8 mM) a été également décrit (Matsumoto et al., 1990). Par conséquent, mes premières analyses ont été menées sur un modèle de cellules HaCaT déjà différenciées. J'ai alors souhaité évaluer l'effet de la SM lors de la mise en place du processus de différenciation kératinocytaire, c'est-à-dire lors du passage de l'état prolifératif des kératinocytes à l'état différencié. Pour cela j'ai utilisé le modèle de différenciation des kératinocytes induit par une élévation de la concentration en calcium dans le milieu de culture. Les cellules HaCaT ont été cultivées pendant plusieurs semaines en présence d'un taux de calcium extracellulaire faible (0.07 mM) afin de les maintenir dans un état basal prédifférencié. J'ai ensuite induit leur programme de différenciation cellulaire en ajustant la concentration extracellulaire en calcium à 1.8 mM pendant 9 jours consécutifs. L'examen morphologique des cellules HaCaT au microscope optique à contraste de phase, à ce temps précis, montre que les kératinocytes prédifférenciés adoptent une morphologie fusiforme et peu compactée. A l'inverse, les kératinocytes différenciés adoptent une morphologie cuboïde et sont reliés entre eux par de nombreuses jonctions serrées (**Figure 78A**). L'expression relative des marqueurs précoces et tardifs de la différenciation kératinocytaire a été vérifiée par Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques (**Figure 78B**). Dès le 3^{ème} jour suivant l'induction de la différenciation des kératinocytes dans le milieu de culture contenant 1.8 mM de calcium, l'expression de la protéine K1 est apparue réprimée de l'ordre de 10 % au profit d'une augmentation de l'ordre de 4.8 et 2.5 fois du niveau d'expression relatif des protéines IVL et LOR quantifié dans les cellules non différenciées.

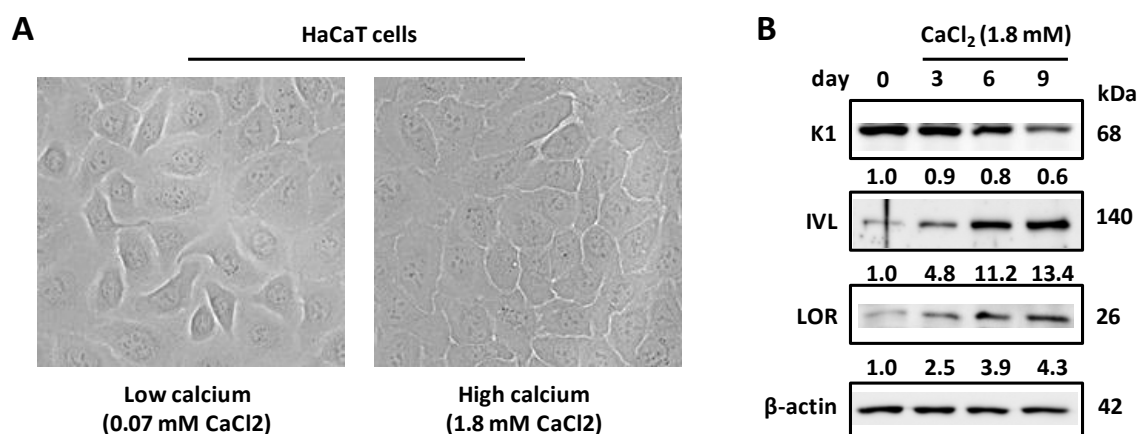


Figure 78 : Modèle de différenciation induite par le calcium des kératinocytes humains.

(A) Image en contraste de phase montrant les changements morphologiques de cellules HaCaT cultivées dans un milieu de culture pauvre ou riche en calcium (0.07 mM CaCl₂ et 1.8 mM CaCl₂, respectivement). (B) Analyse par Western blot de l'expression de la protéine K1, IVL et LOR par rapport à la β-actine (contrôle de charge) dans des lysats de cellules HaCaT cultivées dans un milieu de culture pauvre en calcium (0.07 mM CaCl₂) et induites en différenciation dans un milieu riche en calcium (1.8 mM CaCl₂) pendant 3, 6 et 9 jours. Les résultats sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires. (K1: Kératine 1; IVL: Involucrine; LOR: Loricrine).

Le traitement des cellules HaCaT par différentes concentrations de SM (15, 31, 62 µg/mL) dans le milieu de culture contenant 1.8 mM de calcium a eu pour effet de réguler négativement l'expression des gènes *K1*, *K10*, *IVL*, *LOR* et *FLG* au niveau transcriptionnel et traductionnel (**Figure 79**). Une diminution maximale de l'ordre de 883-, 75-, 8-, 6- et 2-fois du taux d'ARNm de *K1*, *K10*, *IVL*, *FLG* et *LOR* est quantifiée dans ces cellules traitées par la SM utilisée à la concentration de 62 µg/mL (**Figure 79A**), ainsi qu'une diminution de l'ordre de 2-fois du taux de protéine IVL et LOR (**Figure 79C**). Une analyse par immunofluorescence a confirmé la sous-expression de la protéine K10 dans le cytosquelette des cellules HaCaT induites en différenciation en présence de la SM (**Figure 79B**). Il est intéressant de noter que la SM exerce un effet inhibiteur sur l'induction de la différenciation des cellules HaCaT de façon comparable à celui exercé par l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA, 1 µM), un régulateur négatif de la différenciation des kératinocytes (**Figure 79**).

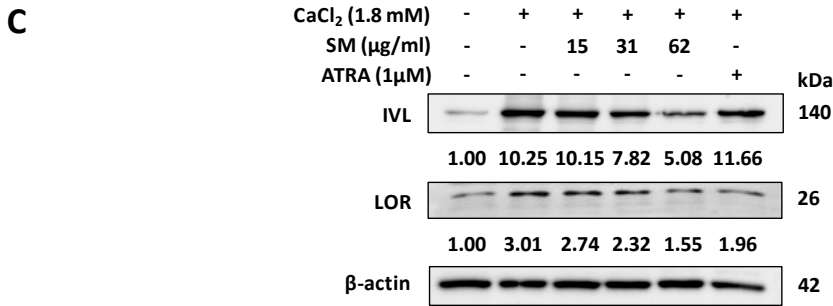
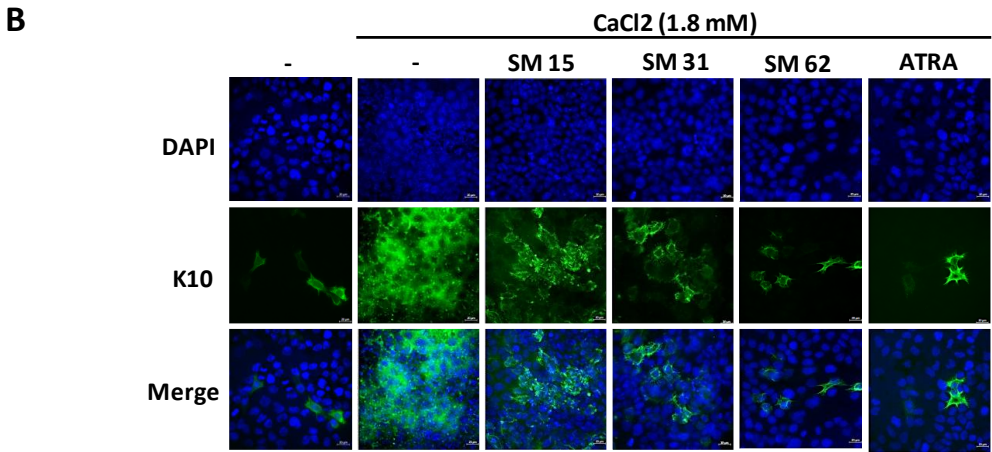
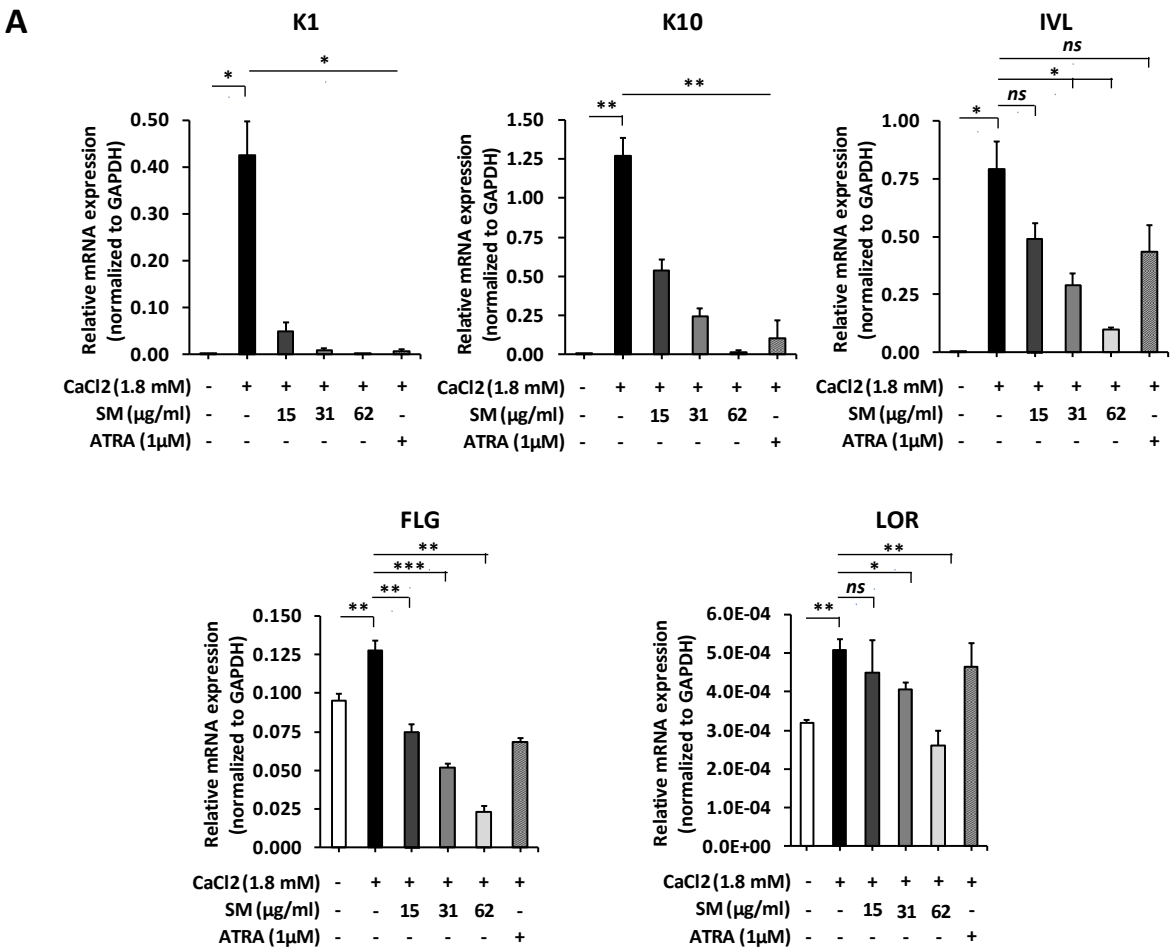


Figure 79 : La silymarine inhibe l'entrée en différenciation des kératinocytes humains.

Les cellules HaCaT cultivées dans un milieu de culture pauvre en calcium (0.07 mM CaCl₂) ont été induites en différenciation pendant 9 jours dans un milieu riche en calcium (1.8 mM CaCl₂) en présence ou absence de différentes concentrations de silymarine (15, 31, 62 µg/mL). L'ATRA (1 µM) a été utilisé comme contrôle négatif de la différenciation kératinocytaire. (A) Expression relative des gènes *K1*, *K10*, *IVL*, *LOR* et *FLG* par rapport au gène *GAPDH* par RT-qPCR. Les données correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. (B) Analyse par immunofluorescence de l'expression de la protéine K10. Les résultats sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires. (C) Analyse par Western blot de l'expression de l'IVL et de la LOR par rapport à la β-actine. Les résultats sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires. (SM: Silymarine; ATRA, Acide tout-trans rétinolique; K1: Kératine 1; K10: Kératine 10; IVL: Involucrine; LOR: Loricrine; FLG: Filaggrine; GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase).

Sachant que le récepteur sensible au calcium (CaSR) est capable de détecter des changements de concentrations extracellulaires de calcium et d'initier la différenciation des kératinocytes épidermiques (Tu et al., 1999) (paragraphe 1.1.2.1.5), nous avons cherché à déterminer si la SM pouvait bloquer la kératinisation via l'inhibition de l'expression du CaSR. Mes résultats de RT-qPCR montrent que le traitement des kératinocytes par la SM ne modifie pas le niveau d'expression de ce récepteur dans les cellules déjà différenciées et stimulées par le TGF-β1, ainsi que dans le modèle de différenciation kératinocytaire induite par une augmentation de la concentration extracellulaire en calcium (résultats non montrés).

Nous avons alors orienté nos études sur la voie de signalisation intracellulaire contrôlée par Notch. Cette voie de signalisation joue un rôle majeur dans le contrôle de la différenciation des kératinocytes. Chez les mammifères, il existe 4 isoformes de Notch (Notch1-4). La surexpression de Notch1-2-3 a été largement observée dans les cellules suprabasales des couches épineuse et granuleuse de l'épiderme (Kopan and Weintraub, 1993; Nickoloff et al., 2002; Blanpain et al., 2006). Il a été montré que Notch1 initie la différenciation des kératinocytes en surexprimant l'inhibiteur réversible des complexes CDK/cyclines p21 (WAF1/Cip1) ainsi que la K1, la K10, et l'IVL (Rangarajan et al., 2001). Par conséquent, j'ai examiné l'effet de la SM sur l'expression des récepteurs transmembranaires Notch1-2-3 dans les cellules HaCaT déjà différenciées et traitées par le TGF-β1 ainsi que dans les cellules HaCaT prédifférenciées et induites en différenciation dans un milieu contenant

1.8 mM de calcium (**Figure 80**). L'analyse par RT-qPCR montre que le niveau d'expression relatif de *Notch1* et *Notch2* est inchangé dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 et la SM à la concentration de 15 et 31 μ g/mL comparativement aux cellules traitées par le TGF- β 1 seul. Une diminution faible mais significative de l'expression relative de *Notch3*, de l'ordre de 1.7 fois ($P = 0.019$) de la valeur du contrôle obtenue en conditions de traitement avec le TGF- β 1 seul, est toutefois détectable dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 en présence de la SM à la concentration de 31 μ g/mL. Cette inhibition apparait plus significative, de l'ordre de 2 fois la valeur du contrôle, lorsque les expériences sont menées dans les mêmes conditions mais en présence d'une concentration plus élevée de SM (62 μ g/mL) et ceci pour l'ensemble des 3 isoformes de Notch (*Notch1*, 2.2 fois, $P = 0.0102$; *Notch2*, 2.06 fois, $P = 0.014$; *Notch3*, 2.03 fois, $P = 0.019$).

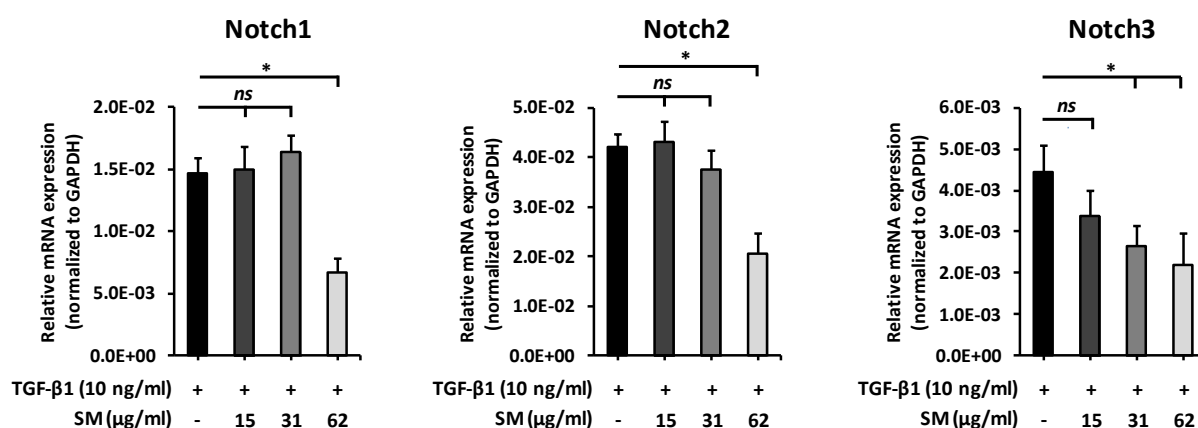


Figure 80 : La silymarine modifie le profil d'expression des gènes codant Notch1, Notch2 et Notch3 dans les kératinocytes déjà différenciés.

L'expression relative des gènes *Notch1*, *Notch2* et *Notch3* par rapport à la *GAPDH* a été quantifiée par RT-qPCR dans les cellules HaCaT traitées pendant 24 h par le TGF- β 1 (10 ng/mL) en présence ou absence de différentes concentrations de silymarine (15, 31, 62 μ g/mL). Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes. ns (pas de différence statistique significative), * $P < 0.05$, t-test bilatéral. (TGF- β 1: *Transforming growth factor beta-1*; K1: Kératine 1; K10: Kératine 10; IVL: Involucrine; FLG: Filaggrine; GAPDH: Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase).

J'ai par la suite cherché à déterminer si l'effet inhibiteur de la SM sur l'expression relative des isoformes de Notch pouvait également s'exercer dans le modèle de différenciation des cellules HaCaT induite par une élévation de la concentration en calcium. Cette étude a donc été réalisée à partir des cellules HaCaT prédifférenciées puis induites en

différenciation dans un milieu de culture contenant 1.8 mM de calcium. L'analyse par RT-qPCR montre que, contrairement au modèle de cellules HaCaT déjà différenciées et traitées par le TGF- β 1, la SM ne régule pas l'expression de *Notch1* et *Notch2* dans ce modèle de différenciation induite au calcium (**Figure 81A**). En revanche, l'expression relative de *Notch3* apparaît, elle, significativement réprimée et ceci de façon dose-réponse, avec un effet inhibiteur maximal observé pour une concentration de SM de 62 μ g/mL. A noter que cet effet inhibiteur est 3 fois supérieur à celui observé par le traitement des cellules à l'ATRA. Sur la base de ces résultats, j'ai quantifié par Western blot le niveau d'expression de la protéine Notch3 dans les kératinocytes prédifférenciés puis induits en différenciation pendant 9 jours dans un milieu contenant 1.8 mM de calcium en présence ou absence de SM à la concentration de 62 μ g/mL. Comme attendu et indiqué dans la **Figure 81B**, l'expression de la protéine Notch3 augmente de manière progressive dans les cellules HaCaT dès les premières 24 heures suivant l'induction de la différenciation par 1.8 mM de calcium et est maintenue à un niveau d'expression inférieur mais élevé pendant les 8 jours suivants. En revanche, en présence de la SM à la concentration de 62 μ g/mL, l'expression de la protéine Notch3 n'est plus induite par le calcium et apparaît même légèrement inhibée après 6 et 9 jours de traitement.

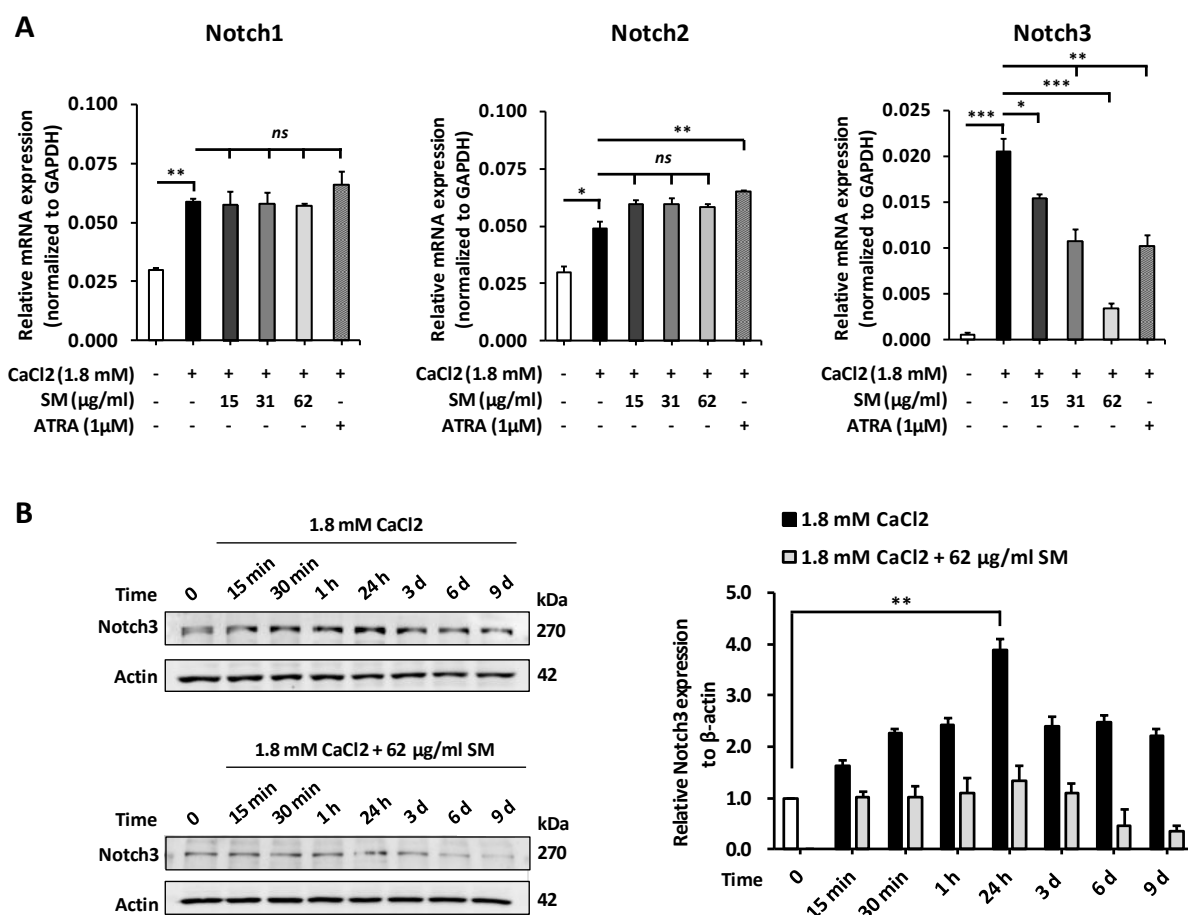


Figure 81 : La silymarine inhibe l'expression de Notch3 dans les kératinocytes humains induits en différenciation.

(A) Les cellules HaCaT cultivées dans un milieu de culture pauvre en calcium (0.07 mM CaCl₂) ont été induites en différenciation pendant 6 jours dans un milieu riche en calcium (1.8 mM CaCl₂) en présence ou absence de différentes concentrations de silymarine (15, 31, 62 µg/mL). L'ATRA (1 µM) a été utilisé comme contrôle négatif de la différenciation kératinocytaire. L'expression relative des gènes *Notch1*, *Notch2* et *Notch3* par rapport au gène *GAPDH* a été quantifiée par RT-qPCR. Les données correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. *ns* (pas de différence statistique significative), **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, t-test bilatéral. (B) Les cellules HaCaT cultivées dans un milieu de culture pauvre en calcium (0.07 mM CaCl₂) ont été induites en différenciation dans un milieu riche en calcium (1.8 mM CaCl₂) en présence ou absence de silymarine (62 µg/mL). L'expression de la protéine Notch3 par rapport à la β-actine a été analysée au cours du temps par Western blot. Les résultats sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires (panneau de gauche). L'histogramme est représentatif de l'analyse densitométrique de 3 expériences indépendantes (moyenne ± écart-type) (panneau de droite). ***P*<0.01, t-test bilatéral. (SM: Silymarine; ATRA, Acide tout-trans rétinolique; GAPDH: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats indiquent que la SM est capable d'inhiber le programme de différenciation des kératinocytes par un processus dépendant de la régulation de l'expression de la protéine Notch3 et dans une moindre mesure de Notch1 et Notch2.

4.6.8 La silymarine stimule la synthèse de lipides dans les cellules kératinocytes

Durant le processus de différenciation, les kératinocytes synthétisent des lipides, les empaquètent dans des corps lamellaires et les excrètent dans la MEC afin de former un « ciment » lipidique intercornéocytaire. La barrière épidermique est principalement constituée d'acides gras, de cholestérol et de céramides. Son intégrité est essentielle pour assurer la protection de notre organisme contre la déshydratation et les agents pathogènes mais aussi pour permettre la réparation tissulaire. Nos données de RNA-seq ont montré que l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides est augmentée dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 et la SM en comparaison des cellules traitées par le TGF- β 1 seul. Nous avons cherché à valider cette signature transcriptomique par une analyse par RT-qPCR en quantifiant le profil d'expression des trois gènes identifiés comme étant les plus surexprimés dans ce processus biologique : *ACSS2* (*acetyl-CoA synthetase member 2*), *ACLY* (*ATP citrate lyase*) et *FASN* (*fatty acid synthase*). Les protéines ACSS2 et ACLY sont les principales enzymes impliquées dans la production de l'acétyl CoA (Ac-CoA) cytosolique qui est un précurseur central de la biosynthèse des acides gras et du cholestérol (Bauer et al., 2005; Wellen et al., 2009). FASN, quant à elle, est une enzyme clé de la lipogenèse. Elle catalyse la synthèse *de novo* des acides gras à partir d'Ac-CoA et de malonyl-CoA en présence du co-facteur NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) (Smith et al., 2003).

L'analyse par RT-qPCR confirme que les niveaux d'expression relatifs de ACSS2, ACLY et FASN sont significativement plus élevés dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 et la SM comparativement aux cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 seul. Cet effet est, toutefois, plus marqué et significatif (de l'ordre de 3 fois la valeur du contrôle des cellules traitées par

le TGF- β 1 seul) lorsque la concentration de SM utilisée est la plus élevée, c'est-à-dire à 62 $\mu\text{g/mL}$ (**Figure 82**).

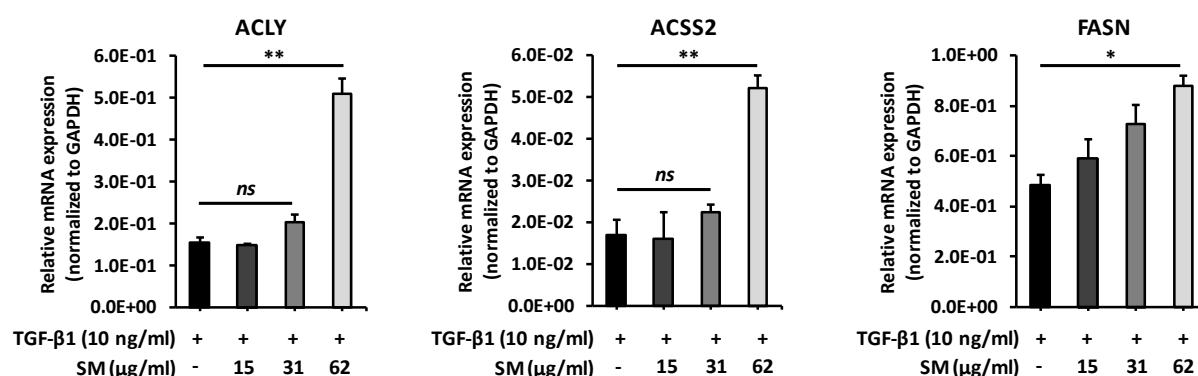


Figure 82 : La silymarine régule positivement le métabolisme des lipides dans les kératinocytes humains déjà différenciés.

L'expression relative des gènes *ACLY*, *ACSS2* et *FASN* par rapport au gène *GAPDH* a été quantifiée par RT-qPCR dans les cellules HaCaT traitées pendant 24 heures par le TGF- β 1 (10 ng/mL) en présence ou absence de silymarine (31 $\mu\text{g/mL}$) dans un milieu de culture riche en calcium (contenant par défaut de 1.8 mM de CaCl_2). Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes. ns (pas de différence statistique significative), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test bilatéral. (TGF- β 1: *Transforming growth factor beta-1*; *ACSS2*: *Acetyl-CoA synthetase member 2*, *ACLY*: *ATP citrate lyase*; *FASN* : *Fatty acid synthase*; *GAPDH*: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase).

J'ai alors comparé ces résultats avec ceux obtenus en utilisant le modèle cellulaire de différenciation des kératinocytes induite au calcium. Les résultats sont montrés dans la **Figure 83A**. Ils indiquent qu'après 6 jours de traitement avec 1.8 mM calcium en présence de SM utilisée à la concentration de 62 $\mu\text{g/mL}$, l'expression relative des gènes *ACLY*, *ACSS2* et *FASN* est plus significativement augmentée, de l'ordre de 4.6, 4.8 et 3.7 fois de la valeur du contrôle obtenue avec les cellules non différenciées par le calcium.

Afin d'évaluer si la modulation de l'expression de ces gènes était suffisante pour conduire à une augmentation également significative du taux de lipides dans les kératinocytes, un marquage des lipides neutres au colorant *Oil Red O* a été réalisé. Les résultats de la **Figure 83B** indiquent que l'induction en différenciation des cellules HaCaT prédifférenciées avec 1.8 mM de calcium en présence de SM à la concentration de 62 $\mu\text{g/mL}$ pendant 6 jours consécutifs, conduit à une augmentation très significative de l'intensité de

coloration des cellules HaCaT. Cette augmentation de coloration se caractérise par une augmentation du nombre et de la taille des vésicules lipidiques, visibles notamment à fort grossissement optique.

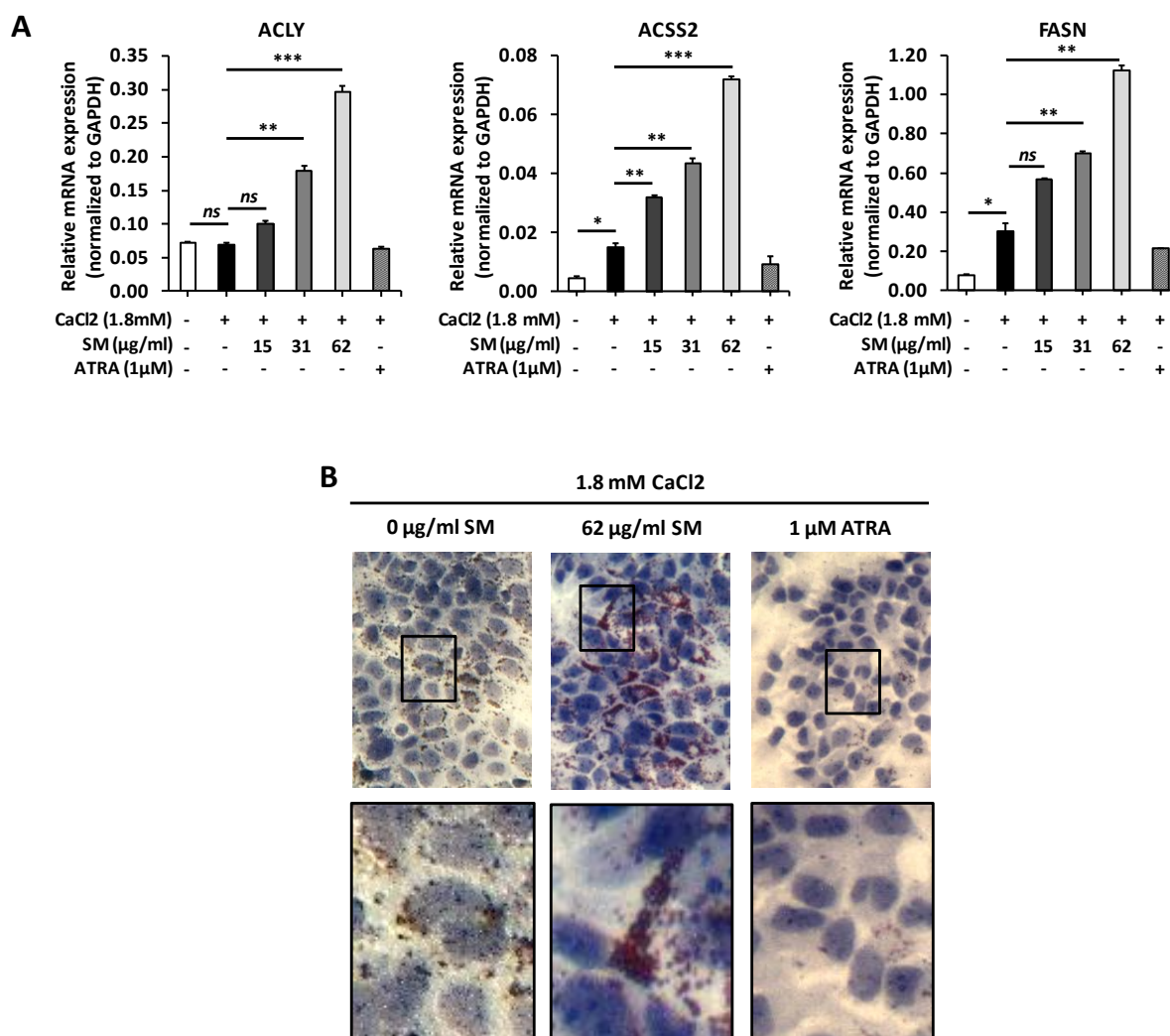


Figure 83 : La silymarine régule positivement le métabolisme des lipides dans les kératinocytes humains induits en différenciation.

Les cellules HaCaT cultivées dans un milieu de culture pauvre en calcium (0.07 mM CaCl₂) ont été induites en différenciation pendant 6 jours dans un milieu riche en calcium (1.8 mM CaCl₂) en présence ou absence de différentes concentrations de silymarine (15, 31, 62 µg/mL). L'ATRA (1 µM) a été utilisé comme contrôle négatif de la différenciation kératinocytaire. (A) Expression relative des gènes ACLY, ACSS2 et FASN par rapport à la GAPDH par RT-qPCR. Les données correspondent à la moyenne ± écart-type de 3 expériences indépendantes. *ns* (pas de différence statistique significative), **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, t-test bilatéral. (B) Observation microscopique des gouttelettes lipidiques colorées en rouge avec la solution *Oil-Red O*. Les noyaux cellulaires ont été contre-colorés en bleu avec une solution d'hémathoxyline. Les résultats sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois en triplicata avec des résultats similaires.

J'ai poursuivi cette étude en tentant de mettre à jour les voies de signalisation intracellulaires activées dans les cellules HaCaT en réponse à la SM, pouvant mener à une augmentation du taux de synthèse des lipides. L'AMPK (*Adenosine monophosphate-activated protein kinase*) est un senseur métabolique majeur permettant l'ajustement précis des besoins et disponibilités énergétiques cellulaires (Foretz et al., 2006). Il a été démontré que l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire favorise l'activation d'AMPK par phosphorylation au niveau de la thréonine 172. L'AMPK sous forme active régule négativement les voies anaboliques, dont celles impliquées dans la synthèse de cholestérol et d'acides gras (Woods et al., 2005). J'ai par conséquent évalué le niveau relatif de phosphorylation d'AMPK par Western blot à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre la forme phosphorylée de la thréonine 172 d'AMPK. Les résultats de la **Figure 84** montrent, comme attendu, que l'induction du programme de différenciation des cellules HaCaT par une concentration élevée en calcium conduit à une augmentation progressive du taux de phosphorylation d'AMPK au cours du temps, qui apparaît maximal au 3^{ème} jour du traitement. En revanche, le traitement des cellules HaCaT dans les mêmes conditions mais en présence de SM utilisée à la concentration de 62 µg/mL a pour effet d'inhiber la phosphorylation d'AMPK et ceci dès les premières minutes suivant l'induction de la différenciation, sans pour autant affecter l'expression de la forme totale de la protéine AMPK.

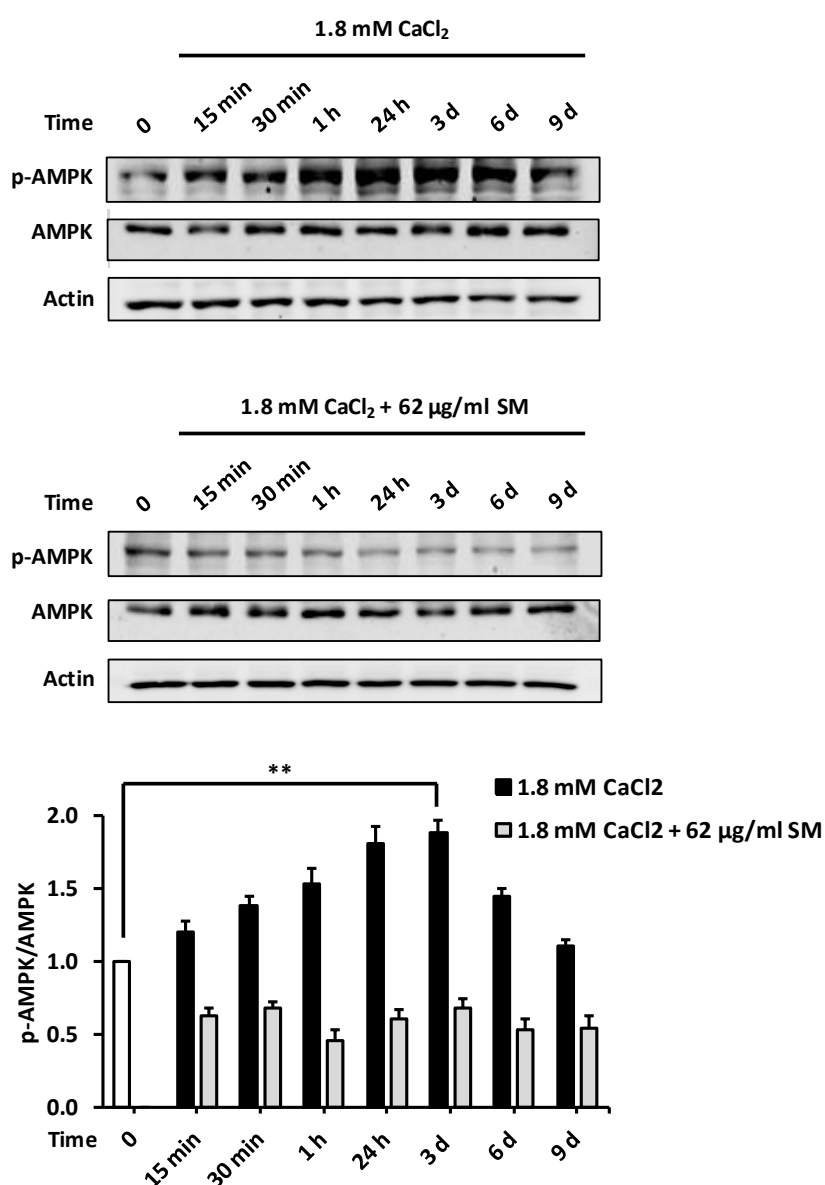


Figure 84 : La silymarine inhibe la phosphorylation d'AMPK dans les kératinocytes humains induits en différenciation.

Les cellules HaCaT cultivées dans un milieu de culture pauvre en calcium (0.07 mM CaCl₂) ont été induites en différenciation dans un milieu riche en calcium (1.8 mM CaCl₂) en présence ou absence de silymarine (62 µg/mL). L'expression de la protéine AMPK phosphorylée (p-AMPK) par rapport à AMPK totale a été analysée au cours du temps par Western blot. La protéine β-actine a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs d'une expérience répétée trois fois avec des résultats similaires (panneaux supérieurs). L'histogramme est représentatif de l'analyse densitométrique de 3 expériences indépendantes (moyenne ± écart-type) (panneau inférieur). (SM: silymarine; ATRA, acide tout-trans rétinolique; GAPDH: glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). ***P* < 0.01, t-test bilatéral.

Partant des données bibliographiques qui indiquent que la forme phosphorylée d'AMPK contrôle le métabolisme des lipides en phosphorylant directement le facteur de transcription SREBP-1 (*sterol regulatory element binding protein 1*), connu pour activer la transcription des gènes lipogéniques tels que *ACC1*, *FASN*, *ACLY*, *SCD1*, *HMGCS* et *HMGCR* (Hawley et al., 1996; Li et al., 2011), j'ai cherché à évaluer l'effet de la SM sur le taux de phosphorylation de la protéine SREBP-1 (**Figure 85**).

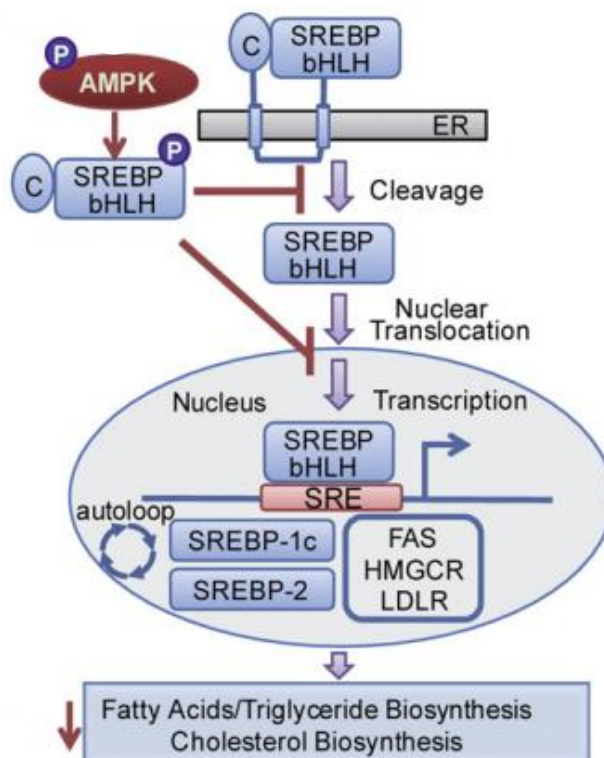


Figure 85 : Représentation schématique du modèle de régulation du facteur de transcription SREBP1 par AMPK.

Le facteur de transcription SREBP1 (*SREBP bHLH* sur le schéma) est synthétisé sous forme d'un précurseur protéique inactif, ancré dans la membrane du réticulum endoplasmique (*ER* sur le schéma) grâce à ses deux domaines transmembranaires. En réponse à une déplétion en lipides cellulaires et membranaires, le précurseur de SREBP1 est clivé par deux protéases, libérant la forme nucléaire de SREBP-1 qui transloque dans le noyau pour activer sa propre transcription ainsi que celle de ses gènes cibles lipogéniques, tels que *ACLY*, *ACSS2* et *FASN* (*FAS* sur le schéma). Le processus de maturation de SREBP est régulé négativement par l'AMPK (*Adenosine monophosphate-activated protein kinase*). D'après (Li et al., 2011).

En raison de l'indisponibilité récente de l'anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de SREBP-1 (Ser372), qui m'aurait permis de discriminer la forme phosphorylée (inactive) et non phosphorylée (active) de cette protéine par Western blot, j'ai

utilisé une approche indirecte basée sur l'identification de la forme précurseur et mature de SREBP-1 en fonction de leur poids moléculaire. Les résultats de cette analyse menée par Western blot sont présentés dans la **Figure 86**.

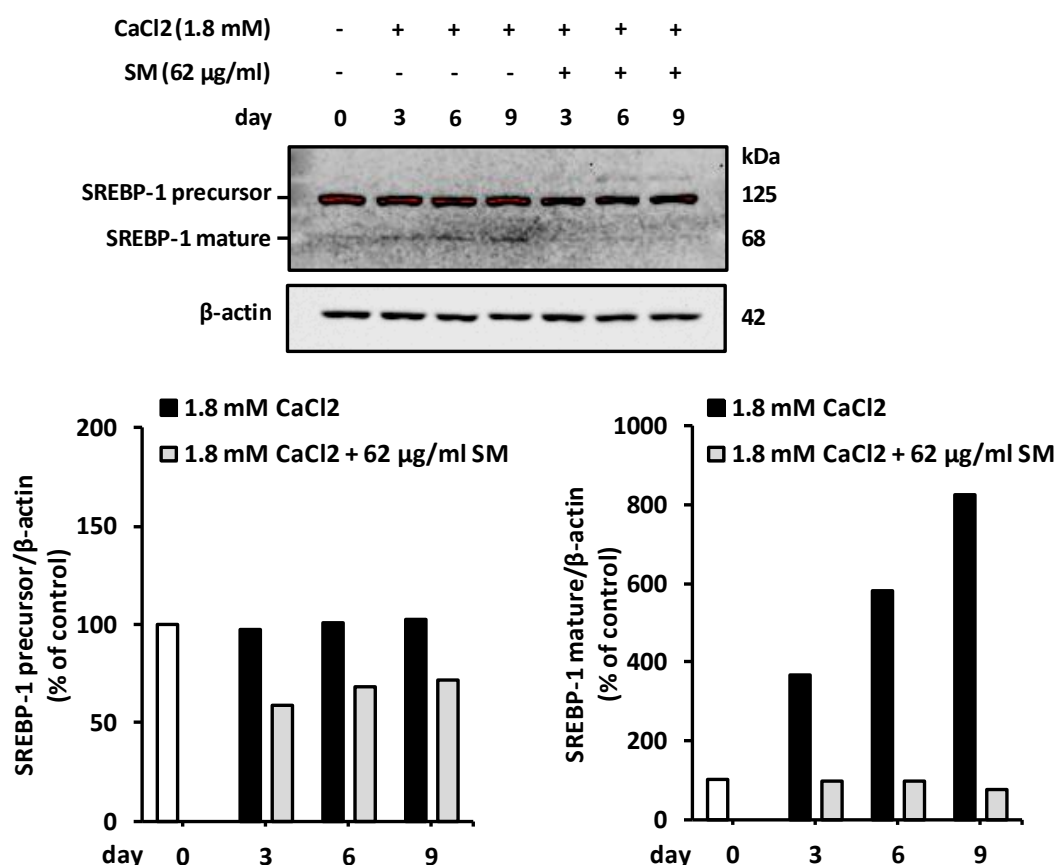


Figure 86 : La silymarine diminue l'expression et la maturation de SREBP-1 dans les kératinocytes humains induits en différenciation.

Les cellules HaCaT cultivées dans un milieu de culture pauvre en calcium (0.07 mM CaCl₂) ont été induites en différenciation dans un milieu riche en calcium (1.8 mM CaCl₂) en présence ou absence de silymarine (62 µg/mL). L'expression de la forme précurseur (non clivée) et mature (clivée) de la protéine SREBP-1 par rapport à la β-actine (contrôle de charge) a été analysée au cours du temps par Western blot. L'histogramme est représentatif de l'analyse densitométrique d'une seule expérience (SM: silymarine; GAPDH: glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase).

Comme attendu, l'induction en différenciation des cellules HaCaT par une concentration élevée en calcium (1.8 mM) conduit au clivage protéolytique de SREBP-1 au cours du temps, avec un pic de détection de la forme mature de SREBP-1 observé au 9^{ème} jour. En revanche et contrairement à nos attentes, le traitement des cellules dans les mêmes conditions mais en présence de la SM à la concentration finale de 62 µg/mL a pour effet

d'inhiber ce processus de maturation protéolytique et ceci dès le 3^{ème} jour suivant l'induction de la différenciation. Ces résultats indiquent donc que la SM régule le métabolisme lipidique dans les kératinocytes HaCaT via d'autres voies de signalisation que celle dépendante de l'axe de régulation génique AMPK/SREBP-1.

Nous avons alors exploré d'autres voies de signalisation potentiellement régulées par la SM en exploitant les données du RNA-seq. Une analyse d'enrichissement des voies KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) à l'aide de l'outil bioinformatique DAVID a permis de mettre en évidence que les gènes différentiellement sur-exprimés ($P < 0.01$; fold change > 2) dans les cellules traitées avec le TGF- β 1 et la SM comparativement aux cellules traitées avec le TGF- β 1 seul sont significativement enrichis dans la voie de signalisation de PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) ($P < 0.05$) (**Figure 87A-B**). Les récepteurs PPARs sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Trois isoformes de PPARs ont été décrits chez l'Homme : PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ . Ils peuvent être activés par des ligands naturels, tels que les acides gras et leurs métabolites lipidiques et jouent un rôle clé dans le contrôle du métabolisme lipidique. Parmi eux, PPAR γ est connu pour être exprimé par les kératinocytes de l'épiderme humain, en particulier lors de la différenciation kératinocytaire (Rivier et al., 1998). Pour évaluer l'effet de la SM sur l'activation de la voie de signalisation de PPAR γ , les cellules HaCaT ont été transfectées avec un plasmide rapporteur (PPAR γ -RE-Luc) exprimant le gène de la luciférase, placé sous le contrôle d'un promoteur contenant des éléments de réponse à PPAR γ . Après transfection, les cellules ont été traitées par le TGF- β 1 en présence ou absence de différentes concentrations de SM pendant 24 heures avant de quantifier l'activité de la luciférase dans les cellules. Les résultats de cette étude présentés dans la **Figure 87C** montrent de manière intéressante, que le traitement des cellules avec des concentrations croissantes de la SM (15, 31 et 62 μ g/mL) a pour effet de potentialiser l'activité de la luciférase. L'effet inducteur maximal de la SM sur l'activité transcriptionnelle de PPAR γ est observé à la concentration de 31 μ g/mL, et conduit à une augmentation de l'ordre de 1.6 fois de la valeur de l'activité de la luciférase quantifiée dans les cellules stimulées par le TGF- β 1 seul. Au-delà de cette concentration, la SM est toujours capable d'activer la voie de signalisation dépendante de PPAR γ mais avec une efficacité plus faible que celle observée à la concentration de 31 μ g/mL.

A

Category	Term	Count	PValue
KEGG_PATHWAY	hsa05205:Proteoglycans in cancer	7	5.92E-03
KEGG_PATHWAY	hsa03320:PPAR signaling pathway	4	1.78E-02
KEGG_PATHWAY	hsa04012:ErbB signaling pathway	4	3.50E-02
KEGG_PATHWAY	hsa01100:Metabolic pathways	17	3.53E-02

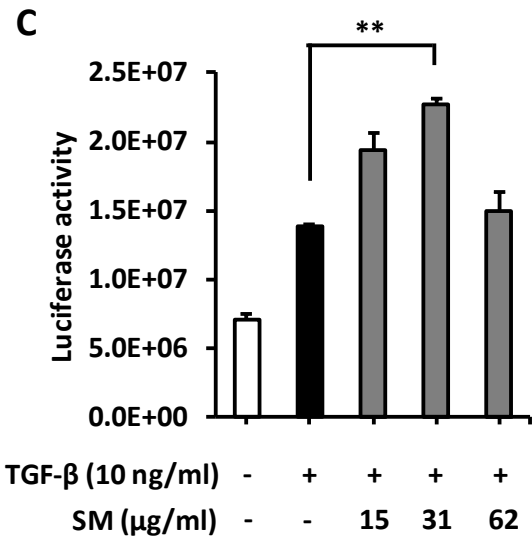
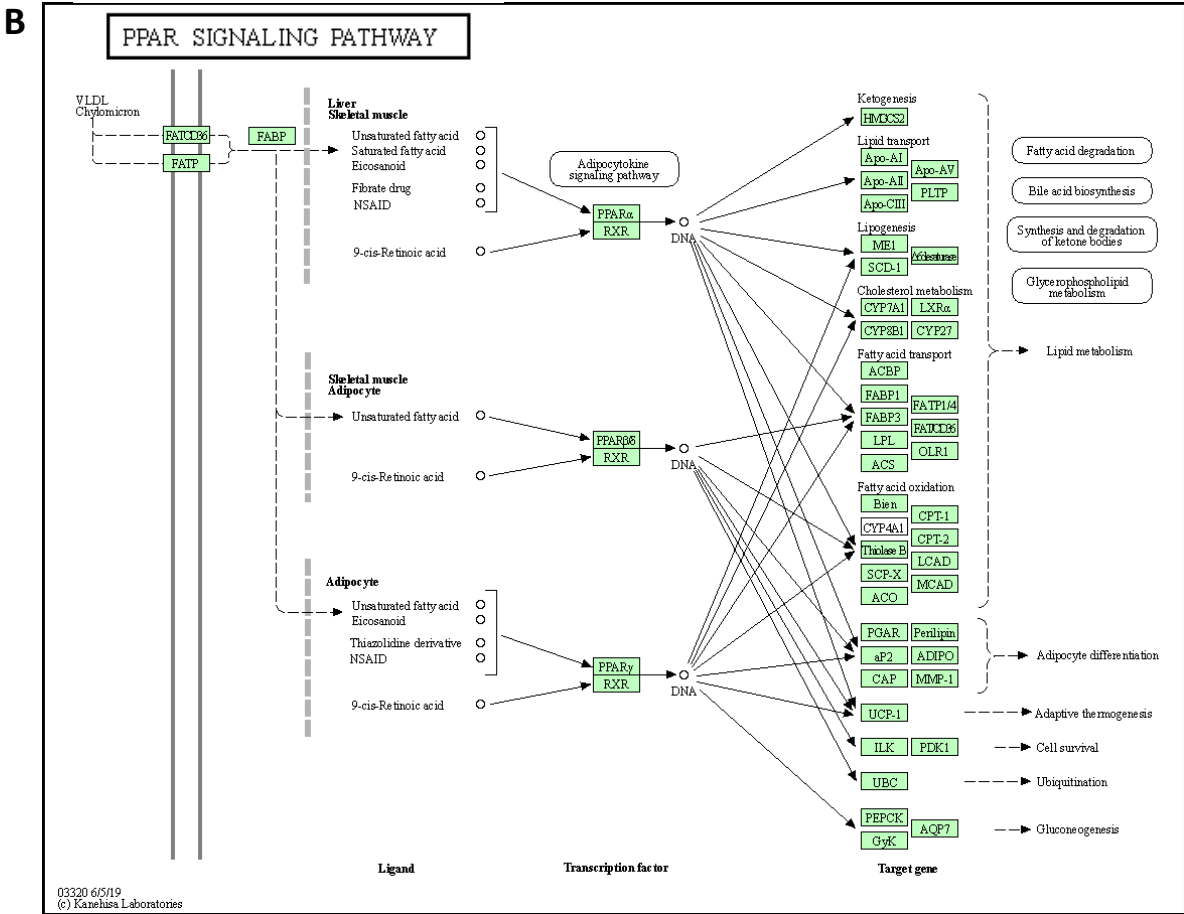


Figure 87 : La silymarine active la voie de signalisation de PPAR.

(A) Enrichissement de la voie de signalisation des récepteurs PPAR (*KEGG pathway*) dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 et la silymarine comparativement aux cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1 seul. (B) Représentation schématique de la voie de signalisation PPAR (PPAR: récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssomes) (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?hsa03320). (C) L'activité du facteur de transcription PPAR γ dans les cellules HaCaT transfectées avec le plasmide rapporteur exprimant le gène de la luciférase sous contrôle de PPAR γ a été mesurée après 24 heures de traitement par le TGF- β 1 (10 ng/mL) en présence ou absence de différentes concentrations de silymarine pendant 24 heures. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ écart-type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test bilatéral. (TGF- β 1: *Transforming growth factor beta-1*; SM: Silymarine; PPAR γ : *Peroxisome proliferator activated receptor gamma*).

4.7 Etude de l'effet de la silymarine dans un modèle murin de psoriasis induit par l'imiquimod (IMQ)

4.7.1 La silymarine améliore les lésions psoriasiques cutanées induites par l'IMQ chez la souris

Au regard de l'ensemble de nos résultats indiquant 1) que la SM exerce des activités anti-inflammatoires et anti-oxydantes dans les kératinocytes, 2) qu'elle est capable de bloquer le cycle cellulaire en phase G0/G1 ainsi que le programme de différenciation tout en 3) stimulant la synthèse des lipides dans les kératinocytes, nous avons évalué son effet thérapeutique dans un modèle expérimental de psoriasis induit par l'imiquimod (IMQ) chez la souris.

Le psoriasis est une dermatose inflammatoire chronique caractérisée par une hyperplasie de l'épiderme (acanthose) due à une hyperprolifération et une différenciation anormale des kératinocytes. Dans la couche cornée, l'accumulation anormale de polynucléaires neutrophiles forme des microabcès de Munro-Sabouraud, à l'origine d'un foyer inflammatoire. L'acanthose s'accompagne très souvent d'invaginations des bourgeons interpapillaires de l'épiderme dans le derme réticulaire (papillomatose). Le derme superficiel des peaux psoriasiques est le siège d'une hypervascularisation et de la présence d'un infiltrat inflammatoire composé de lymphocytes T (LT), de polynucléaires neutrophiles, de cellules dendritiques (DC), de macrophages et de natural killer (NK). Le rôle majeur des LT CD4⁺ de

type Th17 dans cette maladie a été récemment démontré, aux côtés des LT CD4⁺ de type Th1 et Th22. Les LTh17 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26 et TNF- α , capables de stimuler les kératinocytes. Ces derniers prolifèrent et produisent à leur tour des chimiokines, cytokines et peptides antimicrobiens, responsables du recrutement des leucocytes, de l'induction de la néoangiogénèse et de l'activation des DC et LT. Ces interactions entretiennent le cercle vicieux d'activation cellulaire réciproque qui pérennise les lésions cutanées et leur chronicité (Nestle et al., 2009a; Rendon and Schäkel, 2019).

La **Figure 88A** est une représentation schématique du protocole d'expérimentation animale mis en place au laboratoire. Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'application topique pendant 6 jours consécutifs de la SM (9 mg dissous dans de l'acétone (w/v)) n'induisait pas d'effets secondaires indésirables sur la peau saine du dos épilé des souris C57BL/6 comparativement au groupe contrôle. Aucune des souris traitées avec la SM n'a présenté de signes cliniques d'inflammation au cours de l'étude, comme l'atteste l'absence d'apparition de plaques érythémateuses ou tout autre signe cutané anormal (**Figure 88B**). Nous avons ensuite comparé les caractéristiques macroscopiques et physiologiques des peaux de souris traitées par l'IMQ et celles prétraitées par la SM puis traitées par l'IMQ (**Figure 88B**; **Figure 89**). Comme attendu, l'application topique et quotidienne d'IMQ pendant 6 jours consécutifs sur le dos épilé des souris conduit dès le 4^{ième} jour de traitement à l'apparition des plaques érythémateuses, évoluant en plaques squameuses épaisses entre le 5^{ième} et 7^{ième} jour suivant le début du traitement (**Figure 88C**). Une perte de poids de l'ordre de 20 % du poids initial des animaux est observée chez les souris au 4^{ième} jour de traitement avec l'IMQ, liée en partie à leur déshydratation. Au 5^{ième} jour d'application de l'IMQ les animaux reprennent du poids et retrouvent leur poids initial à la fin de l'étude. De manière intéressante, l'application topique de la SM 45 minutes avant l'application de l'IMQ atténue significativement ces manifestations cliniques (**Figure 88D**). L'évaluation par quantification des scores PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*) révèle en effet une réduction significative à très significative de la gravité de la maladie chez ces souris par rapport aux souris traitées seulement par l'IMQ. En effet, au 7^{ième} jour suivant le début du traitement, le score PASI associé au degré de rougeur, d'épaississement de la peau et de desquamation chez les souris traitées avec l'IMQ est égal à 2.5, 3.5 et 2.5, respectivement,

contre seulement 0, 1 et 0.25 chez les souris prétraitées pendant 45 minutes par la SM puis traitées par l'IMQ.

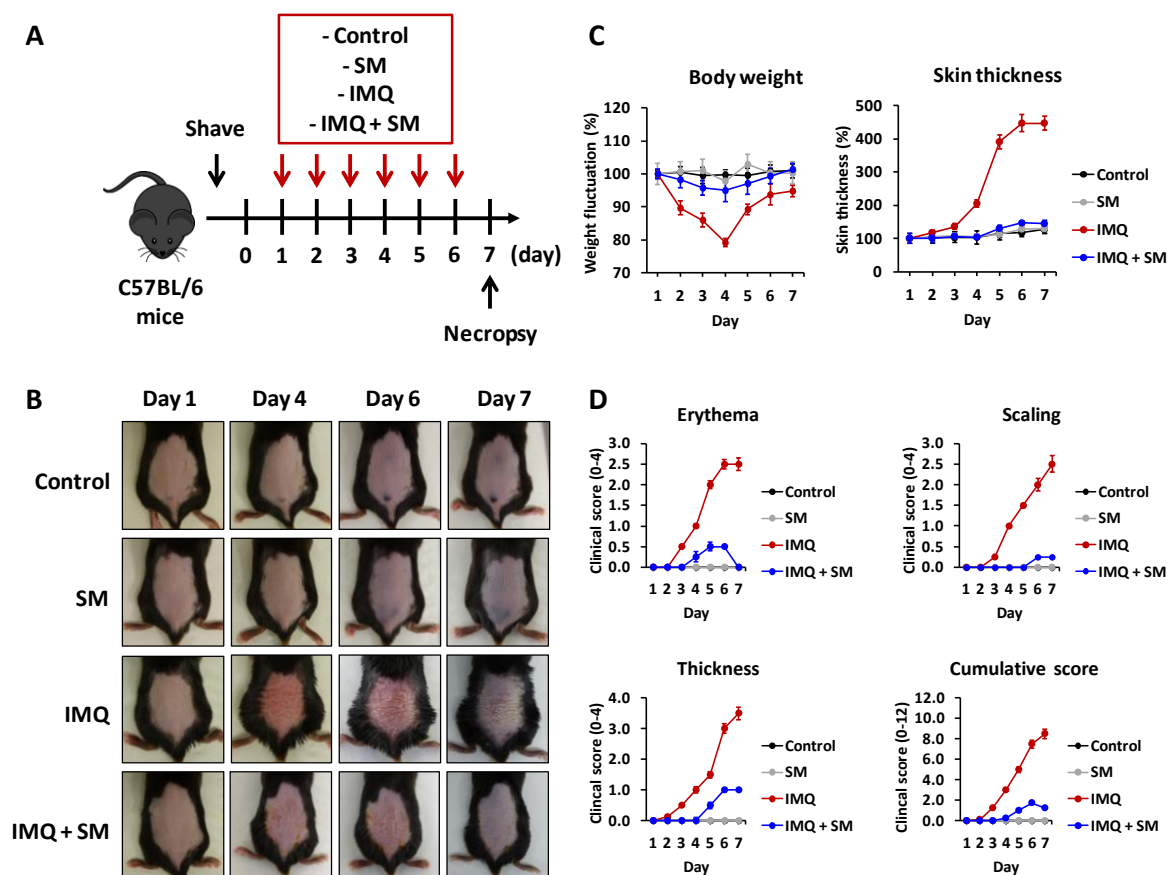


Figure 88 : La silymarine atténue la sévérité du psoriasis induit par l'IMQ chez les souris C57BL/6.

(A) Schéma du protocole d'expérimentation animale. Le dos épilé des souris C57BL/6 a été traité quotidiennement par l'acétone (groupe contrôle), la silymarine, l'IMQ ou l'IMQ après le prétraitement pendant 45 minutes avec la silymarine, pendant 6 jours consécutifs avant d'être sacrifiées. (B) Photographies macroscopiques de la peau du dos des souris avant l'induction de la pathogénèse du psoriasis et au 4^{ième}, 6^{ième} et 7^{ième} jour après le début de traitement. (C) Evolution quotidienne du poids et de l'épaisseur de la peau du dos des souris durant toute la durée de l'expérimentation. (D) Evaluation clinique quotidienne de l'érythème, la desquamation et l'épaississement du dos de la peau du dos des souris (score PASI de 0 à 4). La somme de ces trois paramètres reflète la sévérité de la maladie (score PASI de 0 à 12). Les résultats sont représentatifs d'une expérimentation répétée deux fois avec des résultats similaires. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ l'écart-type avec 7 souris par groupe (IMQ : Imiquimod, SM : Silymarine).

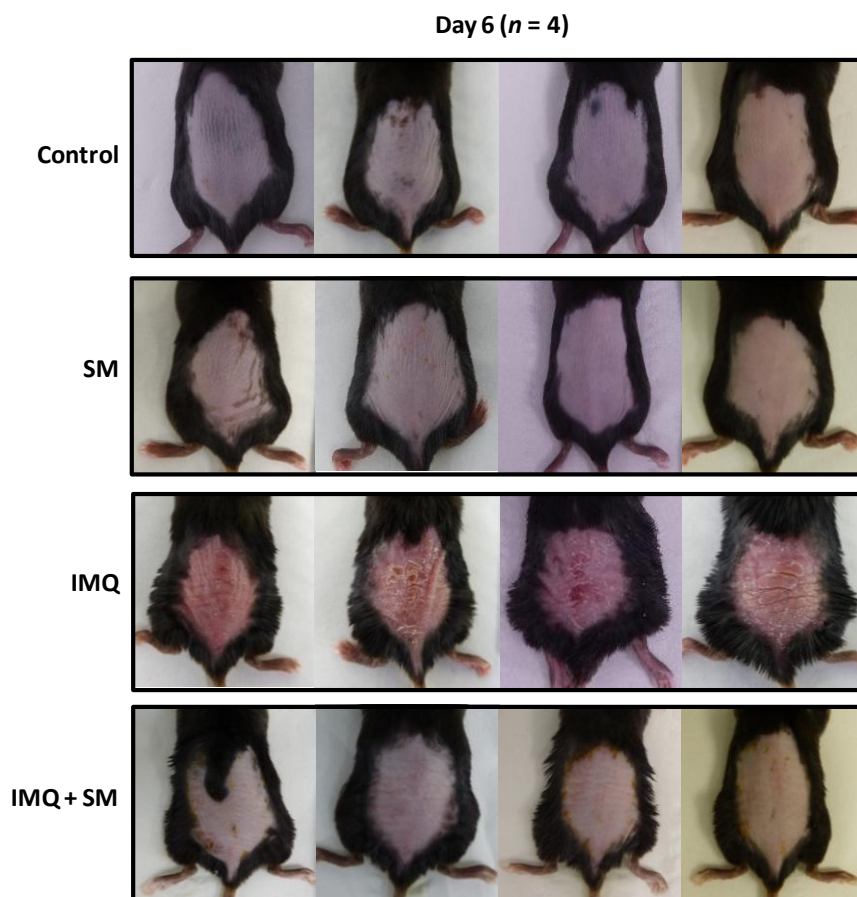


Figure 89 : Photographies macroscopiques de la peau du dos des souris au 6^{ème} après le début de traitement (n = 4 souris par groupe).

Les résultats sont représentatifs d'une expérimentation répétée deux fois avec des résultats similaires.

L'examen histologique des coupes de peaux de souris par coloration à l'hématoxyline et éosine (H&E) confirment les observations phénotypiques et les scores PASI (**Figure 90**). L'analyse met en effet en évidence l'existence d'une acanthose, d'un épaissement de la couche cornée (hyperkératose) et d'une infiltration dermique de cellules inflammatoires dans les peaux de souris traitées par l'IMQ en comparaison des peaux de souris du groupe contrôle. En revanche, le prétraitement du dos des souris avec la SM diminue très significativement l'ensemble de ces manifestations histopathologiques, confirmant l'effet protecteur de la SM contre l'induction et la persistance des lésions psoriasiques induites par l'IMQ.

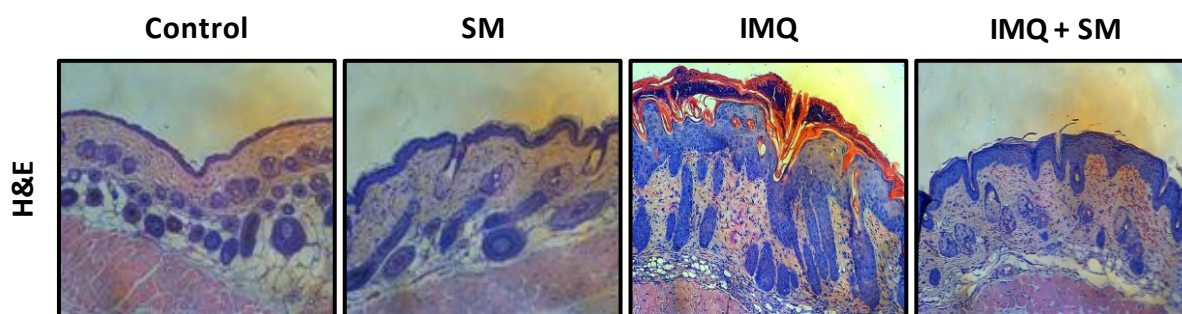


Figure 90 : La silymarine diminue l'hyperplasie épidermique induite par l'IMQ chez les souris C57BL/6. Le dos épilé des souris C57BL/6 a été traité quotidiennement avec l'acétone (groupe contrôle), la silymarine, l'IMQ ou l'IMQ après le prétraitement avec la silymarine pendant 6 jours consécutifs avant d'être sacrifiées le 7^{ème} jour. Les résultats sont représentatifs d'une expérimentation répétée deux fois avec des résultats similaires. Coloration H&E des coupes histologiques de la peau du dos des souris après 6 jours de traitement (IMQ : Imiquimod, SM : Silymarine).

4.7.2 La silymarine régule l'expression des marqueurs moléculaires de l'inflammation, la différenciation épidermique et la synthèse lipidique chez les souris traitées par l'IMQ

J'ai par la suite cherché à établir les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de l'effet correctif, voire thérapeutique, de la SM contre le développement des plaques psoriasiques induites dans ce modèle murin de psoriasis. J'ai orienté mon étude en tenant compte des données de la littérature dans ce domaine mais aussi des nouveaux rôles fonctionnels que nous avons pu attribuer à cet extrait de plante.

La pathogénèse du psoriasis est associée à la surexpression des cytokines de l'axe IL-23/IL-17/IL-22, conduisant à l'augmentation l'expression de gènes cibles codant des peptides antimicrobiens (S100A8 et S100A9), et des chimiokines (CCL20 et CXCL1) (van der Fits et al., 2009; Nestle et al., 2009b). Etant donné que nous avons montré que la SM était capable de bloquer les réponses inflammatoires associées à la production d'IL-6 et de COX2 par les kératinocytes (**Figure 68**), j'ai naturellement évalué le niveau d'expression de ces médiateurs pro-inflammatoires dans les peaux de souris des différents groupes. Cette étude a été menée par RT-qPCR (**Figure 91**). Comme attendu et conformément aux nombreux infiltrats leucocytaires observés dans les peaux des souris traitées par l'IMQ, l'application topique de l'IMQ sur le dos des souris conduit à une augmentation significative du taux d'expression des

cytokines pro-inflammatoires IL-23A (2.7 fois) et IL-22 (25.4 fois) ainsi que celui de S100A8 (219.2 fois), S100A9 (766.5 fois), CXCL1 (5.1 fois) et CCL20 (1.7 fois) comparativement aux échantillons des souris contrôles, traitées par l'acétone. En revanche, le prétraitement des peaux de souris avec la SM en amont de l'IMQ conduit à une diminution significative ($P < 0.001$) de l'ordre de 3.9-, 32.1-, 6.1-, 4.8-, 2.3- et 1.7-fois du niveau d'expression respectif de IL-23A, IL-22, S100A8, S100A9, CXCL1 et CCL20 détecté dans les peaux de souris traitées par l'IMQ. Cette première série de résultats révèlent donc que la SM est capable d'inhiber le processus inflammatoire induit par l'IMQ, notamment en inhibant l'expression des cytokines inflammatoires associées aux lymphocytes Th17/Th22 activées.

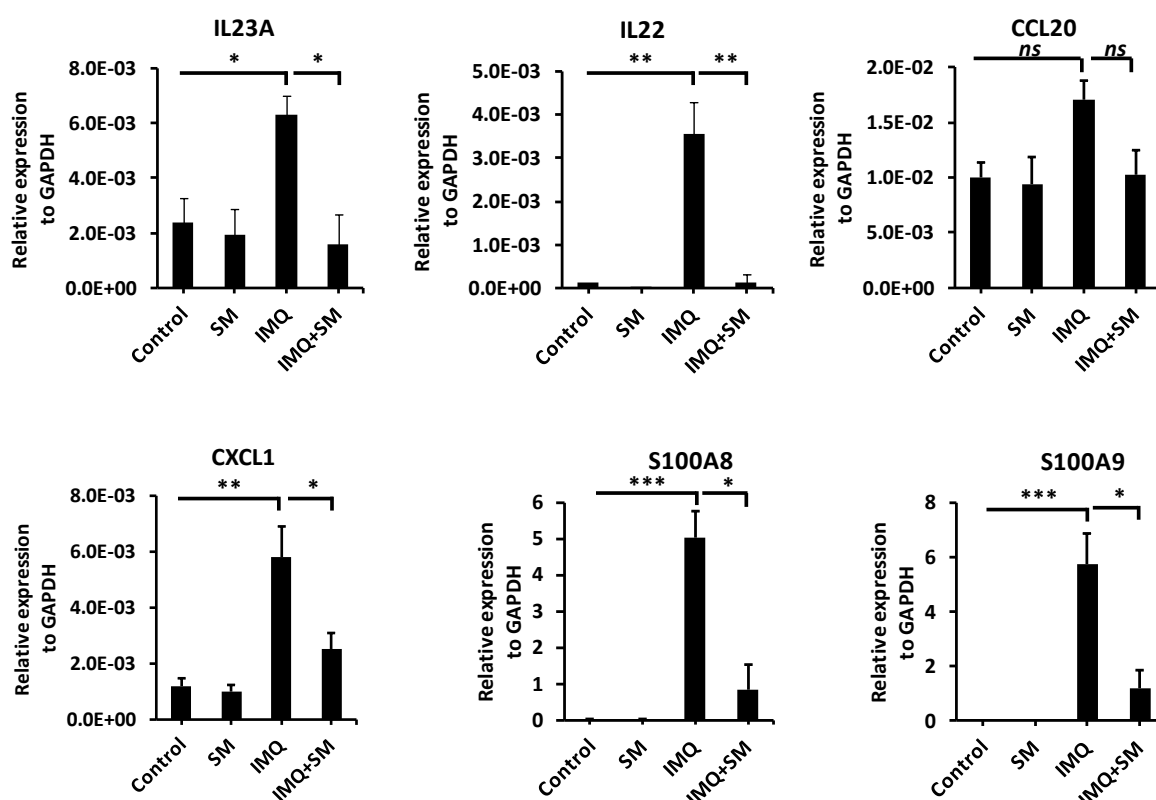


Figure 91 : La silymarine inhibe l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire psoriasique induite par l'IMQ chez les souris C57BL/6.

Le dos épilé des souris C57BL/6 a été traité quotidiennement par l'acétone (groupe contrôle), la silymarine, l'IMQ ou l'IMQ après le prétraitement avec la silymarine pendant 6 jours consécutifs. Les souris ont été sacrifiées le 7^{ième} jour. L'expression des gènes *IL-23A*, *IL-22*, *S100A8*, *S100A9*, *CXCL1* et *CCL20* a été mesurée par RT-qPCR. Le gène de ménage *GAPDH* a été utilisé pour normaliser l'expression des gènes cibles. Les résultats sont représentatifs d'une expérimentation répétée deux fois avec des résultats similaires. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ l'écart-type avec 7 souris par groupe. ns (pas de différence statistique significative), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, t-test bilatéral (IMQ : Imiquimod, SM : Silymarine).

Il a été démontré que les lésions psoriasiques se caractérisent par une altération du programme de différenciation des kératinocytes, associée à une disparition de la couche granuleuse (hypogranulose) et d'une parakératose. De manière remarquable, l'application de la SM sur la peau du dos des souris en amont du traitement par l'IMQ conduit à une restauration significative de l'expression des marqueurs précoces (K10) et tardifs (IVL et LOR) de la différenciation kératinocytaire de l'ordre, respectivement, de 10.6-, 2.5- et 14.0-fois du niveau d'expression détecté dans la peau des souris traitées uniquement par l'IMQ (**Figure 92**). Les niveaux d'expression de ces marqueurs sont similaires à ceux détectés dans les peaux des souris contrôles, traitées par l'acétone. A noter que l'application de la SM sur la peau saine des souris, en absence de traitement par l'IMQ, stimule également l'expression de l'ensemble de ces marqueurs de différenciation des kératinocytes mais de façon beaucoup plus modérée. Cette deuxième série de résultats suggèrent donc que la SM pourrait non seulement activer la kératinisation de l'épiderme dans ce modèle expérimental murin de psoriasis, mais pourrait également participer au renouvellement cellulaire de l'épiderme des peaux saines.

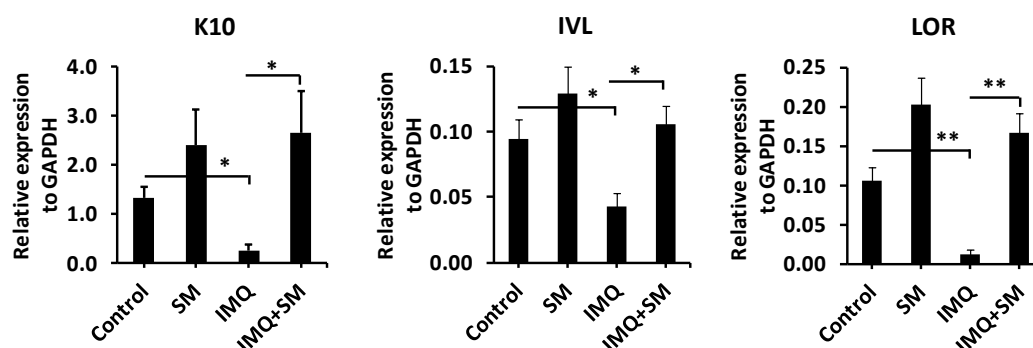


Figure 92 : La silymarine restaure l'expression des marqueurs de différenciation des kératinocytes dans le modèle murin de psoriasis induit par l'IMQ.

Le dos épilé des souris C57BL/6 a été traité quotidiennement par l'acétone (groupe contrôle), la silymarine, l'IMQ ou l'IMQ après le prétraitement avec la silymarine pendant 6 jours consécutifs. Les souris ont été sacrifiées le 7^{ième} jour. L'expression des gènes *K10*, *IVL* et *LOR* a été mesurée par RT-qPCR. Le gène de ménage *GAPDH* a été utilisé pour normaliser l'expression des gènes cibles. Les résultats sont représentatifs d'une expérimentation répétée deux fois avec des résultats similaires. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ l'écart-type avec 7 souris par groupe. *ns* (pas de différence statistique significative), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, t-test bilatéral (IMQ : Imiquimod, SM : Silymarine, K10 : Kératine 10 ; IVL : Involucrine ; LOR : Loricrine).

Un lien de causalité entre l'apparition du psoriasis et la dyslipidémie a été suggéré dans plusieurs études (Ma et al., 2013). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore mal compris. Une récente étude a démontré que l'IL-17A joue un rôle important dans la pathogénèse du psoriasis en augmentant le taux de cholestérol intracellulaire, qui à son retour, par une boucle de rétroaction négative, inhibe l'expression des facteurs de transcription SREBP-1 et SREBP-2, ainsi que leurs gènes cibles tels que *HMGCR*, *FASN* et *ACACA* (Varshney et al., 2016). Etant donné que nous avons montré que la SM était capable de moduler la synthèse de lipides dans les kératinocytes (**Figure 83B**) en régulant l'expression de *ACSS2*, *ACLY* et *FASN* (**Figure 82** et **Figure 83A**), j'ai, à nouveau, naturellement cherché à établir si un tel processus biologique pouvait également prendre place *in vivo* dans le modèle expérimental murin du psoriasis induit par l'IMQ. J'ai par conséquent comparé le profil d'expression génique de *SREBF1* (*Sterol regulatory element binding transcription factor 1*), codant pour la protéine SREBP-1, et de ses gènes cibles *ACSS2*, *ACLY* et *FASN*, dans les échantillons de peaux des différents groupes de souris (**Figure 93**). Les résultats de cette analyse par RT-qPCR montrent que le niveau d'expression relatif du gène *SREBF1* est 2.7 fois diminué dans les peaux des souris traitées par l'IMQ en comparaison de peaux des souris contrôles, traitées par l'acétone. Cette sous-expression de *SREBF-1* est corrélée avec une diminution également significative de l'expression d'*ACSS2* (3.3 fois sous-régulé), *ACLY* (7.1 fois sous-régulé) et *FASN* (4.8 fois sous-régulé) dans les peaux des souris traitées par l'IMQ par rapport aux souris contrôles. De manière intéressante, le prétraitement des peaux des souris avec la SM en amont de l'IMQ a pour effet de restaurer de façon significative et de l'ordre de 2.2-, 3.7-, 8.1 et 5.2-fois le niveau d'expression relatif de *SREBF-1*, *ACSS2*, *ACLY* et *FASN* détecté dans les peaux de souris traitées par l'IMQ. Les taux d'expression de ces marqueurs sont similaires à ceux détectés dans le groupe de souris contrôles, traitées par l'acétone.

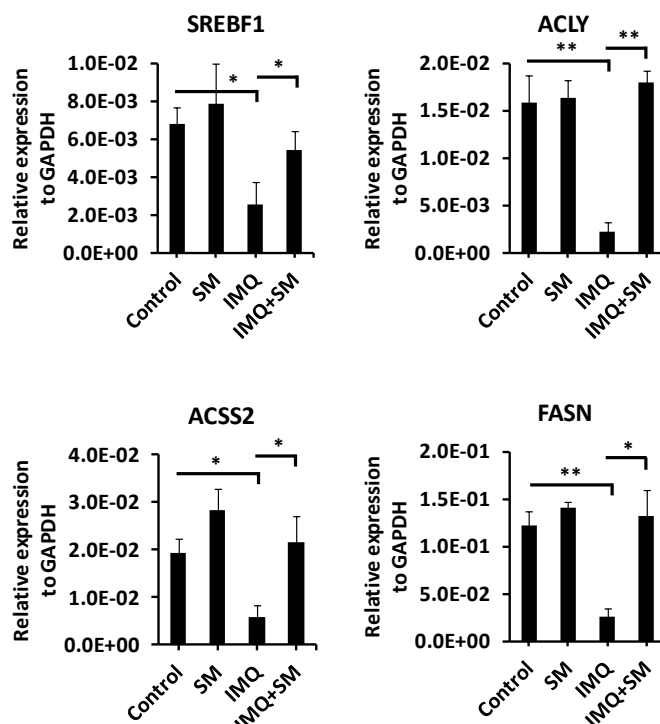


Figure 93 : La silymarine restaure l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique dans le modèle murin de psoriasis induit par l'IMQ.

Le dos épilé des souris C57BL/6 a été traité quotidiennement par l'acétone (groupe contrôle), la silymarine, l'IMQ ou l'IMQ après le prétraitement avec la silymarine pendant 6 jours consécutifs. Les souris ont été sacrifiées le 7^{ième} jour. L'expression des gènes *SREBF1*, *ACSS2*, *ACLY* et *FASN* a été mesurée par RT-qPCR. Le gène de ménage *GAPDH* a été utilisé pour normaliser l'expression des gènes cibles. Les résultats sont représentatifs d'une expérimentation répétée deux fois avec des résultats similaires. Les données correspondent à la moyenne $\pm$ l'écart-type avec 7 souris par groupe. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, t-test bilatéral (IMQ : Imiquimod, SM : Silymarine; *SREBF1* : *Sterol regulatory element binding transcription factor 1*; *ACSS2*: *Acetyl-CoA synthetase member 2*, *ACLY*: *ATP citrate lyase*; *FASN* : *Fatty acid synthase*; *GAPDH*: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase).

L'ensemble des résultats collectés dans ce modèle murin expérimental de psoriasis montre qu'au-delà de l'effet antiprolifératif et anti-inflammatoire de la SM, cet extrait de plante est également capable de réguler le métabolisme lipidique dans les lésions psoriasiques cutanées des souris traitées par l'IMQ et ceci sans affecter l'homéostasie des peaux de souris naïves, non traitées par l'IMQ. L'utilisation de la SM chez les patients souffrant de psoriasis pourrait ainsi aider à restaurer la fonction de barrière cutanée fortement endommagée chez ces derniers. Un tel effet d'un extrait de plante dans la synthèse des lipides cutanés n'a pas été décrit à notre connaissance et pourrait, par conséquent, offrir une méthode alternative et/ou complémentaire aux traitements

pharmacologiques actuels pour la prise en charge des patients souffrant de psoriasis, mais également d'autres pathologies inflammatoires cutanées.

5 Discussion et perspectives

5.1 Les plantes : une source de composés bioactifs encore inexplorée

La Nature est une source d'inspiration majeure pour le développement de nouveaux médicaments. Le paclitaxel (Taxol®, *Taxus brevifolia* Nutt.), l'artémisinine (*Artemisia annua* L.), la capsaïcine (Qutenza®, *Capsicum annum* L.) et la galantamine (Razadyne®, *Galanthus nivalis*) sont autant d'exemples remarquables de molécules bioactives issues de la biodiversité végétale. Ces composés naturels sont utilisés comme agent anti-cancéreux, anti-parasitaire, anti-douleur ou encore anti-démence chez l'Homme. Toutefois, parmi les 400 000 espèces de plantes supérieures actuellement répertoriées à travers le monde, seulement 6 % d'entre elles ont été exploitées pour leur potentiel thérapeutique. Cela peut s'expliquer par la complexité du processus de découverte de molécules actives, qui est fastidieux, long et coûteux. Différentes stratégies de criblage ont été développées pour faciliter l'identification des substances bioactives. Ces approches reposent sur des tests biochimiques (*in tubo*) et cellulaires (*in cellulo*). Les criblages basés sur des tests biochimiques sont relativement simples à mettre en œuvre et renseignent sur l'existence d'interactions physiques entre un composé et sa cible thérapeutique. En revanche, ils ne permettent pas de fournir des informations relatives à la cytotoxicité des composés envers les cellules (biocompatibilité) et ne sont pas prédictifs du maintien de l'activité fonctionnelle du composé dans des systèmes biologiques. Ces structures doivent en effet être capables de passer de nombreuses barrières cellulaires avant de pouvoir interagir avec leurs cibles moléculaires, le plus souvent intracellulaires. A l'inverse, les criblages basés sur des tests cellulaires permettent de s'affranchir de ces limites et de sélectionner un nombre plus restreint de composés à valider sur des modèles animaux appropriés et, plus tard, chez les patients. Ils offrent également la possibilité de cribler des composés bioactifs dans un contexte biologique précis, par traitement des cellules avec des cytokines pour mimer un état inflammatoire, par exemple, ou avec des facteurs de croissance pour mimer l'engagement des cellules vers une voie biologique spécialisée.

5.2 Justification de la stratégie de criblage placée sous contrôle de l'axe de régulation TGF- β 1/microARN-21-5p

A notre connaissance, aucune stratégie de criblage cellulaire similaire à la nôtre, basée sur l'expression des microARNs avec pour objectif d'identifier des substances bioactives d'intérêt, aussi bien fondamental qu'appliqué en biologie cutanée, n'a été développée. Nous avons par conséquent saisi cette opportunité pour mettre en place la première stratégie de criblage par bioluminescence « positive » de banques d'extraits naturels de plantes. Cette approche est basée sur le système rapporteur miR-ON, RILES, et sur l'axe de régulation TGF- β 1/microARN-21-5p. Le choix de cet axe a été motivé par les données de la littérature.

Le TGF- β 1 est décrit pour réguler des fonctions biologiques essentielles depuis le développement embryonnaire où il contrôle la différenciation des cellules souches, jusqu'au stade adulte où il régule l'homéostasie des tissus, l'auto-immunité et le processus de la cicatrisation. Ce facteur de croissance exerce des effets biologiques multiples et variés dans les réponses inflammatoires, la néo-vascularisation, la transition épithélio-mésenchymateuse et la production des ligands de la matrice extracellulaire (Roberts et al., 1986; Croker et al., 2003; Finnson et al., 2013). De la même manière, le microARN-21 est impliqué dans de nombreux processus biologiques, tels que la prolifération, différenciation, la migration, l'angiogenèse, l'inflammation et l'apoptose. Ce microARN est l'un des premiers microARNs à avoir été identifié comme « oncomiR » en réprimant l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, tels que PTEN, PDCD4 et TMP1 (*tropomyosin 1*) (Zhu et al., 2008; Medina et al., 2010; Feng and Tsao, 2016). Au-delà de son rôle particulièrement bien décrit dans la progression tumorale (Volinia et al., 2006), le microARN-21 intervient dans de nombreuses autres pathologies, telles que les maladies fibrotiques (Huang et al., 2015b), cardiovasculaires (Cheng and Zhang, 2010), auto-immunes (Wang et al., 2016) et inflammatoires (Sheedy, 2015). Dans la peau, le microARN-21 est fortement exprimé dans l'épiderme et les follicules pileux (Yi et al., 2006; Ahmed et al., 2011) où il participe activement à l'homéostasie cutanée. De profils d'expression anormaux du microARN-21 ont été mis en évidence dans les lésions cutanées chez les patients souffrant de psoriasis,

d'eczéma, de sclérodermie ou encore de chéloïdes (Sonkoly et al., 2007; Jiang et al., 2012; Degueurce et al., 2016). Ce microARN est considéré comme une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de ces pathologies cutanées. A titre d'exemple, il a été montré à plusieurs reprises que l'injection sous cutanée de microARN-21-5p et -3p synthétiques a pour effet d'accélérer significativement la cicatrisation des plaies dans des modèles murins (Yang et al., 2011; Wang et al., 2012b; Wu et al., 2020b; Wang et al., 2020). De manière intéressante, le TGF- β 1 régule l'expression du microARN-21 au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, en stimulant notamment la maturation du pri-microARN-21 en pré-microARN-21 via l'interaction des protéines Smad avec la sous-unité p68 du complexe Microprocesseur, contenant Drosha (Davis et al., 2008, 2010; Yang et al., 2011; Zhong et al., 2011; Wang et al., 2012c). Yang et al. ont montré que le traitement des kératinocytes humains par le TGF- β 1 induit la migration cellulaire en régulant l'expression du microARN-21-5p, qui en retour réprime l'expression de TIMP3 (*tissue inhibitors of metalloproteinases 3*), TIAM1 (*T cell lymphoma invasion and metastasis*) et PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) (Yang et al., 2011).

Par conséquent, en plaçant la plateforme de criblage RILES sous contrôle de l'axe de régulation TGF- β 1/microARN-21-5p, nous pensions être en mesure d'identifier de(s) composé(s) bioactif(s) exerçant un effet potentialisateur de cette voie de signalisation.

Cette approche s'est avérée payante puisque parmi les extraits identifiés au cours de cette campagne de criblage, nous avons pu constater que la SM était capable de moduler l'activité du microARN-21-5p uniquement après stimulation des cellules HaCaT et NHEK par le TGF- β 1. Le criblage en condition « basale » n'aurait donc pas permis d'identifier ce complexe de flavonolignanes. Cependant, nous n'avons pas réussi à prouver à ce jour le lien de causalité direct entre la modulation de l'axe de régulation TGF- β 1/microARN-21-5p et les réponses biologiques identifiées lors de ce travail. Un essai de transfection d'inhibiteurs synthétiques spécifiques du microARN-21-5p (AMO-21-5p pour *anti-miRNA-21-5p oligonucleotides*) a été réalisé au cours des dernières semaines de ce doctorat. Cet essai s'est avéré non concluant en raison de la difficulté à maintenir l'efficacité de l'AMO-21-5p sur une période de temps suffisante longue (6 à 9 jours) pour apprécier l'effet de l'invalidation fonctionnelle du microARN-21-5p sur le taux de synthèse des lipides par les cellules HaCaT.

Cette étude devra être renouvelée en générant une lignée cellulaire HaCaT stable, exprimant soit de façon constitutive (système miRZipTM Anti-microRNA, BioCat) soit de façon régulée (système Tet-ON inductible par la tétracycline) un shRNA dirigé contre le microARN-21-5p.

5.3 Identification de l'extrait de plante *Silybum marianum* (L.)

Gaertn. puis de la silymarine comme étant des régulateurs du microARN-21-5p

Nous avons criblé une extractothèque de 37 extraits bruts de plantes fournie par le Consortium ValBioCosm. Bien que cette banque contienne un nombre relativement limité d'extraits, elle est constituée en revanche de plantes médicinales reconnues pour leurs vertus thérapeutiques ou de bien-être (cosmétique). A ce titre, elle contient l'extrait brut d'arnica (*Arnica chamassonis*) connu pour ses propriétés anti-inflammatoires et antalgiques (Klaas et al., 2002) ; l'extrait brut de bardane (*Arctium lappa* L.) utilisé pour ses fonctions dépuratives et le traitement des pathologies cutanées telles que l'acné, l'eczéma et le psoriasis (Chan et al., 2011b) ; l'extrait brut de trèfle rouge (*Trifolium pratense*) exploité pour le soulagement des symptômes de la ménopause (Dornstauder et al., 2001) ou encore l'extrait brut d'alchemille vulgaire (*Alchemilla vulgaris* L.) reconnu pour ses vertus astringentes, hémostatiques et cicatrisantes (Tasić-Kostov et al., 2019). Ces extraits végétaux contiennent un grand nombre de métabolites secondaires bioactifs tels que des phénols, des stéroïdes, des coumarines, des flavonoïdes, des terpènes, des alcaloïdes et des défensines.

Durant cette campagne de criblage, nous avons identifié trois extraits bruts de plantes – *Silybum marianum* (L.) Gaertn., *Centella asiatica* (L.) et *Molinea caerulea* (L.) Moench – pour leur capacité à réguler l'activité du microARN-21-5p dans les cellules HaCaT et NHEK en réponse au TGF- β 1. Par la suite, nous avons identifié la SM, une composante majoritaire du *Silybum marianum* (L.) Gaertn., comme étant responsable de l'activité modulatrice du microARN-21-5p. La SM est un complexe de six flavonolignanes dont la silibinine (SB, 50 à 60 % de l'extrait de SM) sous forme de deux diastérisomères A et B, la silychristine (SC, 15 à 30 %), la silydianine (10 à 15 %) et l'isosilibinine (5 à 10 %) sous forme de deux isomères A et B. La SB est, à ce jour, reconnue pour être le principal constituant actif

de la SM. Cette structure est documentée pour ses propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, hépatoprotectrices et, plus récemment, anti-cancéreuses (Abenavoli et al., 2010; Cheung et al., 2010; Dheeraj et al., 2018). De façon surprenante, nous avons récemment montré que l'effet modulateur de la SM sur l'expression du microARN-21-5p n'est pas dépendant de la SB mais de la SC dans les cellules HaCaT traitées par le TGF- β 1. En effet, le fractionnement bio-guidé de la SM par chromatographie de partage centrifuge (CPC) couplé à l'HPLC/UV et la plateforme de criblage cellulaire RILES/21.5p T a révélé que seule la fraction enrichie avec la SC était capable de moduler l'activité du microARN-21-5p. Ce travail a été réalisé en collaboration avec nos collègues de l'équipe analytique du laboratoire de l'ICOA (UMR7311, Orléans).

Les rôles biologiques de la SC sont moins bien décrits que ceux de la SM ou encore de la SB. Toutefois, il a été montré que ce flavonolignane est responsable de l'activité inhibitrice de la SM sur le transporteur MCT8 des hormones thyroïdiennes (Johannes et al., 2016). La SC est également capable d'inhiber l'activité pro-inflammatoire de la lipoxigénase et de la prostaglandine synthétase *in vitro* (Fiebrich and Koch, 1979). Par ailleurs, il a été rapporté que la SC protège les cardiomyocytes contre le stress oxydant induit par la doxorubicine en stabilisant les membranes, en chélatant le fer, en piégeant les radicaux libres et en augmentant le taux d'ATP intracellulaire (Chlopčíková et al., 2004). Dans une autre étude, Sonnenbichler et al. ont montré que la SC stimule la prolifération, la synthèse d'ADN et des protéines ainsi que l'activité métabolique de la lignée cellulaire Vero (cellules rénales du singe vert d'Afrique) (Sonnenbichler et al., 1999). Des études sont en cours au laboratoire pour évaluer l'effet de cette structure dans la prolifération, la différenciation et la synthèse lipidique dans les kératinocytes en réponse au TGF- β 1.

Nous n'excluons pas, pour autant, que plusieurs flavonolignanes de la SM exerceraient des effets synergiques sur le comportement biologique des kératinocytes. Il n'est pas exclu non plus que d'autres familles de molécules, ayant des structures différentes des flavonolignanes, soient également impliquées dans l'effet régulateur du microARN-21-5p. Des études phytochimiques ont montré que l'extrait brut de *Centella asiatica* (L.) contient également des flavonoïdes mais en proportion beaucoup plus faible que ceux retrouvés dans l'extrait brut de *Silybum marianum* (L.) Gaertn (Gray et al., 2018). L'extrait

brut de *Centella asiatica* (L.) contient, en revanche, des quantités élevées de triterpènes pentacycliques dont l'acide asiatique, l'acide madécassique, l'asiaticoside et la madécosside. Actuellement, cet extrait est exploité dans le domaine de la dermato-cosmétique (James and Dubery, 2009) (Bylka et al., 2013). A l'inverse, aucune donnée phytochimique n'a été publiée pour *Molinea caerulea*. De ce fait, il serait intéressant de réaliser un fractionnement bio-guidé de ces deux extraits bruts de plantes avec la plateforme de criblage RILES/21.5p T pour vérifier si l'effet de l'extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn sur la régulation du microARN-21-5p est exclusivement dépendant des flavonolignanes.

5.4 Mécanisme de régulation du microRNA-21-5p par la silymarine en réponse au TGF- β 1

Un point remarquable dans notre étude a été l'identification inattendue d'un mécanisme de régulation original de l'activité du microARN-21-5p par la SM. Nous avons, en effet, montré que la SM favorise la prise en charge du microARN-21-5p par la protéine Ago2 dans le complexe RISC sans modifier l'expression transcriptionnelle et même post-transcriptionnelle du gène codant pour ce microARN (**Figure 67**). Les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette régulation sont, à ce jour, non élucidés. Cependant, des pistes d'exploration sont envisagées. Il est important de souligner que si la biogénèse et le mécanisme d'action moléculaire des microARNs sont maintenant bien décrits ; en revanche, la distribution intracellulaire des microARNs dans les cellules ne l'est pas et fait actuellement l'objet d'importants travaux de recherche (Akgül and Erdoğan, 2018; Stavast and Erkeland, 2019). Dans la littérature, un point de discordance est lié au transport des microARNs matures dans des vésicules intracellulaires pour y exercer leur activité de répresseurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes. En effet, des études ont montré qu'une proportion significative de microARNs endogènes est localisée dans des foci cytoplasmiques, appelés *processing bodies* ou *P-bodies* ou encore dans des granules de stress, appelées *GW-bodies*. Ces condensats vésiculaires dépourvus de membranes concentrent une quantité significative d'ARNm, qui se trouvent être les cibles transcriptomiques directes des microARNs accumulés dans ces vésicules. Par ailleurs, une fraction importante de protéines agissant comme des régulateurs négatifs de la traduction au sein du complexe RISC, est aussi

enrichie dans ces vésicules (Liu et al., 2005a; Souquere et al., 2009; Hubstenberger et al., 2013). Il a été proposé que ces condensats pourraient être le lieu où s'effectue le mécanisme d'interférence par l'ARN médié par le complexe RISC, les microARNs et les répresseurs transcriptionnels ou traductionnels (Decker and Parker, 2012). D'autres études s'accordent à montrer que ces condensats pourraient, à l'inverse, jouer un rôle uniquement de stockage provisoire des ARNm non traduits en vue de leur traduction ultérieure (Brenques et al., 2005; Bhattacharyya et al., 2006; Ayache et al., 2015). Une étude récemment publiée par notre groupe a montré que la transfection de cellules de glioblastome (U87MG) par des microARNs synthétiques à forte concentration conduit à une accumulation significative de ces microARNs dans les *P-bodies* et les *GW-bodies* (Simion et al., 2020). Nous avons montré que ces microARNs s'accumulent dans ces condensats avec la protéine Ago2. Par ailleurs, nous avons constaté que l'inactivation de DCP-1 (*mRNA-decapping enzyme 1A*, (Liu et al., 2005b)), un effecteur protéique de l'activité d'interférence à l'ARN des microARNs présent exclusivement dans les *P-bodies*, ne conduit pas à une perte d'activité des microARNs transfectés dans les cellules U87MG exprimant le RILES de façon stable. A l'inverse, l'inactivation de GW182 (*TNRC6A*, (Gibbins et al., 2009)) et de DDX6 (RCK/p54, (Chu and Rana, 2006)) deux autres effecteurs de la machinerie d'interférence par l'ARN localisés préférentiellement dans les *GW-bodies*, conduit à une inhibition de l'activité du RILES dans ces mêmes cellules tumorales. Ces résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle les microARNs présents en abondance dans les cellules sont provisoirement stockés, à minima, dans les *P-bodies* avant d'être relargués « à façon » lorsque le complexe RISC devient à nouveau (bio)disponible. Sur la base de ces résultats et des données de la littérature (Akgül and Erdoğan, 2018; Stavast and Erkeland, 2019), nous pensons qu'un processus similaire puisse prendre place dans les kératinocytes en réponse au traitement par le TGF- β 1 et la SM. En effet, le microARN-21-5p est très fortement exprimé dans ces cellules (valeur de Ct de l'ordre de 19 par RT-qPCR). Il n'est pas exclu qu'une fraction de ce microARN soit stockée provisoirement dans ces condensats. La SM pourrait alors stimuler la dissolution des *P-bodies* et la délocalisation des microARNs, soit par interaction physique directe, soit de façon indirecte à l'aide d'un médiateur à identifier. Les microARNs « relargués » pourraient ensuite être capturés par la protéine Ago2 du complexe RISC pour y exercer leur activité de répresseurs post-transcriptionnels des gènes. De telles hypothèses vont nécessiter d'importants travaux complémentaires à cette étude. La mise à disposition du système

RILES/21.5p T, de la SM et des outils d'investigations moléculaires développés dans l'étude récemment publiée (Simion et al., 2020) devrait faciliter l'élucidation de ces événements moléculaires.

Dans cette étude, nous avons montré que deux des trois cibles transcriptomiques du microARN-21-5p sont plus significativement réprimées dans les cellules HaCaT en réponse au traitement par le TGF- β 1 et la SM. Ainsi, ces résultats prouvent que la SM stimule l'activité du microARN-21-5p mature, et ceci en dépit de la régulation transcriptionnelle du gène codant pour ce microARN (**Figure 67A**).

5.5 Effet de la silymarine sur la synthèse lipidique dans les kératinocytes humains

La biosynthèse des lipides est essentielle pour le maintien de l'homéostasie. Les lipides produits par les cellules sont utilisés comme source et réserve d'énergie, comme principaux constituants des membranes cellulaires, comme précurseurs de plusieurs macromolécules (vitamine D et hormones stéroïdiennes) et comme molécules de signalisation. Des défauts de synthèse ou de maturation des lipides contribuent au développement de nombreuses pathologies, telles que l'obésité, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, le cancer mais aussi les ichtyoses, le psoriasis, l'acné vulgaris et la dermatite atopique (Adams et al., 2006; Sahle et al., 2015; Cisa-Wieczorek and Hernández-Alvarez, 2020).

Nous avons mis en évidence que le traitement des cellules HaCaT par la SM augmente l'expression des gènes *ACLY*, *ACSS2* et *FASN*, codant pour les enzymes impliquées dans la lipogenèse. Cette régulation s'est avérée corrélée avec l'accumulation de la quantité de gouttelettes lipidiques intracellulaires de manière dose dépendante. Nous avons par ailleurs montré que le traitement des cellules HaCaT en cours de différenciation par la SM inhibe la phosphorylation du résidu Thr172 d'AMPK. Il est décrit que l'activation de l'AMPK par phosphorylation est un événement clé dans le contrôle du métabolisme lipidique. Une fois activée, AMPK inhibe notamment le clivage protéolytique du facteur de transcription

SREBP-1 et, par conséquent, sa translocation nucléaire. Le facteur de transcription SREBP-1 coordonne la synthèse du cholestérol et des acides gras en régulant l'expression des gènes *ACLY* et *ACSS2*, impliqués dans la production d'acétyl-CoA. Sur la base de ces données bibliographiques, nous avons émis l'hypothèse que la SM pouvait augmenter la lipogenèse en stimulant la translocation nucléaire de SREBP-1. Nos résultats ne nous ont pas permis de valider cette hypothèse. En effet, bien que la phosphorylation d'AMPK soit inhibée dans les cellules HaCaT en réponse au traitement par la SM, aucune augmentation significative de la forme mature, nucléaire, de SREBP-1 n'a été détectée (**Figure 86**). Ces résultats indiquent donc que d'autres voies du métabolisme des lipides sont régulées par la SM. A noter toutefois, qu'à l'inverse de notre étude, d'autres travaux ont montré que la SM pouvait inhiber significativement la lipogenèse. Nambiar et ses collègues ont en effet récemment montré que la SB inhibe la lipogenèse dans les cellules humaines du cancer de la prostate en augmentant la phosphorylation d'AMPK (Nambiar et al., 2014). Des résultats similaires ont été rapportés par Suh et al. à partir de culture de pré-adipocytes murins 3T3-L1 induits en différenciation adipocytaire (Suh et al., 2015). Ces résultats indiquent donc que, selon le contexte biologique, la SM peut agir comme senseur métabolique en régulant soit à la hausse soit la baisse le taux de synthèse des lipides dans les cellules.

En tentant d'identifier les voies de synthèse lipidique alternatives à la voie canonique AMPK/SREBP-1, nous avons constaté, grâce aux données du RNA-seq, que les partenaires protéiques de la voie de signalisation de PPAR étaient particulièrement enrichis dans les cellules HaCaT traitées par la TGF- β 1 et la SM. Les récepteurs nucléaires PPAR (PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ) jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme lipidique et de la glycémie (Berger and Moller, 2002; Desvergne et al., 2006). Parmi les trois sous-types de PPAR, PPAR γ est le plus étudié et représente une cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2, des dyslipidémies et des maladies cardiovasculaires (Staels and Fruchart, 2005; Lalloyer and Staels, 2010; Vacca et al., 2011; Evans et al., 2004). Nous avons tiré profit de la disponibilité d'une construction moléculaire senseur de la voie métabolique dépendante de PPAR γ (PPAR γ -RE-Luc, **Figure 87C**) pour vérifier si cette voie de signalisation intracellulaire était activée dans les cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1 et la SM. Nos résultats indiquent que l'activité transcriptionnelle de PPAR γ est augmentée significativement dans les cellules HaCaT en réponse au TGF- β 1 et la SM. Ces résultats sont

corroborés avec une étude antérieure à la nôtre montrant que l'isosilibinine A agit comme agoniste partiel de PPAR γ dans les cellules HEK293 (Pfersch-Wenzig et al., 2014). De façon intéressante, des composés naturels isolés de plantes utilisées en médecine traditionnelle chinoise ont été décrits comme des agonistes partiels de ce récepteur (Marion-Letellier et al., 2009). Il s'agit du néolignane Honokiol, l'actif principal de l'écorce de *Magnolia bark* (Atanasov et al., 2013a) et du polyacétyle faltarindiol extrait de la racine de *Notopterygium incisum* (Atanasov et al., 2013b). Récemment, Wölflé et al. ont montré que l'extrait brut de racines de gentiane (*Gentiana lutea*) est capable d'activer la voie de signalisation de PPAR γ dans les cellules primaires de kératinocytes humains, conduisant à une augmentation de l'expression de l'enzyme CerS3 (*Ceramide synthase 3*), impliquée dans le métabolisme des céramides (Wölflé et al., 2017).

Bien que nous privilégions la voie de synthèse lipidique dépendante de PPAR γ et des isoformes PPAR α et PPAR β/δ , nous n'excluons pas que d'autres voies de signalisation soient activées dans les kératinocytes en réponse au traitement par le TGF- β 1 et la SM. Cette hypothèse est étayée par l'observation que l'activité transcriptionnelle de PPAR γ est maximale lorsque les cellules sont traitées par la SM à la concentration de 31 μ g/mL. Au-delà de cette concentration, *e.g.* 62 μ g/mL, l'activité transcriptionnelle de PPAR γ est diminuée alors que l'expression d'ACLY, ACSS2 et FASN est maximale (**Figure 82**). Ces dernières années, plusieurs études ont démontré l'implication de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) dans la régulation du métabolisme lipidique en réponse à l'insuline et la disponibilité des nutriments (Laplanche and Sabatini, 2009). L'équipe de David Guertin a démontré qu'une invalidation conditionnelle du gène *Rictor*, codant une des deux sous-unités spécifiques de mTORC2, dans les adipocytes bruns et blancs chez les souris diminue le taux d'ARNm et de protéines ACLY, ACC et FASN (Hung et al., 2014; Tang et al., 2016; Jung et al., 2019). De la même façon, la voie dépendante de MAPK/ERK et JNK conduit elle aussi à la synthèse de lipides dans divers types cellulaires (Greenberg et al., 2001; Gubern et al., 2009; Cristea et al., 2020). Enfin, l'implication de la voie de régulation dépendante de l'Angiopoietin-like-4 (Angptl4) est également envisagée. Nous avons été surpris de constater que l'*ANGPTL4* fait partie des gènes les plus différenciellement exprimés dans les cellules HaCaT traitées par le TGF β et la SM comparativement aux cellules traitées par le TGF- β 1 seul (6.8 fois sur-exprimés, $P < 0.001$, données de RNA-seq). La protéine ANGPTL4 joue un rôle

important dans le métabolisme lipidique en inhibant l'activité de la lipoprotéine lipase, une enzyme catalysant l'hydrolyse des triglycérides des lipoprotéines plasmatiques (Sukonina et al., 2006; Kersten et al., 2000). Il a été montré que le traitement des adipocytes humains et murins par des agonistes de PPAR α et PPAR β/δ augmente l'expression de l'ARNm de l'ANGPTL4 (Mandard et al., 2004).

Des études complémentaires sont, donc, nécessaires pour clarifier les voies de synthèse lipidique régulées par la SM dans les kératinocytes. Une analyse précise du profil lipidique des cellules HaCaT en réponse à la SM par spectrométrie de masse est, actuellement, en cours de réalisation en collaboration avec nos collègues de l'équipe analytique de l'ICOA (UMR 7311, Orléans). Cette étude permettra d'établir la nature exacte des voies du métabolisme des lipides induites par la SM.

5.6 Evaluation thérapeutique de la silymarine dans le traitement du psoriasis

L'efficacité thérapeutique de la SM par application topique a été démontrée dans le traitement des tumeurs cutanées photo- et chimio-induites expérimentalement chez la souris (Agarwal et al., 1994; Katiyar et al., 1997; Singh et al., 2002; Dhanalakshmi et al., 2004). Il a été montré que la SM a pour effet de diminuer le taux d'incidence, le nombre et le volume des tumeurs cutanées en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S, en activant des protéines pro-apoptotiques et en inhibant l'angiogénèse et l'invasion tumorale.

En revanche, peu de travaux ont rapporté l'effet thérapeutique de la SM contre d'autres pathologies cutanées, telles que la dermatite atopique (Kang et al., 2008), l'acné (Shie Morteza et al., 2019), la rosacée, le mélasma et le vitiligo (Mehraban and Feily., 2014). Aucune de ces études n'a décrit le mécanisme d'action de la SM contre ces pathologies cutanées inflammatoires et, notamment, contre le psoriasis.

Le psoriasis est une maladie inflammatoire multifactorielle de la peau qui se caractérise par des plaques érythémato-squameuses pouvant s'étendre sur tout le corps.

Elle résulte d'un dérèglement du système immunitaire entraînant une inflammation dermique chronique ainsi qu'une prolifération accrue et une différenciation anormale des kératinocytes. A ce jour, le traitement du psoriasis fait appel à des immunosuppresseurs, tels que le méthotrexate ou la ciclosporine, comme traitement de fond de cette pathologie et à des bio-médicaments, tels que l'anticorps monoclonal anti-TNF α (Infliximab, Remicade®) ou encore l'Etanercept (Enbrel®), comme traitement de dernier recours aux formes sévères et chroniques de cette pathologie. Des bénéfices thérapeutiques mitigés ont été rapportés étant liés à l'apparition de nombreux effets indésirables mal tolérés par les patients. Pour pallier à ces inconvénients, des stratégies thérapeutiques nouvelles issues de la recherche ethnopharmacologique ont été récemment évaluées (Meng et al., 2018). Lin et al. ont notamment montré que l'application topique d'une formulation à base d'*Indigo naturalis*, une herbe traditionnelle asiatique utilisée pendant des siècles comme teinture, sur les lésions psoriasiques des patients a pour effet d'inhiber l'infiltration des lymphocytes T et les réactions inflammatoires tout en rétablissant la prolifération et la différenciation des kératinocytes dans l'épiderme (Lin et al., 2007).

Au regard des propriétés déjà connues de la SM et de celles que nous lui avons attribuées dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la SM pourrait être utilisée en phytothérapie pour traiter des pathologies inflammatoires cutanées comme le psoriasis. Nos résultats *in vivo* confortent cette hypothèse. Nous avons montré que l'application topique de la SM en amont de l'imiquimod (IMQ), un agoniste synthétique du TLR7/8, est suffisante pour protéger significativement les peaux des souris contre l'apparition de lésions psoriasiques caractérisées par une acanthose, une hyperkératose, une parakératose et d'importants infiltrats leucocytaires. La caractérisation du profil transcriptomique des peaux de souris traitées par la SM en amont de l'IMQ a révélé une correction de l'expression des marqueurs précoces (K10) et tardifs (IVL et LOR) de la différenciation kératinocytaire. Ces marqueurs sont fortement altérés dans les lésions psoriasiques humaines et induites expérimentalement par l'IMQ dans notre modèle d'étude *in vivo*. Ces résultats sont, toutefois, en contradiction avec ceux obtenus *in vitro*. Nous avons en effet montré que la SM inhibe la différenciation des kératinocytes en culture via la répression de Notch3. Ces observations nous amènent donc à penser, à nouveau, que la SM, au même titre que pour la synthèse des lipides, puisse moduler la différenciation kératinocytaire en fonction du

contexte biologique. Nous pensons que l'effet de la SM sur la régulation positive du programme de différenciation des kératinocytes dans les lésions psoriasiques soit intimement lié à une inhibition de l'inflammation cutanée. Un lien de causalité entre l'inflammation et la différenciation des kératinocytes a été démontré dans l'étude de Wang et al (Wang et al., 2017). Les auteurs montrent que la stimulation des cellules HaCaT par l'IL-36 γ , une cytokine pro-inflammatoire retrouvée très fortement exprimée dans les lésions psoriasiques (D'Erme et al., 2015), induit la sécrétion de l'IFN- γ , IL-1 β et IL-6 et augmente l'expression des marqueurs de prolifération tels que la β -caténine, la cycline D1 et le Ki67. A l'inverse, cette cytokine inhibe l'expression de la filaggrine, de l'involucrine et des kératines K1 et K5 par les kératinocytes. Depuis, il a été suggéré que l'hyper-inflammation caractéristique des lésions de psoriasis pourrait exacerber la rupture de la balance prolifération/différenciation des kératinocytes (Buerger et al., 2017; Albanesi et al., 2018). Nous montrons que le prétraitement des peaux de souris avec la SM en amont de l'IMQ diminue l'inflammation cutanée en inhibant l'expression des peptides antimicrobiens (S100A8 et S100A9), des chimiokines (CXCL1 et CXCL20) et des cytokines pro-inflammatoires (IL-23 et IL-22). Nous avons également montré *in vitro* que la SM diminue de manière très significative l'activité transcriptionnelle de NF- κ B et la production d'IL-6 en réponse à la stimulation des cellules HaCaT par l'IL-22 et le TNF- α (**Figure 68A** et **Figure 68D**). Il n'est donc pas exclu qu'au-delà de l'effet anti-inflammatoire de la SM sur les composants de la réponse immunitaire, la SM puisse également corriger le programme de différenciation des kératinocytes altéré dans les peaux psoriasiques. Ce phénomène pourrait être différent en conditions physiologiques, tel qu'observé *in vitro* mais également *in vivo* dans les peaux des souris traitées avec la SM seule. En effet, dans ces tissus, l'expression des marqueurs de différenciation kératinocytaire n'est pas fortement affectée.

Autre fait remarquable, l'application topique de la SM sur la peau du dos des souris en amont de l'IMQ a permis de corriger le profil d'expression des marqueurs de la lipogenèse cutanée, tels que *SREBF1*, *ACLY*, *ACSS2* et *FASN*. Comme explicité auparavant, ces gènes sont impliqués dans la synthèse d'acides gras entrant notamment dans la composition des céramides. Des dérégulations du métabolisme des céramides ont été observées dans le *stratum corneum* des patients souffrant de psoriasis (Motta et al., 1993, 1994; Tawada et al., 2014). Une corrélation inverse entre la teneur totale en céramides dans l'épiderme lésionnel

des patients atteints de psoriasis et la sévérité de la maladie a été également démontrée (Cho et al., 2004; Lew et al., 2006). Plusieurs équipes ont rapporté une diminution de la teneur en céramides constituées d'un acide gras à chaîne longue (plus de 26 carbones) au profit d'une augmentation de céramides constituées d'un acide gras à chaîne courte (moins de 24 carbones) dans les peaux des patients atteints du psoriasis (Koyano et al., 2010; Tawada et al., 2014; Kim et al., 2017a). Ces altérations qualitatives et quantitatives du métabolisme lipidique dans les lésions psoriasiques pourraient contribuer activement à la sévérité de la pathologie par divers mécanismes, notamment en augmentant la perte en eau transépidermique (TEWL) (Motta et al., 1994), en exacerbant les réponses inflammatoires (Tawada et al., 2014) et en favorisant l'hyperprolifération des kératinocytes au travers de l'inhibition de l'expression de PKC- α (*Protein kinase C-alpha*) et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (Lew et al., 2006). L'observation que la SM est capable de « contre-balancer » le défaut de synthèse des lipides par les kératinocytes dans les lésions psoriasiques milite en faveur de l'effet protecteur de la SM contre l'altération de la fonction de la barrière cutanée. Il est également probable que la restauration de la lipogenèse dans les lésions psoriasiques puisse également contribuer au retour à l'homéostasie cutanée en régulant la différenciation, la prolifération et les réponses inflammatoires dans ces tissus lésés.

6 Références

- A. Hussein, R., and A. El-Anssary, A. (2019). Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. In *Herbal Medicine*, P. F. Builders, ed. (IntechOpen), p.
- Abdullah, A., Sane, S., Branick, K.A., Freeling, J.L., Wang, H., Zhang, D., and Rezvani, K. (2015). A plant alkaloid, veratridine, potentiates cancer chemosensitivity by UBXLN2A-dependent inhibition of an oncoprotein, mortalin-2. *Oncotarget* 6, 23561–23581.
- Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., and Capasso, F. (2010). Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother. Res.* 24, 1423–1432.
- Abenavoli, L., Izzo, A.A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A., and Capasso, R. (2018). Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytother. Res.* 32, 2202–2213.
- Abraham, J., and Mathew, S. (2019). Merkel Cells: A Collective Review of Current Concepts. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* 9, 9–13.
- Acker, M.G., and Auld, D.S. (2014). Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-throughput screening applications. *Perspect. Sci.* 1, 56–73.
- Adams, K.F., Schatzkin, A., Harris, T.B., Kipnis, V., Mouw, T., Ballard-Barbash, R., Hollenbeck, A., and Leitzmann, M.F. (2006). Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N. Engl. J. Med.* 355, 763–778.
- Agarwal, R., Katiyar, S.K., Lundgren, D.W., and Mukhtar, H. (1994). Inhibitory effect of silymarin, an anti-hepatotoxic flavonoid, on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced epidermal ornithine decarboxylase activity and mRNA in SENCAR mice. *Carcinogenesis* 15, 1099–1103.
- Agarwal, R., Agarwal, C., Ichikawa, H., Singh, R.P., and Aggarwal, B.B. (2006). Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res.* 26, 4457–4498.
- Ahmed, M.I., Mardaryev, A.N., Lewis, C.J., Sharov, A.A., and Botchkareva, N.V. (2011). MicroRNA-21 is an important downstream component of BMP signalling in epidermal keratinocytes. *J. Cell Sci.* 124, 3399–3404.
- Akgül, B., and Erdoğan, İ. (2018). Intracytoplasmic Re-localization of miRISC Complexes. *Front. Genet.* 9, 403.
- Alamgir, A.N.M. (2017). *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts: Volume 1* (Cham: Springer International Publishing).
- Albanesi, C., Madonna, S., Gisondi, P., and Girolomoni, G. (2018). The Interplay Between Keratinocytes and Immune Cells in the Pathogenesis of Psoriasis. *Front. Immunol.* 9, 1549.
- Ali Syeda, Z., Langden, S.S.S., Munkhzul, C., Lee, M., and Song, S.J. (2020). Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1723.
- Allkin, B. (2017). Useful Plants – Medicines: At Least 28,187 Plant Species are Currently Recorded as Being of Medicinal Use. In *State of the World's Plants 2017*, K.J. Willis, ed. (London (UK): Royal Botanic Gardens, Kew), p.

- Aman, M.J., Lamkin, T.D., Okada, H., Kurosaki, T., and Ravichandran, K.S. (1998). The inositol phosphatase SHIP inhibits Akt/PKB activation in B cells. *J. Biol. Chem.* 273, 33922–33928.
- Ambros, V. (2001). microRNAs. *Cell* 107, 823–826.
- An, W.F., and Tolliday, N. (2010). Cell-based assays for high-throughput screening. *Mol. Biotechnol.* 45, 180–186.
- An, I.-S., An, S., Choe, T.-B., Kang, S.-M., Lee, J.H., Park, I.-C., Jin, Y.-W., Lee, S.-J., and Bae, S. (2012a). *Centella asiatica* protects against UVB-induced HaCaT keratinocyte damage through microRNA expression changes. *Int. J. Mol. Med.* 30, 1349–1356.
- An, I.-S., An, S., Kang, S.-M., Choe, T.-B., Lee, S.N., Jang, H.H., and Bae, S. (2012b). Titrated extract of *Centella asiatica* provides a UVB protective effect by altering microRNA expression profiles in human dermal fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* 30, 1194–1202.
- Andl, T., Murchison, E.P., Liu, F., Zhang, Y., Yunta-Gonzalez, M., Tobias, J.W., Andl, C.D., Seykora, J.T., Hannon, G.J., and Millar, S.E. (2006). The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles. *Curr. Biol. CB* 16, 1041–1049.
- Arai, M.A., Masada, A., Ohtsuka, T., Kageyama, R., and Ishibashi, M. (2009). The first Hes1 dimer inhibitors from natural products. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 5778–5781.
- Asangani, I.A., Rasheed, S.A.K., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S., and Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27, 2128–2136.
- Atanasov, A.G., Wang, J.N., Gu, S.P., Bu, J., Kramer, M.P., Baumgartner, L., Fakhrudin, N., Ladurner, A., Malainer, C., Vuorinen, A., et al. (2013a). Honokiol: a non-adipogenic PPAR γ agonist from nature. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4813–4819.
- Atanasov, A.G., Blunder, M., Fakhrudin, N., Liu, X., Noha, S.M., Malainer, C., Kramer, M.P., Cocic, A., Kunert, O., Schinkovitz, A., et al. (2013b). Polyacetylenes from *Notopterygium incisum*--new selective partial agonists of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *PLoS One* 8, e61755.
- Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.-M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., et al. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* 33, 1582–1614.
- Ausseil, F., Samson, A., Aussagues, Y., Vandenberghe, I., Creancier, L., Pouny, I., Kruczynski, A., Massiot, G., and Bailly, C. (2007). High-throughput bioluminescence screening of ubiquitin-proteasome pathway inhibitors from chemical and natural sources. *J. Biomol. Screen.* 12, 106–116.
- Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E., and Bartel, D.P. (2013). Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell* 152, 844–858.
- Avonto, C., Chittiboyina, A.G., Rua, D., and Khan, I.A. (2015). A fluorescence high throughput screening method for the detection of reactive electrophiles as potential skin sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 289, 177–184.
- Avonto, C., Chittiboyina, A.G., Sadrieh, N., Vukmanovic, S., and Khan, I.A. (2018). In chemico skin sensitization risk assessment of botanical ingredients. *J. Appl. Toxicol.* 38, 1047–1053.

- Aya, K.L., and Stern, R. (2014). Hyaluronan in wound healing: Rediscovering a major player. *Wound Repair Regen.* 22, 579–593.
- Ayache, J., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., and Weil, D. (2015). P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Mol. Biol. Cell* 26, 2579–2595.
- Azizuddin, Khan, A.M., and Choudhary, M.I. (2011). Tyrosinase inhibitory potential of natural products isolated from various medicinal plants. *Nat. Prod. Res.* 25, 750–753.
- Bae, S., Lee, E.-J., Lee, J.H., Park, I.-C., Lee, S.-J., Hahn, H.J., Ahn, K.J., An, S., An, I.-S., and Cha, H.J. (2014). Oridonin protects HaCaT keratinocytes against hydrogen peroxide-induced oxidative stress by altering microRNA expression. *Int. J. Mol. Med.* 33, 185–193.
- Báez-Vega, P.M., Echevarría Vargas, I.M., Valiyeva, F., Encarnación-Rosado, J., Roman, A., Flores, J., Marcos-Martínez, M.J., and Vivas-Mejía, P.E. (2016). Targeting miR-21-3p inhibits proliferation and invasion of ovarian cancer cells. *Oncotarget* 7, 36321–36337.
- Balunas, M.J., Su, B., Landini, S., Brueggemeier, R.W., and Kinghorn, A.D. (2006). Interference by Naturally Occurring Fatty Acids in a Noncellular Enzyme-Based Aromatase Bioassay. *J. Nat. Prod.* 69, 700–703.
- Banerjee, J., and Sen, C.K. (2013). MicroRNAs in skin and wound healing. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 936, 343–356.
- Bang, J.Y., Kim, E.-Y., Seong, N.S., Shin, Y.S., and Kang, I.-C. (2007). ProteoChip-based library screening of integrin $\alpha 5 \beta 1$ antagonists from korean medicinal plant extracts. *Arch. Pharm. Res.* 30, 1584–1589.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Bartel, D.P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173, 20–51.
- Barthlott, W., Winiger, M., and Biedinger, N. (2001). *Biodiversity* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).
- Bauer, D.E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C., and Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* 24, 6314–6322.
- Bazzini, A.A., Lee, M.T., and Giraldez, A.J. (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 336, 233–237.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20, 1885–1898.
- Behrens, D.T., Villone, D., Koch, M., Brunner, G., Sorokin, L., Robenek, H., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P., and Hansen, U. (2012). The Epidermal Basement Membrane Is a Composite of Separate Laminin- or Collagen IV-containing Networks Connected by Aggregated Perlecan, but Not by Nidogens *. *J. Biol. Chem.* 287, 18700–18709.
- Berger, J., and Moller, D.E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53, 409–435.

- Beutler, J.A., McMahon, J.B., Johnson, T.R., O'Keefe, B.R., Buzzell, R.A., Robbins, D., Gardella, R., Wilson, J., and Boyd, M.R. (2002). High throughput screening for cyanovirin-N mimetics binding to HIV-1 gp41. *J. Biomol. Screen.* **7**, 105–110.
- Beutler, J.A., Kang, M.-I., Robert, F., Clement, J.A., Pelletier, J., Colburn, N.H., McKee, T.C., Goncharova, E., McMahon, J.B., and Henrich, C.J. (2009). Quassinoid inhibition of AP-1 function does not correlate with cytotoxicity or protein synthesis inhibition. *J. Nat. Prod.* **72**, 503–506.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**, 513–521.
- Bi, S., Chai, L., Yuan, X., Cao, C., and Li, S. (2017). MicroRNA-98 inhibits the cell proliferation of human hypertrophic scar fibroblasts via targeting Col1A1. *Biol. Res.* **50**, 22.
- Bikle, D.D. (2011). Vitamin D metabolism and function in the skin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **347**, 80–89.
- Bikle, D.D., Ratnam, A., Mauro, T., Harris, J., and Pillai, S. (1996). Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. Potential role of the calcium receptor. *J. Clin. Invest.* **97**, 1085–1093.
- Bikle, D.D., Ng, D., Tu, C.-L., Oda, Y., and Xie, Z. (2001). Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **177**, 161–171.
- Blakemore, E. (2020). Why plague doctors wore those strange beaked masks.
- Blank, I.H. (1952). Factors Which Influence the Water Content of the Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* **18**, 433–440.
- Blanpain, C., and Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 207–217.
- Blanpain, C., Lowry, W.E., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2006). Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev.* **20**, 3022–3035.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA N. Y. N* **10**, 185–191.
- Boniface, K., Bernard, F.-X., Garcia, M., Gurney, A.L., Lecron, J.-C., and Morel, F. (2005). IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 3695–3702.
- Borchardt, J.K. (2002). The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. *Drug News Perspect.* **15**, 187–192.
- Botha, C.J., and Penrith, M.-L. (2008). Poisonous plants of veterinary and human importance in southern Africa. *J. Ethnopharmacol.* **119**, 549–558.
- Boudsocq, F., Benaim, P., Canitrot, Y., Knibiehler, M., Ausseil, F., Capp, J.P., Bieth, A., Long, C., David, B., Shevelev, I., et al. (2005). Modulation of cellular response to cisplatin by a novel inhibitor of DNA polymerase beta. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1485–1492.
- Bouquet, A. (1969). *Féticheurs et médecines traditionnelles du Congo (Brazzaville)*. p. 282.

- Bourgain, C., and Jean, K. (2016). L'Artémisinine, emblème du meilleur des mondes de la biologie de synthèse.
- Bourguignon, L.Y.W., Ramez, M., Gilad, E., Singleton, P.A., Man, M.-Q., Crumrine, D.A., Elias, P.M., and Feingold, K.R. (2006). Hyaluronan-CD44 Interaction Stimulates Keratinocyte Differentiation, Lamellar Body Formation/Secretion, and Permeability Barrier Homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 1356–1365.
- Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat. Rev. Cancer* *7*, 495–507.
- Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Weerheim, A., Kempenaar, J., and Ponc, M. (1995). Characterization of stratum corneum structure in reconstructed epidermis by X-ray diffraction. *J. Lipid Res.* *36*, 496–504.
- Boyce, S.T., and Ham, R.G. (1983). Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* *81*, 33s–40s.
- Boyle, E.I., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J.M., and Sherlock, G. (2004). GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *20*, 3710–3715.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Brengues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* *310*, 486–489.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* *3*, e85.
- Briggaman, R.A., and Wheeler, C.E. (1975). The Epidermal-Dermal Junction. *J. Invest. Dermatol.* *65*, 71–84.
- Britannica (2016). The Editors of Encyclopedia. "Curare."
- Broughton, G., Janis, J.E., and Attinger, C.E. (2006). The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* *117*, 12S–34S.
- Broughton, J.P., Lovci, M.T., Huang, J.L., Yeo, G.W., and Pasquinelli, A.E. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol. Cell* *64*, 320–333.
- Brown, D.P., Rogers, D.T., Pomerleau, F., Siripurapu, K.B., Kulshrestha, M., Gerhardt, G.A., and Littleton, J.M. (2016). Novel multifunctional pharmacology of lobinaline, the major alkaloid from *Lobelia cardinalis*. *Fitoterapia* *111*, 109–123.
- Buehrer, B.M., Duffin, D.J., Lea-Currie, Y.R., Ribnick, D., Raskin, I., Stephens, J.M., Cefalu, W.T., and Gimble, J.M. (2012). Tools for the identification of bioactives impacting the metabolic syndrome: screening of a botanical extract library using subcutaneous and visceral human adipose-derived stem cell-based assays. *J. Nutr. Biochem.* *23*, 519–525.

- Buerger, C., Shirsath, N., Lang, V., Berard, A., Diehl, S., Kaufmann, R., Boehncke, W.-H., and Wolf, P. (2017). Inflammation dependent mTORC1 signaling interferes with the switch from keratinocyte proliferation to differentiation. *PLOS ONE* 12, e0180853.
- Bukhari, S.I.A., Truesdell, S.S., Lee, S., Kollu, S., Classon, A., Boukhali, M., Jain, E., Mortensen, R.D., Yanagiya, A., Sadreyev, R.I., et al. (2016). A Specialized Mechanism of Translation Mediated by FXR1a-Associated MicroRNP in Cellular Quiescence. *Mol. Cell* 61, 760–773.
- Butler, M.S. (2005). Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 22, 162–195.
- Butler, M.S. (2008). Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 25, 475–516.
- Bylka, W., Znajdek-Awizeń, P., Studzińska-Sroka, E., and Brzezińska, M. (2013). *Centella asiatica* in cosmetology. *Postepy Dermatol. Alergol.* 30, 46–49.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* 10, 1957–1966.
- Caley, M.P., Martins, V.L.C., and O'Toole, E.A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv. Wound Care* 4, 225–234.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655–1657.
- Caporale, L.H. (2003). Chemical & Engineering News. Rediscovering *Nat. Prod.* 81, 77-78,82-83,86,88-91.
- Catalanotto, C., Cogoni, C., and Zardo, G. (2016). MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Cha, H.J., He, C., Zhao, H., Dong, Y., An, I.-S., and An, S. (2016). Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *Int. J. Mol. Med.* 38, 16–22.
- Chakravarthy, S., Sternberg, S.H., Kellenberger, C.A., and Doudna, J.A. (2010). Substrate-specific kinetics of Dicer-catalyzed RNA processing. *J. Mol. Biol.* 404, 392–402.
- Chan, Y.C., Khanna, S., Roy, S., and Sen, C.K. (2011a). miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 286, 2047–2056.
- Chan, Y.C., Roy, S., Khanna, S., and Sen, C.K. (2012). Downregulation of endothelial microRNA-200b supports cutaneous wound angiogenesis by desilencing GATA binding protein 2 and vascular endothelial growth factor receptor 2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1372–1382.
- Chan, Y.-S., Cheng, L.-N., Wu, J.-H., Chan, E., Kwan, Y.-W., Lee, S.M.-Y., Leung, G.P.-H., Yu, P.H.-F., and Chan, S.-W. (2011b). A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). *Inflammopharmacology* 19, 245–254.
- Chang, A.R., Ferrer, C.M., and Mostoslavsky, R. (2020). SIRT6, a Mammalian Deacylase with Multitasking Abilities. *Physiol. Rev.* 100, 145–169.

- Chang, S.Y., Park, J.H., Kim, Y.H., Kang, J.S., and Min, J.-Y. (2016). A natural component from *Euphorbia humifusa* Willd displays novel, broad-spectrum anti-influenza activity by blocking nuclear export of viral ribonucleoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **471**, 282–289.
- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* **465**, 584–589.
- Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2**, 167–183.
- Chen, S., and Gao, G. (2017). MicroRNAs recruit eIF4E2 to repress translation of target mRNAs. *Protein Cell* **8**, 750–761.
- Chen, Y., and Gorski, D.H. (2008). Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* **111**, 1217–1226.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–744.
- Cheng, Y., and Zhang, C. (2010). MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *J Cardiovasc. Transl. Res.* **3**, 251–255.
- Cheng, H.-L., Huang, H.-K., Chang, C.-I., Tsai, C.-P., and Chou, C.-H. (2008). A cell-based screening identifies compounds from the stem of *Momordica charantia* that overcome insulin resistance and activate AMP-activated protein kinase. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 6835–6843.
- Chermnykh, E., Kalabusheva, E., and Vorotelyak, E. (2018). Extracellular Matrix as a Regulator of Epidermal Stem Cell Fate. *Int. J. Mol. Sci.* **19**.
- Cheung, C.W.Y., Gibbons, N., Johnson, D.W., and Nicol, D.L. (2010). Silibinin--a promising new treatment for cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* **10**, 186–195.
- Chikh, A., Matin, R.N.H., Senatore, V., Hufbauer, M., Lavery, D., Raimondi, C., Ostano, P., Mello-Grand, M., Ghimenti, C., Bahta, A., et al. (2011). iASPP/p63 autoregulatory feedback loop is required for the homeostasis of stratified epithelia. *EMBO J.* **30**, 4261–4273.
- Chillar, A.J., Karimi, P., Tang, K., and Ruan, K.-H. (2011). An agonist sensitive, quick and simple cell-based signaling assay for determination of ligands mimicking prostaglandin E2 or E1 activity through subtype EP1 receptor: Suitable for high throughput screening. *BMC Complement. Altern. Med.* **11**, 11.
- Chin, Y.-W., Balunas, M.J., Chai, H.B., and Kinghorn, A.D. (2006). Drug discovery from natural sources. *AAPS J.* **8**, E239-253.
- Chlopcíková, S., Psotová, J., Miketová, P., and Simánek, V. (2004). Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part I. Silymarin and its flavonolignans. *Phytother. Res. PTR* **18**, 107–110.
- Cho, S.-A., An, S., and Park, J.-H. (2019). High-throughput screening (HTS)-based spectrophotometric direct peptide reactivity assay (Spectro-DPRA) to predict human skin sensitization potential. *Toxicol. Lett.* **314**, 27–36.

- Cho, Y., Lew, B.-L., Seong, K., and Kim, N.-I. (2004). An Inverse Relationship Between Ceramide Synthesis and Clinical Severity in Patients with Psoriasis. *J. Korean Med. Sci.* *19*, 859.
- Christie, M., Boland, A., Huntzinger, E., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2013). Structure of the PAN3 pseudokinase reveals the basis for interactions with the PAN2 deadenylase and the GW182 proteins. *Mol. Cell* *51*, 360–373.
- Chu, C., and Rana, T.M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol.* *4*, e210.
- Cianferotti, L., Cox, M., Skorija, K., and Demay, M.B. (2007). Vitamin D receptor is essential for normal keratinocyte stem cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 9428–9433.
- Cisa-Wieczorek, S., and Hernández-Alvarez, M.I. (2020). Deregulation of Lipid Homeostasis: A Fa(c)t in the Development of Metabolic Diseases. *Cells* *9*.
- Clayton, E., Doupé, D.P., Klein, A.M., Winton, D.J., Simons, B.D., and Jones, P.H. (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* *446*, 185–189.
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P.A., Scaccabarozzi, D., et al. (2017). HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm.* *2017*, 7435621.
- Cooper, S.J., and Bowden, G.T. (2007). Ultraviolet B regulation of transcription factor families: roles of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) and activator protein-1 (AP-1) in UVB-induced skin carcinogenesis. *Curr. Cancer Drug Targets* *7*, 325–334.
- Corson, T.W., and Crews, C.M. (2007). Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. *Cell* *130*, 769–774.
- Cotsarelis, G., Sun, T.-T., and Lavker, R.M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* *61*, 1329–1337.
- Cragg, G.M., and Newman, D.J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* *100*, 72–79.
- Cragg, G.M., and Newman, D.J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* *1830*, 3670–3695.
- Cristea, S., Coles, G.L., Hornburg, D., Gershkovitz, M., Arand, J., Cao, S., Sen, T., Williamson, S.C., Kim, J.W., Drinas, A.P., et al. (2020). The MEK5–ERK5 Kinase Axis Controls Lipid Metabolism in Small-Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* *80*, 1293–1303.
- Croker, B.A., Krebs, D.L., Zhang, J.-G., Wormald, S., Willson, T.A., Stanley, E.G., Robb, L., Greenhalgh, C.J., Förster, I., Clausen, B.E., et al. (2003). SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat. Immunol.* *4*, 540–545.
- Cruz, P.G., Auld, D.S., Schultz, P.J., Lovell, S., Battaile, K.P., MacArthur, R., Shen, M., Tamayo-Castillo, G., Inglese, J., and Sherman, D.H. (2011). Titration-based screening for evaluation of natural product extracts: identification of an aspulvinone family of luciferase inhibitors. *Chem. Biol.* *18*, 1442–1452.

- Cui, L., Cai, Y., Cheng, W., Liu, G., Zhao, J., Cao, H., Tao, H., Wang, Y., Yin, M., Liu, T., et al. (2017). A Novel, Multi-Target Natural Drug Candidate, Matrine, Improves Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease Transgenic Mice by Inhibiting A β Aggregation and Blocking the RAGE/A β Axis. *Mol. Neurobiol.* 54, 1939–1952.
- Cui, Q., Du, R., Anantpadma, M., Schafer, A., Hou, L., Tian, J., Davey, R.A., Cheng, H., and Rong, L. (2018). Identification of Ellagic Acid from Plant *Rhodiola rosea* L. as an Anti-Ebola Virus Entry Inhibitor. *Viruses* 10.
- Curtale, G., Rubino, M., and Locati, M. (2019). MicroRNAs as Molecular Switches in Macrophage Activation. *Front. Immunol.* 10, 799.
- Czech, B., and Hannon, G.J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat. Rev. Genet.* 12, 19–31.
- D'Agostino, A., Stellavato, A., Busico, T., Papa, A., Tirino, V., Papaccio, G., La Gatta, A., De Rosa, M., and Schiraldi, C. (2015). In vitro analysis of the effects on wound healing of high- and low-molecular weight chains of hyaluronan and their hybrid H-HA/L-HA complexes. *BMC Cell Biol.* 16, 19.
- Dahmke, I.N., Backes, C., Rudzitis-Auth, J., Laschke, M.W., Leidinger, P., Menger, M.D., Meese, E., and Mahlknecht, U. (2013). Curcumin intake affects miRNA signature in murine melanoma with mmu-miR-205-5p most significantly altered. *PloS One* 8, e81122.
- Dai, J.-P., Wu, L.-Q., Li, R., Zhao, X.-F., Wan, Q.-Y., Chen, X.-X., Li, W.-Z., Wang, G.-F., and Li, K.-S. (2013). Identification of 23-(s)-2-amino-3-phenylpropanoyl-silybin as an antiviral agent for influenza A virus infection in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4433–4443.
- Dandapani, S., and Marcaurelle, L.A. (2010). Grand challenge commentary: Accessing new chemical space for “undruggable” targets. *Nat. Chem. Biol.* 6, 861–863.
- Danel, F., Caspers, P., Nuoffer, C., Härtlein, M., Kron, M.A., and Page, M.G.P. (2011). Asparaginyl-tRNA synthetase pre-transfer editing assay. *Curr. Drug Discov. Technol.* 8, 66–75.
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454, 56–61.
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Nguyen, P.H., Lagna, G., and Hata, A. (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol. Cell* 39, 373–384.
- Debnath, T., Deb Nath, N.C., Kim, E.-K., and Lee, K.-G. (2017). Role of phytochemicals in the modulation of miRNA expression in cancer. *Food Funct.* 8, 3432–3442.
- Decker, C.J., and Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a012286.
- Degueurce, G., D'Errico, I., Pich, C., Ibberson, M., Schütz, F., Montagner, A., Sgandurra, M., Mury, L., Jafari, P., Boda, A., et al. (2016). Identification of a novel PPAR β / δ /miR-21-3p axis in UV-induced skin inflammation. *EMBO Mol. Med.* 8, 919–936.
- Deiab, S., Mazzio, E., Messeha, S., Mack, N., and Soliman, K.F.A. (2013). High-Throughput Screening to Identify Plant Derived Human LDH-A Inhibitors. *Eur. J. Med. Plants* 3, 603–615.

- Delić, D., Wolk, K., Schmid, R., Gabrielyan, O., Christou, D., Rieber, K., Rolser, M., Jakob, I., Wiech, F., Griesser, M., et al. (2020). Integrated microRNA/mRNA expression profiling of the skin of psoriasis patients. *J. Dermatol. Sci.* 97, 9–20.
- Deppe, J., Steinritz, D., Santovito, D., Egea, V., Schmidt, A., Weber, C., and Ries, C. (2016). Upregulation of miR-203 and miR-210 affect growth and differentiation of keratinocytes after exposure to sulfur mustard in normoxia and hypoxia. *Toxicol. Lett.* 244, 81–87.
- D’Erme, A.M., Wilsmann-Theis, D., Wagenpfeil, J., Hölzel, M., Ferring-Schmitt, S., Sternberg, S., Wittmann, M., Peters, B., Bosio, A., Bieber, T., et al. (2015). IL-36 γ (IL-1F9) is a biomarker for psoriasis skin lesions. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1025–1032.
- Desbordes, S.C., Placantonakis, D.G., Ciro, A., Socci, N.D., Lee, G., Djaballah, H., and Studer, L. (2008). High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 602–612.
- Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 86, 465–514.
- Detmar, M., Yeo, K.T., Nagy, J.A., Van de Water, L., Brown, L.F., Berse, B., Elicker, B.M., Ledbetter, S., and Dvorak, H.F. (1995). Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 105, 44–50.
- Dewick, P.M. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach* (Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley, A John Wiley and Sons, Ltd., Publication).
- Dhanalakshmi, S., Mallikarjuna, G.U., Singh, R.P., and Agarwal, R. (2004). Silibinin prevents ultraviolet radiation-caused skin damages in SKH-1 hairless mice via a decrease in thymine dimer positive cells and an up-regulation of p53-p21/Cip1 in epidermis. *Carcinogenesis* 25, 1459–1465.
- Dharap, A., Pokrzywa, C., Murali, S., Pandi, G., and Vemuganti, R. (2013). MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. *PloS One* 8, e79467.
- Dheeraj, A., Tailor, D., Singh, S.P., and Singh, R.P. (2018). Chapter 10 - Anticancer Attributes of Silibinin: Chemo- and Radiosensitization of Cancer. In *Role of Nutraceuticals in Cancer Chemosensitization*, A.C. Bharti, and B.B. Aggarwal, eds. (Academic Press), pp. 199–220.
- Dias, D.A., Urban, S., and Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites* 2, 303–336.
- Diegelmann, R.F., and Evans, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 9, 283–289.
- Ding, S., and Schultz, P.G. (2004). A role for chemistry in stem cell biology. *Nat. Biotechnol.* 22, 833–840.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., and Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336, 237–240.
- Dobson, C.M. (2004). Chemical space and biology. *Nature* 432, 824–828.

- Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504–511.
- Dong, J., An, X., Zhong, H., Wang, Y., Shang, J., and Zhou, J. (2017). Interleukin-22 participates in the inflammatory process of vitiligo. *Oncotarget* 8, 109161–109174.
- Dornstauder, E., Jisa, E., Unterrieder, I., Krenn, L., Kubelka, W., and Jungbauer, A. (2001). Estrogenic activity of two standardized red clover extracts (Menoflavon) intended for large scale use in hormone replacement therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78, 67–75.
- Douros, J., and Suffness, M. (1980). The National Cancer Institute's Natural Products Antineoplastic Development Program. In *New Anticancer Drugs*, S.K. Carter, and Y. Sakurai, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 21–44.
- Du, J., Wei, Y.-J., Peng, C., Ran, X., Zhang, H., Jiang, Y.-P., Rahman, K., and Qin, L.-P. (2011). Establishment of a luciferase assay-based screening system for detecting estrogen receptor agonists in plant extracts. *Bone* 49, 572–579.
- Eckert, R.L., Sturniolo, M.T., Broome, A.-M., Ruse, M., and Rorke, E.A. (2005). Transglutaminase Function in Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 124, 481–492.
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., and Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833, 3471–3480.
- Edmondson, S.R., Murashita, M.M., Russo, V.C., Wraight, C.J., and Werther, G.A. (1999). Expression of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) in human keratinocytes is regulated by EGF and TGFβ1. *J. Cell. Physiol.* 179, 201–207.
- Edmondson, S.R., Thumiger, S.P., Kaur, P., Loh, B., Koelmeyer, R., Li, A., Silha, J.V., Murphy, L.J., Wraight, C.J., and Werther, G.A. (2005). Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) localizes to and modulates proliferative epidermal keratinocytes in vivo. *Br. J. Dermatol.* 152, 225–230.
- Efferth, T., Kahl, S., Paulus, K., Adams, M., Rauh, R., Boechzelt, H., Hao, X., Kaina, B., and Bauer, R. (2008). Phytochemistry and pharmacogenomics of natural products derived from traditional Chinese medicine and Chinese materia medica with activity against tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 152–161.
- Eichner, R., Sun, T.T., and Aebi, U. (1986). The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 102, 1767–1777.
- Ekanayake-Mudiyanselage, S., Jensen, J.-M., Proksch, E., Aschauer, H., Schmook, F.P., and Meingassner, J.G. (1998). Expression of Epidermal Keratins and the Cornified Envelope Protein Involucrin is Influenced by Permeability Barrier Disruption. *J. Invest. Dermatol.* 111, 517–523.
- Elkayam, E., Kuhn, C.-D., Tocilj, A., Haase, A.D., Greene, E.M., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2012). The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* 150, 100–110.
- Ellwanger, D.C., Büttner, F.A., Mewes, H.-W., and Stümpflen, V. (2011). The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 27, 1346–1350.
- Eming, S.A., Krieg, T., and Davidson, J.M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* 127, 514–525.

- Eming, S.A., Martin, P., and Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* 6, 265sr6.
- Ertl, P., and Schuffenhauer, A. (2008). Cheminformatics analysis of natural products: lessons from nature inspiring the design of new drugs. *Prog. Drug Res. Fortschritte Arzneimittelforschung Progres Rech. Pharm.* 66, 217, 219–235.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9–14.
- Evans, R.M., Barish, G.D., and Wang, Y.-X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* 10, 355–361.
- Ezzine, S., Vassaux, G., Pitard, B., Barteau, B., Malinge, J.-M., Midoux, P., Pichon, C., and Baril, P. (2013). RILES, a novel method for temporal analysis of the in vivo regulation of miRNA expression. *Nucleic Acids Res.* 41, e192–e192.
- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., et al. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 15805–15810.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., et al. (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1211–1217.
- Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M.C., and Martelli, F. (2008). MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J. Biol. Chem.* 283, 15878–15883.
- Feher, M., and Schmidt, J.M. (2003). Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43, 218–227.
- Feng, Y.-H., and Tsao, C.-J. (2016). Emerging role of microRNA-21 in cancer. *Biomed. Rep.* 5, 395–402.
- Feng, L., Wang, L., Ma, Y., Li, M., and Zhao, G.-Q. (2012). A potential in vitro and in vivo anti-HIV drug screening system for Chinese herbal medicines. *Phytother. Res. PTR* 26, 899–907.
- Fiebrich, F., and Koch, H. (1979). Silymarin, an inhibitor of prostaglandin synthetase. *Experientia* 35, 1550–1552.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.
- Finch, P.W., and Rubin, J.S. (2006). Keratinocyte growth factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 812–824.
- Finnson, K.W., McLean, S., Di Guglielmo, G.M., and Philip, A. (2013). Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Adv. Wound Care* 2, 195–214.
- van der Fits, L., Mourits, S., Voerman, J.S.A., Kant, M., Boon, L., Laman, J.D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Floencia, E., Prens, E.P., et al. (2009). Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *J. Immunol.* 182, 5836–5845.

- Fitzgerald, V., Mensack, M., Wolfe, P., and Thompson, H. (2009). A transfer-less, multi-well liquid culture feeding system for screening small molecules that affect the longevity of *Caenorhabditis elegans*. *BioTechniques* 47, ix–xv.
- Fleurentin, J. and Dos Santos (1991). Ethnopharmacologie. Sources, méthodes, objectifs. In *L'ethnopharmacologie, Une Approche Pluridisciplinaire.*, p. 493.
- Fleurentin, J., Pelt, J.-M., Mazars, G., Ansay, M., Anton, R., Aragon, R., Arango Acosta, G.J., Baerts, M., Baghdikian, B., Balansard, G., et al. (2014). Des sources du savoir aux médicaments du futur: actes.
- Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L., and Viollet, B. (2006). [Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]. *Med. Sci.* MS 22, 381–388.
- Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Collier, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14879–14884.
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 4195–4200.
- Freedberg, I.M., and Fitzpatrick, T.B. (1999). *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. (New York: McGraw-Hill, Health Professions Division).
- Freeman (2008). An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *Plant Health Instr.*
- Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature* 445, 834–842.
- Fuchs, E., and Raghavan, S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genet.* 3, 199–209.
- Gandhy, S.U., Kim, K., Larsen, L., Rosengren, R.J., and Safe, S. (2012). Curcumin and synthetic analogs induce reactive oxygen species and decreases specificity protein (Sp) transcription factors by targeting microRNAs. *BMC Cancer* 12, 564.
- Ge, Y., Zhang, L., Nikolova, M., Reva, B., and Fuchs, E. (2016). Strand-specific in vivo screen of cancer-associated miRNAs unveils a role for miR-21* in SCC progression. *Nat. Cell Biol.* 18, 111–121.
- Gibbings, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat. Cell Biol.* 11, 1143–1149.
- Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J., and Schier, A.F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75–79.
- Glavač, D., and Ravnik-Glavač, M. (2015). Essential Role of microRNA in Skin Physiology and Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 888, 307–330.
- Gonçalves, C., Ardourel, M.-Y., Decoville, M., Breuzard, G., Midoux, P., Hartmann, B., and Pichon, C. (2009). An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J. Gene Med.* 11, 401–411.

- Gonçalves, C., Gross, F., Guégan, P., Cheradame, H., and Midou, P. (2014). A robust transfection reagent for the transfection of CHO and HEK293 cells and production of recombinant proteins and lentiviral particles – PTG1. *Biotechnol. J.* 9, 1380–1388.
- Goren, I., Linke, A., Müller, E., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2006). The suppressor of cytokine signaling-3 is upregulated in impaired skin repair: implications for keratinocyte proliferation. *J. Invest. Dermatol.* 126, 477–485.
- Grant, S.K., Sklar, J.G., and Cummings, R.T. (2002). Development of novel assays for proteolytic enzymes using rhodamine-based fluorogenic substrates. *J. Biomol. Screen.* 7, 531–540.
- Gras, C., Ratuszny, D., Hadamitzky, C., Zhang, H., Blasczyk, R., and Figueiredo, C. (2015). miR-145 Contributes to Hypertrophic Scarring of the Skin by Inducing Myofibroblast Activity. *Mol. Med. Camb. Mass* 21, 296–304.
- Gray, N.E., Alcazar Magana, A., Lak, P., Wright, K.M., Quinn, J., Stevens, J.F., Maier, C.S., and Soumyanath, A. (2018). *Centella asiatica* - Phytochemistry and mechanisms of neuroprotection and cognitive enhancement. *Phytochem. Rev. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* 17, 161–194.
- Greenberg, A.S., Shen, W.-J., Muliro, K., Patel, S., Souza, S.C., Roth, R.A., and Kraemer, F.B. (2001). Stimulation of Lipolysis and Hormone-sensitive Lipase via the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 45456–45461.
- Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631–640.
- Grice, E.A., and Segre, J.A. (2011). The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 244–253.
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* 27, 91–105.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106, 23–34.
- Grossman, R.M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D.P., May, L.T., Kupper, T.S., Sehgal, P.B., and Gottlieb, A.B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6367–6371.
- Grubauer, G., Feingold, K.R., and Elias, P.M. (1987). Relationship of epidermal lipogenesis to cutaneous barrier function. *J. Lipid Res.* 28, 746–752.
- Gubern, A., Barceló-Torns, M., Barneda, D., López, J.M., Masgrau, R., Picatoste, F., Chalfant, C.E., Balsinde, J., Balboa, M.A., and Claro, E. (2009). JNK and Ceramide Kinase Govern the Biogenesis of Lipid Droplets through Activation of Group IVA Phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 284, 32359–32369.

- Guo, J., Lin, Q., Shao, Y., Rong, L., and Zhang, D. (2017). miR-29b promotes skin wound healing and reduces excessive scar formation by inhibition of the TGF- β 1/Smad/CTGF signaling pathway. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **95**, 437–442.
- Guo, X., Keyes, W.M., Papazoglu, C., Zuber, J., Li, W., Lowe, S.W., Vogel, H., and Mills, A.A. (2009). TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1451–1457.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., and Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321.
- Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 509–524.
- Hagiwara, K., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Takahashi, R.-U., Takeshita, F., and Ochiya, T. (2012). Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity. *Sci. Rep.* **2**, 314.
- Hagiwara, K., Gailhouse, L., Yasukawa, K., Kosaka, N., and Ochiya, T. (2015). A robust screening method for dietary agents that activate tumour-suppressor microRNAs. *Sci. Rep.* **5**, 14697.
- Hamilton, G.R., and BAskett, T.F. (2000). In the arms of morpheus: the development of morphine for postoperative pain relief. *Can. J. Anesth.* **47**, 367–374.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146–1150.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**, 3016–3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* **125**, 887–901.
- Han, Z., Zhu, S., Han, X., Wang, Z., Wu, S., and Zheng, R. (2015). Baicalein inhibits hepatocellular carcinoma cells through suppressing the expression of CD24. *Int. Immunopharmacol.* **29**, 416–422.
- Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 27879–27887.
- Hearing, V.J. (2005). Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J. Dermatol. Sci.* **37**, 3–14.
- Hebda, P.A. (1988). Stimulatory effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on epidermal cell outgrowth from porcine skin explant cultures. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 440–445.
- Heinrich, M., Frei Haller, B., and Leonti, M. (2014a). A perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: the eagle and the serpent on the prickly pear cactus. *J. Nat. Prod.* **77**, 678–689.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., and Williamson, E.M. (2014b). *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. (Edinburgh: Elsevier Health Sciences UK).

- Helleboid, S., Haug, C., Lamottke, K., Zhou, Y., Wei, J., Daix, S., Cambula, L., Rigou, G., Hum, D.W., and Walczak, R. (2014). The identification of naturally occurring neoruscogenin as a bioavailable, potent, and high-affinity agonist of the nuclear receptor ROR α (NR1F1). *J. Biomol. Screen.* *19*, 399–406.
- Henkel, T., Brunne, R.M., Müller, H., and Reichel, F. (1999). Statistical Investigation into the Structural Complementarity of Natural Products and Synthetic Compounds. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *38*, 643–647.
- Hennemann, H., Wirths, S., and Carl, C. (2015). Cell-based peptide screening to access the undruggable target space. *Eur. J. Med. Chem.* *94*, 489–496.
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S.H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* *19*, 245–254.
- Henrich, C.J., Cartner, L.K., Wilson, J.A., Fuller, R.W., Rizzo, A.E., Reilly, K.M., McMahon, J.B., and Gustafson, K.R. (2015). Deguelins, Natural Product Modulators of NF1-Defective Astrocytoma Cell Growth Identified by High-Throughput Screening of Partially Purified Natural Product Extracts. *J. Nat. Prod.* *78*, 2776–2781.
- Herter, E.K., and Xu Landén, N. (2017). Non-Coding RNAs: New Players in Skin Wound Healing. *Adv. Wound Care* *6*, 93–107.
- Hill, R.G. (2012). *Drug Discovery and Development - E-Book Technology in Transition*.
- Hou, J.P. (1977). The development of Chinese herbal medicine and the Pen-ts'ao. *Comp. Med. East West* *5*, 117–122.
- Hou, X.-Q., Yan, R., Yang, C., Zhang, L., Su, R.-Y., Liu, S.-J., Zhang, S.-J., He, W.-Q., Fang, S.-H., Cheng, S.-Y., et al. (2014). A novel assay for high-throughput screening of anti-Alzheimer's disease drugs to determine their efficacy by real-time monitoring of changes in PC12 cell proliferation. *Int. J. Mol. Med.* *33*, 543–549.
- Houghton, P.J., and Mukherjee, P.K. (2009). *Evaluation of herbal medicinal products: perspectives on quality, safety and efficacy* (London: Pharmaceutical Press).
- Hu, Q., Noor, M., Wong, Y.F., Hylands, P.J., Simmonds, M.S.J., Xu, Q., Jiang, D., Hendry, B.M., and Xu, Q. (2009). In vitro anti-fibrotic activities of herbal compounds and herbs. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *24*, 3033–3041.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* *4*, 44–57.
- Huang, F., Li, S., Lu, X., Liu, A., Du, G., and Shi, G. (2011). Two glutathione S-transferase inhibitors from *Radix Angelicae sinensis*. *Phytother. Res.* *25*, 284–289.
- Huang, M., Yao, P.-W., Chang, M.D.-T., Ng, S.-K., Yu, C.-H., Zhang, Y.-F., Wen, M.-L., Yang, X.-Y., and Lai, Y.-K. (2015a). Identification of anti-inflammatory fractions of *Geranium wilfordii* using tumor necrosis factor- α as a drug target on Herbochip® - an array-based high throughput screening platform. *BMC Complement. Altern. Med.* *15*, 146.
- Huang, Y., He, Y., and Li, J. (2015b). MicroRNA-21: a central regulator of fibrotic diseases via various targets. *Curr. Pharm. Des.* *21*, 2236–2242.

- Hubstenberger, A., Noble, S.L., Cameron, C., and Evans, T.C. (2013). Translation repressors, an RNA helicase, and developmental cues control RNP phase transitions during early development. *Dev. Cell* 27, 161–173.
- Humphreys, A.M., Govaerts, R., Ficinski, S.Z., Nic Lughadha, E., and Vorontsova, M.S. (2019). Global dataset shows geography and life form predict modern plant extinction and rediscovery. *Nat. Ecol. Evol.* 3, 1043–1047.
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 16961–16966.
- Hung, C.-M., Calejman, C.M., Sanchez-Gurmaches, J., Li, H., Clish, C.B., Hettmer, S., Wagers, A.J., and Guertin, D.A. (2014). Rictor/mTORC2 loss in the Myf5 lineage reprograms brown fat metabolism and protects mice against obesity and metabolic disease. *Cell Rep.* 8, 256–271.
- Hunt, T.K., Knighton, D.R., Thakral, K.K., Goodson, W.H., and Andrews, W.S. (1984). Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery* 96, 48–54.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 12, 99–110.
- Ihaka, R., and Gentleman, R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* 5, 299–314.
- Ishimoto, T., Mano, H., Ozawa, T., and Mori, H. (2012). Measuring CREB activation using bioluminescent probes that detect KID-KIX interaction in living cells. *Bioconjug. Chem.* 23, 923–932.
- Jackson, R.J., and Standart, N. (2007). How do microRNAs regulate gene expression? *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2007, re1.
- Jain, C.K., Majumder, H.K., and Roychoudhury, S. (2017). Natural Compounds as Anticancer Agents Targeting DNA Topoisomerases. *Curr. Genomics* 18, 75–92.
- James, J.T., and Dubery, I.A. (2009). Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Mol. Basel Switz.* 14, 3922–3941.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S., and Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 9, 26–38.
- Jeon, Y.-J., Shin, J.-I., Lee, S., Lee, Y.G., Kim, J.B., Kwon, H.C., Kim, S.H., Kim, I., Lee, K., and Han, Y.S. (2018). *Angelica gigas* Nakai Has Synergetic Effects on Doxorubicin-Induced Apoptosis. *BioMed Res. Int.* 2018, 6716547.
- Jeong, Y.H., An, S., Shin, K., and Lee, T.R. (2013). Peptide reactivity assay using spectrophotometric method for high-throughput screening of skin sensitization potential of chemical haptens. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 27, 264–271.
- Jiang, L., Lv, X., Li, J., Li, J., Li, X., Li, W., and Li, Y. (2012). The status of microRNA-21 expression and its clinical significance in human cutaneous malignant melanoma. *Acta Histochem.* 114, 582–588.

- Jin, Y., Tymen, S.D., Chen, D., Fang, Z.J., Zhao, Y., Dragas, D., Dai, Y., Marucha, P.T., and Zhou, X. (2013). MicroRNA-99 family targets AKT/mTOR signaling pathway in dermal wound healing. *PloS One* 8, e64434.
- Jo, M.H., Shin, S., Jung, S.-R., Kim, E., Song, J.-J., and Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol. Cell* 59, 117–124.
- Johannes, J., Jayarama-Naidu, R., Meyer, F., Wirth, E.K., Schweizer, U., Schomburg, L., Köhrle, J., and Renko, K. (2016). Silychristin, a Flavonolignan Derived From the Milk Thistle, Is a Potent Inhibitor of the Thyroid Hormone Transporter MCT8. *Endocrinology* 157, 1694–1701.
- Johnson, K.E., and Wilgus, T.A. (2014). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv. Wound Care* 3, 647–661.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* 16, 421–433.
- Jonca, N., Guerrin, M., Hadjiolova, K., Caubet, C., Gallinaro, H., Simon, M., and Serre, G. (2002). Corneodesmosin, a Component of Epidermal Corneocyte Desmosomes, Displays Homophilic Adhesive Properties. *J. Biol. Chem.* 277, 5024–5029.
- Joo, J.-H., Hong, I.-K., Kim, N.K., and Choi, E. (2018). Trichosanthes kirilowii extract enhances repair of UVB radiation-induced DNA damage by regulating BMAL1 and miR-142-3p in human keratinocytes. *Mol. Med. Rep.* 17, 877–883.
- Joyce, C.E., Zhou, X., Xia, J., Ryan, C., Thrash, B., Menter, A., Zhang, W., and Bowcock, A.M. (2011). Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4025–4040.
- Jung, S.M., Hung, C.-M., Hildebrand, S.R., Sanchez-Gurmaches, J., Martinez-Pastor, B., Gengatharan, J.M., Wallace, M., Mukhopadhyay, D., Martinez Calejman, C., Luciano, A.K., et al. (2019). Non-canonical mTORC2 Signaling Regulates Brown Adipocyte Lipid Catabolism through SIRT6-FoxO1. *Mol. Cell* 75, 807-822.e8.
- Kang, J.S., Yoon, W.K., Han, M.H., Lee, H., Lee, C.W., Lee, K.H., Han, S.-B., Lee, K., Yang, K.-H., Park, S.-K., et al. (2008). Inhibition of atopic dermatitis by topical application of silymarin in NC/Nga mice. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1475–1480.
- Kant, R., Yen, C.-H., Lu, C.-K., Lin, Y.-C., Li, J.-H., and Chen, Y.-M.A. (2016). Identification of 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-β-d-glucopyranoside as a Glycine N-Methyltransferase Enhancer by High-Throughput Screening of Natural Products Inhibits Hepatocellular Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Katiyar, C., Gupta, A., Kanjilal, S., and Katiyar, S. (2012). Drug discovery from plant sources: An integrated approach. *Ayu* 33, 10–19.
- Katiyar, S.K., Korman, N.J., Mukhtar, H., and Agarwal, R. (1997). Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 556–566.
- Katoh, M. (2009). FGFR2 abnormalities underlie a spectrum of bone, skin, and cancer pathologies. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1861–1867.
- Kawamata, T., Seitz, H., and Tomari, Y. (2009). Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 953–960.

- Kersten, S., Mandard, S., Tan, N.S., Escher, P., Metzger, D., Chambon, P., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., and Wahli, W. (2000). Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 28488–28493.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**, 2654–2659.
- Keyes, W.M., Wu, Y., Vogel, H., Guo, X., Lowe, S.W., and Mills, A.A. (2005). p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev.* **19**, 1986–1999.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209–216.
- Kim, B., Shon, J., Liu, K., Hong, S., and Ahn, S. (2017a). 122 Changes in fatty acid lengths of ceramides toward shorter chain dominance in human psoriasis skin. *J. Invest. Dermatol.* **137**, S213.
- Kim, B.-H., Oh, S.-R., Yin, C.-H., Lee, S., Kim, E.-A., Kim, M.-S., Sandoval, C., Jayabose, S., Bach, E.A., Lee, H.-K., et al. (2010). MS-1020 is a novel small molecule that selectively inhibits JAK3 activity. *Br. J. Haematol.* **148**, 132–143.
- Kim, D.H., Saetrom, P., Snøve, O., and Rossi, J.J. (2008a). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16230–16235.
- Kim, K., An, S., Choi, B., Gon, Joo, D., Choi, Y., Min, Ahn, K., Joong, An, I., and Cha, H., Jun (2017b). Arctiin regulates collagen type 1 α chain 1 mRNA expression in human dermal fibroblasts via the miR-378b-SIRT6 axis. *Mol. Med. Rep.* **16**, 9120–9124.
- Kim, M.-H., Liu, W., Borjesson, D.L., Curry, F.-R.E., Miller, L.S., Cheung, A.L., Liu, F.-T., Isseroff, R.R., and Simon, S.I. (2008b). Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1812–1820.
- Kim, N., Graf, T.N., Sparacino, C., Wani, M., and Wall, M. (2003). Complete Isolation and Characterization of Silybins and Isosilybins from Milk Thistle (*Silybum marianum*). *ChemInform* **34**.
- Kim, S.-H., Oh, J.-M., No, J.-H., Bang, Y.-J., Juhn, Y.-S., and Song, Y.-S. (2009a). Involvement of NF- κ B and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis* **30**, 753–757.
- Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009b). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–139.
- Kim, Y., Lee, J., Kim, J., Choi, C.W., Hwang, Y.-I., Kang, J.S., and Lee, W.J. (2017c). The pathogenic role of interleukin-22 and its receptor during UVB-induced skin inflammation. *PLoS One* **12**, e0178567.
- Kim, Y.-K., Kim, B., and Kim, V.N. (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1881–1889.
- Kingwell, K. (2017). Vector overcomes barrier to gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 238–239.

- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., and Mourelatos, Z. (2007). An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 129, 1141–1151.
- Klaas, C.A., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Della Loggia, R., Bomme, U., Pahl, H.L., and Merfort, I. (2002). Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from Arnica flowers. *Planta Med.* 68, 385–391.
- Klausmeyer, P., McCloud, T.G., Scudiero, D.A., Currens, M.J., II, J.H.C., and Shoemaker, R.H. (2012). Discovery and preliminary SAR of bisbenzylisoquinoline alkaloids as inducers of C/EBP α . *Bioorg. Med. Chem.* 20, 4646–4652.
- Köck, K., Xie, Y., Hawke, R.L., Oberlies, N.H., and Brouwer, K.L.R. (2013). Interaction of Silymarin Flavonolignans with Organic Anion-Transporting Polypeptides. *Drug Metab. Dispos.* 41, 958–965.
- Koehn, F.E. (2012). Biosynthetic medicinal chemistry of natural product drugs. *Med Chem Commun* 3, 854–865.
- Koehn, F.E., and Carter, G.T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 206–220.
- Kok, K.H., Ng, M.-H.J., Ching, Y.-P., and Jin, D.-Y. (2007). Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA. *J. Biol. Chem.* 282, 17649–17657.
- Kolaczowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175.
- Kong, S.-Y., Park, M.-H., Lee, M., Kim, J.-O., Lee, H.-R., Han, B.W., Svendsen, C.N., Sung, S.H., and Kim, H.-J. (2015). Kuwanon V inhibits proliferation, promotes cell survival and increases neurogenesis of neural stem cells. *PloS One* 10, e0118188.
- Konno, K. (2011). Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry* 72, 1510–1530.
- Kopan, R., and Weintraub, H. (1993). Mouse notch: expression in hair follicles correlates with cell fate determination. *J. Cell Biol.* 121, 631–641.
- Koscianska, E., Starega-Roslan, J., and Krzyzosiak, W.J. (2011). The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors. *PloS One* 6, e28548.
- Koyano S., Hatamochi A., Yamazaki S., Ishikawa J., Kitahara T., Narita H., Kondo N., and Masukawa Y. (2010). Psoriasis Patients Have Abnormal Ceramide Profile in Stratum Corneum. *Nishi Nihon Hifuka* 72, 494–499.
- Kren, V., and Walterová, D. (2005). Silybin and silymarin—new effects and applications. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* 149, 29–41.
- Krieg, T., and Aumailley, M. (2011). The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions: Extracellular matrix of the dermis. *Exp. Dermatol.* 20, 689–695.
- Kriegel, A.J., Liu, Y., Fang, Y., Ding, X., and Liang, M. (2012). The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol. Genomics* 44, 237–244.

- Krishnamurti, C., and Rao, S.C. (2016). The isolation of morphine by Serturmer. *Indian J. Anaesth.* *60*, 861–862.
- Kuijper, S., Turner, C.J., and Adams, R.H. (2007). Regulation of Angiogenesis by Eph–Ephrin Interactions. *Trends Cardiovasc. Med.* *17*, 145–151.
- Kwok, H.-H., Yue, P.Y.-K., Mak, N.-K., and Wong, R.N.-S. (2012). Ginsenoside Rb₁ induces type I collagen expression through peroxisome proliferator-activated receptor- δ . *Biochem. Pharmacol.* *84*, 532–539.
- Ladewig, E., Okamura, K., Flynt, A.S., Westholm, J.O., and Lai, E.C. (2012). Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res.* *22*, 1634–1645.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* *294*, 853–858.
- Lai, E.C., Tam, B., and Rubin, G.M. (2005). Pervasive regulation of *Drosophila* Notch target genes by GY-box-, Brd-box-, and K-box-class microRNAs. *Genes Dev.* *19*, 1067–1080.
- Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A.L., Wu, Z.-R., Hooper, L.V., Schmidt, R.R., von Aulock, S., et al. (2009). Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nat. Med.* *15*, 1377–1382.
- Lalloyer, F., and Staels, B. (2010). Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 894–899.
- Lampreia, F.P., Carmelo, J.G., and Anjos-Afonso, F. (2017). Notch Signaling in the Regulation of Hematopoietic Stem Cell. *Curr. Stem Cell Rep.* *3*, 202–209.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., et al. (2007). A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* *129*, 1401–1414.
- Laplanche, M., and Sabatini, D.M. (2009). An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr. Biol. CB* *19*, R1046–1052.
- Lau, P.-W., Guiley, K.Z., De, N., Potter, C.S., Carragher, B., and MacRae, I.J. (2012). The molecular architecture of human Dicer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 436–440.
- Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* *437*, 275–280.
- Lee, D.Y.-W., and Liu, Y. (2003). Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A, and isosilybin B, Isolated from *Silybum marianum* (milk thistle). *J. Nat. Prod.* *66*, 1171–1174.
- Lee, H.Y., and Doudna, J.A. (2012). TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. *RNA N. Y. N* *18*, 2012–2019.
- Lee, E.A., Angka, L., Rota, S.-G., Hanlon, T., Mitchell, A., Hurren, R., Wang, X.M., Gronda, M., Boyaci, E., Bojko, B., et al. (2015). Targeting Mitochondria with Avocatin B Induces Selective Leukemia Cell Death. *Cancer Res.* *75*, 2478–2488.

- Lee, G., Tai, Cha, H., Jun, Lee, K., Sik, Lee, K., Kook, Hong, J., Tae, Ahn, K., Joong, An, I.-S., An, S., and Bae, S. (2014a). Arctiin induces an UVB protective effect in human dermal fibroblast cells through microRNA expression changes. *Int. J. Mol. Med.* 33, 640–648.
- Lee, K.S., Cha, H.J., Lee, G.T., Lee, K.K., Hong, J.T., Ahn, K.J., An, I.-S., An, S., and Bae, S. (2014b). Troxerutin induces protective effects against ultraviolet B radiation through the alteration of microRNA expression in human HaCaT keratinocyte cells. *Int. J. Mol. Med.* 33, 934–942.
- Lee, M.-H., Huang, Z., Kim, D.J., Kim, S.-H., Kim, M.O., Lee, S.-Y., Xie, H., Park, S.J., Kim, J.Y., Kundu, J.K., et al. (2013). Direct targeting of MEK1/2 and RSK2 by silybin induces cell-cycle arrest and inhibits melanoma cell growth. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* 6, 455–465.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.
- Lena, A.M., Shalom-Feuerstein, R., Rivetti di Val Cervo, P., Aberdam, D., Knight, R.A., Melino, G., and Candi, E. (2008). miR-203 represses “stemness” by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ.* 15, 1187–1195.
- Levy, L., and Hill, C.S. (2005). Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8108–8125.
- Lew, B.-L., Cho, Y., Kim, J., Sim, W.-Y., and Kim, N.-I. (2006). Ceramides and Cell Signaling Molecules in Psoriatic Epidermis: Reduced Levels of Ceramides, PKC- α , and JNK. *J. Korean Med. Sci.* 21, 95.
- Lewis, D.A., and Spandau, D.F. (2008). UVB-Induced Activation of NF- κ B is Regulated by the IGF-1R and Dependent on p38 MAPK. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1022–1029.
- Li, D., Isherwood, S., Motz, A., Zang, R., Yang, S.-T., Wang, J., and Wang, X. (2013). Cell-based screening of traditional Chinese medicines for proliferation enhancers of mouse embryonic stem cells. *Biotechnol. Prog.* 29, 738–744.
- Li, D., Li, X.I., Wang, A., Meisgen, F., Pivarcsi, A., Sonkoly, E., Ståhle, M., and Landén, N.X. (2015). MicroRNA-31 Promotes Skin Wound Healing by Enhancing Keratinocyte Proliferation and Migration. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1676–1685.
- Li, D., Duan, M., Feng, Y., Geng, L., Li, X., and Zhang, W. (2016). MiR-146a modulates macrophage polarization in systemic juvenile idiopathic arthritis by targeting INHBA. *Mol. Immunol.* 77, 205–212.
- Li, D., Wikstrom, J., Herter, E., Li, X., Pivarcsi, A., Sonkoly, E., Ståhle, M., Mi, Q., Zhou, L., and Xu Landén, N. (2017). 660 Comparison of microRNAome of human normal and chronic wounds reveals microRNA-17~92 is critical for wound repair. *J. Invest. Dermatol.* 137, S306.
- Li, D., Peng, H., Qu, L., Sommar, P., Wang, A., Chu, T., Li, X., Bi, X., Liu, Q., Sérézal, I.G., et al. (2021). miR-19a/b and miR-20a Promote Wound Healing by Regulating the Inflammatory Response of Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 141, 659–671.

- Li, S., Xie, R., Jiang, C., and Liu, M. (2018). Schizandrin A Alleviates LPS-Induced Injury in Human Keratinocyte Cell Hacat Through a MicroRNA-127-Dependent Regulation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **49**, 2229–2239.
- Li, X., Shen, F., Zhang, Y., Zhu, J., Huang, L., and Shi, Q. (2007). Functional characterization of cell lines for high-throughput screening of human neuromedin U receptor subtype 2 specific agonists using a luciferase reporter gene assay. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **67**, 284–292.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.-J., et al. (2011). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* **13**, 376–388.
- Li, Y.C., Pirro, A.E., Amling, M., Delling, G., Baron, R., Bronson, R., and Demay, M.B. (1997). Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9831–9835.
- Liang, C.-C., Park, A.Y., and Guan, J.-L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2**, 329–333.
- Libermann, T.A., and Baltimore, D. (1990). Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2327–2334.
- Lin, Y.-K., Wong, W.-R., Chang, Y.-C., Chang, C.-J., Tsay, P.-K., Chang, S.-C., and Pang, J.-H.S. (2007). The efficacy and safety of topically applied indigo naturalis ointment in patients with plaque-type psoriasis. *Dermatol. Basel Switz.* **214**, 155–161.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 576–577.
- Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D.K., and Cournia, Z. (2014). Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1923–1938.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26.
- Liu, G., and Abraham, E. (2013). MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 170–177.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437–1441.
- Liu, J., Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., Parker, R., and Hannon, G.J. (2005a). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat. Cell Biol.* **7**, 1261–1266.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005b). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 719–723.
- Liu, J., Zu, M., Chen, K., Gao, L., Min, H., Zhuo, W., Chen, W., and Liu, A. (2018). Screening of neuraminidase inhibitory activities of some medicinal plants traditionally used in Lingnan Chinese medicines. *BMC Complement. Altern. Med.* **18**, 102.

- Liu, N., Li, L., Zhu, X., Ling, Z., Feng, J., Hu, Y., Wang, Y., Mou, L., and Wang, Y. (2016). A High Content Screening Assay to Identify Compounds with Anti-Epithelial-Mesenchymal Transition Effects from the Chinese Herbal Medicine Tong-Mai-Yang-Xin-Wan. *Mol. Basel Switz.* 21.
- Liu, Q., Fu, H., Sun, F., Zhang, H., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., and Zheng, X. (2008). miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* 36, 5391–5404.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.
- Liwak, U., Thakor, N., Jordan, L.E., Roy, R., Lewis, S.M., Pardo, O.E., Seckl, M., and Holcik, M. (2012). Tumor Suppressor PDCD4 Represses Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation of Antiapoptotic Proteins and Is Regulated by S6 Kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1818–1829.
- Lowes, M.A., Bowcock, A.M., and Krueger, J.G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445, 866–873.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2011). Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005058–a005058.
- Luan, J., Zhang, Y., Yang, S., Wang, X., Yu, B., and Yang, H. (2015). Oridonin: a small molecule inhibitor of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) isolated from traditional Chinese medicine. *Fitoterapia* 100, 88–94.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.
- Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9667–9672.
- Ma, C., Harskamp, C.T., Armstrong, E.J., and Armstrong, A.W. (2013). The association between psoriasis and dyslipidaemia: a systematic review. *Br. J. Dermatol.* 168, 486–495.
- Ma, H.-L., Liang, S., Li, J., Napierata, L., Brown, T., Benoit, S., Senices, M., Gill, D., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., et al. (2008). IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J. Clin. Invest.* 118, 597–607.
- Ma, J.-B., Ye, K., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* 429, 318–322.
- MacLeod, A.S., and Mansbridge, J.N. (2016). The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv. Wound Care* 5, 65–78.
- Madhyastha, R., Madhyastha, H., Nakajima, Y., Omura, S., and Maruyama, M. (2012). MicroRNA signature in diabetic wound healing: promotive role of miR-21 in fibroblast migration. *Int. Wound J.* 9, 355–361.
- Madison, K.C. (2003). Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 121, 231–241.
- Madison, K.C., Sando, G.N., Howard, E.J., True, C.A., Gilbert, D., Swartzendruber, D.C., and Wertz, P.W. (1998). Lamellar Granule Biogenesis: A Role for Ceramide Glucosyltransferase, Lysosomal Enzyme Transport, and the Golgi. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 3, 80–86.

- Madlener, M., Parks, W.C., and Werner, S. (1998). Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Their Physiological Inhibitors (TIMPs) Are Differentially Expressed during Excisional Skin Wound Repair. *Exp. Cell Res.* 242, 201–210.
- Mahdavi, A., Bagherniya, M., Fakheran, O., Reiner, Ž., Xu, S., and Sahebkar, A. (2020). Medicinal plants and bioactive natural compounds as inhibitors of HMG-CoA reductase: A literature review. *BioFactors* 46, 906–926.
- Mandard, S., Zandbergen, F., Tan, N.S., Escher, P., Patsouris, D., Koenig, W., Kleemann, R., Bakker, A., Veenman, F., Wahli, W., et al. (2004). The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment. *J. Biol. Chem.* 279, 34411–34420.
- Maranduca, M., Branisteanu, D., Serban, D., Branisteanu, D., Stoleriu, G., Manolache, N., and Serban, I. (2019). Synthesis and physiological implications of melanic pigments (Review). *Oncol. Lett.*
- Marion-Letellier, R., Déchelotte, P., Iacucci, M., and Ghosh, S. (2009). Dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gut* 58, 586–593.
- Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1102–1107.
- Martinez-Nunez, R.T., Louafi, F., and Sanchez-Elsner, T. (2011). The interleukin 13 (IL-13) pathway in human macrophages is modulated by microRNA-155 via direct targeting of interleukin 13 receptor alpha1 (IL13Ralpha1). *J. Biol. Chem.* 286, 1786–1794.
- Massagué, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 597–641.
- Matarlo, J.S., Krumpe, L.R.H., Heinz, W.F., Oh, D., Shenoy, S.R., Thomas, C.L., Goncharova, E.I., Lockett, S.J., and O’Keefe, B.R. (2019). The Natural Product Butylcycloheptyl Prodiginine Binds Pre-miR-21, Inhibits Dicer-Mediated Processing of Pre-miR-21, and Blocks Cellular Proliferation. *Cell Chem. Biol.* 26, 1133-1142.e4.
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., et al. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317, 1764–1767.
- Matsumoto, K., Hashimoto, K., Hashiro, M., Yoshimasa, H., and Yoshikawa, K. (1990). Modulation of growth and differentiation in normal human keratinocytes by transforming growth factor-beta. *J. Cell. Physiol.* 145, 95–101.
- Matza-Porges, S., Eisen, K., Ibrahim, H., Haberman, A., Fridlender, B., and Joseph, G. (2014). A new antiviral screening method that simultaneously detects viral replication, cell viability, and cell toxicity. *J. Virol. Methods* 208, 138–143.
- Maurer, B., Stanczyk, J., Jüngel, A., Akhmetshina, A., Trenkmann, M., Brock, M., Kowal-Bielecka, O., Gay, R.E., Michel, B.A., Distler, J.H.W., et al. (2010). MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 62, 1733–1743.
- Mazier, D., and Thellier, M. (2016). [Youyou Tu, from Mao Zedong to the Nobel Prize]. *Med. Sci. MS* 32, 106–109.

- Mazzio, E.A., and Soliman, K.F.A. (2017). HTP Nutraceutical Screening for Histone Deacetylase Inhibitors and Effects of HDACis on Tumor-suppressing miRNAs by Trichostatin A and Grapeseed (*Vitis vinifera*) in HeLa cells. *Cancer Genomics Proteomics* 14, 17–33.
- Mazzio, E., Badisa, R., Mack, N., Deiab, S., and Soliman, K.F.A. (2014). High throughput screening of natural products for anti-mitotic effects in MDA-MB-231 human breast carcinoma cells. *Phytother. Res. PTR* 28, 856–867.
- McGrath, J.A., Eady, R.A.J., and Pope, F.M. (2004). Anatomy and Organization of Human Skin. In *Rook's Textbook of Dermatology*, T. Burns, S. Breathnach, N. Cox, and C. Griffiths, eds. (Malden, Massachusetts, USA: Blackwell Publishing, Inc.), pp. 45–128.
- Medina, P.P., Nolde, M., and Slack, F.J. (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 467, 86–90.
- Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J.A., Longley, M.A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M.E., Steven, A.C., Steinert, P.M., et al. (1990). Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* 61, 1103–1112.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185–197.
- Meng, S., Lin, Z., Wang, Y., Wang, Z., Li, P., and Zheng, Y. (2018). Psoriasis therapy by Chinese medicine and modern agents. *Chin. Med.* 13, 16.
- Mfotie Njoya, E., Weber, C., Hernandez-Cuevas, N.A., Hon, C.-C., Janin, Y., Kamini, M.F.G., Moundipa, P.F., and Guillén, N. (2014). Bioassay-guided fractionation of extracts from *Codiaeum variegatum* against *Entamoeba histolytica* discovers compounds that modify expression of ceramide biosynthesis related genes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2607.
- Michaels, A.S., Chandrasekaran, S.K., and Shaw, J.E. (1975). Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. *AIChE J.* 21, 985–996.
- Mikulic, M. (2021). Bayer - Statistics & Facts.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R., and Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398, 708–713.
- Min, N., Leong, P.T., Lee, R.C.H., Khuan, J.S.E., and Chu, J.J.H. (2018). A flavonoid compound library screen revealed potent antiviral activity of plant-derived flavonoids on human enterovirus A71 replication. *Antiviral Res.* 150, 60–68.
- Miscianinov, V., Martello, A., Rose, L., Parish, E., Cathcart, B., Mitić, T., Gray, G.A., Meloni, M., Al Haj Zen, A., and Caporali, A. (2018). MicroRNA-148b Targets the TGF- β Pathway to Regulate Angiogenesis and Endothelial-to-Mesenchymal Transition during Skin Wound Healing. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 26, 1996–2007.
- Misery, L. (1997). Skin, immunity and the nervous system. *Br. J. Dermatol.* 137, 843–850.
- Mori, R., Tanaka, K., and Shimokawa, I. (2018). Identification and functional analysis of inflammation-related miRNAs in skin wound repair. *Dev. Growth Differ.* 60, 306–315.

- Morris, R.J., and Potten, C.S. (1994). Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vitro. *Cell Prolif.* 27, 279–289.
- Moskaug, J.Ø., Borge, G.I., Fagervoll, A.M., Paur, I., Carlsen, H., and Blomhoff, R. (2008). Dietary polyphenols identified as intracellular protein kinase A inhibitors. *Eur. J. Nutr.* 47, 460–469.
- Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., Pang, W.W., Fischer, M.R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M.M., et al. (2006). Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell* 124, 315–329.
- Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S., and Ghidoni, R. (1993). Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1182, 147–151.
- Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Mellesi, L., Ghidoni, R., and Caputo, R. (1994). Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions. *Arch. Dermatol.* 130, 452–456.
- Moura, J., Sørensen, A., Leal, E.C., Svendsen, R., Carvalho, L., Willemoes, R.J., Jørgensen, P.T., Jenssen, H., Wengel, J., Dalgaard, L.T., et al. (2019). microRNA-155 inhibition restores Fibroblast Growth Factor 7 expression in diabetic skin and decreases wound inflammation. *Sci. Rep.* 9, 5836.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16, 720–728.
- Muluwa, K., and Bostoen, K. (2010). Les plantes et l'invisible chez les Mbuun, Mpiin et Nsong (Bandundu, RD Congo): une approche ethnolinguistique. p.
- Muratspahić, E., Freissmuth, M., and Gruber, C.W. (2019). Nature-Derived Peptides: A Growing Niche for GPCR Ligand Discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 40, 309–326.
- Nagosa, S., Leesch, F., Putin, D., Bhattacharya, S., Altshuler, A., Serró, L., Amitai-Lange, A., Nasser, W., Aberdam, E., Rouleau, M., et al. (2017). microRNA-184 Induces a Commitment Switch to Epidermal Differentiation. *Stem Cell Rep.* 9, 1991–2004.
- Nakanishi, K., Weinberg, D.E., Bartel, D.P., and Patel, D.J. (2012). Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* 486, 368–374.
- Nambiar, D.K., Deep, G., Singh, R.P., Agarwal, C., and Agarwal, R. (2014). Silibinin inhibits aberrant lipid metabolism, proliferation and emergence of androgen-independence in prostate cancer cells via primarily targeting the sterol response element binding protein 1. *Oncotarget* 5, 10017–10033.
- Namkoong, J., Kern, D., and Knaggs, H.E. (2018). Assessment of Human Skin Gene Expression by Different Blends of Plant Extracts with Implications to Periorbital Skin Aging. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Nestle, F.O., Kaplan, D.H., and Barker, J. (2009a). Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* 361, 496–509.
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., and Nickoloff, B.J. (2009b). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 679–691.
- Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335.

- Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **83**, 770–803.
- Nguyen, B.-C., Lefort, K., Mandinova, A., Antonini, D., Devgan, V., Della Gatta, G., Koster, M.I., Zhang, Z., Wang, J., Tommasi di Vignano, A., et al. (2006). Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev.* **20**, 1028–1042.
- Nguyen, T.A., Jo, M.H., Choi, Y.-G., Park, J., Kwon, S.C., Hohng, S., Kim, V.N., and Woo, J.-S. (2015). Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* **161**, 1374–1387.
- Ni, W.-J., and Leng, X.-M. (2016). miRNA-Dependent Activation of mRNA Translation. *MicroRNA Shariqah United Arab Emir.* **5**, 83–86.
- Nickoloff, B.J., Qin, J.-Z., Chaturvedi, V., Denning, M.F., Bonish, B., and Miele, L. (2002). Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF- κ B and PPAR γ . *Cell Death Differ.* **9**, 842–855.
- Nissan, T., and Parker, R. (2008). Computational analysis of miRNA-mediated repression of translation: implications for models of translation initiation inhibition. *RNA N. Y. N* **14**, 1480–1491.
- Nottrott, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1108–1114.
- Oda, Y., Hu, L., Nguyen, T., Fong, C., Zhang, J., Guo, P., and Bikle, D.D. (2018). Vitamin D Receptor Is Required for Proliferation, Migration, and Differentiation of Epidermal Stem Cells and Progeny during Cutaneous Wound Repair. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 2423–2431.
- Odland, G.F., and Holbrook, K. (1981). The lamellar granules of epidermis. *Curr. Probl. Dermatol.* **9**, 29–49.
- Oi, N., Chen, H., Ok Kim, M., Lubet, R.A., Bode, A.M., and Dong, Z. (2012). Taxifolin suppresses UV-induced skin carcinogenesis by targeting EGFR and PI3K. *Cancer Prev. Res. Phila. Pa* **5**, 1103–1114.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* **130**, 89–100.
- Olsen, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* **216**, 671–680.
- Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* **22**, 3172–3183.
- Pálmer, H.G., Anjos-Afonso, F., Carmeliet, G., Takeda, H., and Watt, F.M. (2008). The vitamin D receptor is a Wnt effector that controls hair follicle differentiation and specifies tumor type in adult epidermis. *PloS One* **3**, e1483.
- Paran, Y., Ilan, M., Kashman, Y., Goldstein, S., Liron, Y., Geiger, B., and Kam, Z. (2007). High-throughput screening of cellular features using high-resolution light-microscopy; application for profiling drug effects on cell adhesion. *J. Struct. Biol.* **158**, 233–243.
- Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 271–282.

- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N.C., Ramirez, H., Nusbaum, A.G., Sawaya, A., Patel, S.B., Khalid, L., Isseroff, R.R., and Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv. Wound Care* 3, 445–464.
- Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M.S., and Hoyer, D. (2016). An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today* 21, 204–207.
- Pavarini, D.P., Pavarini, S.P., Niehues, M., and Lopes, N.P. (2012). Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 5–16.
- Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., and De Luca, M. (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3156–3161.
- Pendaries, V., Malaisse, J., Pellerin, L., Le Lamer, M., Nachat, R., Kezic, S., Schmitt, A.-M., Paul, C., Poumay, Y., Serre, G., et al. (2014). Knockdown of filaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2938–2946.
- Peng, C., Wang, H., Xu, X., Wang, X., Chen, X., Wei, W., Lai, Y., Liu, G., Godwin, I.D., Li, J., et al. (2018). High-throughput detection and screening of plants modified by gene editing using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 95, 557–567.
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.-E., Pelletier, J., and Sharp, P.A. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* 21, 533–542.
- Petiot, A., Conti, F.J.A., Grose, R., Revest, J.-M., Hodivala-Dilke, K.M., and Dickson, C. (2003). A crucial role for Fgfr2-IIIb signalling in epidermal development and hair follicle patterning. *Dev. Camb. Engl.* 130, 5493–5501.
- Pferschy-Wenzig, E.-M., Atanasov, A.G., Malainer, C., Noha, S.M., Kunert, O., Schuster, D., Heiss, E.H., Oberlies, N.H., Wagner, H., Bauer, R., et al. (2014). Identification of isosilybin A from milk thistle seeds as an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Nat. Prod.* 77, 842–847.
- Pilgram, G.S.K., Marjolein Engelsma-van Pelt, A., Koerten, H.K., and Bouwstra, J.A. (1999). Electron Diffraction Provides New Information on Human Stratum Corneum Lipid Organization Studied in Relation to Depth and Temperature. *J. Invest. Dermatol.* 113, 403–409.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309, 1573–1576.
- Pizzino, G., Irrera, N., Galfo, F., Pallio, G., Mannino, F., D’amore, A., Pellegrino, E., Ieni, A., Russo, G.T., Calapai, M., et al. (2018). Effects of the antagomiRs 15b and 200b on the altered healing pattern of diabetic mice. *Br. J. Pharmacol.* 175, 644–655.
- Place, R.F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E.J., and Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1608–1613.
- Prescott, F., Organe, G., and Rowbotham, S. (1946). Tubocurarine chloride as an adjunct to anaesthesia; report on 180 cases. *Lancet Lond. Engl.* 2, 80–84.
- Prost-Squarcioni, Catherine (2006). Histologie de la peau et des follicules pileux. *Med Sci Paris* 22, 131–137.

- Qinga, L.-S., Xue, Y., Zheng, Y., Xiong, J., Liao, X., Ding, L.-S., Li, B.-G., and Liu, Y.-M. (2010). Ligand fishing from *Dioscorea nipponica* extract using human serum albumin functionalized magnetic nanoparticles. *J. Chromatogr. A* *1217*, 4663–4668.
- Ramakrishna, A., and Ravishankar, G.A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* *6*, 1720–1731.
- Ramasamy, K., and Agarwal, R. (2008). Multitargeted therapy of cancer by silymarin. *Cancer Lett.* *269*, 352–362.
- Ramirez, H., Patel, S.B., and Pastar, I. (2014). The Role of TGF β Signaling in Wound Epithelialization. *Adv. Wound Care* *3*, 482–491.
- Rand, T.A., Ginalski, K., Grishin, N.V., and Wang, X. (2004). Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 14385–14389.
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J.C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., et al. (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J.* *20*, 3427–3436.
- Rates, S.M. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicology* *39*, 603–613.
- Rawlings, A.V., and Harding, C.R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatol. Ther.* *17*, 43–48.
- Rawlings, A.V., Scott, I.R., Harding, C.R., and Bowser, P.A. (1994). Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level. *J. Invest. Dermatol.* *103*, 731–740.
- Raycroft, M.T., Harvey, B.P., Bruck, M.J., and Mamula, M.J. (2012). Inhibition of antigen trafficking through scavenger receptor A. *J. Biol. Chem.* *287*, 5310–5316.
- Reczko, M., Maragkakis, M., Alexiou, P., Grosse, I., and Hatzigeorgiou, A.G. (2012). Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinform. Oxf. Engl.* *28*, 771–776.
- Rendon, A., and Schäkel, K. (2019). Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int. J. Mol. Sci.* *20*.
- Revest, J.M., Spencer-Dene, B., Kerr, K., De Moerloose, L., Rosewell, I., and Dickson, C. (2001). Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of Shh and Fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of Fgf8, Fgf10, Msx1, or Bmp4. *Dev. Biol.* *231*, 47–62.
- Rhoads, K., Arderiu, G., Charboneau, A., Hansen, S.L., Hoffman, W., and Boudreau, N. (2005). A role for Hox A5 in regulating angiogenesis and vascular patterning. *Lymphat. Res. Biol.* *3*, 240–252.
- Rice, R.H., and Green, H. (1977). The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein. *Cell* *11*, 417–422.
- Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.-J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 340–349.
- Rivier, M., Safonova, I., Lebrun, P., Griffiths, C.E., Ailhaud, G., and Michel, S. (1998). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *111*, 1116–1121.

- Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., and Kehrl, J.H. (1986). Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 4167–4171.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14, 1902–1910.
- Rollinger, J.M., Stuppner, H., and Langer, T. (2008). Virtual screening for the discovery of bioactive natural products. *Prog. Drug Res. Fortschritte Arzneimittelforschung Progres Rech. Pharm.* 65, 211, 213–249.
- Ronot, X., Grunwald, D., Mayol, J.-F., Maynadié, M., and Martet, G. (2006). *La cytométrie en flux* (Paris: Editions Tec & Doc).
- Ross, K. (2018). Towards topical microRNA-directed therapy for epidermal disorders. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 269, 136–147.
- Rothnagel, J.A., and Steinert, P.M. (1990). The structure of the gene for mouse filaggrin and a comparison of the repeating units. *J. Biol. Chem.* 265, 1862–1865.
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83–86.
- Ruocco, K.M., Goncharova, E.I., Young, M.R., Colburn, N.H., McMahon, J.B., and Henrich, C.J. (2007). A high-throughput cell-based assay to identify specific inhibitors of transcription factor AP-1. *J. Biomol. Screen.* 12, 133–139.
- Ryoo, S.-R., Lee, J., Yeo, J., Na, H.-K., Kim, Y.-K., Jang, H., Lee, J.H., Han, S.W., Lee, Y., Kim, V.N., et al. (2013). Quantitative and Multiplexed MicroRNA Sensing in Living Cells Based on Peptide Nucleic Acid and Nano Graphene Oxide (PANGO). *ACS Nano* 7, 5882–5891.
- Ryoo, S.-R., Yim, Y., Kim, Y.-K., Park, I.-S., Na, H.-K., Lee, J., Jang, H., Won, C., Hong, S., Kim, S.-Y., et al. (2018). High-throughput chemical screening to discover new modulators of microRNA expression in living cells by using graphene-based biosensor. *Sci. Rep.* 8, 11413.
- Saarialho-Kere, U.K., Pentland, A.P., Birkedal-Hansen, H., Parks, W.C., and Welgus, H.G. (1994). Distinct populations of basal keratinocytes express stromelysin-1 and stromelysin-2 in chronic wounds. *J. Clin. Invest.* 94, 79–88.
- Sahle, F.F., Gebre-Mariam, T., Dobner, B., Wohlrab, J., and Neubert, R.H.H. (2015). Skin Diseases Associated with the Depletion of Stratum Corneum Lipids and Stratum Corneum Lipid Substitution Therapy. *Skin Pharmacol. Physiol.* 28, 42–55.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A., and Jones, P.A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 9, 435–443.
- Sakdiset, P., Kitao, Y., Todo, H., and Sugibayashi, K. (2017). High-Throughput Screening of Potential Skin Penetration-Enhancers Using Stratum Corneum Lipid Liposomes: Preliminary Evaluation for Different Concentrations of Ethanol. *J. Pharm.* 2017, 7409420.

- Sakuntabhai, A., Ruiz-Perez, V., Carter, S., Jacobsen, N., Burge, S., Monk, S., Smith, M., Munro, C.S., O'Donovan, M., Craddock, N., et al. (1999). Mutations in ATP2A2, encoding a Ca²⁺ pump, cause Darier disease. *Nat. Genet.* **21**, 271–277.
- Sammar, M., Abu-Farich, B., Rayan, I., Falah, M., and Rayan, A. (2019). Correlation between cytotoxicity in cancer cells and free radical-scavenging activity: In vitro evaluation of 57 medicinal and edible plant extracts. *Oncol. Lett.* **18**, 6563–6571.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D., and McLean, W.H.I. (2009). Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J. Cell Sci.* **122**, 1285–1294.
- Sano, S., Chan, K.S., Carbajal, S., Clifford, J., Peavey, M., Kiguchi, K., Itami, S., Nickoloff, B.J., and DiGiovanni, J. (2005). Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat. Med.* **11**, 43–49.
- Sasiela, C.A., Stewart, D.H., Kitagaki, J., Safiran, Y.J., Yang, Y., Weissman, A.M., Oberoi, P., Davydov, I.V., Goncharova, E., Beutler, J.A., et al. (2008). Identification of inhibitors for MDM2 ubiquitin ligase activity from natural product extracts by a novel high-throughput electrochemiluminescent screen. *J. Biomol. Screen.* **13**, 229–237.
- Savignac, M., Simon, M., Edir, A., Guibbal, L., and Hovnanian, A. (2014). SERCA2 dysfunction in Darier disease causes endoplasmic reticulum stress and impaired cell-to-cell adhesion strength: rescue by Miglustat. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 1961–1970.
- Schimmel, K., Jung, M., Foinquinos, A., José, G.S., Beaumont, J., Bock, K., Grote-Levi, L., Xiao, K., Bär, C., Pfanne, A., et al. (2020). Natural Compound Library Screening Identifies New Molecules for the Treatment of Cardiac Fibrosis and Diastolic Dysfunction. *Circulation* **141**, 751–767.
- Schnee, C., Köllner, T.G., Held, M., Turlings, T.C.J., Gershenzon, J., and Degenhardt, J. (2006). The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 1129–1134.
- Schneider, M.R. (2012). MicroRNAs as novel players in skin development, homeostasis and disease. *Br. J. Dermatol.* **166**, 22–28.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208.
- Seggerson, K., Tang, L., and Moss, E.G. (2002). Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev. Biol.* **243**, 215–225.
- Selcen, D., and Engel, A.G. (2004). Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology* **62**, 1363–1371.
- Sen, C.K. (2019). Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Adv. Wound Care* **8**, 39–48.
- Sengupta, R., Barone, A., Marasa, J., Taylor, S., Jackson, E., Warrington, N.M., Rao, S., Kim, A.H., Leonard, J.R., Piwnica-Worms, D., et al. (2015). Novel chemical library screen identifies naturally occurring plant products that specifically disrupt glioblastoma-endothelial cell interactions. *Oncotarget* **6**, 18282–18292.

- Senoo, M., Pinto, F., Crum, C.P., and McKeon, F. (2007). p63 Is essential for the proliferative potential of stem cells in stratified epithelia. *Cell* 129, 523–536.
- Serrano-Marín, J., Reyes-Resina, I., Martínez-Pinilla, E., Navarro, G., and Franco, R. (2020). Natural Compounds as Guides for the Discovery of Drugs Targeting G-Protein-Coupled Receptors. *Molecules* 25.
- Shah, S., Islam, M.N., Dakshanamurthy, S., Rizvi, I., Rao, M., Herrell, R., Zinser, G., Valrance, M., Aranda, A., Moras, D., et al. (2006). The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation. *Mol. Cell* 21, 799–809.
- Shan, G., Li, Y., Zhang, J., Li, W., Szulwach, K.E., Duan, R., Faghihi, M.A., Khalil, A.M., Lu, L., Paroo, Z., et al. (2008). A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat. Biotechnol.* 26, 933–940.
- Sheedy, F.J. (2015). Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front. Immunol.* 6, 19.
- Shen, T., and Huang, S. (2012). The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Agents Med. Chem.* 12, 631–639.
- Shen, T., Chen, X.-M., Harder, B., Long, M., Wang, X.-N., Lou, H.-X., Wondrak, G.T., Ren, D.-M., and Zhang, D.D. (2014). Plant extracts of the family Lauraceae: a potential resource for chemopreventive agents that activate the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element pathway. *Planta Med.* 80, 426–434.
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113, 685–700.
- Shie Morteza, M., Hayati, Z., Namazi, N., and Abdollahimajd, F. (2019). Efficacy and safety of oral silymarin in comparison with oral doxycycline and their combination therapy in the treatment of acne vulgaris. *Dermatol. Ther.* 32.
- Shin, J.Y., Beckett, J.D., Bagirzadeh, R., Creamer, T.J., Shah, A.A., McMahan, Z., Paik, J.J., Sampedro, M.M., MacFarlane, E.G., Beer, M.A., et al. (2019). Epigenetic activation and memory at a TGFB2 enhancer in systemic sclerosis. *Sci. Transl. Med.* 11.
- Siess, W. (1989). Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol. Rev.* 69, 58–178.
- Silva, A.R., Grosso, C., Delerue-Matos, C., and Rocha, J.M. (2019). Comprehensive review on the interaction between natural compounds and brain receptors: Benefits and toxicity. *Eur. J. Med. Chem.* 174, 87–115.
- Simion, V., Sobilo, J., Clemoncon, R., Natkunarajah, S., Ezzine, S., Abdallah, F., Lerondel, S., Pichon, C., and Baril, P. (2017). Positive radionuclide imaging of miRNA expression using RILES and the human sodium iodide symporter as reporter gene is feasible and supports a protective role of miRNA-23a in response to muscular atrophy. *PLoS One* 12, e0177492.
- Simion, V., Henriët, E., Juric, V., Aquino, R., Loussouarn, C., Laurent, Y., Martin, F., Midoux, P., Garcion, E., Pichon, C., et al. (2020). Intracellular trafficking and functional monitoring of miRNA delivery in glioblastoma using lipopolyplexes and the miRNA-ON RILES reporter system. *J. Controlled Release* 327, 429–443.

- Simpson, C.L., Patel, D.M., and Green, K.J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 565–580.
- Singh, N., Guha, R., Giulianotti, M.A., Pinilla, C., Houghten, R.A., and Medina-Franco, J.L. (2009). Chemoinformatic analysis of combinatorial libraries, drugs, natural products, and molecular libraries small molecule repository. *J. Chem. Inf. Model.* **49**, 1010–1024.
- Singh, R.P., Tyagi, A.K., Zhao, J., and Agarwal, R. (2002). Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in SENCAR mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis. *Carcinogenesis* **23**, 499–510.
- Singhvi, G., Manchanda, P., Rapalli, V.K., Dubey, S.K., Gupta, G., and Dua, K. (2018). MicroRNAs as biological regulators in skin disorders. *Biomed. Pharmacother.* **108**, 996–1004.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85.
- Smith, S., Witkowski, A., and Joshi, A.K. (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog. Lipid Res.* **42**, 289–317.
- Smith, S.A., Travers, R.J., and Morrissey, J.H. (2015). How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **50**, 326–336.
- Sneader, W. (2005). *Drug Discovery: A History* (Wiley).
- Soliman, A.M., Das, S., Abd Ghafar, N., and Teoh, S.L. (2018). Role of MicroRNA in Proliferation Phase of Wound Healing. *Front. Genet.* **9**, 38.
- van Solingen, C., Araldi, E., Chamorro-Jorganes, A., Fernández-Hernando, C., and Suárez, Y. (2014). Improved repair of dermal wounds in mice lacking microRNA-155. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 1104–1112.
- Song, Z.H., Slowey, C.A., Hurst, D.P., and Reggio, P.H. (1999). The difference between the CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors at position 5.46 is crucial for the selectivity of WIN55212-2 for CB(2). *Mol. Pharmacol.* **56**, 834–840.
- Sonkoly, E., Wei, T., Janson, P.C.J., Sääf, A., Lundeberg, L., Tengvall-Linder, M., Norstedt, G., Alenius, H., Homey, B., Scheynius, A., et al. (2007). MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PloS One* **2**, e610.
- Sonnenbichler, J., Scalera, F., Sonnenbichler, I., and Weyhenmeyer, R. (1999). Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 1375–1383.
- Sorokina, M., and Steinbeck, C. (2020). Review on natural products databases: where to find data in 2020. *J. Cheminformatics* **12**, 20.
- Sorrell, J.M., and Caplan, A.I. (2004). Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* **117**, 667–675.
- Souquere, S., Mollet, S., Kress, M., Dautry, F., Pierron, G., and Weil, D. (2009). Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J. Cell Sci.* **122**, 3619–3626.

- Spjut, R.W. (1985). Limitations of a random screen: Search for new anticancer drugs in higher plants. *Econ. Bot.* 39, 266–288.
- Staels, B., and Fruchart, J.-C. (2005). Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 54, 2460–2470.
- Staub, P.O., Casu, L., and Leonti, M. (2016). Back to the roots: A quantitative survey of herbal drugs in Dioscorides' *De Materia Medica* (ex Matthioli, 1568). *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 23, 1043–1052.
- Stavast, C.J., and Erkeland, S.J. (2019). The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells* 8.
- Stramer, B., Wood, W., Galko, M.J., Redd, M.J., Jacinto, A., Parkhurst, S.M., and Martin, P. (2005). Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J. Cell Biol.* 168, 567–573.
- Stunova, A., and Vistejnova, L. (2018). Dermal fibroblasts—A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev.* 39, 137–150.
- Subbaramaiah, K., Bulic, P., Lin, Y., Dannenberg, A.J., and Pasco, D.S. (2001). Development and use of a gene promoter-based screen to identify novel inhibitors of cyclooxygenase-2 transcription. *J. Biomol. Screen.* 6, 101–110.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15545–15550.
- Suh, H.J., Cho, S.Y., Kim, E.Y., and Choi, H.-S. (2015). Blockade of lipid accumulation by silibinin in adipocytes and zebrafish. *Chem. Biol. Interact.* 227, 53–62.
- Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T., and Olivecrona, G. (2006). Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 17450–17455.
- Sullivan, R.J., Hagen, E.H., and Hammerstein, P. (2008). Revealing the paradox of drug reward in human evolution. *Proc. Biol. Sci.* 275, 1231–1241.
- Sun, G.G., Lu, Y.F., Fu, Z.Z., Cheng, Y.J., and Hu, W.N. (2014a). EMP1 inhibits nasopharyngeal cancer cell growth and metastasis through induction apoptosis and angiogenesis. *Tumor Biol.* 35, 3185–3193.
- Sun, G.-G., Wang, Y.-D., Cui, D.-W., Cheng, Y.-J., and Hu, W.-N. (2014b). Epithelial membrane protein 1 negatively regulates cell growth and metastasis in colorectal carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 20, 4001–4010.
- Sun, L., Zhou, W., Zhang, H., Guo, Q., Yang, W., Li, B., Sun, Z., Gao, S., and Cui, R. (2019). Modulation of Multiple Signaling Pathways of the Plant-Derived Natural Products in Cancer. *Front. Oncol.* 9, 1153.

- Sun, M., Wang, J., Zhou, Y., Wang, Z., Jiang, Y., and Li, M. (2016). Isotetrandrine Reduces Astrocyte Cytotoxicity in Neuromyelitis Optica by Blocking the Binding of NMO-IgG to Aquaporin 4. *Neuroimmunomodulation* 23, 98–108.
- Surai, P.F. (2015). Silymarin as a Natural Antioxidant: An Overview of the Current Evidence and Perspectives. *Antioxid. Basel Switz.* 4, 204–247.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., and Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12481–12486.
- Tanaka, K., Kim, S.E., Yano, H., Matsumoto, G., Ohuchida, R., Ishikura, Y., Araki, M., Araki, K., Park, S., Komatsu, T., et al. (2017). MiR-142 Is Required for *Staphylococcus aureus* Clearance at Skin Wound Sites via Small GTPase-Mediated Regulation of the Neutrophil Actin Cytoskeleton. *J. Invest. Dermatol.* 137, 931–940.
- Tang, Y., Wallace, M., Sanchez-Gurmaches, J., Hsiao, W.-Y., Li, H., Lee, P.L., Vernia, S., Metallo, C.M., and Guertin, D.A. (2016). Adipose tissue mTORC2 regulates ChREBP-driven de novo lipogenesis and hepatic glucose metabolism. *Nat. Commun.* 7, 11365.
- Tarling, C.A., Woods, K., Zhang, R., Brastianos, H.C., Brayer, G.D., Andersen, R.J., and Withers, S.G. (2008). The search for novel human pancreatic alpha-amylase inhibitors: high-throughput screening of terrestrial and marine natural product extracts. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 9, 433–438.
- Tasić-Kostov, M., Arsić, I., Pavlović, D., Stojanović, S., Najman, S., Naumović, S., and Tadić, V. (2019). Towards a modern approach to traditional use: in vitro and in vivo evaluation of *Alchemilla vulgaris* L. gel wound healing potential. *J. Ethnopharmacol.* 238, 111789.
- Tawada, C., Kanoh, H., Nakamura, M., Mizutani, Y., Fujisawa, T., Banno, Y., and Seishima, M. (2014). Interferon- γ Decreases Ceramides with Long-Chain Fatty Acids: Possible Involvement in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 134, 712–718.
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P.K., and Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 12, 1–12.
- Thermann, R., and Hentze, M.W. (2007). *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* 447, 875–878.
- Thornburg, C.C., Britt, J.R., Evans, J.R., Akee, R.K., Whitt, J.A., Trinh, S.K., Harris, M.J., Thompson, J.R., Ewing, T.L., Shipley, S.M., et al. (2018). NCI Program for Natural Product Discovery: A Publicly-Accessible Library of Natural Product Fractions for High-Throughput Screening. *ACS Chem. Biol.* 13, 2484–2497.
- Tian, H., Ip, L., Luo, H., Chang, D.C., and Luo, K.Q. (2007). A high throughput drug screen based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for anticancer activity of compounds from herbal medicine. *Br. J. Pharmacol.* 150, 321–334.
- Tienaho, J., Poikulainen, E., Sarjala, T., Muilu-Mäkelä, R., Santala, V., and Karp, M. (2018). A Bioscreening Technique for Ultraviolet Irradiation Protective Natural Substances. *Photochem. Photobiol.* 94, 1273–1280.

- Tiwari, P., Sahay, S., Pandey, M., Qadri, S.S.Y.H., and Gupta, K.P. (2016). Preventive effects of butyric acid, nicotinamide, calcium glucarate alone or in combination during the 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene induced mouse skin tumorigenesis via modulation of K-Ras-PI3K-AKT pathway and associated micro RNAs. *Biochimie* 121, 112–122.
- Törmä, H. (2011). Regulation of keratin expression by retinoids. *Dermatoendocrinol.* 3, 136–140.
- Tracy, L.E., Minasian, R.A., and Caterson, E.J. (2016). Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv. Wound Care* 5, 119–136.
- Treiber, T., Treiber, N., and Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 5–20.
- Truesdell, S.S., Mortensen, R.D., Seo, M., Schroeder, J.C., Lee, J.H., LeTonqueze, O., and Vasudevan, S. (2012). MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP. *Sci. Rep.* 2, 842.
- Tu, C.-L., Bikle, D.D., and Oda, Y. (1999). Effects of a Calcium Receptor Activator on the Cellular Response to Calcium in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 113, 340–345.
- Tu, C.-L., Crumrine, D.A., Man, M.-Q., Chang, W., Elalieh, H., You, M., Elias, P.M., and Bikle, D.D. (2012). Ablation of the Calcium-Sensing Receptor in Keratinocytes Impairs Epidermal Differentiation and Barrier Function. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2350–2359.
- Turek-Etienne, T.C., Lei, M., Terracciano, J.S., Langsdorf, E.F., Bryant, R.W., Hart, R.F., and Horan, A.C. (2004). Use of red-shifted dyes in a fluorescence polarization AKT kinase assay for detection of biological activity in natural product extracts. *J. Biomol. Screen.* 9, 52–61.
- Turley, E.A., Noble, P.W., and Bourguignon, L.Y.W. (2002). Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 4589–4592.
- Ursin, F., Steger, F., and Borelli, C. (2018). Katharsis of the skin: peeling applications and agents of chemical peelings in Greek medical textbooks of Graeco-Roman antiquity. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* 32, 2034–2040.
- Vacca, M., Degirolamo, C., Mariani-Costantini, R., Palasciano, G., and Moschetta, A. (2011). Lipid-sensing nuclear receptors in the pathophysiology and treatment of the metabolic syndrome. *WIREs Syst. Biol. Med.* 3, 562–587.
- Vafai, S.B., Mevers, E., Higgins, K.W., Fomina, Y., Zhang, J., Mandinova, A., Newman, D., Shaw, S.Y., Clardy, J., and Mootha, V.K. (2016). Natural Product Screening Reveals Naphthoquinone Complex I Bypass Factors. *PloS One* 11, e0162686.
- Van Den Bossche, K., Naeyaert, J.-M., and Lambert, J. (2006). The Quest for the Mechanism of Melanin Transfer: Revelations of the Pigmentation Synapse. *Traffic* 7, 769–778.
- Varshney, P., Narasimhan, A., Mittal, S., Malik, G., Sardana, K., and Saini, N. (2016). Transcriptome profiling unveils the role of cholesterol in IL-17A signaling in psoriasis. *Sci. Rep.* 6, 19295.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931–1934.

- Vedrenne, N., Coulomb, B., Danigo, A., Bonté, F., and Desmoulière, A. (2012). The complex dialogue between (myo)fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing. *Pathol. Biol. (Paris)* 60, 20–27.
- Venkatadri, R., Muni, T., Iyer, A.K.V., Yakisich, J.S., and Azad, N. (2016). Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell Death Dis.* 7, e2104–e2104.
- Verpoorte, R. (1998). Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discov. Today* 3, 232–238.
- Versiani, M.A., Diyabalanage, T., Ratnayake, R., Henrich, C.J., Bates, S.E., McMahon, J.B., and Gustafson, K.R. (2011). Flavonoids from eight tropical plant species that inhibit the multidrug resistance transporter ABCG2. *J. Nat. Prod.* 74, 262–266.
- Viticchiè, G., Lena, A.M., Cianfarani, F., Odorisio, T., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., and Candi, E. (2012). MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization. *Cell Death Dis.* 3, e435.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.-G., Ambros, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., et al. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 2257–2261.
- Wang, B., Love, T.M., Call, M.E., Doench, J.G., and Novina, C.D. (2006). Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol. Cell* 22, 553–560.
- Wang, D., Zhang, Z., O'Loughlin, E., Lee, T., Houel, S., O'Carroll, D., Tarakhovsky, A., Ahn, N.G., and Yi, R. (2012a). Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. *Genes Dev.* 26, 693–704.
- Wang, D., Zhang, Z., O'Loughlin, E., Wang, L., Fan, X., Lai, E.C., and Yi, R. (2013). MicroRNA-205 controls neonatal expansion of skin stem cells by modulating the PI(3)K pathway. *Nat. Cell Biol.* 15, 1153–1163.
- Wang, F., Fu, X.-D., Zhou, Y., and Zhang, Y. (2009a). Down-regulation of the cyclin E1 oncogene expression by microRNA-16-1 induces cell cycle arrest in human cancer cells. *BMB Rep.* 42, 725–730.
- Wang, H., Garzon, R., Sun, H., Ladner, K.J., Singh, R., Dahlman, J., Cheng, A., Hall, B.M., Qualman, S.J., Chandler, D.S., et al. (2008). NF- κ B-YY1-miR-29 Regulatory Circuitry in Skeletal Myogenesis and Rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell* 14, 369–381.
- Wang, P., Zou, F., Zhang, X., Li, H., Dulak, A., Tomko, R.J., Lazo, J.S., Wang, Z., Zhang, L., and Yu, J. (2009b). microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer Res.* 69, 8157–8165.
- Wang, S., Wan, X., and Ruan, Q. (2016). The MicroRNA-21 in Autoimmune Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Wang, S.Y., Kim, H., Kwak, G., Jo, S.D., Cho, D., Yang, Y., Kwon, I.C., Jeong, J.H., and Kim, S.H. (2020). Development of microRNA-21 mimic nanocarriers for the treatment of cutaneous wounds. *Theranostics* 10, 3240–3253.
- Wang, T., Feng, Y., Sun, H., Zhang, L., Hao, L., Shi, C., Wang, J., Li, R., Ran, X., Su, Y., et al. (2012b). miR-21 regulates skin wound healing by targeting multiple aspects of the healing process. *Am. J. Pathol.* 181, 1911–1920.

- Wang, T., Zhang, L., Shi, C., Sun, H., Wang, J., Li, R., Zou, Z., Ran, X., and Su, Y. (2012c). TGF- β -induced miR-21 negatively regulates the antiproliferative activity but has no effect on EMT of TGF- β in HaCaT cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 366–376.
- Wang, W., Yu, X., Wu, C., and Jin, H. (2017). IL-36 γ inhibits differentiation and induces inflammation of keratinocyte via Wnt signaling pathway in psoriasis. *Int. J. Med. Sci.* **14**, 1002–1007.
- Wang, Y., Zhao, X., Gao, X., Nie, X., Yang, Y., and Fan, X. (2011). Development of fluorescence imaging-based assay for screening cardioprotective compounds from medicinal plants. *Anal. Chim. Acta* **702**, 87–94.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., and Sharma, H.C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* **7**, 1306–1320.
- Watanabe, M., Natsuga, K., Nishie, W., Kobayashi, Y., Donati, G., Suzuki, S., Fujimura, Y., Tsukiyama, T., Ujiie, H., Shinkuma, S., et al. (2017). Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis. *ELife* **6**, e26635.
- Weber, L., Kirsch, E., Müller, P., and Krieg, T. (1984). Collagen Type Distribution and Macromolecular Organization of Connective Tissue in Different Layers of Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* **82**, 156–160.
- Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T.V., Cross, J.R., and Thompson, C.B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* **324**, 1076–1080.
- Wen, Z., Dumas, T.E., Schrieber, S.J., Hawke, R.L., Fried, M.W., and Smith, P.C. (2008). Pharmacokinetics and Metabolic Profile of Free, Conjugated, and Total Silymarin Flavonolignans in Human Plasma after Oral Administration of Milk Thistle Extract. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 65–72.
- Wertz, P.W., Swartzendruber, D.C., Abraham, W., Madison, K.C., and Downing, D.T. (1987). Essential fatty acids and epidermal integrity. *Arch. Dermatol.* **123**, 1381–1384.
- West, H.C., and Bennett, C.L. (2018). Redefining the Role of Langerhans Cells As Immune Regulators within the Skin. *Front. Immunol.* **8**, 1941.
- Westfall, M.D., Mays, D.J., Sniezek, J.C., and Pietsenpol, J.A. (2003). The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2264–2276.
- Wilson, B.A.P., Thornburg, C.C., Henrich, C.J., Grkovic, T., and O’Keefe, B.R. (2020). Creating and screening natural product libraries. *Nat Prod Rep* **37**, 893–918.
- Wölflle, U., Haarhaus, B., Seiwert, J., Cawelius, A., Schwabe, K., Quirin, K.-W., and Schempp, C.M. (2017). The Herbal Bitter Drug *Gentiana lutea* Modulates Lipid Synthesis in Human Keratinocytes In Vitro and In Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* **18**.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.-P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., and Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* **2**, 21–33.
- Wright, C.J., Edmondson, S.R., Fortune, D.W., Varigos, G., and Werther, G.A. (1997). Expression of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) in the psoriatic lesion. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 452–456.

- Wu, B., Gao, J., and Wang, M. (2005). Development of a complex scintillation proximity assay for high-throughput screening of PPARGgamma modulators. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 339–344.
- Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., Wang, Q., Xu, Y., Li, M., Li, X., et al. (2020a). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm. Sin. B* 10, 766–788.
- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4034–4039.
- Wu, Y., Zhang, K., Liu, R., Zhang, H., Chen, D., Yu, S., Chen, W., Wan, S., Zhang, Y., Jia, Z., et al. (2020b). MicroRNA-21-3p accelerates diabetic wound healing in mice by downregulating SPRY1. *Aging* 12, 15436–15445.
- Xiao, K., Luo, X., Wang, X., and Gao, Z. (2017). MicroRNA-185 regulates transforming growth factor- β 1 and collagen-1 in hypertrophic scar fibroblasts. *Mol. Med. Rep.* 15, 1489–1496.
- Xiao, Z., Morris-Natschke, S.L., and Lee, K.-H. (2016). Strategies for the Optimization of Natural Leads to Anticancer Drugs or Drug Candidates. *Med. Res. Rev.* 36, 32–91.
- Xie, C., Shi, K., Zhang, X., Zhao, J., and Yu, J. (2016). MiR-1908 promotes scar formation post-burn wound healing by suppressing Ski-mediated inflammation and fibroblast proliferation. *Cell Tissue Res.* 366, 371–380.
- Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 19, 156–172.
- Xu, N., Brodin, P., Wei, T., Meisgen, F., Eidsmo, L., Nagy, N., Kemeny, L., Ståhle, M., Sonkoly, E., and Pivarcsi, A. (2011). MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1521–1529.
- Xu, W., San Lucas, A., Wang, Z., and Liu, Y. (2014). Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics* 15 Suppl 7, S4.
- Xu, Z.-L., Gao, H., Ou-Yang, K.-Q., Cai, S.-X., and Hu, Y.-H. (2004). Establishment of a cell-based assay to screen regulators for Klotho gene promoter. *Acta Pharmacol. Sin.* 25, 1165–1170.
- Yamanishi, H., Soma, T., Kishimoto, J., Hibino, T., and Ishida-Yamamoto, A. (2019). Marked Changes in Lamellar Granule and Trans-Golgi Network Structure Occur during Epidermal Keratinocyte Differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 139, 352–359.
- Yan, H., Song, K., and Zhang, G. (2017). MicroRNA-17-3p promotes keratinocyte cells growth and metastasis via targeting MYOT and regulating Notch1/NF- κ B pathways. *Pharm.* 72, 543–549.
- Yang, J.-S., and Lai, E.C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol. Cell* 43, 892–903.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., et al. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398, 714–718.

- Yang, C.H., Yue, J., Pfeffer, S.R., Fan, M., Paulus, E., Hosni-Ahmed, A., Sims, M., Qayyum, S., Davidoff, A.M., Handorf, C.R., et al. (2014). MicroRNA-21 promotes glioblastoma tumorigenesis by down-regulating insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP3). *J. Biol. Chem.* *289*, 25079–25087.
- Yang, H.-S., Cho, M.-H., Zakowicz, H., Hegamyer, G., Sonenberg, N., and Colburn, N.H. (2004). A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor Pdc4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 3894–3906.
- Yang, J., Fang, Z., Wu, J., Yin, X., Fang, Y., Zhao, F., Zhu, S., and Li, Y. (2016a). Construction and application of a lung cancer stem cell model: antitumor drug screening and molecular mechanism of the inhibitory effects of sanguinarine. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *37*, 13871–13883.
- Yang, J.-S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K.D., Jeffrey, K.L., Chandwani, R., Papapetrou, E.P., Sadelain, M., O’Carroll, D., and Lai, E.C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 15163–15168.
- Yang, R.-H., Qi, S.-H., Shu, B., Ruan, S.-B., Lin, Z.-P., Lin, Y., Shen, R., Zhang, F.-G., Chen, X.-D., and Xie, J.-L. (2016b). Epidermal stem cells (ESCs) accelerate diabetic wound healing via the Notch signalling pathway. *Biosci. Rep.* *36*.
- Yang, X., Wang, J., Guo, S.-L., Fan, K.-J., Li, J., Wang, Y.-L., Teng, Y., and Yang, X. (2011). miR-21 promotes keratinocyte migration and re-epithelialization during wound healing. *Int. J. Biol. Sci.* *7*, 685–690.
- Yang, Y., Cheng, H., Yan, H., Wang, P.-Z., Rong, R., Zhang, Y.-Y., Zhang, C.-B., Du, R.-K., and Rong, L.-J. (2017). A cell-based high-throughput protocol to screen entry inhibitors of highly pathogenic viruses with Traditional Chinese Medicines. *J. Med. Virol.* *89*, 908–916.
- Yao, Q., Cao, S., Li, C., Mengesha, A., Kong, B., and Wei, M. (2011). Micro-RNA-21 regulates TGF- β -induced myofibroblast differentiation by targeting PDCD4 in tumor-stroma interaction. *Int. J. Cancer* *128*, 1783–1792.
- Yasuda, M., Wilson, D.R., Fugmann, S.D., and Moaddel, R. (2011). Synthesis and characterization of SIRT6 protein coated magnetic beads: identification of a novel inhibitor of SIRT6 deacetylase from medicinal plant extracts. *Anal. Chem.* *83*, 7400–7407.
- Ye, J., Kang, Y., Sun, X., Ni, P., Wu, M., and Lu, S. (2017). MicroRNA-155 Inhibition Promoted Wound Healing in Diabetic Rats. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* *16*, 74–84.
- Yekta, S., Shih, I.-H., and Bartel, D.P. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* *304*, 594–596.
- Yeo, S.-Y., and Chitnis, A.B. (2007). Jagged-mediated Notch signaling maintains proliferating neural progenitors and regulates cell diversity in the ventral spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 5913–5918.
- Yeom, K.-H., Lee, Y., Han, J., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006). Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4622–4629.
- Yi, R., and Fuchs, E. (2010). MicroRNA-mediated control in the skin. *Cell Death Differ.* *17*, 229–235.

- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.
- Yi, R., O’Carroll, D., Pasolli, H.A., Zhang, Z., Dietrich, F.S., Tarakhovsky, A., and Fuchs, E. (2006). Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat. Genet.* *38*, 356–362.
- Yi, R., Poy, M.N., Stoffel, M., and Fuchs, E. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing ‘stemness.’ *Nature* *452*, 225–229.
- Yi, R., Pasolli, H.A., Landthaler, M., Hafner, M., Ojo, T., Sheridan, R., Sander, C., O’Carroll, D., Stoffel, M., Tuschl, T., et al. (2009). DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 498–502.
- Yonezawa, N., Nishida, E., Iida, K., Yahara, I., and Sakai, H. (1990). Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* *265*, 8382–8386.
- Yong, Y., Pan, L., Ren, Y., Fatima, N., Ahmed, S., Chang, L.C., Zhang, X., Kinghorn, A.D., Swanson, S.M., and Carcache de Blanco, E.J. (2014). Assay development for the discovery of semaphorin 3B inducing agents from natural product sources. *Fitoterapia* *98*, 184–191.
- Yu, J., Ryan, D.G., Getsios, S., Oliveira-Fernandes, M., Fatima, A., and Lavker, R.M. (2008). MicroRNA-184 antagonizes microRNA-205 to maintain SHIP2 levels in epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19300–19305.
- Yu, J., Peng, H., Ruan, Q., Fatima, A., Getsios, S., and Lavker, R.M. (2010). MicroRNA-205 promotes keratinocyte migration via the lipid phosphatase SHIP2. *FASEB J.* *24*, 3950–3959.
- Zakowicz, H., Yang, H.-S., Stark, C., Wlodawer, A., Laronde-Leblanc, N., and Colburn, N.H. (2005). Mutational analysis of the DEAD-box RNA helicase eIF4AII characterizes its interaction with transformation suppressor Pdc4 and eIF4GI. *RNA N. Y. N* *11*, 261–274.
- Zhang, null, Chung, null, and Oldenburg, null (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* *4*, 67–73.
- Zhang, B., Wang, X., Deng, J., Zheng, H., Liu, W., Chen, S., Tian, J., and Wang, F. (2019a). p53-dependent upregulation of miR-16-2 by sanguinarine induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* *459*, 50–58.
- Zhang, C., Wang, R., Liu, Z., Bunker, E., Lee, S., Giuntini, M., Chapnick, D., and Liu, X. (2019b). The plant triterpenoid celastrol blocks PINK1-dependent mitophagy by disrupting PINK1’s association with the mitochondrial protein TOM20. *J. Biol. Chem.* *294*, 7472–7487.
- Zhang, D., Han, Y., and Xu, L. (2016a). Upregulation of miR-124 by physcion 8-O- β -glucopyranoside inhibits proliferation and invasion of malignant melanoma cells via repressing RLIP76. *Biomed. Pharmacother.* *84*, 166–176.
- Zhang, J., Bowling, J.J., Smithson, D., Clark, J., Jacob, M.R., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Connelly, M., Samoylenko, V., Ibrahim, M.A., et al. (2016b). Diversity-oriented natural product platform identifies plant constituents targeting *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* *15*, 270.

- Zhang, J., Zhou, W., Liu, Y., Liu, T., Li, C., and Wang, L. (2018). Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5'UTR of RUNX3. *Oncol. Lett.* 15, 7215–7220.
- Zhang, L., Stokes, N., Polak, L., and Fuchs, E. (2011). Specific microRNAs are preferentially expressed by skin stem cells to balance self-renewal and early lineage commitment. *Cell Stem Cell* 8, 294–308.
- Zhang, L., Peng, Y., Uray, I.P., Shen, J., Wang, L., Peng, X., Brown, P.H., Tu, W., and Peng, G. (2017). Natural product β -thujaplicin inhibits homologous recombination repair and sensitizes cancer cells to radiation therapy. *DNA Repair* 60, 89–101.
- Zhang, Y., Zhang, M., Zhong, M., Suo, Q., and Lv, K. (2013). Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. *Int. J. Mol. Med.* 31, 797–802.
- Zhang, Y., Yu, B., Sui, Y., Gao, X., Yang, H., and Ma, T. (2014). Identification of resveratrol oligomers as inhibitors of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by high-throughput screening of natural products from chinese medicinal plants. *PloS One* 9, e94302.
- Zhang, Y.-L., Zhang, H.-Q., Liu, X.-Y., Hua, S.-N., Zhou, L.-B., Yu, J., and Tan, X.-H. (2007). Identification of human dopamine receptors agonists from Chinese herbs. *Acta Pharmacol. Sin.* 28, 132–139.
- Zhao, C., Yin, Q., and Li, S. (2010). A high-throughput screening system for G-protein-coupled receptors using β -lactamase enzyme complementation technology. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 1618–1624.
- Zhao, F., Lang, H., Wang, Z., Zhang, T., Zhang, D., Wang, R., Lin, X., Liu, X., Shi, P., and Pang, X. (2019). Human Novel MicroRNA Seq-915_x4024 in Keratinocytes Contributes to Skin Regeneration by Suppressing Scar Formation. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 14, 410–423.
- Zheng, X., Linke, S., Dias, J.M., Zheng, X., Gradin, K., Wallis, T.P., Hamilton, B.R., Gustafsson, M., Ruas, J.L., Wilkins, S., et al. (2008). Interaction with factor inhibiting HIF-1 defines an additional mode of cross-coupling between the Notch and hypoxia signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3368–3373.
- Zhong, X., Chung, A.C.K., Chen, H.-Y., Meng, X.-M., and Lan, H.Y. (2011). Smad3-Mediated Upregulation of miR-21 Promotes Renal Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 1668–1681.
- Zhou, B., Zuo, X.X., Li, Y.S., Gao, S.M., Dai, X.D., Zhu, H.L., and Luo, H. (2017). Integration of microRNA and mRNA expression profiles in the skin of systemic sclerosis patients. *Sci. Rep.* 7, 42899.
- Zhou, J.-M., Xu, Z.-L., Li, N., Zhao, Y.-W., Wang, Z.-Z., and Xiao, W. (2016). Identification of cardioprotective agents from traditional Chinese medicine against oxidative damage. *Mol. Med. Rep.* 14, 77–88.
- Zhou, Z., Shu, B., Xu, Y., Liu, J., Wang, P., Chen, L., Zhao, J., Liu, X., Qi, S., Xiong, K., et al. (2018). microRNA-203 Modulates Wound Healing and Scar Formation via Suppressing Hes1 Expression in Epidermal Stem Cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 49, 2333–2347.
- Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., and Mo, Y.-Y. (2008). MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res.* 18, 350–359.

- Zhu, Y., Li, Z., Wang, Y., Li, L., Wang, D., Zhang, W., Liu, L., Jiang, H., Yang, J., and Cheng, J. (2016). Overexpression of miR-29b reduces collagen biosynthesis by inhibiting heat shock protein 47 during skin wound healing. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 178, 38-53.e6.
- Zhuo, R., Liu, H., Liu, N., and Wang, Y. (2016). Ligand Fishing: A Remarkable Strategy for Discovering Bioactive Compounds from Complex Mixture of Natural Products. *Molecules* 21.
- Zonoubi, A., Visaga Perumal, D., Prasad, P., Chandy, V., Mafibaniyadi, Z., and Zonoubi, A. (2019). MILK THISTLE-MORPHOLOGY, CHEMISTRY AND PHARMACOLOGICAL ACTION. 7, 14–40.
- Zouboulis, C.C. (2004). The human skin as a hormone target and an endocrine gland. *Horm. Athens Greece* 3, 9—26.

Criblage bioluminescent microARN spécifique d'une librairie d'extraits naturels de plantes pour des applications dans le remodelage cutané.

Résumé :

Les microARNs jouent un rôle essentiel dans la morphogénèse et l'homéostasie cutanée. Cette classe d'ARN non codant contrôle plusieurs voies de signalisation en régulant l'expression de réseaux entiers de gènes cibles. Ils sont donc considérés comme des cibles biologiques de choix pour les stratégies de criblage de composés bioactifs. Au laboratoire, nous avons conçu une sonde d'imagerie bioluminescente inductible par les microARNs, dénommée RILES pour « *RNAi-Inducible Luciferase Expression System* » qui se prête particulièrement bien au criblage cellulaire de bibliothèques de composés synthétiques. Au cours de ce doctorat, nous avons placé le système RILES sous contrôle de l'axe de régulation TGF- β 1/microARN-21 choisi pour son rôle central dans la ré-épithélialisation cutanée. Le criblage d'une extractothèque de 37 extraits bruts de plantes nous a permis d'identifier trois extraits bruts de plantes, dont celui du Chardon Marie (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) qui a fait l'objet d'études mécanistiques et fonctionnelles poussées. Nous avons montré que l'effet de l'extrait de Chardon-Marie sur le microARN-21 est dépendant d'un complexe contenant six flavonolignanes, appelé silymarine (SM). Des études d'immunoprécipitation de la protéine Argonaute 2 couplée à la RT-qPCR ont permis de révéler un mécanisme de régulation original du microARN-21 par cet extrait. Le séquençage à haut débit du transcriptome (RNA-seq) des kératinocytes en réponse au traitement par le TGF- β 1 et la SM a permis de mettre en évidence trois signatures d'expression génique majeures associées à la différenciation kératinocytaire, au cycle cellulaire et de façon inattendue au métabolisme des lipides. Nous avons montré que la SM bloque le cycle cellulaire en phase G0/G1, inhibe la différenciation des kératinocytes via l'inhibition de l'expression de Notch3 et active la synthèse des lipides en inhibant la phosphorylation d'AMPK et en augmentant l'activité transcriptionnelle de PPAR γ . Par ailleurs, la SM ralentit la migration cellulaire en perturbant la transition épithélio-mésenchymateuse et inhibe les réponses inflammatoires en bloquant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. Du fait de ces propriétés biologiques, pour certaines nouvelles, nous avons évalué l'effet thérapeutique de la SM contre le développement du psoriasis en plaques induit par l'imiquimod chez la souris. Nos résultats indiquent que la SM pourrait représenter une alternative prometteuse « naturelle » aux traitements pharmacologiques actuels pour la prise en charge de cette pathologie.

Mots clés : microARNs, RILES, criblage, kératinocytes, plantes

microRNA-based bioluminescent screening of a natural plant extracts library for cutaneous remodeling applications

Abstract :

MicroRNAs play essential roles in skin morphogenesis and homeostasis. This class of non coding RNA mediates cross-talk between various signaling pathways through repression of multiple targeted genes. Therefore microRNAs are considered as relevant biological targets for screening of bioactive compounds. We previously developed a microRNA monitoring system called RILES, standing for "*RNAi-Inducible Luciferase Expression System*" that was found particularly well suited for cell-based screening of synthetic compound libraries. During this Ph.D project, we placed the RILES system under the control of the TGF- β 1/microRNA-21 axis of regulation because of its pivotal role in the re-epithelialization process. Screening of 37 plant crude extracts enabled us to identify three plant extracts, for which the milk thistle (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) extract was selected for further in-depth functional and mechanistic investigation. We showed that the activity of milk thistle extract on microRNA-21 expression is dependent on a mixture of six flavonolignans, called silymarin (SM). Argonaute 2 immunoprecipitation (RIP) coupled with RT-qPCR analysis unveiled an original mechanism of action of SM on microRNA-21 regulation. RNA next generation sequencing (RNA-seq) analysis of keratinocytes treated with TGF- β 1 plus SM revealed three main transcriptomic signatures associated with keratinocytes differentiation, cell cycle and surprisingly lipid metabolism. We showed that SM blocks cell cycle progression in G0/G1 phase, inhibits keratinocytes differentiation through repression of Notch3 and stimulates lipid synthesis via inhibition of AMPK phosphorylation and activation of PPAR γ transcriptional activity. Besides, SM reduces keratinocytes migration by interfering with epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits inflammatory responses by suppressing NF- κ B transcriptional activity. Because of these novel biological properties, we evaluated the therapeutic efficacy of SM in IMQ-induced-psoriasis-like mouse model. Our results indicate that SM may represent a natural alternative treatment for psoriasis management.

Keywords : microRNAs, RILES, screening, keratinocytes, plants