

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE
Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

Centre de Biophysique Moléculaire (CBM, UPR4301 CNRS)

THÈSE présentée par : **Nadira CHETTOUH HAMMAS**

Soutenue le : 20 septembre 2022 – -----

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

Discipline/ Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Influence du taux d'oxygénation et du photovieillissement sur l'activité antioxydante des cellules de la peau

THÈSE dirigée par :
Dr GRILLON Catherine

Chargée de recherche, CNRS UPR 4301, Orléans

RAPPORTEURS :
Dr SIMON Michel
Dr REZVANI Hamid Reza

Directeur de recherche, INSERM, U1056, Toulouse
Directeur de recherche, INSERM, U1035, Bordeaux

JURY :
Pr DESTANDAU Emilie
Dr SIMON Michel
Dr REZVANI Hamid Reza
Dr CROLA DA SILVA Claire
Dr GRILLON Catherine

Professeur, Université d'Orléans, Présidente du jury
Directeur de recherche, INSERM, U1056, Toulouse
Directeur de recherche, INSERM, U1035, Bordeaux
Ingénieur de recherche, INSERM, U1060, Lyon
Chargée de recherche, CNRS UPR 4301, Orléans

« Une belle aventure cette thèse ! »

Remerciements

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie sincèrement Mme Emilie DESTANDAU et Mme Claire CROLA DA SILVA, Mr Michel SIMON et Mr Hamid Reza REZVANI d'avoir pris le temps de lire et d'examiner ce manuscrit de thèse.

Chaque passage de la rédaction de ce manuscrit m'a rappelé toutes les personnes qui y ont contribué et qui m'ont aidé de manière directe ou indirecte durant ces années.

À ma directrice de thèse Catherine GRILLON, je n'ai plus de mots pour exprimer ma reconnaissance pour toutes ces années. Merci de m'avoir accueillie au sein de ton équipe dès mon Master, et de me faire découvrir la physioxie, ce projet qui me passionne de plus en plus. J'ai appris avec toi le goût et l'enthousiasme pour la recherche. C'est un honneur et une chance pour moi d'avoir effectué cette thèse avec toi, et d'avoir pu bénéficier de ton expertise. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi à titre professionnel et humain. Merci d'avoir été patiente avec moi, particulièrement en rédigeant cette thèse et d'être si compréhensive dans ma vie de jeune maman. Je te souhaite plein de beaux projets pour l'avenir et beaucoup de succès.

Je souhaite remercier la direction du CBM, Eva JAKAB TOTH et Matthieu REFREGIERS, de m'avoir accueillie dans ce laboratoire. Je remercie également les membres du CBM que j'ai côtoyés et avec qui j'ai pu travailler, en particulier David pour son aide sur la plateforme P@CYFIC.

Je tiens à exprimer mes plus chaleureux remerciements à l'ensemble de l'équipe CGSML avec qui j'ai partagé toutes ces années. Merci votre aide, votre soutien et pour l'ambiance. Merci à Fabienne, pour m'avoir formée à la culture cellulaire et à la qPCR, ainsi que pour ta disponibilité pour mes fréquentes questions et la relecture de ce manuscrit. Merci à Giovanni pour ton encadrement durant mon stage et merci de nous montrer tous les avantages d'être « italien ». Merci à Loïck de m'avoir initiée aux épidermes reconstruits et aux immuno-F. Merci à Amandine de m'avoir aidée sur la partie UV, à Séverine, pour sa bonne humeur, à Martine pour ses recettes délicieuses. Merci à Nadège de partager mon bureau et surtout pour tes conseils d'hygiène et sécurité durant ma grossesse. Je remercie aussi, mes collègues et amis !! À Chayma pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble ; et voilà, tu t'envoies pour de nouveaux défis, qui j'espère vont être à la hauteur de tes espérances. Merci à Morgan, ça me

fait toujours plaisir de discuter et de partager avec toi les photos de nos petites. À Khadija « le reste des restes » je te souhaite beaucoup de succès dans tes futurs projets. À Zineb pour nous avoir fait découvrir le tajine tunisien. Merci à tous les membres de notre équipe, Julie, Fahima, Ana, Cyril, Marine, Lauren, Wanyin, Yossra. Merci à nos voisins de bureau, Chloé, Stéphane, Fabienne, Lucile. Merci à l'ensemble des doctorants Isabelle, Daouda, Anton. Merci à mes élèves d'Édifice, et à tous les stagiaires de l'équipe.

Merci à tous mes amis, à Mimi pour tes ondes positives au bon moment, j'espère qu'on va se voir bientôt. À Yasmine, Badro, Meriem, Lydi, Tani, Sonia, Warda, Audrey, je vous remercie pour tous vos soutiens et de m'avoir supporté.

Je remercie tous les membres de ma famille et de ma belle-famille. Je remercie également de tout cœur mes grands-parents de leur amour inconditionnel. Merci pour tous vos messages et vos encouragements. Je remercie particulièrement mes sœurs et frères, je suis heureuse de vous avoir à mes côtés, Salim, toi aussi un jour tu seras « docteur Salim » comme tu me l'as promis, mais sache que je suis déjà très fière de toi mon ange.

Merci à mes parents, sans vous je ne serais pas arrivée jusqu'ici aujourd'hui. Papa, tu es le meilleur au monde, merci d'avoir cru en moi dans toutes les circonstances. Il m'est difficile de trouver les mots justes pour écrire ce paragraphe. À toi Maman, tu as été la meilleure du monde et grâce à toi je suis actuellement une femme combattante et ambitieuse. J'aurais aimé partager ce moment avec toi, mais je suis sûre que, de là où tu es, tu es fière de nous. Merci de m'avoir transmis toutes tes valeurs, la bienveillance et la politesse. Merci simplement d'être notre maman, je t'aime.

Merci à toi, Cherif, pour ton amour, pour ta confiance et ton respect vis-à-vis de mes choix et mes ambitions. Merci de m'avoir épaulée et surtout supportée durant toutes ces longues années. Merci d'avoir pris le rôle de maman tout au long de cette rédaction, je te promets que je le reprends bientôt.

Enfin je remercie ma fille, Tessa, mon bout de chou, tout le monde me dit : Quoi ? Une thèse ! Un bébé ! Mais ouiii, tu es là et tu es mon adrénaline, ma source d'énergie incroyable. Merci pour ta présence dans notre vie, tu es notre bonheur. Je t'aime mam.

Table des matières

Remerciements	ii
Table des matières	iv
Liste des figures et des tableaux	viii
Abréviations	x
Introduction générale	1
Introduction	3
1. Les rôles et la structure de la peau	3
1.1. Les rôles de la peau	3
1.1.1. Le rôle protecteur	3
1.1.2. Le rôle métabolique	3
1.1.3. Le rôle sensoriel	4
1.1.4. Le rôle dans le maintien de l'hydratation	4
1.1.5. Le rôle d'échange des gaz	4
1.1.6. Le rôle social	4
1.2. La structure de la peau	3
1.2.1. L'épiderme	4
1.2.1.1. La couche basale	6
1.2.1.2. La couche épineuse	6
1.2.1.3. La couche granuleuse	6
1.2.1.4. La couche cornée	7
1.2.1.5. Les autres types cellulaires de l'épiderme	7
1.2.2. La jonction dermo-épidermique	8
1.2.3. Le derme	10
1.2.4. L'hypoderme	11
2. Le microenvironnement de la peau	12
2.1. Le pH cutané	12
2.2. L'hydratation de la peau	13
2.3. La température de la peau	15
2.4. L'oxygénation de la peau et la physioxie	15
2.4.1. Les nomenclatures liées au taux d'oxygène	15
2.4.1.1. La normoxie	15
2.4.1.2. L'hypoxie	16
2.4.1.3. La physioxie	16

2.4.2.	La physioxie des organes du corps humain	16
2.4.3.	La physioxie cutanée	17
3.	Le vieillissement de la peau	19
3.1.	Les généralités concernant le vieillissement cutané	19
3.2.	Le vieillissement intrinsèque	19
3.2.1.	Les manifestations du vieillissement intrinsèque	20
3.2.1.1.	Les atteintes de l'épiderme	20
3.2.1.2.	Les atteintes de la jonction dermo-épidermique	20
3.2.1.3.	Les atteintes du derme	20
3.3.	Le vieillissement extrinsèque	21
3.3.1.	Les principaux facteurs de l'exposome	22
3.3.1.1.	Les rayonnements solaires (UV)	22
3.3.1.2.	La pénétrance des UV dans les tissus cutanés	23
3.3.1.3.	Les effets directs des UV sur la peau	24
1)	Les dommages à l'ADN	24
2)	Les dommages à la mitochondrie	24
3)	Les dommages aux protéines	25
3.3.1.4.	La pollution de l'air	25
3.3.1.5.	Le tabagisme	26
3.3.1.6.	La nutrition	26
3.3.1.7.	Les autres facteurs : le stress, le manque de sommeil, les variations de température	26
3.3.2.	Les manifestations du photovieillissement de la peau	27
3.3.2.1.	Les atteintes de l'épiderme	27
3.3.2.2.	Les altérations de la jonction dermo-épidermique	27
3.3.2.3.	Les atteintes du derme	28
3.3.2.4.	Les atteintes de la microcirculation	28
3.4.	L'influence du vieillissement sur les propriétés fonctionnelles de la peau	30
3.5.	Les principaux mécanismes impliqués dans le vieillissement	31
3.5.1.	Le raccourcissement des télomères	31
3.5.2.	La sénescence cellulaire	32
3.5.2.1.	La sénescence des cellules cutanées dans l'épiderme	33
3.5.2.2.	La sénescence des cellules cutanées dans le derme	33
3.5.2.3.	Les biomarqueurs des cellules sénescents	34
4.	Les ROS et les défenses antioxydantes dans la peau	35
4.1.	Les différents ROS	35
4.1.1.	L'oxygène singulet	35
4.1.2.	L'anion superoxyde	36
4.1.3.	Le peroxyde d'hydrogène	36
4.1.4.	Le radical hydroxyle	37

4.1.5.	Les autres ROS	37
4.2.	Les principales sources de ROS	37
4.2.1.	Les ROS endogènes	37
4.2.1.1.	La production des ROS par les complexes de la chaîne respiratoire	37
4.2.1.2.	La production des ROS au niveau du cytosol et de la membrane plasmique	38
4.2.1.3.	La production des ROS au niveau des peroxysomes et de réticulum endoplasmique	39
4.2.2.	Les ROS exogènes	39
4.2.2.1.	La production des ROS par les UV	39
4.2.2.2.	La production des ROS par les polluants ou autres facteurs extérieurs	40
4.3.	Les principales cibles des ROS	41
4.3.1.	L'ADN	41
4.3.2.	Les lipides	41
4.3.3.	Les protéines	41
4.4.	Les voies de signalisation activées par les ROS	42
4.4.1.	La voie MAPK et la synthèse des MMPs	42
4.4.2.	L'axe Keap1-Nrf2, régulateur de la signalisation dans le stress oxydant	43
4.5.	Les systèmes antioxydants et leurs mécanismes d'action	44
4.5.1.	La distribution générale des antioxydants dans la peau	45
4.5.2.	Les enzymes antioxydantes dans la peau	46
4.5.2.1.	La catalase	46
4.5.2.2.	Les superoxyde dismutases	48
1)	La superoxyde dismutase 1 (SOD1)	48
2)	La superoxyde dismutase 2 (SOD2)	49
3)	La superoxyde dismutase 3 (SOD3)	50
4.5.2.3.	Les glutathion peroxydases	51
5.	Les mécanismes cutanés modulés par le taux d'oxygénation	53
5.1.	La physioxie et la voie HIF1	53
5.2.	La physioxie et la consommation de l'oxygène par les cellules cutanées	55
5.3.	La physioxie et le métabolisme cellulaire	56
5.4.	La prolifération et la sénescence en physioxie	58
5.5.	La différenciation en physioxie	58
5.6.	La migration en physioxie	59
5.7.	La modulation du stress oxydant en physioxie	59
5.7.1.	L'influence sur le taux de ROS	59
5.7.2.	La régulation de la voie Nrf2 en physioxie	60
6.	Les différents modèles d'étude de la peau	62
6.1.	Les modèles cutanés <i>in vivo</i> (chez l'animal)	62
6.2.	Les modèles <i>in vitro/ex vivo</i>	63
6.2.1.	Le modèle 2D	63

6.2.2.	Le modèle de peau reconstruite en 3D	64
6.2.3.	Le modèle des explants de peau	67
6.3.	Les avantages et inconvénients des différents modèles	67
6.4.	Les modèles de peau et le taux d'oxygène	68
Objectifs		70
Résultats		73
1.	Partie 1	73
1.1.	Résumé	73
1.2.	Article 1 : Improvement of antioxidant defenses in keratinocytes maintained in physioxia: comparison of 2D and 3D models	73
2.	Partie 2	100
2.1.	Résumé	100
2.2.	Article 2: Physioxia induces changes in the antioxidant response of keratinocytes in 2D or 3D models upon UV irradiation	100
Discussion et perspectives		130
1.	Les modèles 2D versus les modèles 3D	131
1.1.	Le développement et caractérisation des modèles en physioxie	131
1.1.1.	Le modèle HaCat <i>versus</i> le modèle NHEK	131
1.1.2.	Les modèles des RHE	133
1.2.	Est-ce que les kératinocytes dans les différents modèles <i>in vitro</i> de la peau expriment les enzymes antioxydantes de la même manière ?	134
2.	Quel est l'effet du taux d'oxygène sur la production de ROS ?	135
3.	Quel est le rôle du taux d'oxygène sur le système antioxydant ?	137
3.1.	La régulation entre la transcription et la traduction	137
3.1.1.	La régulation au niveau de la traduction	138
3.1.2.	La différence dans la stabilité des protéines	138
3.2.	La régulation entre la traduction et l'activité	139
4.	Quel est l'effet du taux d'O₂ sur le photovieillissement ?	140
4.1.	La mise au point des modèles d'irradiation UVs	140
4.2.	La production des ROS après irradiation UV	141
4.3.	L'effet du taux d'oxygène et de l'irradiation UV sur l'expression des enzymes antioxydantes	141
4.3.1.	L'impact de la teneur en oxygène sur la modulation, par les UV, des enzymes piégeant H ₂ O ₂	142
4.3.2.	L'impact de la teneur en oxygène sur la modulation, par les UV, des enzymes piégeant O ₂ [•]	143
5.	Quelles sont les voies de signalisation potentiellement impliquées ?	144
Conclusion		146

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : La structure générale de la peau humaine.	3
Figure 2 : Les différentes couches de l'épiderme et, à droite, une coupe histologique d'un épiderme humain avec la coloration hématoxyline éosine.	4
Figure 3 : La schématisation du processus de différenciation des kératinocytes de la couche basale vers la couche cornée, avec les modifications structurales, biochimiques et biologiques associées.	5
Figure 4 : La structure et les interactions moléculaires de la jonction dermo- épidermique.	9
Figure 5 : La structure des dermes papillaire et réticulaire avec les composantes de la matrice extracellulaire.	11
Figure 6 : Le gradient de pH dans la partie supérieure de l'épiderme et l'activation des enzymes de la différenciation et de la desquamation de la couche cornée.	13
Figure 7 : Le gradient d'hydratation à travers les différentes couches de la peau.	14
Figure 8 : Les gradients d'oxygène dans la peau.	18
Figure 9 : Les différents facteurs de l'exposome impliqués dans le photovieillissement.	21
Figure 10 : Une photo illustrant le contraste entre l'abdomen, protégé du soleil, et le dos de la main, fréquemment exposé au soleil, chez une femme de 91 ans.	22
Figure 11 : La capacité de pénétration des rayonnements ultraviolets à travers les couches de la peau.	23
Figure 12 : Le remodelage des constituants de la matrice extracellulaire dans les vieillissements intrinsèque et extrinsèque par comparaison à la peau d'un jeune.	29
Figure 13 : Le vieillissement unilatéral.	31
Figure 14 : La cascade de formation des ROS au niveau cellulaire.	36
Figure 15 : La voie de signalisation de Nrf2-keap1.	44
Figure 16 : La distribution des antioxydants dans les couches de la peau.	45
Figure 17 : L'expression protéique de la SOD1 dans un explant de peau.	49
Figure 18 : L'analyse en composantes principales des métabolites des kératinocytes et des fibroblastes primaires. Des cellules cultivées dans les conditions suivantes : 0,5% O ₂ pendant 24 et 72 heures, 2% O ₂ pendant 24 h et 72h, ou bien 20 % d'O ₂	57
Figure 19 : La régulation différente des gènes ciblés par Nrf2 dans les cellules endothéliales humaines cultivées en physioxie (Physiological O ₂) et en normoxie (Hyperoxia).	60
Figure 20 : Une coupe histologique avec une coloration hématoxyline et éosine de la peau humaine et de peaux de porc, de rat et de souris. Abréviations EP, épiderme ; DM, derme ; BV, vaisseau sanguin ; SB, glande sébacée, HF, follicule pileux ; et M, muscle.	62
Figure 21 : La schématisation d'un protocole de préparation des épidermes reconstruits, des coupes histologiques de RHE avec une coupe de peau qui montre une différenciation similaire.	66

Tableau 1 : Les valeurs de la pression partielle en oxygène, pO_2, dans l'air, entre les poumons et le cœur (sang veineux et artériel), dans les différents tissus humains exprimées en mm Hg et en pourcentage d'oxygène. .	17
Tableau 2: Les espèces réactives de l'oxygène et leurs propriétés	35
Tableau 3 : Les différentes épaisseurs de la peau et de ses différentes couches entre l'homme et les autres espèces.....	63
Tableau 4 : Les avantages et limites des différents modèles d'études de la peau.....	68
Tableau 5 : L'effet de l'oxygène sur la prolifération des cellules de la peau in vitro (kératinocytes, fibroblastes et mélanocytes).	132
Tableau 6 : L'effet de l'oxygène sur la production des ROS dans les cellules de la peau in vitro (kératinocytes, fibroblastes et mélanocytes, adipocytes).	136

Abréviations

A

ADNmt : ADN mitochondrial
ARE : Antioxidant Response Element
AhR : Récepteur d'Hydrocarbures Aromatiques

B

BaCH1 : BTB Domain And CNC Homolog 1

C

CAT : Catalase
CPD : cyclobutanes

G

GAG : GlycosAminoGlycanes
GSH : Glutathion
GPXs : Glutathion peroxydases
GLUT1 : Transporteur de glucose 1

H

HIF : Hypoxia Inducible Factor
HRE : Hypoxia Responsive Element

J

JDE : Jonction Dermo-Epidermique

K

Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein

M

MEC : Matrice ExtraCellulaire
MMPs : Métalloprotéinases

N

Notch : Neurogenic locus notch homologue protein
Numb : protein numb homologue
NOX : NAD(P)H oxydase
NMF : facteur d'hydratation naturel
Nrf2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like

O

OCR : Oxygen Consumption Rate

P

PHD2 : HIF prolyl hydroxylase domain-2
pVHL : Von-Hippel Lindau
PDK1 : Pyruvate déshydrogénase lipoamide kinase
pO₂ : Pression partielle en oxygène

R

ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RHE : Reconstructed Human Epidermis

S

SAPS : Senescence-Associated Secretory phenotype

sMAF : Protein small MAF
SODs : Superoxydes dismutases

T

TSLP : Thymic Stromal Lymphopoietin
TIMPs : Inhibitor des metalloproteases

U

UV : Rayonnement Ultraviolet

V

VEGF : vascular endothelial growth factor
2D : modèles bidimensionnels
3D : modèles tridimensionnels

Introduction générale

Depuis des siècles, prendre soin de sa peau fait partie des rituels et des plaisirs esthétiques de l'être humain et la restauration d'une peau saine reste la préoccupation première en cas de dommages ou de pathologies. Le tissu cutané est bien plus qu'une simple enveloppe : c'est un moyen de communication avec le monde extérieur. Ce tissu reflète l'identité de l'individu (couleur et âge), ses émotions et son état de santé. En effet, l'architecture de la peau est d'une complexité considérable mais reste d'une très grande organisation. Elle se compose d'un épiderme avec plusieurs strates de cellules représentant la première barrière en surface, d'un derme riche en matrice extracellulaire, et l'ensemble repose sur l'hypoderme qui constitue une couche de soutien.

Comme tous les autres organes du corps humain, la peau est également sujette à un vieillissement potentiellement accéléré par l'environnement, comme par exemple l'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV). Ces derniers sont capables d'induire un stress oxydant, mécanisme qui est responsable de l'altération indirecte des tissus cutanés. Ce vieillissement prématuré est assez visible et entraîne un risque élevé de développement de cancers cutanés. De fait, les enjeux majeurs de la dermocosmétique sont d'une part de développer des technologies et des produits dits « miracles » destinés à améliorer le bien-être de la peau, d'autre part, de mettre au point des principes actifs afin de prévenir et traiter le vieillissement ou les désordres cutanés.

Les travaux de recherche en biologie cutanée œuvrent sans cesse au perfectionnement de ces produits en offrant une meilleure compréhension du fonctionnement de ce tissu mais aussi en recréant, d'un point de vue physiologique, des modèles *in vitro* mimant la peau. De tels modèles rendraient plus aisés les tests d'innocuité et d'efficacité. De plus, il n'y aurait pas de recours aux tests expérimentaux sur des volontaires ou des animaux de laboratoire, un des défis actuels de la recherche en biologie. Cependant, en raison de la complexité des tissus cutanés, il est encore difficile de concevoir des modèles d'étude reproduisant à la fois les aspects physiologiques et fonctionnels de la peau. Pour répondre à ces problématiques, plusieurs modèles *in vitro* de peau ont été développés. Ces modèles représentent soit des monocouches cellulaires de la peau (2D), soit des modèles tridimensionnels (3D) constitués de l'épiderme, ou bien plus complexes incluant aussi le derme, éventuellement l'hypoderme. Il est néanmoins important de rappeler que, à l'heure actuelle, l'oxygénation physiologique (physioxie) n'est pas

prise en compte dans ces modèles. L'oxygène est une molécule fondamentale de l'homéostasie cutanée qui joue un rôle dans le stress oxydant. Cependant, les études sur le stress oxydant sont généralement conduites dans les conditions de l'oxygénation de l'air ambiant (normoxie), une condition non représentative des conditions physiologiques retrouvées *in vivo*.

De ce fait, les objectifs de mes travaux de thèse sont, dans un premier temps, d'élaborer des modèles de peau *in vitro* dans des conditions de culture reproduisant l'oxygénation physiologique. Puis, dans un second temps, de caractériser ces modèles, en particulier, en étudiant les enzymes antioxydantes de la peau, impliquées dans la physiopathologie du vieillissement cutané accéléré, en conditions basales mais aussi dans un modèle de photovieillissement.

Ainsi, ce mémoire de thèse est structuré en différentes sections. L'introduction fait l'objet de cinq parties. La première est consacrée aux multiples fonctions de la peau ainsi qu'à son architecture. Une seconde illustre l'oxygénation cutanée. Une troisième aborde le vieillissement prématuré, ainsi que le stress oxydant. Une quatrième évoque le rôle de l'oxygène dans la modulation de ce stress oxydant. Enfin, la cinquième partie traite des dernières avancées dans le développement des modèles d'étude de la peau.

Les résultats sont présentés en deux grands chapitres. Le premier porte sur la caractérisation de nos modèles, aussi bien des cultures en monocouche (une lignée de kératinocytes et des cellules primaires) que des modèles tridimensionnels en physioxie, et sur la modulation du système antioxydant dans ces derniers, du niveau transcriptionnel jusqu'à la modulation de son activité. Le deuxième est consacré à l'utilisation de ces modèles dans l'étude du photovieillissement, avec une étude comparative des défenses antioxydantes en physioxie et en normoxie.

Ces résultats sont discutés dans une dernière partie qui tente d'apporter de nouvelles pistes et perspectives, afin de mieux comprendre la modulation des antioxydants en physioxie mais aussi dans le photovieillissement, en abordant certains systèmes de régulation.

Introduction

Introduction

1. Les rôles et la structure de la peau

La peau est une véritable interface entre les organes du corps et le monde extérieur. Elle constitue l'organe le plus large et le plus lourd de notre organisme. Selon la taille et la masse du corps, le poids de la peau est compris entre 3,5 et 10 kg pour une superficie de 1,5 à 2 m² (Hasleton 1972). Plus qu'une simple enveloppe, la peau est dotée de plusieurs fonctions vitales. C'est une véritable barrière contre les agressions extérieures, qui joue un rôle dans le métabolisme, la perception sensorielle, l'hydratation, etc.

1.1. Les rôles de la peau

1.1.1. Le rôle protecteur

La peau est la première défense du corps humain contre les agressions extérieures. Elle nous protège des rayonnements ultraviolets, des agents chimiques, des micro-organismes et amortit les chocs. En parallèle, elle assure l'intégrité de ses constituants. L'épiderme, qui est une barrière physique, est l'acteur principal de cette fonction grâce à son mur de kératinocytes, son *stratum corneum*, riche en lipides et en fibres de kératines. La mélanine protège la peau, en particulier l'ADN, des dommages causés par les UV et empêche ainsi le développement de cancers. La peau possède également une barrière chimique avec les peptides antimicrobiens, tels que les défensines et les cathélicidines (Schröder and Harder 2006), qui empêchent l'invasion par des micro-organismes pathogènes. La flore cutanée présente sur la surface de la peau intervient aussi dans la protection du corps.

1.1.2. Le rôle métabolique

La peau est le site de production de plusieurs substances, comme la mélanine et les kératines au niveau de l'épiderme, mais c'est également notre source naturelle de vitamine D qui est synthétisée sous l'action des UV. La vitamine D joue un rôle majeur dans la fixation du calcium par le système osseux (Holick 2007). Elle intervient encore dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes cutanés (Reichrath 2007). Par ailleurs, cette vitamine est un modulateur du système immunitaire. Dans plusieurs désordres cutanés il a été observé une diminution de son taux sérique, en particulier chez les sujets atteints de psoriasis (Barrea,

Savanelli et al. 2017), de vitiligo (Varikasuvu, Aloori et al. 2021), ou encore dans des maladies plus graves comme les mélanomes (Bikle 2012).

1.1.3. Le rôle sensoriel

La peau constitue par ailleurs le principal organe sensoriel de notre corps. Elle participe à l'homéostasie de l'organisme en captant les différentes modifications survenant dans l'environnement. La peau est riche en terminaisons nerveuses spécifiques qui sont disséminées à travers toutes ses couches : les thermorécepteurs qui captent les variations de la température, les mécanorécepteurs (les corpuscules de Pacini et Meissner) qui sont activés par des stimuli comme le toucher, la pression et les vibrations (Delmas, Hao et al. 2011). La peau est aussi un organe nociceptif qui est sensible à différentes douleurs comme les piqûres, les pincements et les brûlures. Elle est également riche en photorécepteurs qui détectent les rayons lumineux (Dubin and Patapoutian 2010).

1.1.4. Le rôle dans le maintien de l'hydratation

L'une des fonctions essentielles de la peau est l'hydrohoméostasie. La peau saine est riche en eau ce qui contribue à l'apparence d'une peau normale, non squameuse. La peau a la capacité à retenir l'eau grâce à ses biomolécules, tel que l'acide hyaluronique, et la barrière hydrolipidique de la couche cornée (Verdier-Sévrain and Bonté 2007) (Papakonstantinou, Roth et al. 2012). L'ensemble empêche l'évaporation de l'eau en surface. Une perte en eau accrue entraîne une accumulation des cornéocytes en surface, qui se traduit par une peau sèche et squameuse.

1.1.5. Le rôle d'échange des gaz

La peau joue un rôle dans l'échange des gaz avec l'extérieur (respiration cutanée). Les couches superficielles absorbent directement l'oxygène atmosphérique et rejettent le dioxyde de carbone indépendamment de la circulation sanguine, par une diffusion passive des gaz.

1.1.6. Le rôle social

La peau joue un rôle dans notre apparence et dans notre image. En raison de ses caractéristiques physiques, elle donne une idée de notre âge, genre, origine ethnique, etc. Elle intervient en outre dans la communication par laquelle nous exprimons toutes les émotions avec le monde extérieur. C'est aussi un organe qui reflète notre état général et certaines pathologies du corps. C'est pourquoi le maintien de l'apparence de la peau est très important.

1.2. La structure de la peau

La peau est un organe complexe dérivé de deux feuillets embryonnaires : l'ectoderme (les couches superficielles) et le mésoderme (les couches profondes). Sur le plan structurel, elle est constituée de trois couches superposées, l'épiderme lié au derme par la jonction dermo-épidermique et l'hypoderme, la couche la plus profonde (Figure 1).

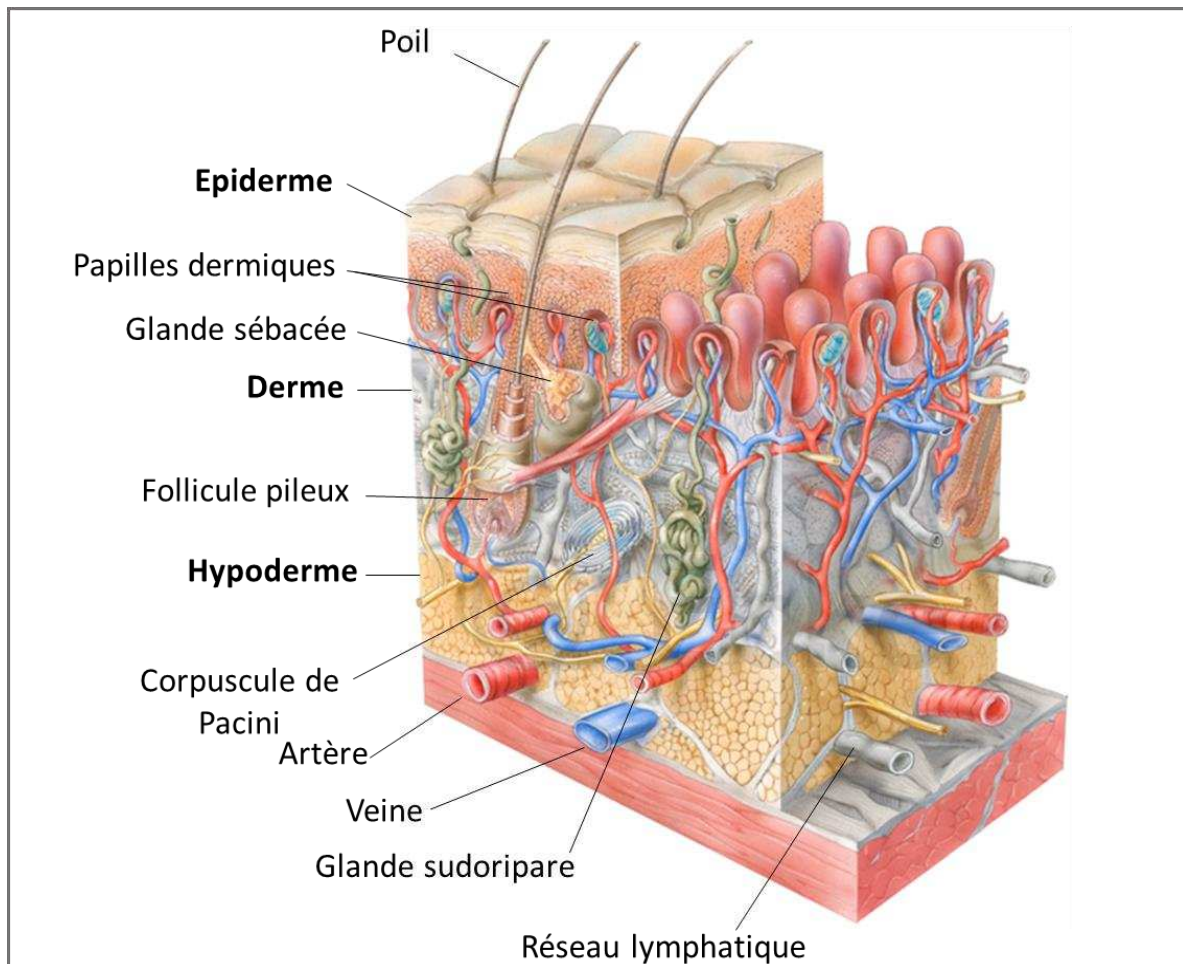


Figure 1 : La structure générale de la peau humaine.

Adapté de (www.julius-ecke.de)

Elle est composée de nombreux types cellulaires et des analyses protéomiques ont démontré qu'il existe 10701 protéines différentes dans cet organe, notamment les collagènes (I, II, III, VI, XII et XIV), les protéines de la matrice extracellulaire (élastine, décorine, etc.), les kératines de type I et II et les protéines cellulaires (actine, myosine, tubuline, laminine, etc.) (Dyring-Andersen et al., 2020)(Mikesh, Aramadhaka et al. 2013).

1.2.1. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. Son développement commence dès la vie utérine, où il se transforme d'un simple tissu épithélial à un épiderme stratifié et différencié. Son épaisseur est d'environ 100 μm mais varie de 40 μm à 6 mm selon sa localisation anatomique. C'est un épithélium stratifié, kératinisé et constamment renouvelé, toutes les trois semaines environ (Figure 2). Il constitue la première barrière contre les agressions physicochimiques. Il héberge également des millions de microorganismes, le microbiote cutané, qui intervient aussi dans l'homéostasie de la peau.

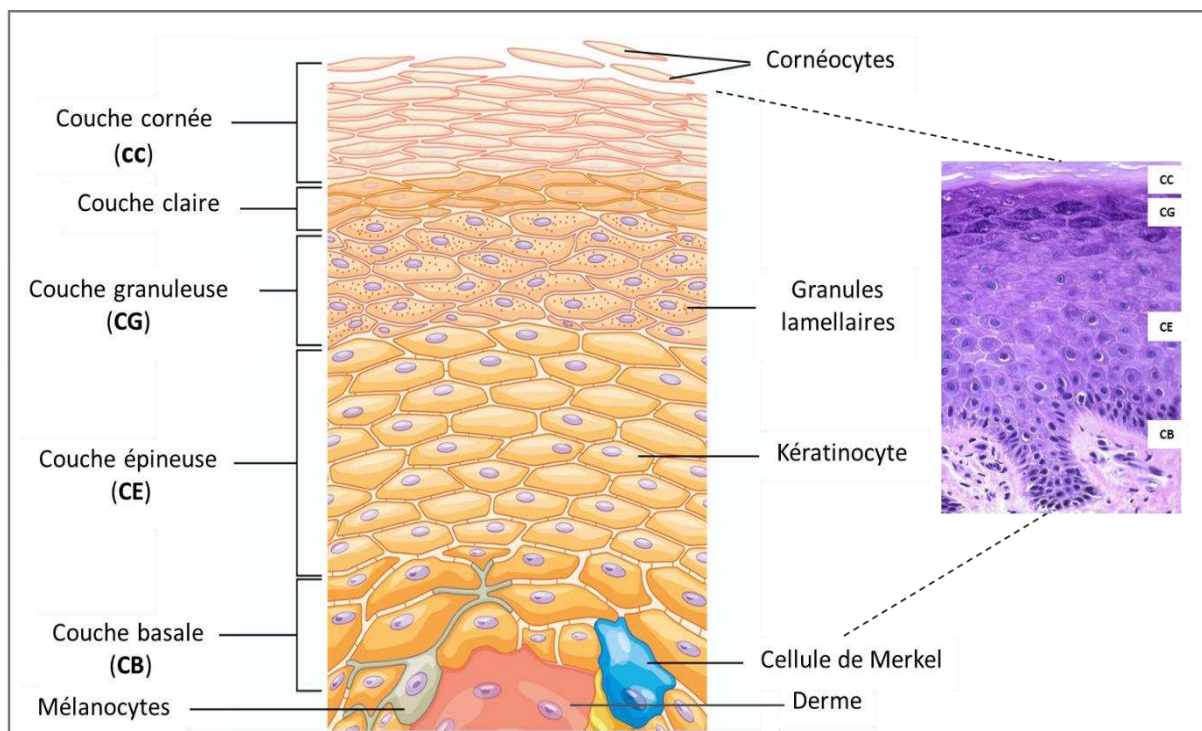


Figure 2 : Les différentes couches de l'épiderme et, à droite, une coupe histologique d'un épiderme humain avec la coloration hématoxyline éosine.

Adapté de (Khavkin and Ellis 2011)

L'épiderme est constitué de 95 % de cellules appelées « kératinocytes » du fait de leur synthèse de kératines, des protéines fibreuses qui confèrent à l'épiderme sa structure et sa rigidité. On distingue deux familles de kératines, les acides et les basiques (type I et type II). Celles-ci sont exprimées différemment selon les couches de l'épiderme. Par exemple : les K5 et K14 sont plus exprimées dans les cellules prolifératives, alors que K1 et K10 sont exprimées dans les cellules différenciées (Figure 3). Donc, la structure en brique des kératinocytes est due à un cytosquelette constitué de filaments intermédiaires de kératines. Au cours de la différenciation de l'épiderme, les filaments de kératines s'associent à la filaggrine formant ainsi le

cytosquelette des cornéocytes (Kim and Lim 2021). La filaggrine est synthétisée sous forme de profilaggrine et stockée dans les grains de kératohyaline des kératinocytes de la couche granuleuse. Des mutations de perte de fonction dans la filaggrine sont très courantes, touchant jusqu'à 10 % de la population, et constituent le principal facteur de risque génétique d'eczéma atopique (Rawlings 2014). Outre leurs propriétés structurales, les kératines peuvent également jouer un rôle direct dans la signalisation cellulaire, dans les réponses au stress et à l'apoptose (Russell, Ross et al. 2010). Les kératines sont ainsi des biomarqueurs de l'hyperprolifération épidermique. Comme dans la cicatrisation et le psoriasis, l'expression des kératines supra basales K6/K16/K17 est induite rapidement (au bout de 6 heures après la blessure). Ces kératines interviennent comme support pour faciliter la réépithélialisation de la plaie (Moll, Divo et al. 2008).

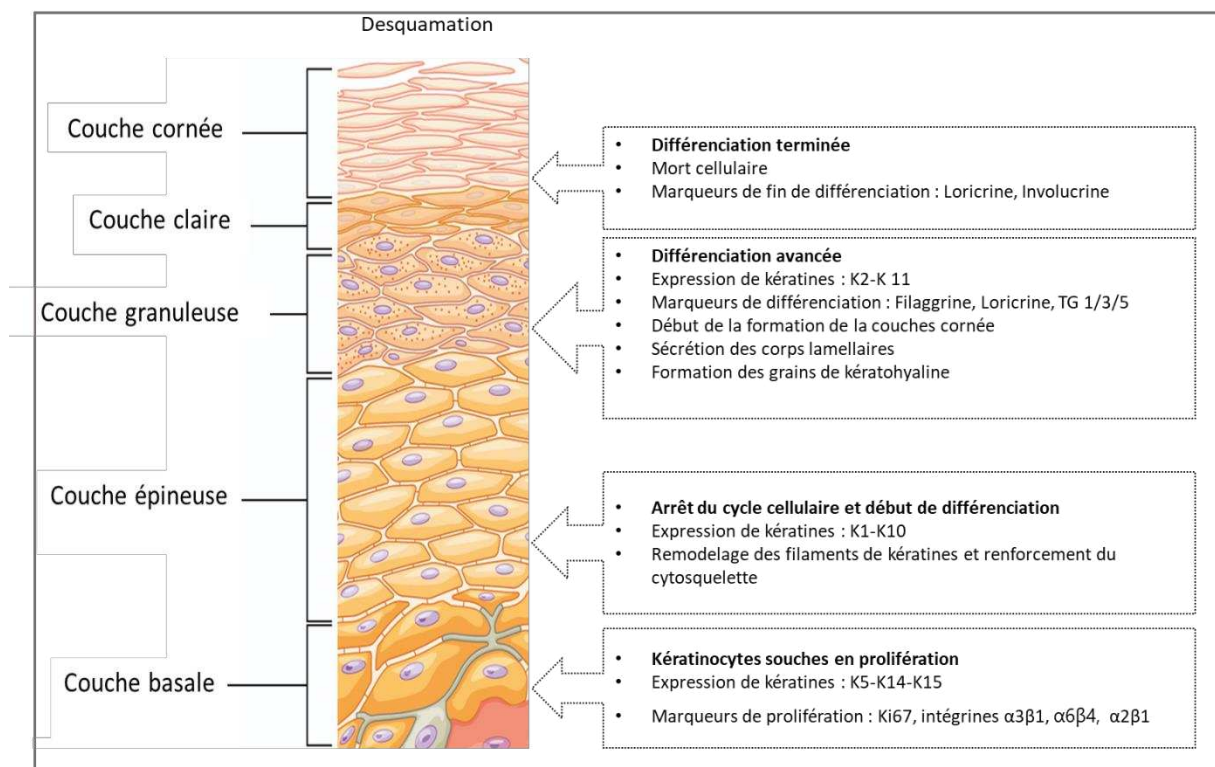


Figure 3 : La schématisation du processus de différenciation des kératinocytes de la couche basale vers la couche cornée, avec les modifications structurales, biochimiques et biologiques associées.

Adapté de (Gutowska-Owsiak, Podobas et al. 2020)

Les kératinocytes prolifèrent dans l'assise basale puis se différencient progressivement pour former les différentes couches de l'épiderme en migrant depuis la profondeur vers la surface où les kératinocytes finissent ensuite par se détacher (Figure 3).

1.2.1.1. La couche basale

C'est la couche la plus profonde et qui est composée d'un seul compartiment de kératinocytes souches ayant une forme cubique. La régénération permanente de l'épiderme est assurée par le fort pouvoir prolifératif de ces cellules. Les kératinocytes souches expriment en particulier les intégrines $\alpha 6 \beta 4$ qui permettent la liaison avec la jonction dermo-épidermique, et qui sont également impliquées dans leur différenciation. En effet, les kératinocytes de la couche basale se divisent de deux manières : soit une division symétrique (horizontale) qui permet l'auto-renouvellement du compartiment des cellules souches, soit une division asymétrique (perpendiculaire) pour obtenir une des cellules filles qui entre par la suite en différenciation dans les couches supérieures (Lechler and Fuchs 2005). Le devenir des cellules filles de ces deux types de divisions est régulé par la voie de signalisation Notch (neurogenic locus notch homologue protein). En effet, la présence du récepteur Notch ne permet pas l'expression de l'intégrine $\beta 1$ (Lechler and Fuchs 2005). Par conséquent, les kératinocytes exprimant Notch se détachent de la lame basale et entrent en différenciation. Alors que, dans les cellules en prolifération, la présence du facteur Numb (protein numb homologue) inhibe la voie de signalisation Notch (Iannolo, Sciuto et al. 2016). Ce facteur intervient dans la régulation du cycle cellulaire et il est considéré aussi comme un biomarqueur de ces cellules souches, comme le Ki67, ou encore la protéine p63 (un homologue de p53), nécessaire à l'auto-renouvellement des cellules souches (Figure 3). Au cours de la différenciation, l'activation de la voie Notch induit un remaniement dans l'expression des filaments de kératines. Les cellules perdent leurs kératines K5 et K14 qui seront remplacées par K1 et K10, dans la couche épineuse.

1.2.1.2. La couche épineuse

La couche épineuse est constituée de 5 à 6 strates de kératinocytes. Comme son nom l'indique ces cellules ont un aspect épineux, suite à la liaison de filaments intermédiaires de kératines 1 et 10 aux desmosomes, des liaisons fortes entre ces cellules qui confèrent une certaine rigidité mécanique. Ces cellules sont plus aplaties et plus étendues que dans la couche basale. Elles vont migrer vers la couche granuleuse grâce à la poussée des cellules sous-jacentes. C'est également au niveau de ces assises cellulaires supérieures de la couche épineuse que va débuter la synthèse de l'involucrine, et de la profilaggrine, les précurseurs de l'enveloppe cornée.

1.2.1.3. La couche granuleuse

Elle comporte une à trois assises de kératinocytes aplaties et fusiformes disposés parallèlement par rapport à la surface cutanée. Elle constitue la dernière couche nucléée de l'épiderme. Certains précurseurs protéiques de l'enveloppe cornée, l'involucrine et la lorcrine, y débutent

leur accumulation. De même, les agrégats de la profilaggrine vont s'accumuler et former les grains de kératohyaline. Au niveau de cette couche, on trouve également des corps lamellaires riches en phospholipides, en céramides et en stérols ainsi que des multiples enzymes. Ces corps lamellaires interviennent dans la formation du gradient de calcium indispensable pour la différenciation des différentes couches de l'épiderme. Plus les cellules vont avancer dans la différenciation, plus la profilaggrine va se dégrader en filaggrine, s'agréant avec d'autres composés par l'action des transglutaminases, formant ainsi un cytosquelette plus dense et rigide.

1.2.1.4. La couche cornée

C'est la couche la plus externe et visible de l'épiderme. Son rôle important est la protection des couches profondes. Elle est composée de 5 à 20 assises de kératinocytes anucléés et très aplatis qu'on appelle les cornéocytes. A ce stade, les kératinocytes arrêtent de se différencier et ils perdent leurs organites cytoplasmiques. Ils sont dits « morts » mais restent biochimiquement actifs. Les cornéocytes sont soudées par des cornéodesmosomes qui baignent dans une matrice dense et riche en lipides libérés par les corps lamellaires. Cette enveloppe joue un rôle majeur dans le maintien de l'hydratation et dans la protection de la peau. Au final, les protéases qui sont activées à leur tour par le pH acide de ces dernières couches vont détruire les cornéodesmosomes détachant les cornéocytes et engendrant ainsi la desquamation (Matsui and Amagai 2015).

1.2.1.5. Les autres types cellulaires de l'épiderme

Dans la couche basale de l'épiderme sont également présents des mélanocytes qui produisent la mélanine dans des mélanosomes qui seront transportés vers les kératinocytes basaux voisins. Chaque mélanocyte fournit de la mélanine à environ 30 à 40 kératinocytes. Dans les kératinocytes, la mélanine répartie autour du noyau assure la photoprotection de l'ADN contre les rayons ultraviolets (Jablonski and Chaplin 2013). Le nombre de mélanocytes varie peu d'un phototype à l'autre. La couleur de la peau est déterminée par le nombre et par la taille des mélanosomes ainsi que par les taux des deux types de mélanine, eumélanine noire et phaeomélanine orange.

Entre les kératinocytes de la couche épineuse se trouvent aussi des cellules de Langherans appartenant au système immunitaire. Ces cellules possèdent une activité macrophagique et donc migrent régulièrement vers les ganglions lymphatiques drainants, afin de présenter des antigènes aux cellules immunitaires (Merad, Ginhoux et al. 2008). Leur nombre augmente lors

de désordres cutanés, notamment dans les réactions allergiques comme la dermatite atopique sous l'action des cytokines TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) secrétées par les kératinocytes (Nakajima, Miyachi et al. 2011). A l'inverse l'exposition chronique au soleil réduit le nombre de cellules de Langerhans, ce qui favorise le développement de carcinomes cutanés chez les personnes âgées (Xu, Qi et al. 2012).

La couche basale de l'épiderme est également pourvue de cellules de Merkel, associées à des terminaisons nerveuses, qui ont une fonction de mécanorécepteurs et jouent un rôle dans la sensibilité.

Enfin, l'épiderme n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin. Les cellules qui le composent sont alimentées par diffusion des nutriments depuis le derme (Stücker, Struk et al. 2002).

1.2.2. La jonction dermo- épidermique

La jonction dermo-épidermique (JDE) appelée aussi la lame basale, comme son nom l'indique, assure l'adhérence entre l'épiderme et le derme. La JDE mesure environ 100 nm d'épaisseur. Cette structure a une forme « ondulée » qui suit les papilles dermiques et cette forme assure des échanges continus et optimaux entre le derme et l'épiderme. En revanche, avec l'âge, cette structure s'aplatit, réduisant ainsi les échanges entre les deux compartiments. Cette jonction est dépourvue de cellules mais est composée d'un réseau complexe de glycoprotéines et de protéoglycanes. Les principaux qui interviennent dans cet assemblage sont : les laminines et le collagène de type IV qui forment chacun un réseau, les deux étant reliés entre-deux par le nidogène et le perlecan (Van Agtmael and Bruckner-Tuderman 2010).

En microscopie électronique, cette membrane comprend trois régions, de l'épiderme vers le derme : le pôle basal des kératinocytes épidermiques, la *lamina lucida*, qui est claire aux électrons et la *lamina densa*, qui est dense aux électrons.

Les membranes plasmiques des kératinocytes sont reliées aux structures sous-jacentes par des hémidesmosomes, des structures multiprotéiques incluant l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ et qui sont liées aux filaments de kératines cytoplasmiques dans les kératinocytes. Les hémidesmosomes assurent l'ancrage des kératinocytes à la lame basale et la formation d'un réseau intracellulaire. A la surface de ces cellules basales, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ se lie aux laminines 332, formant ainsi les filaments d'ancrages qui traversent la *lamina lucida* et s'insèrent dans la *lamina densa*. Ces derniers se lient ensuite aux fibres d'ancrage qui sont constituées de collagène de type VII,

permettant la connexion de la *lamina densa* avec les régions supérieures du derme papillaire (Figure 4).

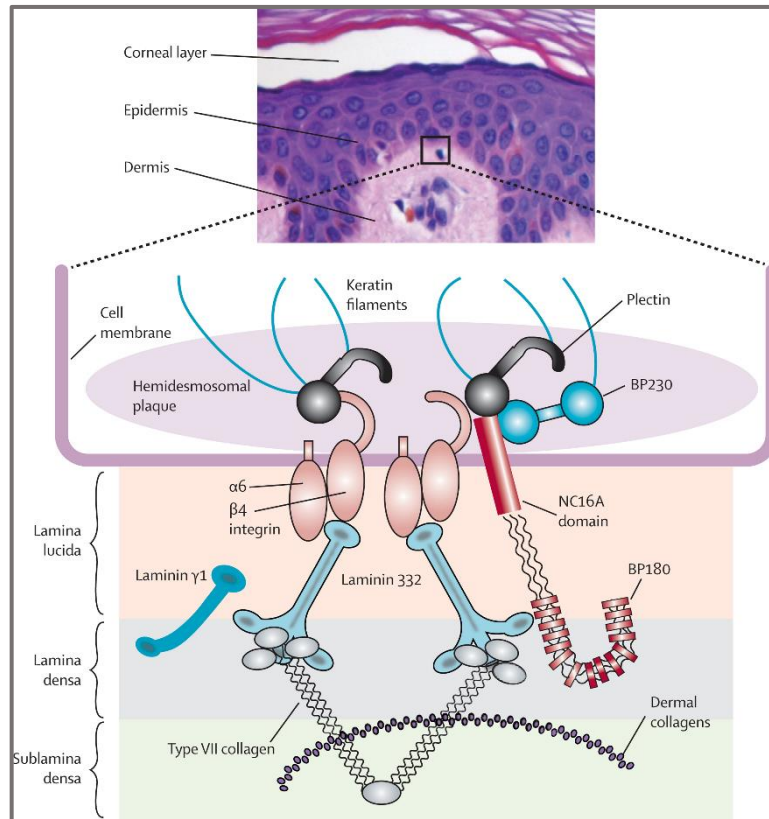


Figure 4 : La structure et les interactions moléculaires de la jonction dermo- épidermique.

Adapté de (Schmidt and Zillikens 2013)

Cette jonction ultra-organisée assure surtout de multiples fonctions :

- remodelage physiologique de l'épiderme et maintien de son intégrité,
- organisation spatiale des kératinocytes de la lame basale,
- contrôle de la prolifération de la niche des cellules souches épidermiques (Li, Pouliot et al. 2004),
- adhérence mécanique entre l'épiderme et le derme,
- contrôle du trafic cellulaire et de la diffusion des molécules dans les deux sens,
- aide à la réépidermisation au cours de la cicatrisation cutanée (Van Agtmael and Bruckner-Tuderman 2010, Fisher and Rittié 2018).

1.2.3. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif, élastique et souple, qui se trouve juste en dessous de l'épiderme. Son épaisseur varie selon les régions du corps et selon le sexe. Elle est d'environ 0,6 mm au niveau des paupières, tandis qu'elle atteint environ 3 mm sur les paumes des mains et les plantes de pieds. En outre, ce tissu est plus épais chez les hommes que chez les femmes (Arda, Göksüğü et al. 2014). Le derme se subdivise en deux sous-couches :

1. **Le derme papillaire**, qui est une fine couche de derme située juste sous l'épiderme et qui englobe les papilles dermiques. Il héberge les cellules de ce tissu conjonctif, les fibroblastes, qui sont réparties d'une façon aléatoire, et il est constitué de collagène de types I et III mélangés à un réseau de fibres fines et courtes d'élastine, oxytalanes et de fibrillines 1 et 2. Ces fibres sont finement organisées d'une façon perpendiculaire à l'épiderme, afin d'assurer une forte adhérence (Wang, Xu et al. 2015). Cette couche est bien pourvue de vaisseaux sanguins de la microvascularisation et de terminaisons nerveuses qui sont sensibles aux stimuli tactiles issues de légères déformations de l'épiderme. Ainsi cette partie du derme forme un tissu nourrissant pour l'épiderme (Naylor, Watson et al. 2011).
2. **Le derme réticulaire**, qui est en contact avec l'hypoderme. C'est la partie la plus épaisse et dense, qui représente 80% de l'épaisseur du derme. Cette zone réticulaire est riche en grosses fibres de collagène I et en fibres d'élastine mature. Enfin, c'est le derme réticulaire qui confère à la peau ses propriétés de résistance et d'élasticité.

Les principales cellules du derme sont les fibroblastes qui sont des cellules mésenchymateuses fusiformes produisant tous les composés de la matrice extracellulaire (MEC) viscoélastique et assurant leur renouvellement. Le derme héberge également différents types de cellules, y compris les mastocytes, les lymphocytes, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Toutes ces cellules baignent dans la MEC.

La MEC est une matrice très riche en protéines fibreuses (Figure 5), dont les collagènes de type I et III qui représentent 70 % du poids du derme à l'état sec. Se trouvent également des fibres élastiques qui représentent 1 à 4 % du poids du derme (Ricard-Blum and Ruggiero 2005) (Jor, Parker et al. 2013). Les fibres d'élastine sont moins rigides que celles de collagène, mais elles offrent à la peau des propriétés d'étirement. Dans ce mélange, nous trouvons aussi les

protéoglycanes, tels que le perlécan, le syndécan ou la décorine, les glycoprotéines de structure dont les laminines et la fibronectine et les glycosaminoglycanes (GAG) dont le principal, l'acide hyaluronique, est comme un lubrifiant biologique jouant un rôle important dans la rétention de l'eau. Le derme contient également des vaisseaux sanguins, des canaux lymphatiques et des nerfs sensoriels comprenant des terminaisons nerveuses libres et des corpuscules terminaux, dont les corpuscules de Pacini et ceux de Meissner. Bien que le derme ne subisse pas de renouvellement continu (au contraire de l'épiderme), sa MEC est remodelée en réponse à un stimulus, notamment dans la cicatrisation, ou désorganisée au cours du processus de vieillissement (Naylor, Watson et al. 2011).

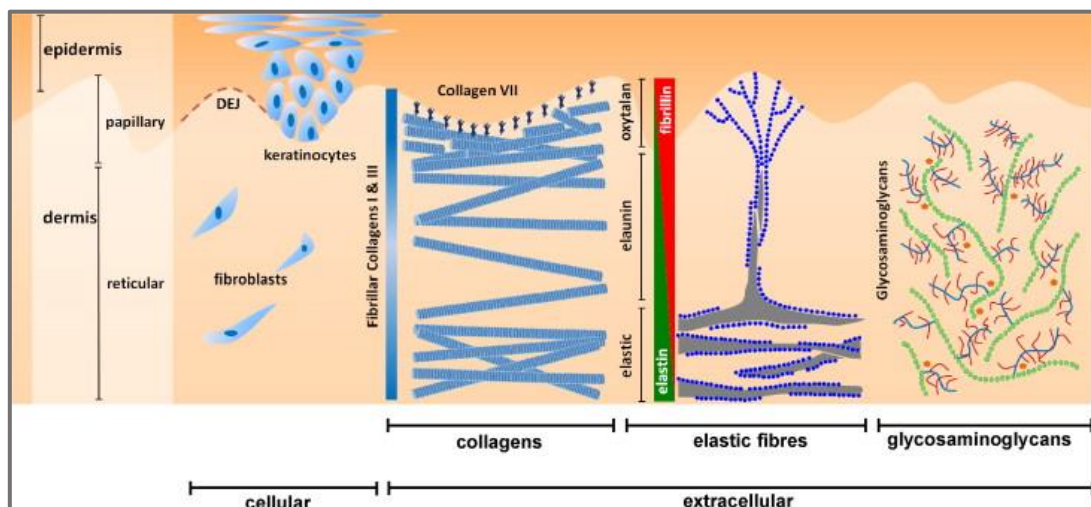


Figure 5 : La structure des dermes papillaire et réticulaire avec les composantes de la matrice extracellulaire.

Adapté de (Naylor, Watson et al. 2011)

1.2.4. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau. Il est principalement constitué de cellules dédiées au stockage graisseux connues sous le nom d'« adipocytes » et qui sont regroupées dans des lobules. L'hypoderme assure le stockage des lipides, principalement des triglycérides et acides gras et la libération d'énergie (Driskell, Jahoda et al. 2014). Ainsi, l'hypoderme participe à l'isolation thermique du corps. Cette couche agit comme une interface entre la peau et les organes, les os ou les muscles. À mesure que nous vieillissons, l'hypoderme commence à s'atrophier, ce qui contribue à l'amincissement de la peau.

Le maintien de l'homéostasie de ces différentes couches ainsi que leur bon fonctionnement sont dépendants du microenvironnement de la peau.

2. Le microenvironnement de la peau

La peau assure un équilibre entre le corps et le monde extérieur. Cet organe est comparable à un écosystème composé de diverses cellules, d'un réseau complexe de biomolécules et d'un microbiote (Grice and Segre 2011), écosystème qui interagit en continu et assure le maintien de son homéostasie. Ce microenvironnement complet est soumis à d'éventuelles modifications provenant de l'extérieur ou de l'intérieur du corps. Dans ce microenvironnement, les paramètres physico-chimiques ont toute leur importance (Grillon, Matejuk et al. 2012). Les principaux qui interviennent dans le maintien de l'intégrité du tissu cutané sont : le pH, l'hydratation, la température et l'oxygénation. L'interface intérieur/extérieur conduit à la formation de gradients qui sont adaptés avec toutes les fonctionnalités et le développement de la peau. Ces paramètres sont stables mais peuvent varier en fonction de l'environnement ou du besoin vital de l'organisme, et ce afin de toujours garder cet équilibre.

2.1. Le pH cutané

Le pH joue un rôle physiologique important dans la nature et chez l'homme. Le pH varie de 1 à 8 dans les organes humains et est sujet à une régulation fine, surtout dans la peau. Il est connu que la peau est relativement acide. En réalité, il existe tout un gradient de pH en fonction de la profondeur. Le pH est plutôt neutre dans l'hypoderme et jusqu'à la couche basale de l'épiderme. Cependant, à partir de la couche granuleuse, il commence à devenir acide jusqu'à la surface de la peau, où il est environ de 4,7 (Lambers, Piessens et al. 2006 , Proksch 2018).

Plusieurs mécanismes contribuent à la formation du gradient de pH cutané, qui est la résultante de la concentration en ions d'hydrogène dans les réactions métaboliques. Les principales réactions responsables de ce gradient de pH dans l'épiderme sont : la production de l'acide lactique par le métabolisme épidermique, la dégradation de la filaggrine, la teneur en acides gras, la libération des mélanosomes et l'activation des échangeuses d'anions sodium et d'hydrogène, NHE1, protéines présentes dans les membranes des corps lamellaires des kératinocytes (Proksch 2018). Le pH de la surface de la peau varie selon plusieurs facteurs : les régions du corps, l'âge, le sexe et la couleur de la peau. Des différences de pH ont été démontrées même au cours du cycle circadien et du cycle saisonnier. D'autre part, le pH varie avec plusieurs pathologies, notamment un pH élevé a été enregistré chez les enfants qui souffrent d'eczéma atopique (Eberlein-König, Schäfer et al. 2000). Le pH cutané joue un rôle crucial dans le contrôle de divers processus physiologiques, comme la formation d'une barrière lipidique fonctionnelle. En effet, plusieurs enzymes y compris la glucocérébrosidase et les

phospholipases qui catalysent la production des précurseurs lipidiques, comme les céramides apolaires et le cholestérol, sont activées seulement dans un milieu acide (Egberts, Heinrich et al. 2004) (Figure 6). Lors de la formation de la peau chez un nouveau-né ou bien lors de la cicatrisation, leurs activations sont retardées à cause du pH neutre. Par ailleurs, un pH acide approprié joue également un rôle important dans l'activation des enzymes de dégradation de la filaggrine (Proksch 2018), et, par conséquent, dans la formation du facteur d'hydratation naturel (NMF) de la peau, une peau acide étant plus hydratée. Enfin, le microbiote cutané intervient aussi dans cette acidification. En effet, la peau entretient une relation de symbiose avec sa microflore, elle lui fournit un biotope adéquat, tandis que cette dernière renforce à son tour les défenses cutanées en empêchant la colonisation par des bactéries nuisibles (Malik, Dennison et al. 2016).

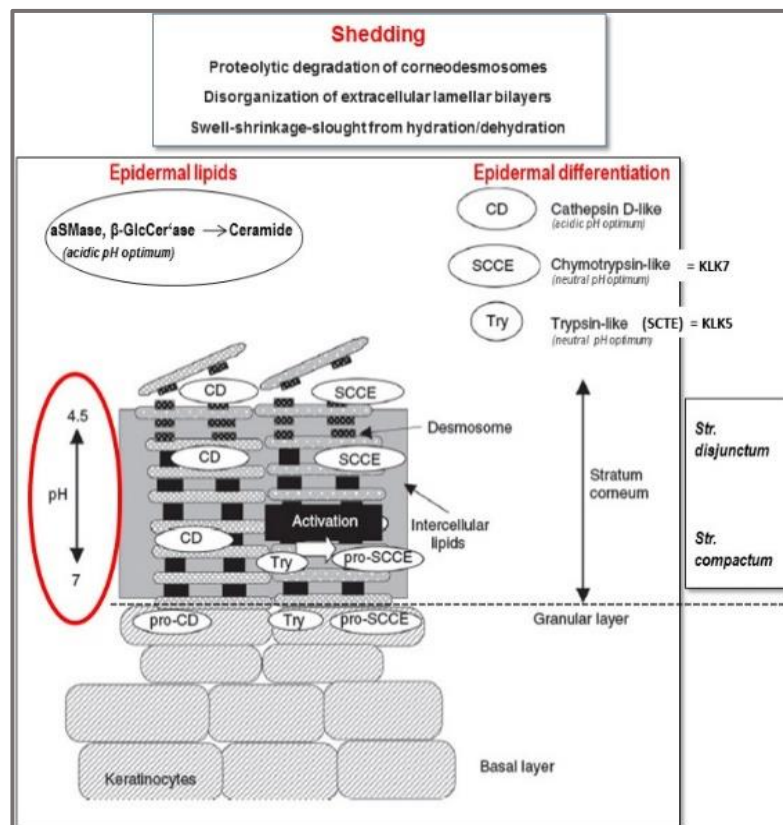


Figure 6 : Le gradient de pH dans la partie supérieure de l'épiderme et l'activation des enzymes de la différenciation et de la desquamation de la couche cornée.

Adapté de (Proksch 2018).

2.2. L'hydratation de la peau

La teneur en eau dans la peau est un facteur essentiel pour son homéostasie. Une peau saine contient plus de 72 % d'eau qui contribue à l'apparence d'une peau normale, non squameuse. Cette teneur en eau est soigneusement régulée. En effet, un gradient d'hydratation est présent à

travers les différentes couches (Figure 7). Les plus hydratées sont les couches en profondeur qui contiennent environ 70 % d'eau, jusqu'à la couche basale de l'épiderme. Puis la teneur en eau diminue en fonction de la remontée dans l'épiderme jusqu'à atteindre 15 à 30 % vers la couche cornée (Bonté 2011).

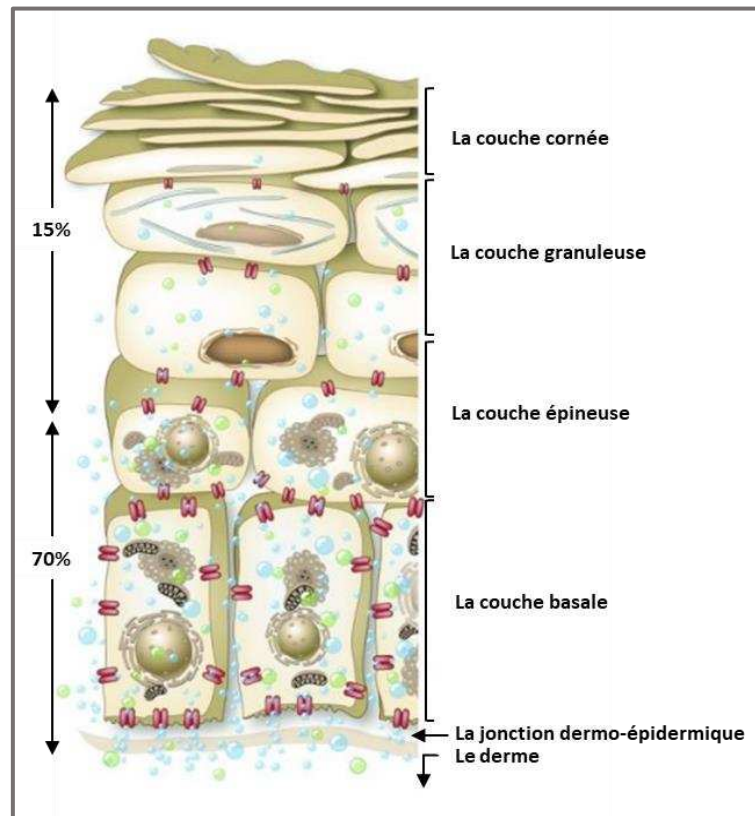


Figure 7 : Le gradient d'hydratation à travers les différentes couches de la peau.

Adapté de (Draelos 2012)

Ce faible taux d'hydratation aide à la formation de la couche cornée, qui est à son tour indispensable dans la conservation des solutés et de l'eau de l'épiderme viable. Plusieurs acteurs interviennent dans le maintien de ce gradient hydro-transépidermique. Parmi ces acteurs, on trouve entre autre le NMF dans les cornéocytes qui est composé principalement d'acides aminés libres, acides lactiques et de minéraux. Ce NMF est produit principalement grâce à la protéolyse de la filaggrine dans les kératinocytes. On trouve également des lipides de la matrice intercornéocytaire comme les céramides et le cholestérol. La disposition appropriée des jonctions serrées de la couche granuleuse, et sa teneur en glycérol, agit en complémentarité pour réguler ce gradient en eau. Au niveau du derme, l'acide hyaluronique, contribue majoritairement à l'hydratation par sa capacité à retenir 1000 à 10000 fois son poids en eau (Verdier-Sévrain and Bonté 2007). Ce gradient d'hydratation est nécessaire dans le maintien de la prolifération et la différenciation des cellules épidermiques.

2.3. La température de la peau

La peau maintient l'homéostasie thermique du corps par sa pilosité et par la couche graisseuse de l'hypoderme, ce qui crée une « couverture » pour tous les organes de l'organisme. Cette régulation est assurée par une détection des variations de températures par le système neurosensoriel. Il existe deux types de terminaisons nerveuses appelées « thermorécepteurs » qui sont disséminés dans toute la peau. Les majoritaires, qui se trouvent beaucoup plus dans l'épiderme, sont sensibles au froid, tandis que les autres, qui se trouvent dans la couche du derme, sont sensibles à la chaleur. Grâce à ces thermorécepteurs, la peau est capable de capter la moindre modification de la température cutanée, même les variations rapides (Schepers and Ringkamp 2009). La température de la surface de la peau est variable selon l'âge : elle est plus basse chez les personnes âgées que chez les jeunes (Geneva, Cuzzo et al. 2019).

2.4. L'oxygénation de la peau et la physioxie

L'oxygène est une molécule vitale pour tous les organismes aérobies et est la source d'énergie des cellules. Dans le corps humain, la pression partielle en oxygène (pO_2) varie considérablement d'un organe à l'autre selon la vascularisation des tissus, les besoins énergétiques et l'état physiologique. L'oxygène représente 21 % (160 mm Hg) des gaz de l'atmosphère. Lorsqu'il pénètre dans les poumons, il est chauffé et humidifié par les voies pulmonaires, et la pression partielle en oxygène diminue autour de 100 mm Hg. Par la suite, l'oxygène passe dans les capillaires sanguins, se fixe sur l'hémoglobine et est transporté vers tous les tissus du corps.

2.4.1. Les nomenclatures liées au taux d'oxygène

Dans la littérature, la dénomination de la teneur en oxygène dans le microenvironnement, *in vivo* ou *in vitro*, peut prêter à confusion car le même terme peut être utilisé dans un tout autre contexte. Le terme hypoxie, par exemple, peut faire référence à un manque d'oxygène ou bien à un taux plus faible que la normoxie. C'est pourquoi une définition des divers termes semble indispensable dans cette partie.

2.4.1.1. La normoxie

Le terme normoxie se réfère généralement au taux d'oxygène dans l'air, c'est à dire 21%. Dans le cas de la culture cellulaire *in vitro*, il s'agit du pourcentage d'oxygène présent dans l'air des incubateurs classiques, qui est d'environ 18.6 % (Wenger, Kurtcuoglu et al. 2015). Ce taux est aussi parfois appelé hyperoxie pour montrer que les cellules sont à un taux d'oxygène supérieur

à leur taux physiologique. Il est nécessaire de prêter attention au terme normoxie car certaines études l'emploient pour désigner un niveau normal d'oxygénation trouvé dans les tissus *in vivo*.

2.4.1.2. L'hypoxie

Le mot hypoxie est très ancien et souvent utilisé dans la littérature pour décrire un taux d'oxygène très bas par rapport au niveau physiologique, particulièrement dans des conditions pathologiques induisant un manque d'oxygène, telles que l'ischémie ou au sein des tumeurs cancéreuses. Il faut noter que cette expression est parfois encore utilisée dans la littérature pour désigner des niveaux d'oxygène physiologiques, c'est-à-dire plus faibles que la normoxie.

2.4.1.3. La physioxie

La physioxie est un terme désormais conventionnel et intégré dans la littérature. Elle se définit par la pression partielle en oxygène d'un organe donné dans les conditions physiologiques. Le terme physioxie a d'abord été introduit en 2011 par notre équipe (Carreau, El Hafny-Rahbi et al. 2011), et, depuis, de nombreuses études l'utilisent pour se référer à ces niveaux d'oxygène physiologiques.

Dans ce manuscrit nous emploierons le terme physioxie pour les niveaux d'oxygène physiologiques, normoxie pour les niveaux atmosphériques, dans l'air ou dans un incubateur, et hypoxie pour l'insuffisance d'oxygène.

2.4.2. La physioxie des organes du corps humain

La physioxie des tissus du corps est inférieure au taux d'oxygène de l'atmosphère, normoxie, qui est d'environ 21 %. En effet, l'oxygène inspiré se mélange aux gaz de l'appareil respiratoire et son taux diminue considérablement jusqu'à 14,5 % dans les alvéoles pulmonaires. Une fois transmis dans le sang à travers les poumons, son pourcentage est réduit à 13 % dans le sang veineux. À mesure que l'oxygène est distribué dans les tissus par diffusion sanguine, son taux chute davantage, atteignant en finale 1,3 à 2,5 % dans certaines cellules (Carreau, El Hafny-Rahbi et al. 2011). Les différents tissus ne sont pas oxygénés de la même manière. Cela dépend de leur degré de vascularisation et de leur éloignement des capillaires sanguins. De plus, le taux d'oxygénation mesuré dans un organe est la résultante de l'apport en oxygène mais aussi de sa consommation, elle-même liée au métabolisme dans l'organe. Les taux physiologiques en oxygène de différents tissus humains sont illustrés dans le Tableau 1. La peau fait partie des organes peu oxygénés.

Tissus	pO ₂ [mmHg]	pO ₂ [%]
Air	160	21.1
Air (trachée)	150	19.7
Air (alvéoles)	110	14.5
Sang veineux	100	13.2
Sang artériel	40	5.3
Cerveau	33.8 ± 2.6	4.4 ± 0.3
Poumon	42.8	5.6
Intestin	57.6 ± 2.3	7.6 ± 0.3
Foie	40.6 ± 5.4	5.4 ± 0.7
Rein	72 ± 20	9.5 ± 2.6
Muscle	29.2 ± 1.8	3.8 ± 0.2
Moelle osseuse	48.9 ± 4.5	6.4 ± 0.6

Tableau 1 : Les valeurs de la pression partielle en oxygène, pO₂, dans l'air, entre les poumons et le cœur (sang veineux et artériel), dans les différents tissus humains exprimées en mm Hg et en pourcentage d'oxygène.

Adapté de (Carreau, El Hafny-Rahbi et al. 2011)

2.4.3. La physioxie cutanée

Dans la peau la microcirculation est très présente et forme un plexus sous-dermique, dans l'hypoderme, et, après ramifications, un plexus dermique au niveau des papilles dermiques.

Cependant, l'épiderme n'est pas vascularisé. Il est oxygéné par la diffusion passive de l'oxygène à partir de 2 sources : la première provient de l'oxygène de l'air, qui part de la couche cornée et se diffuse dans l'épiderme jusqu'à la couche basale. Inversement, le deuxième gradient commence dans le derme, oxygéné principalement par les capillaires sanguins, et va jusqu'à la couche basale (Grillon, Matejuk et al. 2012). Cela veut dire que les cellules souches cutanées ont un taux d'oxygène très bas, mais celui-ci est parfaitement adapté à leur homéostasie. La physioxie de la peau est illustrée dans la Figure 8.

Différentes méthodes ont été conçues pour mesurer les taux d'oxygène dans les différentes couches de la peau. Ainsi, à l'aide de microélectrodes, les niveaux d'oxygène mesurés augmentent avec la profondeur, passant de 8 mm Hg dans des strates de l'épiderme à environ 40-50 mm Hg près du plexus papillaire dermique (Wang, Winlove et al. 2003). L'épiderme, qui est dépourvu de vaisseaux sanguins, possède un gradient d'oxygène allant de 21 mm Hg dans la couche basale près des papilles dermiques à 14 mm Hg dans la couche épineuse et 7 mm Hg dans la couche granuleuse proche de la couche cornée (Carreau, El Hafny-Rahbi et al. 2011).

Comme les poumons, la peau est un organe directement exposé à l'oxygène atmosphérique. De ce fait, la couche superficielle de la peau est oxygénée par le biais de l'oxygène atmosphérique. Environ 266 à 375 μm de la peau sont alimentés par l'oxygène externe, ce qui contribue de manière significative à l'approvisionnement en oxygène de l'épiderme et en partie du derme humains (Stücker, Struk et al. 2002, Grillon, Matejuk et al. 2012).

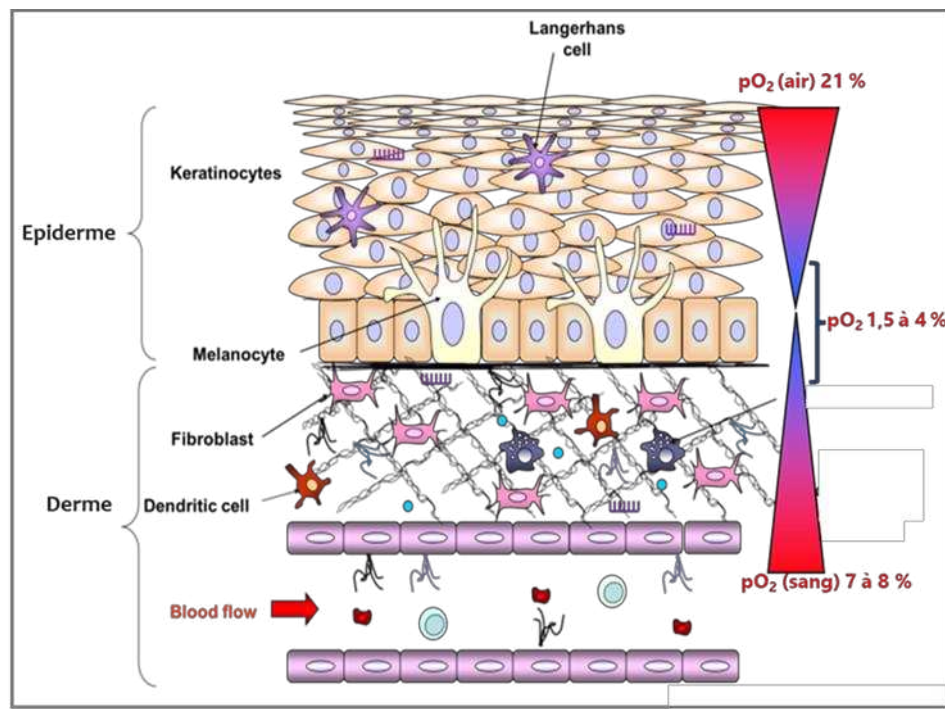


Figure 8 : Les gradients d'oxygène dans la peau.

Adapté de (Grillon, Matejuk et al. 2012)

3. Le vieillissement de la peau

Le microenvironnement de la peau tout comme sa structure et ses activités sont altérés au cours du vieillissement. Le chapitre suivant décrit ces modifications et les mécanismes moléculaires qui contribuent à la physiopathologie du vieillissement cutané.

3.1. Les généralités concernant le vieillissement cutané

Le vieillissement de la peau est tout particulièrement important du fait de son impact social. Il est visible et, en outre, il constitue un support idéal pour étudier le processus général de vieillissement de l'organisme. La compréhension de ces mécanismes est nécessaire pour envisager une prise en charge adaptée. En effet, avec l'allongement de la durée de vie, la demande est de plus en plus forte pour des traitements visant à ralentir l'apparition ou atténuer les signes du vieillissement.

La peau représente le principal témoin des altérations liées à la fois à l'avancement chronologique et à l'environnement externe. Ces altérations sont illustrées par plusieurs signes morphologiques, comme les rides, les taches, le relâchement des tissus et l'apparence d'une peau vieillie. Toutes les manifestations du vieillissement de la peau sont le résultat des modifications au niveau des différentes couches de la peau et des cellules qui maintiennent son homéostasie. Le vieillissement de la peau est le résultat de deux processus superposés : le vieillissement « intrinsèque » et le vieillissement « extrinsèque ». Le vieillissement intrinsèque est la conséquence du vieillissement physiologique des cellules et des tissus alors que le vieillissement extrinsèque est un vieillissement accéléré par l'exposition à des facteurs externes tels que les rayonnements UV et les polluants ainsi qu'à des habitudes néfastes. En conséquence, il est seulement possible d'agir par la prévention sur le vieillissement extrinsèque. Les signes morphologiques entre ces deux mécanismes sont différents : amincissement ou épaissement de l'épiderme, profondeur des rides (Yaar, Eller et al. 2002). Cependant, au niveau moléculaire, plusieurs processus sont communs.

3.2. Le vieillissement intrinsèque

L'ensemble des organes du corps dont fait partie la peau est programmé pour vieillir. Le vieillissement intrinsèque ou chronologique est principalement d'origine génétique. Ses effets sont visibles particulièrement sur cet organe. La peau reflète également les carences liées au vieillissement dans tout le corps humain. Ainsi, l'horloge biologique affecte l'ensemble des

organes de la même manière, provoquant une dégénération irréversible des tissus. Le vieillissement chronologique de la peau est visible sur les parties protégées du soleil. Avec l'âge, les différentes couches de la peau se dégradent et perdent peu à peu leurs structures normales et leurs fonctions.

3.2.1. Les manifestations du vieillissement intrinsèque

3.2.1.1. Les atteintes de l'épiderme

Les altérations biologiques dans l'épiderme des personnes âgées se situent au niveau de la couche basale de l'épiderme. En effet, les kératinocytes souches qui se trouvent à ce niveau ne répondent plus aux signaux prolifératifs. En revanche leur nombre reste constant quel que soit l'âge de l'individu (Zouboulis, Adjaye et al. 2008). Par conséquent, l'épiderme se renouvelle plus lentement et s'amincit ce qui favorise la formation des rides fines (Lavker 1979). Cependant l'épiderme reste une couche moins touchée par le vieillissement intrinsèque du fait de sa capacité d'auto-renouvellement par comparaison au derme (Giangreco, Qin et al. 2008). Il y a peu de dérégulation de la pigmentation dans ce type de vieillissement.

3.2.1.2. Les atteintes de la jonction dermo-épidermique

Avec l'âge, la hauteur des papilles dermiques diminue, ce qui entraîne un aplatissement de la jonction dermo-épidermique (Roig-Rosello and Rousselle 2020). Par conséquent, la surface d'échange entre l'épiderme et le derme est réduite. L'apport de nutriments et d'oxygène à l'épiderme est donc limité ce qui influence l'intégrité et l'homéostasie de l'épiderme. La conséquence est la diminution de l'expression des constituants de la jonction dermo-épidermique par les cellules du derme et l'épiderme, comme la laminine-332 (Yamada, Hasegawa et al. 2018), l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, les collagènes IV, VII (Langton, Halai et al. 2016).

3.2.1.3. Les atteintes du derme

Le vieillissement intrinsèque est caractérisé par une atrophie du derme qui se manifeste par une réduction de l'élasticité, de l'extensibilité de la peau et par l'accentuation de sa rigidité. Ceci est dû, d'une part, à la diminution du nombre de fibroblastes et, d'autre part, au ralentissement de leur activité conduisant à une plus faible densité des fibres élastiques et de collagène (Quan, Qin et al. 2012). D'un point de vue ultrastructural, les principales modifications de la peau âgée sont localisées dans la MEC dermique. Des images topographiques de fibres de collagène au

microscope à force atomique montrent des fibres denses et bien structurées chez les jeunes. En revanche, les fibres des peaux âgées sont dégradées et désorganisées (Quan and Fisher 2015). Ces altérations affectent l'intégrité structurelle et les propriétés mécaniques de la peau, ce qui contribue à l'apparition des rides. Par ailleurs, la perte de la graisse de l'hypoderme en raison de l'âge contribue au relâchement de la peau et à la formation de rides (Bonté, Girard et al. 2019).

3.3. Le vieillissement extrinsèque

Le vieillissement extrinsèque est également connu sous le nom de « vieillissement prématuré » ou de « photovieillissement ». C'est un modèle qui a été proposé depuis 1969 et qui consistait, outre les facteurs intrinsèques, en une exposition au soleil accélérant ainsi le vieillissement de la peau. Aujourd'hui, le vieillissement extrinsèque est induit par la synergie de plusieurs facteurs et d'habitudes néfastes, par exemple l'exposition au soleil et à la pollution environnementale, le tabagisme, une mauvaise alimentation, la consommation d'alcool, le manque de sommeil ou encore le stress (Figure 9). Ces facteurs, connus sous le nom « exposome » (Wild 2005), entraînent davantage de dommages et accélèrent fortement le vieillissement cutané. La peau photovieillie, comme son nom l'indique, concerne les zones régulièrement exposées au soleil, celles localisées surtout sur le visage, le cou, les mains et, moins fréquemment, sur les bras et les jambes (Figure 10).

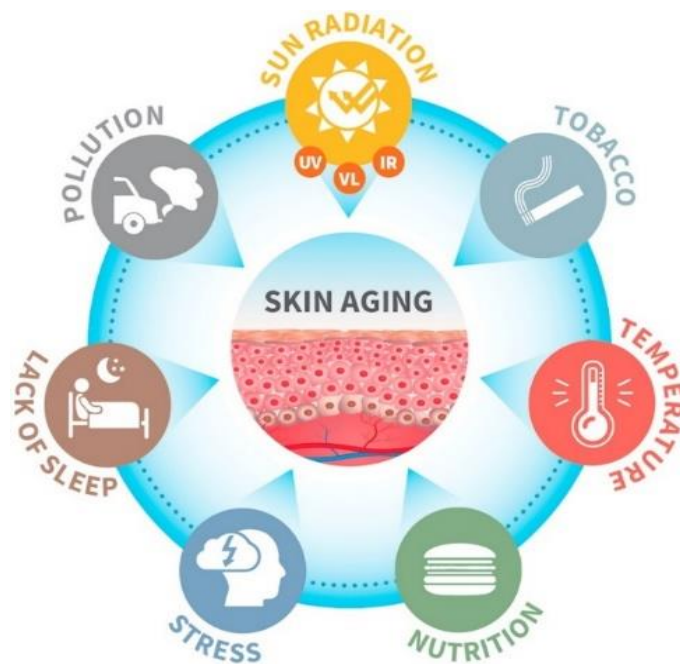


Figure 9 : Les différents facteurs de l'exposome impliqués dans le photovieillissement.

Adapté de (Krutmann, Bouloc et al. 2017).

Plus de 80 % du vieillissement de la peau du visage est dû à une exposition chronique aux rayons UV de faible intensité (Friedman 2005). La peau de ces zones apparaît très sèche, rugueuse avec de profondes rides, des taches de pigmentation et une dilatation des vaisseaux sanguins, ce qui est différent de la peau non exposée qui a subi uniquement un vieillissement intrinsèque et moins d'altérations.



Figure 10 : Une photo illustrant le contraste entre l'abdomen, protégé du soleil, et le dos de la main, fréquemment exposé au soleil, chez une femme de 91 ans.

Adapté de (Kosmadaki and Gilchrest 2004, Bonté 2011).

3.3.1. Les principaux facteurs de l'exposome

3.3.1.1. Les rayonnements solaires (UV)

La peau est l'organe le plus exposé au rayonnement solaire. Ce sont des rayons invisibles d'une longueur d'onde comprise entre 200 et 400 nm. Il y a trois types d'UV, chacun ayant ses propres effets biologiques : UVA (320–400 nm), UVB (280–320 nm) et UVC (200–280 nm). L'exposition aux rayons solaires est le principal facteur du vieillissement cutané extrinsèque. Les rayons ultraviolets provoquent des altérations des composants cellulaires qui conduisent à la dégradation de la matrice dermique, à la modification de la composition lipidique du *stratum corneum*. Par ailleurs, ils stimulent un processus de défense : la pigmentation de la peau. Du fait des différences de pigmentation et de capacité antioxydante entre les individus, les peaux alors sont plus ou moins protégées de ces dommages. Les UV sont de puissants agents mutagènes et leurs réactions au niveau de la peau sont susceptibles de déclencher ou d'exacerber des pathologies à médiation immunitaire ou plus grave encore, de causer des cancers graves. Les radiations UV sont responsables notamment du développement de 65 % des mélanomes

cutanés (Lo and Fisher 2014), en particulier chez les individus à peau claire. Par ailleurs, l'exposition à des UVC artificiels endommage l'ADN et augmente considérablement le risque de développer des cancers de peau (Pfeifer, You et al. 2005).

Cependant, les UV sont aussi bénéfiques pour l'organisme car ils permettent par exemple la production de vitamine D3 dans l'épiderme (UVB). De plus, suivant la position géographique et la période de la journée, les effets des UV ne sont pas les mêmes (Maverakis, Miyamura et al. 2010). Le soleil induit des dommages sur la peau d'une manière directe ou indirecte *via* le stress oxydant. Les détails de ces mécanismes moléculaires sont décrits dans la partie suivante (Les Ros et les défenses antioxydantes).

3.3.1.2. La pénétrance des UV dans les tissus cutanés

Environ 95 % des UV qui atteignent la surface de la Terre sont des UVA. Les rayons UVA, dont les longueurs d'onde sont plus longues, peuvent pénétrer en profondeur dans le derme tandis que les rayons UVB, avec des longueurs d'onde plus courtes, sont absorbés superficiellement dans l'épiderme (Figure 11). Pratiquement aucun rayonnement UVC ne pénètre dans l'atmosphère, car ils sont bloqués par la couche d'ozone.

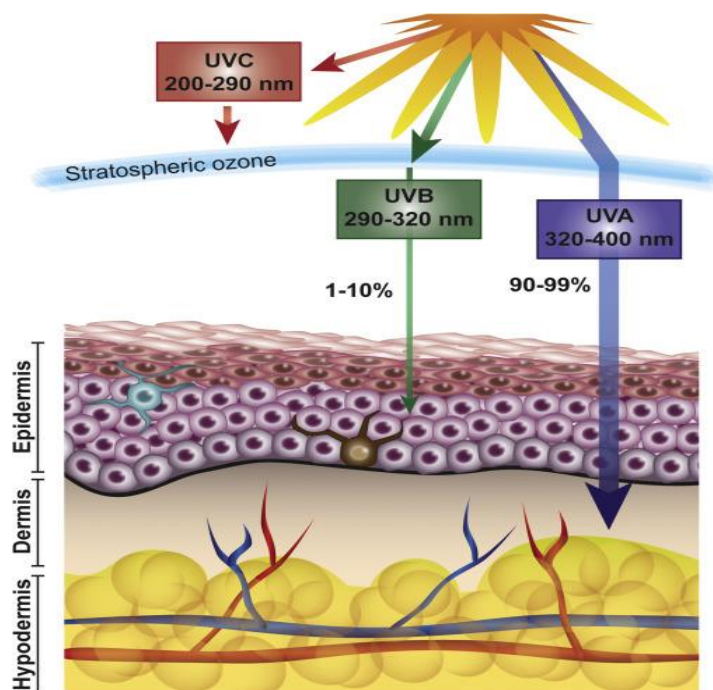


Figure 11 : La capacité de pénétration des rayonnements ultraviolets à travers les couches de la peau.

Adapté de (Mintie, Singh et al. 2020).

Dans la peau, les UVA peuvent induire une production accrue des espèces réactive de l'oxygène (ROS), suite à leur absorption par des chromophores de la peau comme la mélanine. Par conséquent, les UVA jouent un rôle majeur dans la progression du photovieillissement (Ou-Yang, Stamatas et al. 2004, Prasad and Pospíšil 2012). Les UVB sont relativement peu abondants pour atteindre la surface de la Terre, mais ils ont beaucoup plus d'énergie que les UVA. Les rayons UVB brûlent directement la peau et endommagent les cellules superficielles (Maverakis, Miyamura et al. 2010).

3.3.1.3. Les effets directs des UV sur la peau

1) Les dommages à l'ADN

Les UV sont des agents génotoxiques très puissants qui sont reconnus pour être la principale cause de photocancérogenèse. Les rayons UVB passant à travers l'épiderme sont absorbés directement par l'ADN des kératinocytes. Cette énergie provoque des réactions photochimiques dans la double hélice, produisant en conséquence des photodimères, en raison de la formation de liaisons covalentes entre les bases pyrimidiques adjacentes. Les photodimères qui se forment, se différencient par la position du carbone inclus dans leurs liaisons, à savoir les cyclobutanes (CPD) et les photoproduits 6-4. Les cyclobutanes sont les plus fréquents, mais ils sont les moins détectés et réparés par le système de réparation de l'ADN, et ainsi des mutations sont introduites dans le génome. Les CPD sont responsables de la plupart (~80 %) des mutations induites par les UVB (Nakajima, Lan et al. 2004). Récemment, il a été montré que ce type de lésions est produit également par les UVA, principalement des CPD TT, mais moins fréquemment qu'avec les UVB. En revanche il a été rapporté que les CPD formé par les UVA persistent plus longtemps dans l'ADN (Premi, Wallisch et al. 2015). La formation des photoproduits 6-4 est moins fréquente par rapport à celle des CPD (Douki and Cadet 2001). En revanche, leur élimination par la cellule est très rapide parce qu'ils induisent une forte distorsion de la double hélice, empêchant ainsi l'ADN polymérase de progresser et cela provoque l'arrêt du cycle cellulaire. La présence de ces lésions d'ADN constitue une signature dans les cancers de la peau et serait la cause de 80% de ces cancers.

2) Les dommages à la mitochondrie

Les mitochondries possèdent leur propre ADNmt (ADN mitochondrial) qui code les enzymes de la chaîne respiratoire, principale source d'énergie pour la cellule. La présence d'une altération au niveau de l'ADNmt est à l'origine du dysfonctionnement de cette organelle. Ainsi, une mutation dans le gène de la polymérase mitochondriale induit une létalité précoce chez la

souris et l'accélération des signes de vieillissement dans tout le corps, particulièrement au niveau de la peau. (Trifunovic, Wredenberg et al. 2004). Par ailleurs, l'ADNmt est très susceptible aux dommages par les UV. Ceci est dû à plusieurs facteurs, tels que sa structure qui est exempte d'introns, donc 95% de son génome est composé de séquences codantes. Il n'a pas non plus d'histones protectrices, et il est dépourvu aussi de mécanismes de réparation de l'ADN par rapport à l'ADN nucléaire (Tulah and Birch-Machin 2013). En conséquence, l'exposition aux UV induit en particulier la formation de cyclobutanes pyrimidiques comme au niveau de l'ADN nucléaire. Celles-ci persistent dans le temps, et jusqu'au déclin fonctionnel des mitochondries. Ainsi, ces mutations sont utilisées comme biomarqueurs des dommages causés par les UV dans la peau (Birch-Machin and Swalwell 2010). Enfin, les dommages causés à l'ADNmt modifient la chaîne respiratoire et son fonctionnement, et, par conséquent, augmentent la production de ROS, qui peuvent à leur tour endommager davantage l'ADNmt (Tulah and Birch-Machin 2013).

3) Les dommages aux protéines

La majorité des dommages induits par les UV sur les protéines se situent au niveau des chaînes latérales des résidus aromatiques comme la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, l'histidine ou encore sur la cystéine. Les autres acides aminés et liaisons peptidiques absorbent très peu la lumière UV mais les réactions de photo-oxydation directe et les espèces radicalaires peuvent également jouer un rôle, en particulier avec les UV de courte longueur d'onde. Les UV induisent une variété de réactions, y compris des processus radicalaires et des réactions d'ouverture de cycle, qui conduisent finalement à la perturbation de la structure des protéines. Dans la peau, ces oxydations arrivent généralement dans le derme après une exposition à des UVA. Ainsi les modifications structurales des protéines provoquent la perte de leur fonction ou leur activité, ce qui accélère davantage le vieillissement de la peau (Sander, Chang et al. 2002).

3.3.1.4. La pollution de l'air

Selon l'OMS, environ 7 millions de décès surviennent chaque année à travers le monde en raison de maladies causées par la pollution atmosphérique. En effet, la pollution est définie comme étant celle de l'air contaminé par des agents physiques, chimiques ou biologiques. Plusieurs molécules telles que le monoxyde de carbone, l'ozone ou le dioxyde de soufre sont capables de se propager dans la peau et contribuent notamment à accélérer le vieillissement. Plusieurs études épidémiologiques constatent que la pollution induit le développement de symptômes liés au vieillissement accéléré, y compris l'apparition de taches pigmentaires (Vierkötter, Schikowski et al. 2010, Hüls, Vierkötter et al. 2016) et l'apparition des rides (Hüls,

Schikowski et al. 2015). Ces polluants induisent l'activation des voies de signalisation médiées par le facteur de transcription AhR (récepteur d'hydrocarbures aromatiques), responsable de la transcription des enzymes impliquées dans les mécanismes de vieillissement de la peau comme les MMPs (Dupont, Gomez et al. 2013).

3.3.1.5. Le tabagisme

Le tabac fait partie des principaux acteurs capables d'induire l'apparition des rides du visage. Une étude sur des jumeaux a évalué que 10 ans de tabagisme correspondaient à une différence d'apparence d'environ 2 ans et demi de plus (Ph and Gabrielle 2013). Le tabac agit sur le derme et entraîne l'accumulation d'agrégats d'élastine et de protéoglycanes. Il induit également l'expression des MMPs qui dégradent les composants de la MEC et il altère la biosynthèse du collagène. Les constituants du tabac suivent apparemment la même voie de signalisation que les polluants par l'intermédiaire du facteur de transcription AhR (Morita, Torii et al. 2009).

3.3.1.6. La nutrition

Plusieurs pathologies cutanées apparaissent lors de déséquilibres nutritionnels, mettant en évidence un lien entre nutrition et peau. La consommation de nourriture malsaine est associée à toutes sortes de problèmes cutanés, allant de l'acné aux signes du vieillissement cutané. La surconsommation de produits sucrés accélère l'apparition des rides (Draelos 2019). À l'inverse, une alimentation saine et riche en antioxydants, telle qu'une alimentation riche en vitamine C, peut retarder l'apparition des signes du vieillissement (Cosgrove, Franco et al. 2007).

3.3.1.7. Les autres facteurs : le stress, le manque de sommeil, les variations de température

Le stress psychologique et le manque de sommeil affectent le système nerveux et induisent un dysfonctionnement chronique du système immunitaire médié par le stress oxydant. Un mécanisme majeur dans le vieillissement de la peau (Dunn and Koo 2013). Il a été rapporté également que le stress induit une diminution de la perméabilité épidermique et une détérioration de la fonction barrière de la peau (Fukuda, Baba et al. 2015).

Le manque de sommeil provoque un changement de l'aspect du visage. La peau est terne, fatiguée et des cernes apparaissent autour des yeux. Sur le plan du vieillissement cutané, une étude menée auprès de 60 femmes a révélé que celles qui dormaient moins de cinq heures par nuit présentent plus de signes de vieillissement intrinsèques et ont une fonction de barrière cutanée réduite (Oyetakin-White, Suggs et al. 2015).

Une augmentation de température est observée lorsque la peau est exposée au soleil, notamment pendant les périodes de chaleur élevée. Ces variations de température stimulent la formation de nouveaux vaisseaux, le recrutement des cellules inflammatoires et causent des dommages oxydatifs à l'ADN, ce qui participe à l'accélération du vieillissement (Lee, Jung et al. 2012).

3.3.2. Les manifestations du photovieillissement de la peau

Sur le plan histologique, le vieillissement cutané extrinsèque se caractérise par des rides profondes, un relâchement de la peau, une rugosité, une pigmentation altérée et une présence de vaisseaux sanguins sous la surface de la peau.

3.3.2.1. Les atteintes de l'épiderme

À la différence du vieillissement intrinsèque, la peau photovieillie se caractérise par un épaissement de l'épiderme (Kligman 1989). En effet, cela se produit en particulier par l'accumulation de cornéocytes en surface, suite de la non-dégradation des desmosomes (Makrantonaki and Zouboulis 2007). En outre, après une exposition aux UV, une surexpression de l'involucrine est constatée dans la couche cornée, ce qui signifie que la différenciation des kératinocytes est fortement altérée. Dans la couche basale de l'épiderme photoendommagé, l'expression de la chaîne $\beta 1$ des intégrines, un marqueur de cellules souches épidermiques nécessaire à leur ancrage sur la JDE, est considérablement réduite. Il en résulte donc une diminution du potentiel prolifératif de ces cellules et une fragilisation des liaisons avec la matrice extracellulaire du derme (Bosset, Bonnet-Duquennoy et al. 2003, Makrantonaki and Zouboulis 2007). La peau photovieillie a une apparence terne et une pigmentation irrégulière. L'exposome affecte le nombre de mélanocytes fonctionnels dans l'épiderme et altère également les échanges entre les mélanocytes et les kératinocytes. Ceci a pour conséquence un dysfonctionnement de la barrière de protection contre les UV (Brenner and Hearing 2008, Kang, Lee et al. 2021).

3.3.2.2. Les altérations de la jonction dermo-épidermique

L'apparition des rides est fortement liée à la jonction dermo-épidermique, qui sert à l'ancrage de l'épiderme sur le derme. Dans la peau photovieillie, la JDE est plus aplatie et les invaginations des papilles dermiques sont diminuées, ce qui réduit le contact et le maintien des différentes couches. Ces modifications sont dues à la perturbation de l'expression de plusieurs molécules structurales de la JDE par l'exposome, notamment la diminution de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ au niveau des kératinocytes de la lame basale (Bosset, Bonnet-Duquennoy et al. 2003). On constate également une diminution drastique de la laminine 332 et des collagènes IV

et VII en raison d'une dégradation accrue par les MMPs surexprimées sous les effets des UV (Amano 2009). La modification dans les kératinocytes, fibroblastes (sénescence) et la composition de la MEC contribuent fortement à la diminution des constituants de la JDE.

3.3.2.3. Les atteintes du derme

L'exposition aux UV provoque une modification profonde des composants de la MEC et de leurs quantités. Les UVB, qui ne pénètrent pas dans le derme, induisent la synthèse des MMPs par les kératinocytes épidermiques, ce qui conduit à la dégradation des collagènes de type I et III, provoquant la désorganisation ainsi que la dégradation progressive de la MEC dermique (Quan and Fisher 2015) (Figure 13). Les UV induisent un phénotype appelé l'« élastose solaire ». En effet, les fibroblastes produisent et sécrètent plus d'élastase, ce qui entraîne la dégradation de l'élastine et la formation d'agrégats de protéines tronquées, associés à des glycosaminoglycanes (Figure 12). Des études récentes montrent également que les UVA modifient la structure de l'élastine et rendent ses extrémités accessibles aux protéases (Larroque-Cardoso, Camaré et al. 2015). Les UVA agissent également sur la synthèse d'autres molécules de la MEC du derme, sur la teneur en GAG dermiques et en glycoprotéines, sur la diminution de la synthèse de l'acide l'hyaluronique, un composant clé dans l'hydratation de la peau, *via* l'inhibition des enzymes acide hyaluronique synthétases (Tigges, Krutmann et al. 2014).

3.3.2.4. Les atteintes de la microcirculation

Les niveaux d'oxygène dans la peau varient en fonction de plusieurs facteurs parmi lesquels l'âge. Pendant le développement embryonnaire, la vascularisation des différentes couches de la peau se construit dans un microenvironnement hypoxique (Scheid, Wenger et al. 2002). Après la naissance, les couches superficielles de la peau entrent en contact avec l'oxygène atmosphérique afin de continuer la maturation de la peau. Cependant, durant le vieillissement, des altérations structurelles et fonctionnelles des cellules de la peau deviennent récurrentes et par conséquent, impactent la microcirculation, ainsi que l'oxygénation. En effet, on constate une diminution de la densité et une désorganisation de la microcirculation, ce qui affecte le contrôle du flux sanguin. Plusieurs études ont révélé que la teneur en oxygène transcutanée diminue avec l'âge (Ogrin, Darzins et al. 2005, Low, Alimohammadiha et al. 2021).

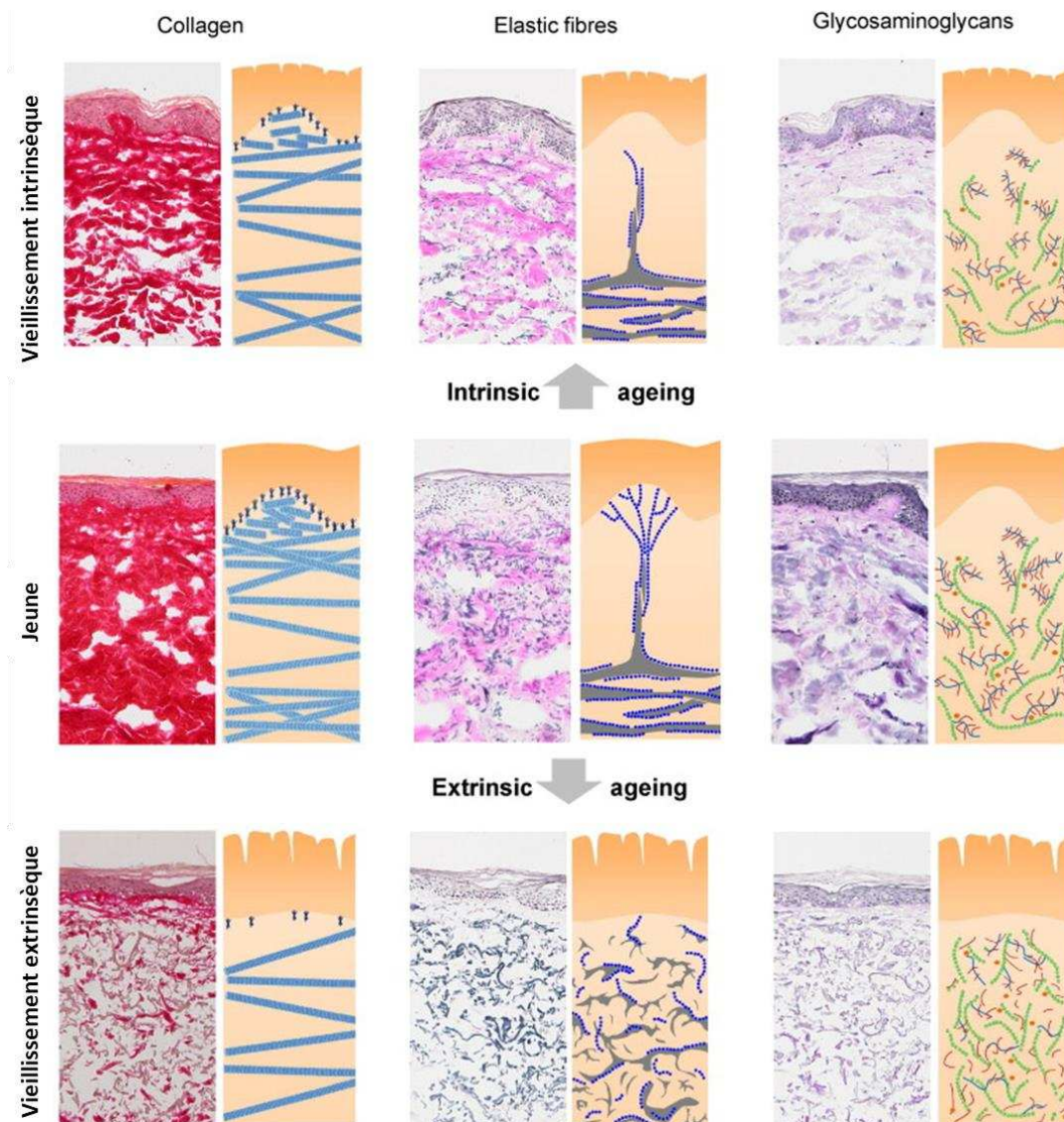


Figure 12 : Le remodelage des constituants de la matrice extracellulaire dans les vieillissements intrinsèque et extrinsèque par comparaison à la peau d'un jeune.

Les collagènes dermiques, les fibres élastiques et les glycosaminoglycans subissent un remodelage significatif, mais différentiel, entre ces deux types de vieillissement.

Adapté de (Naylor, Watson et al. 2011)

Dans le cas du photovieillissement, un effet supplémentaire est observé selon la dose et le temps d'exposition au soleil. Après une exposition aiguë, le rayonnement UV stimule l'angiogenèse en induisant la production de VEGF (vascular endothelial growth factor) et en réprimant celle de la thrombospondine-1, un puissant inhibiteur de l'angiogenèse. Les vaisseaux néosynthétisés sont hyperperméables ce qui provoque l'échappement des médiateurs pro-inflammatoires, qui induisent une inflammation au niveau du tissu cutané et entraînent la dégradation de la MEC. A long terme, dans la peau photovieillie, la vascularisation est fortement réduite (Chung and Eun 2007).

Un autre aspect de la peau photovieillie est la télangiectasie, qui correspond à la dilatation de petits vaisseaux sanguins superficiels qui sont concentrés davantage sur le visage et le cou. Ceci est dû à un dysfonctionnement des cellules endothéliales qui se caractérise par une altération dans l'expression des molécules d'adhérence, une capacité angiogénique réduite ainsi que par une perturbation dans les fonctions de vasodilatation. Le tabac et l'alcool accentuent l'apparition de ce type de vaisseaux (Scioli, Bielli et al. 2014).

3.4. L'influence du vieillissement sur les propriétés fonctionnelles de la peau

Les manifestations cliniques de ces deux types de vieillissement diffèrent également par l'aspect de la peau, notamment la profondeur des rides, la présence ou non de taches d'hyper- ou d'hypo-pigmentation et l'apparition de vaisseaux sanguins à la surface de la peau. Au niveau tissulaire, certaines conséquences sont similaires entre les deux types de vieillissement et les processus moléculaires sont très semblables entre les deux modèles. Enfin, les deux mécanismes, et en particulier le photovieillissement, altèrent les fonctions de la peau et la rendent sujette à d'autres maladies, notamment les cancers de la peau.

Les signes du photovieillissement de la peau sont faciles à détecter (Figure13). Les rides se multiplient, s'approfondissent et la peau s'affaisse, se déforme et s'assèche. La pigmentation devient plus irrégulière avec l'apparence des taches, des télangiectasies et le teint perd de son éclat (Makrantonaki and Zouboulis 2007). À la suite de tous ces changements structuraux, la peau perd également ses fonctions avec l'âge. La fonction barrière est modifiée, ce qui rend la peau plus sensible aux infections et aux agressions extérieures. La dégradation des composants de la matrice extracellulaire perturbe le gradient d'hydratation et le pH de la peau, ce qui donne à la peau un aspect sec. En outre, la différenciation des kératinocytes est altérée donc l'auto-renouvellement de l'épiderme est ralenti, ce qui affecte l'homéostasie épidermique. La perturbation de la mélanogenèse empêche la photoprotection (Lee et al. 2021), ce qui rend la peau plus susceptible de développer des cancers. De plus, les perturbations dans l'organisation de la microcirculation altèrent la fonction de la thermorégulation et le rôle sensoriel de la peau (Ogrin, Darzins et al. 2005, Low, Alimohammadiha et al. 2021). Enfin, ces modifications ont également un grand impact sur l'équilibre du microbiote cutané qui intervient dans la protection de la peau.

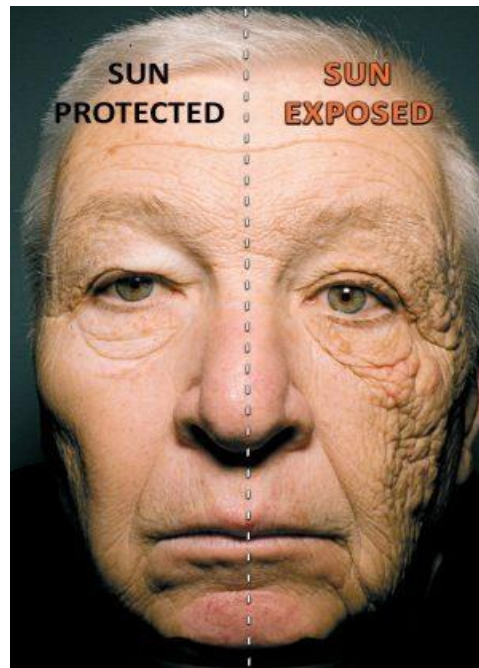


Figure 13 : Le vieillissement unilatéral.

Présence du vieillissement intrinsèque et du photovieillissement sur une même personne. Une photographie du visage d'un conducteur de camion de 69 ans, qui a un côté gauche avec des rides très marquées et une hyperkératose due à l'exposition au soleil tout au long de sa carrière par rapport à son côté droit protégé.

Adaptée de (Gordon and Brieva 2012).

3.5. Les principaux mécanismes impliqués dans le vieillissement

Différents mécanismes moléculaires ont été associés au vieillissement de la peau. Parmi les mécanismes les plus importants, le raccourcissement des télomères, la sénescence cellulaire et le stress oxydant qui sera détaillé dans le chapitre suivant.

3.5.1. Le raccourcissement des télomères

Les télomères sont des répétitions de 7000 à 12000 pb de la séquence TTAGGG, placés aux extrémités des chromosomes. Leur rôle est d'assurer la protection et l'intégrité de l'ADN. Dans la plupart des cellules normales, les télomères se raccourcissent d'environ 50 à 100 pb à chaque mitose. Par conséquent, le nombre de divisions cellulaires est limité à 50-70 (Nakamura, Izumiyama-Shimomura et al. 2002). Au bout d'un seuil critique de raccourcissement, l'ADN n'est donc plus protégé, ce qui entraîne l'activation de l'apoptose, la sénescence ou l'arrêt du cycle cellulaire. Dans la peau, le raccourcissement des télomères peut aussi être accéléré par l'action des UV ou par les dommages oxydatifs induits par ces rayonnements, engendrant ainsi l'apoptose *via* la signalisation médiée par le facteur de transcription p53 (Kosmadaki and

Gilchrest 2004). Les télomères servent ainsi d'horloge biologique en indiquant aux cellules qu'elles sont encore jeunes ou vieilles. Donc, ce mécanisme est fortement lié au vieillissement intrinsèque de la peau.

Par ailleurs, la séquence TTAGGG peut être synthétisée *via* une enzyme appelée « la télomérase ». Son expression est conservée dans les cellules embryonnaires, cancéreuses et germinales. Dans la peau, l'épiderme est l'un des rares tissus régénératifs qui expriment une télomérase active au niveau des kératinocytes de la lame basale, mais son expression est introuvable dans le derme (Boukamp 2005). Il a été montré que l'activité de la télomérase peut inverser le phénotype de sénescence dans des peaux reconstruites, dans lesquelles les fibroblastes sont peu prolifératifs (Funk, Wang et al. 2000). La présence de la télomérase dans l'épiderme remet en question l'implication du raccourcissement des télomères dans le vieillissement de la peau (Krunic, Moshir et al. 2009). En revanche, la présence de cette enzyme est peut-être liée à d'autres rôles. En effet, il a été montré que le rôle de la télomérase ne se limite pas à la protection des télomères. Elle intervient aussi comme antioxydant, comme régulatrice dans l'inflammation, dans l'expression génique et la prolifération cellulaire, afin que les cellules fassent face à des facteurs externes (UV) et internes (ROS) (Ségal-Bendirdjian and Geli 2019). Ce mécanisme constitue un point commun entre les deux types de vieillissement (Kosmadaki and Gilchrest 2004). Les télomères étant décrits comme responsables de la longévité, le maintien de l'activité télomérase pourrait constituer la base d'une approche très intéressante en médecine régénérative et en cosmétique (Jacczak and Rubiś 2021).

3.5.2. La sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire est un arrêt irréversible du cycle cellulaire à la phase G1. Elle a été découverte pour la première fois en 1961 par Hayflick et Moorhead, qui ont remarqué l'arrêt de la prolifération des fibroblastes après un certain nombre de divisions cellulaires (Hayflick and Moorhead 1961). Par la suite la sénescence cellulaire a été associée à plusieurs mécanismes moléculaires, notamment au raccourcissement des télomères, à l'accumulation des dommages à l'ADN et au stress oxydant. Elle se caractérise par des changements morphologiques, métaboliques et fonctionnels. Les cellules sénescents s'accumulent avec l'âge et peuvent accélérer le vieillissement, ainsi que les maladies associées à l'âge (Varani, Dame et al. 2006).

3.5.2.1. La sénescence des cellules cutanées dans l'épiderme

Les kératinocytes de la lame basale de l'épiderme expriment la télomérase et peuvent ainsi conserver la longueur de leurs télomères pendant le vieillissement intrinsèque. Les kératinocytes souches se multiplient et génèrent des cellules progénitrices qui se détachent de la membrane basale et migrent progressivement vers la surface de l'épiderme en se différenciant en cornéocytes. Ce processus continu permet à l'épiderme l'élimination des dommages par desquamation, empêchant ainsi leur accumulation et rendant le compartiment tissulaire relativement résistant au stress. Cependant les UV induisent l'accélération du raccourcissement des télomères. A un niveau très élevé de dommages, par exemple après UV, les kératinocytes entrent en apoptose, un phénomène qui est remarqué dans ce type cellulaire, plus que la sénescence, au contraire des fibroblastes.

Dans l'épiderme, les mélanocytes peuvent aussi entrer en sénescence. Ces cellules sont très peu prolifératives, ce qui rend peu probable qu'ils subissent une sénescence répllicative. Cependant, il a été montré que les mélanocytes entrent facilement en sénescence suite au raccourcissement de leurs télomères. Ceci a été reconnu comme un mécanisme important à cibler pour supprimer le développement des mélanomes (Suram, Kaplunov et al. 2012). Des mélanocytes exprimant des marqueurs de sénescence, dont un taux élevé de p16INK4a, ont été très fréquemment observés dans la peau humaine âgée et associés à l'hyperpigmentation et à d'autres marqueurs morphologiques de l'âge biologique (Waijjer, Gunn et al. 2016, Victorelli, Lagnado et al. 2019). Le mélanocyte constitue donc la cellule la plus sénescence de l'épiderme. De plus ces mélanocytes sont capables d'induire la sénescence des kératinocytes par voie paracrine, car des kératinocytes sénescents sont retrouvés tout autour des mélanocytes (Victorelli, Lagnado et al. 2019).

3.5.2.2. La sénescence des cellules cutanées dans le derme

Les fibroblastes du derme prolifèrent lentement par comparaison aux kératinocytes de l'épiderme. Leur sénescence est induite donc par l'accumulation de protéines mal repliées, et par l'abondance de dommages à l'ADN. De plus, cet effet est accentué par leur système de réparation qui est moins efficace que celui du kératinocyte. Par ailleurs, la morphologie des fibroblastes dermiques change au cours du vieillissement et les cellules deviennent plus petites. Par conséquent, elles réduisent leur interaction avec les composants de la MEC de 80% dans le vieillissement chronologique (Varani, Dame et al. 2006). Cette modification implique des altérations dans leur fonction, notamment elles produisent moins de procollagène 1 et en revanche expriment plus de protéases (MMP1) (Cole, Quan et al. 2018).

3.5.2.3. Les biomarqueurs des cellules sénescences

Plusieurs biomarqueurs peuvent caractériser la sénescence cellulaire, le plus répandu est l'expression de la β galactosidase lysosomale (Senescence-Associated β -Galactosidase, SA- β -Gal), dans la peau son activité augmente avec l'âge. Un autre est la diminution de la lamine B1, protéine structurale des noyaux. De multiples biomarqueurs de la sénescence sont constitués par la corrélation accrue des inhibiteurs du cycle cellulaire, y compris p16INK4a, p21WAF1/CIP1, p53, ARF, p15 et p27, et par la corrélation inverse avec certaines protéines liées à la prolifération. Les dernières études ont démontré que les cellules sénescences ont la capacité de relarguer tout un panel de molécules assemblées sous le nom SAPS (senescence-associated secretory phenotype) (Low, Alimohammadiha et al. 2021).

4. Les ROS et les défenses antioxydantes dans la peau

Le stress oxydant est considéré comme le principal mécanisme du photovieillissement. C'est aussi un mécanisme majeur de plusieurs pathologies. Il se définit par un déséquilibre entre une forte concentration en espèces réactives de l'oxygène et un système antioxydant pas suffisamment efficace pour les neutraliser.

4.1. Les différents ROS

Le terme « espèces réactives de l'oxygène » ou ROS se réfère aux métabolites secondaires dérivés de la réduction de l'oxygène. Ces molécules sont chimiquement instables du fait de la présence d'un ou de plusieurs électrons non appariés sur leurs couches périphériques. Chaque espèce possède une structure différente et est caractérisée par son temps de demi-vie et son degré d'instabilité. Les principales formes d'espèces réactives de l'oxygène sont présentées dans le Tableau 2 et la Figure 14.

Espèces réactives	Formule	Demie vie	Propriétés
L'Oxygène Singulet	$^1\text{O}_2$	microsecondes	Très réactif et instable Produit directement sous l'effet des UV sur dioxygène
L'Anion Superoxyde	$\text{O}_2^{\cdot-}$	microsecondes	Moins réactif Précurseurs des autres ROS Intervient dans la signalisation
Le Peroxyde d'Hydrogène	H_2O_2	minutes	Plus stable Génération du radical hydroxyle
Le Radical Hydroxyle	$\text{OH}^{\cdot}$	nanosecondes	Très réactif et instable Toxicité très élevée
Le Radical Péroxy	$\text{ROO}^{\cdot}$	secondes	Peroxydation lipidique
Le Peroxynitrite	ONOO^-	millisecondes	Très réactif Engendre des oxydations irréversibles
Le Monoxyde d'Azote	$\text{NO}^{\cdot}$	secondes	Signalisation

Tableau 2: Les espèces réactives de l'oxygène et leurs propriétés

4.1.1. L'oxygène singulet

Le $^1\text{O}_2$ fait partie des ROS non radicalaires produits par transfert d'énergie à l'oxygène moléculaire, généralement sous l'effet direct des UV. Cette espèce joue un rôle crucial dans les défenses antimicrobiennes. En revanche, en fonction du site de sa production dans la cellule, il

peut initier la mort cellulaire par apoptose (Ogilby 2010). L' $^1\text{O}_2$ est neutralisé par le β -carotène, l' α -tocophérol.

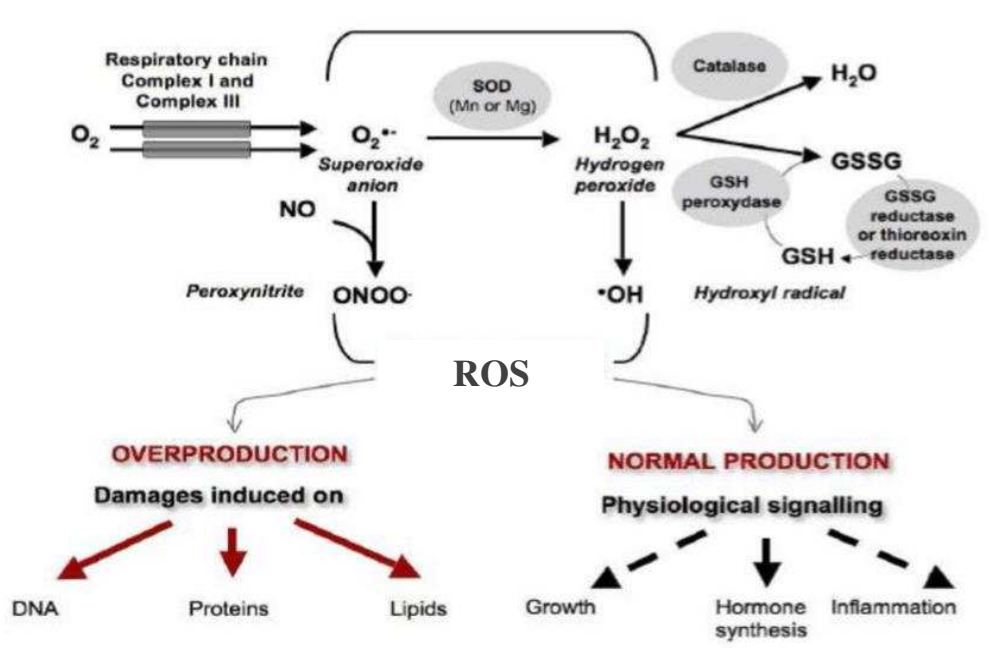


Figure 14 : La cascade de formation des ROS au niveau cellulaire.

Adapté de (Nadipelly 2017).

4.1.2. L'anion superoxyde

Entre 0,1 et 0,2% de l'oxygène consommé par la mitochondrie est transformé en radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Ce taux est mesuré dans les conditions physiologiques en oxygène (Tahara, Navarete et al. 2009). L'anion superoxyde est moins réactif que les autres ROS mais il représente un précurseur de diverses espèces qui le sont davantage. Le $\text{O}_2^{\bullet-}$ est dismuté en H_2O_2 suite à une réaction catalysée *via* les enzymes superoxyde dismutases (SOD) (Figure 15).

4.1.3. Le peroxyde d'hydrogène

Bien que H_2O_2 ne soit pas un radical, ses caractéristiques, sa longue demi-vie et sa capacité à pénétrer les tissus biologiques, font de lui un oxydant très puissant. H_2O_2 est capable de donner naissance, *via* des réactions de Fenton, à la plus délétère des espèces radicalaires du stress oxydant : le radical hydroxyle ($\text{OH}^{\bullet}$). Le peroxyde d'hydrogène peut être neutralisé par les enzymes catalases et les glutathion peroxydases (voir la partie 4.5 sur les antioxydants).

4.1.4. Le radical hydroxyle

Le $\text{OH}^\bullet$ est le radical le plus puissant qui peut être généré dans la cellule. Il est très réactif avec toutes les molécules biologiques (protéines, lipides, ADN) et joue un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS (Di Meo, Reed et al. 2016).

4.1.5. Les autres ROS

Il existe également d'autres ROS secondaires, comme les radicaux peroxylysés $\text{RO}_2^\bullet$, les hydroperoxydes RO_2H et les radicaux alkoxydes $\text{RO}^\bullet$. De plus, il existe d'autres espèces azotées, qui sont des oxydants très puissants, comme le monoxyde d'azote, $\text{NO}^\bullet$, ou le peroxydinitrite, ONOO^- .

4.2. Les principales sources de ROS

Dans la peau, les ROS proviennent de 2 sources majeures : les ROS endogènes produits par les cellules et les ROS exogènes qui viennent principalement de l'exposome et qui peuvent provoquer une réponse de ROS endogènes par les cellules cutanées.

Dans la peau saine, tous les types cellulaires produisent des ROS (Korkina and Pastore 2009). Les fibroblastes et les autres cellules produisent de larges quantités d'anions superoxydes par la chaîne respiratoire mitochondriale (Jeney, Bazzó-Dombi et al. 2000). Les mélanocytes et les kératinocytes produisent du peroxyde d'hydrogène et des radicaux superoxydes par la réaction des UV avec la pheomélanine (Pelle, Mammone et al. 2005).

4.2.1. Les ROS endogènes

Les ROS endogènes sont produits dans de multiples compartiments cellulaires : au niveau des mitochondries, de la membrane plasmique, du cytosol, des peroxysomes et du réticulum endoplasmique (Srivastava, Karlsson et al. 2018). Ils proviennent du métabolisme cellulaire ou sont produits en réaction à une agression.

4.2.1.1. La production des ROS par les complexes de la chaîne respiratoire

La respiration mitochondriale est assurée par des complexes protéiques situés au niveau de la membrane interne. Ces complexes transportent des électrons issus de l'oxydation des NADH_2 et FADH_2 vers l'accepteur final l'O_2 . En parallèle, ils transloquent des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient électrochimique qui permet à la fin la synthèse de l'ATP. Durant cette réaction, des électrons échappent à cette chaîne de transport induisant la formation des ROS mitochondriaux qui représentent 90% des

ROS de la cellule (Balaban, Nemoto et al. 2005). Environ 0.2% de l'oxygène consommé par la mitochondrie est converti en ROS, principalement en superoxyde. Il s'agit d'une quantité très faible, cependant, compte tenu de la forte activité des mitochondries, la fuite d'électrons d'origine mitochondriale semble être la source majoritaire de ROS dans la cellule (Lambert and Brand 2009).

Plusieurs études ont montré le rôle de la mitochondrie dans le maintien de l'homéostasie cutanée. En effet elle intervient dans la pigmentation, la différenciation épidermique et la prolifération. Un dysfonctionnement de cet organe engendre plusieurs conséquences, notamment une surproduction des ROS comme c'est le cas dans le photovieillissement (Sreedhar, Aguilera-Aguirre et al. 2020).

4.2.1.2. La production des ROS au niveau du cytosol et de la membrane plasmique

De nombreuses enzymes cytosoliques génèrent des ROS au cours de leur activité catalytique. La xanthine oxydase qui catalyse la production d'acide urique à partir de l'hypoxanthine produit de l'anion superoxyde. Dans la peau, cette enzyme est suractivée dans les kératinocytes en phase de différenciation finale, exactement dans la couche granuleuse de l'épiderme et elle a un rôle dans les défenses de la peau contre les agents extérieurs (Reiners and Rupp 1989). Les UV induisent également la suractivation de cette enzyme au niveau des kératinocytes et donc la production du superoxyde (Deliconstantinos, Villiotou et al. 1996).

La cyclooxygénase et la lipoxygénase génèrent les prostaglandines, des leucotriènes et des ROS à partir de l'acide arachidonique. Le niveau d'acide arachidonique est généralement faible, mais il augmente dans la peau en raison de maladies inflammatoires cutanées, y compris le psoriasis, la dermatite atopique et le vieillissement (Ziboh, Miller et al. 2000).

La NAD(P)H oxydase (NOX) est une enzyme liée à la membrane cytoplasmique, dont l'activité est de générer le $O_2^{\cdot-}$ par le transfert des électrons du NADPH cytosolique vers une molécule d'oxygène *via* une molécule de FAD. Le superoxyde est impliqué dans la signalisation intracellulaire et la phagocytose des microorganismes (Bedard and Krause 2007).

Dans le cytosol, le fer de la cellule et des organites réagit avec l'oxygène en formant des ROS. Dans la réaction de Haber-Weiss, le fer ferrique réagit avec le superoxyde pour former le fer ferreux. Dans la réaction de Fenton, le fer ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène,

régénérant le fer ferrique et le radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$) et l'hydroxyde (OH^-) très réactifs, deux radicaux nocifs.

4.2.1.3. La production des ROS au niveau des peroxysomes et de réticulum endoplasmique

Les mitochondries ont longtemps été considérées comme la principale source de ROS cellulaires, mais plus récemment, il a été montré que le réticulum endoplasmique ainsi que les peroxysomes produisent autant voire plus de ROS que les mitochondries.

Les peroxysomes constituent une réserve d'enzymes qui sont impliquées dans l'oxydation des acides gras et des acides aminés. Lors de cette activité il y a formation de H_2O_2 qui diffuse dans le cytosol (Fransen, Nordgren et al. 2012).

Le réticulum endoplasmique joue un rôle crucial dans le repliement, les modifications post-traductionnelles et le transport des protéines après leur synthèse au niveau de l'appareil de Golgi. Au niveau de cette organelle, la génération de ROS et particulièrement de superoxyde, se fait principalement par l'activité de l'enzyme disulfure isomérase responsable de la synthèse des ponts disulfures entre les chaînes polypeptidiques des protéines. Cette réaction produit environ 25% des ROS au niveau du réticulum endoplasmique (Tu and Weissman 2004) (Zeeshan, Lee et al. 2016).

4.2.2. Les ROS exogènes

La peau est à l'interface entre l'organisme et l'environnement extérieur et est donc constamment exposée aux radiations solaires, aux polluants ou à d'autres agressions mécaniques et chimiques qui sont également capables de générer des ROS dans les différentes couches de la peau (Poljšak and Dahmane 2012) (Kammeyer and Luiten 2015).

4.2.2.1. La production des ROS par les UV

Les UVA sont connus pour provoquer indirectement des dommages aux biomolécules cutanées. Ceci se fait *via* l'induction de la production de ROS, notamment au niveau des tissus profonds, en raison de leur capacité à pénétrer dans le derme. Les UVA sont absorbés par des photosensibilisateurs endogènes cutanés, tels que la riboflavine, la quinine, le tryptophane, et ceci provoque une cascade de réactions. En effet, ces molécules passent à un état chimiquement instable, nommé état excitation singulet. Le retour ensuite à l'état fondamental s'accompagne de l'émission soit de chaleur, soit de fluorescence, soit par photophosphorylation conduisant à un état excité triplet. La molécule interagit alors avec l'oxygène moléculaire et entraîne la

formation de $O_2^{\bullet-}$ (de Jager, Cockrell et al. 2017) (Rinnerthaler, Bischof et al. 2015). La présence d'anions superoxydes initie alors la chaîne de production d'autres ROS suivant les réactions illustrées dans la Figure 15.

Bien que les rayons UVB produisent plutôt des dommages directs à l'ADN, la production de ROS est également induite par l'effet des UVB mais d'une manière indirecte, *via* les dommages à l'ADNmt. Ce dernier est altéré avec création de mutations dans les gènes codant pour les éléments de la chaîne respiratoire. Ceux-ci étant moins performants, il y a une augmentation de la fuite des électrons de la chaîne respiratoire donc production de ROS (Rinnerthaler, Bischof et al. 2015, Naidoo and Birch-Machin 2017).

Par ailleurs, il a été décrit que l'exposition aux UV entraîne une perturbation des enzymes antioxydantes dans les tissus cutanés (voir la section suivante 4.5 sur les antioxydants), conduisant à l'augmentation du taux de ROS et du stress oxydant.

4.2.2.2. La production des ROS par les polluants ou autres facteurs extérieurs

Les ROS sont générés également par les polluants, notamment des nanoparticules et des gaz tels que le dioxyde d'azote et l'ozone. Les nanoparticules sont capables de pénétrer les couches de la peau jusqu'aux kératinocytes des couches vivantes et elles s'accumulent dans les mitochondries, induisant la production de ROS (Li, Sioutas et al. 2003). Par ailleurs, les polluants ont la capacité de diminuer le taux des antioxydants comme l'acide ascorbique, le tocophérol ou le glutathion. Il en résulte une exacerbation des effets du stress oxydant. Les polluants ont la capacité de modifier la composition lipidique de la couche cornée et induisent la peroxydation lipidique (Valacchi, Sticozzi et al. 2012), ce qui fragilise la barrière cutanée et perturbe le microbiote cutané notamment dans les dermatites allergiques (Xu, Yan et al. 2011). L'ozone peut induire des dommages oxydatifs *via* l'activation du facteur de transcription AhR. L'activation de cette voie induit une réaction inflammatoire et la sécrétion des médiateurs inflammatoires, par conséquent, une production de ROS au niveau des kératinocytes (Kim, Kim et al. 2014) (Afaq, Zaid et al. 2009). L'activation de AhR est impliquée dans la stimulation de l'activité de la tyrosinase et les perturbations de la pigmentation surtout chez les personnes âgées (Luecke, Backlund et al. 2010).

4.3. Les principales cibles des ROS

4.3.1. L'ADN

Les ROS en excès sont capables d'endommager l'ADN nucléaire et l'ADNmt. La principale réaction est la formation de 8-oxoguanine à partir de l'hydroxyle et l'oxygène singulet avec des bases guanine. Cette base modifiée peut alors se lier avec une adénine, au lieu d'une cytosine, favorisant ainsi une transition de GC à TA et ainsi l'apparition de mutations au niveau de l'ADN. La modification de l'information génétique est la cause principale de la cancérogenèse et du vieillissement (Cooke, Evans et al. 2003).

4.3.2. Les lipides

Par ailleurs, les ROS peuvent oxyder les lipides cellulaires par une réaction en chaîne, la peroxydation lipidique. Cette réaction est déclenchée par l'oxydation des acides gras polyinsaturés qui constituent les membranes plasmiques. Ceci génère les radicaux les plus puissants, le $\text{ROO}^\bullet$ et le ROOH , qui sont capables de propager cette réaction (Finaud, Lac et al. 2006). Ces oxydants puissants génèrent des hydroperoxydes dans la cellule, le plus connu est le dialdéhyde malonique qui est utilisé comme biomarqueur de la peroxydation lipidique (Guichardant, Bacot et al. 2006). Ce processus est très dommageable pour la cellule parce qu'il affecte principalement l'intégrité de ses membranes (cytoplasmique, mitochondriale et lysosomiale), en modifiant leur structure, leur fluidité, leur perméabilité ainsi que les fonctions des protéines qui se retrouvent à leur surface (Catalá 2012).

4.3.3. Les protéines

Les protéines sont les plus nombreuses dans les cellules et sont aussi sensibles aux effets des ROS. Les protéines peuvent être oxydées par les ROS à la fois sur leurs squelettes et sur les chaînes latérales de leurs acides aminés. Le radical hydroxyle est le plus connu pour endommager les protéines. Il est capable de former le radical pyroxyde en arrachant un atome d'hydrogène sur les carbones des chaînes polypeptidiques, et générer ainsi des groupes carbonyles (Finaud, Lac et al. 2006). Ou bien il peut s'attaquer à plusieurs acides aminés sensibles aux modifications oxydatives (prolines, arginine, méthionines, cystéines), entraînant la formation par exemple de sulfoxydes de méthionine, de ponts disulfures (Phaniendra, Jestadi et al. 2015). Ces modifications sont irréversibles et induisent des changements conformationnels de la chaîne polypeptidique. Par conséquent, elles peuvent induire une

inactivation partielle ou totale de la fonction de la protéine (enzymes, récepteurs, protéines des transports).

4.4. Les voies de signalisation activées par les ROS

Une des conséquences de la production de ROS est l'activation par la cellule de différentes voies de signalisation. En effet, une production basale de ROS joue un rôle majeur dans la régulation des fonctions cellulaires, telles que, le métabolisme énergétique, la prolifération, la différenciation et le cycle cellulaire (Dröge, 2002). Alors que, une surproduction de ROS induit la transcription d'une batterie de gènes impliqués dans l'inflammation, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et les défenses antioxydantes (Beckhauser et al., 2016).

4.4.1. La voie MAPK et la synthèse des MMPs

Les espèces réactives de l'oxygène activent la voie de signalisation MAPK. Les ROS activent les kinases (ERK, p38, JNK) de la famille MAPK, lesquelles induisent la translocation des facteurs de transcription C-JUN, et C-Fos dans le noyau, permettant ainsi la transcription du facteur AP-1. Ce dernier est responsable de la surexpression des MMPs (Shaulian and Karin 2002).

Les MMPs jouent un rôle majeur dans la dégradation de la MEC. Dans le vieillissement de la peau, le collagène est d'abord clivé par MMP1 et ensuite dégradé par MMP3 et MMP9, qui sont les MMPs les plus exprimés dans les peaux âgées (Fisher, Datta et al. 1996). Dans une peau saine, l'action des MMPs est inhibée par les TIMPs (inhibiteurs de métalloprotéinases). Dans les peaux plus âgées, les MMPs sont surexprimées par des kératinocytes et des fibroblastes alors que l'expression des TIMPs reste inchangée, ce qui conduit à la dégradation des composants de la MEC (Quan, Little et al. 2013).

En outre, la surexpression des MMP1, 3, 9 passe aussi par le facteur de transcription NF- κ B activé par les UV dans le cas du photovieillissement (Lee, Noh et al. 2012).

Par ailleurs, l'activation de AP-1 par les ROS conduit à l'inhibition de la voie TGF β /Smad qui est la voie majeure dans la biosynthèse des composants de la MEC. Elle contrôle la synthèse du collagène mais aussi sa dégradation en maintenant un équilibre entre les MMPs et TIMPs, équilibre indispensable pour l'intégrité structurelle et mécanique du tissu dermique (Nagase, Visse et al. 2006) (Kim, Kim et al. 2020).

4.4.2. L'axe Keap1-Nrf2, régulateur de la signalisation dans le stress oxydant

En cas de stress oxydant, les cellules activent la voie de signalisation Keap1-Nrf2, qui est une voie de signalisation cruciale dans la détoxification par les antioxydants. Cette voie est médiée par le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2) -like 2), responsable de la transcription d'une batterie de gènes antioxydants. Dans la peau, son rôle a été mis en évidence en 2002, avec son implication dans la cicatrisation cutanée (Braun, Hanselmann et al. 2002). Depuis, plusieurs recherches ont été concentrées sur Nrf2 dans les différents axes physiopathologiques de la peau. Cette voie aujourd'hui attire un fort intérêt en raison de son implication dans plusieurs pathologies où le stress oxydant est le mécanisme majeur, tels que les cancers (Taguchi and Yamamoto 2017), les maladies cardiovasculaires (Chen and Maltagliati 2018), les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Fão, Mota et al. 2019).

En conditions d'homéostasie, Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme par l'intermédiaire de son inhibiteur, la protéine Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein) qui est ancrée dans les filaments d'actine. C'est une protéine riche en résidus cystéines, ce qui la rend sensible aux modifications redox dans la cellule. En effet, deux protéines Keap1 se fixent sur des domaines spécifiques de Nrf2 et ainsi le complexe est retenu dans le cytoplasme. Keap1 agit également comme un adaptateur pour l'ubiquitine ligase E3, qui est responsable de l'ubiquitination permanente de Nrf2, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. Ainsi ce complexe assure la régulation du taux basal minimum de Nrf2.

En réponse à un stress oxydant, l'oxydation par les ROS des cystéines 151 et 288 des domaines de Keap1 induit la dissociation du complexe. De ce fait, Nrf2 s'accumule dans le cytoplasme et par la suite est transloqué dans le noyau où il forme un complexe hétérodimère avec la protéine small MAF (sMAF). Au niveau nucléaire, ce complexe se lie de manière spécifique aux séquences dites « Antioxidant response element » (ARE) qui se trouvent dans la région promotrice de ses gènes cibles (Figure 15). Des études transcriptomiques ont montré que Nrf2 régule l'expression de près de 500 gènes, dont les enzymes antioxydantes (*SODs*, *CAT*, *GPXs*), des enzymes de détoxification, des protéines de réponse au stress et des enzymes métaboliques (Figure 16)(Bellezza, Giambanco et al. 2018).

L'activité de Nrf2 est détectée davantage dans les couches superficielles de l'épiderme. Puis, elle décroît avec la profondeur et elle est moins active au niveau des kératinocytes de la couche basale, constituant ainsi un gradient d'expression de ses gènes cibles (Lee, Shin et al. 2014), en

corrélation avec le gradient d'expression des enzymes antioxydantes dans la peau. Le maintien du taux basal de Nrf2 est indispensable pour la fonction barrière de l'épiderme. En effet des souris transgéniques surexprimant Nrf2 dans l'épiderme montrent une altération de la barrière lipidique, une inflammation dans l'épiderme et également une hyperprolifération des kératinocytes (Schäfer, Farwanah et al. 2012).

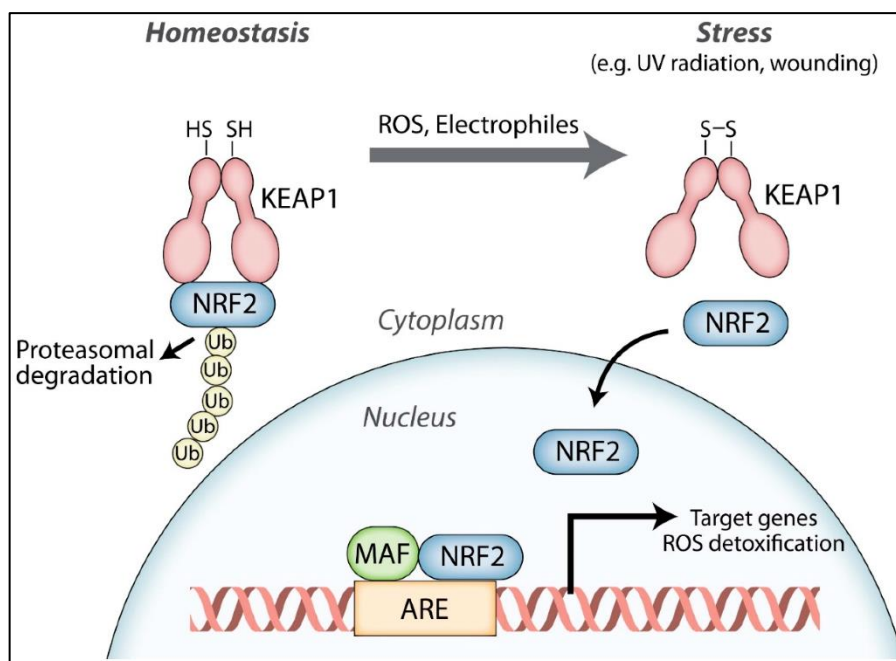


Figure 15 : La voie de signalisation de Nrf2-keap1.

Adaptée de (Hiebert and Werner 2019).

L'irradiation aux UVA induit l'activation de Nrf2 et l'accumulation des enzymes antioxydantes dans les fibroblastes (Zhong, Edwards et al. 2010). Cependant, il n'y a pas d'activation de Nrf2 dans des kératinocytes irradiés à des doses faibles, alors que les produits chimiques électrophiles activent Nrf2 et induisent sa translocation dans le noyau et l'expression des gènes cibles (Durchdewald, Beyer et al. 2007). Par ailleurs, dans des souris déficientes en Nrf2, les UVB sont capables d'induire une forte inflammation au niveau des couches cutanées, montrant que Nrf2 joue un rôle important dans la protection de la peau contre les UV (Kawachi, Xu et al. 2008).

4.5. Les systèmes antioxydants et leurs mécanismes d'action

Les antioxydants sont définis comme des molécules qui peuvent neutraliser les ROS et empêcher l'oxydation de l'ADN, des lipides et des protéines cellulaires. L'organisme possède deux principaux systèmes antioxydants, l'un enzymatique et l'autre non enzymatique. Les molécules telles que l'acide ascorbique, le glutathion (GSH), l'ubiquinol, l'acide urique, ou

encore la mélanine sont capables de réagir directement avec les ROS, empêchant ainsi leur réaction avec les autres composants cellulaires. D'autre part, des enzymes sont spécialisées dans la neutralisation de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène. C'est le cas des superoxydes dismutases (SODs), de la catalase et des glutathion peroxydases (GPXs). Ces deux systèmes fonctionnent de manière synergique pour neutraliser les ROS et, par conséquent, leurs effets (Krishnamurthy and Wadhwani 2012).

4.5.1. La distribution générale des antioxydants dans la peau

La peau est constamment soumise à des agressions extérieures. Son système antioxydant est en mesure d'éliminer les ROS induits de façon efficace et sans affecter son homéostasie. Il s'agit d'un réseau complexe et organisé dans les différentes couches de la peau selon le gradient lipophile / hydrophile de la peau. Cela se traduit par un gradient d'activité antioxydante, qui est dense dans la couche cornée et ensuite diminue en fonction de la profondeur comme c'est illustré dans la Figure 16.

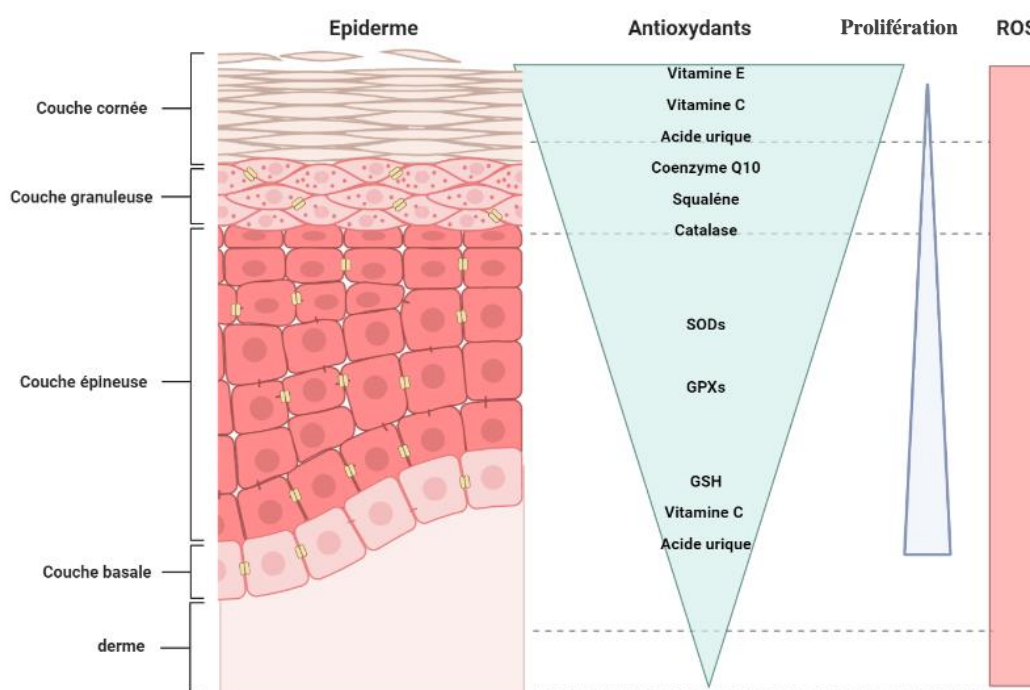


Figure 16 : La distribution des antioxydants dans les couches de la peau.

Crée avec le site BioRender.com

La couche cornée, au contact avec l'extérieur, est très riche en antioxydants non enzymatiques tels que la vitamine E, le GSH, la vitamine C, l'acide urique, le squalène, et le coenzyme Q10 (Thiele, Schroeter et al. 2001) (Wölflé, Seelinger et al. 2014). Au-dessous, les enzymes

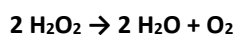
antioxydantes, comme la catalase, les SODs, les GPXs, et PRx (Peroxyrédoxine) sont abondamment présentes dans les couches où les kératinocytes sont à différents stades de différenciation et baignent dans une matrice lipophile (Pai, Shukla et al. 2014) (Wölfle, Seelinger et al. 2014). Le derme est riche en antioxydants non enzymatiques comme la vitamine C, l'acide urique et le GSH (Shindo, Witt et al. 1993). Les enzymes antioxydantes sont aussi présentes mais moins exprimées que dans l'épiderme (Shindo, Witt et al. 1994). De plus, la qualité et la quantité des défenses antioxydantes varient entre les femmes et les hommes. Elle est plus élevée chez les hommes que chez les femmes (Altobelli, Van Noorden et al. 2019). Des variations sont également observées en fonction de la période de l'année, comme la catalase qui est en quantité plus faible en été et plus élevée en hiver quand elle est mesurée chez la même personne (Hellemans, Corstjens et al. 2003). Au fil du temps, le système antioxydant perd de ses performances ce qui contribue au vieillissement. Une étude sur le *Caenorhabditis elegans* montre qu'une surexpression de la SOD et de la catalase induit une prolongation de la durée de vie de cet organisme (Melov, Ravenscroft et al. 2000).

4.5.2. Les enzymes antioxydantes dans la peau

La première ligne de défense contre les ROS dans la cellule est constituée par des enzymes : les Superoxyde Dismutases, les Glutathion Peroxydases et la catalase qui sont toutes des métalloenzymes. Chacune de ces enzymes possède son propre mode d'action et une localisation particulière dans la cellule. La modulation de leur expression est impliquée dans plusieurs processus physiopathologiques.

4.5.2.1. La catalase

La catalase est l'enzyme majeure dans la neutralisation du H₂O₂ cellulaire. Elle peut transformer rapidement des millions de molécules (~10⁷/sec) en oxygène et eau sans produire de ROS (Young and Woodside 2001).



C'est une protéine de 240 kDa codée par le gène *CAT* situé sur le chromosome 11. La catalase est constituée de quatre chaînes polypeptidiques identiques et chacune de ces sous-unités possède un groupe héminique qui est étroitement lié à une molécule de NADPH, jouant un rôle dans la stabilité de sa forme active (Goyal and Basak 2010). Il existe trois types de catalase : la catalase monofonctionnelle et la catalase-peroxydase contenant de l'hème, alors que la troisième famille, dites pseudo-catalase, contient dans ses sous-unités du manganèse (Glorieux and Calderon 2017). Dans la cellule, la catalase est localisée principalement dans les

peroxysomes où elle poursuit sa maturation avec l'association de ses sous-unités à l'hème (Otera and Fujiki 2012). Elle est également présente dans certains cas dans le cytosol, notamment lors d'un stress oxydant (Fujiki and Bassik 2021) et dans les fibroblastes sénescents (Legakis, Koepke et al. 2002).

Au niveau cutané, la catalase est surexprimée plus précisément au niveau de la couche cornée où elle dépasse largement l'expression des SODs. Ainsi, l'activité de la catalase est 720 % plus élevée dans l'épiderme humain que dans le derme sous-jacent (Shindo, Witt et al. 1994).

Des données contradictoires existent sur la variation de la capacité de défense antioxydante avec le vieillissement. La plupart des études n'ont pas révélé de différence liée à l'âge dans le niveau de la catalase dans la peau des souris (Lopez-Torres, Shindo et al. 1994), des rats (Tahara, Matsuo et al. 2001), ou dans les fibroblastes de la peau humaine (Keogh, Allen et al. 1996). Néanmoins, durant le processus de vieillissement, il a été rapporté une forte augmentation de la catalase dans l'épiderme mais une sous-expression dans le derme (SAGUET 2006). Il est intéressant de noter que l'activité de la catalase augmente de manière significative dans l'épiderme de la peau photovieillie (163%) et de la peau naturellement vieillie (118%), mais qu'elle est significativement plus faible dans le derme pour les deux types de vieillissement par rapport à la peau jeune (Rhie, Shin et al. 2001).

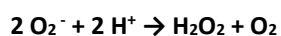
En revanche, d'autres études sur le vieillissement intra- et extrinsèque ont rapporté une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes, en particulier de la catalase, dans l'épiderme (Sander, Chang et al. 2002) et dans les fibroblastes du derme (Lu, Lee et al. 1999). En effet, dans le cas du photovieillissement, il a été décrit que seuls les UVA provoquent cette diminution de l'activité catalase dans des épidermes reconstruits, un effet encore amplifié dans des peaux claires (Maresca, Flori et al. 2006). L'irradiation aiguë ou chronique aux UVB n'a aucun effet sur l'activité de la catalase chez les souris (Iizawa, Kato et al. 1994).

La récupération complète de l'activité de la catalase se produit en 3-4 semaines après irradiation UV, un rythme dépendant de l'âge, suggérant que la catalase fonctionnelle doit être reconstituée à partir des couches cellulaires vivantes plus profondes (Hellemans, Corstjens et al. 2003). L'implication de la catalase dans le vieillissement cutané est controversée mais l'équipe de Rezvani *et al* a montré à plusieurs reprises que la surexpression de la catalase protège des dommages à l'ADN induits par les UVB dans des kératinocytes humains et dans des peaux reconstruites (Rezvani, Mazurier et al. 2006, Rezvani, Cario-André et al. 2007). De plus, une étude menée sur la délivrance des catalases et SODs dans la peau a montré une atténuation des effets des UV (Hammiller, Karuturi et al. 2017) (Sander, Chang et al. 2002),

En outre, l'altération de l'activité de la catalase est associée à plusieurs maladies cutanées comme le vitiligo, l'érythème polymorphe, la xérodermie pigmentosum (Hellemans, Corstjens et al. 2003). Cette diminution d'expression de la catalase est considérée comme l'un des biomarqueurs de ces maladies, et ceci montre également son importance dans la protection et l'homéostasie de la peau.

4.5.2.2. Les superoxyde dismutases

La dismutation du superoxyde en H_2O_2 est assurée par les enzymes superoxyde dismutases qui jouent un rôle central dans les réactions antioxydantes cutanées. Le peroxyde d'hydrogène généré est ensuite pris en charge par la catalase ou les glutathion peroxydases.



Chez l'homme, il existe trois isoformes de SODs distinctes : deux sont associées au cuivre et au zinc, la SOD1 qui est intracellulaire et la SOD3 qui est extracellulaire ; la dernière est associée au manganèse, la SOD2, qui est mitochondriale.

1) La superoxyde dismutase 1 (SOD1)

SOD1, l'isoforme la plus active, est un homo-dimère de 32 kDa possédant deux cofacteurs, Cu et Zn, qui assurent l'activité catalytique et la stabilité de l'enzyme respectivement.

Le gène *SOD1* est beaucoup étudié parce qu'il est localisé sur le chromosome 21. La région promotrice de ce gène engendre la fixation de nombreux facteurs de transcription (NFκB et AP-1), ce qui explique son implication dans diverses pathologies (Kim, Kim et al. 2011) telles que le syndrome de Down.

La localisation de la SOD1 dans la cellule est dans le cytoplasme. Plus récemment, une nouvelle localisation importante de la SOD1 a été rapportée. En effet, des niveaux élevés de H_2O_2 favorisent la translocation nucléaire de la SOD1 qui joue alors un rôle en tant que facteur de transcription. L'enzyme régule ainsi l'expression des gènes d'antioxydants. Ce phénomène a été démontré pour la première fois chez les levures, et dans des fibroblastes humains (Tsang, Liu et al. 2014). Récemment, l'équipe de Altobelli a également localisé la SOD1 au niveau nucléaire dans des explants humains (Figure17), ce qui souligne l'importance de ce nouveau rôle de la SOD1 comme un facteur de transcription dans la régulation des défenses antioxydantes dans la peau (Altobelli, Van Noorden et al. 2019) (Eleutherio, Silva Magalhães et al. 2021).

Dans la peau, la SOD1 est présente avec une distribution variable selon les différentes couches de l'épiderme et localisée plus dans les couches basales, en revanche elle est très peu exprimée dans le derme (Figure 18) (Altobelli, Van Noorden et al. 2019).

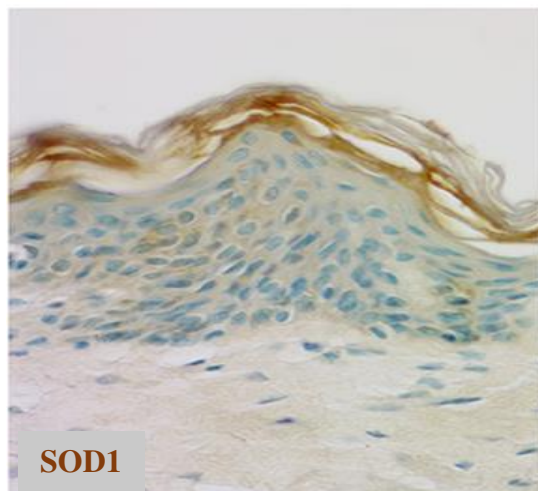


Figure 17 : L'expression protéique de la SOD1 dans un explant de peau.

Adapté de (Altobelli, Van Noorden et al. 2019)

Les souris *SOD1*^{-/-} sont caractérisées par une atrophie de la peau, équivalente à celle retrouvée chez des souris âgées normales (Murakami, Inagaki et al. 2009). Dans le vieillissement de la peau humaine, des données controversées sont également rapportées par la littérature sur la variation de l'expression de la SOD1. Dans des explants de peau, l'activité de la superoxyde dismutase n'est pas modifiée au cours des deux types de vieillissement cutané (Rhie, Shin et al. 2001). Par contre, une étude récente montre bien la diminution de la SOD1 selon l'âge, avec des niveaux plus élevés chez les jeunes sujets (Altobelli, Van Noorden et al. 2019). Ces résultats concordent avec une étude, selon laquelle l'activité enzymatique de la SOD1 tend à diminuer avec l'âge, notamment après 60 ans (Lu, Lee et al. 1999).

2) La superoxyde dismutase 2 (SOD2)

La SOD2 (ou Mn-SOD) est une protéine homotétramérique de 80 kDa. Chaque sous-unité contient un atome de Manganèse dans son site catalytique. Elle est codée par le gène *SOD2* localisé sur le chromosome 6 et sa région promotrice est régulée par plusieurs facteurs de transcription. Il s'agit d'une enzyme-clé dans le système antioxydant mitochondrial. Elle protège l'ADNmt de l'oxydation et des cassures par le superoxyde. L'ADNmt étant responsable de la transcription des enzymes de la chaîne respiratoire, une altération de ces dernières induit une production accrue de ROS et engendre une amplification des dommages cellulaires.

La SOD2 est une enzyme strictement mitochondriale (Karnati, Lüers et al. 2013). Dans la peau, sa localisation a été décrite dans un premier temps uniquement dans les kératinocytes basaux de l'épiderme humain (Kobayashi, Saito et al. 1993). Dans un second temps, une forte localisation dans la couche cornée a été aussi mise en évidence (Sander, Chang et al. 2002). Il a également été démontré que son expression est plus élevée dans l'épiderme que dans le derme (Sander, Chang et al. 2002).

La SOD2 joue un rôle important dans le vieillissement intrinsèque de la peau. En effet, une déficience de cette enzyme, dans des souris *SOD2^{-/-}*, montre une altération de l'activité du complexe mitochondrial II, provoquant ainsi une accumulation de ROS et des dommages à l'ADN induisant la sénescence des kératinocytes. Ce modèle murin se caractérise par une accélération de la différenciation terminale des kératinocytes et par une atrophie de l'épiderme (Velarde, Flynn et al. 2012). Par ailleurs, dans un modèle de vieillissement prématuré induit par une exposition chronique ou aiguë aux UVA, l'expression de la SOD2 est fortement élevée dans des fibroblastes humains (Poswig, Wenk et al. 1999). Cette surexpression de la SOD2 est aussi retrouvée chez des sujets qui présentent un vieillissement intrinsèque jusqu'à l'âge de 60 ans (Sander, Chang et al. 2002). Au-delà l'expression de toutes les enzymes antioxydantes diminue dans la peau. L'activité de la SOD2 correspond à un système d'adaptation instauré par les cellules de la peau afin de se protéger du niveau élevé de stress oxydant lié à l'âge (Borlon, Debacq-Chainiaux et al. 2007), (Treiber, Maity et al. 2012).

3) La superoxyde dismutase 3 (SOD3)

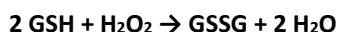
La SOD3 possède les mêmes cofacteurs que la SOD1, Cu et Zn. Elle a une masse de 135 kDa et possède une forte affinité pour l'héparine. Le gène *SOD3* est localisé sur le chromosome 4 et présente 40 à 60 % de similarité avec le gène *SOD1*. Sa région promotrice présente un élément de réponse pour AP1 et « antioxidant response element » ARE (Fattman, Schaefer et al. 2003).

La SOD3 est exclusivement extracellulaire. Elle est produite par les cellules et immédiatement excrétée. L'expression de la SOD3 est cellule- et tissu-spécifique. Elle est plus exprimée dans les poumons, le cœur, les vaisseaux sanguins, le placenta et les reins, ce qui n'est pas le cas pour les SOD1 et 2 (van der Vliet 2015). La SOD3 est également retrouvée dans la peau en niveau du derme et de l'épiderme. En particulier, elle est très abondante dans la matrice extracellulaire suite à sa sécrétion par les cellules endothéliales et les cellules du follicule pileux. Elle intervient dans la protection de la MEC (Kwon, Kim et al. 2012). La SOD3 est considérée comme l'enzyme qui varie le plus en fonction de l'âge (Adachi, Wang et al. 2000).

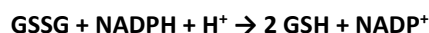
Il a été rapporté que l'induction de l'expression de la SOD3 se fait uniquement à des doses élevées d'irradiations UV. En revanche, dans la même étude, il a été montré que les SOD1 et 2 sont surexprimées à des doses faibles en UV (Kwon, Kim et al. 2012). Donc, l'expression de la SOD3 est induite par les UV qui arrivent jusqu'au derme. Par conséquent, la SOD3 peut prévenir le vieillissement de la peau. En effet, une étude récente a montré qu'elle favorise la production du collagène *in vitro* et *in vivo* par l'activation du TGFβ dans des fibroblastes dermiques humains et dans un modèle murin (Lee, Agrahari et al. 2021).

4.5.2.3. Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases (GPXs) neutralisent H₂O₂, d'une façon complémentaire à la réaction de la catalase. Il s'agit d'une enzyme sensible à de faibles quantités de H₂O₂, contrairement à la catalase. Sa réaction dépend de la présence de glutathion réduit (GSH). Ce dernier est le tripeptide (γ-L-Glutamyl-L-cystéinyglycine). C'est un antioxydant sous forme libre dans la cellule et il est utilisé par les GPXs comme donneur d'électrons.



Le glutathion oxydé (GSSG) est régénéré en GSH par la glutathionne réductase en présence de NADPH.



Les GPXs jouent un rôle crucial dans l'arrêt de la peroxydation des lipides durant le stress oxydant.

Il existe plusieurs isoformes de GPX (GPX1 à GPX8) qui diffèrent par leur localisation, leur structure et la spécificité de leur substrat. GPX1 et GPX4 sont exprimés par toutes les cellules et elles sont principalement situées dans le cytosol et dans la mitochondrie respectivement. Les autres sont exprimées de façon tissu-spécifique tel que GPX2 et GPX3 dans les intestins et dans les reins. Les GPXs sont formées de quatre sous-unités contenant chacune un cofacteur composé de sélénium ou de cystéine. En particulier, GPX1, GPX2, GPX3 et GPX4 possèdent un résidu de sélénium. Par conséquent, leur activité est limitée par la quantité de sélénium disponible dans les cellules (Tian, Geng et al. 2021).

Dans la peau l'activité GPX est importante. Une altération dans la fonction de GPX4 mène à une propagation de la peroxydation lipidique induisant une hyperplasie et une inflammation dans l'épiderme et le derme (Sengupta, Lichti et al. 2013). Cependant, l'expression des GPXs

ne semble pas être directement modifiée dans le vieillissement cutané. Par contre, l'activité de la glutathion réductase augmente dans l'épiderme intrinsèquement vieilli (Rhie, Shin et al. 2001). De plus, le cofacteur de ces enzymes, le sélénium, est impliqué dans le maintien de l'état prolifératif des kératinocytes souches en retardant leur sénescence, garantissant ainsi une bonne adhésion de l'épiderme avec le derme (Jobeili, Rousselle et al. 2017). En outre, le sélénium a un rôle cyto-protecteur. En effet il atténue les dommages induits par des UVA dans les kératinocytes, en favorisant la réparation de l'ADN (Favrot, Beal et al. 2018).

5. Les mécanismes cutanés modulés par le taux d'oxygénation

En conditions physiologiques, le taux d'oxygène cutané varie entre 1 % et 7 % (Grillon, Matejuk et al. 2012) (paragraphe 2.4). Toutefois, ce taux n'est pas correctement représenté lors des tests *in vitro* où les cellules se trouvent dans un milieu contenant 18,6 % d'oxygène au sein de l'incubateur (Place, Domann et al. 2017), condition de suroxygénation pour les cellules. Même s'il est connu que l'oxygène est impliqué dans divers mécanismes biologiques, le niveau d'oxygène dans les cultures *in vitro* a généralement été négligé jusqu'à ces dernières années. Récemment, des études ont commencé à se développer sur l'effet du taux d'oxygène sur les activités cellulaires, sur des cellules cutanées mais aussi sur d'autres types cellulaires comme les chondrocytes (Dennis, Whitney et al. 2020), les cellules souches adipocytaires (Chen, Tang et al. 2018) ou encore les cellules immunitaires (Shin, Huang et al. 2020). De nouveaux mécanismes sont mis en évidence en fonction du taux d'oxygène ou bien des clarifications plus argumentées des mécanismes déjà connus. Par exemple, la présence d'un complexe d'initiation à la traduction des protéines (eIF4E2) qui s'active en complémentarité avec le complexe classique connu déjà en normoxie (eIF4E), suggérant ainsi que le protéome des cellules en physioxie est différent de celui en normoxie (Timpano and Uniacke 2016). Plusieurs études ont montré l'importance de maintenir la physioxie de chaque tissu dans les cultures *in vitro* pour obtenir des résultats plus proches des conditions physiologiques. Par exemple, la culture des cellules tumorales dans leur environnement physioxique a montré une régulation différente de plusieurs voies de signalisation (Lgr5, Wnt, YAP1, et EpCAM) (Kumar, Adebayo et al. 2022) qui explique la résistance de ces cellules aux thérapies anticancéreuses. Un autre intérêt est de conserver la potentialité des cellules afin d'être réimplantées *in vivo* (Chen, Tang et al. 2018).

Nous verrons dans ce chapitre les principaux résultats connus actuellement sur le rôle du taux d'oxygénation sur les voies de signalisation, le métabolisme, les activités cellulaires et le stress oxydant.

5.1. La physioxie et la voie HIF1

HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1) est le facteur de transcription majeur dans la réponse cellulaire à un faible taux d'oxygène. Il est bien connu et beaucoup étudié dans le cas des tumeurs hypoxiques. HIF-1 joue un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire car il est responsable de la transcription de centaines de gènes impliqués dans la survie, la prolifération,

le métabolisme, l'angiogenèse, la migration, etc (Chowdhury, Hardy et al. 2008). HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités : HIF-1 α , dont la quantité est dépendante de l'oxygène, et HIF-1 β , avec une localisation nucléaire.

En présence d'oxygène, la sous-unité HIF-1 α est exprimée et est dégradée continuellement. Cette régulation implique une hydroxylation par la PHD2 (HIF prolyl hydroxylase domain-2). Cette enzyme est une dioxygénase donc son activité est dépendante de la présence de l'oxygène. Une fois HIF-1 α hydroxylé, il se lie ensuite à la protéine suppresseur de tumeur pVHL (von-Hippel Lindau), qui induit son ubiquitination *via* son activité E3 ubiquitine-ligase. Ceci conduit à la dégradation de HIF-1 α par le protéasome. En hypoxie, HIF-1 α n'est plus dégradé et, par conséquent, il s'accumule dans le cytoplasme et est transloqué ensuite dans le noyau. Au niveau nucléaire, il s'associe avec la sous-unité HIF-1 β et le complexe se fixe alors sur la séquence HRE (hypoxia responsive element) des promoteurs de ses gènes cibles (Gothié and Pouyssegur 2002) (Semenza 2007).

Il existe d'autres isoformes de HIF-1 α . HIF-2 α est une protéine présentant une certaine similitude avec HIF-1 α (environ 40% d'homologie) et il se lie à la plupart des mêmes séquences HRE des gènes cibles. La principale différence se situe au niveau de leur expression : HIF-1 α est exprimé d'une façon ubiquitaire alors que HIF-2 α est tissu-spécifique (dans les reins, les poumons, le cœur et les intestins) (Loboda, Jozkowicz et al. 2010). La seconde isoforme est HIF-3 α , également tissu-spécifique. Ce facteur est connu pour sa régulation négative de l'activité de HIF-1 α et HIF-2 α . En revanche, il cible également une multitude de gènes impliqués dans le métabolisme, comme GLUT1, qui est aussi parmi les gènes cibles de HIF-1 α et HIF-2 α (Yang, Wu et al. 2015). Néanmoins, des études transcriptomiques ont mis en évidence un panel de gènes qui sont régulés spécifiquement par HIF-3 α (Zhang, Yao et al. 2014).

Dans la peau l'expression de HIF-1 α est détectée dans l'épiderme, dans la couche basale qui possède un taux d'oxygène faible. HIF-1 α contrôle ainsi plusieurs fonctions physiologiques de la peau : il intervient dans la pigmentation, la prolifération, la migration et la synthèse de la matrice extracellulaire (Rezvani, Ali et al. 2011). Indépendamment de l'hypoxie, ce facteur de transcription est aussi sensible aux variations du taux de ROS. Les ROS induits directement dans le cytoplasme par les UV inhibent l'expression de HIF-1 α alors que ceux qui sont induits plus tard après irradiation *via* l'altération mitochondriale induisent l'expression de HIF-1 α .

(Rezvani, Ali et al. 2011). La voie HIF-1 est donc un des mécanismes qui régule les fonctions de la peau en conditions physiologiques.

5.2. La physioxie et la consommation de l'oxygène par les cellules cutanées

Lorsque l'oxygène qui pénètre dans les tissus atteint les cellules, cette molécule hydrophobe diffuse passivement à travers les membranes lipidiques pour rejoindre les mitochondries. C'est le siège de la synthèse de l'ATP qui est couplée à la consommation d'environ 95 % de l'oxygène cellulaire, au cours de la phosphorylation oxydative. C'est la cytochrome C oxydase, un complexe de la chaîne respiratoire, qui réduit l'oxygène en eau par un transfert d'électrons. Le cytochrome C mitochondrial a une forte affinité pour l'oxygène ce qui suggère qu'un niveau élevé en oxygène stimule l'activité de la cytochrome C oxydase. L'oxygène joue le rôle d'accepteur final dans cette chaîne de respiration (Kueh, Niethammer et al. 2013, Voet, Voet et al. 2016).

L'oxygène consommé par les cellules est mesuré à l'aide du taux de consommation d'oxygène appelé OCR (Oxygen Consumption Rate). Il correspond à la quantité totale d'oxygène consommé (en amol s⁻¹) rapporté au nombre de cellules d'un tissu. L'évaluation de l'OCR cutané est importante car il peut informer sur une dérégulation au niveau du métabolisme, particulièrement pendant les maladies ou encore pendant le vieillissement (Correia-Melo, Marques et al. 2016). Dans l'épiderme *in vivo*, l'OCR de la couche basale est de 10 amol/cellule/s, tandis que les cellules des couches superficielles ont un OCR plus faible (Bal, Mazhar et al. 2013, Liasi, Samatham et al. 2017). Ces niveaux bas reflètent un métabolisme réduit des kératinocytes cutanés, à la différence des tissus connus pour leur métabolisme élevé, tels que le foie, où l'OCR est de 200-400 nmol/cellule/s (Nahmias, Kramvis et al. 2006). Des études suggèrent que l'OCR s'accroît avec l'âge. En particulier, les fibroblastes âgés ont un OCR plus élevé et ceci peut être lié aux enzymes des mitochondries qui sont dérégulées chez ces sujets (Son, Sarsour et al. 2017).

Il est vraisemblable que la régulation de l'OCR soit dépendante de la disponibilité de l'oxygène. On peut donc s'attendre à une modification de l'OCR entre la physioxie et la normoxie. Une étude récente a montré pour la première fois que les kératinocytes cultivés en normoxie ont des niveaux plus élevés d'OCR ainsi qu'une plus forte production d'ATP par comparaison à ceux qui sont cultivés en physioxie (Shih, Lee et al. 2018). Dans ce travail, la période de culture en

physioxie est très courte, d'environ 24h, c'est pourquoi les changements observés pourraient être aussi liés à l'adaptation des kératinocytes à la condition de physioxie et ne pas refléter directement la différence entre les deux conditions de culture.

5.3. La physioxie et le métabolisme cellulaire

Le métabolisme énergétique sert à produire de l'ATP, la source d'énergie de toutes les cellules. Cette phosphorylation oxydative débute dans le cytosol par la dégradation du glucose en pyruvate qui sera oxydé ensuite dans la matrice mitochondriale. Les électrons générés par cette oxydation sont transportés le long de la chaîne respiratoire, accompagnés du transport de protons qui activent l'ATP synthase. Enfin, ces électrons sont transférés à l'oxygène, l'accepteur final. Sans ce dernier, aucune respiration cellulaire n'est possible. En condition anaérobie, les cellules s'adaptent pour réaliser la glycolyse dont le revenu en ATP est beaucoup plus faible et qui est accompagné par la production du lactate. Dans la peau, précisément dans l'épiderme, les kératinocytes utilisent plus la voie de la glycolyse que de la phosphorylation oxydative, suite au faible taux d'oxygène (Nguyen and Keast 1991). Des études ont montré que la glycolyse aide à conserver le potentiel prolifératif des cellules (Buravkova, Rylova et al. 2013).

Par ailleurs, une étude sur des fibroblastes et des kératinocytes montre que ces cellules ont un profil métabolique optimal dans leurs conditions de physioxie respectives (Kato, Sugimoto et al. 2021). Cependant, cette activité métabolique baisse toujours quand le taux d'oxygène passe au-dessus de 12%. Par ailleurs, les mitochondries de divers types cellulaires changent de structure en fonction des conditions, plutôt fusiforme en physioxie mais sphériques en normoxie, suggérant que les cellules en normoxie sont dans un état de stress (Timpano, Guild et al. 2019).

Très récemment, une analyse métabolomique des kératinocytes et des fibroblastes primaires à différents taux d'oxygène et différents temps de culture (Figure 18), montre des changements drastiques des métabolites produits. Dans les kératinocytes, en particulier, la condition de physioxie (2% O₂) produit un changement de métabolites clairement distinct par rapport aux conditions de normoxie et d'hypoxie (0.5% O₂) avec une position intermédiaire (Figure 19). En physioxie, les kératinocytes surexpriment un ensemble de gènes impliqués dans la voie des pentoses phosphate et la glycolyse. Par contre, les fibroblastes sont moins sensibles à ces variations d'oxygène, mais augmentent fortement l' α -acide cétooglutarique, un coactivateur de la prolyl hydroxylase, l'enzyme induisant la dégradation de HIF-1 α , et qui agit également

comme un antioxydant (Kato, Sugimoto et al. 2021). Ces modifications montrent l'adaptation des cellules à leur environnement physiologique.

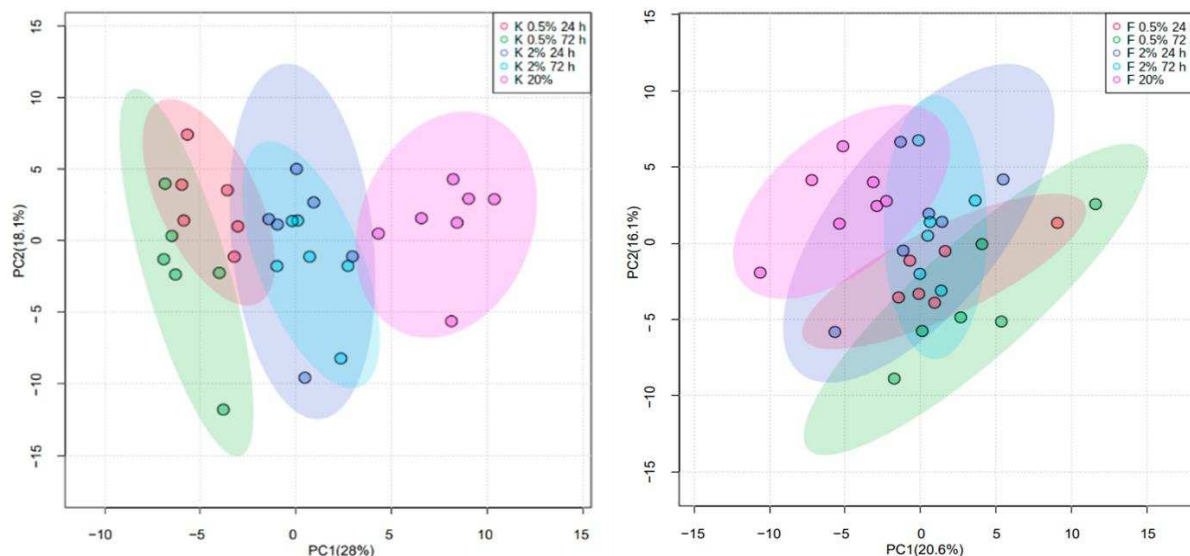


Figure 18 : L'analyse en composantes principales des métabolites des kératinocytes et des fibroblastes primaires. Des cellules cultivées dans les conditions suivantes : 0,5% O₂ pendant 24 et 72 heures, 2% O₂ pendant 24 h et 72h, ou bien 20 % d'O₂.

Adapté de (Kato, Sugimoto et al. 2021)

Cultivés en physioxie, les fibroblastes et les kératinocytes se caractérisent par une surexpression des gènes clés du métabolisme cellulaire, notamment le transporteur de glucose 1 (GLUT1), l'isozyme 1 de la pyruvate déshydrogénase lipoamide kinase (PDK1). Ces gènes sont contrôlés en particulier *via* le facteur de transcription HIF-1 et contribuent à la reprogrammation et à l'adaptation du métabolisme cellulaire aux conditions de faible teneur en oxygène (Mieremet, Vázquez García et al. 2019).

D'autres données montrent au contraire un effet inverse avec une diminution des niveaux d'OCR et par conséquent de la production d'ATP en physioxie. Ceci est accompagné par une réduction de la masse mitochondriale ainsi que sa densité. Cependant, le taux de lactate reste inchangé entre physioxie et normoxie montrant que la glycolyse n'est pas affectée. Ces résultats suggèrent donc une réduction du métabolisme énergétique des kératinocytes en physioxie (Shih, Lee et al. 2018). Ces données ont été obtenues dans une culture de 24 h à 5% O₂, conditions étant comme une phase d'adaptation de ces cellules vers leur environnement physioxique. Une diminution du métabolisme a également été démontrée dans une étude sur des kératinocytes buccaux cultivés à 2% d'oxygène et pendant une période de 96 heures (Kato, Izumi et al. 2014). Suggérant ainsi que les kératinocytes en physioxie produisent leur énergie préférentiellement par la voie de la glycolyse afin de conserver leur pouvoir prolifératif comme les cellules souches (Buravkova, Rylova et al. 2013).

5.4. La prolifération et la sénescence en physioxie

Le lien entre la prolifération des cellules de la peau et les différents niveaux d'oxygénation est établi depuis des années (Pentland and Marcelo 1983). Comme ce tissu est en constante régénération, le pouvoir prolifératif de ses cellules est donc élevé, en particulier celui des kératinocytes. Toutefois, leur prolifération fait l'objet d'une régulation fine pour deux raisons principales. D'une part, pour que les cellules souches épidermiques n'entrent pas en sénescence et d'autre part pour éviter l'hyperprolifération, qui est liée à l'apparition de cancers, en particulier dans les mélanomes.

Une forte prolifération des kératinocytes et des fibroblastes en condition de physioxie a été observée et corrélée à la diminution des activités de p21 et de la β -galactosidase, deux marqueurs de sénescence. Ceci suggère que la physioxie favorise un état prolifératif et indifférencié, empêchant ces cellules de passer à un état de sénescence, en opposition avec ce qui est observé en normoxie (Kato, Izumi et al. 2014) (Shih, Lee et al. 2018). En normoxie, les kératinocytes perdent leur capacité de croissance et elles présentent davantage de marqueurs de différenciation (Koh, Szeverényi et al. 2020). Ces résultats sont controversés par 2 études qui montrent au contraire une absence d'effet ou une diminution de prolifération des kératinocytes en physioxie comparativement à la normoxie (Ross, Alston et al. 2011, Mieremet, Vázquez García et al. 2019).

5.5. La différenciation en physioxie

La différenciation des kératinocytes de l'épiderme est indispensable pour assurer le renouvellement de la peau, mais un pool de kératinocytes prolifératifs est précieusement conservé dans la couche basale de l'épiderme où le taux d'oxygène est très faible. Ce microenvironnement presque hypoxique aide à conserver les cellules dans un état indifférencié (Mohyeldin, Garzón-Muvdi et al. 2010). En revanche, ces cellules en culture en normoxie (21% d'O₂) présentent davantage de marqueurs de différenciation tels que la kératines K10, l'involucrine et la filaggrine. Cependant, elles expriment moins de biomarqueurs potentiels des cellules souches dans l'épiderme tels que les kératines K7 et K15 (Koh, Szeverényi et al. 2020). Cette différenciation précoce en normoxie est liée à l'activité du facteur de transcription AP1. Ce facteur se lie à des promoteurs de gènes de la différenciation des kératinocytes, et les promoteurs des gènes des enzymes prooxydantes comme la cyclooxygénase-2 et induit leur transcription (Eckert, Adhikary et al. 2013).

5.6. La migration en physioxie

La migration des cellules de la peau est un processus clé dans la cicatrisation des plaies et qui dépend aussi de l'oxygène. En effet, les kératinocytes primaires des sujets jeunes cultivés en physioxie (4%) migrent plus vite que ceux cultivés en normoxie. Cependant, les mécanismes de régulation exacts restent inconnus. Dans cette même étude, les kératinocytes âgés répondent de façon inverse et migrent plus rapidement en normoxie (Ross, Alston et al. 2011). Ces résultats suggèrent une forte relation entre la migration, le taux d'oxygène et l'âge. Par conséquent, ces résultats représentent une voie intéressante d'étude de la cicatrisation chez les personnes âgées. Dans le cas des fibroblastes de la papille dermique, il a été montré également une migration plus rapide en condition de physioxie et que ceci dépend du stress oxydant, mécanisme majeur impliqué dans la signalisation de ces cellules et dans la cicatrisation (Upton, Hannen et al. 2015).

5.7. La modulation du stress oxydant en physioxie

5.7.1. L'influence sur le taux de ROS

Le niveau de ROS est la principale indication de l'état redox des cellules de la peau et leur production est dépendante de plusieurs facteurs, notamment l'oxygène du micro-environnement.

La consommation d'oxygène cellulaire a toujours été décrite comme étant positivement corrélée avec la production de ROS. Toutefois, il s'agit d'un principe très controversé puisque des études ont montré que la production de ROS n'augmente pas nécessairement avec la tension d'oxygène, à moins que les cellules s'adaptent par l'élévation de leur métabolisme et leur activité mitochondriale (Balaban, Nemoto et al. 2005).

L'augmentation de ROS en normoxie a été rapportée dans les cellules musculaires, qui présentent un taux de ROS élevé comparé à celles cultivées en physioxie (6%) et elles semblent être dans un état de stress oxydant permanent. Pour s'adapter, elles surexpriment les enzymes antioxydantes (McCormick, Pearson et al. 2016). Ce processus est également observé au niveau des cellules primaires de kératinocytes (Ferguson, Smerdon et al. 2018).

Dans des cultures de fibroblastes et de mélanocytes cutanés en normoxie il a été montré également l'induction d'un stress oxydant par l'augmentation de taux de ROS (Upton, Hannen et al. 2015, Abreu and Reis 2021). Ce dernier impacte la différenciation, la motilité, la prolifération ainsi que la morphologie des cellules. Il a été montré que la condition de normoxie perturbe la communication entre ces deux types cellulaires dans un modèle de coculture *in vitro*,

en conséquence, ils suggèrent que la physioxie semble être le meilleur environnement physiologique tel que dans la peau *in vivo* (Abreu and Reis 2021).

5.7.2. La régulation de la voie Nrf2 en physioxie

La diminution du stress oxydant en physioxie peut aussi être liée à la voie de signalisation médiée par le facteur Nrf2. En effet, un lien entre Nrf2 et l'oxygène a été reporté pour la première fois récemment dans des cellules primaires endothéliales (Chapple, Keeley et al. 2016). Dans cette étude, la condition de physioxie n'induit pas de différence dans l'accumulation de Nrf2 dans le noyau et sa liaison à l'ADN reste inchangée par rapport à la condition de normoxie. En revanche, l'expression de ses gènes cibles diminue, notamment celle de HO-1. Il a été démontré qu'en physioxie un autre facteur de transcription est surexprimé et se trouve aussi présent dans le noyau, Bach1 (BTB Domain And CNC Homolog 1, en anglais). Il rentre en compétition avec Nrf2 pour la fixation sur certains promoteurs des mêmes gènes codant pour les antioxydants. Cependant, à l'inverse de Nrf2, il inhibe leur transcription. La Figure 19 résume cette voie de signalisation et les modifications en physioxie (Chapple, Keeley

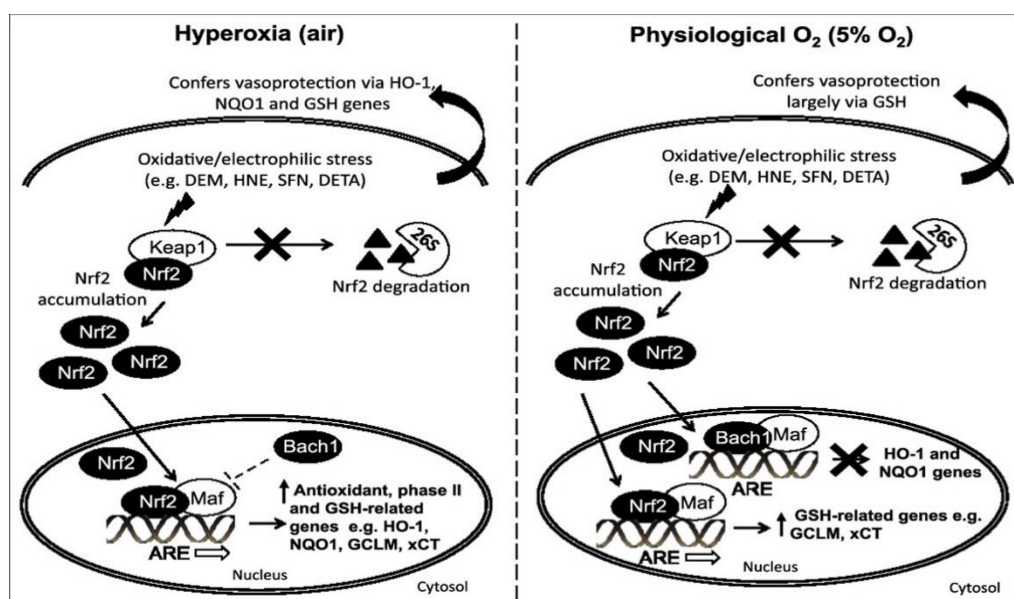


Figure 19 : La régulation différente des gènes ciblés par Nrf2 dans les cellules endothéliales humaines cultivées en physioxie (Physiological O₂) et en normoxie (Hyperoxia).

Adapté de (Chapple, Keeley et al. 2016)

et al. 2016).

Dans le cas particulier de cancers de la peau, la physioxie (2%) peut induire une sous-expression de Nrf2 par rapport à la normoxie. C'est le cas des cellules du carcinome épidermoïde A431. Cette diminution de Nrf2 provoque la sous-expression des gènes antioxydants, ce qui augmente

la sensibilité de ces cellules aux traitements anticancéreux. Au contraire, ces traitements ne sont pas efficaces dans les cellules A431 cultivées en normoxie en raison de leur surexpression d'antioxydants (Ferguson, Smerdon et al. 2018).

6. Les différents modèles d'étude de la peau

Il existe de nombreux modèles de peau qui ont été mis au point pour tester des molécules, comprendre des mécanismes d'action ou reproduire des pathologies cutanées. C'est pourquoi un point bibliographique sur ces modèles est nécessaire pour comprendre la démarche de cette étude, en particulier la comparaison de différents modèles et la reproduction de modèles de photo-vieillessement. Dans ce chapitre, nous allons décrire brièvement les divers modèles qui sont communément utilisés, en commençant par les modèles *in vivo* et ensuite les modèles *in vitro* qui sont à présent les plus utilisés pour la recherche en dermocosmétique.

6.1. Les modèles cutanés *in vivo* (chez l'animal)

Une multitude de modèles animaux, souris, rats, lapins ou porcs ont été développés soit pour évaluer des molécules dermocosmétiques, soit pour imiter les maladies cutanées, comprendre leurs mécanismes et optimiser des candidats médicaments. Les modèles animaux ont l'avantage de prendre en considération la complexité d'un organe et surtout les interactions avec tout l'ensemble du corps. Cependant, les résultats ne sont pas directement transposables à la peau humaine puisqu'il existe de nombreuses différences en termes de structure, de morphologie (Figure 20), d'épaisseur (Tableau 3), et bien évidemment de composition du microbiote cutané.

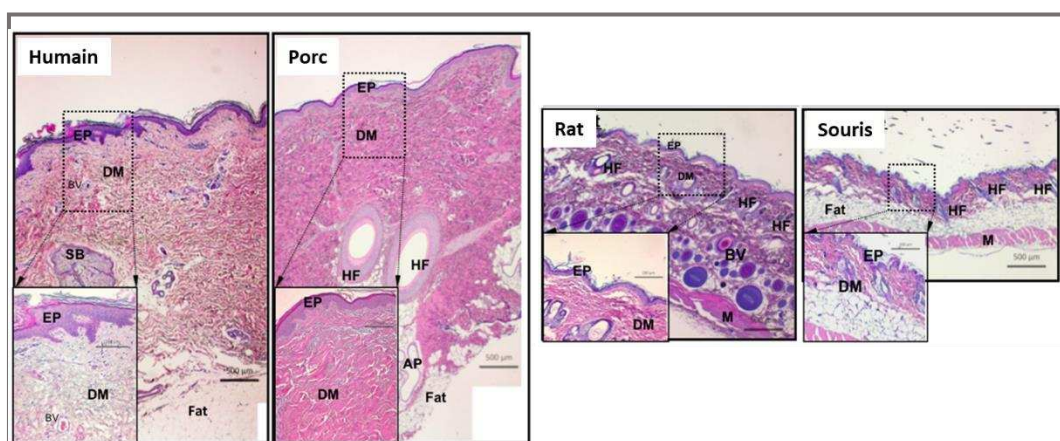


Figure 20 : Une coupe histologique avec une coloration hématoxyline et éosine de la peau humaine et de peaux de porc, de rat et de souris. Abréviation EP, épiderme ; DM, derme ; BV, vaisseau sanguin ; SB, glande sébacée, HF, follicule pileux ; et M, muscle.

Adaptés de (O'Brien, Bhatia et al. 2014)

Ainsi, ces différences soulignent la nécessité de disposer d'autres modèles plus conformes à la peau humaine.

Espèces	Couche cornée (μm)	Epiderme (μm)	La peau complète (mm)
Homme (avant bras)	17	36	1,5
Homme	16,8	46,9	2,97
Porc (dos)	26	66	3,4
Porc (oreille)	10	50	1,3
Souris (dos)	5	13	0,8
Rat	18	32	2,09
Rat sans poils	8,9	28,6	0,7

Tableau 3 : Les différentes épaisseurs de la peau et de ses différentes couches entre l'homme et les autres espèces.

Adapté de (Todo 2017)

Par ailleurs, l'utilisation d'animaux dans le domaine cosmétique est maintenant rigoureusement réglementée en Europe. La législation européenne a interdit les tests sur animaux pour les produits cosmétiques finis en 2003 puis pour les ingrédients en 2009. Ceci a finalement été appliqué en 2013 (Directive 93/35/CEE, 1993 ; Official Journal of the European Community [JOCE], L 151, p. 32 ; European cosmetic settlement n°1223/2009). Par conséquent, à la fois l'innocuité et l'efficacité de ces produits doivent être évaluées à l'aide de méthodes alternatives. Pour cela, les méthodes *in vitro* se sont beaucoup développées ces dernières années.

6.2. Les modèles *in vitro/ex vivo*

De nombreux modèles sont disponibles, des plus simple, les modèles 2D constitués de cellules en monocouche, aux plus complexes avec la peau reconstruite *in vitro*. Un cas particulier est celui des explants de peau humaine maintenus *ex vivo*.

6.2.1. Le modèle 2D

L'utilisation des cellules cutanées en monocouche est le modèle le plus simple pour suivre la toxicité ou l'activité d'un produit, pour étudier des mécanismes moléculaires. Deux types de cellules peuvent être utilisés : soit des lignées, soit des cellules primaires.

Plusieurs lignées sont utilisées aujourd'hui avec l'avantage de pouvoir disposer de nombreuses cellules. La lignée de kératinocytes HaCat est de loin la principale utilisée pour étudier l'épiderme (Boukamp, Petrussevska et al. 1988). Cette lignée est issue d'une immortalisation spontanée des kératinocytes primaires isolés d'une lésion proche d'une zone cancéreuse d'un patient de 62 ans. Leur immortalisation n'a pas été faite par des transfections, mais par les conditions de culture. En effet, ces kératinocytes ont été cultivés durant plusieurs passages dans

des milieux forts concentrés en calcium et à faible température. Ainsi, cette lignée est commercialisée avec des passages supérieurs à 30. Malgré cette transformation ces cellules présentent plusieurs similitudes avec les kératinocytes primaires. Par exemple, elles peuvent se différencier en partie et exprimer des facteurs de différenciation tels que les cytokératines K14, K10 et l'involucrine (Colombo, Sangiovanni et al. 2017). De plus, les HaCat sont faciles à entretenir avec une prolifération illimitée. Cependant, ce nombre de passages induit plusieurs aberrations chromosomiques, notamment la mutation du gène p53 (Lehman, Modali et al. 1993).

Les cellules primaires proviennent de plasties de peau issues de déchets chirurgicaux. Elles sont plus représentatives de la peau, mais leur réplication est limitée et le moindre stress induit leur différenciation ou l'arrêt de leur cycle cellulaire.

Il est également possible de cultiver deux ou trois types de cellules simultanément, c'est la coculture qui est le modèle 2D le plus complexe. En effet, ces cocultures facilitent notamment le suivi des interactions directes entre les cellules ou indirectes par l'intermédiaire de leurs molécules relarguées dans les milieux de culture. Il existe des cocultures de fibroblastes/kératinocytes, mélanocytes/fibroblastes, mélanocytes/kératinocytes, etc. Par exemple, la coculture de kératinocytes et mélanocytes permet de suivre le transfert de la mélanine (Joshi, Nair et al. 2007)

La mise en œuvre de ces modèles est simple, peu coûteuse et ils sont de grande utilité pour les études moléculaires. Cependant, les cellules dans ces modèles prolifèrent continuellement alors que, dans la peau, elles sont à plusieurs niveaux de différenciation et dans une configuration spatiale différente. Par ailleurs, les cellules se trouvent *in vivo* dans un microenvironnement complexe, comme la présence de matrices extracellulaires et de biomolécules. L'essai d'un produit dermocosmétique est un peu restreint sur ce modèle en raison de l'immersion des cellules dans un milieu de culture, ce qui ne reflète pas la surface sèche de la peau.

6.2.2. Le modèle de peau reconstruite en 3D

Au cours des trois dernières décennies, le développement des modèles alternatifs a été marqué par la reconstruction de la peau humaine en modèle 3D. Grâce à l'ingénierie tissulaire, ces modèles reproduisent les principales caractéristiques structurelles et fonctionnelles de la peau. Au départ, ils ont été conçus pour la médecine régénérative, en particulier pour la guérison des brûlures (Gallico, O'Connor et al. 1984). Pour autant, ces modèles sont maintenant largement

utilisés pour la recherche en physiopathologie cutanée et pour l'évaluation de produits dermocosmétiques.

Les modèles de peau en 3D peuvent être composés soit de l'épiderme seul, soit de la peau entière avec la partie dermique, ou même avec l'hypoderme.

Les épidermes reconstruits ou RHE (Reconstructed Human Epidermis) ont été les premiers modèles 3D *in vitro* à être développés (Asselineau, Bernard et al. 1986). En effet, les kératinocytes cultivés sur un support sont capables de proliférer et de se différencier, formant ainsi un épithélium stratifié qui reproduit les caractéristiques histologiques et biochimiques de l'épiderme. Pour cela, les kératinocytes sontensemencés sur un support, en inserts sur des membranes poreuses synthétiques en polycarbonate, sur un derme désépidermisé et acellulaire, ou sur une matrice de collagène IV. Les cellules sont maintenues en immersion pendant deux jours dans un milieu de prolifération classique, puis elles sont exposées à l'air dans un milieu riche en calcium qui stimule la différenciation. Généralement à 15 jours de culture, l'épiderme obtenu est stratifié avec la présence des couches basales, épineuses et granuleuses, ainsi qu'une couche cornée (Figure 21). Celles-ci peuvent être caractérisées par des biomarqueurs tels que Ki67, différentes kératines, la loricine, la filaggrine ou l'involucrine.

Ce modèle est évolutif et peut être enrichi avec d'autres cellules épidermiques. Avec des mélanocytes il est possible de recréer les différents phototypes de la peau (Böttcher-Haberzeth, Klar et al. 2013). Le rajout de cellules progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ dans la culture de départ de kératinocytes, conduit à la différenciation en cellules dendritiques épidermiques (Régner, Staquet et al. 1997).

La construction de l'ensemble de la peau est obtenue par la stratification de l'épiderme sur un équivalent dermique. Les fibroblastes de la matrice dermique sont d'abord cultivés sur support pendant 7 jours puis des kératinocytes sont ajoutés au-dessus et le processus de différenciation est suivi. Ainsi, ces équivalents de peau ont une matrice cutanée fonctionnelle, ressemblant à la MEC native, qui stimule davantage le développement de l'épiderme pleinement différencié. En conséquence, ils peuvent être utilisés pour modéliser le vieillissement de la peau (Pennacchi, de Almeida et al. 2015). Ce modèle qui présente une jonction dermo-épidermique permet de

reproduire les interactions entre les cellules et la matrice, entre les fibroblastes et les kératinocytes.

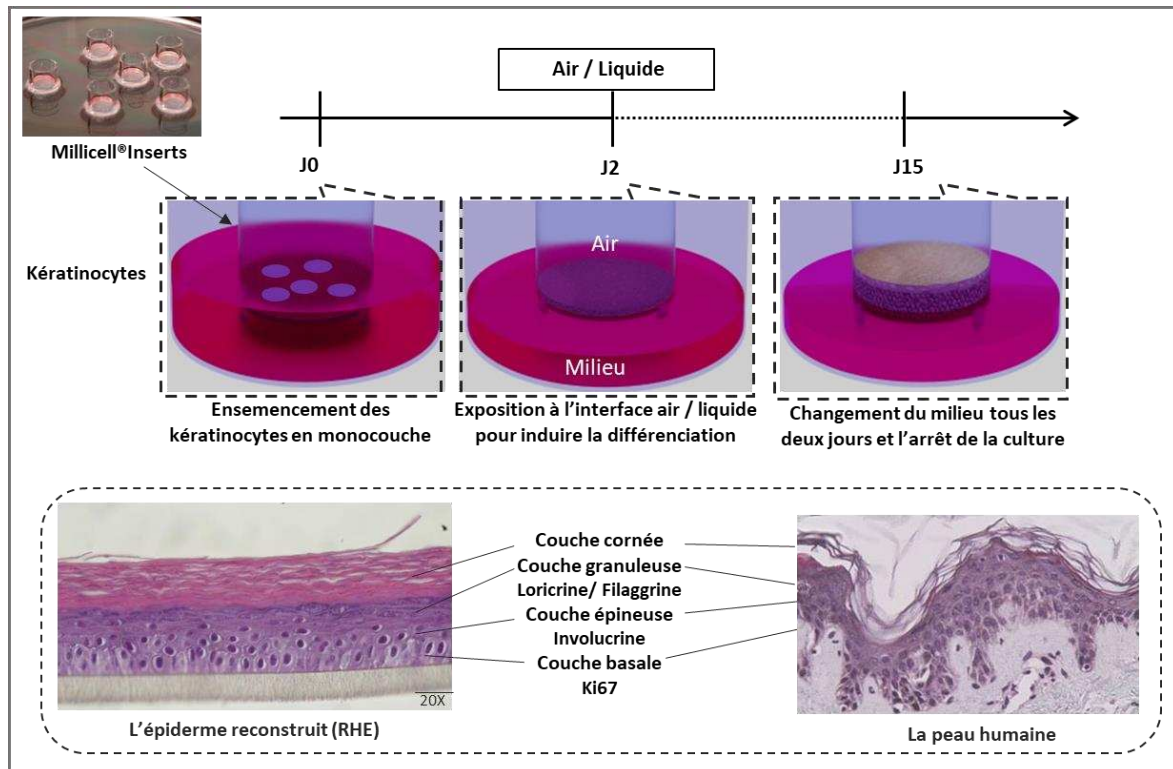


Figure 21 : La schématisation d'un protocole de préparation des épidermes reconstruits, des coupes histologiques de RHE avec une coupe de peau qui montre une différenciation similaire.

Ces modèles évoluent en continu avec l'introduction de différents types cellulaires pour se rapprocher le plus possible de la peau et reproduire toutes ses fonctionnalités. Les cellules endothéliales permettent d'échafauder un réseau de vascularisation (Tremblay, Hudon et al. 2005) et même de reproduire une microcirculation (Salameh, Tissot et al. 2021). Les cellules neuronales reproduisent en partie les fonctions sensorielles et les cellules immunitaires apportent l'immunocompétence cutanée (Muller and Berthod 2021). Il est maintenant même possible de reconstruire un modèle de peau avec sa microflore. La colonisation par une bactérie commensale, *S. epidermidis* a permis d'étudier l'interaction avec les kératinocytes et a montré la transcription des gènes de défense tout en conservant la fonction barrière de ce modèle (Niehues, Bouwstra et al. 2018). D'autres équipes sont parvenues à introduire des bactéries pathogènes telles que *M. restricta* pour explorer son implication dans la formation des pellicules du cuir chevelu (Meloni, Balzaretto et al. 2021). Toutefois, ces modèles sont très délicats à mettre en œuvre tout en conservant une stérilité et la culture ne dépasse pas les 72 heures. Par ailleurs, ces modèles sont loin de représenter la complexité du microbiote cutané.

Les RHE et les peaux reconstruites ont été largement employés pour les études de l'homéostasie de la peau, mais aussi pour étudier ses pathologies et son vieillissement. Ces modèles ont été adaptés pour représenter des pathologies de la peau, telles que la dermatite atopique ou le psoriasis (Bernard, Morel et al. 2012). Pour l'étude du vieillissement cutané, des modèles ont été construits à partir de kératinocytes vieillis (par culture longue durée ou suite à irradiation UV). Ceci a permis d'obtenir des peaux qui reproduisent les mêmes caractéristiques que celles des peaux photovieillies en particulier par la présence des cellules sénescents et par l'altération de la fonction barrière (Löwenau, Zoschke et al. 2017).

6.2.3. Le modèle des explants de peau

Des explants de peau sont aussi utilisés comme modèles alternatifs. Ce modèle contient tous les types cellulaires et quasiment toutes les fonctions structurales et métaboliques de la peau normale à l'exception de la circulation sanguine. Ces explants peuvent être maintenus en culture pendant une dizaine de jours. Ils sont utilisés pour l'application topique de produits cosmétiques ou l'application de stress, en particulier des UV, permettant ainsi de restituer les mêmes effets qu'*in vivo*. Ils sont également souvent employés pour le suivi de la pénétration transcutanée des formulations chimiques. Le problème majeur de ces explants est que les résultats ne sont pas toujours reproductibles d'un donneur à l'autre, du fait de la variabilité interindividuelle.

6.3. Les avantages et inconvénients des différents modèles

Ainsi, tous ces modèles de peau proposent de nombreuses possibilités et laissent le choix selon les objectifs de l'étude ciblée (criblage de nombreuses molécules, études de pénétration, mécanismes d'action et signalisation...). Par exemple, les modèles 2D sont les plus appréciés pour une étude moléculaire sur le suivi d'une voie de régulation. Cependant, pour l'étude d'une pénétration d'ingrédient actif au niveau transépidermique, le modèle des explants de peau est le plus approprié, sachant que les modèles 3D *in vitro* sont plus perméants que la peau. Les RHE sont également des modèles pertinents car ils miment toutes les phases de différenciation de l'épiderme et facilitent ainsi les études de la barrière cutanée. Ils permettent également une surexpression ou une sous-expression de gènes par ingénierie. Néanmoins, ces modèles présentent plusieurs limites. Le tableau 4 énumère de manière non exhaustive les avantages et les inconvénients des divers modèles.

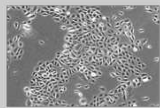
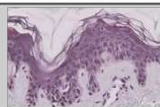
Modèles	Avantages	Limites
 Monocouche cellulaire	• Cellules d'origine humaine • Reproductibilité des résultats (lignée) • Faciles à obtenir et moins coûteuses (lignée) • Production à grande échelle (lignée) et congélation possible. • Convient à des études moléculaires • Possibilité de réaliser des co-cultures	• Limitation de la prolifération (cellule primaire) • Mutations génétiques (lignée) • Configuration spatiale différente du tissu cutané • Réduction des interactions entre les cellules • Immersion dans un milieu de culture
 Épiderme et peau reconstruits	• Prolifération et différenciation comme dans la peau • Présence de la barrière épidermique • Modèle évolutif, ajout d'autres types de cellules • Possibilité de reproduire des pathologies cutanées • Application topique possible de formulations • Reproductibilité des résultats • Intérêt économique, plusieurs marques sont commercialisées.	• Culture sur une longue durée • Perméabilité différente de celle de la peau <i>in vivo</i> • Absence du microbiote cutané • Absence d'annexes cutanée • Variabilité dans les protocoles, dans les milieux pour la différenciation
 Explant de peau	• Conservation de presque les aspects physiologiques de la peau • Présence de l'ensemble des cellules cutanées • Présence de la barrière cutanée • Application topique possible de formulations	• Accès et quantité limités • Réglementation éthique • Variation selon les donneurs • Durée de culture limitée

Tableau 4 : Les avantages et limites des différents modèles d'études de la peau.

6.4. Les modèles de peau et le taux d'oxygène

Dans l'ensemble de ces modèles, qu'ils soient 2D ou 3D, l'oxygénation de la peau n'est pas prise en considération et les expériences sont réalisées à 18,6% d'O₂ dans les incubateurs. Même le modèle des explants *ex vivo* ne reproduit pas la physioxie puisque la circulation sanguine est absente et que la partie dermique est en contact avec l'air de l'incubateur ou le milieu de culture.

L'aptitude des cellules à s'adapter à la normoxie fausse les résultats de plusieurs processus biologiques, dont le stress oxydant. Cela ne fait qu'accentuer les limites de ces modèles *in vitro* et l'incohérence avec ce qui se passe *in vivo*. Par exemple, le stress oxydant est le principal facteur dans un certain nombre de troubles de la peau, en particulier le vieillissement. Les modèles cutanés *in vitro* qui reproduisent ce processus, à l'heure actuelle, sont réalisés dans des conditions de normoxie. Ces conditions sont loin d'être représentatives de ce qui se passe exactement au niveau de la peau.

Quelques études commencent à reproduire le taux d'oxygénation physiologique, principalement en système de monocouche, mais elles restent très limitées. Cependant, l'importance de respecter la physioxie émerge de plus en plus avec les études récentes de l'effet de l'oxygénation sur les activités cutanées (partie 5). Le modèle de peau *in vitro* "idéal" n'existe probablement pas mais s'approcher au plus près des conditions physiologiques apportera des résultats plus fiables quant à l'étude des mécanismes physiopathologiques cutanés.

Objectifs

Objectifs

La physioxie correspond à la pression partielle en oxygène dans les tissus. Ce terme a paru pour la première fois dans une revue publiée par notre groupe en 2011, et est largement utilisé aujourd'hui. Les travaux de l'équipe se concentrent beaucoup sur la peau. Cet organe possède une physioxie particulière. En effet, l'épiderme est dépourvu de vaisseaux sanguins, il est donc oxygéné à partir de deux sources. L'une provient du derme et l'autre de l'O₂ atmosphérique. La teneur en oxygène dans la peau varie en conséquence entre ses différentes couches de 1.5 à 7%. Le niveau le plus bas se situe dans la couche basale. Selon la littérature, ce taux d'oxygène intervient dans le maintien de la prolifération des kératinocytes souches, préservant ainsi l'autorégénération de l'épiderme. Étonnamment, la physioxie est souvent négligée dans les cultures cellulaires *in vitro*. En effet, les expérimentations sur les modèles de peau sont généralement effectuées en normoxie qui correspond à 18,6% d'O₂. Pourtant, au cours des dernières années, certaines études ont commencé à démontrer que les cellules cultivées en physioxie conservent leurs propriétés équivalentes à l'*in vivo*. De plus, notre équipe a démontré qu'il existe une modulation de la pigmentation des mélanocytes en physioxie, et encore sur l'expression des microARNs.

Dans ma thèse, nous nous sommes posé la question du statut du stress oxydant dans des kératinocytes cultivés en physioxie. Pourquoi s'intéresser à ce processus ? Parce que le métabolisme de l'oxygène est la première source de ROS. Les ROS sont des régulateurs importants de l'homéostasie cellulaire mais, en excès, ils excèdent les capacités antioxydantes de la peau et conduisent, par conséquent, à un stress oxydant. Celui-ci est le principal mécanisme du photovieillissement cutané, particulièrement parce que les ROS sont fortement surproduits sous l'influence de facteurs exogènes, y compris l'exposition aux UV. Normalement, les enzymes telles que la catalase, les superoxyde dismutases et les glutathion peroxydases sont les premières à neutraliser les ROS dans l'épiderme. Cependant, en vieillissant, leurs expressions sont perturbées. Ces enzymes antioxydantes sont actuellement visées par plusieurs traitements antiâges. Par conséquent, l'étude de la physiologie des enzymes antioxydantes dans leur microenvironnement est indispensable, spécialement dans le cas du stress oxydatif.

Au début de ma thèse, peu de modèles cutanés étaient étudiés en physioxie. En conséquence, notre premier objectif a été de développer des modèles pour étudier les kératinocytes dans les

conditions d'oxygénation physiologiques. Nous avons commencé par un modèle simple des kératinocytes en cultures en monocouche (2D) et poursuivi ensuite par la mise au point de modèles d'épidermes reconstruits, afin de reproduire la configuration des kératinocytes *in vivo* (3D). Nous les avons caractérisés en les comparant aux mêmes modèles développés en normoxie.

Compte tenu de l'importance de l'oxygène dans le stress oxydant, notre second objectif a été de caractériser les taux basaux des enzymes antioxydantes dans ces différents modèles. Puis nous avons étudié si leur expression, leur quantité, mais aussi leur activité étaient modulées en physioxie par comparaison aux conditions de normoxie.

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude sur le photovieillissement cutané dans un modèle *in vitro* de physioxie. Pour comprendre la réponse des kératinocytes dans le photovieillissement, notre troisième objectif a consisté à reproduire ce processus dans nos modèles par irradiations UV et à suivre dans le temps la régulation des antioxydants en physioxie.

De façon générale, un des objectifs de ma thèse vise à proposer des modèles qui respectent au mieux le microenvironnement de la peau. Ces nouveaux modèles sont utilisés dans notre cas sur l'étude du processus de photovieillissement et peuvent également être utilisés pour étudier d'autres processus biologiques de la peau.

Résultats

Résultats

L'ensemble des résultats de mon projet de thèse sur le statut du stress oxydant et les enzymes antioxydants en physioxie sont présentés ici sous forme de deux articles.

1. Partie 1

1.1. Résumé

Dans cette première partie, nous avons commencé par établir des modèles représentant la peau en physioxie. Nous nous sommes ensuite focalisés sur leurs caractérisations par rapport à ceux développés en normoxie, en termes de prolifération et d'expression des d'enzymes antioxydantes. Nos résultats démontrent une meilleure résistance des kératinocytes en physioxie contre un stress oxydant, une surexpression de la catalase et de la SOD2 ainsi qu'une activité enzymatique antioxydante plus importante.

Le présent article est en cours de finalisation en vue d'une soumission dans le journal Free Radical Biology and Medicine.

1.2. Article 1 : Improvement of antioxidant defenses in keratinocytes maintained in physioxia: comparison of 2D and 3D models

***Improvement of antioxidant defense in keratinocytes
maintained in physioxia: comparison of 2D and 3D models***

Nadira Chettouh-Hammas, Fabienne Fasani, Amandine Boileau, Giovanni Busco, David
Gosset, Catherine Grillon

Center for Molecular Biophysics UPR4301 CNRS, Orléans, France

Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France

Corresponding author:

Dr. Catherine Grillon, Center for Molecular Biophysics UPR4301 CNRS, Orléans, France

Tel: +33 38 25 78 04

Fax: 02 38 25 54 59

Email address: catherine.grillon@cnrs-orleans.fr

Abstract

In the skin, keratinocytes ensure the defences against oxidative stress, an excessive production of reactive oxygen species (ROS), mainly to prevent photoaging. They are localized in the epidermis where the oxygen level (1-3% O₂), named physioxia, is low compared to other organs. Oxygen is essential for life as its metabolization by mitochondria brings energy, but it is also involves the generation of ROS. Most of the studies on antioxidant capacities of keratinocytes are performed in classical *in vitro* culture condition (18.6% O₂ in an incubator), named normoxia, which are very far from the physiological microenvironment, thus submitting cells to an overoxygenation. This study aimed to investigate the antioxidant system in keratinocytes under conditions mimicking the oxygenation of skin tissue, physioxia, in both 2D and 3D models. First, we show here that the basal antioxidant profiles of keratinocytes display important differences when comparing HaCaT, primary keratinocytes (NHEK), reconstructed epidermis (RHE) and skin explants. We established and characterized keratinocyte cultures at 3% and 18.6% oxygen: monolayers, comparing HaCat, NHEK, and RHE. Physioxia condition was shown to promote a strong proliferation of keratinocytes in both monolayers and RHE, resulting in a thinner epidermis likely due to a slow-down in cell differentiation. Besides, cells in physioxia display a lower ROS production suggesting a better protection against oxidative stress. To understand this effect, we studied the antioxidant enzymes, catalase, superoxide dismutases, glutathion peroxidases, at various levels: mRNA expression, protein amount and activity. We reported a lower or equivalent level of mRNA for all enzymes in physioxia conditions compared to normoxia, and whatever the culture model, but a higher activity for catalase and superoxide dismutases. As the amount of catalase remains unchanged in NHEK and RHE, the results suggest that catalase is suractivated in physioxia. Contrary, physioxia condition induced a higher amount in SOD2 which can explain the higher activity. Taken together, our results demonstrate the role of oxygen level in the regulation of the antioxidant defences in keratinocytes, highlighting the importance of the culture conditions. Additionally, the present study points out the significance of the keratinocyte model choice and the oxygen level to be as close as possible to the *in-situ* skin.

Keywords

Oxygen, skin, antioxidant defences, Physioxia, human reconstructed epidermis

Abbreviations

ROS, reactive oxygen species

SOD, superoxide dismutase

GPX, glutathion peroxydase

TBS, Tris buffer saline

NHEK, normal human epidermal cell

HDF, human dermal fibroblast

RHE, reconstructed human epidermis

PBS, phosphate buffer saline

CM-H₂DCFDA, 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

SDS-PAGE, Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

1. Introduction

Oxygen is one of the main parameters of the microenvironment in tissues and it ensures an optimal cell metabolism required for stabilizing homoeostasis in physiological conditions. In the skin the physiological oxygen level (physioxia) ranges from 1 to 3%, in the epidermis, to 7%, in the dermis, and is lower compared to atmospheric oxygen 21% (normoxia) [1]. However, *in vitro* cell culture experiments are commonly performed under standard atmospheric oxygen tension leading to around 18.6% O₂ inside an incubator [2], which is far from the physiological oxygen level. Keratinocytes grown under elevated oxygen levels consume more oxygen and produce higher ATP levels [3]. Several studies have shown the importance of maintaining the physioxia of each tissue in *in-vitro* assays. Indeed, the variation in oxygen can impact the cell metabolism [4], proliferation and differentiation [5], key mechanisms of skin functions.

A consequence of oxygen metabolism in cells is the production of reactive oxygen species (ROS) and their production is oxygen-dependent [5-9]. The ROS level is the key measure for evaluating the redox state of skin cells. In addition, keratinocytes are targets of exposome [10], which leads to the generation of high ROS levels and to oxidative stress. This latter causes DNA mutations as well as proteins and lipid oxidation inducing apoptosis [11] and keratinocyte senescence [12].

Therefore, cells have to develop various strategies for converting ROS into less toxic species thus preventing their accumulation and the subsequent potential damages. The first effective line of defence against ROS involves the antioxidant enzymes, mainly Superoxide Dismutases (SODs) responsible for the neutralization of O₂⁻ to H₂O₂, which is then eliminated

by Catalase or Glutathione Peroxidase (GPx) metalloenzymes. These enzymes have distinct and specific mechanisms of action, with different subcellular localizations. However, they can appear in a complimentary way in order to avoid oxidative damage to the cellular components. In skin, these enzymes are more expressed in epidermis than in dermis [13], where they allow the protection of the tissue and thus prevent skin photoaging. Their inefficiency negatively impacts the skin homoeostasis.

In the current work, we investigated the role of physiological oxygen level, compared to classical culture conditions at atmospheric pressure oxygen, in the modulation of antioxidant system in keratinocytes, both in monolayer cultures and in reconstructed epidermis. First, we prepared and characterized the 2D (HaCaT cell line and primary keratinocytes) and 3D keratinocyte models in physioxia and we compared the antioxidant enzyme profile between *in vitro* models. Then we assessed the efficacy of the antioxidants by evaluating ROS production. To understand the observed modulations, we studied the enzymes catalase, superoxide dismutases and glutathione peroxidases in terms of gene expression and protein amount as well as their antioxidant activity.

2. Materials and Methods

2.1. Monolayer cell cultures

HaCaT cell line was derived from the spontaneous immortalization of human keratinocytes [14] and was purchased from CLS GmbH (Eppelheim, Germany). HaCat cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Illkirch- Graffenstaden) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 100 U/mL penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Gibco™, Thermo Fisher Scientific) and 2 mM L-glutamine (Eurobio, les Ulis, France). The primary normal human epidermal keratinocytes (NHEK) were purchased from Lonza Bioscience (Basel, Switzerland) and maintained in DermaLife K Complete Medium (Lifeline Cell Technology, Frederick, MD, USA) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/ml streptomycin. Normal human adult primary fibroblasts (HDF) were purchased from Cell Systems (Kirkland, WA, USA) and maintained in Fibrolife medium (Lifeline Cell Technology) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/ml streptomycin. Cultures were maintained at 37°C in normoxia condition in a classical incubator with 5% CO₂ and 18.6% of O₂, or in physioxia condition inside a HypOxystation® H35 (Don Whitley, Bingley, United Kingdom)

with 3% of O₂, 5% CO₂ and 92 N₂. Throughout this study, cells were always used at about 70% confluence with a maximum of 40 passages for HaCat cell line, of 2- 3 passages for NHEK, of 6 passages for HDF. The numbers of viable cells were determined using the NucleoCounter (ChemoMetec, Allerød, Denmark) according to the manufacturer's instructions.

2.2. Reconstructed Human Epidermis

Reconstructed human epidermis (RHE) were generated on polycarbonate membrane cell culture inserts with 12 mm diameter and 0.4 µm pore size (Sigma). Briefly, after thawing, HDF and NHEK were resuspended in their specific culture medium and maintained in normoxia or in physioxia conditions, the medium being replaced after 24 hours and every two days. When cells reach 70% confluence, HDF were harvested by incubation with trypsin-EDTA (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), seeded at 5×10^4 cells/insert on the outer side of the insert membrane and let them attach for 1h. Keratinocytes were harvested using trypsin solution (Lonza Biosciences) and seeded into the inserts at 4×10^5 cells/insert in Dermalife K complete medium. Inserts were placed in 6-well-plates containing 2 ml Dermalife K complete medium and incubated for 48 h. Then, to induce keratinocyte differentiation, the medium inside the insert was removed and keratinocytes were subsequently exposed to air-liquid interface. The medium inside the 6-well-plates was replaced by 1.5 mL of Epilife supplemented with 1% Human Keratinocyte Growth Supplement (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), 1.5 mM CaCl₂, 92 µg/mL L-ascorbic acid 2-phosphate and 10 ng/mL keratinocyte growth factor (Sigma Aldrich). The medium was renewed every 2 days and the air-liquid cultures were maintained 15 days.

2.3. Skin Explants

Abdominal skin biopsy from a 37-year-old woman was obtained from Proviskin (Besançon, France). Explants of 1 cm diameter were prepared from defatted skin biopsy, incubated in RNA lysis solution (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) for 24h at 4°C, immediately frozen and kept at -80°C before RNA extraction.

2.4. Determination of intracellular ROS generation

Intracellular ROS formation in normoxia and physioxia was measured by the cell-permeant probe 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, CM-H₂DCFDA (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Cells were seeded at a density of $1 \times$

10³/well in 96-well microplates and were maintained for four days in normoxia or physioxia condition. Then cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and incubated with 10 µM CM-H₂DCFDA for 20 min. After washings, cells were stressed with 50, 100, 200 or 400 µM H₂O₂ (Sigma Aldrich) for 20 min. Non stressed cells were incubated with N-acetyl-cystein 5mM (Sigma Aldrich), a ROS scavenger, during the previous two steps. The relative fluorescence intensity was then measured using a microplate spectrophotometer (VICTOR 3V, Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France) with excitation at 490 nm and emission at 535 nm. Results are expressed in relative fluorescence units for the non-treated cells and in fold change versus control for H₂O₂ treated samples.

2.5. Western blots

After culture, cells were washed with cold PBS then mechanically harvested in RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). After 15 min of incubation on ice, lysates were centrifuged. The supernatant was collected, and protein extract concentration was determined using Bio-Rad DC™ protein assay. Proteins were denatured at 95°C for 5 min in Laemmli buffer 4X with 0.1% β-mercaptoethanol (Biorad, Hercules, CA, USA). 25 µg of proteins were then loaded on a 12% SDS-PAGE gel at a voltage of 160 V for 45 min. The separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Biorad) using Trans-Blot Transfer System (Biorad). Membrane was incubated in a blocking buffer (5% dry skimmed milk in Tris Buffered Saline (TBS) supplemented with 0.1% Tween-20). Proteins were probed with primary antibodies overnight at 4 °C and then with horseradish peroxidase conjugated-secondary antibodies for 1 h at room temperature. After washing with TBS-Tween-20, bands were detected with enhanced chemiluminescence reagents (WestDura detection kit, Thermo Fisher Scientific) and then the signal was digitally acquired using the chemiluminescence imager ChemiDoc (Biorad).

The following primary antibodies were used: catalase (1:1000, 12980, Cell Signaling technology, Danvers, MA, USA), SOD1 (1: 1000, ab183881, Abcam, Cambridge, United Kingdom), SOD2 (1: 1000, ab13533, Abcam), GPX4 (1: 1000, ab13533, Abcam), β-Actin (1/10000, Cell Signaling Technology), secondary antibody goat anti-rabbit (1:30000, 65-6120, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Protein quantification was performed using ImageLab software (BioRad) and results were normalized to the corresponding actin content.

2.6. Gene expression

Total RNA from cell cultures, RHE samples or skin explants were extracted using Qiagen RNeasy mini kit following the manufacturer's recommended protocol (Qiagen, Hilden, Germany). The reverse transcription of 1 µg total RNA was performed using reverse transcription kit Maxima First Strand cDNA (Fermentas, Thermo Fisher Scientific). The generated cDNA (200 ng) was used as a template for the qPCR with various primers and SYBR Premix Ex Taq™ (TAKARA BIO INC, Saint Germain en Laye, France). PCR reactions were set up in duplicate, after a slight modification of the manufacturer's protocol, allowing the use of 2 µL cDNA per reaction, instead of 5 µL. Reactions were run on a LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). A dissociation curve was run after each PCR reaction to ensure that only one amplicon was synthesized. qPCR analysis was performed using the LightCycler 480 software. The efficiency of each primer pair was calculated using a dilution range of cDNA. The relative quantity of each gene was then calculated by considering the efficiency of each primer pair. Three housekeeping genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta-2 macroglobulin (B2M) and β -Glucuronidase (GUSB) were used in the same experiment. The geometric mean of reference gene-relative quantities was used to normalize the relative quantities of each gene of interest. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of normalized relative quantities from at least three independent samples.

The following primers were used in the study of the respective target genes: catalase (Sigma, FH3_CAT GGACTTTTACATCCAGGTC, and RH3_CAT CGGTTTAAGACCAGTTTACC), SOD1 (Sigma, FH1_SOD1 GAGCAGAAGGAAAGTAATGG, RH1_SOD1 GATTAAAGTGAGGACCTGC), SOD2 (Sigma, FH1_SOD2 ATCATACCCTAATGATCCCAG, RH1_SOD2 AGGACCTTATAGGGTTTTCAG), GPX4 (Qiagen, QT00067165), B2M (Qiagen, QT00088935), GAPDH (Qiagen, QT00079247), GUSB (Qiagen, QT00046046).

2.7. Measurement of SODs, Catalase, GPX enzymatic activities

After four days of culture in normoxia or physioxia, the antioxidant activities in HaCaT, NHEK and RHE were measured using catalase and SODs assay kits (707002, 706002, 703102, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Briefly, cells were harvested in the corresponding lysis buffer and centrifuged at 10,000 rpm for 15 min, and 5 min at 1,500 rpm for catalase and SODs assay respectively. The supernatant was kept on ice and used for the activity assay and protein quantification.

The assays were performed according to the manufacturer's instructions. To measure catalase activity, methanol is converted to formaldehyde in the presence of H_2O_2 . Then the reaction of formaldehyde with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1, 2,4 triazole (Purpald) generated a coloured compound which absorbs at 520 nm. The catalase unit was described as the quantity of enzymes that degraded 1 nmol of H_2O_2 to O_2 and H_2O per min. For SOD activity measurement, the reaction is based on a xanthine oxidase system, which produces $\text{O}_2^{\bullet-}$ in the environment and then oxidizes tetrazolium into coloured compounds (formazan). In this case, SODs compete with tetrazolium and leads to a decrease in coloration, proportional to the level of SOD activity. The absorbance was measured at 450 nm, and the SODs unit is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of $\text{O}_2^{\bullet-}$. The results are expressed as units of enzyme/mg proteins.

2.8. Cell immunostaining

Cells were seeded on glass coverslips and maintained in culture in normoxia or physioxia. They were washed with TBS and then fixed for 7 min with 4% paraformaldehyde solution on ice. Plasma membranes were permeabilized for 10 min with TBS-Triton X-100 1%, and non-specific binding sites were saturated for 1 hour at 4° C with TBS containing 1% bovine serum albumin, 3% goat serum, and 0.3% Triton X-100. Cells were then incubated overnight at 4° C with primary antibodies. After washing with TBS, cells were incubated for 1 hour with secondary antibodies. Before mounting, nuclei were stained with a solution of 50 µg/ml bis-benzimide (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature. Finally, coverslips were mounted on glass slides using Fluoromount-G mounting medium (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). The following primary antibodies were used: catalase (12980, Cell Signaling), SOD1 (ab183881, Abcam), SOD2 (ab13533, Abcam), GPX4 (ab13533, Abcam), Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (A-11036, Invitrogen, ThermoFisher Scientific).

2.9. RHE immunostaining

Twenty-four hours before stopping the cultures, pimonidazole (100 µM, Hypoxyprobe kit, Hypoxyprobe, Burlington, MA, USA) was added to the culture medium of RHE. After 15 days of culture, RHE were fixed with a 4% paraformaldehyde solution for 24 h and kept in 30% sucrose for 48 h at 4° C. RHE on membranes were separated from the insert and embedded in OCT embedding matrix (Leica, Wetzlar, Germany). Immediately, specimens were snap-frozen

in isopentane on dry ice and then kept at -20°C. RHE were cut into 7 µm thick slices with a cryotome (Leica). Some RHE cryosections were stained with Masson's Trichrome (Masson-Goldner staining kit, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Before immunostaining, cryosections were exposed to citrate buffer (0.01M, pH 6) at 90°C for 45 min, permeabilized with TBS-1%Triton X-100, and saturated with TBS containing 1% bovine serum albumin, 3% goat serum, and 0.3% Triton X-100, for 1 h. The immunohistochemical staining was performed using primary antibodies specific for Ki-67 (550609, BD pharmingen, le Pont de Claix, France), involucrine (I9018, Sigma-Aldrich), loricrin (PRB-145P, Covanceref), catalase (12980, Cell Signaling), SOD1 (ab183881, Abcam), SOD2 (ab13533, Abcam) which were incubated overnight at 4 °C. Cryosections were subsequently incubated with the corresponding secondary antibodies (AlexaFluor 568 goat anti-rabbit IgG, A-21069, or AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG, A-21121) for 1 h at room temperature. For pimonidazol adducts detection, cryosections were incubated with the FITC-conjugated antibody (Hydroxyprobe kit) for 1h at room temperature. Before mounting, nuclei were stained with a solution of 50 µM bis-benzimide (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature. Finally, cryosections were mounted using Fluoromount solution.

2.10. Immunostaining: photos and quantification

Immunostaining images were taken using a confocal microscope LSM980 AS2 (Zeiss, Iena, Germany), and ZEN software (Zeiss). Quantification of fluorescence intensity was determined using ImageJ software and normalized to the analysed surface. For Ki67 labeling, the percentage of positive cells was calculated by the number of Ki67 positive cells divided by the total number of nuclei (bis-benzimide positive cells) in the basal layer.

2.11. Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times as mentioned in the figure legends. The data were treated with Prism GraphPad 9 software (GraphPad, Inc, La Jolla, CA, USA). The figures were generated, and the results are presented as mean ± SEM of at least three biological replicates. For the statistical analyses, an unpaired Mann-Whitney test was used to compare two independent groups and a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc correction was performed for multiple comparison. The differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ respectively.

3. Results and discussion

The role of oxygen in skin physiology is complex and difficult to study as the skin microenvironment, and mainly the physiological oxygen level, physioxia, is far from the *in vitro* culture conditions which are mostly performed in atmospheric pressure oxygen. In the present study we used several models, from cells in monolayers to reconstructed epidermis, to investigate the status of the antioxidant system in keratinocytes in the physiological conditions of skin oxygenation.

3.1. Keratinocytes express different antioxidant profiles between monolayer cultures and reconstructed epidermis

Before going to physioxia experiments, we started by comparing the expression of antioxidant enzymes in various models classically used to study skin activities in order to understand how cells can adapt to normoxia environment. The HaCaT cell line resulting from a spontaneous immortalization of epidermal cells is widely used as a model of keratinocytes although it is not able to achieve a total differentiation [14]. Primary keratinocytes are the cells of choice for studying epidermis activity, but these cells are coming from different donors, which can have more heterogeneous behaviours. Under monolayer culture, both HaCat and NHEK do not represent epidermal properties in the skin. These two cell culture models are the most used to assess response to oxidative stress and to evaluate potential antioxidant compounds. To obtain a representative skin barrier, reconstructed epidermis from primary keratinocytes brings a good alternative to skin explants and are more and more studied.

To compare these models, the antioxidant gene expression profile in HaCaT cells, in primary keratinocytes, in reconstructed epidermis and in skin explants was analysed using RT-qPCR. Results show that the antioxidant profiles are not similar (Fig. 1). The major difference is that cells in monolayers express globally lower level of antioxidant enzymes than RHE or skin explants. If we compare cells in monolayers, NHEK display very low expressions of catalase and SOD1 when compared to HaCat cell line. This has to be taken into account for the choice of the better model to assess antioxidant activity or ROS production, as an example. Besides NHEK cells express a higher level of catalase and SOD transcript when differentiated to form a 3D epidermis compared to cells cultivated in monolayer. On the contrary, they display a lower level of GPX than cell culture models. These results suggest that the differentiation process in human epidermis affects a lot of the expression of antioxidant enzymes and these

results confirm several studies performed on animal models, either on catalase expression or on catalase activity. In fact, studies on newborn rat keratinocytes reported that catalase was mainly expressed in the cytoplasm of cells from the stratum granulosum to the lower corneum [15]. Besides, *in vitro* catalase-specific activity was shown to be relatively constant during the proliferation phase of murine primary keratinocyte in monolayer culture, but to increase after cessation of cell division [16]. Furthermore, in murine skin, the study of keratinocyte subpopulations in different stages of differentiation from murine skin confirmed that catalase activity increases with keratinocyte maturity [17]. In addition, we demonstrated here that *in vitro* keratinocyte differentiation also modulates SODs and GPXs expression.

Interestingly, RHE show a similar antioxidant profile than skin explants with an

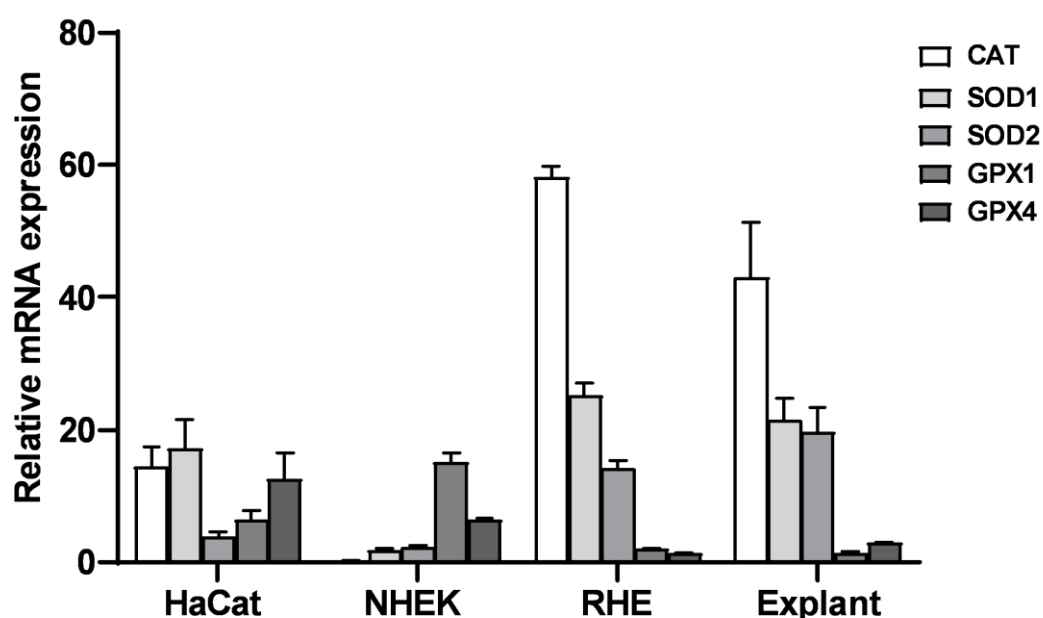


Fig.1. The antioxidant expression profiles are different between HaCaT, NHEK, RHE and skin explants. HaCaT cells, NHEK, RHE and skin explants were analysed for the expression of mRNA of antioxidant enzymes. Results are expressed as normalized relative mRNA expression (mean $\pm$ SEM) for catalase, superoxide dismutase 1 and 2, glutathione peroxidase 1 and 4 (N=3 for HaCaT, NHEK and explants, N=6 for RHE). Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001.

overexpression of catalase and SODs, and a low expression of GPX family genes. This confirms that the RHE models closely mimic the real epidermis. So, *in vitro* epidermis differentiation process leads to the same antioxidant profile as *in vivo* and highlights the relevance of using

RHE for skin antioxidant investigations. Comparatively, HaCaT and NHEK models are not representative of the antioxidant defences of the skin.

3.2. Characterization of keratinocyte proliferation in physioxia condition

To characterize the effect of oxygen on keratinocytes, cell cultures were adapted in physioxia conditions (3% oxygen) for four days, to mimic epidermis physiological conditions, and compared to culture in normoxia (18.6% oxygen). No morphological change was observed for HaCaT and NHEK in both oxygen conditions (Fig. 2A). However, we followed the cell growth for several days and show that the proliferation rate of HaCaT and NHEK, 5 or 6 days after seeding (Fig. 2B), is significantly increased in physioxia when compared to normoxia (+ 20 % and + 52% on day 6, respectively for HaCat and for NHEK). This is in agreement with previous results showing an increase in keratinocyte proliferation in physioxia (2 to 5% O₂) after 4 to 6 days of culture [3, 5, 18]. Freshly isolated keratinocytes grown for 8 days in the absence of serum and exposed to 5% of oxygen were shown to increase their growth rate up to 12-fold compared to the same cells grown in normoxia [18]. Furthermore, primary keratinocytes growth at 5% oxygen reduces differentiation gene expression like K10, involucrin and filaggrin [18]. All these results suggest that physioxia allows keeping the proliferative potential of keratinocyte, preserving them from differentiation. However, two studies reported a decrease in keratinocyte proliferation at 3 and 4% O₂ for shorter terms of culture (2 to 4 days) [19, 20]. Differences can come from culture conditions, from the origin and the nature of the cells. These conflicting reports show how the role of oxygen on keratinocytes growth is still not very well understood. Additionally, studies on other skin cell types show an increase of cell proliferation in physioxia for melanocytes [21] and for dermal papilla cells at 2% O₂ [22]. The importance of the right oxygen level for skin-cell growth and differentiation was shown in a study on hair follicles where growing conditions in normoxia resulted in the most efficient induction of dermal papilla cells, whereas low oxygen level caused the most efficient induction and maturation of dermal sheath cells [23]. However, other cell type, as human skin fibroblast, was not sensitive to change in oxygen level [24].

More generally, several recent studies point in the same direction and highlight the importance of respecting physioxia in cell culture in order to keep the original cell phenotype. This is the case for endothelial progenitor cells and adipocytes keeping their angiogenesis and

migratory abilities with a lower proportion of senescent cells [25, 26], and for chondrocytes retaining their chondrogenicity [27].

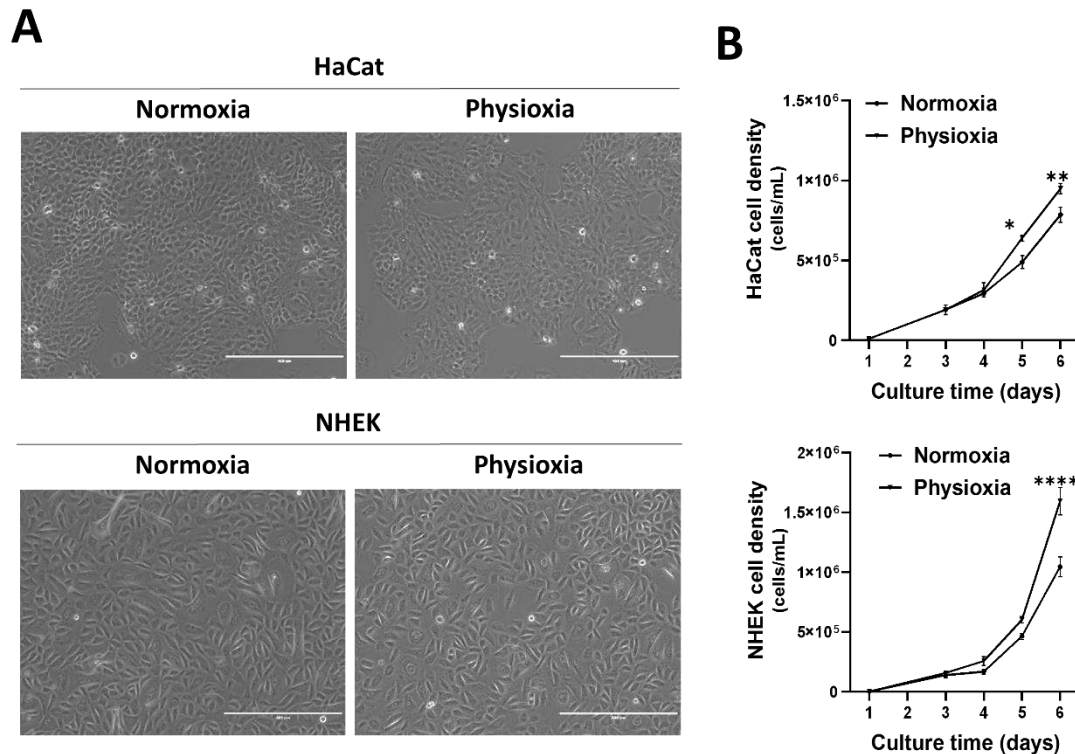


Fig. 2: Differences in HaCat and NHEK proliferation rate in physioxia vs normoxia. HaCaT and NHEK were maintained either in physioxia (3% O₂) or in normoxia (18.6% O₂) for one week. (A) Phase contrast images of HaCat and NHEK cultures at four days after seeding, scale bar: 400 μm; (B) Proliferation curves of HaCaT and NHEK in physioxia and in normoxia. Cells were quantified using the NucleoCounter® allowing the evaluation of viable cells. Data are represented with mean +/- SEM of 2 independent experiments including 6 replicates each. Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3.3. Characterization of RHE generated in physioxia

Keratinocyte monolayers are considered as representative of proliferative keratinocytes, i.e., cells from the basal layer of the epidermis, but do not integrate the differentiation process that occurs in the upper layers. Closer to skin physiology, RHE are now mainly used to study skin mechanisms as they reproduce a functional barrier even if their permeability is not exactly the same as native skin [28]. To study the effects of oxygen level, we generated RHE in physioxia and characterized their properties in comparison to normoxia.

Following 15 days of culture, RHE were obtained in both oxygen conditions. They display a correct cell stratification and the presence of a stratum corneum shown by the nuclei and by the Masson's trichrome stainings (Fig. 3A.). RHE grown in physioxia showed a positive labelling with the hypoxyprobe pimonidazole confirming the low oxygen level at the keratinocyte level during the culture time (Fig. 3E). As a consequence, we observed structural and biological differences in epidermal formation compared to RHE grown in standard conditions. Interestingly, a lower epidermis thickness was observed in physioxia with about 40 μm compared to 70 μm in normoxia (Fig. 3A-3B). This can be correlated to the increase in Ki67-positive cells (+43%, Fig. 3C-3D) showing that keratinocytes from the basal layer rather stay in the proliferation phase than enter the differentiation process, leading to a thinner epidermis. However, the differentiation markers, loricrin and involucrin, are present in physioxia (Fig. 3F) and indicate an achieved epidermal terminal differentiation.

To our knowledge, very few studies focused on the role of oxygen on skin 3D models. The stratification of keratinocytes in a colony formation model was reported to be greatly attenuated at 2% O_2 [29]. Additionally low epidermis thickness was reported for RHE generated at 5% and 2% O_2 but without the presence of fibroblasts [18] and a delayed cornification was observed below 10% O_2 . The terminal differentiation that we observed in our results and that is absent from the previous model could be due to the presence of the fibroblasts under the membrane as they were shown to crosstalk with keratinocytes and enhance epidermal barrier formation [30]. This is in agreement with the second study on a full-skin model prepared at 3% O_2 where a thinner epidermis was shown as well as a terminal differentiation with the expression of loricrin, involucrin and filaggrin [20]. According to the study of the stratum corneum composition and the lipid organisation, full-skin equivalents prepared in physioxia were shown closer to native human skin [20]. Taken together, these results suggest that the exposition of skin cells, which are naturally in physioxia, to increased levels of oxygen accelerates keratinocyte differentiation, leading to a thicker epidermis with less proliferating cells.

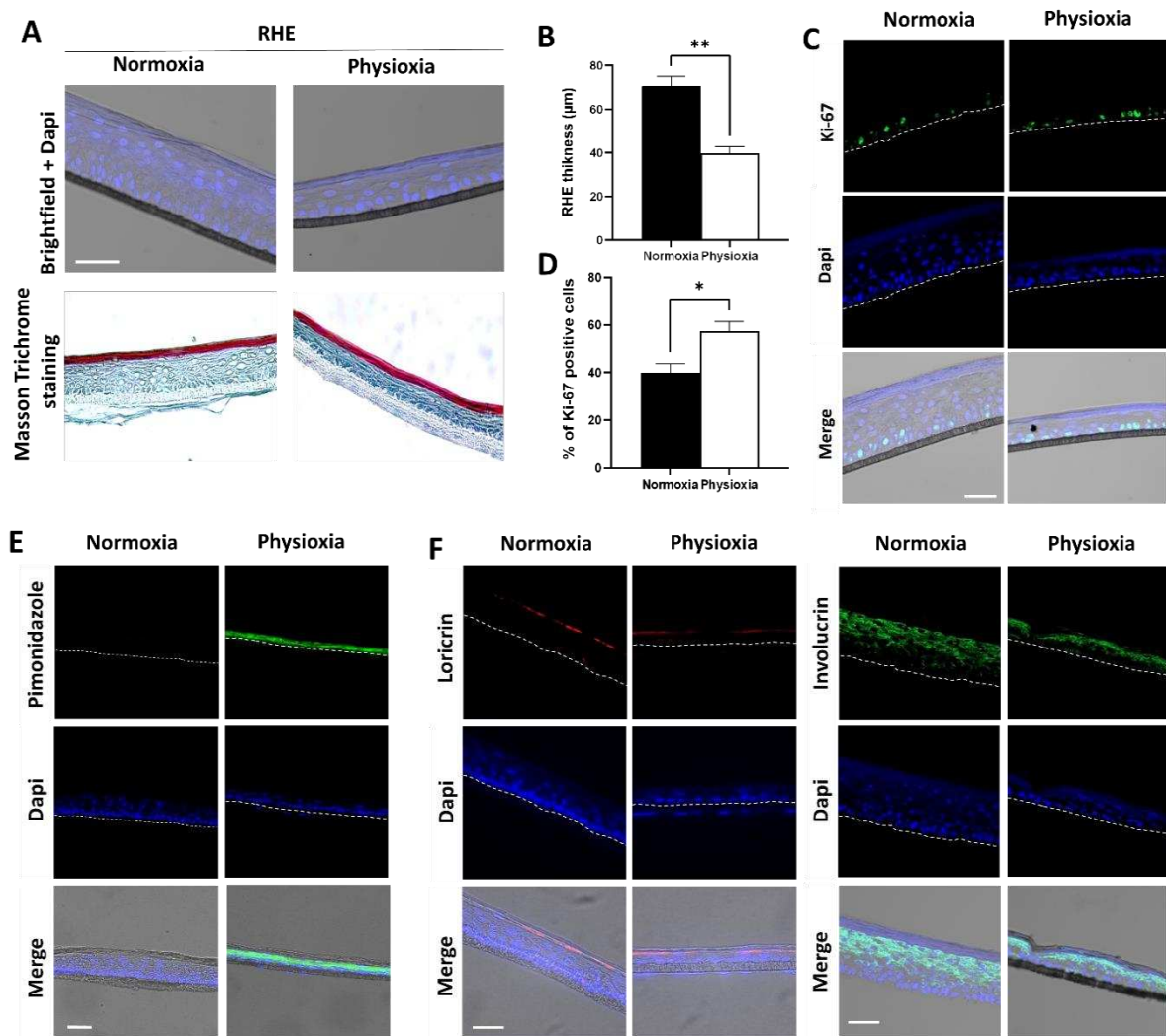


Fig. 3. Comparison between RHE generated in physioxia and in normoxia. RHE were prepared in physioxia (3% O₂) and in normoxia (18.6% O₂). (A) Nuclei staining with Dapi and Masson's Trichrome staining; (B) Evaluation of epidermis thickness; (C) Visualization of proliferative cells by Ki67 immunostaining; (D) Evaluation of the percentage of Ki67-positive cells in the basal layer of RHE; (E) Visualization of the decrease in oxygen level by pimonidazole adducts immunostaining; (F) Differentiation markers, involucrin and loricrin, immunostaining. Data are represented with mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments. Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.4. Physioxia decreases H₂O₂-induced intracellular ROS production in keratinocytes

In the cellular metabolism, oxygen availability is closely related to the production of ROS through mitochondria and enzymes activities [31]. To understand the role of oxygen in the antioxidant defences of the skin, we started by evaluating the production of ROS in keratinocytes in physioxia and in normoxia, both in basal conditions and after induction of H₂O₂ stress.

In both HaCaT and NHEK, the basal production of ROS (Fig. 4) is not significantly different between physioxia and normoxia after 4 days in culture and only part of this production can be scavenged by NAC in HaCaT cells. Keratinocytes keep thus a stable ROS level despite the strong oxygen variation. In the literature ROS production in cells at physiological oxygen level is still misunderstood and the results are different from one study to another. Kato et al show a decrease in primary human oral keratinocyte ROS at 2% O₂ for 72h [5]. This was also reported for human dermal fibroblasts at various O₂ levels (1-10% O₂) with a linear basal ROS decrease with the diminution of O₂ [24] and for cells from dermal papillae at 2% O₂ [22] or 5% O₂ [7]. However, an increase in basal ROS production was reported in human adipocytes at 2% O₂ [26] and similarly in human dermal fibroblasts, young or old, at 5% O₂ but with a concomitant increase in intramitochondrial superoxide [8]. Therefore, the production of basal ROS in physioxia depends not only on the cell type or on the oxygen level but also maybe on the culture medium, or on the choice of ROS probes.

Besides basal ROS production, we also evaluated the ability of cells to respond to H₂O₂ stress in physioxia. Upon stimulation with high levels of H₂O₂, both HaCaT and NHEK show a significant increase in ROS production but only in normoxia. The difference in ROS production between physioxia and normoxia is significant starting from 100 µM for HaCaT and only at 400 µM for NHEK. Interestingly, under physioxia condition, the effects of H₂O₂ are almost totally inhibited because the ROS generation at different H₂O₂ concentration was not significantly different than that in the control group, for both cellular types. This result shows that cells in physioxia are less sensitive to H₂O₂ stress, even for high concentrations, and may suggest that they have a better antioxidant system.

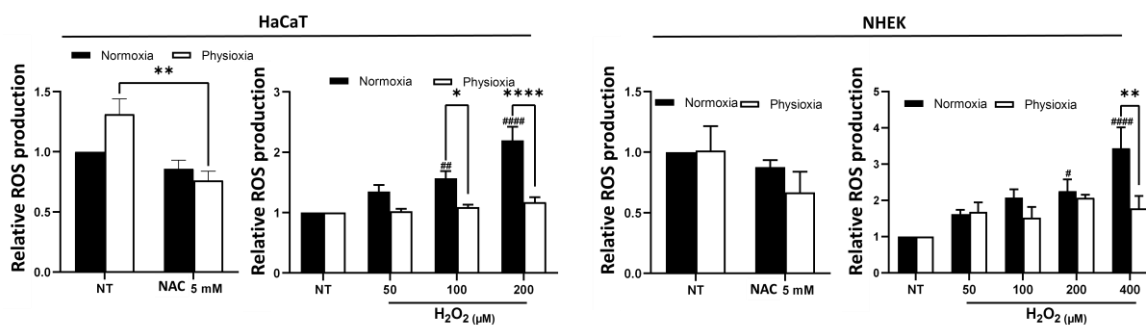


Fig. 4. Decrease in H₂O₂-induced ROS production in keratinocytes under physioxia condition. After a 4-day period in physioxia or in normoxia, HaCaT and NHEK were submitted to H₂O₂ stress (50 to 400 μM) for 20 min. ROS production was then evaluated using the DCF-DA probe. Non treated (NT) cells were incubated with N-Acetyl-Cystein (NAC, 5 mM), a ROS scavenger. Basal ROS production was expressed as normalized values versus normoxia condition. H₂O₂-stimulated ROS production was expressed as normalized values versus the corresponding control, normoxia or physioxia. Data are represented with mean +/- SEM of at least 3 independent experiments. Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA). ##*p*<0.01, ####*p*<0.0001 versus the corresponding control, physioxia ou normoxia. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001 between physioxia and normoxia.

3.5. Physioxia decreases antioxidant gene expression in keratinocyte cultures and in RHE

ROS are continually generated inside the cell in response to various endogenous and exogenous signals. Therefore, the expression and the activity of antioxidant enzymes are crucial for maintaining a controlled redox state and for preventing damages to biological molecules. As physioxia decreases ROS level upon H₂O₂ stress, we investigated the expression of the main antioxidant enzyme genes using RTqPCR, comparing normoxia and physioxia conditions. On both HaCaT and NHEK, SOD1, GPX1 and GPX4 expressions were significantly downregulated at 3% O₂ (Fig. 5A, 5B). The decrease was of -38 %, -31% and -34%, respectively for SOD1, GPX1 and GPX4 in HaCaT, and -45%, -34% and -39% in NHEK. On RHE (Fig. 5C) the downregulation of SOD1 was confirmed (-23%) whereas the GPXs were not affected by physioxia. On both NHEK and RHE but not on HaCaT, catalase expression was strongly reduced (-68% and -54%, respectively) in physioxia. Besides, we demonstrated here that SOD2 was unchanged in physioxia whatever the model used.

Similar results about a decrease in SOD1 expression, and also, in addition, to SOD3, was reported in dermal fibroblasts, whether young or old, but in these cells the catalase expression was unchanged [8]. In a slightly more distant cell type, the A431 human epidermoid carcinoma, Ferguson et al described the same phenotype in physioxia with a reduction of SOD1, GPX1 and catalase expressions and a lack of SOD2 modulation under culture at 2% O₂ [32]. In contrary, mRNA of SOD1 was reported to be increased in several cells line cultured at 3% of oxygen [33].

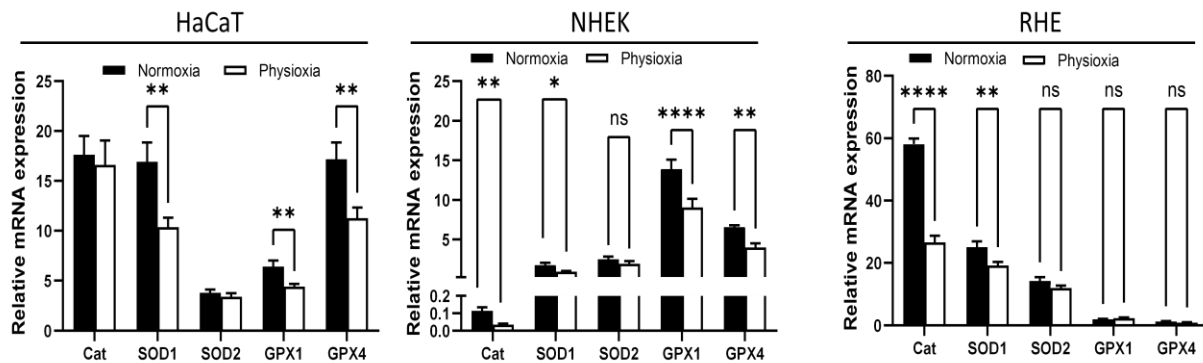


Fig. 5. Physioxia decreases antioxidant gene expression in keratinocyte cultures and in RHE. HaCaT and NHEK were submitted to physioxia (3% O₂) or normoxia (18.6% O₂) for 4 days. RHE were generated in physioxia or in normoxia for 15 days. Quantitative real-time PCR analyses were performed for mRNA expression of catalase, SOD1, SOD2, GPX1 and GPX4. Results were normalized to the three housekeeping genes GAPDH, B2M and GUSB. Data are represented by the relative mRNA expression with mean +/- SEM of at least 3 independent experiments. Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001, *****p*<0.0001 between physioxia and normoxia.

3.6. Physioxia regulates antioxidant enzyme amounts in keratinocyte cultures and in RHE

As the decrease in antioxidant enzyme expression was not consistent with our hypothesis that cells in physioxia display a better antioxidant efficacy, we then investigated the antioxidant enzymes at the protein level by immunofluorescence and Western blotting.

In HaCaT, a clear increase in catalase amount in the cytoplasm in physioxia was observed by immunofluorescence and this was confirmed by the quantification of Western blotting (+121% in physioxia compared to normoxia) (Fig. 6A, 6C.). However, the amount of catalase remained unchanged in NHEK (Fig. 6B, 6D) and in RHE (Fig. 7.). Taken together these results show an increase in catalase without modulation of the corresponding mRNA in

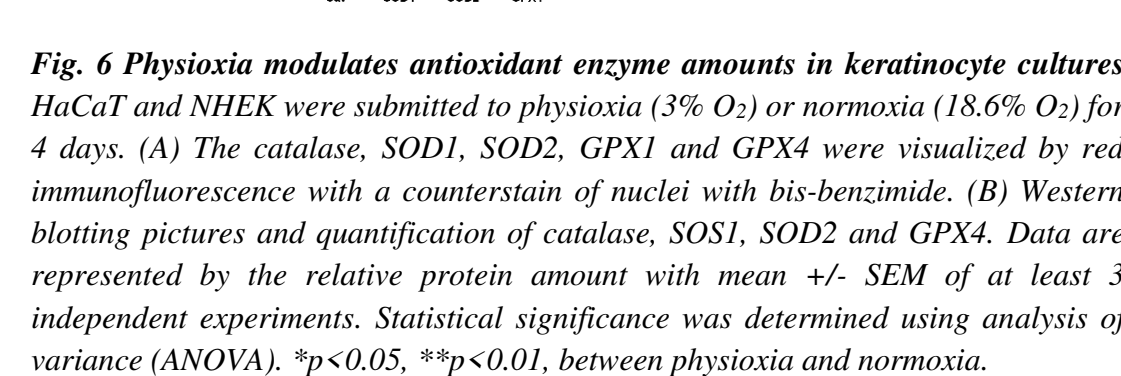
HaCat and a lack of catalase modulation associated with a downregulation of the mRNA in NHEK and RHE. By contrast, a decrease in catalase amount was previously reported in dermal fibroblasts at 1% O₂ [24] and in dermal papilla cells at 2% O₂ [22] but, in these two studies, the corresponding gene expressions were not assessed.

Concerning SOD2, we found in NHEK that the protein amount increases in the cell cytoplasm in physioxia with a significant level (+ 82%). Similarly, SOD2 amount is higher (+86%) in RHE in physioxia, confirming the result obtained in NHEK.

For SOD1, we demonstrated a reduction in physioxia of protein amount in RHE (-30%) whereas it was unchanged in keratinocyte monolayer cultures. However, we observed a preferential accumulation of SOD1 inside the nuclei of NHEK in physioxia compared to normoxia whereas in HaCaT it remains in the cytoplasm (Fig 6B). It was previously demonstrated that SOD1 can be present in the nucleus of fibroblasts where it can act as a transcription factor. This intranuclear localization was shown to be triggered by the presence of high levels of H₂O₂ and therefore SOD1 regulates oxidative resistance and repair gene expression [34]. Whether a higher production of H₂O₂ is present in NHEK in physioxia, compared to normoxia, despite an unchanged global ROS production (Fig. 4), remains to be determined. Similarly, a different content in H₂O₂ may be present in NHEK compared to HaCaT leading to a different localization of SOD1.

Confirming partly our results a study of keratinocytes from either old or young patient at 4% O₂ reported a lack of SOD1 modulation, but also for SOD2 [19] whereas another study on dermal fibroblasts at 1% O₂ showed a decrease in both enzymes amount [24].

A questionable point in this study of antioxidant enzymes is the decrease, or stability, in mRNA expression, both in 2D and in 3D models, correlated with an increase of protein amount, catalase in HaCaT and SOD2 in NHEK and RHE. Several hypotheses can be raised such as a higher protein stability or a change in enzyme translation mechanisms. In fact, Timpano et al demonstrated that human cells cultured under physiological oxygen (1-8% O₂) utilize two Cap-binding proteins to recruit distinct mRNAs for translation, eIF4E dominant in normoxia and eIF4E2 dominant in hypoxia, whereas only eIF4E-based translation is active in normoxia [35]. Each cap-binding protein being specific for different mRNA [36], it may explain that, even if the mRNA expression is low in physioxia, the protein can be more expressed if eIF4E2 is more specific for this mRNA than eIF4E.



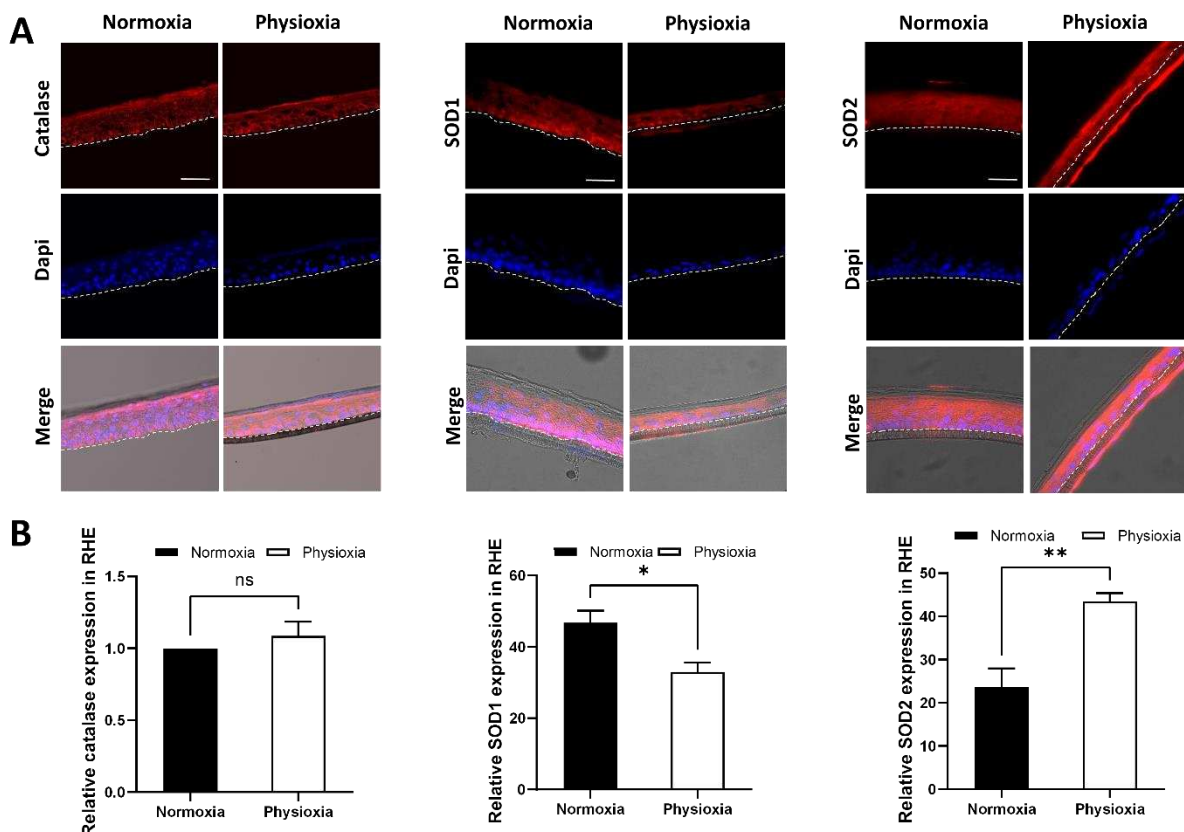


Fig. 7. Physioxia modulates antioxidant enzyme amounts in RHE. RHE were generated in physioxia (3% O₂) or in normoxia (18.6% O₂) for 15 days. (A) Catalase, SOD1, SOD2, GPX1 and GPX4 were visualized by red immunofluorescence with a counterstain of nuclei with bis-benzimide. Scale bar of 50 μ m. (B) Quantification of catalase, SOD1, SOD2 and GPX4 from immunostainings. Data are represented by the relative protein amount with mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments. Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA). * p < 0.05, ** p < 0.01, between physioxia and normoxia.

3.7. Physioxia stimulates antioxidant enzyme activity in keratinocytes

As the presence of the enzymes in terms of protein amount can be different from enzyme activity, we further assessed the antioxidant activity of catalase and SODs in the same culture models (Fig. 8). The results show a similar and significant increase in catalase activity in physioxia for HaCaT, NHEK and RHE (+41%, +35%, +62%, respectively). Additionally, the superoxide dismutase activity was higher in physioxia for NHEK (+ 33%) and much higher in RHE (+ 87%) but was unchanged in HaCaT.

Little data are available about the effect of oxygen level on antioxidant enzymes in physioxia, especially in keratinocytes, although these cells are the richest in antioxidant enzymes in the skin relative to the dermal cells [13]. However, a lower antioxidant activity has been reported in physioxia in other cell types. A decrease in catalase activity was described in cells from the dermal papilla [22]. Also, a decline in the expression of antioxidant enzymes and their activities was observed in carcinoma cells cultivated at 2% O₂ [32], as well as in fibroblasts at 1% O₂ [24]. These results are not consistent with ours, obtained in keratinocytes, and up to now, no mechanism has been put forward to explain such effect.

For SOD2, our work shows an increase in protein amount in physioxia which can explain the higher activity. However, catalase seems to be affected differently because its activity is not correlated to the protein level. Our result suggests that catalase becomes activated in physioxia in both NHEK and RHE. Some posttranslational changes in catalase have been identified in the literature that may influence a conformational change in the enzyme and thus its activation or inhibition. The glycation onto specific catalase lysine residues, for example, can lead to its activation [37]. Catalase activity was also shown to be modulated by direct interactions with other proteins: calmodulin, the calcium regulation protein, a mechanism identified in plant [38] but not yet in mammalian cells, or with p53R, a transcriptional product of p53 [39]. These possibilities may explain why catalase activities can be induced independently of its protein amount but their relationship with the oxygen level has to be studied.

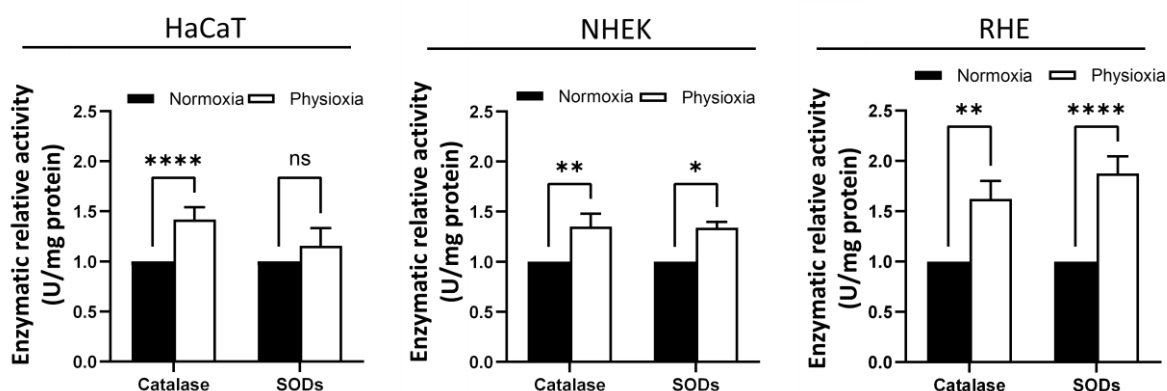


Fig. 8 Physioxia stimulates antioxidant enzyme activity in keratinocyte cultures and in RHE. HaCaT and NHEK were submitted to physioxia (3% O₂) or normoxia (18.6% O₂) for 4 days. RHE were generated in physioxia (3% O₂) or in normoxia (18.6% O₂) for 15 days. (A) Catalase and SODs enzymatic activities were evaluated in cells or RHE extracts. Data are presented by the relative enzymatic activities with mean $\pm$ SEM of at least 3 independent experiments. Statistical significance was determined using analysis of variance (ANOVA). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 between physioxia and normoxia.

4. Conclusion

We successfully established various models of keratinocyte cultures in physioxia, in particular reconstructed epidermis, and demonstrated that physiological oxygen conditions controlled both keratinocyte proliferation and expression of antioxidant enzymes. As a consequence, a better protection of keratinocytes against oxidative stress was found under physioxia conditions compared to classical cultures in normoxia, mainly due to the over-production of SOD2 and the suractivation of catalase. Further studies are needed to determine the mechanisms underlying such modulations of antioxidant enzymes by oxygen level.

Fundings

Nadira Chettouh-Hammas is funded by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. Giovanni Busco is funded by Cosmetosciences (PLASMACOSM2 Project, Grant 2017 00118114). Part of this work was supported by Cosmetosciences, a global training and research program dedicated to the cosmetic industry, located in the heart of the Cosmetic Valley. This program led by University of Orléans is funded by the Région Centre-Val de Loire, France. Part of this work was supported by APR-IR V-Skin from Région Centre-Val de Loire, France. This work was performed in the frame of the French CNRS network, GDR3711 Cosmactifs.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgements

The authors thank the flow cytometry and cell imaging platform, P@CYFIC, in the Center for Molecular Biophysics for access to microscopy equipment and Loick Ridou for the support in preparing reconstructed epidermis.

References

1. Carreau, A., et al., Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*, 2011. **15**(6): p. 1239-53.
2. Wenger, R.H., et al., Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia* (Auckland, N.Z.), 2015. **3**: p. 35-43.

3. Shih, C.-P., et al., Comparison of changes in mitochondrial bioenergetics between keratinocytes in human external auditory canal skin and cholesteatomas from normoxia to hypoxia. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 125.
4. Kato, H., et al., Metabolomic Alteration of Oral Keratinocytes and Fibroblasts in Hypoxia. *Journal of Clinical Medicine*, 2021. **10**(6): p. 1156.
5. Kato, H., et al., Hypoxia Induces an Undifferentiated Phenotype of Oral Keratinocytes in vitro. *Cells Tissues Organs*, 2014. **199**(5-6): p. 393-404.
6. Nys, K., et al., Skin mild hypoxia enhances killing of UVB-damaged keratinocytes through reactive oxygen species-mediated apoptosis requiring Noxa and Bim. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012. **52**(6): p. 1111-1120.
7. Abreu, C.M. and R.L. Reis, Dermal papilla cells and melanocytes response to physiological oxygen levels depends on their interactions. 2021. **54**(7): p. e13013.
8. Damiani, E., et al., Modulation of Oxidative Status by Normoxia and Hypoxia on Cultures of Human Dermal Fibroblasts: How Does It Affect Cell Aging? 2018. **2018**: p. 5469159.
9. Busco, G., et al., Changes in Oxygen Level Upon Cold Plasma Treatments: Consequences for RONS Production. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences*, 2018. **2**(2): p. 147-152.
10. Krutmann, J., et al., The skin aging exposome. *Journal of dermatological science*, 2017. **85**(3): p. 152-161.
11. Kulms, D. and T. Schwarz, Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 2002. **64**(5): p. 837-841.
12. Moon, K.-C., et al., Effects of ultraviolet irradiation on cellular senescence in keratinocytes versus fibroblasts. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2019. **30**(1): p. 270-275.
13. Shindo, Y., et al., Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol*, 1994. **102**(1): p. 122-4.
14. Boukamp, P., et al., Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, 1988. **106**(3): p. 761-771.
15. Muramatsu, S., et al., Differentiation-specific localization of catalase and hydrogen peroxide, and their alterations in rat skin exposed to ultraviolet B rays. *J Dermatol Sci*, 2005. **37**(3): p. 151-8.
16. Reiners, J.J., Jr., et al., Modulation of catalase activities in murine epidermal cells as a function of differentiation and exposure to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis*, 1990. **11**(6): p. 957-63.

17. Reiners, J.J., Jr., M.A. Hale, and A.R. Cantu, Distribution of catalase and its modulation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in murine dermis and subpopulations of keratinocytes differing in their stages of differentiation. *Carcinogenesis*, 1988. **9**(7): p. 1259-63.
18. Koh, R., et al., Oxygen-Mediated Control of the Keratinocyte Proliferation-Differentiation Axis. *J Invest Dermatol*, 2020. **140**(1): p. 235-238.e3.
19. Ross, C., et al., Oxygen tension changes the rate of migration of human skin keratinocytes in an age-related manner. *Exp Dermatol*, 2011. **20**(1): p. 58-63.
20. Mieremet, A., et al., Human skin equivalents cultured under hypoxia display enhanced epidermal morphogenesis and lipid barrier formation. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 7811.
21. Weidmann, C., et al., Differential responses of choroidal melanocytes and uveal melanoma cells to low oxygen conditions. *Molecular vision*, 2017. **23**: p. 103-115.
22. Upton, J.H., et al., Oxidative stress-associated senescence in dermal papilla cells of men with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol*, 2015. **135**(5): p. 1244-1252.
23. Kanayama, K., et al., Hair Regeneration Potential of Human Dermal Sheath Cells Cultured Under Physiological Oxygen. *Tissue Eng Part A*, 2020. **26**(21-22): p. 1147-1157.
24. Sgarbi, G., et al., Hypoxia decreases ROS level in human fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017. **88**: p. 133-144.
25. Lin, Y., et al., Normoxia is not favorable for maintaining stemness of human endothelial progenitor cells. *Stem Cell Research*, 2019. **38**: p. 101464.
26. Chen, C., et al., Physioxia: a more effective approach for culturing human adipose-derived stem cells for cell transplantation. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018. **9**(1): p. 148.
27. Anderson, D.E., et al., Physioxia Promotes the Articular Chondrocyte-Like Phenotype in Human Chondroprogenitor-Derived Self-Organized Tissue. *Tissue Eng Part A*, 2018. **24**(3-4): p. 264-274.
28. Thakoersing, V.S., et al., Nature versus nurture: does human skin maintain its stratum corneum lipid properties in vitro? *Exp Dermatol*, 2012. **21**(11): p. 865-70.
29. Ngo, M.A., et al., Oxygen-Dependent Differentiation of Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007. **127**(2): p. 354-361.
30. Varkey, M., J. Ding, and E.E. Tredget, Superficial dermal fibroblasts enhance basement membrane and epidermal barrier formation in tissue-engineered skin: implications for treatment of skin basement membrane disorders. *Tissue Eng Part A*, 2014. **20**(3-4): p. 540-52.

31. Stuart, J.A., et al., How Supraphysiological Oxygen Levels in Standard Cell Culture Affect Oxygen-Consuming Reactions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. **2018**: p. 8238459.
32. Ferguson, D.C.J., et al., Altered cellular redox homeostasis and redox responses under standard oxygen cell culture conditions versus physioxia. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018. **126**: p. 322-333.
33. Timpano, S., et al., Physioxic human cell culture improves viability, metabolism, and mitochondrial morphology while reducing DNA damage. *The FASEB Journal*, 2019. **33**(4): p. 5716-5728.
34. Tsang, C.K., et al., Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 3446.
35. Timpano, S. and J. Uniacke, Human Cells Cultured under Physiological Oxygen Utilize Two Cap-binding Proteins to recruit Distinct mRNAs for Translation. *The Journal of biological chemistry*, 2016. **291**(20): p. 10772-10782.
36. Uniacke, J., et al., An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature*, 2012. **486**(7401): p. 126-9.
37. Mofidi Najjar, F., et al., Destructive effect of non-enzymatic glycation on catalase and remediation via curcumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2017. **630**: p. 81-90.
38. Yang, T. and B.W. Poovaiah, Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(6): p. 4097-4102.
39. Kang, M.Y., et al., The critical role of catalase in prooxidant and antioxidant function of p53. *Cell Death & Differentiation*, 2013. **20**(1): p. 117-129.

2. Partie 2

2.1. Résumé

Ce travail fait suite à la première étude qui montre l'impact de la physioxie sur l'état des enzymes antioxydantes des kératinocytes dans trois modèles de peau. Dans cette deuxième étude, nous avons recréé le photovieillissement en physioxie et en normoxie dans les deux modèles, NHEK et RHE, *via* des irradiations UV. Nos résultats démontrent une forte surexpression et/ou activation des enzymes antioxydantes en réponse aux UV en physioxie par rapport à la normoxie, dans les deux modèles de culture.

Le présent article est en cours de préparation.

2.2. Article 2: Physioxia induces changes in the antioxidant response of keratinocytes in 2D or 3D models upon UV irradiation

Physioxia induces changes in the antioxidant response of keratinocytes in 2D or 3D models upon UV irradiation

Nadira Chettouh-Hammas, Fabienne Fasani, Amandine Boileau, David Gosset, Giovanni Busco, Zeineb Maaroufi, Catherine Grillon

Center for Molecular Biophysics UPR4301 CNRS, Orléans, France

Rue Charles Sadron, 45071 Orléans, France

Publication en préparation

Corresponding author:

Dr. Catherine Grillon, Center for Molecular Biophysics UPR4301 CNRS, Orléans, France

Tel: +33 38 25 78 04

Fax: 02 38 25 54 59

Email address: catherine.grillon@cnrs-orleans.fr

Abstract

Skin photoaging is mainly due to oxidative stress. This mechanism is strongly linked to oxygen level since reactive oxygen species (ROS) are generated from the oxygen by cellular metabolism or by exogenous factors such as UV exposure. However, most of the studies are performed under atmospheric oxygen which is very far from the physiological microenvironment in the skin epidermis, physioxia (1-3% O₂). In addition, in aging skin, the key antioxidant enzymes, catalase, superoxide dismutases (SOD) and glutathione peroxidases (GPX), are deregulated, leading to accentuating the oxidative stress and the tissue damages. The present work aims to studying the role of oxygen level on antioxidant enzyme expression and activity in keratinocytes after UV irradiation. We established two models representing the epidermis in physioxia (3% O₂), primary keratinocytes in monolayer (NHEK) and reconstructed epidermis (RHE), and compared them to the same models maintained in normoxia (18.6% O₂ in an incubator). UVA/UVB irradiation was performed on both models and antioxidant responses was studied 6 and 24 hours after treatment. Upon UV irradiation in physioxia, catalase expression increases in NHEK but not in RHE. However the high enzymatic activity, without any change in catalase at the protein level, mainly at 24h, indicates an over activation of this enzyme when compared to normoxia. Among all antioxidant enzymes, SOD2 shows the major change with a higher expression in physioxia after UV irradiation, at 6h for RHE and at 24h for NHEK. This explains the higher superoxide dismutase enzymatic activity observed in both models in physioxia, whereas SOD1 expression is not or low changed. However, in NHEK, despite the lack of change in SOD1 amount, a marked difference was shown in SOD1 localization. In physioxia, SOD1 accumulated in keratinocyte nuclei 24h after irradiation suggesting a switch in its activity from antioxidant to transcription factor. These results open new ways for a better comprehension of antioxidant enzyme regulation in physiopathological skin photoaging.

Keywords

Oxygen, skin, antioxidant defenses, physioxia, photoaging, normoxia, UV, oxidative stress,

Abbreviations

UV, ultraviolet rays

ROS, reactive oxygen species

SOD, superoxide dismutase

GPX, glutathione peroxidase

TBS, Tris buffer saline

NHEK, normal human epidermal cell

HDF, human dermal fibroblast

RHE, reconstructed human epidermis

PBS, phosphate buffer saline

CM-H₂DCFDA, 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

SDS-PAGE, Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

1. Introduction

Photoaging refers to the acceleration of skin natural aging primarily due to prolonged solar exposure. Upon reaching the earth, the ultraviolet rays, which comprise UVB (290-320 nm) and UVA (320-400), may penetrate human skin and damage epidermal keratinocytes as well as the extracellular matrix of the dermis, leading to a marked decline in the biological properties of the skin and various other consequences, such as pronounced wrinkles and pigmentation spots. One of the reasons to particularly focus on skin photoaging is the high risk of developing skin cancers [1].

The most important molecular mechanism related to aging is oxidative stress. UV interacts directly with molecular oxygen, which induces the immediate production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Or by the activation of enzymes, like NADPH oxidase, and alteration of mitochondria producing more ROS thereafter [2, 3]. As the skin ages, antioxidants, including catalase (Cat) and glutathione peroxidase (GPX) that neutralize H_2O_2 and superoxide dismutase (SODs) responsible for neutralizing superoxide $O_2^{\cdot-}$, become progressively less effective [4]. This deterioration exacerbates oxidative stress, causing irreversible damage to nucleic acids, lipids, and proteins.

Oxygen is strongly linked to oxidative stress, as it is the source of ROS in the cell. However, it is a fundamental molecule in cellular metabolism. Oxygen availability varies from one tissue to another [5]. In fact, physioxia, the physiological oxygenation rate of the organs is heterogeneous. In the skin, it varies from 1% to 7% and is on average 3% in the basal layer of the epidermis, which is the rate required for maintaining cell homeostasis [6]. This percentage is still lower than the oxygen availability in the air, normoxia, which is 21% O_2 . The physiological oxygen levels in *in vitro* culture, especially in the skin, has generally been neglected until recent years. Furthermore, several studies have shown the importance of maintaining physioxia of each tissue *in vitro*. Indeed, culturing keratinocytes at their physiological oxygenation levels affects their proliferation [7-9]; their metabolism [10], with a

greater orientation towards glycolysis, migration [11], and differentiation. Similar effects have been observed in adipocytes [12], melanocytes and dermal fibroblasts [13].

However, the mechanisms of photoaging, particularly the modulation of antioxidants which promotes skin aging is not fully elucidated, and the experimental models currently available remain in normoxia.

The present study aims to better understand the mechanisms of photoaging of the skin by using reconstructed skin models developed in our laboratory in physioxia and to examine how an oxygen concentration that more closely reflects a physiological condition (3% O₂) influences the expression of antioxidants in keratinocytes in response to UV treatment. To this end, the gene transcription and protein expression as well as the activity of Cat, GPX and SODs were assessed on a 2D model of primary skin keratinocyte culture as well as on a 3D model of reconstructed skin and were compared to models cultured under the conventional culture condition of normoxia. We report here, for the first time to our knowledge, data on the variation in these antioxidants, from transcription levels to their activity, in models grown under physiological oxygen concentration.

2. Materials and methods

1.1. Cell cultures

The primary normal human epidermal keratinocytes (NHEK) were purchased from Lonza Bioscience (Basel, Switzerland) and maintained in DermaLife K Complete Medium (Lifeline Cell Technology, Frederick, MD, USA) supplemented with 100 U/mL Penicillin, 100 µg/ml streptomycin. Normal human adult primary fibroblasts (HDF) were purchased from Cell Systems (Kirkland, WA, USA) and maintained in Fibrolife medium (Lifeline Cell Technology) supplemented with 100 U/mL Penicillin, 100 µg/ml streptomycin. Cultures were maintained at 37°C in normoxia condition in a classical incubator with 5% CO₂ and 21% of O₂, or in physioxia condition inside a HypOxystation® H35 (Don Whitley, Bingley, United Kingdom) with 3% of O₂, 5% CO₂ and 92 N₂. Throughout this study, cells were always used at about 70% confluence with a maximum of 2-3 passages for NHEK cells, and 6 passages for fibroblasts.

1.2. Reconstructed human epidermis (RHE)

RHE were generated on polycarbonate membrane cell culture inserts with 12 mm diameter and 0.4 μm pore size (Sigma-Aldrich). Briefly, after thawing, HDF and NHEK were diluted in their specific culture medium and maintained in normoxia or in physioxia, the medium being replaced after 24 hours and every two days. When cells reach 70% confluence, HDF were harvested by incubation with trypsin-EDTA (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), seeded at 5×10^4 cells/insert underside of the insert membrane, and incubated for 1h in each condition. Keratinocytes were harvested using trypsin (Lonza Biosciences) and seeded into the inserts at 4×10^5 cells/insert in Dermalife K complete medium. Inserts were placed in 6-well-plates containing 2 ml Dermalife K complete medium and incubated for 48 h. Then, to induce differentiation of keratinocytes, the insert medium was removed, and keratinocytes were subsequently exposed to the air-liquid interface. The medium from 6-well-plates was replaced by 1.5 mL of Epilife supplemented with 1% Human Keratinocyte Growth Supplement (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), 1.5 mM CaCl_2 , 92 $\mu\text{g/mL}$ L-ascorbic acid 2-Phosphate and 10 ng/mL keratinocyte growth factor (Sigma Aldrich). The medium was renewed every 2 days and the air-liquid cultures were maintained for 15 days.

1.3.UV Irradiation of cells and RHE

Following a 4 days-culture under physioxia or normoxia, NHEK were irradiated in PBS with UVA (3 J/cm², 365 nm) and UVB (20 to 200 mJ/cm², 312 nm) using the BIO-SUN irradiator (Vilber Lourmat, Marne la Vallée, France). Immediately after the treatment, PBS was changed to a culture medium. For RHE samples, after generations in physioxia or in normoxia (15 days), RHE were treated with UVA (3 J/cm²) and UVB (50 mg/cm²). The cultures were stopped at 6 hours and 24 hours after UV irradiation. The control consisted of cells or RHE that were not exposed to irradiation.

1.4.Measurement of NHEK viability

Cells were seeded into 96 wells-microplates at 5000 cells/well, grown in physioxia or normoxia and irradiated. Twenty-four hours after irradiation, the culture medium was replaced by 100 μL of 1:10 diluted Alamar Blue® (Thermo Fisher Scientific) solution in the culture medium. Cells were incubated for three hours at 37°C in normoxia. For the physioxia conditions, the incubation in the presence of Alamar Blue was also performed in normoxia to avoid the bias induced by the change in Alamar Blue metabolism under various oxygen levels. The fluorescence intensity ($\lambda_{\text{excitation}} = 560 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emission}} = 605 \text{ nm}$) was measured

using a microplate spectrophotometer (VICTOR 3V, Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France). The fluorescence signal was proportional to the number of living cells.

1.5.Determination of intracellular ROS generation

Intracellular ROS formation in normoxia and physioxia was measured by the cell-permeant indicator 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, CM-H₂DCFDA (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific). Cells were seeded at a density of 1 x 10³/well in 96-well microplates and were maintained for four days in normoxia or physioxia condition. Then cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and incubated with 10 μM CM-H₂DCFDA for 20 min. After washings, cells were stressed with UVA/UVB irradiation. The relative fluorescence intensity was then measured using a microplate spectrophotometer (VICTOR 3V, Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France) with excitation at 490 nm and emission at 535 nm. Results are expressed in fold change *versus* the untreated control.

1.6.Western blots

After culture, cells were washed with cold PBS then mechanically harvested in RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). After 15 min on ice, lysates were centrifuged, and proteins were denatured at 95°C for 5 min in Laemmli buffer 4X with 0.1% β-mercaptoethanol (Biorad, Hercules, CA, USA). 25 μg of proteins were then loaded on a 12% SDS-PAGE gel at a voltage of 160 V for 45 min. Then proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Biorad) using Trans-Blot Transfer System (Biorad). Membrane was incubated in 5% dry skimmed milk solution in Tris Buffered Saline (TBS) supplemented with 0.1% Tween-20. Proteins were probed with primary antibodies overnight at 4 °C and then with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. After washing with TBS, bands were detected with enhanced chemiluminescence reagents (WestDura detection kit, Thermo Fisher Scientific) and then quantified using the chemiluminescence imager ChemiDoc (Biorad).

The following primary antibodies were used: Catalase (1:1000, 12980, Cell Signaling technology, Danvers, MA, USA), SOD1 (1: 1000, ab183881, Abcam, Cambridge, United Kingdom), SOD2 (1: 1000, ab13533, Abcam), GAPDH (1/10000, D16H11, Cell Signaling Technology), secondary antibody goat anti-rabbit (1:30000, 65-6120, Invitrogen). Protein quantification was performed using ImageLab software (BioRad) and results were normalized to GAPDH.

1.7. Gene expression

Total RNA from cell cultures, RHE samples or skin explants were extracted using Qiagen RNeasy mini kit following the manufacturer's recommended protocol (Qiagen, Hilden, Germany). The reverse transcription of 1 µg total RNA was performed using the reverse transcription kit Maxima First Strand cDNA (Fermentas, Thermo Fisher Scientific). The generated cDNA (200 ng) was used as a template for the qPCR with various primers and SYBR Premix Ex Taq™ (TAKARA BIO INC, Saint Germain en Laye, France). PCR reactions were set up in duplicate, after a slight modification of the manufacturer's protocol, allowing the use of 2 µL cDNA per reaction, instead of 5 µL. Reactions were run on a LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). A dissociation curve was run after each PCR reaction to ensure that only one amplicon was synthesized. qPCR analysis was performed using the LightCycler 480 software. The efficiency of each primer pair was calculated using a dilution range of cDNA. The relative quantity of each gene was then calculated by considering the efficiency of each primer pair. Three housekeeping genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), beta-2 macroglobulin (B2M) and β -Glucuronidase (GUSB) were used in the same experiment. The geometric mean of reference gene-relative quantities was used to normalize the relative quantities of each gene interest. Results are expressed in fold change versus the UV-untreated control from at least three independent samples.

The following primers were used in the study of the respective target genes: Catalase (Sigma, FH3_CAT GGACTTTTACATCCAGGTC, and RH3_CAT CGGTTTAAGACCAGTTTACC), SOD1 (Sigma, FH1_SOD1 GAGCAGAAGGAAAGTAATGG, RH1_SOD1 GATTAAAGTGAGGACCTGC), SOD2 (Sigma, FH1_SOD2 ATCATACCCTAATGATCCCAG, RH1_SOD2 AGGACCTTATAGGGTTTTCAG), GPX4 (Qiagen, QT00067165), B2M (Qiagen, QT00088935), GAPDH (Qiagen, QT00079247), GUSB (Qiagen, QT00046046).

1.8. Measurement of SODs, Catalase activities

Six hours or 24h after UV irradiation, the antioxidant activities in NHEK and RHE were measured using catalase and SODs assay kits (707002, 706002) Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Briefly, cells were harvested in the corresponding lysis buffer and centrifuged at 10,000 rpm for 15 min and 5 min at 1,500 rpm, for catalase and SODs assay respectively. The supernatant was kept on ice and used for the enzymatic activity assay.

The assays were performed according to the manufacturer's instructions. To measure catalase activity, methanol is converted to formaldehyde in the presence of H_2O_2 . Then the reaction of formaldehyde with 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1, 2,4 triazole (Purpald) generated a coloured compound which absorbs at 520 nm. The catalase unit was described as the quantity of enzymes that degraded 1 nmol of H_2O_2 to O_2 and H_2O per min. About SOD activity, the reaction is based on a xanthine oxidase system, which produces $\text{O}_2^{\cdot-}$ in the environment and then oxidizes tetrazolium into colored compounds (formazan). In this case, SOD competes with tetrazolium and leads to a decrease in coloration, proportional to the level of SOD activity. The absorbance was measured at 450 nm, and the SODs unit is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of $\text{O}_2^{\cdot-}$. The results are expressed as units of enzyme/mg proteins.

1.9. Cell immunostaining

Cells were seeded on glass coverslips, maintained in culture in normoxia or physioxia and then irradiated with UV. They were washed with TBS and then fixed for 7 min with 4% paraformaldehyde solution on ice. Plasma membranes were permeabilized for 10 min with TBS-Triton X-100 1%, and non-specific binding sites were saturated for 1 hour at 4° C with TBS containing 1% bovine serum albumin, 3% goat serum, and 0.3% Triton X-100. Cells were then incubated overnight at 4° C with primary antibodies. After washing with TBS, cells were incubated for 1 hour with secondary antibodies. Before mounting, nuclei were stained with (50µg/ml) bis-benzimide (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature. Finally, coverslips were mounted using Fluoromount-G mounting medium (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA). The following antibodies were used: catalase (12980, Cell Signaling), SOD1 (ab183881, Abcam), SOD2 (ab13533, Abcam), and Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (A-11036, Invitrogen, ThermoFisher Scientific).

1.10. RHE immunostainings

RHE were fixed with 4% paraformaldehyde solution for 24 h and kept in 30% sucrose for 48 h at 4° C. RHE on membranes were separated from the insert and embedded in OCT embedding matrix (Leica, Wetzlar, Germany). Immediately, specimens were snap-frozen in isopentane on dry ice then kept at -20°C. RHE were cut into 7 µm thick slices with a cryomicrotome (Leica). Before staining, cryosections were exposed to citrate buffer (0.01 M, pH6) at 90°C for 45 min, permeabilized with TBS-1%Triton X-100, and saturated with TBS

containing 1% bovine serum albumin, 3% goat serum, and 0.3% Triton X-100, for 1 h. The immunohistochemical staining was performed using primary antibodies specific for Ki-67 (550609, BD pharmingen, le Pont de Claix, France), catalase (12980, Cell Signaling), SOD2 (ab13533, Abcam) which were incubated overnight at 4 °C. Cryosections were subsequently incubated with the corresponding secondary antibodies (AlexaFluor 568 goat anti-rabbit IgG, A-21069, or AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG, A-21121) for 1 h at room temperature. Before mounting, nuclei were stained with a solution of 50 µg/ml bis-benzimide (Sigma-Aldrich) for 10 min at room temperature. Finally, cryosections were mounted using Fluoromount solution.

1.11. Immunostaining: photos and quantification

Immunostaining images were taken using a confocal microscope LSM980 AS2 (Zeiss, Iena, Germany), and ZEN software (Zeiss). Quantification of fluorescence intensity was determined using ImageJ software and normalized to the analysed surface. For Ki67 labelling, the percentage of positive cells was calculated by the number of Ki67 positive cells divided by the total number of nuclei (Dapi positive cells) in the basal layer.

1.12. Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times as mentioned in the figure legends. The data were treated with Prism GraphPad 9 software (GraphPad, Inc, La Jolla, CA, USA). The figures were generated, and the results are presented as mean ± SEM of at least three biological replicates. For the statistical analyses, an unpaired Mann-Whitney test was used to compare two independent groups and a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc correction was performed for multiple comparison. The differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ respectively.

2. Results and discussion

UV rays are the primary factors of photoaging, partly by inducing an overproduction of ROS. The concomitant deficiency in key antioxidants (catalase, SODs, and GPXs) [14] leads to an oxidative stress, inducing a more vulnerable skin and likely cancer risks. Stimulating the expression as well as the activity of these antioxidants are thus potential strategies for anti-

aging treatments. However, all the studies of antioxidant response to UV irradiation done in *in vitro* assays were performed under atmospheric oxygenation which is higher to physiological levels. So, the aim of this work was to study the role of physioxia in the antioxidant defences of keratinocyte in response to UV irradiation. We compared 2D and 3D models established both in physioxia and in normoxia conditions: primary keratinocyte in monolayer culture, representing the proliferating keratinocytes in the basal layer, and reconstructed epidermis, mimicking keratinocyte differentiation in the upper layers.

2.1.Optimization and characterization of models with UV irradiation

In order to reproduce photoaging processes, acute exposure to both UVA and UVB rays were used to simulate the solar spectrum that penetrates the skin epidermis. Most of the studies use only UVB rays since they have a major effect on the skin epidermis. However other findings suggest that UVA also regulate several epidermal genes. Some of them are involved in the antioxidant response such as catalase and GPX, and others in the acceleration of the epidermal differentiation with up-regulation of involucrin, and down-regulation of keratin K10 and K2 [15].

To select a suitable UV irradiation condition, NHEK cells, previously cultured for four days under physioxia or normoxia condition, were simultaneously exposed to 3 J/UVA and a range of UVB doses in both oxygenation conditions. Cell viability was evaluated 24 hours later and compared to the untreated control. Our results show a decrease in keratinocyte viability after UVB exposure, which is statistically significant at 40 mJ/UVB and reaches up to 50% of the control of 80 mJ/UVB (Fig. 1A). In fact, keratinocyte apoptosis was shown to be triggered at this UVB dose, with an excessive production of ROS by NADPH oxidase activity [16]. For the lowest irradiations (<60 mJ/cm² UVB) both oxygen conditions lead to the same cytotoxic effect. When increasing UVB energy, the toxic effect was generally a bit lower in physioxia. Thus, the 20 mJ/UVB dose was shown to be the higher UVB energy inducing no significant toxicity to the cells and was therefore selected for the present study.

In order to follow the antioxidant regulation, we then investigated whether this UV treatment is able to trigger an oxidative stress in NHEK culture. The generation of ROS was measured in keratinocyte irradiated at 20 mJ/UVB and at 40 mJ/UVB, in addition to 3 J/cm² UVA. The results show a strong production of ROS, six fold higher than in the control, induced immediately after UV irradiation in a similar manner under physioxia and normoxia conditions

(Fig. 1B). The higher UVB dose of 40 mJ/cm² did not produce a stronger ROS production and NAC, a ROS scavenger, partially inhibited this stress, clearly showing the involvement of ROS. This is in accordance with the work of Rezvani *et al.* demonstrating the generation of a strong ROS pulse in the cytoplasm immediately after irradiation [17]. However, the similar production of ROS in physioxia and in normoxia observed here upon UV irradiation is different from our previous results reporting the higher resistance of NHEK grown in physioxia against ROS production generated after exposure to H₂O₂ (Chettouh-Hammas et al, submitted paper). This can be related to the nature of generated ROS. In fact, it was shown in endothelial cells that UV irradiation generates ROS mainly in the cytoplasm, while H₂O₂ leads to a change in the respiratory chain that induces the production of superoxide in the mitochondria [18]. The higher production and activity of SOD2 in physioxia, that we have shown previously, may prevent accumulation of superoxide in mitochondria whereas it should not be active in the cytoplasm (Chettouh-Hammas et al, submitted paper).

To be closer to the cutaneous tissue we compared NHEK with reconstructed human epidermis. In RHE, the UV dose of 3J/UVA and 50mJ/UVB was chosen, based on the literature, permitting a modulation of gene expression but without tissue damage [19]. RHE keratinocyte proliferation (Ki-67 labeling) was monitored at 6 h and 24 h respectively after irradiation. Whereas cells in proliferation are increased at 6h and 24h in normoxia, a decrease was observed in physioxia at 24h after irradiation (Fig. 1C). It is known that UV irradiation stimulate epidermal keratinocyte proliferation through activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR), responsible for keratinocyte hyperplasia [20]. A hyperproliferation was also reported after acute UVB irradiation of human skin transplants from mice, inducing a strong proliferation of both basal and suprabasal keratinocytes at 48 hours post-irradiation. The WNT-mediated pathway appeared to be important in this process [21]. Our results are in accordance with these data in normoxia condition but not for physioxia. As the thickness of RHE is lower in physioxia than in normoxia, we can hypothesize that proliferating keratinocytes in the basal layer are less protected from UV radiation which can damage the cells. In fact, we demonstrate that an irradiation of NHEK in monolayer with 3J/UVA and 40mJ/UVB decreases cell viability of about 25% (fig. 1A).

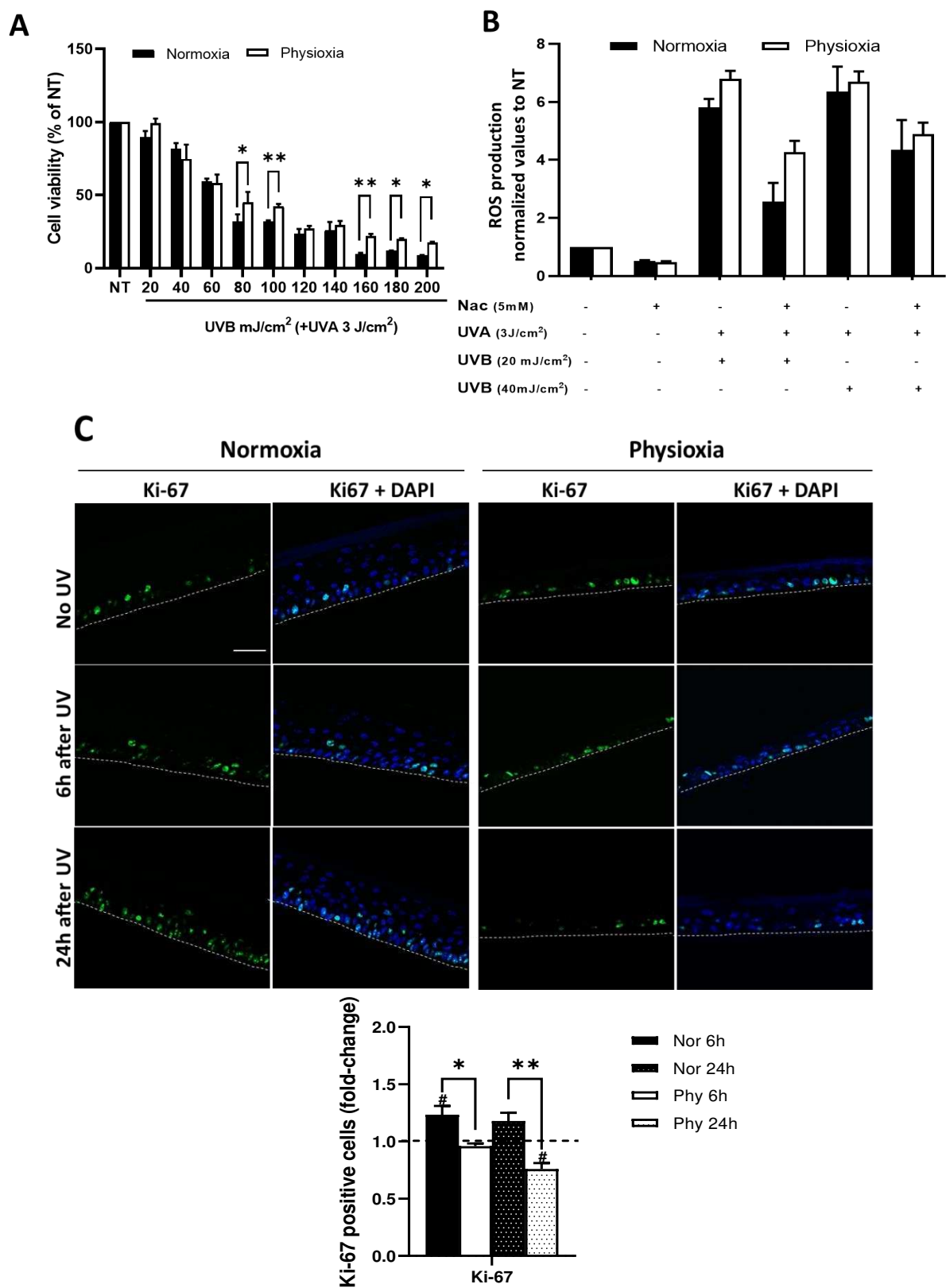


Fig. 1: Cell cytotoxicity and ROS production upon of UV radiation on keratinocytes and proliferating cells in RHE under normoxia and physioxia conditions. **A.** NHEK were cultured during four days at the respective oxygen conditions and were treated with UVA at 3 J/cm² and with UVB (20-200 mJ/cm²). Viability was measured after 24 hours using Alamar Blue. **B.** NHEK were cultured during four days at respective oxygen conditions and subsequently treated with UVA at 3 J/cm² and with UVB 20 or 40 mJ/cm²). Representative results of intracellular ROS production. Results are presented as normalized values to NT. NAC was used as ROS scavenger. **C.** Reconstructed RHE in each culture conditions were irradiated with UVA at 3 J/cm² and with UVB 50 mJ/cm², and labeling with Ki-67. Results are presented as photos of immunostainings and by the ratio between proliferating cells, Ki-67-positive cells, and total cell number, DAPI-positive cells, normalized to the non-irradiated control. Data are represented by mean +/- SEM of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using two-way anova test (N=3). #*p*<0.05, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001, ####*p*<0.0001 versus non-irradiated condition; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.0001 between indicated conditions.

2.2.Effect of oxygen level on H₂O₂ scavenger enzymes

The first enzymes that neutralize H₂O₂ in cells are GPXs and catalase. All these enzymes are expressed in human skin and are deregulated in skin photoaging [22] [23]. However, their behavior after UV irradiation in physiological oxygen conditions has never been studied.

2.2.1. Physioxia and gene expression

GPX1 and GPX4 are particularly expressed in the basal layer of the epidermis, act at low doses of H₂O₂ and their activities are restricted by the quantity of the selenium cofactor in their catalytic site [24].

First, we investigated the expression of genes using RTqPCR, 6h and 24h after UV irradiation either in physioxia or in normoxia. Our results (Fig. 2) show a significant increase in GPX1 expression, but not in GPX4, 24h after UV irradiation in normoxia both in NHEK (+89%) and in RHE (+ 53%). In physioxia, the results are different, according to the model. GPX1 expression increases rapidly, from 6h after irradiation in RHE and reaches a 2-fold increase after 24h, whereas in NHEK there is no change. Such an induction of GPX1 mRNA upon UV irradiation was also demonstrated *in vivo* in human skin [25]. GPX4 expression increases significantly after 24h in RHE, a bit later than GPX1, but not in NHEK where a significant decrease is observed between 6h and 24 post-UV-irradiation.

In RHE the GPX1 and GPX4 expressions are always significantly higher in physioxia than in normoxia showing a faster stimulation of GPXs antioxidant enzymes following UV irradiation in physiological oxygen conditions. Besides the effect on GPX1, the main difference is the induction of GPX4 expression only in physioxia. GPX4 is mainly located in mitochondria and these results suggest a better antioxidant defence inside mitochondria.

The difference in response in physioxia between NHEK and RHE suggests the involvement of the keratinocyte differentiation state. We previously demonstrated that GPXs, at a basal level, are much less expressed in RHE than in NHEK.

Catalase acts in synergy with GPX for an efficient H_2O_2 neutralisation in the cell. Unlike GPXs, which are located in mitochondria, catalase is present only in cytoplasm and peroxisome [26] [27]. This enzyme is sensitive to elevated levels of H_2O_2 following UV irradiation and is the most efficient, able to neutralise millions of molecules of H_2O_2 per second [28]. In the epidermis, catalase protein is localised mainly in the superficial layers (granular layer) and plays a key role in the barrier properties of the skin [22], and therefore, in protecting the skin from photodamages.

Our work (Fig. 2) shows that UV irradiation induced a significant increase at 24h in catalase expression in NHEK, with always a higher level in physioxia compared to normoxia (+ 50% at 6h, + 17% at 24h). On the contrary, the changes in catalase expression are less visible on RHE, with a small decrease at 6h and a return to normal at 24h for both conditions in a similar manner. A similar profile was observed in normoxia with differentiated and undifferentiated mouse keratinocytes following 25 mJ/cm^2 UVB irradiation [29]. This supports the idea that the regulation of catalase in single-layer cells is not the same as that of the epidermal model.

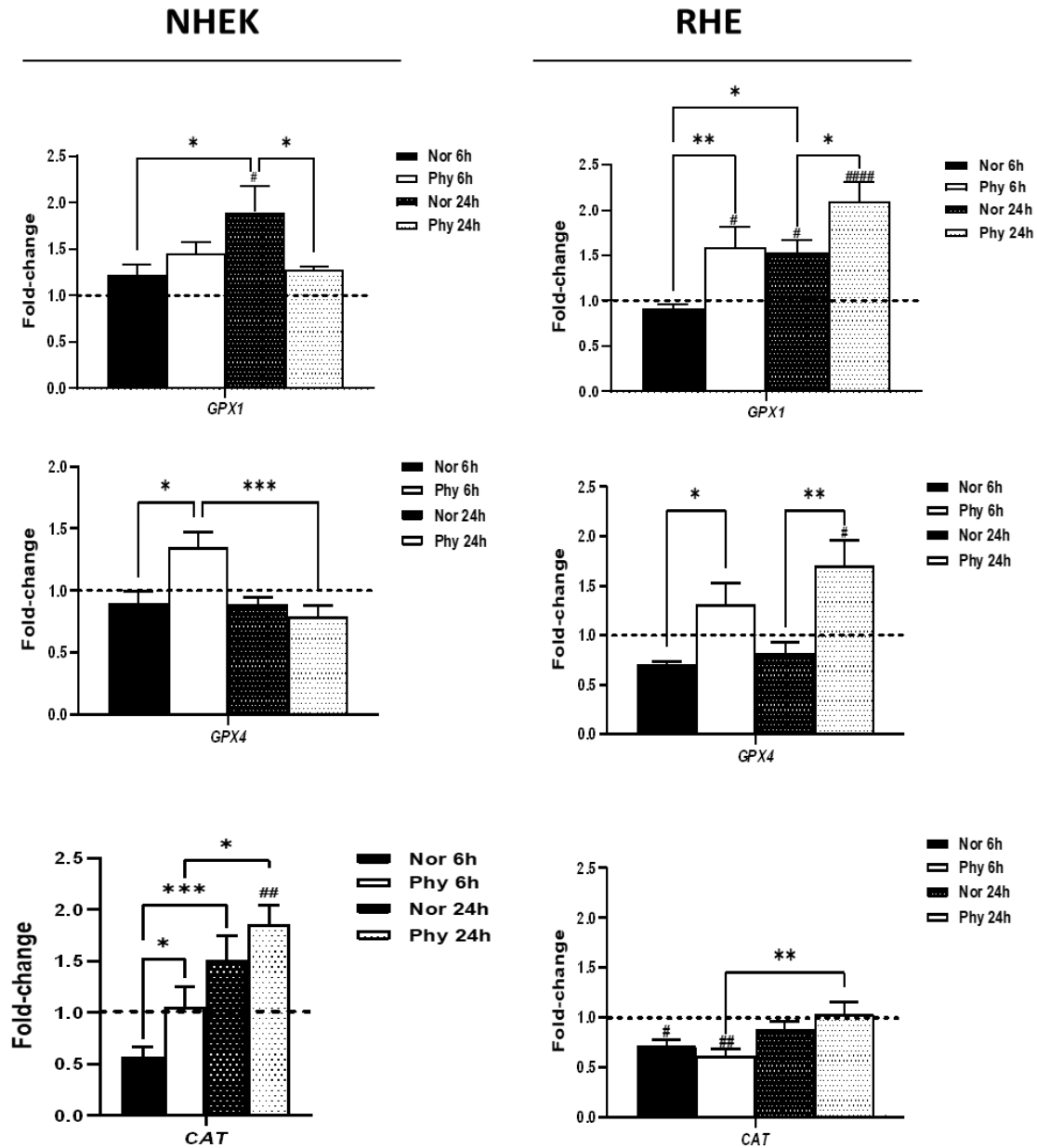


Fig. 2: GPXs and Catalase gene expression post UV irradiation on keratinocytes and RHE under normoxia and physioxia conditions. NHEK were cultured for four days at the respective oxygen conditions and were treated with UVA 3 J/cm² and with UVB 20 mJ/cm². Reconstructed RHE in each condition were irradiated with UVA 3 J/cm² and with UVB 50 mJ/cm², the culture was stopped after 6 and 24 hours. mRNA expression of GPX1, GPX4 and CAT were evaluated and normalized to the three housekeeping genes (GAPDH, B2M, GUSB). Results are presented by the fold change versus the non-irradiated condition. Data are represented with mean $\pm$ SEM of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using two-way anova test (N=3). # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001, #### p <0.0001 versus non-irradiated condition; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.0001 between indicated conditions.

2.2.2. Physioxia and amount/activity of catalase

We continued this work by investigating protein amount and activity, only for catalase. The protein amount was assessed by western blotting and immunostaining in keratinocytes, and by immunostaining for the reconstructed epidermis. Catalase activity was then evaluated in both models in both oxygen conditions.

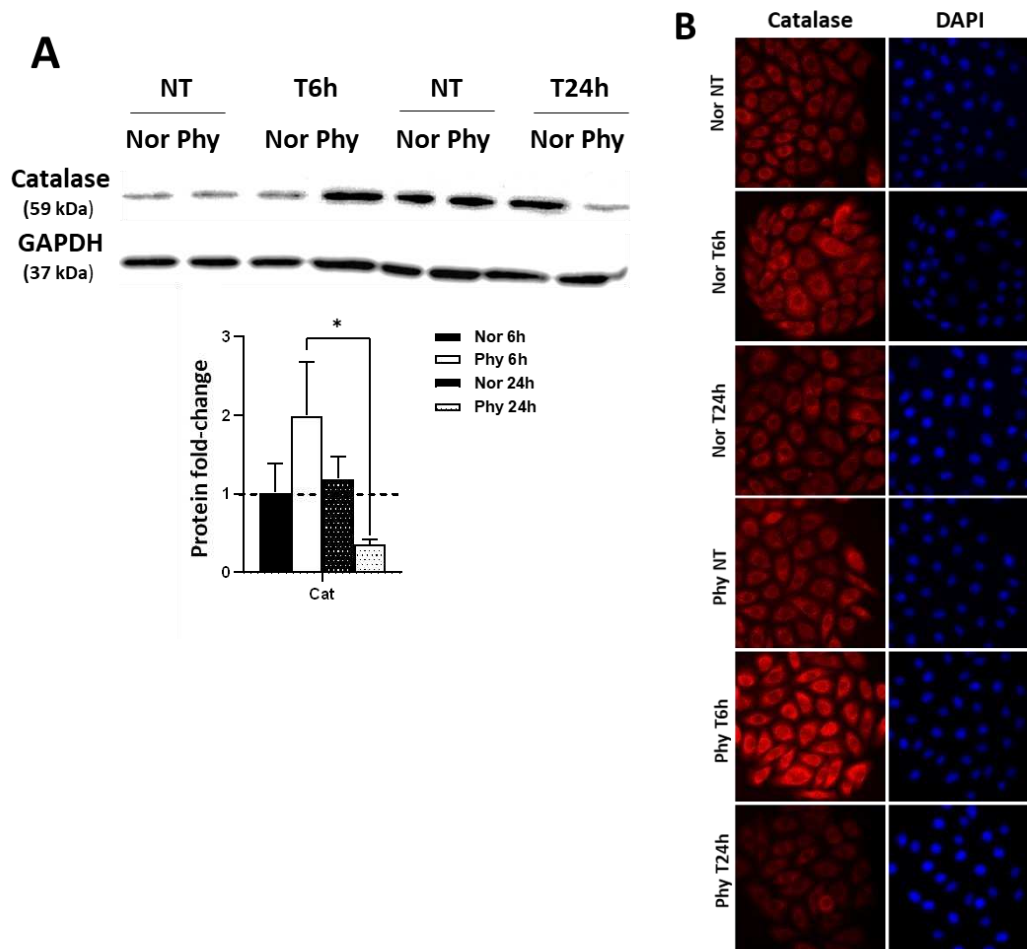
In physioxia, catalase amount from Western-blot analysis seems to increase at 6h, but without significance, and then strongly and significantly decreases (- 130%) at 24h in NHEK, whereas there is no change in normoxia whatever the time (Fig 3A). The images of immunostaining clearly confirm the increase of catalase amount in the cytoplasm of NHEK at 6h in physioxia and its subsequent decrease at 24h (Fig 3B). In parallel, catalase activity tends to rise with the time, in normoxia and a bit more in physioxia, but this doesn't reach significant variation (Fig 3D).

Comparatively in RHE only a small decrease in catalase amount (- 28%) is observed from immunostainings at 6h after irradiation in physioxia and this amount is not significantly different from the normoxia condition (Fig 3C). But surprisingly, in this model, catalase activity exhibits a high augmentation at 6h (+34%) and 24h (+ 32%) after irradiation in physioxia when compared to normoxia condition, suggesting that the activity is not directly dependent on the protein amount but likely due to the activation of the enzyme in physioxia (Fig 3D). Such an increase in catalase performance, independently of the amount of its protein, was already reported in RHE exposed to high doses of UVB irradiation (180-220 mJ/cm²) [30].

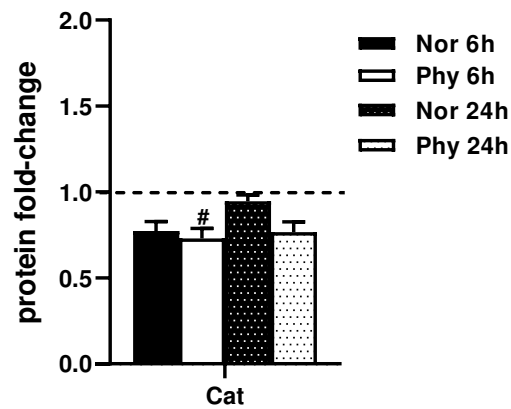
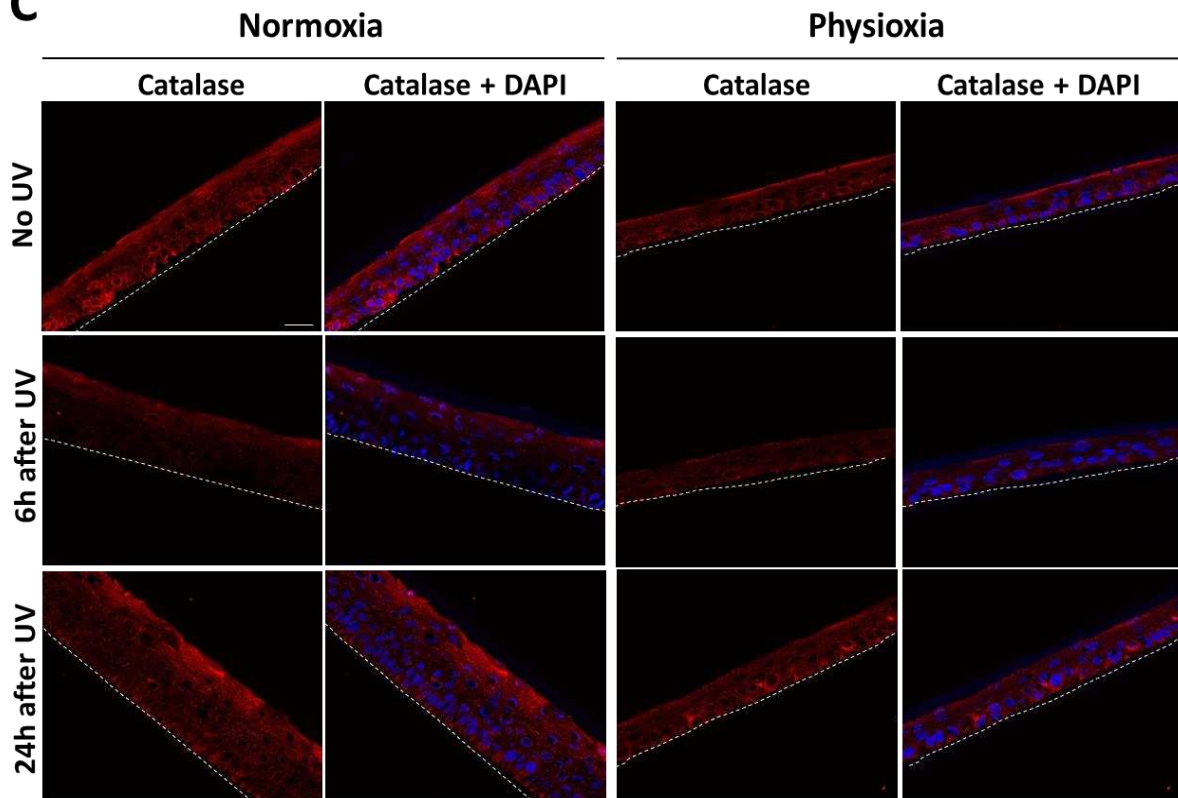
Whereas minor variations were observed in catalase regulation upon UV in normoxia in both models (only an increase in catalase expression in NHEK at 24h), our work clearly shows a different regulation of catalase in physioxia which is proper for each model. NHEK show a quick induction and then a strong reduction of the catalase amount, but without a fine increase in activity at 24h. Maybe the activity will increase and become significant for longer times. For RHE, whereas only minor effects were detected on catalase expression and quantity (a low increase of catalase mRNA), physioxia induces the activation of catalase compared to normoxia.

Several hypothesis can be put forward to explain this activation. The effect of UV on catalase activity depends on the pH and oxygen [31]. In fact, UV changes the H₂O₂ binding site in this enzyme, which leading to ROS generation [31]. Consequently, the protective action of

catalase becomes a pro-oxidant. We hypothesize that physioxia combined with UV irradiation stimulates the protective role of catalase in skin RHE models. The differences in catalase activation between NHEK and RHE may also be linked to its localization. As observed in RHE immunostaining, catalase is found mainly in the upper layers, so in differentiated cells, contrary to the monolayer where the cells are proliferating. The state of differentiation may bring a different regulation of catalase activity.



C



D

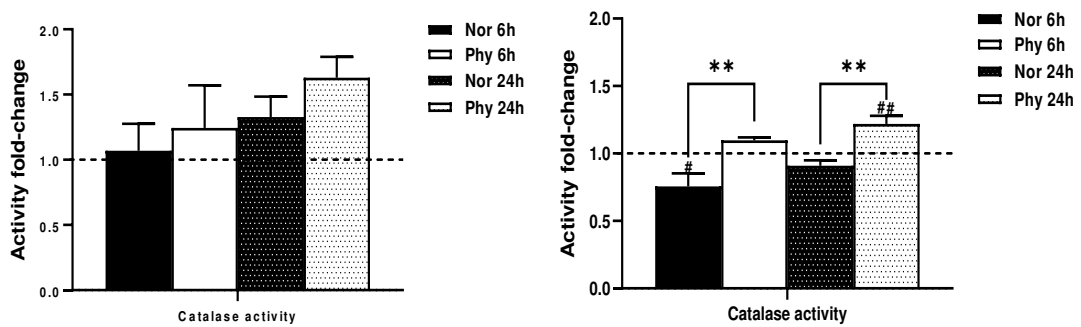


Fig 3: Catalase amount and activity post UV irradiation on NHEK and RHE under normoxia and physioxia conditions. NHEK were cultured for four days at the respective oxygen conditions and were treated with UVA 3 J/cm² and UVB 20 mJ/cm². Reconstructed RHE in each condition were irradiated with UVA 3 J/cm² and UVB 50 mJ/cm². A, representative western blot and image analysis of catalase normalized to GAPDH in NHEK; B, Immunostaining of catalase and nuclei (DAPI) on NHEK; C, Immunostaining of catalase and nuclei (DAPI) in RHE model; D, Measurement of catalase activity in NHEK and RHE models. Results are presented by protein or activity fold change versus the non-irradiated condition. Data are represented by mean +/- SEM of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using a two-way anova test. Nor normoxia; Phy, physioxia. #*p*<0.05, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001, ####*p*<0.0001 versus non-irradiated condition; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.0001 between indicated conditions.

2.3. Effect of oxygen level on superoxide scavenger enzymes

The other types of enzymes important for cell defence against ROS are the superoxide dismutases, responsible for the dismutation of superoxide in hydrogen peroxide. SOD1 and SOD2 which are the most present in keratinocytes and epidermis were studied at various levels after UV irradiation in both oxygen conditions.

2.3.1. Physioxia and gene expression

First, we investigated transcriptional expression of cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutases, SOD1 and SOD2, respectively.

For both models, SOD1 seems to be the less regulated by UV irradiation, with the induction of SOD1 gene expression in RHE only in physioxia 24h after UV irradiation (+ 56%), but without any change in NHEK culture (Fig 4). For SOD2, a different kinetic of response was observed between RHE and NHEK only in physioxia as in normoxia there was no effect. A strong overexpression of SOD2 (+ 220%) was shown at 6h after UV irradiation in RHE with a subsequent decrease to a level close to the control at 24h. Whereas, in NHEK, the stimulation of SOD2 expression is slower with no change at 6h and a maximal expression at 24h (+ 100%).

SODs enzymes are the first line of defence against superoxide anion which is the precursor of other ROS. The fact that SODs are localized throughout the cell, SOD1 in the cytoplasm and SOD2 in the mitochondria, offers a maximal protection against oxidant stress. They play a key role in redox homoeostasis, as shown by the SOD2 deficiency in mice which

results in the induction of markers of aging, such as senescence of keratinocytes and malformation of the epidermis [32]. Our results show a strong modulation of SOD2 transcripts rapidly following UV in physioxia. The same effect was reported in a model of full thickness reconstructed skin in normoxia, at 6 hours post-irradiation [33]. We can wonder if the central part of the model is really in normoxia knowing that oxygen diffuses only on a distance of about 80-100 micrometers [34].

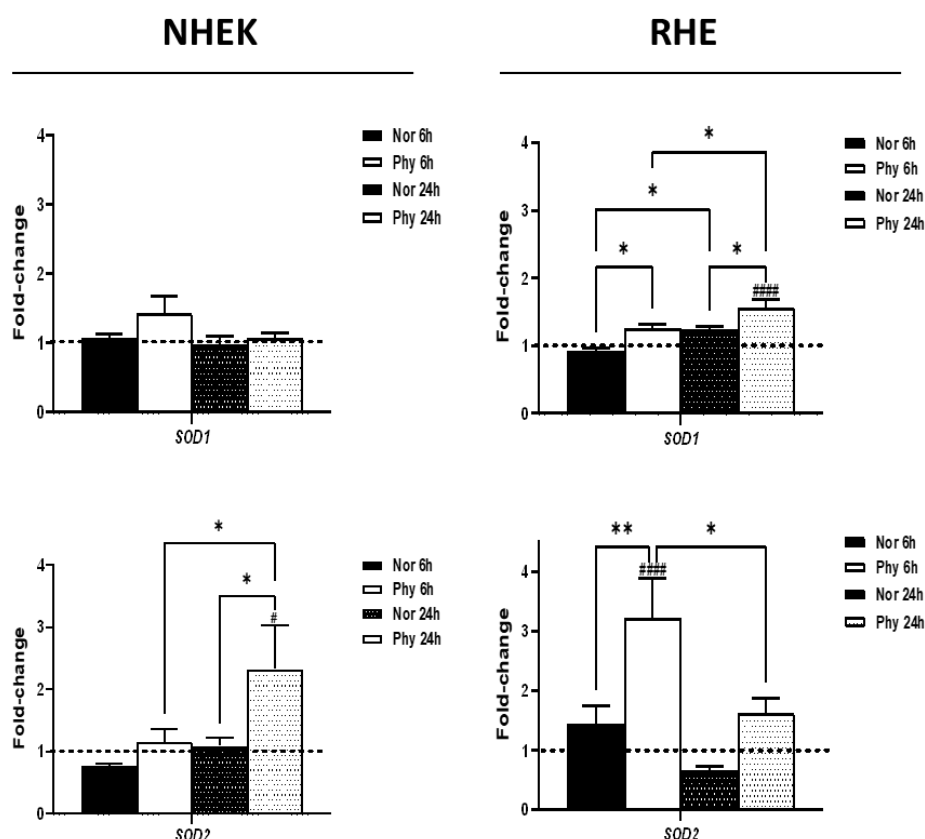


Fig 4: SOD1 and SOD2 gene expression post UV radiation on keratinocytes and RHE under normoxia and physioxia conditions. NHEK were cultured for four days at the respective oxygen conditions and were treated with UVA 3 J/cm² and UVB 20 mJ/cm². Reconstructed RHE in each condition were radiated with UVA 3 J/cm² and UVB 50 mJ/cm². The culture was stopped after 6 and 24 hours. mRNA expression of SOD1 et SOD2 were evaluated and normalized to three housekeeping genes (GAPDH, B2M, GUSB), results are presented by the fold change versus the non-irradiated condition. Data are represented with mean +/- SEM of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using two-way anova test (N=3). #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001 versus non-irradiated condition; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001 between indicated conditions.

2.3.2. Physioxia and amount/activity of superoxide dismutase

The SOD1 and SOD2 amounts were assessed by Western blotting and immunostaining in keratinocytes, and by immunostaining for reconstructed epidermis. Superoxide activity was then measured in both models under different oxygen conditions.

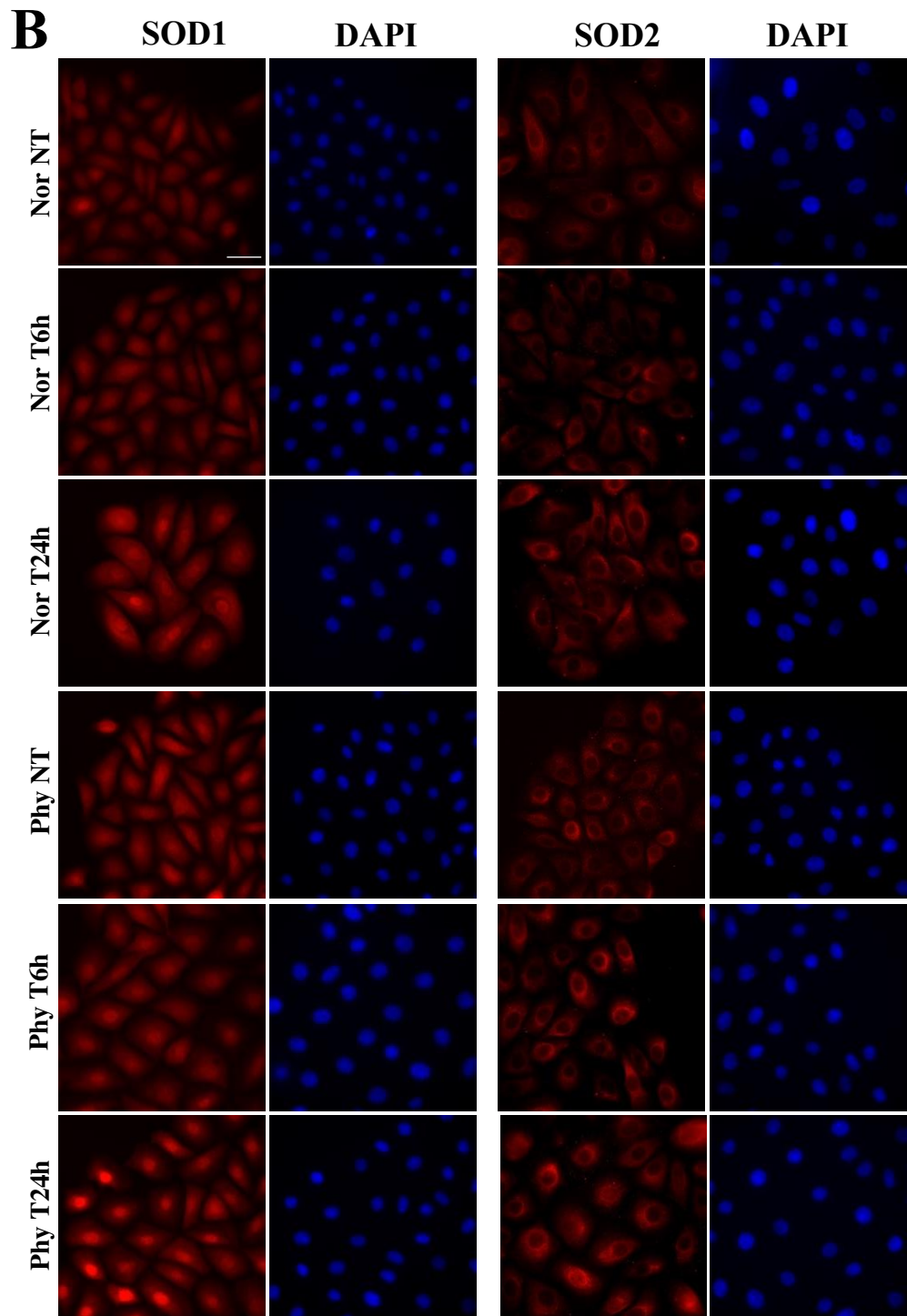
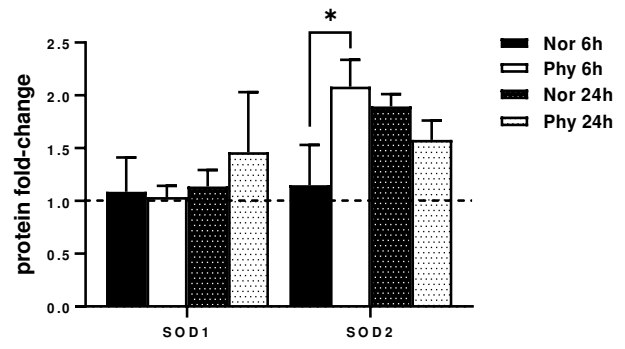
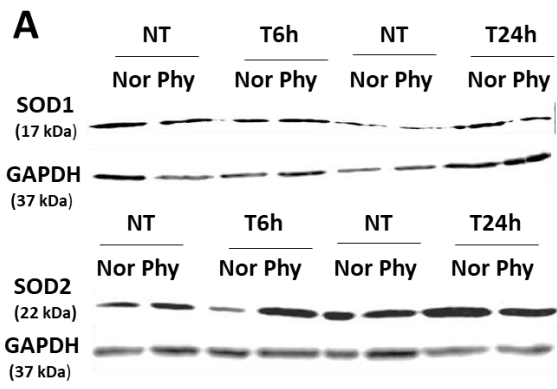
The quantification of SOD1 amount in NHEK, using Western blotting, shows no significant difference between physioxia and normoxia whatever the time after UV irradiation (Fig 5A). These results are well correlated with the absence of effect at the RNA level. However, immunostaining images reveal an important distinction in SOD1 localization (Fig 5B). In fact, 24h after UV irradiation in physioxia, SOD1 is clearly localized inside the nucleus, when compared to the cytoplasm. This effect is observed mainly in physioxia condition even if a similar but lower tendency is also present in normoxia at 24h compared to 6h. Recently, SOD1 was shown to act as a transcription factor in yeast [35] but also in skin cells [36] in the presence of ROS, and particularly of intracellular H₂O₂. It is involved in the regulation of oxidative resistance and repair genes. Its binding to DNA was reported to be dependent on and regulated by its conformation, the presence/absence of metal but also the redox environment. In fact, as the H₂O₂ concentration increases, SOD1 enzymatic activity decreases and its binding to DNA is higher [37]. We show here that upon UV irradiation, SOD1 accumulates in the nuclei of keratinocytes, likely upon H₂O₂ production induced by UV, preferentially in physioxia condition. In fact, we observed no differential effect in ROS production between physioxia and normoxia, but we measured the total ROS production and not H₂O₂ alone. Furthermore, we evaluated the ROS production just after the UV irradiation and not on a duration. All these results suggest that SOD1 may be able to induce the transcription of repair genes with a higher efficacy in physioxia condition.

The quantification of the mitochondrial enzyme SOD2 revealed on the contrary important difference according to the culture conditions. Western blotting shows a significant higher amount of SOD2 after 6 hours in physioxia, compared to normoxia, whereas a non-significant increase of SOD2 in normoxia is observed at 24h (Fig 5A). Results from immunostaining are consistent with these data even if the increase in physioxia is less marked at 6h (Fig 5B). Moreover, this SOD2 amount increase is confirmed in RHE, especially after 6h in physioxia, where the SOD2 labelling is significantly enhanced in all layers (Fig 5C). In normoxia a modest enrichment is visible mainly at 24h only in the basal layer.

The higher production of SOD2 in physioxia upon UV irradiation is closely correlated to the strong increase of SODs activity both in NHEK and in RHE. A significant and stable

augmentation is observed at 6h (+56%) and 24h (+53%) in physioxia versus a punctual increase (+73%) only at 6h in normoxia. Considering that SOD1 amount is unchanged in physioxia versus normoxia and that its activity may be downregulated following its translocation in the nucleus [37], we can suppose that the increase in SODs activity comes mainly from the observed augmentation in SOD2 amount.

The increase in SOD2 activity is well documented *in vivo* in photoaged skin both in human [38] and in mice, either after acute [39] [40] or chronic [41] UV exposure. As its increase was shown from 24h to 5 days post-irradiation, the constant high SOD activity observed following UV irradiation in physioxia mimics *in vivo* skin in contrast to normoxia where SOD activity decreases rapidly after 6h. Comparison of our results with studies using *in vitro* models is more difficult because the results differ, likely due to different protocols. In addition, there is no comparison between UV regulation at the mRNA level with protein and activity.



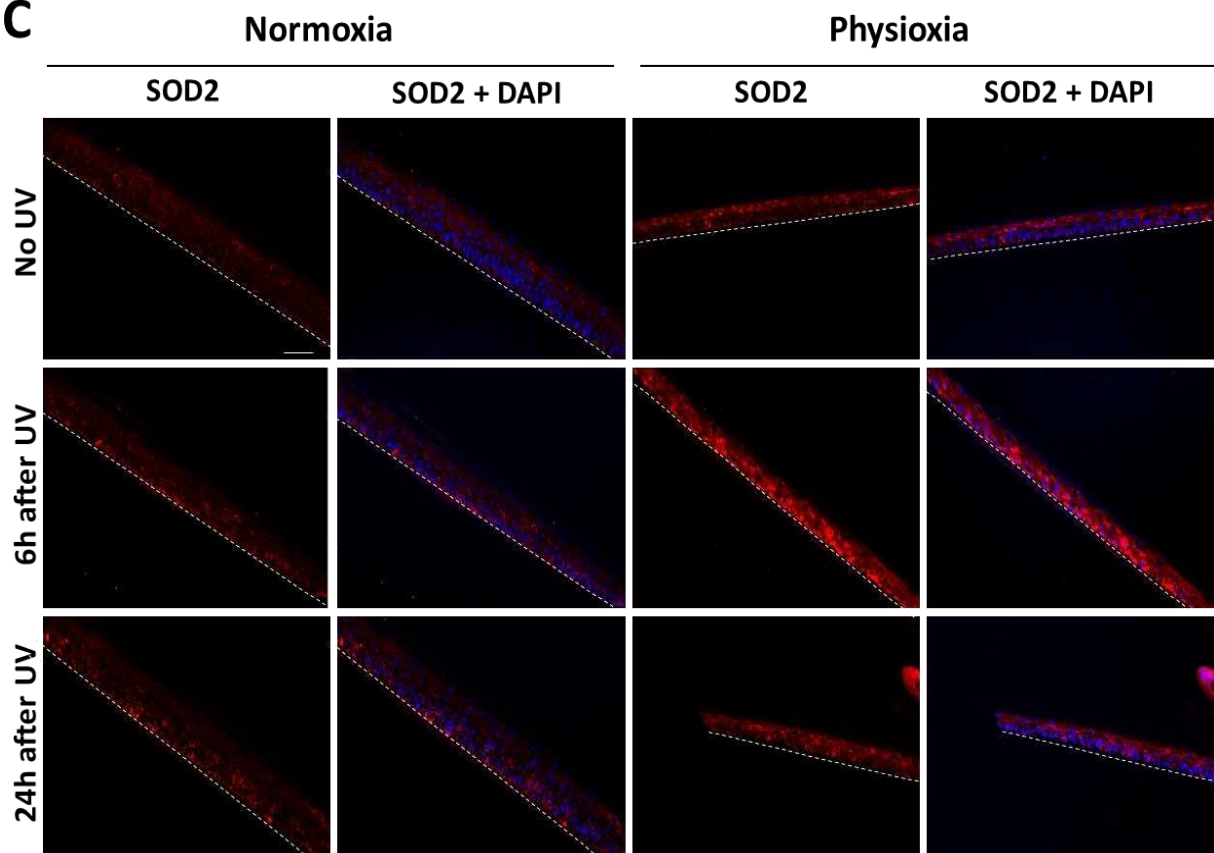
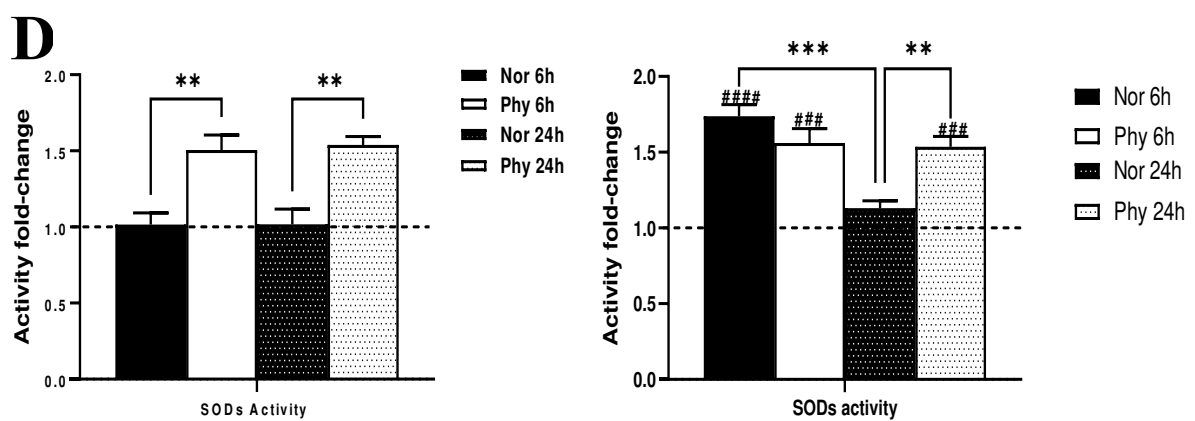
C**D**

Figure 5: SODs amount and activity post UV irradiation on NHEK and RHE under normoxia and physioxia conditions. NHEK were cultured for four days at the respective oxygen conditions and were treated with UVA 3 J/cm² and UVB 20 mJ/cm². Reconstructed RHE in each condition were irradiated with UVA 3 J/cm² and UVB 50 mJ/cm². A, representative western blot and image analysis for SOD1 and SOD2 normalized to GAPDH in NHEK; B, Immunostaining of SOD1, SOD2 and nuclei (DAPI) on NHEK; C, Immunostaining of SOD1, SOD2 and nuclei (DAPI) in RHE models; D, Measurement of SODs activity in NHEK and RHE models. Results are presented by protein or activity fold change versus the non-irradiated condition. Data are represented by means +/- SEM of 3 independent experiments. Statistical analysis was performed using two-way anova test. #*p*<0.05, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001, ####*p*<0.0001 versus non-irradiated condition; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.0001 between indicated conditions.

3. Conclusion

We demonstrated here the distinct regulation and activity of antioxidants in physioxia in keratinocyte models that mimic skin photoaging. Compared to the classical culture conditions in normoxia, the physiological level of oxygen allows the suractivation of catalase and the overproduction of SOD2 upon UV irradiation in both keratinocyte monolayers and in reconstructed epidermis. Furthermore, it induces the translocation of SOD1 into the nucleus likely triggering its activity as transcription factor for oxidative stress adaptation genes. The role of oxygen level in regulating the antioxidant system in skin photoaging is still largely unexplored and further studies are needed to understand the mechanisms involved in such regulation.

4. References

1. Lucas, R., et al., The consequences for human health of stratospheric ozone depletion in association with other environmental factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2015. **14**(1): p. 53-87.
2. Schuch, A.P., et al., Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017. **107**: p. 110-124.
3. Krutmann, J. and P. Schroeder, Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2009. **14**(1): p. 44-9.

4. Wölfe, U., et al., Reactive molecule species and antioxidative mechanisms in normal skin and skin aging. *Skin Pharmacol Physiol*, 2014. **27**(6): p. 316-32.
5. Carreau, A., et al., Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*, 2011. **15**(6): p. 1239-53.
6. Grillon, C., et al., News on microenvironmental physioxia to revisit skin cell targeting approaches. *Exp Dermatol*, 2012. **21**(10): p. 723-8.
7. Kato, H., et al., Hypoxia Induces an Undifferentiated Phenotype of Oral Keratinocytes in vitro. *Cells Tissues Organs*, 2014. **199**(5-6): p. 393-404.
8. Shih, C.-P., et al., Comparison of changes in mitochondrial bioenergetics between keratinocytes in human external auditory canal skin and cholesteatomas from normoxia to hypoxia. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 125.
9. Koh, R., et al., Oxygen-Mediated Control of the Keratinocyte Proliferation-Differentiation Axis. *J Invest Dermatol*, 2020. **140**(1): p. 235-238.e3.
10. Kato, H., et al., Metabolomic Alteration of Oral Keratinocytes and Fibroblasts in Hypoxia. *Journal of Clinical Medicine*, 2021. **10**(6): p. 1156.
11. Ross, C., et al., Oxygen tension changes the rate of migration of human skin keratinocytes in an age-related manner. *Exp Dermatol*, 2011. **20**(1): p. 58-63.
12. Chen, C., et al., Physioxia: a more effective approach for culturing human adipose-derived stem cells for cell transplantation. *Stem Cell Research & Therapy*, 2018. **9**(1): p. 148.
13. Kanayama, K., et al., Hair Regeneration Potential of Human Dermal Sheath Cells Cultured Under Physiological Oxygen. *Tissue Eng Part A*, 2020. **26**(21-22): p. 1147-1157.
14. Ighodaro, O.M. and O.A. Akinloye, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 2018. **54**(4): p. 287-293.
15. Marionnet, C., et al., A broad-spectrum sunscreen prevents UVA radiation-induced gene expression in reconstructed skin in vitro and in human skin in vivo. *Experimental Dermatology*, 2011. **20**(6): p. 477-482.
16. Ryu, H.-C., et al., UVB Radiation Induces Apoptosis in Keratinocytes by Activating a Pathway Linked to "BLT2-Reactive Oxygen Species". *Journal of Investigative Dermatology*, 2010. **130**(4): p. 1095-1106.
17. Rezvani, H.R., et al., Hypoxia-inducible Factor-1, a Key Factor in the Keratinocyte Response to UVB Exposure *. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(22): p. 16413-16422.

18. Park, W.H., The effects of exogenous H₂O₂ on cell death, reactive oxygen species and glutathione levels in calf pulmonary artery and human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med*, 2013. **31**(2): p. 471-476.
19. Marionnet, C., C. Tricaud, and F. Bernerd, Exposure to non-extreme solar UV daylight: spectral characterization, effects on skin and photoprotection. *Int J Mol Sci*, 2014. **16**(1): p. 68-90.
20. El-Abaseri, T.B., S. Putta, and L.A. Hansen, Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. *Carcinogenesis*, 2005. **27**(2): p. 225-231.
21. Michalczyk, T., et al., UVB exposure of a humanized skin model reveals unexpected dynamic of keratinocyte proliferation and Wnt inhibitor balancing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2018. **12**(2): p. 505-515.
22. Shindo, Y., et al., Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol*, 1994. **102**(1): p. 122-4.
23. de Jager, T.L., A.E. Cockrell, and S.S. Du Plessis, Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. *Adv Exp Med Biol*, 2017. **996**: p. 15-23.
24. Lubos, E., J. Loscalzo, and D.E. Handy, Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 2011. **15**(7): p. 1957-1997.
25. Smith, G., et al., Quantitative Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Analysis of Drug Metabolizing and Cytoprotective Genes in Psoriasis and Regulation by Ultraviolet Radiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 2003. **121**(2): p. 390-398.
26. Otera, H. and Y. Fujiki, Pex5p imports folded tetrameric catalase by interaction with Pex13p. *Traffic*, 2012. **13**(10): p. 1364-77.
27. Fujiki, Y. and M.C. Bassik, A New Paradigm in Catalase Research. *Trends in Cell Biology*, 2021. **31**(3): p. 148-151.
28. Young, I.S. and J.V. Woodside, Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 2001. **54**(3): p. 176-86.
29. Black, A.T., et al., Distinct effects of ultraviolet B light on antioxidant expression in undifferentiated and differentiated mouse keratinocytes. *Carcinogenesis*, 2007. **29**(1): p. 219-225.
30. Rezvani, H.R., et al., Catalase overexpression reduces UVB-induced apoptosis in a human xeroderma pigmentosum reconstructed epidermis. *Cancer Gene Therapy*, 2008. **15**(4): p. 241-251.

31. Heck, D.E., et al., UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. *J Biol Chem*, 2003. **278**(25): p. 22432-6.
32. Velarde, M., et al., Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging*, 2012. **4**: p. 3-12.
33. Bernerd, F., C. Marionnet, and C. Duval, Solar ultraviolet radiation induces biological alterations in human skin in vitro: Relevance of a well-balanced UVA/UVB protection. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, 2012. **78 Suppl 1**: p. S15-23.
34. Franko, A.J. and R.M. Sutherland, Oxygen diffusion distance and development of necrosis in multicell spheroids. *Radiat Res*, 1979. **79**(3): p. 439-53.
35. Tsang, C.K., et al., Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 3446.
36. Altobelli, G.G., S. Van Noorden, and V. Cimini, Copper/Zinc-Superoxide Dismutase in Human Epidermis: An Immunochemical Study. *Frontiers in Medicine*, 2019. **6**.
37. Li, X., et al., The Specific Inhibition of SOD1 Selectively Promotes Apoptosis of Cancer Cells via Regulation of the ROS Signaling Network. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. **2019**: p. 9706792.
38. Punnonen, K., et al., Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis in vivo. *J Photochem Photobiol B*, 1995. **30**(1): p. 43-8.
39. Jin, G.-H., et al., UVB induced oxidative stress in human keratinocytes and protective effect of antioxidant agents. *Radiation and environmental biophysics*, 2007. **46**: p. 61-8.
40. Ahn, J., et al., Laminarin Attenuates Ultraviolet-Induced Skin Damage by Reducing Superoxide Anion Levels and Increasing Endogenous Antioxidants in the Dorsal Skin of Mice. *Marine Drugs*, 2020. **18**: p. 345.
41. Okada, K., et al., Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin. *Journal of Dermatological Science*, 1994. **8**(3): p. 183-186.

Discussion & Perspectives

Discussion et perspectives

L'oxygène est une molécule fondamentale dans le métabolisme de toutes les cellules de l'organisme. Toutefois, c'est la source principale de ROS. La pression partielle en oxygène représente un aspect très important de la physiologie humaine, bien qu'elle soit encore nettement négligée. En effet, le microenvironnement des tissus *in vivo* est beaucoup plus pauvre en oxygène que les conditions dans lesquelles sont cultivées les cellules *in vitro*, dans l'air ambiant. La pratique de la culture cellulaire en normoxie pose donc la question des conséquences de cette suroxygénation sur les diverses fonctionnalités des cellules, et, par conséquent, sur la validité des résultats obtenus dans ces conditions.

Les données tirées de la littérature citée dans la section Introduction du présent manuscrit commencent à montrer l'importance de la physioxie. Par exemple, elle intervient dans le maintien du potentiel migratoire des adipocytes (Chen, Tang et al. 2018), dans la synthèse de la matrice extracellulaire des chondrocytes (Dennis, Whitney et al. 2020) (Anderson, Markway et al. 2018) et dans la maturation des lymphocytes T (Shin, Huang et al. 2020). À l'heure actuelle, on dispose de peu d'informations sur l'effet de l'oxygène sur les cellules de la peau. Étant donné que l'oxygène est la source de ROS, il est vraiment important d'étudier le mécanisme du stress oxydant et l'expression des antioxydants cutanés, particulièrement dans le cas du photovieillissement.

Mon travail de thèse avait donc pour objectif d'apporter des explications à ces questions :

1. Quel rôle le taux d'oxygène joue-t-il dans l'expression et l'activité des défenses antioxydantes de la peau ?
2. Quel est l'impact du taux d'oxygène dans la réponse au stress oxydant lors du photovieillissement de la peau ?

Comme première étape, nous avons établi plusieurs modèles *in vitro* : des cultures en monocouche de lignée et des cellules primaires de kératinocytes, ainsi que des épidermes reconstruits en physioxie. En parallèle, ces modèles ont également été élaborés dans la condition de normoxie, pour comparaison. Pour chacun des modèles, les défenses antioxydantes ont été étudiées par l'expression des principales enzymes antioxydantes et par leur activité dans les deux conditions d'oxygénation. Nous avons ensuite reproduit le photo-

vieillissement de la peau en physioxie en utilisant les irradiations UV et étudié les enzymes antioxydantes.

Les principaux résultats obtenus sont discutés ici en comparaison avec la littérature et des perspectives ont été proposées pour poursuivre et approfondir ce travail.

1. Les modèles 2D *versus* les modèles 3D

1.1. Le développement et caractérisation des modèles en physioxie

1.1.1. Le modèle HaCat *versus* le modèle NHEK

Dans la présente étude, nous avons utilisé une lignée HaCat, qui provient de l'immortalisation spontanée des kératinocytes humains (Boukamp, Petrussevska et al. 1988). Ces kératinocytes sont isolés d'une région proche d'une lésion cancéreuse d'une personne âgée. Les HaCat sont largement utilisées dans de nombreuses investigations cutanées, surtout dans l'inflammation, la différenciation et le stress oxydant, etc. Le modèle HaCat est une lignée facile à cultiver et qui se multiplie constamment. Cependant, elles ne correspondent pas exactement aux kératinocytes de la peau normale parce qu'elles présentent plusieurs aberrations chromosomiques, telles que la mutation du gène P53 (Lehman, Modali et al. 1993) et celle de NF- κ B (Lewis, Hengeltraub et al. 2006). En parallèle, nous avons utilisé des kératinocytes primaires (NHEK), il s'agit des cellules les plus comparables aux kératinocytes dans l'épiderme. En revanche, leurs cultures sont limitées dans le temps et elles sont en outre sujettes à des variations interindividuelles suivant les différents donneurs.

Dans notre étude, les caractéristiques morphologiques des kératinocytes, à savoir les HaCat et les NHEK, ne sont pas affectées par la teneur en oxygène des milieux. Cela est cohérent avec une étude récente sur HaCat cultivées avec 2% d'oxygène pendant 7 jours (Lee, Kim et al. 2021). Par comparaison, les fibroblastes de la papille dermique s'adaptent à la physioxie et, eux, changent de morphologie. Dans ces conditions, ils sont plutôt polygonaux que fusiformes et d'une taille plus réduite (Abreu and Reis 2021).

Nous montrons que, dans les deux modèles, le taux d'oxygène semble avoir un impact sur la prolifération. En effet, les kératinocytes prolifèrent plus rapidement en état d'oxygénation physiologique. Ces résultats ont déjà été soulignés dans plusieurs d'études qui sont regroupées

dans le tableau 5. Cette augmentation de la prolifération des kératinocytes a été démontrée dans des conditions de 2 à 5% d'oxygène et au bout de 4 à 6 jours de culture (Kato, Izumi et al. 2014) (Shih, Lee et al. 2018) (Koh, Szeverényi et al. 2020). Cependant, deux études ont rapporté au contraire une diminution de la prolifération des kératinocytes à 3 et 4% d'O₂ pour des temps de culture plus courts (2 à 3 jours) (Ross, Alston et al. 2011) (Mieremet, Vázquez García et al. 2019). Cette différence peut être due aux conditions de culture ainsi qu'à l'origine et à la nature des kératinocytes. Par ailleurs, d'autres cellules cutanées montrent aussi une augmentation de la prolifération en physioxie par rapport à la normoxie, notamment des mélanocytes (Weidmann, Pomerleau et al. 2017) et les cellules de la papille dermique à 2% d'O₂ (Upton, Hannen et al. 2015).

D'autre part, il a été montré l'importance du respect de la physioxie de chaque type cellulaire pour aider à maintenir leur potentiel prolifératif tout en les empêchant de se différencier. Ceci est le cas des cellules progénitrices endothéliales et des adipocytes qui conservent leur capacité d'angiogenèse et de migration et présentent moins de cellules sénescents (Chen, Tang et al.

Type cellulaire	% d'oxygène de culture	Durée de culture	Effet sur la prolifération	Age	Références
Kératinocyte	4%	2 jours	=	Jeunes /Agés	(Ross, Alston et al. 2011)
	3%	3 jours	--	Adultes	(Mieremet, Vázquez García et al. 2019)
	5%	4 jours	++	Adultes	(Shih, Lee et al. 2018)
	2%	6 jours	++	Adultes	(Kato, Izumi et al. 2014)
	5%	8 jours	++	Adultes	(Koh, Szeverényi et al. 2020)
Fibroblaste	5%	3 jours	--	Adultes	(Damiani, Brugè et al. 2018)
	6%	5 jours	++	Adultes	(Kanayama, Takada et al. 2020)
	4%	7 jours	++	Néonataux /Adultes	(Balin and Pratt 2002)
	2%	>10 jours	++	Adultes	(Upton, Hannen et al. 2015)
Mélanocyte	5%	3 jours	++	Néonataux	(Abreu and Reis 2021)
	1-5%	6 jours	++	Néonataux	(Horikoshi, Balin et al. 1990)
	3%	> 10 jours	++	Adultes	(Weidmann, Pomerleau et al. 2017)

Tableau 5 : L'effet de l'oxygène sur la prolifération des cellules de la peau *in vitro* (kératinocytes, fibroblastes et mélanocytes).

Les données sont rangées en fonction du temps de culture en physioxie (effet sur la prolifération : --négatif, = constant, ++ positif).

2018, Lin, Liu et al. 2019), et des chondrocytes conservant leur chondrogénicité(Anderson, Markway et al. 2018). Ceci est physiologiquement cohérent pour les kératinocytes de la couche

basale épidermique qui doivent préserver leur caractère souche ainsi que leur potentiel prolifératif.

1.1.2. Les modèles des RHE

Afin d'aborder un modèle plus représentatif de la peau que les modèles 2D, nous avons mis en place des épidermes reconstruits (RHE), qui représentent les kératinocytes dans leur véritable microenvironnement et leur configuration spatiale. En effet, dans la peau, ces cellules prolifèrent dans la couche basale, ce qui est représenté dans une culture en monocouche. Tandis que, dans les couches supérieures, elles se différencient progressivement jusqu'aux cornéocytes dans la couche cornée. Les RHE reproduisent ainsi toutes les caractéristiques morphologiques et structurales de l'épiderme.

Nous avons donc généré des RHE dans les deux conditions d'oxygénation, en normoxie 18.6% et en physioxie à 3 %. Ces derniers ne sont pas les plus simples à mettre en œuvre en raison de la différence de prolifération des kératinocytes et de leur différenciation. Le rajout des fibroblastes à la culture facilite néanmoins la formation de la couche basale et le début de la différenciation, surtout en physioxie.

Les RHE obtenus en physioxie avaient des caractéristiques proches de ceux de la normoxie. Les deux montrent à la fois une stratification cellulaire correcte par la présence de marqueurs de différenciation (loricrine et involucrine), et une différenciation complète avec la formation de la couche cornée. Toutefois, nous avons obtenu des RHE plus fins en physioxie, ce qui peut être corrélé avec l'augmentation de cellules positives au Ki67. En d'autres termes, les kératinocytes de la couche basale restent en prolifération, ce qui est en accord avec les résultats sur les modèles 2D, plutôt que d'entrer dans le processus de différenciation, produisant ainsi un épiderme plus fin.

Il existe très peu d'études qui ont abordé le rôle de l'oxygène dans les modèles cutanés 3D et aucune n'était publiée au début de mon travail de thèse. Par exemple, l'équipe de Koh a obtenu également des RHE plus fins. Cependant, la différenciation n'était pas complète parce qu'il n'y avait pas de formation de la couche cornée. (Koh, Szeverényi et al. 2020). Cette différence par rapport à nos modèles peut être due à la présence de fibroblastes que nous avons rajoutés sous la membrane, des cellules qui favorisent la formation de la barrière épidermique (Varkey, Ding et al. 2013). Nos résultats sont en accord avec la seconde étude sur un modèle de peau entière préparée à 3% O₂ où un épiderme plus fin a été obtenu ainsi qu'une différenciation terminale

avec l'expression de la loricrine, de l'involucrine et de la filaggrine (Mieremet, Vázquez García et al. 2019).

Les résultats de cette première partie suggèrent que, d'un point de vue physiologique, l'exposition de kératinocytes, qui sont naturellement en physioxie dans la peau, à un fort taux d'oxygène, au cours d'une culture classique, réduit leur potentiel prolifératif à la fois dans les modèles 2D et 3D. De plus, en modèle RHE, ceci accélère la différenciation des kératinocytes, conduisant ainsi à un épiderme plus épais.

Afin de vérifier si les kératinocytes gardent leur potentiel de prolifération en physioxie ou s'engagent dans un processus de sénescence, il serait intéressant de suivre la sénescence de ces cellules, en mesurant par exemple l'activité de la bêta-galactosidase. Ceci pourrait être important pour maintenir ces cultures primaires plus longtemps, mais aussi pour la reconstruction des RHE. Pour compléter la caractérisation de nos modèles, nous pourrions aussi effectuer des marquages de kératines ainsi que de la filaggrine, des protéines importantes dans la différenciation épidermique.

1.2. Est-ce que les kératinocytes dans les différents modèles *in vitro* de la peau expriment les enzymes antioxydantes de la même manière ?

Les modèles *in vitro* utilisés dans cette étude représentent les kératinocytes épidermiques avec des aspects structurels, prolifératifs, morphologiques et aussi biochimiques différents. Avant d'étudier la physioxie, nous nous sommes déjà demandé s'il y avait des différences d'expression du système antioxydant entre ces modèles. Nous avons donc caractérisé pour la première fois l'expression des principales enzymes antioxydantes (SOD1, SOD2, CAT, GPX1 et GPX4), lors du passage des kératinocytes d'un état de monocouche en prolifération à l'état de différenciation dans les RHE et les avons comparés avec des explants de peau.

Nos résultats montrent des profils très différents. Les cellules en monocouche expriment globalement moins de gènes des enzymes antioxydantes, et notamment pas les mêmes, que les RHE ou les explants de peau.

La lignée HaCat exprime davantage la catalase et la SOD1 que les cellules primaires. Cela peut être dû à l'adaptation des HaCat à la normoxie car elles sont cultivées depuis longtemps dans

ces conditions. Il s'agit d'une différence supplémentaire entre les HaCat et les NHEK, dont il faut tenir compte lors du choix du modèle pour des études de l'activité antioxydante.

Les NHEK en monocouche expriment plus les enzymes de la famille GPXs, tandis que dans les RHE, les cellules expriment beaucoup plus la catalase et les SODs. De plus, le profil antioxydant des RHE est exactement le même que celui des explants de peau, confirmant l'intérêt de ce modèle. Nos résultats suggèrent donc que les profils de gènes antioxydants sont modulés pendant la différenciation épidermique, entre NHEK et RHE.

Dans la littérature, seulement quelques études sur des modèles animaux abordent ces différences, particulièrement sur l'expression de la catalase. Dans des kératinocytes de rats nouveau-nés, la catalase est exprimée seulement à partir du stratum granulosum (Muramatsu, Suga et al. 2005). L'augmentation de l'activité de la catalase dans la peau de souris est aussi révélée dans les cellules qui arrêtent de proliférer et dans des kératinocytes différenciés (Reiners, Hale et al. 1988, Reiners, Thai et al. 1990). Notre travail vient compléter ces données en démontrant que, dans les modèles différenciés comparativement aux modèles monocouches, l'expression des SODs est plus élevée et celle des GPXs est plus faible.

L'ensemble des résultats montre l'importance du choix du modèle. En effet, les modèles HaCaT et NHEK ne représentent pas correctement les enzymes antioxydantes de la peau. Cela souligne l'importance de l'utilisation des RHE pour les recherches sur les antioxydants de la peau

Faire une comparaison de la quantité de protéines par immunomarquages et aussi de l'activité de ces enzymes permettrait de confirmer ces différences liées à la différenciation des kératinocytes. En outre, il serait intéressant d'approfondir l'étude des voies de régulation qui entrent en jeu dans la différenciation des kératinocytes et qui pourraient expliquer ces changements dans les niveaux d'expression des gènes antioxydants.

2. Quel est l'effet du taux d'oxygène sur la production de ROS ?

Dans ma thèse nous nous sommes intéressés au stress oxydant, qui est un mécanisme lié à l'oxygène, étant donné qu'il constitue la principale source de ROS. Donc, nous nous sommes demandé quel était l'impact de la physioxie sur ce mécanisme. Nous avons évalué le taux de ROS basal des kératinocytes en normoxie et en physioxie mais aussi sous l'effet d'un stress oxydant. Nos conclusions montrent que les kératinocytes HaCat et NHEK gardent un niveau de

ROS basal stable malgré le fort écart d'oxygène entre les deux conditions. Dans la littérature, la production de ROS dans les cellules à un niveau d'oxygène physiologique est encore mal comprise et les résultats sont différents d'une étude à l'autre (Tableau 6). Une diminution du taux basal ROS a été rapportée dans des kératinocytes primaires (Kato, Izumi et al. 2014), dans des fibroblastes dermiques (Sgarbi, Gorini et al. 2017) et dans les cellules de la papille dermique (Upton, Hannen et al. 2015) (Abreu and Reis 2021). Cependant, une augmentation de la production basale de ROS a été citée dans les adipocytes (Chen, Tang et al. 2018) et également dans les fibroblastes dermiques (Damiani, Brugè et al. 2018). Ces variations peuvent être expliquées par les différents types cellulaires utilisés, les conditions des cultures et de l'expérimentation, comme le choix des sondes ROS.

Type cellulaire	Taux d'oxygène	Durée de culture	Sonde de détection	Effet sur le taux de ROS	Références
Kératinocyte	1,5%	1 jour	CM-H ₂ DCFDA	Positif	(Nys, Maes et al. 2012)
	2%	3 jours	ROS-ID	Négatif	(Kato, Izumi et al. 2014)
Fibroblaste	1-10%	3 jours	CM-H ₂ DCFDA	Négatif	(Sgarbi, Gorini et al. 2017)
	5%	3 jours	OxiSelect	Négatif	(Abreu and Reis 2021)
	5%	3 jours	MitoSOX	Positif	(Damiani, Brugè et al. 2018)
	2%	>10 jours	H ₂ DCFDA	Négatif	(Upton, Hannen et al. 2015)
Mélanocyte	1,5%	1 jour	CM-H ₂ DCFDA	Constant	(Nys, Maes et al. 2012)
Adipocyte	2%	>10 jours	H ₂ DCFDA	Positif	(Chen, Tang et al. 2018)

Tableau 6 : L'effet de l'oxygène sur la production des ROS dans les cellules de la peau *in vitro* (kératinocytes, fibroblastes et mélanocytes, adipocytes).

Lors de la stimulation avec de fortes quantités de H₂O₂, les HaCaT et les NHEK reproduisent une augmentation significative de la production de ROS, mais uniquement en normoxie. De manière intéressante, en condition de physioxie, les effets de H₂O₂ sont presque totalement inhibés à différentes concentrations de H₂O₂. Ce résultat montre que les cellules en physioxie sont moins sensibles au stress H₂O₂, même à des concentrations élevées, et peut suggérer qu'elles possèdent un meilleur système antioxydant.

La sonde des ROS qui a été utilisée dans cette étude est une sonde polyvalente, qui peut être oxydée par plusieurs types de ROS. Il serait par conséquent intéressant d'utiliser d'autres sondes telles que la DHR 123, qui est plus spécifique des ROS mitochondriaux. Ceci permettrait

de distinguer l'activité mitochondriale entre les deux conditions d'oxygénations et de compléter d'autres points que nous discuterons par la suite à propos des enzymes antioxydantes.

Il serait aussi intéressant de faire une cinétique de la production de ROS en physioxie. En effet, suivre l'adaptation des cellules dans cette condition pourrait également expliquer certains résultats de la littérature.

3. Quel est le rôle du taux d'oxygène sur le système antioxydant ?

Les défenses des kératinocytes en physioxie étant plus efficaces, nous nous sommes alors posé la question de l'état des enzymes antioxydantes dans cette condition. L'étape suivante a consisté à vérifier si l'absence de production de ROS sous stress en physioxie est liée à l'efficacité des enzymes antioxydantes. D'une manière globale, deux principaux résultats ressortent de cette étude :

1. Une régulation négative ou une absence de régulation des transcrits des gènes antioxydants en physioxie,
2. Une activité enzymatique plus importante de la catalase et des SODs en physioxie.

Ces deux conclusions ont été confirmées dans nos différents modèles de kératinocytes. Deux hypothèses ont été avancées permettant d'expliquer cette contradiction entre l'expression transcriptionnelle et l'activité de ces enzymes. La première est que la forte activité de ces enzymes est due à une expression protéique accrue, indépendamment de sa quantité d'ARN. La deuxième est qu'elle est due à une activation de l'enzyme indépendamment de sa quantité de protéine.

3.1. La régulation entre la transcription et la traduction

Concernant la catalase, sa faible expression transcriptionnelle en physioxie n'est pas corrélée avec une diminution de la quantité de protéines qui reste constante pour NHEK et RHE et augmente pour les HaCaT. Dans le cas de la SOD2, son expression n'est pas modulée en physioxie alors que sa quantité augmente dans les NHEK et dans les RHE. En se basant sur la littérature, ces résultats suggèrent une régulation possible à 2 niveaux : soit une régulation au niveau de la traduction, soit une différence dans la stabilité des protéines

3.1.1. La régulation au niveau de la traduction

La traduction d'un ARNm en protéine se déroule en trois étapes qui sont finement contrôlées par des facteurs de traduction : l'initiation par les facteurs d'initiation (eIF), l'élongation par les facteurs d'élongation (eEF) et la terminaison par les facteurs de libération (eRF). Dans la littérature, plusieurs études ont montré que ces facteurs sont sujets à une régulation par l'oxygène, en particulier dans des conditions hypoxiques. En effet, l'hypoxie induit l'activation d'un facteur de traduction eIF4E2 à la place de eIF4E activée normalement en normoxie. La présence de ce facteur dans le complexe d'initiation de la traduction permet une sélection des ARNm de protéines possédant des séquences spécifiques de réponse à l'hypoxie. Par conséquent, ce complexe permet de continuer à synthétiser les protéines nécessaires à la survie cellulaire dans des environnements à faible teneur en oxygène et à faible énergie (Uniacke, Holterman et al. 2012).

Une étude intéressante vient de montrer sur plusieurs types cellulaires ce qui se passe cette fois-ci en physioxie par comparaison à la normoxie et l'hypoxie. La traduction des protéines en physioxie, dans une gamme de 1 à 8% O₂, passe par ces deux complexes en même temps, ce qui implique une sélection différente d'ARNm (Timpano and Uniacke 2016). La SOD2 pourrait être traduite plus efficacement en physioxie, ce qui pourrait expliquer son augmentation en termes de protéine, sans affecter le taux d'ARNm comme nous l'avons montré. De même la catalase pourrait être produite en quantité équivalente en physioxie alors que son taux d'ARNm est diminué.

3.1.2. La différence dans la stabilité des protéines

La différence entre les quantités du transcrit et de la protéine pourrait aussi être due à un effet de cinétique entre la régulation de la transcription et la traduction de ces protéines. En effet les deux paramètres ont été étudiés au même temps après la mise en physioxie. On peut imaginer que la diminution de l'expression des gènes en physioxie se fait juste avant l'arrêt de la culture, en particulier dans le modèle en monocouche, et que les changements ne sont pas encore traduits en niveau de la protéine. Ceci pourrait être envisagé pour les NHEK mais plus difficilement pour les RHE qui sont depuis 15 jours en physioxie.

Cette variation peut aussi être due à un changement dans le temps de demi-vie des protéines antioxydantes qui pourrait être plus long en physioxie. Ceci aurait pour résultat l'accumulation au niveau protéine. Nous pouvons supposer que le taux d'oxygène soit capable de moduler la

machinerie de protéolyse de ces enzymes comme l'hypoxie est capable de moduler la machinerie de dégradation des ARNm (Carraway, Johnson et al. 2017).

3.2. La régulation entre la traduction et l'activité

La surproduction de la SOD2 est cohérente avec l'augmentation d'activité observée dans les différents modèles. En revanche, la forte activité de la catalase dans les NHEK et les RHE n'est pas due à une augmentation de son expression protéique. Comment expliquer cette suractivation ?

Dans la littérature, plusieurs mécanismes ont été mis en évidence et montrent des régulations postraductionnelles qui sont capables d'activer ou d'inhiber la catalase. Il a été rapporté qu'un changement dans la conformation de la catalase facilite l'accessibilité à son site catalytique et par conséquent conduit à la suractivation de l'enzyme. Cet effet peut être induit par plusieurs modifications post-traductionnelles au niveau de la structure de la catalase. C'est le cas notamment de la glycation sur certains résidus lysines (Mofidi Najjar, Taghavi et al. 2017). Inversement, une glycation sur d'autres lysines, une phosphorylation sur certaines serines, ou une acétylation conduisent à son inhibition (Glorieux, Zamocky et al. 2015). Par ailleurs, il a été démontré que l'activité basale de la p53 induit la transcription de la p53R qui se lie spécifiquement à la catalase induisant ainsi sa suractivation. Au contraire, dans le cas d'une forte activité de la p53, après un stress UV, il y a induction de la transcription de PIG3 qui inhibe cette suractivation (Kang, Kim et al. 2013) (Glorieux, Zamocky et al. 2015). Pour le moment aucun lien entre ces modifications post-traductionnelles et une variation dans le taux d'oxygène n'a encore été établi.

D'autre part, il est décrit chez les plantes que l'activité catalytique de la catalase peut être modifiée par la voie de signalisation médiée par la calmoduline, une protéine cytosolique qui intervient principalement dans la régulation du calcium (Yang and Poovaiah 2002). Ce mécanisme n'est pas encore décrit chez les mammifères, mais pourrait expliquer nos résultats. La calmoduline est présente dans la peau surtout dans les couches supérieures, à partir de la couche granuleuse en suivant le gradient du calcium (Méhul, Bernard et al. 2001). Une localisation plus importante ou une concentration plus forte en calmoduline dans les conditions de physioxie pourrait être liée à l'activation de la catalase dans les RHE.

Afin de déterminer l'expression des enzymes antioxydantes dans la phase d'adaptation en physioxie, il serait intéressant de réaliser une cinétique. Ceci permettrait de clarifier le lien

entre les expressions transcriptionnelle et protéique. En effet, la diminution de l'expression transcriptionnelle pourrait résulter d'un feedback négatif suite à la phase d'adaptation où le taux de protéines pourrait être augmenté transitoirement.

Une étude de l'activité des enzymes GPXs pourrait compléter cette partie.

4. Quel est l'effet du taux d'O₂ sur le photovieillissement ?

Nous avons montré qu'en physioxie, l'expression basale des antioxydants n'est pas similaire à celle en normoxie. Les rayons UV sont les principaux facteurs dans la progression du photovieillissement. Cette progression est accompagnée par la déficience en antioxydants qui accentue les effets des UV et rend la peau plus vulnérable au cancer. Stimuler l'expression et l'activité de ces antioxydants fait donc partie des cibles potentielles des traitements anti-âge. Pour étudier le système antioxydant dans le photovieillissement, nous avons reproduit ce processus par irradiation aux UV.

4.1. La mise au point des modèles d'irradiation UVs

Les NHEK et les RHE ont été exposés à des doses aiguës et simultanées d'UVA et d'UVB. De nombreuses études n'utilisent que des UVB, étant donné que c'est l'irradiation majeure qui affecte l'épiderme. Toutefois, les UVA régulent aussi un certain nombre de gènes, lequel sont impliqués dans la réponse antioxydante ou dans la différenciation de l'épiderme (Marionnet, Grether-Beck et al. 2011). De plus, les rayons UVA et UVB ne déclenchent pas les mêmes voies de signalisation dans les kératinocytes humaines (Syed, Afaq et al. 2012). Il est donc pertinent d'utiliser les deux rayonnements pour simuler correctement le spectre UV.

Dans l'épiderme reconstruit, la dose d'UV utilisée a été de 3J/UVA et 50mJ/UVB. Sachant qu'une dose érythémateuse minimale d'UVA comprend 50 J/cm² et d'UVB de 30 mJ/cm² pour une peau de phototype II et III, ce qui est équivalent à 2 heures et demie d'exposition au soleil tropical australien (Tewari, Grys et al. 2014). La dose appliquée sur nos modèles reste faible en comparant à ceux qui sont décrits dans la littérature. Cette dose permet une modulation de l'expression des gènes, mais pas de dommage tissulaire (Marionnet, Tricaud et al. 2014). En revanche, elle est élevée par rapport à celle utilisée sur les NHEK, en raison de la présence de multiples couches de cellules qui sont normalement plus résistantes.

Nous avons suivi la prolifération des kératinocytes dans les RHE après 6h et 24h d'irradiation en physioxie et en normoxie. Les UV induisent la prolifération des kératinocytes de la couche

basale et également suprabasale en normoxie ce qui est cohérent avec des résultats obtenus chez la souris (El-Abaseri, Putta et al. 2005). De même, une induction de la prolifération des kératinocytes basaux et supra basaux a été obtenue sur de la peau humaine irradiée à une dose de 250 mJ/cm² UVB (Michalczyk, Biedermann et al. 2018). En revanche, en physioxie, une diminution de la prolifération a été constatée 24h après irradiation. Ceci peut être dû à la sensibilité de ce tissu. L'épiderme étant plus fin, les kératinocytes en prolifération dans la couche basale sont moins protégés. Nous avons montré que cette dose d'UV (40-60 mJ/cm²) diminue la viabilité d'environ 25% dans les NHEK en monocouche.

Dans cette partie, la lignée HaCat n'a pas été utilisée, car elle possède plusieurs aberrations moléculaires, particulièrement dans la voie de signalisation NF-κB, une voie majeure dans la réponse au stress (Chaturvedi, Qin et al. 2001). Il en résulte que les HaCat peuvent avoir une régulation de l'expression génétique différente de ce qui se passe dans la peau en réponse aux UV.

4.2. La production des ROS après irradiation UV

Nous avons précédemment montré que les NHEK cultivés en physioxie ont une résistance élevée contre les ROS produits après un stress avec H₂O₂, et ceci est dû à l'augmentation de l'activité des antioxydants. Curieusement, après irradiation UV, cette résistance est absente. Ceci pourrait être dû au stress différent causé par ces derniers par comparaison avec H₂O₂. En effet, les UV sont capables de générer des ROS principalement dans le cytoplasme (Aitken, Henderson et al. 2007), tandis que H₂O₂ est à l'origine de la production de superoxyde dans les mitochondries (Park 2013). Il est possible que, en physioxie, l'activité mitochondriale des enzymes antioxydantes soit plus efficace que dans le cytoplasme, ce qui peut expliquer l'absence de cette résistance. Nous avons notamment montré une activité basale importante de la SOD2 en physioxie comparativement à la normoxie (Article 1).

Pour approfondir cet aspect, il pourrait être intéressant de distinguer les ROS mitochondriaux avec l'utilisation de sondes spécifiques.

4.3. L'effet du taux d'oxygène et de l'irradiation UV sur l'expression des enzymes antioxydantes

Nous nous sommes demandé si les cellules en physioxie, suite à une irradiation UV, modulent leurs enzymes antioxydantes de la même manière qu'en normoxie. Pour cela, nous avons suivi

les mêmes enzymes antioxydantes que dans la première partie, les piègeurs du H_2O_2 , la GPX1, la GPX4 et la catalase, ainsi que les piègeurs du $\text{O}_2^{\cdot-}$ la SOD1 et la SOD2.

4.3.1 L'impact de la teneur en oxygène sur la modulation, par les UV, des enzymes piégeant H_2O_2

En condition de physioxie l'irradiation UV induit clairement une expression plus importante de GPX1 et GPX4 dans les RHE comparativement à la normoxie, quel que soit le temps après UV. Cet effet n'est pas retrouvé dans les NHEK, sauf pour GPX4 après 6h. Ceci montre encore un effet lié à l'état de différenciation des kératinocytes.

Afin de mieux comprendre la régulation de ces enzymes, il serait intéressant de compléter ce travail par la mesure des quantités de protéines et de leurs activités enzymatiques pour savoir s'il y a une modulation à ce niveau indépendamment de leurs transcrits.

La catalase est l'enzyme la plus efficace car elle réagit à la présence d'un niveau important de H_2O_2 . L'irradiation UV conduit à l'augmentation de l'expression de la catalase dans les NHEK, avec toujours un niveau plus élevé en physioxie qu'en normoxie, alors qu'une modulation minime de l'expression et de la quantité est observée dans les RHE. Son activité plus importante en physioxie dans les RHE, et l'absence de corrélation avec le taux de la protéine suggère que le taux d'oxygène agit sur l'activation de l'enzyme et non sur sa production. Ceci rejoint ce qui a été observé précédemment dans l'étude de la catalase au niveau basal et pourrait être expliqué, de même, par des modifications post-traductionnelles ou des interactions avec des protéines telles que la calmoduline ou p53. Par ailleurs il a été démontré que les UV sont capables de modifier directement le site de liaison du H_2O_2 dans cette enzyme conduisant ainsi à une génération de ROS, par entrée de l'eau et réaction avec le fer de l'hème, et à un effet pro-oxydant (Heck, Vetrano et al. 2003). De façon intéressante, il a été montré qu'un taux faible en oxygène inhibe cet effet pro-oxydant et, par conséquent, restaure l'activité antioxydante de la catalase. Cela pourrait en partie expliquer pourquoi l'activité antioxydante de la catalase est plus importante en physioxie qu'en normoxie suite à l'irradiation UV.

D'une manière générale, nous pouvons noter que, parmi les enzymes réagissant avec H_2O_2 , celles qui sont les moins exprimées, GPXs pour RHE et catalase pour NHEK, sont celles qui sont le plus induites par les UV en physioxie comparativement à la normoxie. Les cellules pourraient-elles réagir en surexprimant les enzymes qui leur manquent quand elles sont en conditions physiologiques ?

4.3.2 L'impact de la teneur en oxygène sur la modulation, par les UV, des enzymes piégeant $O_2^{\bullet-}$

L' $O_2^{\bullet-}$ est un oxydant puissant et c'est le précurseur d'autres ROS. Il est particulièrement induit sous l'effet des UV. Ses effets sont neutralisés par les enzymes SODs qui sont réparties dans l'ensemble de la cellule. Pour cette raison, ces enzymes jouent un rôle clé dans l'homéostasie redox. Ainsi une déficience en SOD2 mitochondriale conduit à l'apparition de marqueurs du vieillissement chez la souris tels que la sénescence des kératinocytes et la malformation épidermique (Velarde, Flynn et al. 2012).

Nos résultats montrent une forte surexpression de la SOD2 6h après l'irradiation UV dans les RHE. En revanche, dans les NHEK, la stimulation de l'expression de la SOD2 est plus lente. Ceci est en accord avec une étude sur de la peau reconstruite entière, qui a également montré une augmentation des transcrits de la SOD2 à 6 heures (Bernerd, Marionnet et al. 2012). Les effets des UV sur le modèle d'épiderme en physioxie reproduisent donc ce qui se passe dans la peau complète contrairement à la normoxie. De plus cette régulation précoce de la SOD2 induit l'accumulation de la protéine et l'enzyme est très active dans les NHEK et dans les RHE. Cette augmentation de la SOD2 reflète ce qui a déjà décrit *in vivo* dans la littérature sur le photovieillissement de la peau humaine (Punnonen, Lehtola et al. 1995). Elle a également été mise en évidence dans un modèle de photovieillissement chronique chez la souris (Okada, Takahashi et al. 1994), et après 24h et 5 jours d'exposition aiguë, toujours chez la souris (Jin, Liu et al. 2007) (Ahn, Kim et al. 2020). Ainsi, le maintien d'une activité élevée de SOD2 après une irradiation UV en physioxie reproduit ce qui se passe dans la peau *in vivo*, contrairement à la normoxie. La comparaison avec les modèles *in vitro* est plus difficile, car, dans la littérature, l'activité de ces enzymes est décrite de manière divergente, ce qui peut être dû à des protocoles différents.

Dans les deux modèles, NHEK et RHE, nous montrons que la SOD1 est la moins induite par l'irradiation UV, peut être que cela se fait plus tardivement, après 24h, car un début d'induction de son expression est observé dans les RHE en physioxie à 24h. D'une manière intéressante, dans ce projet pour la première fois nous présentons une nouvelle localisation de la SOD1 *in vitro* en physioxie dans les noyaux des kératinocytes primaires. Une localisation similaire de cette enzyme a été rapportée dans les levures et dans les fibroblastes (Tsang, Liu et al. 2014). À ce niveau la SOD1 peut agir comme un facteur de transcription. De plus, une étude sur les explants de peau donc *ex vivo* a montré pour la première fois sa localisation dans les noyaux

des kératinocytes épidermique (Altobelli, Van Noorden et al. 2019). Nos modèles en physioxie confirment ces résultats et surtout que cette localisation est beaucoup plus accentuée avec l'effet des UV.

Dans cette optique, il serait intéressant de déterminer les gènes cibles de SOD1 dans nos modèles. Il peut s'agir d'une nouvelle voie afin de réguler les enzymes antioxydantes dans le stress oxydant.

5. Quelles sont les voies de signalisation potentiellement impliquées ?

Les UV sont des générateurs puissants des ROS dans le cytoplasme et dans la mitochondrie (Rezvani, Ali et al. 2011). Les ROS régulent plusieurs facteurs de transcription qui ciblent les enzymes antioxydantes. Ces facteurs de transcription sont également sensibles aux variations de l'oxygène. Cette section décrit donc les deux principales voies de signalisation sensible aux variations de l'oxygène et des ROS, HIF et Nrf2, et le rôle qu'elles peuvent avoir dans la régulation des antioxydants.

La voie de régulation médiée par HIF est la voie majeure induite à de faibles taux d'oxygène. En effet, HIF-1 α est responsable de la transcription des gènes d'adaptation à l'hypoxie. Les plus importants d'entre eux sont le VEGF, impliquée dans l'angiogenèse, PDK1, dans la glycolyse, Bcl-2/BNIP3/p53, dans l'apoptose/arrêt du cycle cellulaire, GLUT1/3, dans le métabolisme du glucose. La stabilisation de HIF-1 α est largement décrite en hypoxie : il est rapidement accumulé (2h à 24h heures) dans les cellules en hypoxie. Par la suite, c'est l'isoforme HIF-2 α qui se stabilise jusqu'à 72 heures en hypoxie (Holmquist-Mengelbier, Fredlund et al. 2006) (Carreau, El Hafny-Rahbi et al. 2011). Les données ne sont pas encore claires concernant la stabilisation des HIFs en physioxie. En effet, une étude sur des adipocytes primaires cultivées en physioxie à partir de leur isolement du tissu *in vivo*, donc n'ayant jamais été en normoxie, montre l'expression et la stabilisation de HIF-1 α qui, en conséquence, induit la transcription des gènes cibles comme GLU1 (Chen, Tang et al. 2018). En, revanche, d'autres données montrent que HIF-1 α n'est pas activé ni accumulé en physioxie (Chen, Lai et al. 2018). Ces dernières données ont été confirmées par la présence d'un équilibre entre son accumulation et sa dégradation en physioxie, de la même façon qu'en normoxie (Pierrevelcin, Fuchs et al. 2020). Dans la peau, il a été démontré une légère accumulation de HIF-1 α le premier jour de

l'adaptation des kératinocytes en physioxie (5% O₂) et par la suite aucune trace n'a été identifiée, même après 4 jours de cultures (Carrera, Senra et al. 2014).

Il y a une forte probabilité que dans notre cas, des cultures de 4 jours en monocouche ou de 15 jours pour les RHE, l'accumulation de HIF-1 α soit réprimée. Il serait intéressant de vérifier l'expression de l'isoforme HIF-2 α .

Indépendamment de l'oxygène, la régulation de HIF- α 1 par le taux de ROS n'est encore pas très claire. En effet, il a été démontré que l'accumulation de HIF-1 α induit la diminution des ROS (Semenza 2009), typiquement les ROS mitochondriaux (Li, Zhou et al. 2019). Cependant, des données sont différentes : soit l'accumulation de HIF-1 α n'est pas liée à la régulation des ROS, soit elle entraîne en contraire une augmentation des ROS (Chen, Tang et al. 2018) (Movafagh, Crook et al. 2015). Dans notre étude nous pourrions émettre l'hypothèse de la présence d'une interaction entre les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α et le facteur de transcription Nrf2, en particulier dans la régulation de la SOD2 qui augmente à la fois en physioxie et sous l'effet des UV. Pour quoi le facteur Nrf2 ? C'est un facteur de transcription induit par la présence des ROS, et qui est responsable de la transcription des gènes antioxydants. Ceci est déjà décrit en normoxie. En physioxie, le facteur Nrf2 n'est pas modulé directement, cependant, une régulation *via* un autre facteur de transcription Bach 1 a été mise en évidence dans les cellules endothéliales (Chapple, Keeley et al. 2016). En hypoxie, il a été décrit que HIF- α 1 interagit directement avec Nrf2 dans le noyau des cellules de pancréas (Küper, Baumann et al. 2021). La présence de ces deux facteurs à la fois dans les noyaux des cellules de la peau n'est pas encore décrite mais l'investigation de cette possible interaction dans nos modèles pourrait apporter d'éventuelles explications sur la régulation de la SOD2. Plusieurs résultats de la littérature soutiennent l'existence de relations étroites entre HIFs et SOD2. En effet, la surexpression de la SOD2 induit l'accumulation du facteur HIF- α 1. En revanche, la translocation de HIF- α 1 dans le noyau induit la répression de la transcription de la SOD2 (Gao, Li et al. 2013), ce qui crée un système de régulation. D'autre part, la SOD2 figure parmi les gènes régulés par HIF- α 2 (Oktay, Dioum et al. 2007).

Dans cette optique, il serait intéressant d'étudier l'expression, l'accumulation et la localisation de ces facteurs de transcription, au niveau basal et après irradiation UV. Une colocalisation éventuelle de ces facteurs, en particulier avec la présence de la SOD1, pourrait expliquer les modulations des enzymes antioxydantes dans le stress oxydant en physioxie.

Conclusion

Les travaux de recherche que nous avons réalisés au cours de cette thèse avaient pour ambition de mettre en place des outils permettant d'explorer et de mieux comprendre le rôle du taux d'oxygène présent dans le microenvironnement cutané et notamment son rôle dans les défenses antioxydantes de la peau.

Dans notre étude, nous avons comparé les différents modèles cutanés habituellement utilisés dans des cultures *in vitro*, des modèles en monocouche, avec une lignée HaCat et des kératinocytes primaires, et un modèle plus représentatif de la peau avec les épidermes reconstruits. Par ailleurs, nous avons recréé un micro-environnement proche de la physiologie de la peau en ce qui concerne le taux d'oxygénation et une comparaison a été effectuée entre ces modèles établis en physioxie, qui représente l'oxygénation physiologique de la peau, et en normoxie, qui correspond à l'oxygénation de l'air donc à la culture en condition classique. Ces modèles ne se limitent pas à l'étude du stress oxydant mais ont des applications beaucoup plus larges dans le domaine de l'étude de la biologie de la peau. Egalement ils peuvent être utilisés pour évaluer l'activité de composés afin d'obtenir des résultats plus proches des conditions physiologiques. En effet nous avons montré un certain nombre de différences d'activité biologique entre la normoxie et la physioxie.

De façon générale, nos travaux montrent que le taux d'oxygène du microenvironnement cellulaire régule les enzymes antioxydantes. Une meilleure activité antioxydante est obtenue dans les conditions physiologiques avec une surexpression de la SOD2, une suractivation de la catalase et une translocation de la SOD1, capable d'agir alors comme un facteur de transcription. Ceci est observé à l'état basal mais aussi fortement accentué après irradiation UV mimant le photovieillissement de la peau. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans ces régulations par l'oxygène permettrait de mieux comprendre l'importance de respecter les conditions physiologiques.

Références

Références

1. Abreu, C. M. and R. L. Reis (2021). "Dermal papilla cells and melanocytes response to physiological oxygen levels depends on their interactions." **54**(7): e13013.
2. Adachi, T., J. Wang and X. L. Wang (2000). "Age-related change of plasma extracellular-superoxide dismutase." Clin Chim Acta **290**(2): 169-178.
3. Afaq, F., M. A. Zaid, E. Pelle, N. Khan, D. N. Syed, M. S. Matsui, D. Maes and H. Mukhtar (2009). "Aryl hydrocarbon receptor is an ozone sensor in human skin." J Invest Dermatol **129**(10): 2396-2403.
4. Ahn, J., D. Kim, C. Park, B. Kim, H. Sim, H. Kim, T.-K. Lee, J.-C. Lee, G. Yang, Y. Her, J. H. Park, T. Sim, H. Lee and M.-H. Won (2020). "Laminarin Attenuates Ultraviolet-Induced Skin Damage by Reducing Superoxide Anion Levels and Increasing Endogenous Antioxidants in the Dorsal Skin of Mice." Marine Drugs **18**: 345.
5. Aitken, G. R., J. R. Henderson, S.-C. Chang, C. J. McNeil and M. A. Birch-Machin (2007). "Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes." Clinical and Experimental Dermatology **32**(6): 722-727.
6. Altobelli, G. G., S. Van Noorden and V. Cimini (2019). "Copper/Zinc-Superoxide Dismutase in Human Epidermis: An Immunochemical Study." Frontiers in Medicine **6**.
7. Amano, S. (2009). "Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging." J Investig Dermatol Symp Proc **14**(1): 2-7.
8. Anderson, D. E., B. D. Markway, K. J. Weekes, H. E. McCarthy and B. Johnstone (2018). "Physioxia Promotes the Articular Chondrocyte-Like Phenotype in Human Chondroprogenitor-Derived Self-Organized Tissue." Tissue Eng Part A **24**(3-4): 264-274.
9. Arda, O., N. Göksüğü and Y. Tüzün (2014). "Basic histological structure and functions of facial skin." Clin Dermatol **32**(1): 3-13.
10. Asselineau, D., B. A. Bernard, C. Bailly, M. Darmon and M. Pruniéras (1986). "Human Epidermis Reconstructed by Culture: Is It "Normal"?" Journal of Investigative Dermatology **86**(2): 181-186.
11. Balaban, R. S., S. Nemoto and T. Finkel (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." cell **120**(4): 483-495.

12. Balin, A. K. and L. Pratt (2002). "Oxygen modulates the growth of skin fibroblasts." In Vitro Cell Dev Biol Anim **38**(5): 305-310.
13. Balu, M., A. Mazhar, C. K. Hayakawa, R. Mittal, T. B. Krasieva, K. Konig, V. Venugopalan and B. J. Tromberg (2013). "In vivo multiphoton NADH fluorescence reveals depth-dependent keratinocyte metabolism in human skin." Biophys J **104**(1): 258-267.
14. Barrea, L., M. C. Savanelli, C. Di Somma, M. Napolitano, M. Megna, A. Colao and S. Savastano (2017). "Vitamin D and its role in psoriasis: An overview of the dermatologist and nutritionist." Reviews in endocrine & metabolic disorders **18**(2): 195-205.
15. Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.
16. Bellezza, I., I. Giambanco, A. Minelli and R. Donato (2018). "Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress." Biochim Biophys Acta Mol Cell Res **1865**(5): 721-733.
17. Bernard, F. X., F. Morel, M. Camus, N. Pedretti, C. Barrault, J. Garnier and J. C. Lecron (2012). "Keratinocytes under Fire of Proinflammatory Cytokines: Bona Fide Innate Immune Cells Involved in the Physiopathology of Chronic Atopic Dermatitis and Psoriasis." J Allergy (Cairo) **2012**: 718725.
18. Bernerd, F., C. Marionnet and C. Duval (2012). "Solar ultraviolet radiation induces biological alterations in human skin in vitro: Relevance of a well-balanced UVA/UVB protection." Indian journal of dermatology, venereology and leprology **78 Suppl 1**: S15-23.
19. Bikle, D. D. (2012). "Protective actions of vitamin D in UVB induced skin cancer." Photochemical & Photobiological Sciences **11**(12): 1808-1816.
20. Birch-Machin, M. A. and H. Swalwell (2010). "How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue." Mutagenesis **25**(2): 101-107.
21. Bonté, F. (2011). "Skin moisturization mechanisms: New data." Annales Pharmaceutiques Françaises **69**(3): 135-141.
22. Bonté, F., D. Girard, J. C. Archambault and A. Desmoulière (2019). "Skin Changes During Ageing." Subcell Biochem **91**: 249-280.
23. Borlon, C., F. Debaq-Chainiaux, C. Hinrichs, K. Scharffetter-Kochanek, O. Toussaint and M. Wlaschek (2007). "The gene expression profile of psoralen plus UVA-induced

- premature senescence in skin fibroblasts resembles a combined DNA-damage and stress-induced cellular senescence response phenotype." *Exp Gerontol* **42**(9): 911-923.
24. Bosset, S., M. Bonnet-Duquennoy, P. Barré, A. Chalon, K. Lazou, R. Kurfurst, F. Bonté, S. Schnébert, F. Disant, B. Le Varlet and J. F. Nicolas (2003). "Decreased expression of keratinocyte beta1 integrins in chronically sun-exposed skin in vivo." *Br J Dermatol* **148**(4): 770-778.
 25. Böttcher-Haberzeth, S., A. S. Klar, T. Biedermann, C. Schiestl, C. Meuli-Simmen, E. Reichmann and M. Meuli (2013). "'Trooping the color': restoring the original donor skin color by addition of melanocytes to bioengineered skin analogs." *Pediatric Surgery International* **29**(3): 239-247.
 26. Boukamp, P. (2005). "Skin aging: a role for telomerase and telomere dynamics?" *Curr Mol Med* **5**(2): 171-177.
 27. Boukamp, P., R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham and N. E. Fusenig (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *The Journal of cell biology* **106**(3): 761-771.
 28. Braun, S., C. Hanselmann, M. G. Gassmann, U. auf dem Keller, C. Born-Berclaz, K. Chan, Y. W. Kan and S. Werner (2002). "Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound." *Mol Cell Biol* **22**(15): 5492-5505.
 29. Brenner, M. and V. J. Hearing (2008). "The protective role of melanin against UV damage in human skin." *Photochem Photobiol* **84**(3): 539-549.
 30. Buravkova, L., Y. Rylova, E. Andreeva, A. Kulikov, M. Pogodina, B. Zhivotovsky and V. Gogvadze (2013). "Low ATP level is sufficient to maintain the uncommitted state of multipotent mesenchymal stem cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1830**(10): 4418-4425.
 31. Carraway, K. R., E. M. Johnson, T. C. Kauffmann, N. J. Fry and K. D. Mansfield (2017). "Hypoxia and Hypoglycemia synergistically regulate mRNA stability." *RNA Biology* **14**(7): 938-951.
 32. Carreau, A., B. El Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon and C. Kieda (2011). "Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia." *J Cell Mol Med* **15**(6): 1239-1253.
 33. Carrera, S., J. Senra, M. Acosta, M. Althubiti, E. Hammond, P. de Verdier and S. Macip (2014). "The Role of the HIF-1 α Transcription Factor in Increased Cell Division at Physiological Oxygen Tensions." *PloS one* **9**: e97938.

34. Catalá, A. (2012). "Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the "Fluid Mosaic Model" to the "Lipid Whisker Model"." Biochimie **94**(1): 101-109.
35. Chapple, S. J., T. P. Keeley, D. Mastronicola, M. Arno, G. Vizcay-Barrena, R. Fleck, R. C. M. Siow and G. E. Mann (2016). "Bach1 differentially regulates distinct Nrf2-dependent genes in human venous and coronary artery endothelial cells adapted to physiological oxygen levels." Free Radic Biol Med **92**: 152-162.
36. Chaturvedi, V., J. Z. Qin, M. F. Denning, D. Choubey, M. O. Diaz and B. J. Nickoloff (2001). "Abnormal NF-kappaB signaling pathway with enhanced susceptibility to apoptosis in immortalized keratinocytes." J Dermatol Sci **26**(1): 67-78.
37. Chen, C., Q. Tang, Y. Zhang, M. Yu, W. Jing and W. Tian (2018). "Physioxia: a more effective approach for culturing human adipose-derived stem cells for cell transplantation." Stem Cell Research & Therapy **9**(1): 148.
38. Chen, Q. M. and A. J. Maltagliati (2018). "Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection." Physiol Genomics **50**(2): 77-97.
39. Chen, R.-L., U. Lai, L. Zhu, A. Singh, M. Ahmed Alkataan and N. Forsyth (2018). "Reactive Oxygen Species Formation in the Brain at Different Oxygen Levels: The Role of Hypoxia Inducible Factors." Frontiers in Cell and Developmental Biology **6**.
40. Chowdhury, R., A. Hardy and C. Schofield (2008). "The human oxygen sensing machinery and its manipulation." Chemical Society reviews **37**: 1308-1319.
41. Chung, J. H. and H. C. Eun (2007). "Angiogenesis in skin aging and photoaging." J Dermatol **34**(9): 593-600.
42. Cole, M. A., T. Quan, J. J. Voorhees and G. J. Fisher (2018). "Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging." Journal of Cell Communication and Signaling **12**(1): 35-43.
43. Colombo, I., E. Sangiovanni, R. Maggio, C. Mattozzi, S. Zava, Y. Corbett, M. Fumagalli, C. Carlino, P. A. Corsetto, D. Scaccabarozzi, S. Calvieri, A. Gismondi, D. Taramelli and M. Dell'Agli (2017). "HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes." Mediators of Inflammation **2017**: 7435621.
44. Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu and J. Lunec (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." The FASEB Journal **17**(10): 1195-1214.
45. Correia-Melo, C., F. D. Marques, R. Anderson, G. Hewitt, R. Hewitt, J. Cole, B. M. Carroll, S. Miwa, J. Birch, A. Merz, M. D. Rushton, M. Charles, D. Jurk, S. W. Tait, R. Czapiewski, L. Greaves, G. Nelson, M. Bohlooly-Y, S. Rodriguez-Cuenca, A. Vidal-

- Puig, D. Mann, G. Saretzki, G. Quarato, D. R. Green, P. D. Adams, T. von Zglinicki, V. I. Korolchuk and J. F. Passos (2016). "Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype." The EMBO Journal **35**(7): 724-742.
46. Cosgrove, M. C., O. H. Franco, S. P. Granger, P. G. Murray and A. E. Mayes (2007). "Dietary nutrient intakes and skin-aging appearance among middle-aged American women." Am J Clin Nutr **86**(4): 1225-1231.
47. Damiani, E., F. Brugè, I. Cirilli, F. Marcheggiani, F. Olivieri, T. Armeni, L. Cianfruglia and A. Giuliani (2018). "Modulation of Oxidative Status by Normoxia and Hypoxia on Cultures of Human Dermal Fibroblasts: How Does It Affect Cell Aging?" **2018**: 5469159.
48. de Jager, T. L., A. E. Cockrell and S. S. Du Plessis (2017). "Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species." Adv Exp Med Biol **996**: 15-23.
49. Deliconstantinos, G., V. Villiotou and J. C. Stavrides (1996). "Alterations of nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation. Potential role for peroxynitrite in skin inflammation." Biochem Pharmacol **51**(12): 1727-1738.
50. Delmas, P., J. Hao and L. Rodat-Despoix (2011). "Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons." Nat Rev Neurosci **12**(3): 139-153.
51. Dennis, J. E., G. A. Whitney, J. Rai, R. J. Fernandes and T. J. Kean (2020). "Physioxia Stimulates Extracellular Matrix Deposition and Increases Mechanical Properties of Human Chondrocyte-Derived Tissue-Engineered Cartilage." Frontiers in Bioengineering and Biotechnology **8**.
52. Di Meo, S., T. T. Reed, P. Venditti and V. M. Victor (2016). "Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions." Oxid Med Cell Longev **2016**: 1245049.
53. Douki, T. and J. Cadet (2001). "Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions." Biochemistry **40**(8): 2495-2501.
54. Draelos, Z. (2012). "Aquaporins: an introduction to a key factor in the mechanism of skin hydration." The Journal of clinical and aesthetic dermatology **5**(7): 53-56.
55. Draelos, Z. D. (2019). "An Oral Supplement and the Nutrition-Skin Connection." The Journal of clinical and aesthetic dermatology **12**(7): 13-16.

56. Driskell, R. R., C. A. B. Jahoda, C.-M. Chuong, F. M. Watt and V. Horsley (2014). "Defining dermal adipose tissue." Experimental Dermatology **23**(9): 629-631.
57. Dubin, A. E. and A. Patapoutian (2010). "Nociceptors: the sensors of the pain pathway." J Clin Invest **120**(11): 3760-3772.
58. Dunn, J. H. and J. Koo (2013). "Psychological Stress and skin aging: a review of possible mechanisms and potential therapies." Dermatol Online J **19**(6): 18561.
59. Dupont, E., J. Gomez and D. Bilodeau (2013). "Beyond UV radiation: a skin under challenge." Int J Cosmet Sci **35**(3): 224-232.
60. Durchdewald, M., T. A. Beyer, D. A. Johnson, J. A. Johnson, S. Werner and U. auf dem Keller (2007). "Electrophilic Chemicals but not UV Irradiation or Reactive Oxygen Species Activate Nrf2 in Keratinocytes *In Vitro* and *In Vivo*." Journal of Investigative Dermatology **127**(3): 646-653.
61. Eberlein-König, B., T. Schäfer, J. Huss-Marp, U. Darsow, M. Möhrenschrager, O. Herbert, D. Abeck, U. Krämer, H. Behrendt and J. Ring (2000). "Skin surface pH, stratum corneum hydration, trans-epidermal water loss and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children." Acta Derm Venereol **80**(3): 188-191.
62. Eckert, R. L., G. Adhikary, C. A. Young, R. Jans, J. F. Crish, W. Xu and E. A. Rorke (2013). "AP1 transcription factors in epidermal differentiation and skin cancer." Journal of skin cancer **2013**: 537028-537028.
63. Egberts, F., M. Heinrich, J. M. Jensen, S. Winoto-Morbach, S. Pfeiffer, M. Wickel, M. Schunck, J. Steude, P. Saftig, E. Proksch and S. Schütze (2004). "Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2295-2307.
64. El-Abaseri, T. B., S. Putta and L. A. Hansen (2005). "Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor." Carcinogenesis **27**(2): 225-231.
65. Eleutherio, E. C. A., R. S. Silva Magalhães, A. de Araújo Brasil, J. R. Monteiro Neto and L. de Holanda Paranhos (2021). "SOD1, more than just an antioxidant." Archives of Biochemistry and Biophysics **697**: 108701.
66. Fão, L., S. I. Mota and A. C. Rego (2019). "Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases." Ageing Res Rev **54**: 100942.

67. Fattman, C. L., L. M. Schaefer and T. D. Oury (2003). "Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine." Free Radical Biology and Medicine **35**(3): 236-256.
68. Favrot, C., D. Beal, E. Blouin, M. T. Leccia, A. M. Roussel and W. Rachidi (2018). "Age-Dependent Protective Effect of Selenium against UVA Irradiation in Primary Human Keratinocytes and the Associated DNA Repair Signature." **2018**: 5895439.
69. Ferguson, D. C. J., G. R. Smerdon, L. W. Harries, N. J. F. Dodd, M. P. Murphy, A. Curnow and P. G. Winyard (2018). "Altered cellular redox homeostasis and redox responses under standard oxygen cell culture conditions versus physioxia." Free Radical Biology and Medicine **126**: 322-333.
70. Finaud, J., G. Lac and E. Filaire (2006). "Oxidative stress." Sports medicine **36**(4): 327-358.
71. Fisher, G. and L. Rittié (2018). "Restoration of the basement membrane after wounding: a hallmark of young human skin altered with aging." **12**(1): 401-411.
72. Fisher, G. J., S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. Kang and J. J. Voorhees (1996). "Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism." Nature **379**(6563): 335-339.
73. Fransen, M., M. Nordgren, B. Wang and O. Apanasets (2012). "Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease." Biochim Biophys Acta **1822**(9): 1363-1373.
74. Friedman, O. (2005). "Changes associated with the aging face." Facial Plast Surg Clin North Am **13**(3): 371-380.
75. Fujiki, Y. and M. C. Bassik (2021). "A New Paradigm in Catalase Research." Trends in Cell Biology **31**(3): 148-151.
76. Fukuda, S., S. Baba and T. Akasaka (2015). "Psychological stress has the potential to cause a decline in the epidermal permeability barrier function of the horny layer." Int J Cosmet Sci **37**(1): 63-69.
77. Funk, W. D., C. K. Wang, D. N. Shelton, C. B. Harley, G. D. Pagon and W. K. Hoeffler (2000). "Telomerase expression restores dermal integrity to in vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model." Exp Cell Res **258**(2): 270-278.
78. Gallico, G. G., 3rd, N. E. O'Connor, C. C. Compton, O. Kehinde and H. Green (1984). "Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium." N Engl J Med **311**(7): 448-451.

79. Gao, Y. H., C. X. Li, S. M. Shen, H. Li, G. Q. Chen, Q. Wei and L. S. Wang (2013). "Hypoxia-inducible factor 1 α mediates the down-regulation of superoxide dismutase 2 in von Hippel-Lindau deficient renal clear cell carcinoma." Biochem Biophys Res Commun **435**(1): 46-51.
80. Geneva, I. I., B. Cuzzo, T. Fazili and W. Javaid (2019). "Normal Body Temperature: A Systematic Review." Open forum infectious diseases **6**(4): ofz032-ofz032.
81. Giangreco, A., M. Qin, J. E. Pinter and F. M. Watt (2008). "Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging." Aging Cell **7**(2): 250-259.
82. Glorieux, C. and P. B. Calderon (2017). "Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach." Biol Chem **398**(10): 1095-1108.
83. Glorieux, C., M. Zamocky, J. Sandoval, J. Verrax and P. Calderon (2015). "Regulation of catalase expression in healthy and Cancer cells." Free radical biology & medicine **87**.
84. Gordon, J. R. S. and J. C. Brieva (2012). "Unilateral Dermatoheliosis." New England Journal of Medicine **366**(16): e25.
85. Gothié, E. and J. Pouyssegur (2002). "HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie." Med Sci (Paris) **18**(1): 70-78.
86. Goyal, M. M. and A. Basak (2010). "Human catalase: looking for complete identity." Protein Cell **1**(10): 888-897.
87. Grice, E. A. and J. A. Segre (2011). "The skin microbiome." Nat Rev Microbiol **9**(4): 244-253.
88. Grillon, C., A. Matejuk, M. Nadim, N. Lamerant-Fayel and C. Kieda (2012). "News on microenvironmental physioxia to revisit skin cell targeting approaches." Exp Dermatol **21**(10): 723-728.
89. Guichardant, M., S. Bacot, P. Molière and M. Lagarde (2006). "Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique." OCL **13**(1): 31-34.
90. Gutowska-Owsiak, D., E. I. Podobas, C. Eggeling, G. S. Ogg and J. Bernardino de la Serna (2020). "Addressing Differentiation in Live Human Keratinocytes by Assessment of Membrane Packing Order." Front Cell Dev Biol **8**: 573230.
91. Hammiller, B., B. V. K. Karuturi, C. Miller, M. Holmes, V. Labhasetwar, G. Madsen and L. A. Hansen (2017). "Delivery of antioxidant enzymes for prevention of ultraviolet irradiation-induced epidermal damage." J Dermatol Sci **88**(3): 373-375.
92. Hasleton, P. S. (1972). "The internal surface area of the adult human lung." J Anat **112**(Pt 3): 391-400.

93. Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Experimental Cell Research **25**(3): 585-621.
94. Heck, D. E., A. M. Vetrano, T. M. Mariano and J. D. Laskin (2003). "UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase." J Biol Chem **278**(25): 22432-22436.
95. Hellemans, L., H. Corstjens, A. Neven, L. Declercq and D. Maes (2003). "Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery." J Invest Dermatol **120**(3): 434-439.
96. Hiebert, P. and S. Werner (2019). "Regulation of Wound Healing by the NRF2 Transcription Factor—More Than Cytoprotection." International Journal of Molecular Sciences **20**(16): 3856.
97. Holick, M. F. (2007). "Vitamin D deficiency." N Engl J Med **357**(3): 266-281.
98. Holmquist-Mengelbier, L., E. Fredlund, T. Löfstedt, R. Noguera, S. Navarro, H. Nilsson, A. Pietras, J. Vallon-Christersson, A. Borg, K. Gradin, L. Poellinger and S. Pahlman (2006). "Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype." Cancer Cell **10**(5): 413-423.
99. Horikoshi, T., A. K. Balin and D. M. Carter (1990). "Effects of Oxygen Tension on the Growth and Pigmentation of Normal Human Melanocytes." Journal of Investigative Dermatology **96**(6): 841-844.
100. Hüls, A., T. Schikowski, U. Krämer, D. Sugiri, S. Stolz, A. Vierkoetter and J. Krutmann (2015). Ozone exposure and extrinsic skin aging: results from the SALIA cohort. JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP 75 VARICK ST, 9TH FLR, NEW YORK, NY 10013-1917 USA.
101. Hüls, A., A. Vierkötter, W. Gao, U. Krämer, Y. Yang, A. Ding, S. Stolz, M. Matsui, H. Kan, S. Wang, L. Jin, J. Krutmann and T. Schikowski (2016). "Traffic-Related Air Pollution Contributes to Development of Facial Lentigines: Further Epidemiological Evidence from Caucasians and Asians." J Invest Dermatol **136**(5): 1053-1056.
102. Iannolo, G., M. R. Sciuto, S. Buccheri, C. Colarossi, R. De Maria, L. Memeo and P. G. Conaldi (2016). "Numb Expression Contributes to the Maintenance of an Undifferentiated State in Human Epidermis." Cell Transplant **25**(2): 353-364.

103. Iizawa, O., T. Kato, H. Tagami, H. Akamatsu and Y. Niwa (1994). "Long-term follow-up study of changes in lipid peroxide levels and the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in mouse skin after acute and chronic UV irradiation." Archives of Dermatological Research **286**(1): 47-52.
104. Jablonski, N. G. and G. Chaplin (2013). "Epidermal pigmentation in the human lineage is an adaptation to ultraviolet radiation." J Hum Evol **65**(5): 671-675.
105. Jacczak, B. and B. Rubiś (2021). "Potential of Naturally Derived Compounds in Telomerase and Telomere Modulation in Skin Senescence and Aging." **22**(12).
106. Jeney, F., E. Bazsó-Dombi, K. Oravecz, J. Szabó and I. Z. Nagy (2000). "Cytochemical studies on the fibroblast-preadipocyte relationships in cultured fibroblast cell lines." Acta Histochem **102**(4): 381-389.
107. Jin, G.-H., Y. Liu, S.-Z. Jin, X. Liu and S.-Z. Liu (2007). "UVB induced oxidative stress in human keratinocytes and protective effect of antioxidant agents." Radiation and environmental biophysics **46**: 61-68.
108. Jobeili, L., P. Rousselle, D. Béal, E. Blouin, A. M. Roussel, O. Damour and W. Rachidi (2017). "Selenium preserves keratinocyte stemness and delays senescence by maintaining epidermal adhesion." Aging (Albany NY) **9**(11): 2302-2315.
109. Jor, J. W., M. D. Parker, A. J. Taberner, M. P. Nash and P. M. Nielsen (2013). "Computational and experimental characterization of skin mechanics: identifying current challenges and future directions." Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **5**(5): 539-556.
110. Joshi, P., N. Nair, G. Begum, N. Joshi, V. Sinkar and S. Vora (2007). "Melanocyte-keratinocyte interaction induces calcium signalling and melanin transfer to keratinocytes." Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society **20**: 380-384.
111. Kammeyer, A. and R. M. Luiten (2015). "Oxidation events and skin aging." Ageing Res Rev **21**: 16-29.
112. Kang, H. Y., J. W. Lee, F. Papaccio, B. Bellei and M. Picardo (2021). "Alterations of the pigmentation system in the aging process." Pigment Cell & Melanoma Research **34**(4): 800-813.
113. Kang, M. Y., H. B. Kim, C. Piao, K. H. Lee, J. W. Hyun, I. Y. Chang and H. J. You (2013). "The critical role of catalase in prooxidant and antioxidant function of p53." Cell Death & Differentiation **20**(1): 117-129.

114. Karnati, S., G. Lüers, S. Pfreimer and E. Baumgart-Vogt (2013). "Mammalian SOD2 is exclusively located in mitochondria and not present in peroxisomes." Histochemistry and Cell Biology **140**(2): 105-117.
115. Kato, H., K. Izumi, A. Uenoyama, A. Shiomi, S. Kuo and S. E. Feinberg (2014). "Hypoxia Induces an Undifferentiated Phenotype of Oral Keratinocytes in vitro." Cells Tissues Organs **199**(5-6): 393-404.
116. Kato, H., M. Sugimoto, A. Enomoto, M. Kaneko, Y. Hara, N. Saito, A. Shiomi, H. Ohnuki and K. Izumi (2021). "Metabolomic Alteration of Oral Keratinocytes and Fibroblasts in Hypoxia." Journal of Clinical Medicine **10**(6): 1156.
117. Kawachi, Y., X. Xu, S. Taguchi, H. Sakurai, Y. Nakamura, Y. Ishii, Y. Fujisawa, J. Furuta, T. Takahashi, K. Itoh, M. Yamamoto, F. Yamazaki and F. Otsuka (2008). "Attenuation of UVB-induced sunburn reaction and oxidative DNA damage with no alterations in UVB-induced skin carcinogenesis in Nrf2 gene-deficient mice." J Invest Dermatol **128**(7): 1773-1779.
118. Keogh, B. P., R. G. Allen, R. Pignolo, J. Horton, M. Tresini and V. J. Cristofalo (1996). "Expression of hydrogen peroxide and glutathione metabolizing enzymes in human skin fibroblasts derived from donors of different ages." J Cell Physiol **167**(3): 512-522.
119. Kim, H. O., J. H. Kim, B. Y. Chung, M. G. Choi and C. W. Park (2014). "Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases." Experimental Dermatology **23**(4): 278-281.
120. Kim, Y., B. H. Kim, H. Lee, B. Jeon, Y. S. Lee, M.-J. Kwon and T.-Y. Kim (2011). "Regulation of skin inflammation and angiogenesis by EC-SOD via HIF-1 α and NF- κ B pathways." Free Radical Biology and Medicine **51**(11): 1985-1995.
121. Kim, Y. and K.-M. Lim (2021). "Skin barrier dysfunction and filaggrin." Archives of Pharmacal Research **44**(1): 36-48.
122. Kim, Y. I., K. S. Kim and H. J. Ahn (2020). "Reduced matrix metalloproteinase and collagen transcription mediated by the TGF- β /Smad pathway in passaged normal human dermal fibroblasts." **19**(5): 1211-1218.
123. Kligman, L. H. (1989). "Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment." Clin Geriatr Med **5**(1): 235-251.
124. Kobayashi, T., N. Saito, N. Takemori, S. Iizuka, K. Suzuki, N. Taniguchi and H. Iizuka (1993). "Ultrastructural localization of superoxide dismutase in human skin." Acta Derm Venereol **73**(1): 41-45.

125. Koh, R., I. Szeverényi, B. Lee, S. Denil, S. Y. J. Lim, P. A. Benny, N. Grasset, B. K. Tan and E. B. Lane (2020). "Oxygen-Mediated Control of the Keratinocyte Proliferation-Differentiation Axis." J Invest Dermatol **140**(1): 235-238.e233.
126. Korkina, L. and S. Pastore (2009). "The role of redox regulation in the normal physiology and inflammatory diseases of skin." Front Biosci (Elite Ed) **1**(1): 123-141.
127. Kosmadaki, M. G. and B. A. Gilchrest (2004). "The role of telomeres in skin aging/photoaging." Micron **35**(3): 155-159.
128. Krishnamurthy, P. and A. Wadhvani (2012). "Antioxidant enzymes and human health. Antioxidant enzyme." Rijeka: InTech.
129. Krunic, D., S. Moshir, K. M. Greulich-Bode, R. Figueroa, A. Cerezo, H. Stammer, H. J. Stark, S. G. Gray, K. V. Nielsen, W. Hartschuh and P. Boukamp (2009). "Tissue context-activated telomerase in human epidermis correlates with little age-dependent telomere loss." Biochim Biophys Acta **1792**(4): 297-308.
130. Krutmann, J., A. Bouloc, G. Sore, B. A. Bernard and T. Passeron (2017). "The skin aging exposome." Journal of dermatological science **85**(3): 152-161.
131. Kueh, H. Y., P. Niethammer and T. J. Mitchison (2013). "Maintenance of mitochondrial oxygen homeostasis by cosubstrate compensation." Biophysical journal **104**(6): 1338-1348.
132. Kumar, B., A. K. Adebayo, M. Prasad, M. L. Capitano, R. Wang, P. Bhat-Nakshatri, M. Anjanappa, E. Simpson, D. Chen, Y. Liu, J. M. Schilder, A. B. Colter, C. Maguire, C. J. Temm, G. Sandusky, E. H. Doud, A. B. Wijeratne, A. L. Mosley, H. E. Broxmeyer and H. Nakshatri (2022). "Tumor collection/processing under physioxia uncovers highly relevant signaling networks and drug sensitivity." Science advances **8**(2): eabh3375-eabh3375.
133. Küper, A., J. Baumann, K. Göpelt, M. Baumann, C. Sängler, E. Metzen, P. Kranz and U. Brockmeier (2021). "Overcoming hypoxia-induced resistance of pancreatic and lung tumor cells by disrupting the PERK-NRF2-HIF-axis." Cell Death & Disease **12**(1): 82.
134. Kwon, M.-J., B. Kim, Y. S. Lee and T.-Y. Kim (2012). "Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation." Journal of Dermatological Science **67**(2): 81-87.
135. Lambers, H., S. Piessens, A. Bloem, H. Pronk and P. Finkel (2006). "Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora." Int J Cosmet Sci **28**(5): 359-370.

136. Lambert, A. J. and M. D. Brand (2009). "Reactive oxygen species production by mitochondria." Methods Mol Biol **554**: 165-181.
137. Langton, A. K., P. Halai, C. E. Griffiths, M. J. Sherratt and R. E. Watson (2016). "The impact of intrinsic ageing on the protein composition of the dermal-epidermal junction." Mech Ageing Dev **156**: 14-16.
138. Larroque-Cardoso, P., C. Camaré, F. Nadal-Wollbold, M. H. Graziade, M. Pucelle, S. Garoby-Salom, P. Bogdanowicz, G. Josse, A. M. Schmitt, K. Uchida, K. Zarkovic, R. Salvayre and A. Nègre-Salvayre (2015). "Elastin Modification by 4-Hydroxynonenal in Hairless Mice Exposed to UV-A. Role in Photoaging and Actinic Elastosis." J Invest Dermatol **135**(7): 1873-1881.
139. Lavker, R. M. (1979). "Structural alterations in exposed and unexposed aged skin." J Invest Dermatol **73**(1): 59-66.
140. Lechler, T. and E. Fuchs (2005). "Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin." Nature **437**(7056): 275-280.
141. Lee, D. H., J. Y. Jung, J. H. Oh, S. Lee, Y. K. Kim and J. H. Chung (2012). "Ultraviolet irradiation modulates ABO blood group antigens in human skin in vivo: possible implication in skin aging." J Dermatol Sci **66**(1): 71-73.
142. Lee, K.-H., D.-Y. Kim and W. Kim (2021). "Cultivation of human skin cells under physiological oxygen concentration modulates expression of skin significant genes and response to hydroxy acids." Biochemical and Biophysical Research Communications **551**: 161-167.
143. Lee, M. J., G. Agrahari, H. Y. Kim, E. J. An, K. H. Chun, H. Kang, Y. S. Kim, C. W. Bang, L. J. Tak and T. Y. Kim (2021). "Extracellular Superoxide Dismutase Prevents Skin Aging by Promoting Collagen Production through the Activation of AMPK and Nrf2/HO-1 Cascades." J Invest Dermatol **141**(10): 2344-2353.e2347.
144. Lee, Y., J.-M. Shin, S. Jang, D.-K. Choi, M.-S. Seo, H.-R. Kim, K.-C. Sohn, M. Im, Y.-J. Seo and J.-H. Lee (2014). "Role of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in epidermal differentiation." Archives of dermatological research **306**(7): 677-682.
145. Lee, Y. R., E. M. Noh, J. H. Han, J. M. Kim, J. K. Hwang, B. M. Hwang, E. Y. Chung, B. S. Kim, S. H. Lee, S. J. Lee and J. S. Kim (2012). "Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF- κ B pathway in human dermal fibroblasts." Eur J Pharmacol **674**(2-3): 80-86.

146. Legakis, J. E., J. I. Koepke, C. Jedeszko, F. Barlasakar, L. J. Terlecky, H. J. Edwards, P. A. Walton and S. R. Terlecky (2002). "Peroxisome senescence in human fibroblasts." Mol Biol Cell **13**(12): 4243-4255.
147. Lehman, T. A., R. Modali, P. Boukamp, J. Stanek, W. P. Bennett, J. A. Welsh, R. A. Metcalf, M. R. Stampfer, N. Fusenig, E. M. Rogan and et al. (1993). "p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines." Carcinogenesis **14**(5): 833-839.
148. Lewis, D. A., S. F. Hengeltraub, F. C. Gao, M. A. Leivant and D. F. Spandau (2006). "Aberrant NF-kappaB activity in HaCaT cells alters their response to UVB signaling." J Invest Dermatol **126**(8): 1885-1892.
149. Li, A., N. Pouliot, R. Redvers and P. Kaur (2004). "Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny." J Clin Invest **113**(3): 390-400.
150. Li, H.-S., Y.-N. Zhou, L. Li, S.-F. Li, D. Long, X.-L. Chen, J.-B. Zhang, L. Feng and Y.-P. Li (2019). "HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria." Redox Biology **25**: 101109.
151. Li, N., C. Sioutas, A. Cho, D. Schmitz, C. Misra, J. Sempf, M. Wang, T. Oberley, J. Froines and A. Nel (2003). "Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage." Environmental Health Perspectives **111**(4): 455-460.
152. Liasi, F. T., R. Samatham and S. L. Jacques (2017). "Noninvasive in vivo optical characterization of blood flow and oxygen consumption in the superficial plexus of skin." J Biomed Opt **22**(11): 1-6.
153. Lin, Y., B. Liu, T. Deng, J. Zhong, Z. Feng, Q. Zeng, G. Huang and Z. Chen (2019). "Normoxia is not favorable for maintaining stemness of human endothelial progenitor cells." Stem Cell Research **38**: 101464.
154. Lo, J. A. and D. E. Fisher (2014). "The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics." Science **346**(6212): 945-949.
155. Loboda, A., A. Jozkowicz and J. Dulak (2010). "HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical." Mol Cells **29**(5): 435-442.
156. Lopez-Torres, M., Y. Shindo and L. Packer (1994). "Effect of age on antioxidants and molecular markers of oxidative damage in murine epidermis and dermis." J Invest Dermatol **102**(4): 476-480.
157. Low, E., G. Alimohammadiha, L. A. Smith, L. F. Costello, S. A. Przyborski, T. von Zglinicki and S. Miwa (2021). "How good is the evidence that cellular senescence causes skin ageing?" Ageing Research Reviews **71**: 101456.

158. Löwenau, L. J., C. Zoschke, R. Brodewolf, P. Volz, C. Hausmann, S. Wattanapitayakul, A. Boreham, U. Alexiev and M. Schäfer-Korting (2017). "Increased permeability of reconstructed human epidermis from UVB-irradiated keratinocytes." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **116**: 149-154.
159. Lu, C.-Y., H.-C. Lee, H.-J. Fahn and Y.-H. Wei (1999). "Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **423**(1): 11-21.
160. Luecke, S., M. Backlund, B. Jux, C. Esser, J. Krutmann and A. Rannug (2010). "The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis." Pigment Cell & Melanoma Research **23**(6): 828-833.
161. Makrantonaki, E. and C. C. Zouboulis (2007). "Molecular mechanisms of skin aging: state of the art." Ann N Y Acad Sci **1119**: 40-50.
162. Malik, E., S. R. Dennison, F. Harris and D. A. Phoenix (2016). "pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents." Pharmaceutics (Basel) **9**(4).
163. Maresca, V., E. Flori, S. Briganti, E. Camera, M. Cario-André, A. Taïeb and M. Picardo (2006). "UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin phototype." J Invest Dermatol **126**(1): 182-190.
164. Marionnet, C., S. Grether-Beck, S. Seité, A. Marini, T. Jaenicke, F. Lejeune, P. Bastien, A. Rougier, F. Bernerd and J. Krutmann (2011). "A broad-spectrum sunscreen prevents UVA radiation-induced gene expression in reconstructed skin in vitro and in human skin in vivo." Experimental Dermatology **20**(6): 477-482.
165. Marionnet, C., C. Tricaud and F. Bernerd (2014). "Exposure to non-extreme solar UV daylight: spectral characterization, effects on skin and photoprotection." Int J Mol Sci **16**(1): 68-90.
166. Matsui, T. and M. Amagai (2015). "Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum." International Immunology **27**(6): 269-280.
167. Maverakis, E., Y. Miyamura, M. P. Bowen, G. Correa, Y. Ono and H. Goodarzi (2010). "Light, including ultraviolet." J Autoimmun **34**(3): J247-257.
168. McCormick, R., T. Pearson and A. Vasilaki (2016). "Manipulation of environmental oxygen modifies reactive oxygen and nitrogen species generation during myogenesis." Redox Biology **8**: 243-251.

169. Méhul, B., D. Bernard and R. Schmidt (2001). "Calmodulin-like skin protein: a new marker of keratinocyte differentiation." J Invest Dermatol **116**(6): 905-909.
170. Meloni, M., S. Balzaretto, N. Collard, S. Desaint and C. Laperdrix (2021). "Reproducing the scalp microbiota community: co-colonization of a 3D reconstructed human epidermis with *C. acnes* and *M. restricta*." International Journal of Cosmetic Science **43**(2): 235-245.
171. Melov, S., J. Ravenscroft, S. Malik, M. S. Gill, D. W. Walker, P. E. Clayton, D. C. Wallace, B. Malfroy, S. R. Doctrow and G. J. Lithgow (2000). "Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics." Science **289**(5484): 1567-1569.
172. Merad, M., F. Ginhoux and M. Collin (2008). "Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells." Nat Rev Immunol **8**(12): 935-947.
173. Michalczyk, T., T. Biedermann, S. Böttcher-Haberzeth, A. S. Klar, M. Meuli and E. Reichmann (2018). "UVB exposure of a humanized skin model reveals unexpected dynamic of keratinocyte proliferation and Wnt inhibitor balancing." Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine **12**(2): 505-515.
174. Mieremet, A., A. Vázquez García, W. Boiten, R. van Dijk, G. Gooris, J. A. Bouwstra and A. El Ghalbzouri (2019). "Human skin equivalents cultured under hypoxia display enhanced epidermal morphogenesis and lipid barrier formation." Sci Rep **9**(1): 7811.
175. Mikesch, L. M., L. R. Aramadhaka, C. Moskaluk, P. Zigrino, C. Mauch and J. W. Fox (2013). "Proteomic anatomy of human skin." J Proteomics **84**: 190-200.
176. Mintie, C. A., C. K. Singh and N. Ahmad (2020). "Whole Fruit Phytochemicals Combating Skin Damage and Carcinogenesis." Translational Oncology **13**(2): 146-156.
177. Mofidi Najjar, F., F. Taghavi, R. Ghadari, N. Sheibani and A. A. Moosavi-Movahedi (2017). "Destructive effect of non-enzymatic glycation on catalase and remediation via curcumin." Archives of Biochemistry and Biophysics **630**: 81-90.
178. Mohyeldin, A., T. Garzón-Muvdi and A. Quiñones-Hinojosa (2010). "Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche." Cell stem cell **7**(2): 150-161.
179. Moll, R., M. Divo and L. Langbein (2008). "The human keratins: biology and pathology." Histochem Cell Biol **129**(6): 705-733.

180. Morita, A., K. Torii, A. Maeda and Y. Yamaguchi (2009). "Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging." J Investig Dermatol Symp Proc **14**(1): 53-55.
181. Movafagh, S., S. Crook and K. Vo (2015). "Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate." J Cell Biochem **116**(5): 696-703.
182. Muller, Q. and F. Berthod (2021). "[Tridimensional in vitro models of nervous and immune systems in the skin]." **37**(1): 68-76.
183. Murakami, K., J. Inagaki, M. Saito, Y. Ikeda, C. Tsuda, Y. Noda, S. Kawakami, T. Shirasawa and T. Shimizu (2009). "Skin atrophy in cytoplasmic SOD-deficient mice and its complete recovery using a vitamin C derivative." Biochem Biophys Res Commun **382**(2): 457-461.
184. Muramatsu, S., Y. Suga, Y. Mizuno, T. Hasegawa, S. Matsuba, Y. Hashimoto, A. Volkl, J. Seitz and H. Ogawa (2005). "Differentiation-specific localization of catalase and hydrogen peroxide, and their alterations in rat skin exposed to ultraviolet B rays." J Dermatol Sci **37**(3): 151-158.
185. Nadipelly, D. J. (2017). "Molecular Mechanisms Involved in Inflammatory Cascade: A Review." TEXILA INTERNATIONAL JOURNAL OF BASIC MEDICAL SCIENCES **2**: 1-12.
186. Nagase, H., R. Visse and G. Murphy (2006). "Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs." Cardiovascular Research **69**(3): 562-573.
187. Nahmias, Y., Y. Kramvis, L. Barbe, M. Casali, F. Berthiaume and M. L. Yarmush (2006). "A novel formulation of oxygen-carrying matrix enhances liver-specific function of cultured hepatocytes." Faseb j **20**(14): 2531-2533.
188. Naidoo, K. and M. A. Birch-Machin (2017). "Oxidative Stress and Ageing: The Influence of Environmental Pollution, Sunlight and Diet on Skin." Cosmetics **4**(1): 4.
189. Nakajima, S., L. Lan, S.-i. Kanno, M. Takao, K. Yamamoto, A. P. Eker and A. Yasui (2004). "UV light-induced DNA damage and tolerance for the survival of nucleotide excision repair-deficient human cells." Journal of Biological Chemistry **279**(45): 46674-46677.
190. Nakajima, S., Y. Miyachi and K. Kabashima (2011). "Langerhans cells are critical in the pathogenesis of atopic dermatitis via TSLP receptor signaling (103.1)." The Journal of Immunology **186**(1 Supplement): 103.101-103.101.

191. Nakamura, K., N. Izumiyama-Shimomura, M. Sawabe, T. Arai, Y. Aoyagi, M. Fujiwara, E. Tsuchiya, Y. Kobayashi, M. Kato, M. Oshimura, K. Sasajima, K. Nakachi and K. Takubo (2002). "Comparative analysis of telomere lengths and erosion with age in human epidermis and lingual epithelium." J Invest Dermatol **119**(5): 1014-1019.
192. Naylor, E. C., R. E. Watson and M. J. Sherratt (2011). "Molecular aspects of skin ageing." Maturitas **69**(3): 249-256.
193. Nguyen, D. T. and D. Keast (1991). "Energy metabolism and the skin." Int J Biochem **23**(11): 1175-1183.
194. Niehues, H., J. A. Bouwstra, A. El Ghalbzouri, J. M. Brandner, P. L. J. M. Zeeuwen and E. H. van den Bogaard (2018). "3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function." Experimental Dermatology **27**(5): 501-511.
195. Nys, K., H. Maes, G. Andrei, R. Snoeck, M. Garmyn and P. Agostinis (2012). "Skin mild hypoxia enhances killing of UVB-damaged keratinocytes through reactive oxygen species-mediated apoptosis requiring Noxa and Bim." Free Radical Biology and Medicine **52**(6): 1111-1120.
196. O'Brien, K., A. Bhatia, F. Tsen, M. Chen, A. Wong, D. Woodley and W. li (2014). "Identification of the Critical Therapeutic Entity in Secreted Hsp90 α That Promotes Wound Healing in Newly Re-Standardized Healthy and Diabetic Pig Models." PloS one **9**: e113956.
197. Ogilby, P. R. (2010). "Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun." Chemical Society Reviews **39**(8): 3181-3209.
198. Ogrin, R., P. Darzins and Z. Khalil (2005). "Age-related changes in microvascular blood flow and transcutaneous oxygen tension under basal and stimulated conditions." The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences **60**(2): 200-206.
199. Okada, K., Y. Takahashi, K. Ohnishi, O. Ishikawa and Y. Miyachi (1994). "Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin." Journal of Dermatological Science **8**(3): 183-186.
200. Oktay, Y., E. Dioum, S. Matsuzaki, K. Ding, L.-J. Yan, R. G. Haller, L. I. Szweda and J. A. Garcia (2007). "Hypoxia-inducible Factor 2 $\times$ 3b1; Regulates Expression of the Mitochondrial Aconitase Chaperone Protein Frataxin *." Journal of Biological Chemistry **282**(16): 11750-11756.

201. Otera, H. and Y. Fujiki (2012). "Pex5p imports folded tetrameric catalase by interaction with Pex13p." Traffic **13**(10): 1364-1377.
202. Ou-Yang, H., G. Stamatias, C. Saliou and N. Kollias (2004). "A Chemiluminescence Study of UVA-Induced Oxidative Stress in Human Skin In Vivo." Journal of Investigative Dermatology **122**(4): 1020-1029.
203. Oyetakin-White, P., A. Suggs, B. Koo, M. S. Matsui, D. Yarosh, K. D. Cooper and E. D. Baron (2015). "Does poor sleep quality affect skin ageing?" Clin Exp Dermatol **40**(1): 17-22.
204. Pai, V. V., P. Shukla and N. N. Kikkeri (2014). "Antioxidants in dermatology." Indian Dermatol Online J **5**(2): 210-214.
205. Papakonstantinou, E., M. Roth and G. Karakiulakis (2012). "Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging." Dermato-endocrinology **4**(3): 253-258.
206. Park, W. H. (2013). "The effects of exogenous H₂O₂ on cell death, reactive oxygen species and glutathione levels in calf pulmonary artery and human umbilical vein endothelial cells." Int J Mol Med **31**(2): 471-476.
207. Pelle, E., T. Mammone, D. Maes and K. Frenkel (2005). "Keratinocytes Act as a Source of Reactive Oxygen Species by Transferring Hydrogen Peroxide to Melanocytes." Journal of Investigative Dermatology **124**(4): 793-797.
208. Pennacchi, P. C., M. E. de Almeida, O. L. Gomes, F. Faião-Flores, M. C. de Araújo Crepaldi, M. F. Dos Santos, S. B. de Moraes Barros and S. S. Maria-Engler (2015). "Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging." Tissue Eng Part A **21**(17-18): 2417-2425.
209. Pentland, A. P. and C. L. Marcelo (1983). "Modulation of proliferation in epidermal keratinocyte cultures by lowered oxygen tension." Experimental Cell Research **145**(1): 31-43.
210. Pfeifer, G. P., Y. H. You and A. Besaratinia (2005). "Mutations induced by ultraviolet light." Mutat Res **571**(1-2): 19-31.
211. Ph, J. K. M. A. B. and D. Gabrielle (2013). "The Skin Aging Exposome." Int. J. Cosmet. Sci **35**(3): 224-232.
212. Phaniendra, A., D. B. Jestadi and L. Periyasamy (2015). "Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases." Indian J Clin Biochem **30**(1): 11-26.
213. Pierrevelcin, M., Q. Fuchs, B. Lhermitte, M. Messé, E. Guérin, N. Weingertner, S. Martin, I. Lelong-Rebel, C. Nazon, M. Dontenwill and N. Entz-Werlé (2020). "Focus

- on Hypoxia-Related Pathways in Pediatric Osteosarcomas and Their Druggability." Cells **9**(9): 1998.
214. Place, T. L., F. E. Domann and A. J. Case (2017). "Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research." Free Radic Biol Med **113**: 311-322.
 215. Poljšak, B. and R. Dahmane (2012). "Free radicals and extrinsic skin aging." Dermatol Res Pract **2012**: 135206.
 216. Poswig, A., J. Wenk, P. Brenneisen, M. Wlaschek, C. Hommel, G. Quel, K. Faisst, J. Dissemond, K. Briviba, T. Krieg and K. Scharffetter-Kochanek (1999). "Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation." J Invest Dermatol **112**(1): 13-18.
 217. Prasad, A. and P. Pospíšil (2012). "Ultraweak photon emission induced by visible light and ultraviolet A radiation via photoactivated skin chromophores: *in vivo* charge coupled device imaging." Journal of Biomedical Optics **17**(8): 085004.
 218. Premi, S., S. Wallisch, C. M. Mano, A. B. Weiner, A. Bacchiocchi, K. Wakamatsu, E. J. Bechara, R. Halaban, T. Douki and D. E. Brash (2015). "Chemical excitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure." Science **347**(6224): 842-847.
 219. Proksch, E. (2018). "pH in nature, humans and skin." J Dermatol **45**(9): 1044-1052.
 220. Proksch, E. (2018). "pH in nature, humans and skin." The Journal of Dermatology **45**(9): 1044-1052.
 221. Punnonen, K., K. Lehtola, P. Autio, U. Kiistala and M. Ahotupa (1995). "Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis *in vivo*." J Photochem Photobiol B **30**(1): 43-48.
 222. Quan, T. and G. J. Fisher (2015). "Role of Age-Associated Alterations of the Dermal Extracellular Matrix Microenvironment in Human Skin Aging: A Mini-Review." Gerontology **61**(5): 427-434.
 223. Quan, T., E. Little, H. Quan, Z. Qin, J. J. Voorhees and G. J. Fisher (2013). "Elevated matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function." J Invest Dermatol **133**(5): 1362-1366.

224. Quan, T., Z. Qin, J. J. Voorhees and G. J. Fisher (2012). "Cysteine-rich protein 61 (CCN1) mediates replicative senescence-associated aberrant collagen homeostasis in human skin fibroblasts." Journal of cellular biochemistry **113**(9): 3011-3018.
225. Rawlings, A. V. (2014). "Molecular basis for stratum corneum maturation and moisturization." Br J Dermatol **171 Suppl 3**: 19-28.
226. Régnier, M., M. J. Staquet, D. Schmitt and R. Schmidt (1997). "Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis." J Invest Dermatol **109**(4): 510-512.
227. Reichrath, J. (2007). "Vitamin D and the skin: an ancient friend, revisited." Experimental dermatology **16**(7): 618-625.
228. Reiners, J. J., Jr., M. A. Hale and A. R. Cantu (1988). "Distribution of catalase and its modulation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in murine dermis and subpopulations of keratinocytes differing in their stages of differentiation." Carcinogenesis **9**(7): 1259-1263.
229. Reiners, J. J., Jr. and T. Rupp (1989). "Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase occurs during keratinocyte differentiation: modulation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate." J Invest Dermatol **93**(1): 132-135.
230. Reiners, J. J., Jr., G. Thai, A. Pavone, T. Rupp and E. Kodari (1990). "Modulation of catalase activities in murine epidermal cells as a function of differentiation and exposure to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate." Carcinogenesis **11**(6): 957-963.
231. Rezvani, H. R., N. Ali, L. J. Nissen, G. Harfouche, H. de Verneuil, A. Taïeb and F. Mazurier (2011). "HIF-1 α in Epidermis: Oxygen Sensing, Cutaneous Angiogenesis, Cancer, and Non-Cancer Disorders." Journal of Investigative Dermatology **131**(9): 1793-1805.
232. Rezvani, H. R., M. Cario-André, C. Pain, C. Ged, H. deVerneuil and A. Taïeb (2007). "Protection of normal human reconstructed epidermis from UV by catalase overexpression." Cancer Gene Ther **14**(2): 174-186.
233. Rezvani, H. R., F. Mazurier, M. Cario-André, C. Pain, C. Ged, A. Taïeb and H. de Verneuil (2006). "Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes." J Biol Chem **281**(26): 17999-18007.
234. Rhie, G., M. H. Shin, J. Y. Seo, W. W. Choi, K. H. Cho, K. H. Kim, K. C. Park, H. C. Eun and J. H. Chung (2001). "Aging- and photoaging-dependent changes of

- enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo." J Invest Dermatol **117**(5): 1212-1217.
235. Ricard-Blum, S. and F. Ruggiero (2005). "The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane." Pathologie Biologie **53**(7): 430-442.
236. Rinnerthaler, M., J. Bischof, M. K. Streubel, A. Trost and K. Richter (2015). "Oxidative stress in aging human skin." Biomolecules **5**(2): 545-589.
237. Roig-Rosello, E. and P. Rousselle (2020). "The Human Epidermal Basement Membrane: A Shaped and Cell Instructive Platform That Aging Slowly Alters." Biomolecules **10**(12): 1607.
238. Ross, C., M. Alston, J. R. Bickenbach and N. Aykin-Burns (2011). "Oxygen tension changes the rate of migration of human skin keratinocytes in an age-related manner." Exp Dermatol **20**(1): 58-63.
239. Russell, D., H. Ross and E. B. Lane (2010). "ERK involvement in resistance to apoptosis in keratinocytes with mutant keratin." Journal of investigative dermatology **130**(3): 671-681.
240. SAGUET, T. (2006). "intrinsèque et extrinsèque de la peau: propriétés mécaniques et défenses anti oxydantes." Prix A'Doc de la jeune recherche en Franche-Comté: 2006: 17.
241. Salameh, S., N. Tissot, K. Cache, J. Lima, I. Suzuki, P. A. Marinho, M. Rielland, J. Soeur and S. Takeuchi (2021). "A perfusable vascularized full-thickness skin model for potential topical and systemic applications." **13**(3).
242. Sander, C. S., H. Chang, S. Salzmann, C. S. L. Müller, S. Ekanayake-Mudiyanselage, P. Elsner and J. J. Thiele (2002). "Photoaging is Associated with Protein Oxidation in Human Skin In Vivo." Journal of Investigative Dermatology **118**(4): 618-625.
243. Schäfer, M., H. Farwanah, A.-H. Willrodt, A. J. Huebner, K. Sandhoff, D. Roop, D. Hohl, W. Bloch and S. Werner (2012). "Nrf2 links epidermal barrier function with antioxidant defense." EMBO molecular medicine **4**(5): 364-379.
244. Scheid, A., R. Wenger, L. Schäffer, I. Camenisch, O. Distler, A. Ferenc, H. Cristina, H. Ryan, R. Johnson, K. Wagner, U. Stauffer, C. Bauer, M. Gassmann and M. Meuli (2002). "Physiologically low oxygen concentrations in fetal skin regulate hypoxia-inducible factor 1 and transforming growth factor-beta3." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **16**: 411-413.

245. Schepers, R. J. and M. Ringkamp (2009). "Thermoreceptors and thermosensitive afferents." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **33**(3): 205-212.
246. Schmidt, E. and D. Zillikens (2013). "Pemphigoid diseases." The Lancet **381**(9863): 320-332.
247. Schröder, J.-M. and J. Harder (2006). "Peptides antimicrobiens naturels cutanés." Med Sci (Paris) **22**(2): 153-157.
248. Scioli, M. G., A. Bielli, G. Arcuri, A. Ferlosio and A. Orlandi (2014). "Ageing and microvasculature." Vasc Cell **6**: 19.
249. Ségal-Bendirdjian, E. and V. Geli (2019). "Non-canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbrolio." Front Cell Dev Biol **7**: 332.
250. Semenza, G. L. (2007). "Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Pathway." Science's STKE **2007**(407): cm8-cm8.
251. Semenza, G. L. (2009). "Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." Physiology (Bethesda) **24**: 97-106.
252. Sengupta, A., U. F. Lichti, B. A. Carlson, C. Cataisson, A. O. Ryscavage, C. Mikulec, M. Conrad, S. M. Fischer, D. L. Hatfield and S. H. Yuspa (2013). "Targeted disruption of glutathione peroxidase 4 in mouse skin epithelial cells impairs postnatal hair follicle morphogenesis that is partially rescued through inhibition of COX-2." J Invest Dermatol **133**(7): 1731-1741.
253. Sgarbi, G., G. Gorini, A. Costanzini, S. Barbato, G. Solaini and A. Baracca (2017). "Hypoxia decreases ROS level in human fibroblasts." Int J Biochem Cell Biol **88**: 133-144.
254. Shaulian, E. and M. Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." Nat Cell Biol **4**(5): E131-136.
255. Shih, C.-P., J.-T. Lee, H.-K. Chen, Y.-C. Lin, H.-C. Chen, Y.-Y. Lin, C.-Y. Kuo, Y.-T. Chen and C.-H. Wang (2018). "Comparison of changes in mitochondrial bioenergetics between keratinocytes in human external auditory canal skin and cholesteatomas from normoxia to hypoxia." Scientific Reports **8**(1): 125.
256. Shih, C. P., J. T. Lee, H. K. Chen, Y. C. Lin, H. C. Chen, Y. Y. Lin, C. Y. Kuo, Y. T. Chen and C. H. Wang (2018). "Comparison of changes in mitochondrial bioenergetics between keratinocytes in human external auditory canal skin and cholesteatomas from normoxia to hypoxia." Sci Rep **8**(1): 125.

257. Shin, D.-Y., X. Huang, C.-H. Gil, A. Aljoufi, J. Ropa and H. E. Broxmeyer (2020). "Physioxia enhances T-cell development ex vivo from human hematopoietic stem and progenitor cells." STEM CELLS **38**(11): 1454-1466.
258. Shindo, Y., E. Witt, D. Han, W. Epstein and L. Packer (1994). "Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin." J Invest Dermatol **102**(1): 122-124.
259. Shindo, Y., E. Witt and L. Packer (1993). "Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light." J Invest Dermatol **100**(3): 260-265.
260. Son, J., E. Sarsour, A. Balaraju, J. Fussell, A. Kalen, B. Wagner, G. Buettner and P. Goswami (2017). "Mitofusin 1 and optic atrophy 1 shift metabolism to mitochondrial respiration during aging." Aging Cell **16**.
261. Sreedhar, A., L. Aguilera-Aguirre and K. K. Singh (2020). "Mitochondria in skin health, aging, and disease." Cell Death Dis **11**(6): 444.
262. Srivastava, A., M. Karlsson, C. Marionnet, F. Bernerd, A. Gueniche, C. E. I. Rawadi, M. Ståhle, E. Sonkoly, L. Breton and A. Pivarsci (2018). "Identification of chronological and photoageing-associated microRNAs in human skin." Scientific Reports **8**(1): 12990.
263. Stücker, M., A. Struk, P. Altmeyer, M. Herde, H. Baumgärtl and D. W. Lübbers (2002). "The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis." J Physiol **538**(Pt 3): 985-994.
264. Suram, A., J. Kaplunov, P. L. Patel, H. Ruan, A. Cerutti, V. Boccardi, M. Fumagalli, R. Di Micco, N. Mirani, R. L. Gurung, M. P. Hande, F. d'Adda di Fagagna and U. Herbig (2012). "Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions." Embo j **31**(13): 2839-2851.
265. Syed, D. N., F. Afaq and H. Mukhtar (2012). "Differential activation of signaling pathways by UVA and UVB radiation in normal human epidermal keratinocytes." Photochemistry and photobiology **88**(5): 1184-1190.
266. Taguchi, K. and M. Yamamoto (2017). "The KEAP1-NRF2 System in Cancer." Front Oncol **7**: 85.
267. Tahara, E. B., F. D. Navarete and A. J. Kowaltowski (2009). "Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation." Free Radic Biol Med **46**(9): 1283-1297.

268. Tahara, S., M. Matsuo and T. Kaneko (2001). "Age-related changes in oxidative damage to lipids and DNA in rat skin." Mech Ageing Dev **122**(4): 415-426.
269. Tewari, A., K. Grys, J. Kollet, R. Sarkany and A. R. Young (2014). "Upregulation of MMP12 and Its Activity by UVA1 in Human Skin: Potential Implications for Photoaging." Journal of Investigative Dermatology **134**(10): 2598-2609.
270. Thiele, J. J., C. Schroeter, S. N. Hsieh, M. Podda and L. Packer (2001). "The antioxidant network of the stratum corneum." Curr Probl Dermatol **29**: 26-42.
271. Tian, R., Y. Geng, Y. Yang, I. Seim and G. Yang (2021). "Oxidative stress drives divergent evolution of the glutathione peroxidase (GPX) gene family in mammals." Integr Zool **16**(5): 696-711.
272. Tigges, J., J. Krutmann, E. Fritsche, J. Haendeler, H. Schaal, J. W. Fischer, F. Kalfalah, H. Reinke, G. Reifenberger, K. Stühler, N. Ventura, S. Gundermann, P. Boukamp and F. Boege (2014). "The hallmarks of fibroblast ageing." Mech Ageing Dev **138**: 26-44.
273. Timpano, S., B. D. Guild, E. J. Specker, G. Melanson, P. J. Medeiros, S. L. J. Sproul and J. Uniacke (2019). "Physioxic human cell culture improves viability, metabolism, and mitochondrial morphology while reducing DNA damage." The FASEB Journal **33**(4): 5716-5728.
274. Timpano, S. and J. Uniacke (2016). "Human Cells Cultured under Physiological Oxygen Utilize Two Cap-binding Proteins to recruit Distinct mRNAs for Translation." The Journal of biological chemistry **291**(20): 10772-10782.
275. Todo, H. (2017). "Transdermal Permeation of Drugs in Various Animal Species." Pharmaceutics **9**.
276. Treiber, N., P. Maity, K. Singh, F. Ferchiu, M. Wlaschek and K. Scharffetter-Kochanek (2012). "The role of manganese superoxide dismutase in skin aging." Dermato-endocrinology **4**(3): 232-235.
277. Tremblay, P.-L., V. Hudon, F. Berthod, L. Germain and F. A. Auger (2005). "Inosculation of Tissue-Engineered Capillaries with the Host's Vasculature in a Reconstructed Skin Transplanted on Mice." American Journal of Transplantation **5**(5): 1002-1010.
278. Trifunovic, A., A. Wredenberg, M. Falkenberg, J. N. Spelbrink, A. T. Rovio, C. E. Bruder, Y. M. Bohlooly, S. Gidlöf, A. Oldfors, R. Wibom, J. Törnell, H. T. Jacobs

- and N. G. Larsson (2004). "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase." Nature **429**(6990): 417-423.
279. Tsang, C. K., Y. Liu, J. Thomas, Y. Zhang and X. F. Zheng (2014). "Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance." Nat Commun **5**: 3446.
280. Tu, B. P. and J. S. Weissman (2004). "Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences." J Cell Biol **164**(3): 341-346.
281. Tulah, A. S. and M. A. Birch-Machin (2013). "Stressed out mitochondria: the role of mitochondria in ageing and cancer focussing on strategies and opportunities in human skin." Mitochondrion **13**(5): 444-453.
282. Uniacke, J., C. E. Holterman, G. Lachance, A. Franovic, M. D. Jacob, M. R. Fabian, J. Payette, M. Holcik, A. Pause and S. Lee (2012). "An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery." Nature **486**(7401): 126-129.
283. Upton, J. H., R. F. Hannen, A. W. Bahta, N. Farjo, B. Farjo and M. P. Philpott (2015). "Oxidative stress-associated senescence in dermal papilla cells of men with androgenetic alopecia." J Invest Dermatol **135**(5): 1244-1252.
284. Valacchi, G., C. Sticozzi, A. Pecorelli, F. Cervellati, C. Cervellati and E. Maioli (2012). "Cutaneous responses to environmental stressors." Annals of the New York Academy of Sciences **1271**(1): 75-81.
285. Van Agtmael, T. and L. Bruckner-Tuderman (2010). "Basement membranes and human disease." Cell Tissue Res **339**(1): 167-188.
286. van der Vliet, A. (2015). Chapter 25 - Antioxidant Defenses in the Lung. Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition). R. A. Parent. San Diego, Academic Press: 489-507.
287. Varani, J., M. K. Dame, L. Rittie, S. E. G. Fligel, S. Kang, G. J. Fisher and J. J. Voorhees (2006). "Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation." The American journal of pathology **168**(6): 1861-1868.
288. Varikasuvu, S. R., S. Aloori, S. Varshney and A. V. Bhongir (2021). "Decreased circulatory levels of Vitamin D in Vitiligo: a meta-analysis." Anais Brasileiros de Dermatologia **96**(3): 284-294.
289. Varkey, M., J. Ding and E. E. Tredget (2013). "Superficial Dermal Fibroblasts Enhance Basement Membrane and Epidermal Barrier Formation in Tissue-Engineered

- Skin: Implications for Treatment of Skin Basement Membrane Disorders." Tissue Engineering Part A **20**(3-4): 540-552.
290. Velarde, M., J. Flynn, N. Day, S. Melov and J. Campisi (2012). "Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin." Aging **4**: 3-12.
291. Velarde, M. C., J. M. Flynn, N. U. Day, S. Melov and J. Campisi (2012). "Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin." Aging (Albany NY) **4**(1): 3-12.
292. Verdier-Sévrain, S. and F. Bonté (2007). "Skin hydration: a review on its molecular mechanisms." J Cosmet Dermatol **6**(2): 75-82.
293. Victorelli, S., A. Lagnado, J. Halim, W. Moore, D. Talbot, K. Barrett, J. Chapman, J. Birch, M. Ogrodnik, A. Meves, J. S. Pawlikowski, D. Jurk, P. D. Adams, D. van Heemst, M. Beekman, P. E. Slagboom, D. A. Gunn and J. F. Passos (2019). "Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction." The EMBO Journal **38**(23): e101982.
294. Vierkötter, A., T. Schikowski, U. Ranft, D. Sugiri, M. Matsui, U. Krämer and J. Krutmann (2010). "Airborne particle exposure and extrinsic skin aging." J Invest Dermatol **130**(12): 2719-2726.
295. Voet, D., J. G. Voet and C. W. Pratt (2016). Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level, John Wiley & Sons.
296. Waaijer, M. E., D. A. Gunn, P. D. Adams, J. S. Pawlikowski, C. E. Griffiths, D. van Heemst, P. E. Slagboom, R. G. Westendorp and A. B. Maier (2016). "P16INK4a Positive Cells in Human Skin Are Indicative of Local Elastic Fiber Morphology, Facial Wrinkling, and Perceived Age." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **71**(8): 1022-1028.
297. Wang, W., C. P. Winlove and C. C. Michel (2003). "Oxygen partial pressure in outer layers of skin of human finger nail folds." J Physiol **549**(Pt 3): 855-863.
298. Wang, Y., R. Xu, W. He, Z. Yao, H. Li, J. Zhou, J. Tan, S. Yang, R. Zhan, G. Luo and J. Wu (2015). "Three-Dimensional Histological Structures of the Human Dermis." Tissue Eng Part C Methods **21**(9): 932-944.
299. Weidmann, C., J. Pomerleau, L. Trudel-Vandal and S. Landreville (2017). "Differential responses of choroidal melanocytes and uveal melanoma cells to low oxygen conditions." Molecular vision **23**: 103-115.

300. Wenger, R. H., V. Kurtcuoglu, C. C. Scholz, H. H. Marti and D. Hoogewijs (2015). "Frequently asked questions in hypoxia research." Hypoxia (Auckland, N.Z.) **3**: 35-43.
301. Wild, C. P. (2005). "Complementing the Genome with an "Exposome": The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology." Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention **14**(8): 1847-1850.
302. Wölflle, U., G. Seelinger, G. Bauer, M. C. Meinke, J. Lademann and C. M. Schempp (2014). "Reactive Molecule Species and Antioxidative Mechanisms in Normal Skin and Skin Aging." Skin Pharmacology and Physiology **27**(6): 316-332.
303. Xu, F., S. Yan, M. Wu, F. Li, X. Xu, W. Song, J. Zhao, J. Xu and H. Kan (2011). "Ambient ozone pollution as a risk factor for skin disorders." Br J Dermatol **165**(1): 224-225.
304. Xu, Y.-P., R.-Q. Qi, W.-B. Chen, Y.-L. Shi, Z.-Z. Cui, X.-H. Gao, H.-D. Chen, L. Zhou and Q.-S. Mi (2012). "Aging affects epidermal Langerhans cell development and function and alters their miRNA gene expression profile." Aging (Albany NY) **4**(11): 742.
305. Yaar, M., M. S. Eller and B. A. Gilchrest (2002). "Fifty years of skin aging." J Investig Dermatol Symp Proc **7**(1): 51-58.
306. Yamada, T., S. Hasegawa, K. Miyachi, Y. Date, Y. Inoue, A. Yagami, M. Arima, Y. Iwata, N. Yamamoto, S. Nakata, K. Matsunaga, K. Sugiura and H. Akamatsu (2018). "Laminin-332 regulates differentiation of human interfollicular epidermal stem cells." Mech Ageing Dev **171**: 37-46.
307. Yang, S. L., C. Wu, Z. F. Xiong and X. Fang (2015). "Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review)." Mol Med Rep **12**(2): 2411-2416.
308. Yang, T. and B. W. Poovaiah (2002). "Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(6): 4097-4102.
309. Young, I. S. and J. V. Woodside (2001). "Antioxidants in health and disease." J Clin Pathol **54**(3): 176-186.
310. Zeeshan, H. M. A., G. H. Lee, H.-R. Kim and H.-J. Chae (2016). "Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS." International journal of molecular sciences **17**(3): 327-327.

311. Zhang, P., Q. Yao, L. Lu, Y. Li, P.-J. Chen and C. Duan (2014). "Hypoxia-Inducible Factor 3 Is an Oxygen-Dependent Transcription Activator and Regulates a Distinct Transcriptional Response to Hypoxia." Cell Reports **6**(6): 1110-1121.
312. Zhong, J. L., G. P. Edwards, C. Raval, H. Li and R. M. Tyrrell (2010). "The role of Nrf2 in ultraviolet A mediated heme oxygenase 1 induction in human skin fibroblasts." Photochem Photobiol Sci **9**(1): 18-24.
313. Ziboh, V., C. Miller and Y. H. Cho (2000). "Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: Generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites." The American journal of clinical nutrition **71**: 361S-366S.
314. Zouboulis, C. C., J. Adjaye, H. Akamatsu, G. Moe-Behrens and C. Niemann (2008). "Human skin stem cells and the ageing process." Exp Gerontol **43**(11): 986-997.
315. Beckhauser, T.F., Francis-Oliveira, J., and De Pasquale, R. (2016). Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity. Journal of experimental neuroscience **10**, 23-48.
316. Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological reviews **82**, 47-95.
317. Dyring-Andersen, B., Løvendorf, M.B., Coscia, F., Santos, A., Møller, L.B.P., Colaço, A.R., Niu, L., Bzorek, M., Doll, S., Andersen, J.L., *et al.* (2020). Spatially and cell-type resolved quantitative proteomic atlas of healthy human skin. Nature Communications **11**, 5587.

Annexes

Annexe 1 : Contributions scientifiques

Publications

Giovanni Busco, Robert Eric, Nadira Chettouh-Hammas, Jean-Michel Pouvesle, Catherine Grillon. The emerging potential of cold atmospheric plasma in skin biology. Free Radical Biology and Medicine, Elsevier, 2020, 161, pp.290-304.

Revue publiée, en annexe 2

J'ai contribué à cette revue sur la partie qui porte sur les ROS et le stress oxydant

Nadira Chettouh-Hammas, Fabienne Fasani, Amandine Boileau, Giovanni Busco, David Gosset, Catherine Grillon. Improvement of antioxidant defense in keratinocytes maintained in physioxia: comparison of 2D and 3D models.

Article à soumettre en juin/juillet dans le journal Free Radical Biology and Medicine

Nadira Chettouh-Hammas, Fabienne Fasani, Amandine Boileau, David Gosset, Giovanni Busco, Zeineb Maaroufi, Catherine Grillon. Physioxia induces changes in the antioxidant response of keratinocytes in 2D or 3D models upon UV irradiation.

Article en cours de préparation

Communications Orales

Congrès internationaux :

Nadira Chettouh Hammas, Giovanni BUSCO, Fabienne FASANI, Catherine GRILLON. Study of oxidative stress under the real conditions of skin oxygenation, physioxia. Symposium international de la SFC « peau & âge », Paris, France, décembre 2019.

Communication orale et poster

Nadira Chettouh Hammas, Giovanni BUSCO, Fabienne FASANI, Catherine GRILLON. Study of oxidative stress under the true oxygenation of the skin, physioxia. Congrès international Oxidative stress Reduction, Redox Homeostasis and antioxidants, Congrès virtuel, octobre 2021.

Communication orale de 10 min.

Nadira CHETTOUH HAMMAS, Giovanni BUSCO, Fabienne FASANI, Catherine GRILLON. Study of oxidative stress under the true oxygenation of the skin, physioxia. Congrès international Skin ageing and challenges, Congrès virtuel, novembre 2021. Communication orale de 10 min.

Catherine Grillon, Nadira Hammas-Chettouh, Loick Ridou, Shalina Hassanaly, Fabienne Fasani, Giovanni Busco. Skin physioxia as a new parameter to improve in vitro skin models. Le Studium Conference: Skin Models in Cosmetic Science: Bridging Established Methods and Novel Technologies. Tours, 2-4 décembre 2019. Communications internationales (associée)

Catherine Grillon, Nadira Hammas-Chettouh, Loick Ridou, Fabienne Fasani, Giovanni Busco. New reconstructed epidermis models closer to skin physiology. Le Studium conference: Skin Models in Cosmetic Science: Bridging Established Methods and Novel Technologies, 2nd meeting. 7-8 April 2022, on line Communications internationales (associée)

Congrès nationaux :

Nadira CHETTOUH HAMMAS, Giovanni BUSCO, Fabienne FASANI, Catherine GRILLON. Study of oxidative stress under the real conditions of skin oxygenation, physioxia. 32^{ème} colloque Biotechnocentre, Seillac, France, octobre 2019. Pitch et poster

Nadira CHETTOUH HAMMAS, Giovanni BUSCO, Fabienne FASANI, Catherine GRILLON. Rôle du taux d'oxygénation sur l'activité antioxydante des cellules épidermiques. Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (CARD), Namur, Belgique. Communication orale 30 juin 2022 (à venir)

Annexe 2 : contributions à la formation

Encadrement de lycéens (Projet Edifice) 2018-2020

Durant ma thèse, j'ai participé au programme Edifice, qui est une collaboration entre les laboratoires de recherche et les lycées de l'académie d'Orléans-Tours. Le but de ce dispositif est d'accompagner les élèves, de seconde à terminale, sur une partie d'un projet de thèse qui leur permettra de découvrir le monde professionnel et de les aider dans leur orientation. Dans mon cas, j'ai encadré deux groupes (terminales et secondes) (96 heures) :

- 1) Le premier groupe de 5 élèves durant une semaine : nous avons réalisé des optimisations d'anticorps des antioxydants avec la technique de western blot.
- 2) Le deuxième groupe de 5 élèves : je les ai encadrés durant 2 ans (2 x 1/2 journée par mois). Nous avons étudié le facteur de transcription Nrf2 dans les cellules HaCat en physioxie avec différentes techniques (WB, Immunomarquage, qPCR). Durant ces deux années, ils ont présenté leurs résultats à plusieurs reprises :
 - Poster : Nrf2 dans le modèle de photovieillissement en physioxie
 - Communication orale : Rôle de l'oxygénation dans le photovieillissement cutané
 - Tournage d'une vidéo sur le projet et participation aux Olympiades de biologie 2020 <https://youtu.be/kcCKMb2JCKg>

Encadrement des TP de Master 2 (3 jours) Janvier 2022

MASTER Chimie moléculaire - Parcours Bioactifs et Cosmétique

TP sur Biologie et physiologie de la peau

Annexe 3 : Revue

The emerging potential of cold atmospheric plasma in skin biology. Free Radical Biology and Medicine



Review Article

The emerging potential of cold atmospheric plasma in skin biology

Giovanni Busco^{a,b,*}, Eric Robert^b, Nadira Chettouh-Hammas^a, Jean-Michel Pouvesle^b, Catherine Grillon^{a,**}^a Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, CNRS, 45071, Orléans, France^b Groupe de Recherches sur l'Énergie des Milieux Ionisés, UMR 7344, Université d'Orléans/CNRS, 45067, Orléans, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Skin
Cold atmospheric plasma
RONS
Aging
Dermatology
Cosmetics

ABSTRACT

The maintenance of skin integrity is crucial to ensure the physiological barrier against exogenous compounds, microorganisms and dehydration but also to fulfill social and aesthetic purposes. Besides the development of new actives intended to enter a formulation, innovative technologies based on physical principles have been proposed in the last years. Among them, Cold Atmospheric Plasma (CAP) technology, which already showed interesting results in dermatology, is currently being studied for its potential in skin treatments and cares. CAP bio-medical studies gather several different expertise ranging from physics to biology through chemistry and biochemistry, making this topic hard to pin. In this review we provide a broad survey of the interactions between CAP and skin. In the first section, we tried to give some fundamentals on skin structure and physiology, related to its essential functions, together with the main bases on cold plasma and its physicochemical properties. In the following parts we dissected and analyzed each CAP parameter to highlight the already known and the possible effects they can play on skin. This overview aims to get an idea of the potential of cold atmospheric plasma technology in skin biology for the future developments of dermo-cosmetic treatments, for example in aging prevention.

1. Introduction

The skin is the largest organ of the human body and ensures several distinct functions because of its particular position, in connection between the outside and the inside of the body. This keratinized tegument envelops the whole body and protects it from environmental aggressions and from massive water loss [1]. Although the physical barrier against environmental and pathogen insults is the main role of this organ, the skin possesses several other functions such as vitamin D production [2], humidity, temperature and mechanical sensing [3–5], temperature regulation [6], molecule absorption [7], excretion and secretion [8–11] and some immunological functions [12]. In view of the above, daily cares of this organ are necessary to preserve its integrity and functions. Skin care practices are not only needed for the whole body health but also for social and aesthetic purposes. Cosmetic skin care was practiced from the dawn of time by the ancient civilizations. In the 21st century, with the increase of span life, people from all walks of life ask to live healthy and look younger. Consequently, the global consumer demand of cosmetic products is rapidly expanding today. In 2018, the value of the global cosmetics market was 508 billion U.S. dollars. The market is

projected to value at about 758 billion U.S. dollars by 2025 [13]. Modern skin treatment-offer ranges from chemical product application to physical treatments. Among the treatments, creams, sera and oils are commonly used as at-home beauty treatments while skin peeling treatments are often administered by professional beauticians. Physical treatments are also administered in beauty centers although today some devices can be bought for domestic use. Among them, LED lights and lasers are often used for rejuvenation purposes. These light sources stimulate skin renewal by physically removing the external layers of the skin (resurfacing) thus activating skin cell metabolism [14,15]. For a deeper skin rejuvenation, more invasive and expensive techniques such as aesthetic surgery are required. Currently, a physicochemical approach, based on ionized gases, is joining the skin non-surgical treatments. This technology, named Cold Atmospheric Plasma (CAP), was already used in dermatology to promote wound healing. Today, CAP is entering into the cosmetic field, thus providing a new challenge. In reason of their unique ability to generate a complex chemical mix and thanks to their physical properties, CAPs could be a promising alternative in non-invasive treatment of skin. However, the scientific bases of cold plasma effects on skin and the identification of their exact

* Corresponding author. Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301, CNRS, 45071, Orléans, France.

** Corresponding author.

E-mail addresses: giovanni.busco@cnrs-orleans.fr (G. Busco), catherine.grillon@cnrs-orleans.fr (C. Grillon).<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.004>

Received 10 July 2020; Received in revised form 18 September 2020; Accepted 5 October 2020

Available online 8 October 2020

0891-5849/© 2020 The Authors.

Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

mechanisms of action, both at the cellular and at the molecular levels, are still lacking and they constitute a new active field of investigation.

In the present review, based on skin fundamental notions and on chemo-physical properties of plasmas, we described the possible beneficial interactions between CAPs and skin and how they could participate in improving skin wellness and regeneration.

2. Fundamentals on skin and its microenvironment

To understand how CAP could be used for skin treatments, it is important to take into consideration all skin parameters contributing to skin health that could be potentially modified by plasma treatment.

2.1. Skin structure

The skin covers and isolates the whole body. In humans its thickness can vary from 0.5 to 4 mm. Skin thickness strictly correlates with the collagen content of the dermis and it is gender dependent [16]. The different cell types composing the skin form a complex structure that can be divided in three main layers: the epidermis, the dermis and the hypodermis (Fig. 1). The epidermis is the layer that takes contact directly with the external environment. Its thickness can change at the different body sites and it is also age, gender and phototype dependent [17,18]. The epidermis (Fig. 1A) is mainly made up of keratinocytes and melanocytes, these latter confer the typical color tone of the skin. Some other cells can be found in this part of the skin, the immune system Langerhans cells and the mechanosensors Merkel cells. Human epidermis can be further divided in four or five functional layers. The deeper layer of the epidermis is called *stratum basale* or *germinativum* and is made of non-differentiated keratinocytes, melanocytes and Merkel cells laying on the basal lamina (*lamina basalis*). The presence of keratinocyte stem cells permit the epidermis turnover [19–21]. Once divided, one of the keratinocyte daughter cells moves and differentiates toward the upper layers of the epidermis forming, in sequence, the *strata spinosum*, *granulosum*, *lucidum* (found only in the palms of the hands and soles of the feet) and the *corneum*. Epidermis in healthy and young humans forms digitations that penetrate the dermis (papillary dermis). The epidermis is separated from the dermis thanks to a thin layer of extracellular matrix called basal lamina. This latter is mainly made up of collagen IV,

laminins and glycosaminoglycans (GAGs) and ensures the mechanical link between the basal layer of the epidermis and the underlying connective tissue, the dermis. This middle layer between the epidermis and the hypodermis (Fig. 1B), is made up of a network of fibrillar proteins, collagens, elastin and an amorphous ground substance rich in GAGs such as dermatan sulfate and hyaluronic acid. These negatively charged macromolecules attract water molecules keeping the skin hydrated. Few cell types can be found in the dermis, essentially papillary and reticular fibroblasts with some mast cells. The dermis possesses a sensitivity to mechanic stimuli thanks to the presence of mechanosensors such as the Ruffini's, Meissner's and Pacini corpuscles. The hypodermis is the third deeper layer of the skin. It is an adipose tissue made up of fibroblasts, adipose cells and macrophages. The main function of this tissue is to store fat for thermal insulation and as a source of energy. Besides its three horizontal layers, mammalian skin possesses typical appendages crossing this structure. During the embryogenesis some cells of the ectoderm forming the epidermis invaginate into the dermis creating cutaneous annexes like hair follicles, nails, sweat and sebaceous glands (Fig. 1).

The skin possesses a heterogeneous vascularization (Fig. 1). Vessels coming from the hypodermis enter the dermis and form the deep vascular plexus in the reticular dermis, supplying nutrients and oxygen to hair bulbs and glands. The whole dermis layer is vascularized thanks to the ascending arterioles and descending collecting venules coming from the deeper layers of the skin. In the upper dermis, these vessels form the superficial vascular plexus from which originate the capillary loops extending in dermal papilla [22]. Unlike the other cutaneous layers the epidermis is not vascularized at all.

2.2. Skin oxygenation and antioxidant status

A consequence of the typical skin vascularization is a non-uniform oxygenation. Indeed oxygen diffuses inside the skin from two sources: the atmosphere (21% O₂) and the blood stream circulating in the dermis (5–9% O₂) [23,24]. This results in two oxygen gradients that reach a point of minimum (1–3% O₂) at the basal lamina where keratinocytes stem cells reside (Fig. 1D). Although oxygen has a vital importance for aerobic cells, during the respiratory metabolism a small part of this diatomic molecule is converted in reactive oxygen species (ROS). While

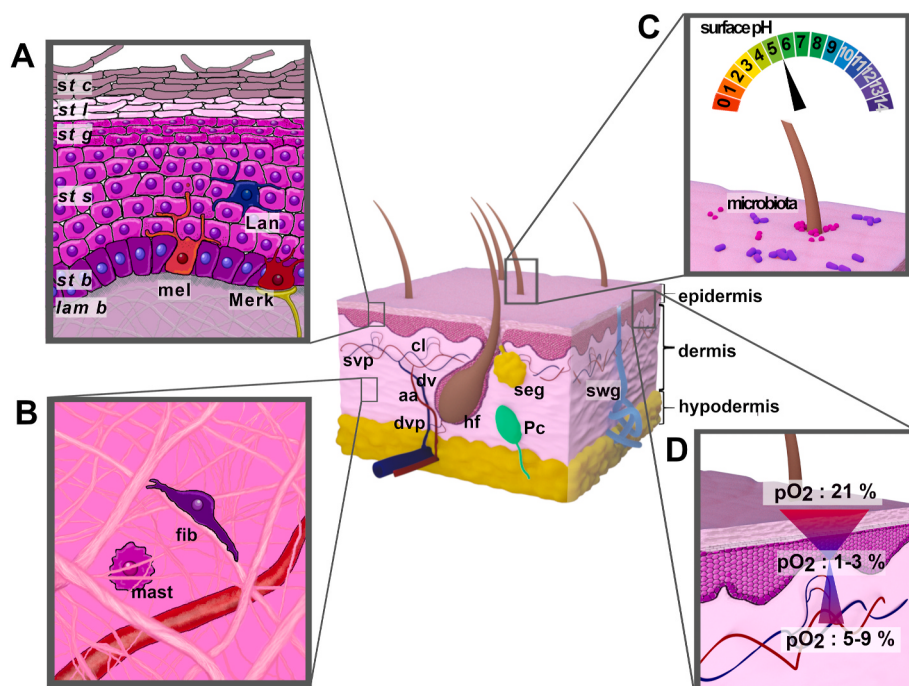


Fig. 1. The skin and its microenvironment. In the middle, the 3D structure of the whole skin with its vascular system: superficial vascular plexus (svp), capillary loops (cl), ascending arteriole (aa), descending collecting venule (dv), deep vascular plexus (dvp). Typical skin appendages: hair and hair follicles (hf) with the associated sebaceous gland (seg) and a sweat gland (swg). Sensory organs such as the Pacini corpuscle (Pc) permit to feel the external stimuli. A) Keratinocytes forming the epidermis layers: *stratum corneum* (st c), *stratum lucidum* (st l) only present in the palms of the hands and soles of the feet, *stratum granulosum* (st g), *stratum spinosum* (st s) and *stratum basale* (st b). The epidermis is separated from the dermis by the *lamina basalis* (lam b). Some other cell types found in this epidermis: melanocytes (mel), Langerhans cells (Lan) and Merkel cells (Merk). B) The vascularized dermis layer made up of extracellular matrix fibers and few cell types such as: fibroblasts (fib) and mast cell (mast). C) The acidic surface of the skin and the associated microbiota living on the *stratum corneum* and inside the hair follicles. D) Skin oxygenation with the two gradients created by oxygen coming on one side from the atmosphere and on the other side from dermis blood vessels.

in low doses ROS play an essential role in cell signaling and in the maintaining of cell homeostasis, in case of overproduction, these free radicals can induce the so-called oxidative stress [25]. Being exposed to different percentage of oxygen, the different skin layers are likely to possess a different sensitivity to oxidative stress. However, to avoid ROS-induced damages, skin cells are able to eliminate the excess of these reactive species keeping their concentration at a physiological level. This task is performed by the antioxidant system that is made up of both small molecules and enzymes such as glutathione peroxidases, catalase and superoxide dismutases allowing the conversion of ROS into harmless molecules [26].

2.3. Skin surface and its physiological pH

A healthy epidermis is relatively acidic. Its outer layer, the *stratum corneum*, possesses an “acidic mantle” that confers it a pH ranging between 4 and 6 (Fig. 1C). Keeping an acidic pH fulfills several physiological roles [27]. At birth, the skin is exposed to a non-sterile environment and it is rapidly colonized by microorganism. The acidic mantle inhibits the growth of pathogen microorganisms and promotes the growth of the physiological microflora [28]. The acidic mantle is generated thanks to endogenous factors but also to exogenous ones such as bacteria. Among the endogenous factors, the relatively-low pH seems to be induced by the generation of urocanic acid [29], and free fatty acids [30]. The maintaining of this acidic mantle seems to be due to the activity of the sodium-proton exchanger (NHE1) [31]. The low pH contributes also to preserve the skin barrier. Indeed, *stratum corneum* enzymes, involved in the synthesis of the ceramide barrier, possess an optimal activity at acidic pH [32]. In addition, a dysregulated acidic mantle can have a negative impact on the skin barrier [33]. Moreover, a high pH of the *stratum corneum* is correlated with skin pathologies such as atopic dermatitis [34,35]. To keep the pH at physiological values, the skin possesses its own buffering system permitting to avoid rapid pH variations induced by external insults [36].

2.4. The skin as a semipermeable barrier of the body

As already described, the *stratum corneum* creates a protective, semipermeable barrier [37–41]. The first representation of the *stratum corneum* was made in 1975 by Michaels and collaborators who simplistically described the outer layer of the skin as a *brick and mortar like structure* [42]. Although the skin isolates and protects the body from external aggressions, this cornified organ is not a sealed barrier. Skin actively communicates and interacts with the external environment. The organ can expel, in a controlled way, water containing organic and inorganic molecules but can also absorb exogenous compounds from the environment. Molecules can penetrate the skin in three ways: through the cells (intracellular way), via the inter-cellular space (intercellular way) or through the skin pores, glands and hair follicles (trans-appendageal way) [43]. In order to understand how molecules can enter the skin, several models have been proposed. In 1992, Auton tried to construct a mathematical model of skin penetration considering either diffusion or metabolism of the compound passing through the skin layers [44]. He considered two main barriers in his skin model 1) the external barrier of the skin, the *stratum corneum* - this physical barrier lets lipophilic compound to pass more easily than hydrophilic molecules -, 2) the second barrier made up of living cells in the epidermis and the dermis where exogenous molecules are subjected to enzymes such as esterase and oxygenase. In 2001 a more complex model, called “single gel phase” was proposed by Norlén and colleagues to describe the *stratum corneum* of the skin [45]. This model is in accordance with the Michaels’ “brick and mortar” one. Other approaches, focused on how different chemical compounds can penetrate the *stratum corneum*, were developed by Trommer and Neubert [46]. Mathematical models of skin permeability have been summarized in a complete review by Mitragotri and collaborators [47].

2.5. The skin microbiota

Thanks to the previously described structure, the skin possesses a unique and complex microenvironment. Because of the low water content of the *stratum corneum*, the low physiological pH, lysozyme and RNase production, skin is a poor substrate for microbial colonization. However, even in healthy conditions, the skin is the host of commensal or symbiotic bacteria [48] at the epidermal but also at the dermal level [49]. After birth, the skin is directly exposed to environmental microorganisms and rapidly colonized by some of them leading to a balance that is unique to each individual. In adults, considering the skin appendages such as follicles and sebaceous glands, the total exposed surface is estimated to be 30 m². This makes our external organ the largest epithelial surface for interacting with microorganisms [50]. Different types of microorganisms can be found in different sites of the skin, depending on humidity, sweat production and local temperature. Commensal bacteria not only protect skin from pathogen bacteria colonization, avoiding thus skin diseases, but play also a symbiotic role with this organ [51,52] that is currently under investigation [53,54].

2.6. Skin homeostasis and aging

The whole skin wellness resides on the physiological equilibrium of all the mentioned biochemical, bio-physical and symbiotic parameters. Although the skin is a powerful organ able to rapidly regenerate, the continuous biological, chemical and physical aggressions weaken its structure over time.

Skin aging is a natural process driven by our genes (chronological aging), that can be drastically accelerated by our way of life, sun and pollutant exposures [55] more largely named exposome [56]. This aging process is mainly mediated by the oxidative stress, an overproduction of ROS able to damage biological molecules such as lipids, proteins and nucleic acids and inducing the alteration of their activity. Typical signs of time in skin are the loss of elasticity and hydration, the slowing down of cell metabolism and the alteration of melanocyte activity. All these changes lead to a decrease of the complexion radiance and the occurrence of light or dark spots and the appearance of wrinkles.

Since the dawn of humanity, people tried to find methods to hide the signs of senescence. Cosmetic treatments have always been the answer to slow down skin deterioration process and ameliorate its aesthetic appearance. To achieve such goal, besides cosmetic products, new physical technologies such as LED- or ultrasounds-based devices have recently been developed. Among these, cold atmospheric plasma may be an innovative and interesting approach in this field. To know CAPs characteristics and how they can interact with the skin, the following chapter will provide some fundamentals about these ionized gases.

3. Plasma bases and biomedical applications

Understanding the physicochemical aspect of plasmas, and the mechanisms involved in the interactions between them and biological tissues, is primordial in order to use them on skin in efficient and secure conditions.

3.1. Introduction to plasmas

The stars, the sun, the lightning and the aurorae have always fascinated human being. All of these wonders of the nature share a common feature, they are forms of plasma: the fourth state of the matter. From the first attempt to artificially generate and master these ionized gases, plasmas have been exploited in different fields. The first artificial plasma was generated by the German physicist Johann Heinrich Wilhelm Geissler who created the ancestor of the fluorescent tube in 1857. Based on the Geissler tube, William Crookes built the first cathode tube in 1879. In his high vacuum tube, Crookes observed that the rarefied gas, exposed to the high voltage between two electrodes, emitted a weak

light at the cathode. Since he did not know that the light was due to the electrons flowing from the cathode, he called them “cathode rays”. Crookes understood that the rarefied gas inside the tube, exposed to the high voltage, was in a particular state that he described as a fourth state of the matter or “radiant matter”. Gases possess almost no interatomic or intermolecular forces. Since they are formed by neutral atoms or molecules, gases are perfect electric insulators. In 1889, Friedrich Paschen studied the loss of the insulating property of the gases exposed to a high electric field between two planar electrodes. Paschen called “breakdown voltage” the minimum voltage needed to generate a discharge in the gas. This voltage is depending on the gas pressure and the distance between the two electrodes [57]. Arc generation is due to the ionization of the gas with consequently a loss of the insulating property. It's only in 1928 that the chemist Irving Langmuir described the state of a rarefied gas exposed to a high voltage between two electrodes. In his paper, Langmuir wrote that *except near the electrodes, the ionized gas was made up of an equal mix of ions and electrons* and proposed to use the term of plasma for this state of the matter [58].

3.2. Hot and cold plasmas

To generate a plasma, a gas must be supplied with enough energy to ionize it. The gas could be heated at very high temperatures in order to permit the external electrons to escape the atoms. The electron and the ionized atoms can interact with other atoms creating a cascade reaction. Thus the generated plasma is a mix of electrons, ions and neutral species. Although it is formed by charged species, the plasma is neutral on its whole. As described previously, a gas can be ionized and form plasma also under a strong electric field generated between two electrodes. Plasmas can be divided in two main categories: thermal and non-thermal plasmas. Most of the natural occurring plasmas belong to the thermal category. These hot plasmas possess electrons and heavy particles at the same temperature. Artificial hot plasmas are produced for some applications such as hard material cutting and toxic waste destruction [59, 60]. In non-thermal plasmas (NTPs), free electrons possess a higher temperature than ions and neutral gas molecules, these latter conferring a relatively low temperature to the whole plasma. Thanks to this characteristic, NTPs are used in a plethora of industrial applications: micro-electronics, lighting, surface treatment and functionalization. Most NTPs conceived for industrial purposes are produced using low pressure gases inside reactors. The controlled atmosphere inside the reactors results in a well-controlled plasma generation. NTPs, can also be generated at atmospheric pressure and are called Cold Atmospheric Plasmas (CAPs).

3.3. Cold atmospheric plasmas generation and characterization

CAPs are mainly generated by means of energy coming from electric alternate or direct currents, radiofrequencies or microwaves. Several methods and configurations are today used to produce these ionized gases: volume and surface Dielectric Barrier Discharge (DBD) [61,62], Atmospheric Pressure Plasma Jets [63], plasma needles and Plasma Pencils [64] (Fig. 2A, B, C). These different configurations, together with the choice of the feeding gas, result in a plasma having peculiar characteristics. Commonly used gases are atmospheric air, pure nitrogen, noble gases or custom gas mixtures of these latter. Once the gas is ionized to plasma, the charged species can react with the matter (target) with which they enter in contact. In the case of CAPs the first encountered medium is the atmospheric air. Reacting with the nitrogen and oxygen composing the air, CAPs produce the so-called Reactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS) (Fig. 2 D). Plasma treatment can be performed on several types of targets, either solids or liquids. When CAPs interact with a solid surface, the generated reactive species can modify, charge or ablate the external layers of the target. These modifications can change the physical characteristics of the surface modifying for example its wettability [65].

Aqueous media exposed to a CAP are enriched of new chemical species. Once generated in the surrounding atmosphere, RONS can be carried and solubilized in the liquid medium [66–68]. Some species such as hydrogen peroxide (H_2O_2) are produced directly from water vapor entering in contact with the plasma effluents [69]. Oxygen already dissolved in the liquid medium also participate to RONS generation [70, 71]. The amount of generated and solubilized species is proportional to the plasma working frequencies [70,72], the voltage waveform, the CAP exposure time [72,73] and the distance from the treated target. Gases passing to the state of plasma emit electromagnetic radiations in the visible and infra-red spectrum. Low amount of UV are commonly generated together with other visible radiations whose wavelength depends on the feeding gas used to produce the plasma. Since CAPs are generally ignited by a strong electric field, once the plasma is generated, the movement of the charged species produces itself an electric field. Lastly, although these plasmas are named cold, they generate thermal energy and develop temperatures between 30° and 100 °C. While temperatures higher than 40 °C are not suitable for the treatment of mammalian tissues, tuning the gas flow rate and the distance of the CAP source from the target permits to avoid overheating effects. The complex interplays between CAP and the treated target are summarized on Fig. 3. In view of the above mentioned characteristics CAPs can be compatible with applications on biological tissues.

Taking into account all the above-mentioned parameters and

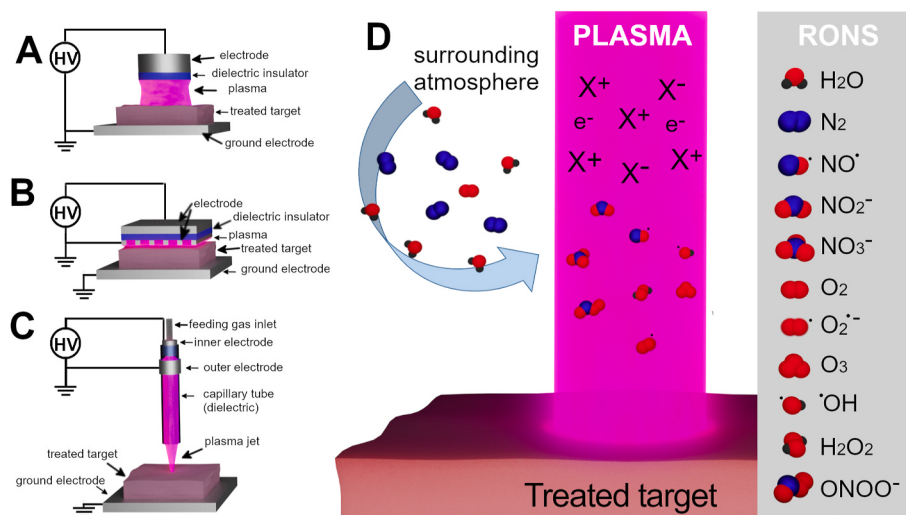


Fig. 2. Cold atmospheric plasma devices and plasma chemistry. Most commonly used CAP-setup for bio-medical applications: A) Volume dielectric barrier discharge reactor; B) Surface dielectric barrier discharge reactor; C) Plasma jet reactor. (HV) High Voltage generator. D) The plasma chemistry: the ionized gas forming a plasma, with its negative and positive ions (X^+ , X^-) and free electrons (e^-), generates a mix of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) from the atmospheric gases and water vapor.

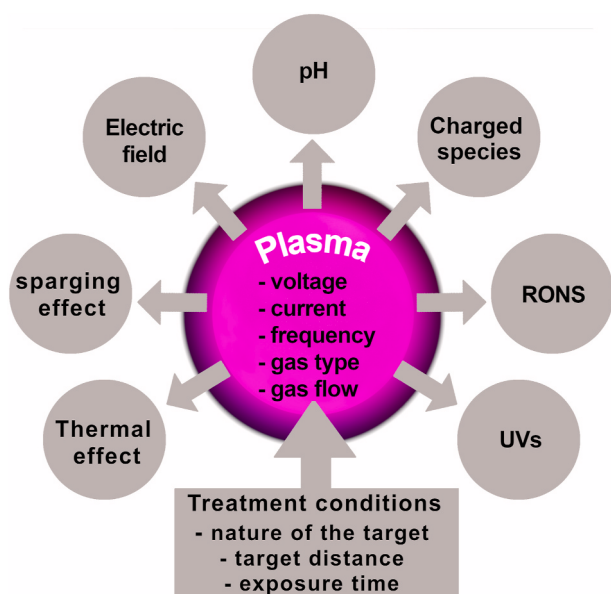


Fig. 3. The interplays between CAP and the treated target. CAP characteristics intrinsically depend on the electrical setup, the feeding gas and its flow rate. The fine tuning of these parameters influences the amount of the produced charged species and RONS, the CAP-generated electric field, the acidification and de-gasification (sparging) of the target. Although marginal, the emitted UVs and the small thermal increase can play a role in the administered treatment. In addition, the treatment conditions such as the nature of the target, the plasma-target distance and the exposure duration also strongly influence the CAP behavior and performances.

knowing that each research laboratory developed its own CAP device, the plethora of data obtained with these sources are not easy to compare. Moreover, depending on the selected technical parameters, such as voltage, frequency, carrier gas composition and gas flow, as well as at different temperatures and humidity, a single individual device also produces very different plasmas inducing different effects. Conscious of this heterogeneity, in the following paragraphs we will make use of the generic term of CAP to indicate different devices and settings employed to generate a Cold Atmospheric Plasma.

3.4. Biomedical applications of plasmas

Plasma application in the bio-medical field is called plasma medicine [74]. In the last decade this field has rapidly expanded. CAPs have shown promising results in cancer therapy either *in vitro* or in clinical case studies [75–80]. Being more sensitive to RONS than normal cells, cancer cells can be selectively killed by plasma exposure [81,82]. Non-thermal plasmas for biomedical applications can be used in indirect or direct configuration. In indirect configuration, the long lived reactive species generated between the electrodes are carried to the target thanks to the gas flow. In direct configuration, the biological target is one of the two electrodes and actively participates to plasma generation [83,84]. Although CAP effluents can now be brought inside the body by means of catheters for *in situ* treatments [85,86], at the beginning plasma medicine was conceived for surface, non-invasive applications. Most of the *in vivo* studies are performed by treating directly the external tissues of the body. Besides cancer applications, CAPs are also used in dermatology with promising effects on chronic wound disinfection and healing [87–94]. Lately some CAP devices have been developed for skin regeneration [95,96]. These plasma sources, operating with atmospheric air, nitrogen or argon, can reach temperatures higher than 60 °C and are mostly used in skin resurfacing. Like laser resurfacing, this type of cosmetic plasma treatment is mostly used to burn the outer layers of the skin and force its renewal [97–100]. Although plasma resurfacing is

a less invasive alternative to facial plastic surgery, the high temperatures, the long recovery after treatment and the limited trial data on long term side effects suggest a careful use of these treatments [101]. Whereas the above mentioned plasma treatments work by a mechanic ablation of the dead outer skin layers, some recent evidences suggest that mild CAP treatments may actually stimulate the deeper layer of the skin and play an anti-age role on skin cells [102]. Hence, plasma applications in dermatology and in cosmetics are, today, hot topics.

4. Cold atmospheric plasma activity on skin

As previously mentioned, CAP features are under the dependency of several parameters of the device such as the voltage and the pulse frequency. The characteristics of the generated plasma are modified by the environment and the gas composition, the nature of the target, the distance from the target and the treatment time (Fig. 3). This results in differences in terms of RONS nature and amount, in the generated electric field and so in a different effect on the treated biological tissue. This is why it is important to understand how plasma chemistry and physics can interact with the skin and how the different parameters can be adapted to achieve the desired effect.

4.1. Effects of CAP-generated RONS on biological components

4.1.1. On biomolecules

Liquid physiological media treated by plasma are enriched in RONS species and have been shown to carry out interesting biological activities on cells and tissues [103,104].

Among the CAP-produced RONS, nitrites (NO_2^-), nitrates (NO_3^-), nitric oxide ($\text{NO}^\bullet$), hydroxyl radical ($^\bullet\text{OH}$), superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2) and ozone (O_3) are of great interest in biology [105,106].

Biomolecules, in contact with the plasma-generated RONS, can be chemically changed, inactivated or irreversibly damaged [107,108]. Takai and collaborators analyzed the chemical structure of water-dissolved amino acids after CAP exposure and demonstrated that most of the treated amino-acids can be oxidized and acquire new chemical groups by hydroxylation or nitration [109]. The amino acid cysteine, involved in the redox activities of enzymes and abundant in the keratin, has been shown to be oxidized by CAP exposure [110]. Since amino acid can be modified by cold plasma treatment, the whole proteins exposed to CAP can be altered either at their primary amino-acid sequence or at their secondary and tertiary structure. These modifications can change the activity or induce a loss of function of the protein [111–114].

Lipids have also been shown to be oxidized by CAP exposure [115–117]. Phospholipids composing cell membranes can directly be peroxidized by a non-thermal plasma treatment [118]. This oxidation can temporarily change the permeability of the cell membrane facilitating the penetration of exogenous molecules [119]. Lipid oxidation is a phenomenon that naturally occurs during oxidative stress and chronic inflammation [120–122].

CAP-induced modifications and damages were observed equally in nucleic acids [123,124] although strong DNA damages have been observed after long plasma exposure [125]. Taken together, these CAP-induced effects on biological molecules underpin the toxic impact that plasma can have on living matter. Although cold plasmas are a source of potentially toxic reactive species, CAPs delivery can induce a hormesis effect [126] since a proper use of these ionized-gas source, with adapted and controlled conditions, can bring beneficial effects on the treated biological tissue.

4.1.2. On cell metabolism

As already mentioned, a proper CAP treatment can, for example, accelerate wound healing or selectively kill cancer cells with little or no impact on normal cells [81,82,127,128]. CAPs have been largely used to

treat easily accessible tissues and organs and therefore they are suitable to treat the skin, the external organ of our body. Being exposed to the external environment, the skin is continuously stressed by physical and chemical insults. Every day the epidermis is exposed to UV radiations, ozone, cigarette smoke, pollutants, organic solvents or alcohols that directly generate or induce the formation of large amount of ROS [129]. Beside these exogenous sources, cellular metabolism also generates in a lesser extend endogenous free radicals [130]. Human and animal tissues produce reactive oxygen species such as $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , H_2O_2 and O_3 [131]. These ROS are mainly produced in mitochondria during cell respiration [132]. Although these highly reactive species can be harmful, the cells are able to neutralize free radicals in excess using their anti-oxidant system. Moreover our body can adapt to chronic exposure of toxic compounds. Human adaptation to lethal poisons by ingestion of sub-lethal doses was known thousands of years ago thanks to Mithridates and his Antidotum Mithridaticum [133]. In mitochondria the adaptation to chronic exposure of small doses of ROS is a phenomenon called mitohormesis [134,135].

4.1.3. On skin cellular signaling

Besides their damaging role, well known as oxidative stress when in large amount, ROS are required molecules for cell viability and activity. In fact, right amounts of ROS play some physiological effects as they can act as second messengers [136–138], stimulators for stem cells proliferation [138,139], and as a booster for the immune system [140,141]. In injured skin, the immune system cells entering in contact with pathogens, start to produce large amounts of RONS. This phenomenon called “respiratory burst” helps wound disinfection. Correct wound healing depends on the equilibrium between ROS generation and the activity of the antioxidant system [142]. Among the reactive nitrogen species (RNS), the small gaseous molecule $NO^{\cdot}$ possesses several biological activities [143] acting as a signaling molecule [144], a vasodilator [145], an angiogenesis modulator [146], an immune system stimulator [147] and a melanogenesis enhancer [148]. In skin $NO^{\cdot}$ is also involved in hair growth, in the proliferation and differentiation of epidermal cells and in wound healing [149,150]. Nitrates present in sweat can be converted in nitrites and then in $NO^{\cdot}$ thanks to the skin bacterial microflora [28] or directly from the photo-decomposition of nitrites [151,152]. $NO^{\cdot}$ derived from photo-decomposition of nitrites has been shown to protect human skin cells from lipid peroxidation and thus apoptosis induced by UVA exposure [152,153]. However an over production or a high exposure to these reactive species, can be harmful [154,155]. Indeed high doses of ROS can contribute to the development of several pathologies such as psoriasis [156–158]. Moreover the oxidative stress in skin can accelerate the natural process of ageing [159,160]. As cold plasmas generate a heterogeneous mix of RONS and considering the “Janus effect” of most of the above mentioned reactive species, the final effect on the treated tissues will depend on the amount of the released reactive species. CAP treatment has been shown to induce an oxidative stress in human keratinocytes [161] but the same cell line exposed for short periods to a helium-fed CAP with a low flow rate increases its viability [126]. Moreover, Schmidt and collaborators observed a hormesis-like increase of the antioxidant system in human keratinocytes cells exposed to an argon fed CAP [162]. In light of the biphasic effect of CAP treatment on skin, mastering the delivery of CAP-produced RONS is a challenge in dermatology and in cosmetics where CAP could be a powerful tool.

4.2. CAP influence on skin proliferation and motility

Cutaneous cell proliferation is important for epidermis turnover and to ensure the healing process in case of skin injuries. When correctly administered, CAP treatment can stimulate these processes. Short exposures to a helium-fed CAP were shown to stimulate HaCaT human keratinocytes proliferation and motility [126,163]. A beneficial effect of plasma treatment on HaCaT cells was also observed with the use of

argon-DBD. Choi et al. showed that CAP treatment inhibits the E-cadherin-mediated intercellular junctions and activates a β -catenin-mediated proliferative signal. This plasma-activated proliferative pathway accelerates *in-vivo* re-epithelialization in mice wound [164]. Furthermore, short treatments (1–3 min) with argon-based plasma jet were shown to increase the proliferation of the *stratum basale* keratinocytes in human, intact skin explants [165]. On dermal fibroblasts very short treatments were shown to increase the proliferation [163,166] while treatments of few minutes exert a toxic effect [166,167]. The higher sensitivity of fibroblasts to CAP treatment, when compared to keratinocytes, can be explained by the fact that these cells reside in a deep layer of the skin. Being protected in the deep dermis, fibroblasts are less equipped to endure an external oxidative stress. *In vivo*, skin fibroblasts can be directly exposed to CAP only in case of wounds. Moreover, in wound treatments, the CAP anti-proliferative effect can be advantageous to avoid the anti-aesthetic side effects of the healing process such as excessive scarring [168].

4.3. CAP influence on skin oxygenation

CAPs have been shown to influence the oxygen content in the treated target. In plasma jets, the gas flow rate exerts the so-called “sparging effect”, de-oxygenating the treated liquid [70,169] while *in vivo* CAP applied on mouse skin has been shown to enhance underneath tissues oxygenation [170]. An increase of the post capillary oxygen saturation after plasma treatment has also been observed in human skin [84,171]. The mechanism on how the plasma source increases *in vivo* skin oxygenation is still unclear. As previously mentioned CAPs are not really cold sources and the devices used in biology develop temperatures between 30° and 40 °C. The application of this relatively warm sources on the skin could induce a local vasodilation and so the increase of tissue oxygenation. Furthermore, since CAP directly or indirectly induces $NO^{\cdot}$ formation, this vasodilator molecule could be also responsible of the observed phenomenon. A correct oxygenation is fundamental for a proper cellular metabolism. Some skin cosmetic therapies are based on the increase of tissue oxygenation. Hyperbaric Oxygen Therapy, already used for decompression sickness, is currently used in skin-rejuvenation. The administration of pressurized oxygen seems to protect the skin from UVB-induced photoaging [172]. However skin oxygenation needs to be carefully controlled. Oxygen has a double face and its excess can generate an oxidative stress accelerating the ageing process. Moreover skin stem cells need a very low oxygen partial pressure to keep their stemness [23] and thus ensure the renewal of the epidermis.

4.4. CAP effect on skin vascularization and extracellular matrix

Skin oxygenation is directly related to the vascularization of the organ. A healthy skin possesses a well-organized vasculature. With the age, skin microcirculation reactivity such as vasodilation and vasoconstriction as well as vascular density are impaired [173]. The inability to handle ROS generation and the endothelial oxidative stress seem to be one of the reason of the loss of this age-related vessels functionality [174]. Although ROS are down regulators of vascular endothelial functions, CAP treatments, in right conditions, seem to play a stimulating action. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) were shown to release pro-angiogenic factors and increase *in vitro* angiogenesis when exposed to an argon-fed CAP for 30s [175]. An increase of proliferation was also shown in porcine endothelial cells where a 30s treatment with an air-DBD induced the release of the fibroblast growth factor-2 (FGF2) [176]. The CAP-angiogenesis stimulatory effect was recently showed by Dzimitrowicz et al. who used a He-fed CAP on human endothelial cells for very short treatments (10s) [163]. *In vivo*, since endothelial cells are not directly affected by plasma treatment, the increase of angiogenesis could be induced via a paracrine mechanism mediated by keratinocytes exposed to plasma treatment [175,177]. The small molecule $NO^{\cdot}$ also plays a role in angiogenesis. $NO^{\cdot}$ can act as a

pro- or anti-angiogenic factor depending on its amount [146,178,179]. Moreover NO[•] can increase the synthesis of collagen IV and activate endothelial cells adhesion [180]. Duchesne et al. demonstrated that CAP treatment stimulates endogenous NO[•] synthesis in *in vitro* and *in vivo* models. Indeed, in a murine burn wound model, plasma-generated RONS was shown to increase the expression of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS). The increase of the enzyme producing endogenous NO[•], together with proangiogenic factors, speeds up the healing process [181]. In wounds, the extracellular matrix (ECM) of the dermis is directly exposed to CAP treatment and the improvement of the healing process could depend on a direct modification of the ECM properties. Ring and collaborators showed that plasma-treated collagen-elastin matrix scaffolds implanted under mice skin induce an enhancement of neovascularization [182]. In addition, a well-organized ECM is also essential to keep a youthful looking skin. Murine fibroblasts directly exposed for 15s to an argon-CAP were shown to increase the expression of collagen I and III while slightly longer treatments exert an opposite effect [166]. Unlike wounds, in intact skin CAP cannot directly influence the extracellular matrix metabolism. However some *in vivo* studies suggested that CAP can indirectly induce dermal remodeling. An increase of dermal collagen content was observed in intact mouse skin exposed to an argon-DBD plasma [183]. Type I collagen is the major component of the dermis. While the neo-synthesis and a well-organized network of the fibrillary protein is a sign of a young and healthy skin, its overproduction is sometimes the expression of skin damages and diseases. Interestingly CAP is able to stimulate physiological collagenogenesis while inhibiting the pathological synthesis of the protein. *In vitro* and *in vivo* studies have shown this selective effect in dermo-aesthetic disorders such as scars and keloids [184,185].

5. Cold atmospheric plasma effect on skin surface

5.1. CAP-induced pH modification

In addition to their stimulating/oxidizing effects, CAP-generated RONS were shown to induce an acidification of the treated target. A decrease of the initial pH is commonly observed in non-buffered or weakly buffered treated liquids [186,187] and in hydrated 3D matrices [188]. The pH-drop can be mainly attributed to acidic species originating from the precursor NO[•] that generates nitric (HNO₃) and nitrous (HNO₂) acids in solution [187]. The induced acidification is proportional to the plasma exposure time. It has been shown that the pH of alkaline or neutral non-buffered media drops rapidly after few minutes of CAP treatment. The quick pH-decrease tends to stabilize at pH values between 3.5 and 2.5 thanks the transient formation of HONO/ONO⁻ buffer and to the generation of nitrous acid (pKa 3.3) [187–189]. In light of the above, CAP exposure can lower the pH of biological tissues.

Pork skin sebum and human lipids can be rapidly acidified when exposed to an air-fed CAP [190]. The CAP-induced acidification was also confirmed by clinical trials on intact human skin [84,150]. Thanks to these acidifying properties, CAP treatment can contribute to keep the skin in healthy conditions. Indeed, by lowering the pH, cold plasmas can stimulate and accelerate skin renewing. In acute skin wound, a physiological acidification was shown to enhance the proteases activity and stimulate fibroblast proliferation [191]. While skin pH higher than the physiological values can lead to pathologies, very acidic pH can burn the external tissues of the organ. In order to avoid chemical burns, skin exposure to CAP should be carefully controlled [150]. However, in cosmetic, chemical peel or chemexfoliation is used to gently ablate the external layer of the epidermis and force skin renewal. This approach uses often organic acids to lower the pH and peel off the epidermis layers [192]. A well administered plasma treatment could exert a similar noninvasive exfoliating effect. Moreover, as the pH of the acidic mantle increases with the aging process leading to a weakening of this barrier [193], CAP treatments could be beneficial to re-establish the physiological pH barrier and stimulate the regeneration in mature skin.

5.2. CAP effect on bacterial decontamination and skin disinfection

Cold atmospheric plasmas possess a well-known bactericidal activity [194–197]. In CAP-treated solutions such as plasma-activated water (PAW), short and long lived species react with each other and create a powerful anti-microbial mix. Some authors reported that the biocidal properties mostly derives from a combination of oxidative and nitrosative effects induced by the synergistic activity of H₂O₂ and NO[•] [198]. Zhou et al. demonstrated that the biocidal effect is achieved by the combination of H₂O₂ and NO₂⁻. The two molecules alone possess a very weak anti-bacterial activity while reacting together they can form peroxynitrite (ONOO⁻), an unstable isomer of NO₃⁻. Peroxynitrite was described as the key species in PAW-induced bacterial damages [199]. Moreover in PAW the protonated form of peroxynitrite, the peroxynitrous acid (ONOOH), can be further oxidized by H₂O₂ and produce the peroxinitric acid (O₂NOOH), a stronger bactericidal molecule [200]. Within the ROS, O₃, mainly produced by air-fed CAPs, also contributes to the plasma-induced biocidal effect [201]. While bacteria directly exposed to plasma can be quite easily killed by the chemical attack of short and long lived RONS, in real life most of these microorganisms are protected by biofilms. Biofilm is a complex consortium of various microorganisms growing on a substrate. Bacteria are embedded in a sort of clammy extracellular matrix made up of extracellular polymeric substances such as polysaccharides, lipids, protein and DNA that are meant to protect bacteria from dehydration and external environment insults. Thanks to this physical barrier, bacteria are more resistant to antibiotic treatments. *In vitro* tests have shown that CAP is able to destroy biofilms of skin pathogens such as the *candida albicans* yeast [202] and the *staphylococcus aureus* [203]. In direct CAP treatment, biofilms are not only exposed to the highly reactive species but also to an intense electric field that can destabilizes the physicochemical structure of the microorganisms [204]. Interestingly, the CAP ability to destroy biofilms has been demonstrated also *in vivo* in wounds that are not any more responsive to common antibiotics [93,205,206]. Although CAP treatment can be efficiently used to deteriorate biofilms, some bacterial strains could adapt and tolerate plasma treatment stress. Tailoring of CAP devices and treatment conditions are to date a big challenge for a safe and efficient biofilm decontamination [207]. It was already mentioned that skin microbiota plays a physiological role on the intact organ. However when the symbiotic equilibrium between the skin and the microorganisms is disrupted, these latter can become pathogenic [208]. The previously mentioned acidic mantle controls this equilibrium by inhibiting the growth of pathogen organisms and by promoting commensal skin bacteria proliferation. Low pH is unfavorable to the growth of several pathogens, and the already discussed CAP-induced acidification enhances the antimicrobial activity of these sources [187, 209–211]. Thanks to their anti-microbial activities, CAP devices can be used as an alternative and efficient method to sanitize intact skin [92, 212]. CAPs can inhibit the growth of the anaerobic pathogen *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes* involved in the oily skin inflammation known as acne vulgaris and in other more severe pathologies [213]. A CAP patented-device was shown to inhibit, *in vitro*, the growth of *Malassezia restricta* and *Malassezia globosa*, yeasts responsible for dandruff [214]. Onychomycosis caused by the bacterium *Escherichia coli* and by the fungus *Trichophyton rubrum* was successfully treated by a helium CAP [215]. In most cases pathogens like the above proliferate in the deep skin appendages. The eradication of these microorganism with topic antibiotic applications is often difficult since the drugs fail to penetrate inside the deep structure of the skin. As will be explained later, CAP treatment can overcome this issue.

5.3. Plasma and skin hydration

A healthy and functional skin needs the right amount of water. In the dermis the hydration is guaranteed by the high hygroscopic GAGs such as hyaluronic acid. In the epidermis, water content varies between 70%

in the viable part and 15–30% in the external layers [216]. The *stratum corneum* is able to sense the environmental humidity and adapt its biochemical metabolism [217]. Corneocytes, the dead cells composing the *stratum corneum*, can keep water thanks to hygroscopic molecules composing the Natural Moisturizing Factor and keratins [218,219]. Corneocytes adhere tightly each other avoiding massive water loss. Furthermore, intercellular lipids such as ceramides create a hydrophobic barrier against desiccation [220]. Cold plasma treatment can exert a double effect on skin hydration. CAP can at first destabilize the skin barrier and desiccate the external layer of the epidermis. A small temporary water loss was observed *in vivo* in human *stratum corneum* after plasma exposure [221]. Epidermis desiccation is a desired effect in plasma skin resurfacing where the non-ablated dried epidermis protects the thermally damaged layers during the recovery process [222]. Paradoxically since CAPs can deposit charges on the treated surface, it is likely that after a plasma treatment skin could attract more water molecules. Human *stratum corneum* wettability rapidly increases in the first seconds of plasma treatment [223]. The increased hydrophilicity was also demonstrated in finger nails where plasma treatment ameliorates the adhesion of cosmetic nail varnish [224].

5.4. RONS skin penetration and CAP-mediated percutaneous absorption

During CAP treatment, RONS can directly influence the skin cell physiology or mediate the activation of downstream responses. One of the hot topic in dermocosmetic plasma therapies is to understand the ability of these reactive species to penetrate and diffuse inside the skin layers. While short lived species rapidly react and deactivate in contact with the *stratum corneum*, long lived molecules such as H_2O_2 , NO_3^- , NO_2^- and $\text{NO}^\bullet$ can diffuse deeply. Knowing how these molecules penetrate inside the skin during CAP treatment is of crucial importance in treatment planning. Whether in dermatological therapies the deep penetration of these species is allowed, in pure cosmetic treatments the effect of RONS must be superficial and affects only the epidermis. Simple organic skin mimics such as agarose gel and gelatin have been used to quantify and measure the diffusion kinetics of the reactive species after CAP treatment [225]. These models permit to have an idea on the ability of RONS to cross the mesh of semi-solid gel but they overestimate the ability of these molecules to diffuse into the biological tissues. In real world, the physicochemical barriers of the skin can slow down the diffusion and neutralize most of the reactive species. Even using real skin, the exact quantification of RONS passing through the tissues can be distorted by the nature of the liquid medium used to collect and analyze them [226]. As already mentioned, molecules can cross the skin either through the cells, the intercellular space or via the external pores. Small species such as $\text{NO}^\bullet$ can passively diffuse through cell membrane, whereas some others can pass via channel proteins. Indeed, the water channel aquaporins [227,228] were shown to facilitate the cellular diffusion of H_2O_2 produced upon CAP treatment [229,230]. In addition, as previously evoked, thanks to lipid peroxidation RONS can generate transient pores on the membrane and so facilitate their own penetration. Furthermore, by destabilizing the cellular membrane, the electric field generated during the plasma treatment participates to the pore formation [231,232].

Beside the direct role of CAP in skin treatment, cold plasma sources could be also used to ameliorate the effect of topic dermocosmetic cares. Thanks to their ability to destabilize the skin barrier, CAP were shown to facilitate the transdermal delivery of other molecules with a mechanism similar to electroporation [233–236]. This temporary loss of the epidermis barrier could permit the intercellular diffusion of drugs or cosmetic actives. Lastly, RONS and ointments can easily penetrate through the appendageal way whose density depends on the body zone.

6. CAP delivery and skin electrical parameters

CAPs can behave differently depending on the electrical nature of the

target [237–240]. Human organs possess different values of electrical conductivity and this latter depends on the biochemical and biophysical structure of the organ, on its water content and on its extracellular electrolyte composition. In skin, the conductivity varies greatly in the three different layers composing the organ. The *stratum corneum*, with its low water content and its lipid composition, acts as a real dielectric barrier, insulating the whole body from electric shocks. However as already mentioned in the previous paragraph, CAP can temporarily increase the conductivity of the epidermis promoting transdermal penetration of molecules. The electroporation induced by high-voltage pulses lets also the current flow deeper into the tissues. CAP-transported electric current, penetrating the skin layers, could have beneficial effects. High frequency electrotherapy was used since the early 20th century to treat several dermatological conditions and other diseases [241]. It is known that a certain electrical stimulation can speed up the wound healing process by promoting dermal fibroblast motility [242, 243]. In addition, direct and pulsed currents were shown to stimulate keratinocytes differentiation, epidermis proliferation, vascularization and new collagen deposition [244,245].

The interaction between CAPs and the skin is bidirectional, CAP can modify the initial physico-chemical parameters of the targeted tissue while the characteristics of this latter can influence the plasma performance (Fig. 3). The knowledge of the body electrical parameters is crucial for planning a safe, controlled and effective CAP treatment [240, 246]. We already mentioned that the thickness and the structure of the skin change along the body which is why the same plasma treatment can produce a different effect depending on the treated zone. Moreover, the conductivity of the skin itself can vary over the time according to its hydration and to the temporary psychological and hormonal state of the treated person [247,248]. To overcome these variations, CAP delivery should dynamically adapt to the electrical changes of the skin [249]. The applied electric field has to be carefully chosen and controlled and will depend on the desired effect on skin, either a stronger for dermatological use or a lighter for cosmetic applications.

7. Towards a potential role of CAP in skin biology and ageing prevention

In this review we tried to summarize the interactions between cold atmospheric plasmas and the skin, based on the current knowledge of their own properties and characteristics, highlighting the already known and some other possible effects of these sources on the integumentary system biology (Fig. 4). We described how the multiple physical parameters involved in cold plasma can individually or together impact the cutaneous microenvironment and skin cell activities. The coaction of all these effects tends towards a beneficial role of CAPs on skin biology and brings relevant arguments in favor of the use of cold plasma for restoring skin functional barrier and thus improving skin health and appearance.

In the light of these findings, one could ask: can CAPs be considered as a fountain of youth for the skin? Answering this question is not simple.

From a technical point of view, the interesting *in vitro* and *in vivo* data found in the literature come often from different cold-plasma devices. Indeed, worldwide researchers have developed devices with different designs, gases and characteristics for plasma generation. This makes the biological results hardly comparable. Whether one specific device is better for one desired biological effect remains to be determined. Moreover, for a single device, parameters such as voltage, frequency and distance from the target also strongly influence plasma behavior and composition. In one hand, while these technical variables add a new level of complexity, in the other hand they also bring the possibility to modulate the plasma production. Moreover CAP physics and chemistry also depend on the operating conditions, such as ambient temperature and humidity. Thus the device should automatically adapt to the environmental conditions in order to deliver the same performance at every use. Hence, for each treatment, a systematic diagnosis of the device

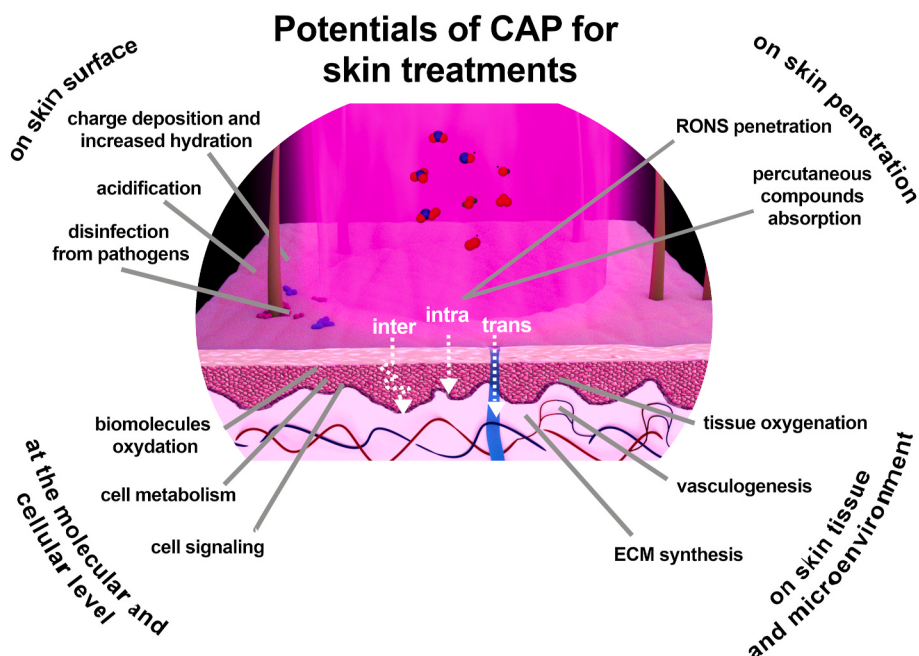


Fig. 4. Potentials of CAP in skin biology. CAP performs its activity at various levels of the skin. At a superficial level it promotes the hydration, acidification and decontamination of the stratum corneum. CAP-generated RONS can penetrate inside the skin via the intercellular way (**inter**), the intracellular way (**intra**) or via the transappendageal way (**trans**). By loosening the cutaneous barrier, CAP also promotes the absorption of other molecules such as drugs. At a molecular level, once penetrated into the skin, RONS can have a direct effect on skin biomolecule oxidation or activate cell metabolism and signaling. At the tissue level, CAP treatment lead to an increase in skin oxygenation, stimulates the vasculogenesis and the ECM remodeling or *de-novo* synthesis.

plasma composition should bring a new tool for the control and modulation of RONS generation. The development of means to finely analyze and control plasma delivery in interaction with skin with the support of modern plasma medicine studies should allow to determine the optimal conditions of use and contribute to the evaluation of this technology for skin wellbeing. Finally this CAP “plasticity” can become a strong point for specific applications.

From a biochemical point of view, the mechanisms involved in plasma effect on cells and tissues still remains to be determined. Progress in this field are currently ongoing by making a precise diagnosis of plasma composition with the characterization of RONS produced in liquid or in tissues. The next step is to understand how these species are able to induce a biological effect either alone or in synergy [250]. The last challenging step is to master all the other CAP components (charged particles, UV, electric field, thermal emission) that cooperate to the final biological effect. Such rational approaches should strengthen plasma effects understanding and bring new insight in plasma applications for skin but also more generally in plasma medicine domain [251].

From a biological point of view and according to the results reported till now in the literature and presented here, CAPs should be a promising technology to stimulate and/or regenerate skin. However, as noted in this work, relatively little is known about the molecular and cellular mechanisms involved in the plasma-induced biological effects and about the consequences of these treatments in the long term. Data obtained from *in vitro* experiments are essential to understand the cellular signaling activated by the CAP exposure. However, the biggest limit in the use of cell cultures in plasma treatments is that most of the time the cells are not directly exposed to the CAP. Cells are either treated through the physiological medium covering them or put in contact with plasma-pretreated medium. Thus, cells in culture receive only long-lived species diffusing from the surface of the medium or dissolved in the plasma-activated medium. Conversely, *in vivo*, the skin will be impacted by all the CAP-produced species since the *stratum corneum* of the epidermis is directly exposed to the atmosphere. To overcome this issue, the use of skin explants or more complex skin models such as Reconstructed Human Epidermis or Reconstructed Whole Skin could strengthen the understanding of the CAP-activated processes *in vitro* and allow to modulate the effects, define and correct the limits of this technology. Finally, once clear cause-and-effect mechanisms are defined in these studies, real life treatment must be adapted to each user as the skin

structure depends on the phototype but also on the age, sex and ethnicity. Indeed dermo-cosmetic CAP-based treatments should be considered as adapted and personalized therapies which are currently increasingly in demand. Thus a new generation of plasma-based treatments could emerge in the field of cosmetics and dermatology to improve skin aspect and health.

Taking into account the flexibility of plasma generation, thanks to its many parameters, CAPs could become new and promising treatments for skin care and regeneration. This will go through an optimization of devices, in terms of efficacy, control and safety for use as well as through the deciphering of mechanisms involved in plasma-induced effects on the skin. This innovative technology opens new areas of research at the interface between plasma physics and skin biology and should lead towards new applications in the dermo-cosmetic field.

Funding

This work was supported by Cosmetosciences, a global training and research program dedicated to the cosmetic industry, located in the heart of the Cosmetic Valley. This program led by University of Orléans is funded by the Région Centre-Val de Loire, France. Giovanni Busco is funded by Cosmetosciences (PLSMACOSM2 Project, Grant 2017 00118114) and Nadira Chettouh-Hammas by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. E R; J-M P and C G are funded by the Centre National de la Recherche Scientifique. This interdisciplinary work was performed in the frame of the French CNRS networks, GDR2025 HAPPYBIO and GDR3711 Cosmactifs.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Abbreviations

CAP	Cold atmospheric Plasma
ROS	Reactive Oxygen Species
RNS	Reactive Nitrogen Species
RONS	Reactive Oxygen and Nitrogen Species
DBD	Dielectric Barrier Discharge
ECM	Extracellular Matrix

References

- [1] G.K. Menon, A.M. Kligman, Barrier functions of human skin: a holistic view, *Skin Pharmacol. Physiol.* 22 (4) (2009) 178–189, <https://doi.org/10.1159/000231523>.
- [2] W.Z. Mostafa, R.A. Hegazy, Vitamin D and the skin: focus on a complex relationship: a review, *J. Adv. Res.* 6 (6) (2015) 793–804, <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.01.011>.
- [3] J.P. Kuhlitz-Buschbeck, W. Andresen, S. Gobel, R. Gilster, C. Stick, Thermoreception and nociception of the skin: a classic paper of Bessou and Perl and analyses of thermal sensitivity during a student laboratory exercise, *Adv. Physiol. Educ.* 34 (2) (2010) 25–34, <https://doi.org/10.1152/advan.00002.2010>.
- [4] D. Filingieri, Neurophysiology of skin thermal sensations, *Comp. Physiol.* 6 (3) (2016) 1429, <https://doi.org/10.1002/cphy.c150040>.
- [5] D. Filingieri, Humidity sensation, cockroaches, worms, and humans: are common sensory mechanisms for hygosensation shared across species? *J. Neurophysiol.* 114 (2) (2015) 763–767, <https://doi.org/10.1152/jn.00730.2014>.
- [6] A.A. Romanovsky, Skin temperature: its role in thermoregulation, *Acta Physiol.* 210 (3) (2014) 498–507, <https://doi.org/10.1111/apha.12231>.
- [7] T.S. Poet, J.N. McDougal, Skin absorption and human risk assessment, *Chem. Biol. Interact.* 140 (1) (2002) 19–34, [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(02\)00013-3](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(02)00013-3).
- [8] M. Gallagher, C.J. Wysocki, J.J. Leyden, A.I. Spielman, X. Sun, G. Preti, Analyses of volatile organic compounds from human skin, *Br. J. Dermatol.* 159 (4) (2008) 780–791, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08748.x>.
- [9] H.J. Hurley, J. Witkowski, Dye clearance and eccrine sweat secretion in human skin, *J. Invest. Dermatol.* 36 (1961) 259–272, <https://doi.org/10.1038/jid.1961.44>.
- [10] K.R. Smith, D.M. Thiboutot, Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J. Lipid Res.* 49 (2) (2008) 271–281, <https://doi.org/10.1194/jlr.R700015-JLR200>.
- [11] Y. Peng, X. Cui, Y. Liu, Y. Li, J. Liu, B. Cheng, Systematic review focusing on the excretion and protection roles of sweat in the skin, *Dermatology* 228 (2) (2014) 115–120, <https://doi.org/10.1159/000357524>.
- [12] E. Guttman-Yassky, L. Zhou, J.G. Krueger, The skin as an immune organ: tolerance versus effector responses and applications to food allergy and hypersensitivity reactions, *J. Allergy Clin. Immunol.* 144 (2) (2019) 362–374, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.03.021>.
- [13] M. Shahbandeh, Value of the Cosmetics Market Worldwide from 2018 to 2025 (In Billion U.S. Dollars), 2019, 27 Nov 2019; Available from: <https://www.statista.com/statistics/585522/global-value-cosmetics-market/>.
- [14] E. Papadavid, A. Katsambas, Lasers for facial rejuvenation: a review, *Int. J. Dermatol.* 42 (6) (2003) 480–487, <https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2003.01784.x>.
- [15] F. Baez, L.R. Reilly, The use of light-emitting diode therapy in the treatment of photoaged skin, *J. Cosmet. Dermatol.* 6 (3) (2007) 189–194, <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00329.x>.
- [16] S. Shuster, M.M. Black, E. McVitie, The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density, *Br. J. Dermatol.* 93 (6) (1975) 639–643, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1975.tb05113.x>.
- [17] J. Sandby-Møller, T. Poulsen, H.C. Wulf, Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits, *Acta Derm. Venereol.* 83 (6) (2003) 410–413, <https://doi.org/10.1080/00015550310015419>.
- [18] S.C. Taylor, Skin of color: biology, structure, function, and implications for dermatologic disease, *J. Am. Acad. Dermatol.* 46 (2 Suppl Understanding) (2002) S41–S62, <https://doi.org/10.1067/mjd.2002.120790>.
- [19] P.R. Bergstresser, J.R. Taylor, Epidermal 'turnover time'—a new examination, *Br. J. Dermatol.* 96 (5) (1977) 503–509, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1977.tb07152.x>.
- [20] C.S. Potten, C. Booth, Keratinocyte stem cells: a commentary, *J. Invest. Dermatol.* 119 (4) (2002) 888–899, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.00020.x>.
- [21] C. Pincelli, A. Marconi, Keratinocyte stem cells: friends and foes, *J. Cell. Physiol.* 225 (2) (2010) 310–315, <https://doi.org/10.1002/jcp.22275>.
- [22] I.M. Braverman, The cutaneous microcirculation, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 5 (1) (2000) 3–9, <https://doi.org/10.1046/j.1087-0024.2000.00010.x>.
- [23] A. Carreau, B. El Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon, C. Kieda, Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia, *J. Cell Mol. Med.* 15 (6) (2011) 1239–1253, <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x>.
- [24] N.T. Evans, P.F. Naylor, The systemic oxygen supply to the surface of human skin, *Respir. Physiol.* 3 (1) (1967) 21–37, [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(67\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0034-5687(67)90020-5).
- [25] H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones, Oxidative stress, *Annu. Rev. Biochem.* 86 (1) (2017) 715–748, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.
- [26] F.A.S. Addor, Antioxidants in dermatology, *An. Bras. Dermatol.* 92 (3) (2017) 356–362, <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175697>.
- [27] S.M. Ali, G. Yosipovitch, Skin pH: from basic science to basic skin care, *Acta Derm. Venereol.* 93 (3) (2013) 261–267, <https://doi.org/10.2340/00015555-1531>.
- [28] R. Weller, S. Pattullo, L. Smith, M. Golden, A. Ormerod, N. Benjamin, Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate, *J. Invest. Dermatol.* 107 (3) (1996) 327–331, <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12363167>.
- [29] P.M. Krien, M. Kermici, Evidence for the existence of a self-regulated enzymatic process within the human stratum corneum—an unexpected role for urocanic acid, *J. Invest. Dermatol.* 115 (3) (2000) 414–420, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00083.x>.
- [30] J.W. Fluhr, J. Kao, S.K. Ahn, K.R. Feingold, P.M. Elias, M. Jain, Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity, *J. Invest. Dermatol.* 117 (1) (2001) 44–51, <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01399.x>.
- [31] M.J. Behne, J. Meyer, K.M. Hanson, N.P. Barry, S. Murata, D. Crumrine, R. R. Clegg, E. Gratton, W.M. Holleran, P.M. Elias, T.M. Mauro, NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis: microenvironment acidification assessed with FLIM, *J. Biol. Chem.* (2002), <https://doi.org/10.1074/jbc.M204759200>.
- [32] J.-P. Hachem, D. Crumrine, J. Fluhr, B.E. Brown, K.R. Feingold, P.M. Elias, pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion, *J. Invest. Dermatol.* 121 (2) (2003) 345–353, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12365.x>.
- [33] M.H. Schmid-Wendtner, H.C. Korting, The pH of the skin surface and its impact on the barrier function, *Skin Pharmacol. Physiol.* 19 (6) (2006) 296–302, <https://doi.org/10.1159/000094670>.
- [34] D.J. Panther, S.E. Jacob, The importance of acidification in atopic eczema: an underexplored avenue for treatment, *J. Clin. Med.* 4 (5) (2015) 970–978, <https://doi.org/10.3390/jcm4050970>.
- [35] F. Rippke, V. Schreiner, T. Doering, H.I. Maibach, Stratum corneum pH in atopic dermatitis, *Am. J. Clin. Dermatol.* 5 (4) (2004) 217–223, <https://doi.org/10.2165/00128071-200405040-00002>.
- [36] H. Zhai, H.P. Chan, S. Farahmand, H.I. Maibach, Measuring human skin buffering capacity: an in vitro model, *Skin Res. Technol.* 15 (4) (2009) 470–475, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2009.00392.x>.
- [37] J.A. Bouwstra, M. Ponc, The skin barrier in healthy and diseased state, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (12) (2006) 2080–2095, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2006.06.021>.
- [38] Z. Nemes, P.M. Steinert, Bricks and mortar of the epidermal barrier, *Exp. Mol. Med.* 31 (1) (1999) 5–19, <https://doi.org/10.1038/emmm.1999.2>.
- [39] G.K. Menon, G.W. Cleary, M.E. Lane, The structure and function of the stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 435 (1) (2012) 3–9, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.005>.
- [40] M.B. Murphy, P.M. Zito, *Histology, Stratum Corneum, StatPearls*, Treasure Island (FL), 2018.
- [41] R.R. Wickett, M.O. Visscher, Structure and function of the epidermal barrier, *Am. J. Infect. Contr.* 34 (10, Supplement) (2006) S98–S110, <https://doi.org/10.1016/j.jaic.2006.05.295>.
- [42] A.S. Michaels, S.K. Chandrasekaran, J.E. Shaw, Drug permeation through human skin: theory and invitro experimental measurement, *AIChE J.* 21 (5) (1975) 985–996, <https://doi.org/10.1002/aic.690210522>.
- [43] C. Vitorino, J. Sousa, A. Pais, Overcoming the skin permeation barrier: challenges and opportunities, *Curr. Pharmaceut. Des.* 21 (20) (2015) 2698–2712, <https://doi.org/10.2174/1381612821666150428124053>.
- [44] T.R. Auton, Concentration-flux relations for a multicellular biological membrane with metabolism, *Math. Biosci.* 115 (1) (1993) 103–117, [https://doi.org/10.1016/0025-5564\(93\)90048-F](https://doi.org/10.1016/0025-5564(93)90048-F).
- [45] L. Norlen, Skin barrier structure and function: the single gel phase model, *J. Invest. Dermatol.* 117 (4) (2001) 830–836, <https://doi.org/10.1038/jid.2001.1>.
- [46] H. Trommer, R.H. Neubert, Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review, *Skin Pharmacol. Physiol.* 19 (2) (2006) 106–121, <https://doi.org/10.1159/000091978>.
- [47] S. Mitragotri, Y.E. Anissimov, A.L. Bunge, H.F. Frasch, R.H. Guy, J. Hadgraft, G. B. Kasting, M.E. Lane, M.S. Roberts, Mathematical models of skin permeability: an overview, *Int. J. Pharm.* 418 (1) (2011) 115–129, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.023>.
- [48] E.A. Grice, J.A. Segre, The skin microbiome, *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (4) (2011) 244–253, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>.
- [49] L. Bay, C.J. Barnes, B.G. Fritz, J. Thorsen, M.E.M. Restrup, L. Rasmussen, J. K. Sørensen, A.B. Hesselvig, A. Odgaard, A.J. Hansen, T. Bjarnsholt, Universal dermal microbiome in human skin, *mBio* 11 (1) (2020), <https://doi.org/10.1128/mBio.02945-19>.
- [50] R.L. Gallo, Human skin is the largest epithelial surface for interaction with microbes, *J. Invest. Dermatol.* 137 (6) (2017) 1213–1214, <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.045>.
- [51] K. Chiller, B.A. Selkin, G.J. Murakawa, Skin microflora and bacterial infections of the skin, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 6 (3) (2001) 170–174, <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x>.
- [52] A.L. Cogen, N. Nizet, R.L. Gallo, Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br. J. Dermatol.* 158 (3) (2008) 442–455, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x>.
- [53] H. Vallhov, C. Johansson, R.E. Veerman, A. Scheynius, Extracellular vesicles released from the skin commensal yeast *Malassezia sympodialis* activate human primary keratinocytes, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10 (6) (2020), <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00006>.
- [54] M.-A. Dagnelie, S. Corvec, A. Khammari, B. Dréno, Bacterial extracellular vesicles: a new way to decipher host-microbiota communications in inflammatory dermatoses, *Exp. Dermatol.* 29 (1) (2020) 22–28, <https://doi.org/10.1111/exd.14050>.
- [55] G.J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, J.J. Voorhees, Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, *Arch. Dermatol.* 138 (11) (2002) 1462–1470, <https://doi.org/10.1001/archderm.138.11.1462>.

- [56] J. Krutmann, A. Boulou, G. Sore, B.A. Bernard, T. Passeron, The skin aging exposome, *J. Dermatol. Sci.* 85 (3) (2017) 152–161, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.09.015>.
- [57] F. Paschen, Ueber die zum Funkenübergang in Luft, Wasserstoff und Kohlensäure bei verschiedenen Drucken erforderliche Potentialdifferenz, *Ann. Phys.* 273 (5) (1889) 69–96, <https://doi.org/10.1002/andp.18892730505>.
- [58] I. Langmuir, Oscillations in ionized gases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 14 (1928) 627–637, <https://doi.org/10.1073/pnas.14.8.627>.
- [59] P. Fauchais, A. Vardelle, Thermal plasmas, *IEEE Trans. Plasma Sci.* 25 (6) (1997) 1258–1280, <https://doi.org/10.1109/27.650901>.
- [60] J. Heberlein, A.B. Murphy, Thermal plasma waste treatment, *J. Phys. Appl. Phys.* 41 (5) (2008), 053001, <https://doi.org/10.1088/0022-3727/41/5/053001>.
- [61] G. Fridman, A. Friedman, A. Gutsol, A.B. Shekhter, V.N. Vasilets, A. Fridman, *Applied Plasma Medicine. Plasma Processes and Polymers* 5 (6) (2008) 503–533, <https://doi.org/10.1002/ppap.200700154>.
- [62] Y.-F. Li, T. Shimizu, J.L. Zimmermann, G.E. Morfill, Cold atmospheric plasma for surface disinfection, *Plasma Process. Polym.* 9 (6) (2012) 585–589, <https://doi.org/10.1002/ppap.201100090>.
- [63] M. Laroussi, T. Akan, Arc-free atmospheric pressure cold plasma jets: a review, *Plasma Process. Polym.* 4 (9) (2007) 777–788, <https://doi.org/10.1002/ppap.200700066>.
- [64] C. Hoffmann, C. Berganza, J. Zhang, Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology, *Med. Gas Res.* 3 (1) (2013) 21, <https://doi.org/10.1186/2045-9912-3-21>.
- [65] D. Rymuszka, K. Terpilowski, P. Borowski, L. Holysz, Time-dependent changes of surface properties of polyether ether ketone caused by air plasma treatment, *Polym. Int.* 65 (7) (2016) 827–834, <https://doi.org/10.1002/pi.5141>.
- [66] W. Tian, A.M. Lietz, M.J. Kushner, The consequences of air flow on the distribution of aqueous species during dielectric barrier discharge treatment of thin water layers, *Plasma Sources Sci. Technol.* 25 (5) (2016), 055020, <https://doi.org/10.1088/0963-0252/25/5/055020>.
- [67] J. Chauvin, F. Judée, M. Yousfi, P. Vicendo, N. Merbahi, Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 4562, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04650-4>.
- [68] R. Thirumdas, A. Kothakota, U. Annappure, K. Siliveru, R. Blundell, R. Gatt, V. P. Valdramis, Plasma activated water (PAW): chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture, *Trends Food Sci. Technol.* 77 (2018) 21–31, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.007>.
- [69] J. Liu, B. He, Q. Chen, J. Li, Q. Xiong, G. Yue, X. Zhang, S. Yang, H. Liu, Q.H. Liu, Direct synthesis of hydrogen peroxide from plasma-water interactions, *Sci. Rep.* 6 (2016) 38454, <https://doi.org/10.1038/srep38454>, <https://www.nature.com/articles/srep38454#supplementary-information>.
- [70] G. Busco, F. Fasani, S. Dozias, L. Ridou, C. Douat, J.-M. Pouvesle, E. Robert, C. Grillon, Changes in oxygen level upon cold plasma treatments: consequences for RONS production, *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* 2 (2) (2018) 147–152, <https://doi.org/10.1109/trpms.2017.2775705>.
- [71] E. Turrini, R. Laurita, E. Simoncelli, A. Stancampiano, E. Catanzaro, C. Calcinai, G. Carulli, M. Rousseau, M. Gherardi, F. Maffei, V. Cocchi, M. Lenzi, V. Pellicioni, P. Hrelia, V. Colombo, C. Fimognari, Plasma-activated medium as an innovative anticancer strategy: insight into its cellular and molecular impact on in vitro leukemia cells, *Plasma Process. Polym.* (2020), <https://doi.org/10.1002/ppap.202000007>, n/a(n/a), p. e2000007.
- [72] A. Valineta, G. Busco, L. Ridou, S. Dozias, C. Grillon, J.-M. Pouvesle, E. Robert, Cold atmospheric single plasma jet for RONS delivery on large biological surfaces, *Plasma Sources Sci. Technol.* 29 (10) (2020), 105002, <https://doi.org/10.1088/1361-6595/abaffd>.
- [73] E. Gjika, S. Pal-Ghosh, A. Tang, M. Kirschner, G. Tadvalkar, J. Canady, M. A. Stepp, M. Keidar, Adaptation of operational parameters of cold atmospheric plasma for in vitro treatment of cancer cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10 (11) (2018) 9269–9279, <https://doi.org/10.1021/acsami.7b18653>.
- [74] M.G. Kong, G. Kroesen, G. Morfill, T. Nosenko, T. Shimizu, J.v. Dijk, J. L. Zimmermann, Plasma medicine: an introductory review, *New J. Phys.* 11 (11) (2009) 115012, <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115012>.
- [75] D. Yan, J.H. Sherman, M. Keidar, Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality, *Oncotarget* 8 (9) (2017) 15977–15995, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13304>.
- [76] J. Schlegel, J. Körzter, V. Boxhammer, Plasma in cancer treatment, *Clinical Plasma Medicine* 1 (2) (2013) 2–7, <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2013.08.001>.
- [77] G. Isbary, J.L. Zimmermann, T. Shimizu, Y.F. Li, G.E. Morfill, H.M. Thomas, B. Steffes, J. Heinlin, S. Karrer, W. Stolz, Non-thermal plasma—more than five years of clinical experience, *Clinical Plasma Medicine* 1 (1) (2013) 19–23, <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2012.11.001>.
- [78] A.M. Hirst, F.M. Frame, M. Arya, N.J. Maitland, D. O'Connell, Low temperature plasmas as emerging cancer therapeutics: the state of play and thoughts for the future, *Tumour Biol* 37 (6) (2016) 7021–7031, <https://doi.org/10.1007/s13277-016-4911-7>.
- [79] A. Dubuc, P. Monsarrat, F. Virard, N. Merbahi, J.-P. Sarrette, S. Laurencin-Dalieux, S. Cousty, Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic review, *Therapeutic advances in medical oncology* 10 (2018), <https://doi.org/10.1177/1758835918786475>, 1758835918786475–1758835918786475.
- [80] P.M. Metelmann, D.S. Nedrelov, M. Schuster, R. Rutkowski, C. Seebauer, Clinical studies applying physical plasma in head and neck cancer - key points and study design, *Int J Clin Res Trials* 1 (103) (2016) 2, <https://doi.org/10.15344/2456-8007/2016/103>.
- [81] R. Guerrero-Preston, T. Ogawa, M. Uemura, G. Shumulinsky, B.L. Valle, F. Pirini, R. Ravi, D. Sidransky, M. Keidar, B. Trink, Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells, *Int. J. Mol. Med.* 34 (4) (2014) 941–946, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1849>.
- [82] S.J. Kim, T.H. Chung, Cold atmospheric plasma jet-generated RONS and their selective effects on normal and carcinoma cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 20332, <https://doi.org/10.1038/srep20332>.
- [83] M. Kuchenbecker, N. Bibinov, A. Kaemling, D. Wandke, P. Awakowicz, W. Viöl, Characterization of DBD plasma source for biomedical applications, *J. Phys. Appl. Phys.* 42 (4) (2009), <https://doi.org/10.1088/0022-3727/42/4/045212>, 045212.
- [84] T. Borchardt, J. Ernst, A. Helmke, M. Tanyeli, A.F. Schilling, G. Felmerer, W. Viöl, Effect of direct cold atmospheric plasma (diCAP) on microcirculation of intact skin in a controlled mechanical environment, *Microcirculation* 24 (8) (2017), <https://doi.org/10.1111/micc.12399>.
- [85] M. Vandamme, E. Robert, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape, J. M. Pouvesle, Response of human glioma U87 xenograft on mice to non thermal plasma treatment, *Plasma Med.* 1 (1) (2011) 27–43, <https://doi.org/10.1615/PlasmaMed.v1.i1.30>.
- [86] S. Mirpour, S. Piroozmand, N. Soleimani, N. Jalali Faharani, H. Ghomi, H. Fotovat Eskandari, A.M. Sharifi, S. Mirpour, M. Eftekhari, M. Nikkhar, Utilizing the micron sized non-thermal atmospheric pressure plasma inside the animal body for the tumor treatment application, *Sci. Rep.* 6 (2016) 29048, <https://doi.org/10.1038/srep29048>.
- [87] S. Kubinova, K. Zaviskova, L. Uherkova, V. Zablotskii, O. Churpita, O. Lunov, A. Dejneka, Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats, *Sci. Rep.* 7 (2017) 45183, <https://doi.org/10.1038/srep45183>, <https://www.nature.com/articles/srep45183#supplementary-information>.
- [88] B. Haertel, T. von Woedtke, K.D. Weltmann, U. Lindequist, Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing, *Biomol Ther (Seoul)* 22 (6) (2014) 477–490, <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.105>.
- [89] J. Heinlin, J.L. Zimmermann, F. Zeman, W. Bunk, G. Isbary, M. Landthaler, T. Maisch, R. Monetti, G. Morfill, T. Shimizu, J. Steinbauer, W. Stolz, S. Karrer, Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma on skin graft donor sites, *Wound Repair Regen.* 21 (6) (2013) 800–807, <https://doi.org/10.1111/wrr.12078>.
- [90] S. Emmert, F. Brehmer, H. Hänle, A. Helmke, N. Mertens, R. Ahmed, D. Simon, D. Wandke, W. Maus-Friedrichs, G. Däschlein, M.P. Schön, W. Viöl, Atmospheric pressure plasma in dermatology: ulcer treatment and much more, *Clinical Plasma Medicine* 1 (1) (2013) 24–29, <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2012.11.002>.
- [91] G. Daeschlein, S. Scholz, R. Ahmed, A. Majumdar, T. von Woedtke, H. Haase, M. Niggemeier, E. Kindel, R. Brandenburg, K.D. Weltmann, M. Junger, Cold plasma is well-tolerated and does not disturb skin barrier or reduce skin moisture, *J Dtsch Dermatol Ges* 10 (7) (2012) 509–515, <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2012.07857.x>.
- [92] G. Daeschlein, S. Scholz, R. Ahmed, T. von Woedtke, H. Haase, M. Niggemeier, E. Kindel, R. Brandenburg, K.D. Weltmann, M. Juenger, Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma, *J. Hosp. Infect.* 81 (3) (2012) 177–183, <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.02.012>.
- [93] G. Isbary, J. Heinlin, T. Shimizu, J.L. Zimmermann, G. Morfill, H.U. Schmidt, R. Monetti, B. Steffes, W. Bunk, Y. Li, T. Klaempfl, S. Karrer, M. Landthaler, W. Stolz, Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: results of a randomized controlled trial, *Br. J. Dermatol.* 167 (2) (2012) 404–410, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.10923.x>.
- [94] J. Heinlin, G. Isbary, W. Stolz, G. Morfill, M. Landthaler, T. Shimizu, B. Steffes, T. Nosenko, J. Zimmermann, S. Karrer, Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 25 (1) (2011) 1–11, <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x>.
- [95] M.J. Gonzalez, W.H. Sturgill, E.V. Ross, N.S. Uebelhoefer, Treatment of acne scars using the plasma skin regeneration (PSR) system, *Laser Surg. Med.* 40 (2) (2008) 124–127, <https://doi.org/10.1002/lsm.20617>.
- [96] S. Kilmer, N. Semchysyn, G. Shah, R. Fitzpatrick, A pilot study on the use of a plasma skin regeneration device (Portrait PSR3) in full facial rejuvenation procedures, *Laser Med. Sci.* 22 (2) (2007) 101–109, <https://doi.org/10.1007/s10103-006-0431-9>.
- [97] R. Fitzpatrick, E. Bernstein, S. Iyer, D. Brown, P. Andrews, K. Penny, A histopathologic evaluation of the plasma skin regeneration system (PSR) versus a standard carbon dioxide resurfacing laser in an animal model, *Laser Surg. Med.* 40 (2) (2008) 93–99, <https://doi.org/10.1002/lsm.20547>.
- [98] R.D. Gentile, J.D. McCoy, Pulsed and fractionated techniques for helium plasma energy skin resurfacing, *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* 28 (1) (2020) 75–85, <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2019.09.007>.
- [99] M.L. Elsaie, J.N. Kammer, Evaluation of plasma skin regeneration technology for cutaneous remodeling, *J. Cosmet. Dermatol.* 7 (4) (2008) 309–311, <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00411.x>.
- [100] M.A. Bogle, K.A. Arndt, J.S. Dover, Evaluation of plasma skin regeneration technology in low-energy full-facial rejuvenation, *Arch. Dermatol.* 143 (2) (2007) 168–174, <https://doi.org/10.1001/archderm.143.2.168>.
- [101] S.H. Bentkover, Plasma skin resurfacing: personal experience and long-term results, *Facial Plast. Surg. Clin.* 20 (2) (2012) 145–162, <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2012.02.010>.
- [102] J.H. Choi, H.W. Lee, J.K. Lee, J.W. Hong, G.C. Kim, Low-temperature atmospheric plasma increases the expression of anti-aging genes of skin cells without causing cellular damages, *Arch. Dermatol. Res.* 305 (2) (2013) 133–140, <https://doi.org/10.1007/s00403-012-1259-8>.

- [103] A. Khlyustova, C. Labay, Z. Machala, M.-P. Ginebra, C. Canal, Important parameters in plasma jets for the production of RONS in liquids for plasma medicine: a brief review, *Front. Chem. Sci. Eng.* 13 (2) (2019) 238–252, <https://doi.org/10.1007/s11705-019-1801-8>.
- [104] S.A. Norberg, W.H. Tian, E. Johnsen, K.M. J., Atmospheric pressure plasma jets interacting with liquid covered tissue: touching and not-touching the liquid, *J. Phys. Appl. Phys.* 47 (47) (2014) 475203, <https://doi.org/10.1088/0022-3727/47/47/475203>.
- [105] D.B. Graves, Reactive species from cold atmospheric plasma: implications for cancer therapy, *Plasma Process. Polym.* 11 (12) (2014) 1120–1127, <https://doi.org/10.1002/ppap.201400068>.
- [106] A. Weidinger, A.V. Kozlov, Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction, *Biomolecules* 5 (2) (2015) 472–484, <https://doi.org/10.3390/biom5020472>.
- [107] P. Attri, N. Kumar, J.H. Park, D.K. Yadav, S. Choi, H.S. Uhm, I.T. Kim, E.H. Choi, W. Lee, Influence of reactive species on the modification of biomolecules generated from the soft plasma, *Sci. Rep.* 5 (2015) 8221, <https://doi.org/10.1038/srep08221>. <https://www.nature.com/articles/srep08221#supplementary-information>.
- [108] C. Bernard, A. Leduc, J. Barbeau, B. Saoudi, L.H. Yahia, G.D. Crescenzo, Validation of cold plasma treatment for protein inactivation: a surface plasmon resonance-based biosensor study, *J. Phys. Appl. Phys.* 39 (16) (2006) 3470–3478, <https://doi.org/10.1088/0022-3727/39/16/s04>.
- [109] E. Takai, T. Kitamura, J. Kuwabara, S. Ikawa, S. Yoshizawa, K. Shiraki, H. Kawasaki, R. Arakawa, K. Kitano, Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution, *J. Phys. Appl. Phys.* 47 (28) (2014) 285403, <https://doi.org/10.1088/0022-3727/47/28/285403>.
- [110] J.W. Lackmann, K. Wende, C. Verlact, J. Golda, J. Volzke, F. Kogelheide, J. Held, S. Bekechus, A. Bogaerts, V. Schulz-von der Gathen, K. Stapelmann, Chemical fingerprints of cold physical plasmas – an experimental and computational study using cysteine as tracer compound, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 7736, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25937-0>.
- [111] E. Takai, K. Kitano, J. Kuwabara, K. Shiraki, Protein inactivation by low-temperature atmospheric pressure plasma in aqueous solution, *Plasma Process. Polym.* 9 (1) (2012) 77–82, <https://doi.org/10.1002/ppap.201100063>.
- [112] S.K. Pankaj, N.N. Misra, P.J. Cullen, Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge, *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 19 (2013) 153–157, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.001>.
- [113] N.N. Misra, S.K. Pankaj, A. Segat, K. Ishikawa, Cold plasma interactions with enzymes in foods and model systems, *Trends Food Sci. Technol.* 55 (2016) 39–47, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.001>.
- [114] Y. Han, J.-H. Cheng, D.-W. Sun, Activities and conformation changes of food enzymes induced by cold plasma: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59 (5) (2019) 794–811, <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1555131>.
- [115] M. Gavahian, Y.-H. Chu, A. Mousavi Khaneghah, F.J. Barba, N.N. Misra, A critical analysis of the cold plasma induced lipid oxidation in foods, *Trends Food Sci. Technol.* 77 (2018) 32–41, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.009>.
- [116] J. Van Durme, A. Nikiforov, J. Vandamme, C. Leys, A. De Winne, Accelerated lipid oxidation using non-thermal plasma technology: evaluation of volatile compounds, *Food Res. Int.* 62 (2014) 868–876, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.043>.
- [117] P. Kulawik, C. Alvarez, P.J. Cullen, R. Aznar-Roca, A.M. Mullen, B. Tiwari, The effect of non-thermal plasma on the lipid oxidation and microbiological quality of sushi, *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 45 (2018) 412–417, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.12.011>.
- [118] J. Van der Paal, E.C. Neyts, C.C.W. Verlact, A. Bogaerts, Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress, *Chem. Sci.* 7 (1) (2016) 489–498, <https://doi.org/10.1039/C5SC02311D>.
- [119] M. Leduc, D. Guay, R.L. Leask, S. Coulombe, Cell permeabilization using a non-thermal plasma, *New J. Phys.* 11 (11) (2009) 115021, <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115021>.
- [120] G.O. Fruhwirth, A. Loidl, A. Hermetter, Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* 1772 (7) (2007) 718–736, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.04.009>.
- [121] A. Reis, C.M. Spickett, Chemistry of phospholipid oxidation, *Biochim. Biophys. Acta* 1818 (10) (2012) 2374–2387, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.02.002>.
- [122] C.M. Spickett, A.R. Pitt, Oxidative lipidomics coming of age: advances in analysis of oxidized phospholipids in physiology and pathology, *Antioxidants Redox Signal.* 22 (18) (2015) 1646–1666, <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6098>.
- [123] A.M. Hirst, F.M. Frame, N.J. Maitland, D. O'Connell, Low temperature plasma causes double-strand break DNA damage in primary epithelial cells cultured from a human prostate tumour, *IEEE Trans Plasma Sci IEEE Nucl Plasma Sci Soc* 42 (10) (2014) 2740–2741, <https://doi.org/10.1109/TPS.2014.2351453>.
- [124] M. Dezest, L. Chavatte, M. Bourdens, D. Quinton, M. Camus, L. Garrigues, P. Descargues, S. Arbault, O. Burlet-Schiltz, L. Casteilla, F. Clement, V. Planat, A. L. Bulteau, Mechanistic insights into the impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on human epithelial cell lines, *Sci. Rep.* 7 (2017) 41163, <https://doi.org/10.1038/srep41163>.
- [125] E.J. Szili, N. Gaur, S.-H. Hong, H. Kurita, J.-S. Oh, M. Ito, A. Mizuno, A. Hatta, A. J. Cowin, D.B. Graves, R.D. Short, The assessment of cold atmospheric plasma treatment of DNA in synthetic models of tissue fluid, tissue and cells, *J. Phys. Appl. Phys.* 50 (27) (2017) 274001, <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa7501>.
- [126] E.J. Szili, F.J. Harding, S.-H. Hong, F. Herrmann, N.H. Voelcker, R.D. Short, The hormesis effect of plasma-elevated intracellular ROS on HaCaT cells, *J. Phys. Appl. Phys.* 48 (2015), <https://doi.org/10.1088/0022-3727/48/49/495401>.
- [127] M. Wang, B. Holmes, X. Cheng, W. Zhu, M. Keidar, L.G. Zhang, Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells, *PLoS One* 8 (9) (2013), e73741, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073741>.
- [128] J. Duan, X. Lu, G. He, The selective effect of plasma activated medium in an in vitro co-culture of liver cancer and normal cells, *J. Appl. Phys.* 121 (1) (2017), 013302, <https://doi.org/10.1063/1.4973484>.
- [129] G. Valacchi, C. Sticozzi, A. Pecorelli, F. Cervellati, C. Cervellati, E. Maioli, Cutaneous responses to environmental stressors, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1271 (1) (2012) 75–81, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06724.x>.
- [130] A. Phaniendra, D.B. Jestadi, L. Periyasamy, Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Indian J. Clin. Biochem.* 30 (1) (2015) 11–26, <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>.
- [131] J. N. Onyango, Endogenous generation of singlet oxygen and ozone in human and animal tissues: mechanisms, biological significance, and influence of dietary components, *Oxid Med Cell Longev* 2016 (2016) 2398573, <https://doi.org/10.1155/2016/2398573>.
- [132] A.A. Starkov, The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147 (2008) 37–52, <https://doi.org/10.1196/annals.1427.015>.
- [133] A.C. Celsus, W.G.W.G. Spencer, De Medicina, Harvard university press, London, 1935 (W. Heinemann, Ltd: Cambridge, Mass).
- [134] J. Yun, T. Finkel, Mitohormesis, *Cell Metabol.* 19 (5) (2014) 757–766, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.011>.
- [135] M. Ristow, K. Schmeisser, Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS), *Dose-Response* 12 (2) (2014) 288–341, <https://doi.org/10.2203/dose-response.13-035>. Ristow.
- [136] T. Finkel, Signal transduction by reactive oxygen species, *J. Cell Biol.* 194 (1) (2011) 7–15, <https://doi.org/10.1083/jcb.201102095>.
- [137] P.D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cell. Signal.* 24 (5) (2012) 981–990, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.
- [138] C.R. Reczek, N.S. Chandel, ROS-dependent signal transduction, *Curr. Opin. Cell Biol.* 33 (2015) 8–13, <https://doi.org/10.1016/j.celb.2014.09.010>.
- [139] J.E. Le Belle, N.M. Orozco, A.A. Paucar, J.P. Saxe, J. Mottahedeh, A.D. Pyle, H. Wu, H.I. Kornblum, Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner, *Cell Stem Cell* 8 (1) (2011) 59–71, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.11.028>.
- [140] X. Chen, M. Song, B. Zhang, Y. Zhang, Reactive oxygen species regulate T cell immune response in the tumor microenvironment, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2016) 10, <https://doi.org/10.1155/2016/1580967>, 2016.
- [141] C. Kohchi, H. Inagawa, T. Nishizawa, G. Soma, ROS and innate immunity, *Anticancer Res.* 29 (3) (2009) 817–821.
- [142] U. auf dem Keller, A. Kumin, S. Braun, S. Werner, Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 11 (1) (2006) 106–111, <https://doi.org/10.1038/sj.jidsymp.5650001>.
- [143] D.A. Wink, J.B. Mitchell, Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide, *Free Radic. Biol. Med.* 25 (4) (1998) 434–456, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00092-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00092-6).
- [144] N.R. Prabhakar, NO and CO as second messengers in oxygen sensing in the carotid body, *Respir. Physiol.* 115 (2) (1999) 161–168, [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(99\)00019-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(99)00019-5).
- [145] K. Chen, R.N. Pittman, A.S. Popel, Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective, *Antioxidants Redox Signal.* 10 (7) (2008) 1185–1198, <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1959>.
- [146] A. Carreau, C. Kieda, C. Grillon, Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment, *Exp. Cell Res.* 317 (1) (2011) 29–41, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.08.011>.
- [147] P. Tripathi, P. Tripathi, L. Kashyap, V. Singh, The role of nitric oxide in inflammatory reactions, *Pathogens and Disease* 51 (3) (2007) 443–452, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x>.
- [148] Y. Dong, H. Wang, J. Cao, J. Ren, R. Fan, X. He, G.W. Smith, C. Dong, Nitric oxide enhances melanogenesis of alpaca skin melanocytes in vitro by activating the MITF phosphorylation, *Mol. Cell. Biochem.* 352 (1) (2011) 255–260, <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0761-1>.
- [149] J. Liebmank, J. Scherer, N. Bibinov, P. Rajasekaran, R. Kovacs, R. Gesche, P. Awakowicz, V. Kolb-Bachofen, Biological effects of nitric oxide generated by an atmospheric pressure gas-plasma on human skin cells, *Nitric Oxide* 24 (1) (2011) 8–16, <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.09.005>.
- [150] K. Heuer, M.A. Hoffmanns, E. Demir, S. Baldus, C.M. Volkmar, M. Rohle, P. C. Fuchs, P. Awakowicz, C.V. Suschek, C. Oplander, The topical use of non-thermal dielectric barrier discharge (DBD): nitric oxide related effects on human skin, *Nitric Oxide* 44 (2015) 52–60, <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.11.015>.
- [151] A.N. Paunel, A. Dejam, S. Thelen, M. Kirsch, M. Horstjann, P. Gharini, M. Mürtz, M. Kelm, H. de Groot, V. Kolb-Bachofen, C.V. Suschek, Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms, *Free Radic. Biol. Med.* 38 (5) (2005) 606–615, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.018>.
- [152] C.V. Suschek, P. Schroeder, O. Aust, H. Sies, C. Mahotka, M. Horstjann, H. Ganser, M. Mürtz, P. Hering, O. Schnorr, K.-D. Kröncke, V. Kolb-Bachofen, The presence

- of nitrite during UVA irradiation protects from apoptosis, *FASEB J.* 17 (15) (2003) 2342–2344, <https://doi.org/10.1096/fj.03-0359fje>.
- [153] C. Opländer, W. Wetzel, M.M. Cortese, N. Pallua, C.V. Suschek, Evidence for a physiological role of intracellularly occurring photolabile nitrogen oxides in human skin fibroblasts, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (9) (2008) 1752–1761, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.030>.
- [154] S. Di Meo, T.T. Reed, P. Venditti, V.M. Victor, Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2016) 1245049, <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>, 2016.
- [155] V. Calabrese, C. Cornelius, E. Rizzarelli, J.B. Owen, A.T. Dinkova-Kostova, D. A. Butterfield, Nitric oxide in cell survival: a janus molecule, *Antioxidants Redox Signal.* 11 (11) (2009) 2717–2739, <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2721>.
- [156] Q. Zhou, U. Mrowietz, M. Rostami-Yazdi, Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (7) (2009) 891–905, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.033>.
- [157] D.P. Kadam, A.N. Suryakar, R.D. Ankush, C.Y. Kadam, K.H. Deshpande, Role of oxidative stress in various stages of psoriasis, *Indian J. Clin. Biochem. : Indian J. Clin. Biochem.* 25 (4) (2010) 388–392, <https://doi.org/10.1007/s12291-010-0043-9>.
- [158] S.P. Cannavò, G. Riso, M. Casciaro, E. Di Salvo, S. Gangemi, Oxidative stress involvement in psoriasis: a systematic review, *Free Radic. Res.* 53 (8) (2019) 829–840, <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1648800>.
- [159] S. Pillai, C. Oresajo, J. Hayward, Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review, *Int. J. Cosmet. Sci.* 27 (1) (2005) 17–34, <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2004.00241.x>.
- [160] M. Rinnerthaler, J. Bischof, M.K. Streubel, A. Trost, K. Richter, Oxidative stress in aging human skin, *Biomolecules* 5 (2) (2015) 545–589, <https://doi.org/10.3390/biom5020545>.
- [161] K. Wende, S. Strassenburg, B. Haertel, M. Harms, S. Holtz, A. Barton, K. Masur, T. von Woedtke, U. Lindequist, Atmospheric pressure plasma jet treatment evokes transient oxidative stress in HaCaT keratinocytes and influences cell physiology, *Cell Biol. Int.* 38 (4) (2014) 412–425, <https://doi.org/10.1002/cbin.10200>.
- [162] A. Schmidt, S. Dietrich, A. Steuer, K.D. Weltmann, T. von Woedtke, K. Masur, K. Wende, Non-thermal plasma activates human keratinocytes by stimulation of antioxidant and phase II pathways, *J. Biol. Chem.* 290 (11) (2015) 6731–6750, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603555>.
- [163] A. Dzimitrowicz, A. Bielawska-Pohl, P. Jamroz, J. Dora, A. Krawczenko, G. Busco, C. Grillon, C. Kieda, A. Klimczak, D. Terefinko, A. Baszczynska, P. Pohl, Activation of the normal human skin cells by a portable dielectric barrier discharge-based reaction-discharge system of a defined gas temperature, *Plasma Chem. Plasma Process.* 40 (1) (2020) 79–97, <https://doi.org/10.1007/s11090-019-10039-0>.
- [164] J.H. Choi, Y.S. Song, K. Song, H.J. Lee, J.W. Hong, G.C. Kim, Skin renewal activity of non-thermal plasma through the activation of β -catenin in keratinocytes, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 6146, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06661-7>.
- [165] S. Hasse, T. Duong, O. Hahn, S. Kindler, H.-R. Metelmann, T. von Woedtke, K. Masur, Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma, *Clin. Exp. Dermatol.* (2015) 41, <https://doi.org/10.1111/ced.12735>.
- [166] X. Shi, J. Cai, G. Xu, H. Ren, S. Chen, Z. Chang, J. Liu, C. Huang, G. Zhang, X. Wu, Effect of cold plasma on cell viability and collagen synthesis in cultured murine fibroblasts, *Plasma Sci. Technol.* 18 (4) (2016) 353–359, <https://doi.org/10.1088/1009-0630/18/4/04>.
- [167] M. Bourdens, Y. Jeanson, M. Taurand, N. Juin, A. Carrière, F. Clément, L. Casteilla, A.-L. Bulteau, V. Planat-Bénard, Short exposure to cold atmospheric plasma induces senescence in human skin fibroblasts and adipose mesenchymal stromal cells, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019), <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45191-2>, 8671–8671.
- [168] J. Balzer, K. Heuer, E. Demir, M.A. Hoffmanns, S. Baldus, P.C. Fuchs, P. Awakowicz, C.V. Suschek, C. Opländer, Non-thermal dielectric barrier discharge (DBD) effects on proliferation and differentiation of human fibroblasts are primary mediated by hydrogen peroxide, *PloS One* 10 (12) (2015), e0144968, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144968>.
- [169] J.-S. Oh, X. Strudwick, R.D. Short, K. Ogawa, A. Hatta, H. Furuta, N. Gaur, S.-H. Hong, A.J. Cowin, H. Fukuhara, K. Inoue, M. Ito, C. Charles, R.W. Boswell, J. W. Bradley, D.B. Graves, E.J. Szili, How plasma induced oxidation, oxygenation, and de-oxygenation influences viability of skin cells, *Appl. Phys. Lett.* 109 (20) (2016) 203701, <https://doi.org/10.1063/1.4967880>.
- [170] G. Collet, E. Robert, A. Lenoir, M. Vandamme, T. Darny, S. Dozias, C. Kieda, J. M. Pouvesle, Plasma jet-induced tissue oxygenation: potentialities for new therapeutic strategies, *Plasma Sources Sci. Technol.* 23 (1) (2014), 012005, <https://doi.org/10.1088/0963-0252/23/1/012005>.
- [171] T. Kisch, A. Helmke, S. Schleusser, J. Song, E. Liodaki, F.H. Stang, P. Mailaender, R. Kraemer, Improvement of cutaneous microcirculation by cold atmospheric plasma (CAP): results of a controlled, prospective cohort study, *Microvasc. Res.* 104 (2016) 55–62, <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2015.12.002>.
- [172] B. Asadamongkol, J. Zhang, The development of hyperbaric oxygen therapy for skin rejuvenation and treatment of photoaging, *Med. Gas Res.* 4 (2014) 7, <https://doi.org/10.1186/2045-9912-4-7>.
- [173] I. Bentov, M.J. Reed, The effect of aging on the cutaneous microvasculature, *Microvasc. Res.* 100 (2015) 25–31, <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2015.04.004>.
- [174] A.J. Donato, I. Eskurza, A.E. Silver, A.S. Levy, G.L. Pierce, P.E. Gates, D.R. Seals, Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans, *Circ. Res.* 100 (11) (2007) 1659–1666, <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000269183.13937.e8>.
- [175] S. Arndt, P. Unger, M. Berneburg, A.K. Bosserhoff, S. Karrer, Cold atmospheric plasma (CAP) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode, *J. Dermatol. Sci.* 89 (2) (2018) 181–190, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.008>.
- [176] S. Kalghatgi, G. Friedman, A. Fridman, A.M. Clyne, Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release, *Ann. Biomed. Eng.* 38 (3) (2010) 748–757, <https://doi.org/10.1007/s10439-009-9868-x>.
- [177] H.S. Cui, Y.S. Cho, S.Y. Joo, C.H. Mun, C.H. Seo, J.B. Kim, Wound healing potential of low temperature plasma in human primary epidermal keratinocytes, *Tissue Eng Regen Med* 16 (6) (2019) 585–593, <https://doi.org/10.1007/s13770-019-00215-w>.
- [178] J.P. Cooke, D.W. Losordo, Nitric oxide and angiogenesis, *Circulation* 105 (18) (2002) 2133–2135, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000014928.45119.73>.
- [179] S. Babaei, K. Teichert-Kuliszewska, Q. Zhang, N. Jones, D.J. Dumont, D. J. Stewart, Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide, *Am. J. Pathol.* 162 (6) (2003) 1927–1936, [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64326-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64326-X).
- [180] J.A. Stewart Jr., T.A. West, P.A. Lucchesi, Nitric oxide-induced collagen IV expression and angiogenesis: FAK or fiction? Focus on "Collagen IV contributes to nitric oxide-induced angiogenesis of lung endothelial cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300 (5) (2011) C968–C969, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00059.2011>.
- [181] C. Duchesne, S. Banzet, J.-J. Lataillade, A. Rousseau, N. Frescaline, Cold atmospheric plasma modulates endothelial nitric oxide synthase signalling and enhances burn wound neovascularisation, *J. Pathol.* 249 (3) (2019) 368–380, <https://doi.org/10.1002/path.5323>.
- [182] A. Ring, S. Langer, A. Schaffran, I. Stricker, P. Awakowicz, H.-U. Steinau, J. Hauser, Enhanced neovascularization of dermis substitutes via low-pressure plasma-mediated surface activation, *Burns* 36 (8) (2010) 1222–1227, <https://doi.org/10.1016/j.burns.2010.03.002>.
- [183] B.B.R. Choi, J.H. Choi, J. Ji, K.W. Song, H.J. Lee, G.C. Kim, Increment of growth factors in mouse skin treated with non-thermal plasma, *Int. J. Med. Sci.* 15 (11) (2018) 1203–1209, <https://doi.org/10.7150/ijms.26342>.
- [184] S.U. Kang, Y.S. Kim, Y.E. Kim, J.-K. Park, Y.S. Lee, H.Y. Kang, J.W. Jang, J. B. Ryoo, Y. Lee, Y.S. Shin, C.-H. Kim, Opposite effects of non-thermal plasma on cell migration and collagen production in keloid and normal fibroblasts, *PloS One* 12 (11) (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187978>, e0187978.
- [185] X.-F. Wang, Q.-Q. Fang, B. Jia, Y.-Y. Hu, Z.-C. Wang, K.-p. Yan, S.-Y. Yin, Z. Liu, W.-Q. Tan, Potential effect of non-thermal plasma for the inhibition of scar formation: a preliminary report, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020) 1064, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57703-6>.
- [186] Z. Chen, L. Lin, X. Cheng, E. Gjika, M. Keidar, Effects of cold atmospheric plasma generated in deionized water in cell cancer therapy, *Plasma Process. Polym.* 13 (12) (2016) 1151–1156, <https://doi.org/10.1002/ppap.201600086>.
- [187] J.-L. Brisset, B. Benstaali, D. Moussa, J. Fanmoe, E. Njoyim-Tamungang, Acidity control of plasma-chemical oxidation: applications to dye removal, urban waste abatement and microbial inactivation, *Plasma Sources Sci. Technol.* 20 (3) (2011), 034021, <https://doi.org/10.1088/0963-0252/20/3/034021>.
- [188] G. Busco, A. Valinaj Omran, L. Ridou, J.M. Pouvesle, E. Robert, C. Grillon, Cold atmospheric plasma-induced acidification of tissue surface: visualization and quantification using agarose gel models, *J. Phys. Appl. Phys.* (2019), <https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab1119>.
- [189] B. Benstaali, D. Moussa, A. Addou, J.-L. Brisset, Plasma treatment of aqueous solutes: some chemical properties of a gliding arc in humid air, *Eur. Phys. J. AP* 4 (2) (1998) 171–179, <https://doi.org/10.1051/epjap:1998258>.
- [190] A. Helmke, D. Hoffmeister, N. Mertens, S. Emmert, J. Schuette, W. Vioel, The acidification of lipid film surfaces by non-thermal DBD at atmospheric pressure in air, *New J. Phys.* 11 (11) (2009) 115025, <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115025>.
- [191] L.A. Schneider, A. Korber, S. Grabbe, J. Dissemund, Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? *Arch. Dermatol. Res.* 298 (9) (2007) 413–420, <https://doi.org/10.1007/s00403-006-0713-x>.
- [192] T. Soleymani, J. Lanoue, Z. Rahman, A practical approach to chemical peels: a review of fundamentals and step-by-step algorithmic protocol for treatment, *The Journal of clinical and aesthetic dermatology* 11 (8) (2018) 21–28.
- [193] E.-H. Choi, M.-Q. Man, P. Xu, S. Xin, Z. Liu, D.A. Crumrine, Y.J. Jiang, J.W. Fluhr, K.R. Feingold, P.M. Elias, T.M. Mauro, Stratum corneum acidification is impaired in moderately aged human and murine skin, *J. Invest. Dermatol.* 127 (12) (2007) 2847–2856, <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700913>.
- [194] M. Laroussi, D.A. Mendis, M. Rosenber, Plasma interaction with microbes, *New J. Phys.* 5 (2003), <https://doi.org/10.1088/1367-2630/5/1/341>, 41–41.
- [195] L.F. Gaunt, C.B. Beggs, G.E. Georgiou, Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: a review, *IEEE Trans. Plasma Sci.* 34 (4) (2006) 1257–1269, <https://doi.org/10.1109/TPS.2006.878381>.
- [196] M. Moreau, N. Orange, M.G.J. Feuillol, Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination, *Biotechnol. Adv.* 26 (6) (2008) 610–617, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.001>.
- [197] J. Guo, K. Huang, J. Wang, Bactericidal effect of various non-thermal plasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: a

- review, *Food Contr.* 50 (2015) 482–490, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.037>.
- [198] V. Boxhammer, G.E. Morfill, J.R. Jokipii, T. Shimizu, T. Klämpfl, Y.F. Li, J. Körtzer, J. Schlegel, J.L. Zimmermann, Bactericidal action of cold atmospheric plasma in solution, *New J. Phys.* 14 (11) (2012), 113042, <https://doi.org/10.1088/1367-2630/14/11/113042>.
- [199] R. Zhou, R. Zhou, K. Prasad, Z. Fang, R. Speight, K. Bazaka, K. Ostrikov, Cold atmospheric plasma activated water as a prospective disinfectant: the crucial role of peroxynitrite, *Green Chem.* 20 (23) (2018) 5276–5284, <https://doi.org/10.1039/C8GC02800A>.
- [200] S. Ikawa, A. Tani, Y. Nakashima, K. Kitano, Physicochemical properties of bactericidal plasma-treated water, *J. Phys. Appl. Phys.* 49 (42) (2016) 425401, <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/42/425401>.
- [201] M. Müller, T. Shimizu, S. Binder, P. Rettberg, J.L. Zimmermann, G.E. Morfill, H. Thomas, Plasma afterglow circulation apparatus for decontamination of spacecraft equipment, *AIP Adv.* 8 (10) (2018) 105013, <https://doi.org/10.1063/1.5040303>.
- [202] K. Fricke, I. Koban, H. Tresp, L. Jablonowski, K. Schröder, A. Kramer, K.-D. Weltmann, T. von Woedtke, T. Kocher, Atmospheric pressure plasma: a high-performance tool for the efficient removal of biofilms, *PLoS One* 7 (8) (2012), e42539, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042539>.
- [203] P. Brun, G. Bernabè, C. Marchiori, M. Scarpa, M. Zuin, R. Cavazzana, B. Zaniol, E. Martinez, Antibacterial efficacy and mechanisms of action of low power atmospheric pressure cold plasma: membrane permeability, biofilm penetration and antimicrobial sensitization, *J. Appl. Microbiol.* 125 (2) (2018) 398–408, <https://doi.org/10.1111/jam.13780>.
- [204] Y.W. Kim, S. Subramanian, K. Gerasopoulos, H. Ben-Yoav, H.-C. Wu, D. Quan, K. Carter, M.T. Meyer, W.E. Bentley, R. Ghodssi, Effect of electrical energy on the efficacy of biofilm treatment using the bioelectric effect, *npj Biofilms and Microbiomes* 1 (1) (2015) 15016, <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2015.16>.
- [205] S.A. Ermolaeva, A.F. Varfolomeev, M.Y. Chernukha, D.S. Yurov, M.M. Vasiliev, A. A. Kaminskaya, M.M. Moiseyevich, J.M. Romanova, A.N. Murashev, I. I. Selezneva, T. Shimizu, E.V. Sysolyatina, I.A. Shaginyan, O.F. Petrov, E. I. Mayevsky, V.E. Fortov, G.E. Morfill, B.S. Naroditsky, A.L. Gintsburg, Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds, *J. Med. Microbiol.* 60 (1) (2011) 75–83, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.020263-0>.
- [206] G. Isbary, T. Shimizu, J.L. Zimmermann, H.M. Thomas, G.E. Morfill, W. Stolz, Cold atmospheric plasma for local infection control and subsequent pain reduction in a patient with chronic post-operative ear infection, *New Microbes and New Infections* 1 (3) (2013) 41–43, <https://doi.org/10.1002/2052-2975.19>.
- [207] B.F. Gilmore, P.B. Flynn, S. O'Brien, N. Hickok, T. Freeman, P. Bourke, Cold plasmas for biofilm control: opportunities and challenges, *Trends Biotechnol.* 36 (6) (2018) 627–638, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.03.007>.
- [208] Y.E. Chen, M.A. Fischbach, Y. Belkaid, Skin microbiota-host interactions, *Nature* 553 (7689) (2018) 427–436, <https://doi.org/10.1038/nature25177>.
- [209] K. Oehmigen, M. Hähnel, R. Brandenburg, C. Wilke, K.D. Weltmann, T. von Woedtke, The role of acidification for antimicrobial activity of atmospheric pressure plasma in liquids, *Plasma Process. Polym.* 7 (3–4) (2010) 250–257, <https://doi.org/10.1002/ppap.200900077>.
- [210] Q. Zhang, R. Ma, Y. Tian, B. Su, K. Wang, S. Yu, J. Zhang, J. Fang, Sterilization efficiency of a novel electrochemical disinfectant against *Staphylococcus aureus*, *Environ. Sci. Technol.* 50 (6) (2016) 3184–3192, <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05108>.
- [211] E.M. Jones, C.A. Cochrane, S.L. Percival, The effect of pH on the extracellular matrix and biofilms, *Adv. Wound Care* 4 (7) (2015) 431–439, <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0538>.
- [212] G.A. Konesky, *COLD PLASMAJET HAND SANITIZER* C. Bovie Medical Corporation, FL (US) Editor, 2013. US 2013/0202496 A1: United States.
- [213] A. Ali, Y.H. Kim, J.Y. Lee, S. Lee, H.S. Uhm, G. Cho, B.J. Park, E.H. Choi, Inactivation of *Propionibacterium acnes* and its biofilm by non-thermal plasma, *Curr. Appl. Phys.* 14 (2014) S142–S148, <https://doi.org/10.1016/j.cup.2013.12.034>.
- [214] F. Woodland, F. Osolin, J.-Y. Legendre, G. Vic, in: *COSMETIC USE OF A COLD PLASMA*, L'OREAL, France, 2014.
- [215] Z. Xiong, J. Roe, T.C. Grammer, D.B. Graves, Plasma treatment of onychomycosis, *Plasma Process. Polym.* 13 (6) (2016) 588–597, <https://doi.org/10.1002/ppap.201600010>.
- [216] S. Verdier-Sévrain, F. Bonté, Skin hydration: a review on its molecular mechanisms, *J. Cosmet. Dermatol.* 6 (2) (2007) 75–82, <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x>.
- [217] L. Cau, V. Pendaries, E. Lhuillier, P.R. Thompson, G. Serre, H. Takahara, M.-C. Méchin, M. Simon, Lowering relative humidity level increases epidermal protein deimination and drives human filaggrin breakdown, *J. Dermatol. Sci.* 86 (2) (2017) 106–113, <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.02.280>.
- [218] A.V. Rawlings, C.R. Harding, Moisturization and skin barrier function, *Dermatol. Ther.* 17 (s1) (2004) 43–48, <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04S1005.x>.
- [219] E.H. Mojumdar, Q.D. Pham, D. Topgaard, E. Sparr, Skin hydration: interplay between molecular dynamics, structure and water uptake in the stratum corneum, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017), <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15921-5>, 15712–15712.
- [220] M.J. Choi, H.I. Maibach, Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin, *Am. J. Clin. Dermatol.* 6 (4) (2005) 215–223, <https://doi.org/10.2165/00128071-200506040-00002>.
- [221] J.W. Fluhr, S. Sassning, O. Lademann, M.E. Darvin, S. Schanzer, A. Kramer, H. Richter, W. Sterry, J. Lademann, In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum, *Exp. Dermatol.* 21 (2) (2012) 130–134, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2011.01411.x>.
- [222] K.W. Foster, R.L. Moy, E.F. Fincher, Advances in plasma skin regeneration, *J. Cosmet. Dermatol.* 7 (3) (2008) 169–179, <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00385.x>.
- [223] D.K. Athanasopoulos, P. Svarnas, A. Gerakis, Cold plasma bullet influence on the water contact angle of human skin surface, *J. Electrostat.* 102 (2019) 103378, <https://doi.org/10.1016/j.elstat.2019.103378>.
- [224] C. Kaemling, A. Kaemling, S. Tümmel, W. Viöl, Plasma treatment on finger nails prior to coating with a varnish, *Surf. Coating. Technol.* 200 (1) (2005) 668–671, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2005.01.065>.
- [225] J.-S. Oh, E.J. Szili, G. Nishtha, S.-H. Hong, H. Furuta, A. Kurita, A. Mizuno, A. Hattar, R.D. Short, How to assess the plasma delivery of RONS into tissue fluid and tissue, *J. Phys. Appl. Phys.* 49 (30) (2016) 304005, <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/30/304005>.
- [226] L. Nie, Y. Yang, J. Duan, F. Sun, X. Lu, G. He, Effect of tissue thickness and liquid composition on the penetration of long-lifetime reactive oxygen and nitrogen species (RONS) generated by a plasma jet, *J. Phys. Appl. Phys.* 51 (34) (2018) 345204, <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aad427>.
- [227] M. Boury-Jamot, J. Daraspe, F. Bonte, E. Perrier, S. Schnebert, M. Dumas, J. M. Verbavatz, Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis, *Handb. Exp. Pharmacol.* (190) (2009) 205–217, https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_10.
- [228] R. Patel, L. Kevin Heard, X. Chen, W.B. Bollag, in: *Aquaporins*, B. Yang (Eds.), *Aquaporins in the Skin*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2017, pp. 173–191, https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_11.
- [229] Y. Dayun, X. Haijie, Z. Wei, N. Niki, Z. Lijie Grace, B. Ka, K. Michael, The role of aquaporins in the anti-glioblastoma capacity of the cold plasma-stimulated medium, *J. Phys. Appl. Phys.* 50 (5) (2017), 055401, <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa53d6>.
- [230] M. Yusupov, J. Razzokov, R.M. Cordeiro, A. Bogaerts, Transport of reactive oxygen and nitrogen species across aquaporin: a molecular level picture, *Oxidative medicine and cellular longevity* (2019), <https://doi.org/10.1155/2019/2930504>, 2019, 2930504–2930504.
- [231] M. Yusupov, J. Van der Paal, E.C. Neyts, A. Bogaerts, Synergistic effect of electric field and lipid oxidation on the permeability of cell membranes, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1861 (4) (2017) 839–847, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.01.030>.
- [232] V. Vijayarangan, A. Delalande, S. Dozias, J. Pouvesle, C. Pichon, E. Robert, Cold atmospheric plasma parameters investigation for efficient drug delivery in HeLa cells, *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* 2 (2) (2018) 109–115, <https://doi.org/10.1109/TRPMS.2017.2759322>.
- [233] J. Lademann, H. Richter, A. Kramer, O. Lademann, Enhancement of the Penetration of Topically Applied Substances by Tissue-Tolerable Plasma, 2018, pp. 441–447, https://doi.org/10.1007/978-3-319-67627-2_27.
- [234] M. Gelker, C.C. Müller-Goymann, W. Viöl, Permeabilization of human stratum corneum and full-thickness skin samples by a direct dielectric barrier discharge, *Clinical Plasma Medicine* 9 (2018) 34–40, <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2018.02.001>.
- [235] K. Shimizu, K. Hayashida, M. Blajan, Novel method to improve transdermal drug delivery by atmospheric microplasma irradiation, *Biointerphases* 10 (2) (2015), <https://doi.org/10.1116/1.4919708>, 029517.
- [236] H.Y. Lee, J.H. Choi, J.W. Hong, G.C. Kim, H.J. Lee, Comparative study of the Ar and He atmospheric pressure plasmas on E-cadherin protein regulation for plasma-mediated transdermal drug delivery, *J. Phys. Appl. Phys.* 51 (21) (2018) 215401, <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aab8dc>.
- [237] T. Darny, J.M. Pouvesle, V. Puech, C. Douat, S. Dozias, R. Eric, Analysis of conductive target influence in plasma jet experiments through helium metastable and electric field measurements, *Plasma Sources Sci. Technol.* 26 (4) (2017), <https://doi.org/10.1088/1361-6595/aa5b15>, 045008.
- [238] O. Guaitella, A. Sobota, The impingement of a kHz helium atmospheric pressure plasma jet on a dielectric surface, *J. Phys. Appl. Phys.* 48 (25) (2015) 255202, <https://doi.org/10.1088/0022-3727/48/25/255202>.
- [239] K. Aboubakar, F.P. Saint, C. Muja, B. Caillier, P. Guillot, Investigation of the interaction between a helium plasma jet and conductive (Metal)/Non-Conductive (dielectric) targets, *Plasma Med.* 7 (2018), <https://doi.org/10.1615/PlasmaMed.2018019503>.
- [240] A. Stancampiano, T. Chung, S. Dozias, J. Pouvesle, L.M. Mir, E. Robert, Mimicking of human body electrical characteristic for easier translation of plasma biomedical studies to clinical applications, *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* 4 (3) (2020) 335–342, <https://doi.org/10.1109/TRPMS.2019.2936667>.
- [241] D.B. Graves, Lessons from tesla for plasma medicine, *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences* 2 (6) (2018) 594–607, <https://doi.org/10.1109/TRPMS.2018.2866373>.
- [242] S. Snyder, C. DeJulius, R.K. Willits, Electrical stimulation increases random migration of human dermal fibroblasts, *Ann. Biomed. Eng.* 45 (9) (2017) 2049–2060, <https://doi.org/10.1007/s10439-017-1849-x>.
- [243] M. Rouabhi, H. Park, S. Meng, H. Derbali, Z. Zhang, Electrical stimulation promotes wound healing by enhancing dermal fibroblast activity and promoting myofibroblast transdifferentiation, *PLoS One* 8 (8) (2013), e71660, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071660>.

- [244] J. Dube, O. Rochette-Drouin, P. Levesque, R. Gauvin, C.J. Roberge, F.A. Auger, D. Goulet, M. Bourdages, M. Plante, V.J. Moulin, L. Germain, Human keratinocytes respond to direct current stimulation by increasing intracellular calcium: preferential response of poorly differentiated cells, *J. Cell. Physiol.* 227 (6) (2012) 2660–2667, <https://doi.org/10.1002/jcp.23008>.
- [245] A. Golberg, S. Khan, V. Belov, K.P. Quinn, H. Albadawi, G. Felix Broelsch, M. T. Watkins, I. Georgakoudi, M. Papisov, M.C. Mihm Jr., W.G. Austen Jr., M. L. Yarmush, Skin rejuvenation with non-invasive pulsed electric fields, *Sci. Rep.* 5 (2015) 10187, <https://doi.org/10.1038/srep10187>.
- [246] F. Judée, T. Dufour, Plasma gun for medical applications: engineering an equivalent electrical target of the human body and deciphering relevant electrical parameters, *J. Phys. Appl. Phys.* 52 (16) (2019), 16LT02, <https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab03b8>.
- [247] A. Scavone, M.J. Kadziolka, C.J. Miller, State and trait mindfulness as predictors of skin conductance response to stress, *Appl. Psychophysiol. Biofeedback* (2020), <https://doi.org/10.1007/s10484-020-09467-y>.
- [248] M.E. Dawson, A.M. Schell, D.L. Filion, The electrodermal system, in: G. G. Berntson, J.T. Cacioppo, L.G. Tassinary (Eds.), *Handbook of Psychophysiology*, Cambridge University Press, Cambridge, 2016, pp. 217–243, <https://doi.org/10.1017/9781107415782.010>.
- [249] D. Gidon, D.B. Graves, A. Mesbah, Effective dose delivery in atmospheric pressure plasma jets for plasma medicine: a model predictive control approach, *Plasma Sources Sci. Technol.* 26 (8) (2017), 085005, <https://doi.org/10.1088/1361-6595/aa7c5d>.
- [250] P.-M. Girard, A. Arbabian, M. Fleury, G. Bauville, V. Puech, M. Dutreix, J. S. Sousa, Synergistic effect of H₂O₂ and NO₂ in cell death induced by cold atmospheric He plasma, *Sci. Rep.* 6 (1) (2016) 29098, <https://doi.org/10.1038/srep29098>.
- [251] T. Bernhardt, M.L. Semmler, M. Schäfer, S. Bekeschus, S. Emmert, L. Boeckmann, Plasma medicine: applications of cold atmospheric pressure plasma in dermatology, *Oxidative medicine and cellular longevity* (2019), <https://doi.org/10.1155/2019/3873928>, 2019, 3873928–3873928.

Nadira CHETTOUH HAMMAS

Influence du taux d'oxygénation et du photovieillissement sur l'activité antioxydante des cellules de la peau

Ces dernières décennies ont été marquées par le développement de modèles de peau *in vitro* qui se rapprochent de plus en plus de la physiologie du tissu cutané *in vivo*, ceci pour trouver des modèles alternatifs aux animaux de laboratoire. Malgré ces progrès, le microenvironnement cutané n'est pas tout à fait respecté, en particulier la pression partielle en oxygène. En effet, les niveaux physiologiques d'oxygène dans la peau varient de 1,5% à 7% (physioxie). Cependant, les modèles se font au taux d'oxygène atmosphérique (~18,6% O₂ dans les incubateurs), donc les cellules cutanées se trouvent en hyperoxygénation. Bien que, l'oxygène soit la principale source d'énergie des cellules, il est aussi connu comme le précurseur des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont impliquées dans le stress oxydant décrit comme la principale cause du photovieillissement.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier l'influence du taux d'oxygénation sur le stress oxydant dans la peau. La première étape a consisté à établir de nouveaux modèles de culture des cellules de l'épiderme, 2D et 3D, en physioxie, puis à caractériser leurs capacités antioxydantes par l'évaluation de la production de ROS et des enzymes associées (SODs, Catalase et GPXs). La seconde partie a consisté à reproduire le processus du photovieillissement par irradiation UV en physioxie, et à évaluer les capacités antioxydantes en comparaison avec le modèle classique en normoxie.

Dans un premier temps, nous avons démontré une meilleure résistance des cellules (modèle 2D) en physioxie contre un stress oxydant qui est due à la régulation du taux basal des enzymes antioxydantes en physioxie, avec une suractivation de la catalase et une surproduction de la SOD2. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle plus physiologique des épidermes reconstruits en physioxie. Dans un second temps, nos résultats montrent que les mêmes enzymes sont aussi modulées en réponse aux irradiations UV dans des modèles mimant le photovieillissement. Cette condition d'oxygénation physiologique après irradiation par les UV induit une surexpression rapide de la SOD2 et une translocation de la SOD1 dans les noyaux, suggérant ainsi un nouveau rôle de cette enzyme en réponse à un stress oxydant. Cette étude établit pour la première fois un lien entre le taux d'oxygénation et les capacités antioxydantes de la peau. En conséquence, ces résultats mettent en évidence l'importance de respecter la physioxie pour mieux comprendre le stress oxydant et le photo-vieillissement

Mots clés : peau, physioxie, stress oxydant, antioxydant, normoxie

Effects of oxygen levels and photoaging on cutaneous antioxidant activity

In recent years, the development of *in vitro* skin models that approximate the physiology of skin tissue *in vivo* has occurred, thus, to find alternative models to laboratory animals. However, the skin microenvironment is not completely respected, especially the partial pressure of oxygen. In fact, physiological oxygen levels in the skin range from 1.5% to 7%, physioxia. However, these models are usually performed at atmospheric oxygen levels (~18.6% O₂ in incubators), so skin cells are in a hyperoxic environment. While, oxygen is the main source of cell energy, it is also known to be the precursor of reactive oxygen species (ROS) which are involved in the oxidative stress reported as the major cause of photoageing.

My thesis work focused on the effect of oxygenation levels of oxidative stress in the skin. The first step was to develop new 2D and 3D models of epidermal cells in physioxia, and then to characterize their antioxidant potential by the evaluation of ROS production and associated enzymes (SODs, Catalase and GPXs). The second part of the study was to reproduce the process of photoaging by UV irradiation under physioxia and compare the antioxidant capacities with the classic normoxia model.

Firstly, we demonstrated a better resistance of cells (2D model) in physioxia against oxidative stress. This was due to the upregulation of the basal levels of antioxidant enzymes in physioxia, with an overactivation of catalase and an overproduction of SOD2. These results were further confirmed in a more physiological model, the reconstructed epidermis in physioxia. In a second step, the same enzymes were also modulated in response to UV irradiation in models mimicking photoageing. Following UV irradiation, the physiological oxygenation condition induces a quick overexpression of SOD2 and the translocation of SOD1 into the nuclei, suggesting a new involvement of this enzyme in oxidative stress response. This is the first time that a study links the oxygen level to oxidative stress in the skin. These results, therefore, illustrate the importance of respecting skin physiology to better understand oxidative stress and photoaging.

Keywords: physioxia, oxidatif stress, antioxydant, normoxia