

Table des matières

Abréviations	7
But du travail	9
Résumé	11
INTRODUCTION	13
I. Le marché mondial des produits « anti-âge »	14
II. Les cellules de la peau	15
1. Les kératinocytes	15
2. Les fibroblastes	17
3. Les mélanocytes	19
III. Stress oxydant	21
1. Définition	21
2. Oxydation des protéines	22
IV. Le vieillissement cellulaire cutané	25
1. Le vieillissement cellulaire intrinsèque	25
2. Le vieillissement cellulaire extrinsèque	28
3. Effets des UV sur la peau	30
3.1. Effets biologiques des UVA	32
3.2. Effets biologiques des UVB	33
V. Les systèmes de protection endogènes	35
1. Systèmes cellulaires antioxydants	
1.1. Catalase	35
1.2. Superoxyde dismutase	35
1.3. Glutathion peroxydase	35
1.4. Thioredoxines	36
2. Enzymes de phase I et II	36
3. Rôle du glutathion et des enzymes de phase II dans la protection cellulaire	38
3.1. Glutathion	38
3.2. Glutathion-S-transférase	39
3.3. NADPH : quinone oxydoréductase 1	41
4. La protéostasie cellulaire	42
5. Le protéasome	43
6. Le système Keap1-Nrf2	46
VI. La famille des Brassicacées	47
1. Présentation	47
2. Nutrition et santé	49
VII. Molécules soufrées cytoprotectrices	50
1. Sulforaphane	50
1.1. Synthèse naturelle du sulforaphane	50
1.2. Un cytoprotecteur puissant	53

1.3. Mécanisme du sulforaphane dans la cytoprotection	53
2. L'acide α -lipoïque	54
2.1. L'antioxydant universel	54
2.2. Les activités biologiques de l'acide lipoïque.....	56

Partie expérimentale I : Evaluation des effets du SFN et l'AL sur l'activité protéasomale d'un modèle expérimental de vieillissement cutané de fibroblastes humains normaux.

Matériel et Méthodes	59
I. Culture cellulaire	60
1. Origine des molécules utilisées	60
2. Lignée cellulaire NHDF.....	60
3. Milieux et conditions de culture.....	61
II. Test MTT	62
1. Principe de la méthode	62
2. Méthode utilisée	63
III. Prolifération cellulaire : comptage au bleu de Trypan	64
1. Principe de la méthode	64
2. Méthode utilisée	64
IV. Mesure de la production de ROS par cytométrie de flux et CAA	65
1. Principe de la méthode	65
2. Méthode utilisée	66
V. Mesure de la carbonylation des protéines.....	67
1. Principe de la méthode	67
2. Méthode utilisée	67
VI. Expression génique de PSMB5 et Nrf2 par RT-PCR.....	69
1. Principe de la méthode	69
2. Méthode utilisée	71
VII. Expression protéique des sous-unités du protéasome 20S par WB et immunofluorescence	72
1. Principe de la méthode du WB.....	72
2. Méthode utilisée	74
3. Principe de la microscopie à fluorescence et immunofluorescence	76
4. Méthode utilisée	76
VIII. Mesure de l'activité du protéasome par chémiluminescence	77
1. Principe de la méthode	77
2. Méthode utilisée	78
IX. Analyses statistiques	78
Résultats	79
I. Cytotoxicité des composés	80
II. Effets de l'AL et du SFN sur la prolifération cellulaire	81
III. Effets de l'AL et du SFN sur le taux de ROS intracellulaire	83
IV. Effets de l'AL et du SFN sur la carbonylation des protéines.....	84

V. Effets de l'AL et du SFN sur l'expression génique de PSMB5 et Nrf2.....	87
VI. Effets de l'AL et du SFN sur l'expression protéique de PSMB5 et Nrf2.....	89
VII. Effets de l'AL et du SFN sur l'activité du protéasome 20S.....	92

Partie expérimentale II : Induction des enzymes de phase II glutathion-S-transférase et NADPH : quinone oxydoréductase-1 par des dérivés originaux du sulforaphane sur un modèle de kératinocytes humains HaCat.

Matériel et Méthodes	96
I. Culture cellulaire	97
1. Origine des molécules utilisées	97
2. Lignée cellulaire HaCat	98
3. Milieux et conditions de culture.....	98
II. Test MTT	99
1. Méthode utilisée	99
III. Mesure de la quantité de GSH intracellulaire	100
1. Principe de la méthode	101
2. Méthode utilisée	102
IV. Mesure de l'activité de la GST intracellulaire	103
1. Principe de la méthode	103
2. Méthode utilisée	104
V. Mesure de l'activité de la NQO1	105
1. Principe de la méthode	105
2. Méthode utilisée	106
VI. Analyses statistiques	107
Résultats	108
I. Cytotoxicité des composés	109
II. Effets du SFN et de ses dérivés sur le taux de GSH intracellulaire et sur l'activité des enzymes de phase II GST et NQO1	111
DISCUSSION	113
I. Le protéasome dans le vieillissement cellulaire	114
II. Les méthodes de mesures des capacités antioxydantes	115
III. Les produits « anti-âge » existants	116
1. Le « skin care »	116
2. Les procédures invasives	117
IV. L'acide lipoïque comme stimulateur de la fonction cellulaire	118
V. Le sulforaphane comme inducteur du protéasome et des enzymes de phase II	120
PERSPECTIVES	122
CONCLUSION	126

BIBLIOGRAPHIE	129
----------------------------	------------

ANNEXES.....	149
---------------------	------------

Annexe 1 : Sikdar S., Lallemand B., Dubois J. Induction of Phase II Enzymes Glutathione-S-Transférase and NADPH : Quinone Oxydoreductase 1 with Novel Sulforaphane Derivatives in Human Keratinocytes : Evaluation of the Intracellular GSH Level. Pharmacology and Pharmacy. 2014. 5 : 937-43

Annexe 2 : Sikdar S., Papadopoulou M., Dubois J. Effect of α -Lipoic Acid on Proteasomal Induction : Protection Against Oxidative Damage in Human Skin Fibroblasts Cell Line NHDF. Pharmacology and Pharmacy. 2017. 8

Annexe 3 : Sikdar S., Papadopoulou M., Dubois J. What do we know about sulforaphane protection against photoaging ? Journal of Cosmetic Dermatology. 2016. 15 : 72-7

Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ARNm du kit NucléoSpin

Annexe 5 : Mise au point des méthodes de mesure du GSH et de la GST