



HAL
open science

Rôle des mélanocytes dans l'unité épidermique de mélanisation reconstruite ex-vivo après une irradiation UV aiguë

Muriel Cario-Andre

► **To cite this version:**

Muriel Cario-Andre. Rôle des mélanocytes dans l'unité épidermique de mélanisation reconstruite ex-vivo après une irradiation UV aiguë. Biologie cellulaire. Université Victor Segalen - Bordeaux II, 2000. Français. NNT: . tel-00194194

HAL Id: tel-00194194

<https://theses.hal.science/tel-00194194>

Submitted on 5 Dec 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Victor Ségalen Bordeaux 2

Année 2000

Thèse n°

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologiques et Médicales

Option : Biologie Santé

Présentée et soutenue publiquement le :

23 Novembre 2000

par

Muriel CARIO-ANDRE

RÔLE DES MÉLANOCYTES DANS L'UNITÉ ÉPIDERMIQUE DE MÉLANISATION RECONSTRUITE EX-VIVO APRÈS UNE IRRADIATION UV AIGUË

Membre du Jury :

M. DARMON Michel , Professeur en Biochimie.	Président
M. BEANI Jean-Claude , Professeur en Dermatologie	Rapporteur
M. SCHMITT Daniel , Directeur de recherche INSERM	Rapporteur
M. PICARDO Mauro , Docteur en Dermatologie	Examineur
M. TAIEB Alain , Professeur en Dermatologie	Examineur

INTRODUCTION	14
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	17
1 LA PEAU.....	19
1.1 Structure de la peau.....	19
1.1.1 L'épiderme.....	19
1.1.2 Le derme.....	20
1.1.3 L'hypoderme.....	20
1.2 Les cellules épidermiques	20
1.2.1 Mélanocytes.....	20
1.2.2 Kératinocytes	21
1.2.3 Cellules de Langerhans.....	22
1.2.4 Cellules de Merkel.....	22
1.3 La pigmentation	24
1.3.1 Mélanogenèse.....	25
1.3.1.1 Eumélananogenèse	25
1.3.1.2 Phéomélanogenèse	26
1.3.1.3 Transfert des mélanosomes	26
1.3.2 α -MSH.....	27
1.4 Rôle des lipides	28
2 PEAU ET RAYONNEMENT SOLAIRE.....	30
2.1 Les ultraviolets	31
2.1.1 Effets biochimiques des UV.....	31
2.1.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène.....	32
2.1.1.1.1 Superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle.....	32
2.1.1.1.1.1 Réactions en absence d'ions métalliques.....	33
2.1.1.1.1.2 Réaction en présence d'ions métalliques.....	34

2.1.1.1.2	Monoxyde d'azote, peroxydite	34
2.1.1.2	Autres espèces réactives	36
2.1.1.2.1	Oxygène singulet	36
2.1.1.2.2	Acide hypochlorique	36
2.1.1.3	Lésions UV induites	39
2.1.1.3.1	Les lésions de l'ADN	39
2.1.1.3.2	L'oxydation des protéines	40
2.1.1.3.3	UV et lipides	41
2.1.1.3.3.1	Lipoperoxydation	41
2.1.1.3.3.2	Phospholipases, cyclooxygénases, sphingomyélinase	43
2.1.1.3.4	UV et mélanocyte	44
2.1.1.3.4.1	Données générales	44
2.1.1.3.4.2	UV et mélanogenèse	44
2.1.1.3.4.3	Rôles de la mélanine	45
2.1.2	Changements morphologiques de la peau après irradiation	46
2.1.2.1	UVA	46
2.1.2.2	UVB	47
2.1.2.3	Influence du phototype	47
2.2	Systèmes de défense et de réparation	48
2.2.1	Réparation des lésions de l'ADN	48
2.2.1.1	Réparation par excision de nucléotides	48
2.2.1.2	Réparation par excision de base	52
2.2.1.3	Réparation par photoréactivation	52
2.2.1.4	Réparation post-réplivative	52
2.2.2	Protection de la lipoperoxydation	53
2.2.3	Réparation et dégradation des protéines oxydées	54
2.2.3.1	Réparation des protéines oxydées	54
2.2.3.2	Dégradation des protéines oxydées	54
2.2.4	Défenses envers les espèces réactives de l'oxygène	55
2.2.4.1	Enzymes antioxydantes principales	55
2.2.4.1.1	Superoxyde dismutases	55
2.2.4.1.2	Catalase	55
2.2.4.1.3	Glutathion peroxydases / glutathion réductase	55
2.2.4.1.4	Thioredoxine peroxydase / thioredoxine réductase	56
2.2.4.2	Principaux antioxydants naturels non-enzymatiques	56

2.2.4.2.1	Vitamine E (α -tocophérol).....	56
2.2.4.2.2	Acide ascorbique ou Vitamine C	57
2.2.4.2.3	Caroténoïdes	57
2.2.4.2.4	Glutathion	57
2.2.4.2.5	Métallothionéines.....	57
2.2.4.2.6	Thioredoxine	57
2.2.4.3	Effet des UV sur les défenses antioxydantes de la peau	58
2.2.5	Apoptose UV-induite.....	59
2.2.5.1	Rôle des mitochondries dans l'apoptose	60
2.2.5.2	Les caspases	62
2.2.5.3	Les céramides	62
2.3	Cancers cutanés.....	63
2.3.1	Mutations de l'ADN	63
2.3.2	Carcinomes	64
2.3.3	Mélanomes	69
2.3.4	Conclusions	70
2.4	Photoprotection	70
2.4.1	Photoprotection naturelle	70
2.4.2	Photoprotecteurs externes	71
2.4.2.1	Les écrans physiques	71
2.4.2.2	Les filtres chimiques	71
2.4.2.2.1	Les filtres à spectre étroit	72
2.4.2.2.2	Les filtres à spectre large	72
2.4.2.3	Autres agents photoprotecteurs	72
2.4.2.4	Les vêtements.....	73
2.4.2.5	Les préparations solaires	74
2.4.3	Intérêts et limites des photoprotecteurs externes.....	74
2.4.3.1	Effets à court terme	74
2.4.3.2	Effets à long terme	75
2.4.3.3	Epidémiologie des cancers cutanés et photoprotecteurs externes et naturels ..	75
3	EPIDERMES RECONSTRUITS.....	79

3.1	Epidermes reconstruits sur DED.....	79
3.1.1	Epidermes reconstruits avec des kératinocytes	81
3.1.1.1	Epidermes reconstruits en milieu DMEM/Ham/sérum bovin.....	81
3.1.2	Epidermes reconstruits avec des kératinocytes et des mélanocytes	83
3.1.2.1	Epidermes reconstruits avec des mélanocytes en milieu IMDM/MCDB153/SVF	83
3.1.2.2	Epidermes reconstruits avec des mélanocytes en milieu DMEM/Ham/sérum bovin	84
3.1.2.3	Epidermes reconstruits avec des mélanocytes en milieu Rheinwald-Green modifié	85
3.1.3	Epidermes reconstruits avec des kératinocytes, des mélanocytes et des cellules de Langerhans	85
3.2	Effet des UV sur les épidermes reconstruits.....	86
3.2.1	Effet des UV sur les épidermes reconstruits avec des mélanocytes sur DED	86
3.2.2	Effet des UV sur les épidermes reconstruits sur lattices ou peaux équivalentes.....	86
3.3	Champs d'application du modèle d'épiderme reconstruit	87
3.3.1	Etudes cellulaires.....	87
3.3.1.1	Mélanocytes	87
3.3.1.2	Kératinocytes.....	87
3.3.1.3	Supplémentation du milieu.....	87
3.3.2	Etude de différentes affections	90
3.3.2.1	Carcinomes.....	90
3.3.2.2	Mélanomes	90
3.3.2.3	Nævus pigmentaires	90
3.3.2.4	Vitiligo	91
3.3.2.5	Epidermolyse bulleuse	91
3.3.2.6	Xeroderma pigmentosum	91
3.3.2.7	Candidoses cutanées.....	91
3.3.3	Test de molécules actives	92
3.3.3.1	Etude des modificateurs de la pigmentation	92
3.3.3.2	Etude des écrans solaires.....	92

3.3.3.3	Etude de l'irritation	92
3.3.4	Amélioration du modèle d'épiderme reconstruit	93
3.3.5	Conclusions	93
RESULTATS		95
1 ARRIÈRE-PLAN GÉNÉRAL.....		96
2 ETUDE DE L'INFLUENCE DES MÉLANOCYTES CAUCASOÏDES DANS LES RÉPONSES ÉPIDERMIQUES INDUITES PAR UNE IRRADIATION AIGUË		97
2.1	Arrière-plan.....	97
2.2	But de l'étude.....	98
2.3	Méthodologie générale.....	98
2.4	Principaux résultats	99
2.5	Résultats complémentaires.....	99
2.6	Conclusions	101
2.7	Article : Studies on epidermis with and without melanocytes : melanocytes prevent sunburn cell formation but not appearance of DNA damaged cells in fair-skinned caucasians	101
3 IMPORTANCE DE LA CONCENTRATION EN MÉLANINE ET EN ACIDES GRAS POLYINSATURÉS DANS LES RÉPONSES ÉPIDERMIQUES UV-INDUITES.....		114
3.1	Arrière-plan.....	114

3.2	But de l'étude.....	114
3.3	Méthodologie générale.....	114
3.4	Principaux résultats.....	115
3.5	Résultats complémentaires.....	116
3.6	Conclusions.....	116
3.7	Article : Comparative study of UVB, UVA and UVA plus B on Reconstructed Epidermis with and without Melanocytes : Importance of Melanin and Unsaturated Fatty Acids concentrations in Epidermal Responses to UV	117
3.8	Article : The reconstructed epidermis with melanocytes: a new tool to study pigmentation and photoprotection	139
4	LE MÉLANOCYTE PEUT-IL ÊTRE ASSIMILÉ À UN MÉLANGE D'ACIDES GRAS POLYINSATURÉS ET DE MÉLANINE.....	145
4.1	Arrière-plan.....	145
4.2	But de l'étude.....	145
4.3	Méthodologie générale.....	145
4.4	Principaux résultats.....	146
4.5	Conclusions.....	147
4.6	Article : Influence of Polyunsaturated Fatty acids concentration on Basal Epidermal Status And in Epidermal Responses to UV : Comparative	

study on Non-Irradiated and Irradiated Reconstructed Epidermis with or without Melanocytes supplemented or not with PUFA..... 148

5 L'ÉPIDERME RECONSTRUIT EST-IL UN BON MODÈLE POUR ÉTUDIER LES MOLÉCULES PHOTOPROTECTRICES TOPIQUES ET SYSTÉMIQUES 148

5.1 But de l'étude..... 148

5.2 Méthodologie générale..... 148

5.3 Principaux résultats 174

5.4 Résultats complémentaires..... 174

5.5 Conclusions 175

5.6 Article : Epidermal Reconstructs : A new tool to study topical and systemic photoprotective molecules..... 175

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 200

1- CONCLUSIONS 201

2- PERSPECTIVES 205

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 210

ABREVIATIONS

5OHdC	5-hydroxy-2'-désoxycytosine
6-4 PP	6-4 photoproduits
8-oxodG	7,8-dihydro-8-oxodésoxyguanosine
ACTH	Hormone adrénocorticotropique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AHP	Aminohydroxyphenylalanine
AIF	Facteur induisant l'apoptose / (apoptosis-inducing factor)
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator Protein-1 / Protéine activatrice-1
Apaf1	Facteur apoptotique activant des proteases / apoptosis protease-activating factor-1
ARN	Acide ribonucléique
AT	Aminotyrosine
ATP	Adénosine triphosphate
BCC	Carcinome basocellulaire
BER	Réparation par excision de base
bFGF	Facteur basal de croissance des fibroblastes
CoA	Coenzyme A
CPD	Dimère Cyclobutane de Pyrimidine
cyt c	cytochrome c
DAG	Diacylglycérol
DEM	Dose érythémateuse minimale
DewarPP	Isomère de Dewar
DFF	DNA Fragmentation Factor
DHI	Dihydroxyindole
DHICA	Acide dihydroxyindole carboxylique
DPC	Interaction ADN-Protéine (DNA-Protein crosslink)

EGF	Facteur de croissance épidermique
ER/RE	Epiderme reconstruit
ERK/REK	Epiderme reconstruit avec des kératinocytes
ERM/REM	Epiderme reconstruit avec des kératinocytes et des mélanocytes
ET-1	Endothéline-1
GGR	Réparation globale du génome
GSH	Glutathion
GSHPx	Glutathion peroxidase
HHR23B	UV excision repair protein RAD23 homologue B
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HO-1	Hème-oxygénase
HSP	Protéine de choc thermique
IBMX	Isobutylméthylxanthine
IFN-γ	Interféron- γ
IL-1 ; -6	Interleukine 1, 6
I-κB	Inhibiteur de NF- κ B
JDE	Jonction dermo-épidermique
KGF	Facteur de croissance des kératinocytes
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphénylalanine
MDA	Malondialdéhyde
MMP	Metalloprotéinase matricielle
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucléotide
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
NER	Réparation par excision-resynthèse
NF-κB	Facteur Nucléaire- κ B
OAG	1-oleyl-2-acetylglcérol
ODC	Ornithine décarboxylase

PABA	Acide para-amino-benzoïque
PARP	Poly(ADP-ribosyl)polymérase
PB-DOPA	Protéine liée à un groupement 3-4 dihydroxyphénylalanine
PCNA	Antigène nucléaire de prolifération cellulaire / Proliferating Cell Nuclear Antigen
PGE-2	Prostaglandine E2
PHGSHPx	Glutathion peroxidase spécifique des phospholipides
PKC	Protéine kinase C
POMC	Proopiomélanocortine
pTpT	Dimère de Thymine
PUFA	Acides gras polyinsaturés
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
RPA	Protéine de réplication A / Replication Protein A
SBC	Sunburn cell : kératinocyte apoptotique
SCC	Carcinome spinocellulaire
SOD	Superoxyde dismutase
SPF	Sun Protecting Factor
SVF	Sérum de Veau fœtale
TCR	Réparation couplée à la transcription
TFIIH	Facteur de transcription de l'ARN polymérase II
TNFR1	Récepteur 1 du TNF
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale / Tumor Necrosis Facteur
TRP-1	Tyrosinase Related Protein 1
TRP-2	Tyrosinase Related Protein 2
UVA	Ultraviolets A
UVA+B	Ultraviolet A combiné aux ultraviolets B
UVB	Ultraviolets B
XP	Xeroderma pigmentosum
XPA,B,C,D	Xeroderma pigmentosum

,E	Groupe de complémentation A, B, C, D, E
α-MSH	Hormone stimulant les mélanocytes / Melanocyte Stimulating Hormon

PRINCIPAUX SYMBOLES ET FORMULES

H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HO· ou OH·	Radical hydroxyle
HO₂·	radical hydroperoxyle ·
HOCl	Acide hypochlorique
LOO·	Radical peroxyde
LOOH	Hydroperoxyde
NO	Monoxyde d'azote (Nitric oxide)
ONOO⁻	peroxynitrite
TiO₂	Dioxyde de titane
ZnO	Oxyde de zinc

INTRODUCTION

En France, depuis 1936, date d'obtention des congés payés, les vacances au soleil sont devenues une des principales activités estivales. A l'échelon international, le phénomène s'est amplifié, au cours des dernières décennies, par la démocratisation du transport aérien rendant facilement accessible, notamment aux sujets à peau claire, des latitudes auxquelles sont adaptées les peaux négroïdes. De même, le culte du bronzage a fait des UVA, outil thérapeutique, un outil de séduction. Ce changement de mode de vie, accompagné d'une augmentation quantitative et qualitative de l'exposition aux irradiations solaires et artificielles, a eu pour conséquence une augmentation importante du taux de cancers cutanés qui sont devenus un problème de santé publique à l'échelle mondiale dans les pays développés à population à peau claire.

Divers modes de prévention ont été envisagés: la non-exposition, le port de vêtements photoprotecteurs et l'utilisation de produits anti-solaires. Pour ces derniers, au centre d'une controverse, les connaissances de l'effet des UV sur la peau ont eu pour effet de faire évoluer la formulation : par exemple, dans la période la plus récente, les produits antisolaires sont passés de simples anti-UVB à des combinaisons d'anti-UVA et d'anti-UVB. En effet, pendant longtemps, seuls les UVB ont été considérés comme cancérogènes.

En général, l'incidence des cancers cutanés chez les individus de type négroïde semble nettement moins importante que chez les individus de type caucasoïde. Des carcinomes ont été observés chez des négroïdes albinos Nigériens dont les mélanocytes sont présents mais inactifs (Yakubu et Mabogunje, 1993). Une étude sur 111 albinos de type négroïde a montré un taux de cancer cutané de 23,4 % (Kromberg et al., 1989). Par contre, très peu de carcinomes cutanés ont été observés chez des patients atteints de vitiligo, dont les mélanocytes sont détruits, et ceci sans corrélation avec le phototype et la latitude (Nordlund et Ortonne, 1998). Sur 1500 patients atteints de vitiligo, 0,2 % ont développé un cancer cutané (Nordlund et Ortonne, 1998). Les malades atteints de xeroderma pigmentosum, maladie génétique de la réparation de l'ADN, sont très sensibles aux UV et développent de nombreuses tumeurs cutanées. Ces données cliniques suggèrent d'une part que les cancers cutanés peuvent être liés directement aux lésions de l'ADN induites par les UV, d'autre part, que les mélanocytes négroïdes normaux auraient un effet globalement protecteur sur la cancérogenèse cutanée; et enfin, que l'altération fonctionnelle des mélanocytes ou la diminution de leur nombre a des effets variables en termes de cancérogenèse cutanée, et ceci quel que soit le phototype cutané.

Le phototype, qui est évalué par la résistance au coup de soleil et la capacité à bronzer, n'est pas corrélé au nombre de mélanocytes mais à la quantité et au type de mélanine produite par les mélanocytes. Les études in vitro montrent que la mélanine prévient l'induction des lésions directes de l'ADN, ce qui suggère que le rôle du mélanocyte dans la cancérogenèse cutanée puisse être attribuable à la mélanine.

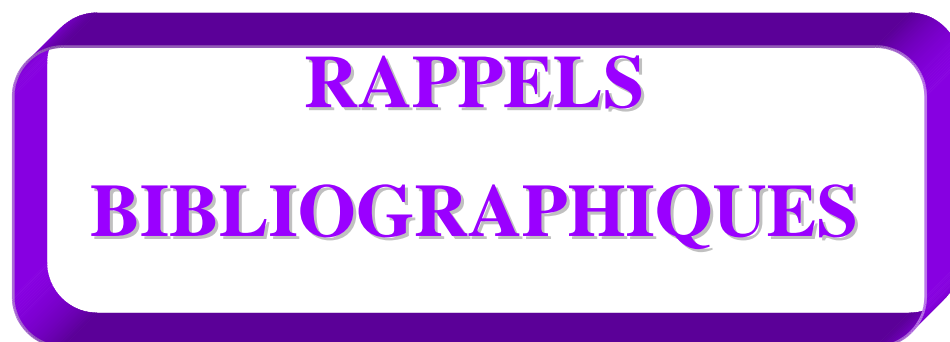
Le mélanocyte semble donc être la cellule clé dans la protection de la peau contre le stress génotoxique UV-induit et conséquemment dans la cancérogenèse cutanée, avec des variations importantes selon le phototype.

Le but de cette thèse est d'aborder objectivement la façon dont les mélanocytes de type caucasoïde influencent les réponses UV-induites de l'épiderme. Ce type d'étude n'est possible qu'ex-vivo avec un modèle tridimensionnel d'épiderme reconstruit.

Ce modèle, comme les explants cutanés, ne peut pas être utilisé à suffisamment long terme pour étudier l'apparition de tumeurs, mais il permet d'étudier les stress génotoxiques et cytotoxiques induits par les UV.

Notre étude a porté sur l'influence, à court terme, de la présence de mélanocytes normaux dans l'épiderme reconstruit, après une irradiation aiguë correspondant à 4-5 DEM d'UVB pour une peau de phototype II/III, soit environ 1- 2 heures d'exposition solaire au zénith et en été (Lowe et Friedlander, 1997).

Le soleil ayant un effet bénéfique sur la population, en particulier par son influence anti-dépressive et son rôle dans la synthèse de la vitamine D (facteur antirachitique), la mise au point de photoprotecteurs appropriés reste à l'ordre du jour. Les expérimentations animales étant en recul annoncé, les modèles alternatifs tels que les épidermes reconstruits sont appelés à être utilisés plus fréquemment pour l'étude des substances actives. Cependant, la physiologie de ces modèles doit être validée afin de déterminer dans quelle mesure leur comportement reproduit celui de l'organe correspondant in vivo. En conséquence, nous avons étudié le rôle du mélanocyte, parallèlement au comportement de l'épiderme reconstruit face aux UVB, UVA et à la combinaison UVA + UVB. Nous avons également évalué, après irradiation UV, l'efficacité d'agents photoprotecteurs appliqués sur l'épiderme reconstruit.



RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

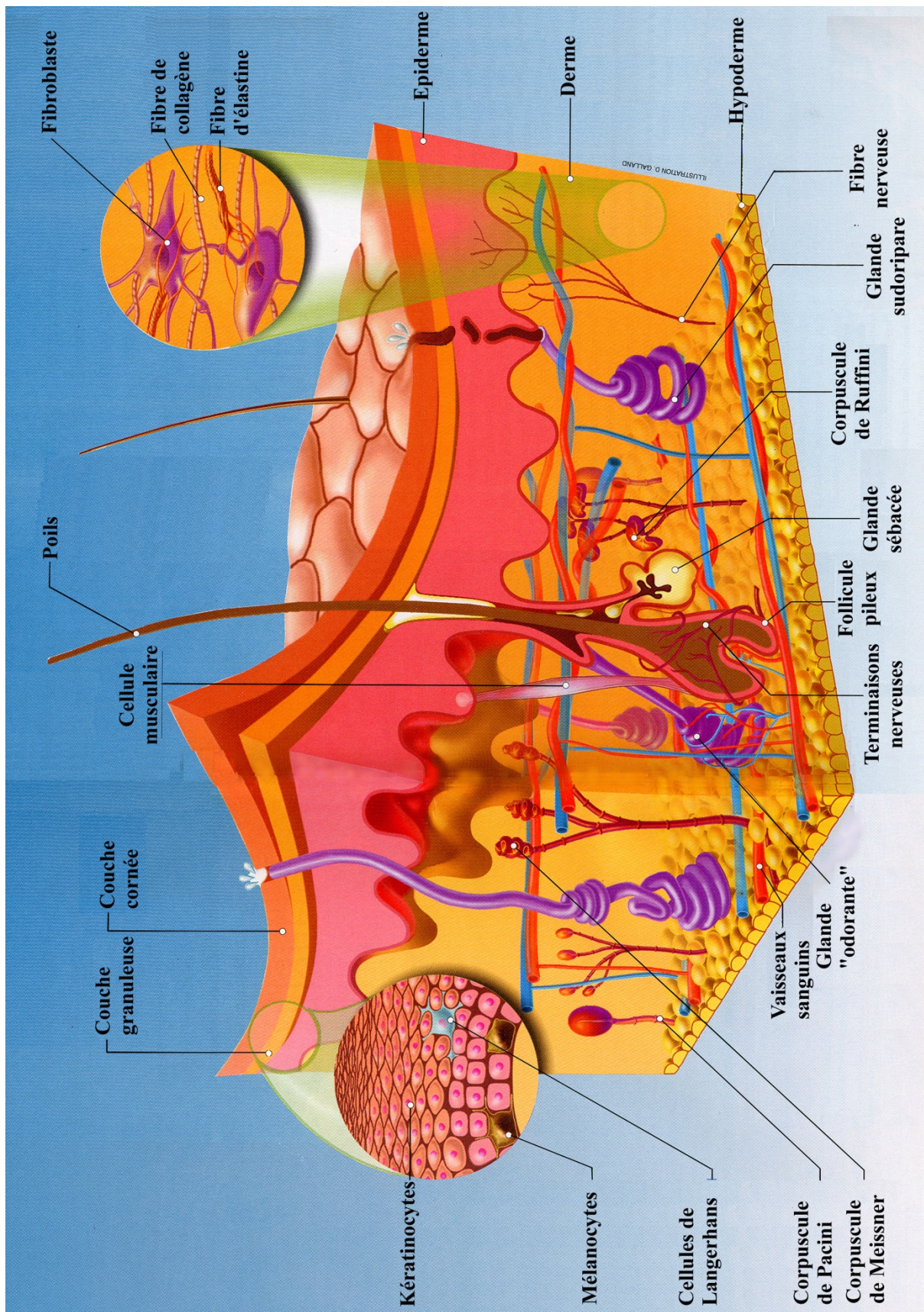


Figure 1 : Structure de la peau (Science & Vie, édition spéciale « Corps Humain », 1999)

1 La peau

La peau constitue l'organe le plus important de l'organisme, en taille et en poids. C'est la première barrière de défense de l'organisme contre les agressions extérieures (UV, composés chimiques, microorganismes). Elle est constituée de trois tissus superposés qui sont de l'extérieur vers l'intérieur, l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

1.1 Structure de la peau

1.1.1 L'épiderme

L'épiderme est constitué de 4 couches de cellules superposées, de l'extérieur vers l'intérieur : la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale.

Il est composé à 90 % de kératinocytes, 5 % de mélanocytes, 2-8 % de cellules de Langerhans et à 1 % de cellules de Merkel.

La jonction dermo-épidermique (JDE) permet la cohésion épiderme-derme. Elle est élaborée à la fois par les kératinocytes épidermiques basaux et par les fibroblastes dermiques. Elle est caractérisée par la présence de structures d'ancrage spécifiques.

La jonction épiderme-JDE est assurée par les hémidesmosomes. La cohésion derme-JDE est assurée par les fibres d'ancrage (collagènes) associées aux plaques d'ancrage.

Comme toutes les membranes basales, la jonction dermo-épidermique contrôle les échanges des produits métaboliques entre l'épiderme et le derme.

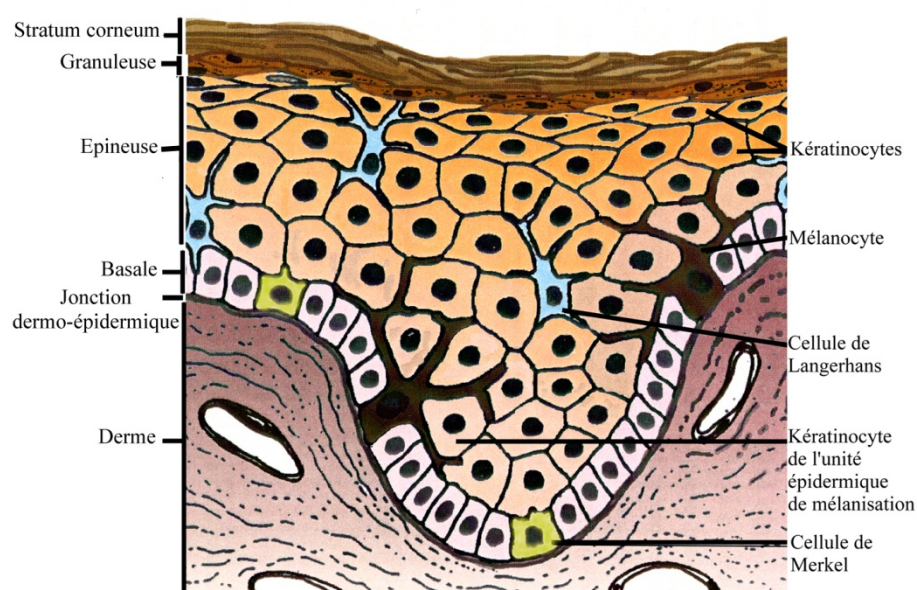


Figure 2 : Structure de l'épiderme (d'après Dominice-Franchi, 1999)

1.1.2 Le derme

Le derme est un tissu conjonctif dense qui constitue le support solide de la peau. Il est constitué de cellules, principalement les fibroblastes, et d'une matrice extracellulaire.

La matrice extracellulaire est constituée majoritairement de fibres de collagènes et d'élastine, de protéoglycanes et de glycoprotéines de structure. Le derme est vascularisé et innervé. C'est le tissu nourricier de l'épiderme. Outre les fibroblastes qui sécrètent tous les composants de la matrice extracellulaire, le derme contient d'autres composants cellulaires résidents des tissus de soutien ou passagers apportés par la vascularisation.

1.1.3 L'hypoderme

L'hypoderme sépare le derme des muscles sous-jacents. Il est constitué majoritairement d'adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage des lipides. Il représente une réserve nutritionnelle et une source de chaleur. Il est rattaché au derme par des expansions de fibres de collagènes et de fibres élastiques (Mélissopoulos et Levacher, 1998).

1.2 Les cellules épidermiques

1.2.1 Mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques pigmentogènes, issues de la crête neurale, situées au niveau de la couche basale. Ils assurent la pigmentation de la peau. Ils se divisent peu sauf sous l'effet de stimulations telles que la stimulation ultraviolette.

Au niveau de la basale, il y a 1 mélanocyte pour 5 à 10 kératinocytes. Les mélanocytes forment, avec les kératinocytes voisins des couches basale et épineuse, l'unité épidermique de mélanisation (environ un mélanocyte pour 36 kératinocytes). C'est au sein de cette unité que se fait le transfert des mélanosomes, organelles contenant la mélanine (Kanitakis, 1997).

La différence existant entre les divers phototypes ne provient pas du nombre de mélanocytes mais de leur activité pigmentogène et du transfert de la mélanine au sein de l'épiderme (Fitzpatrick et al, 1979).

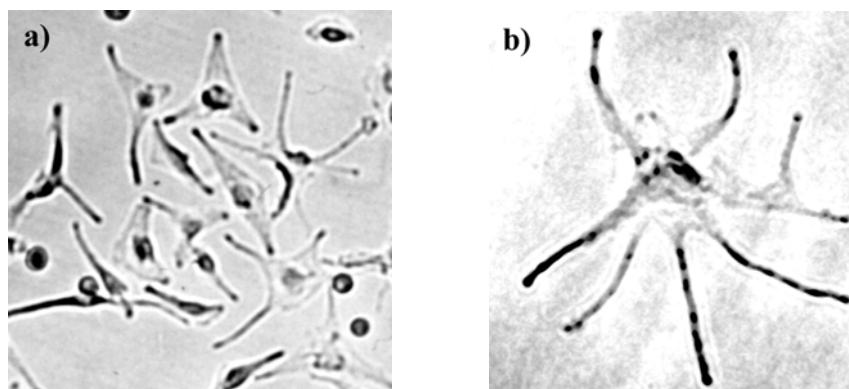
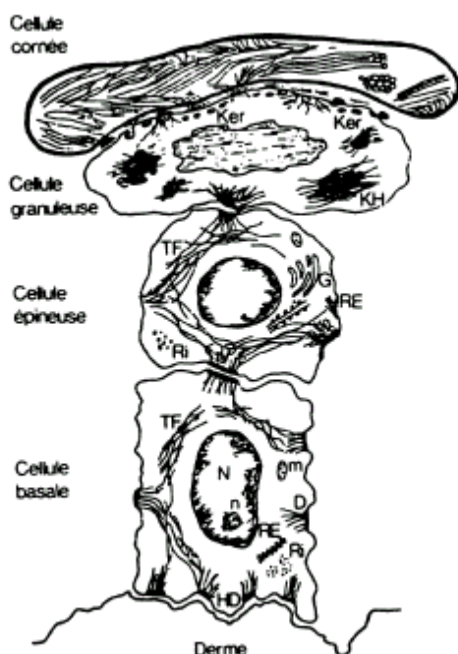


Figure 3 : Mélanocytes en culture observés en microscopie photonique. a) x200, b) x600
(Collection personnelle)

1.2.2 Kératinocytes

Les kératinocytes assurent la structuration de l'épiderme. Ils se divisent au niveau de la couche basale. Les couches épineuse, granuleuse et cornée sont formées de kératinocytes ayant un stade de différenciation de plus en plus avancé. La couche cornée est formée de cornéocytes ou cellules cornées qui sont des kératinocytes en phase terminale de différenciation.



- N : noyau
- n : nucléole
- m : mitochondries
- Ri : ribosomes
- RE : réticulum endoplasmique
- G : appareil de Golgi
- HD : hémidesmosomes
- D : desmosomes
- KH : kératohyaline
- TF : tonofilaments

Figure 4 : Le processus de kératinisation (d'après Lavker et Maltosky, 1970)

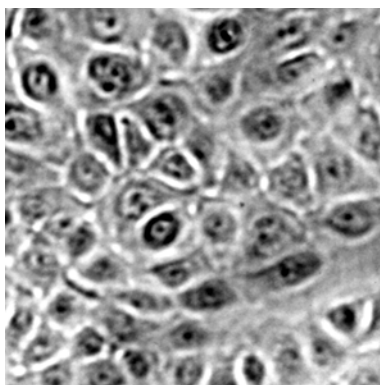


Figure 5 : Kératinocytes confluents en culture observés en microscopie photonique (x 200) (Collection personnelle)

1.2.3 Cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont issues de précurseurs hématopoïétiques CD34+ de la moelle osseuse. Elles se situent dans la couche épineuse. Ce sont des cellules dendritiques dont la fonction principale est de présenter les antigènes aux lymphocytes T et B. A ce titre, elles sont impliquées dans les défenses immunitaires spécifiques.

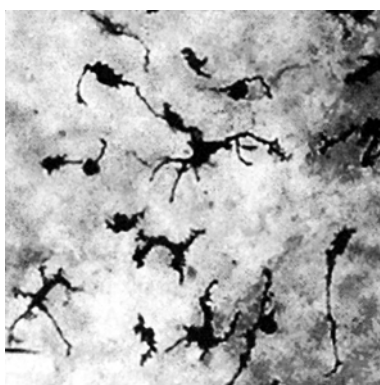


Figure 6 : Cellules de Langerhans sur le feuillet épidermique reconstruit (d'après Staquet et al., 2000)

1.2.4 Cellules de Merkel

Les cellules de Merkel sont les cellules neuro-endocrine de l'épiderme. Elles sont situées dans la couche basale. Elles semblent avoir un rôle de mécanorécepteur. Leur origine reste ambiguë.

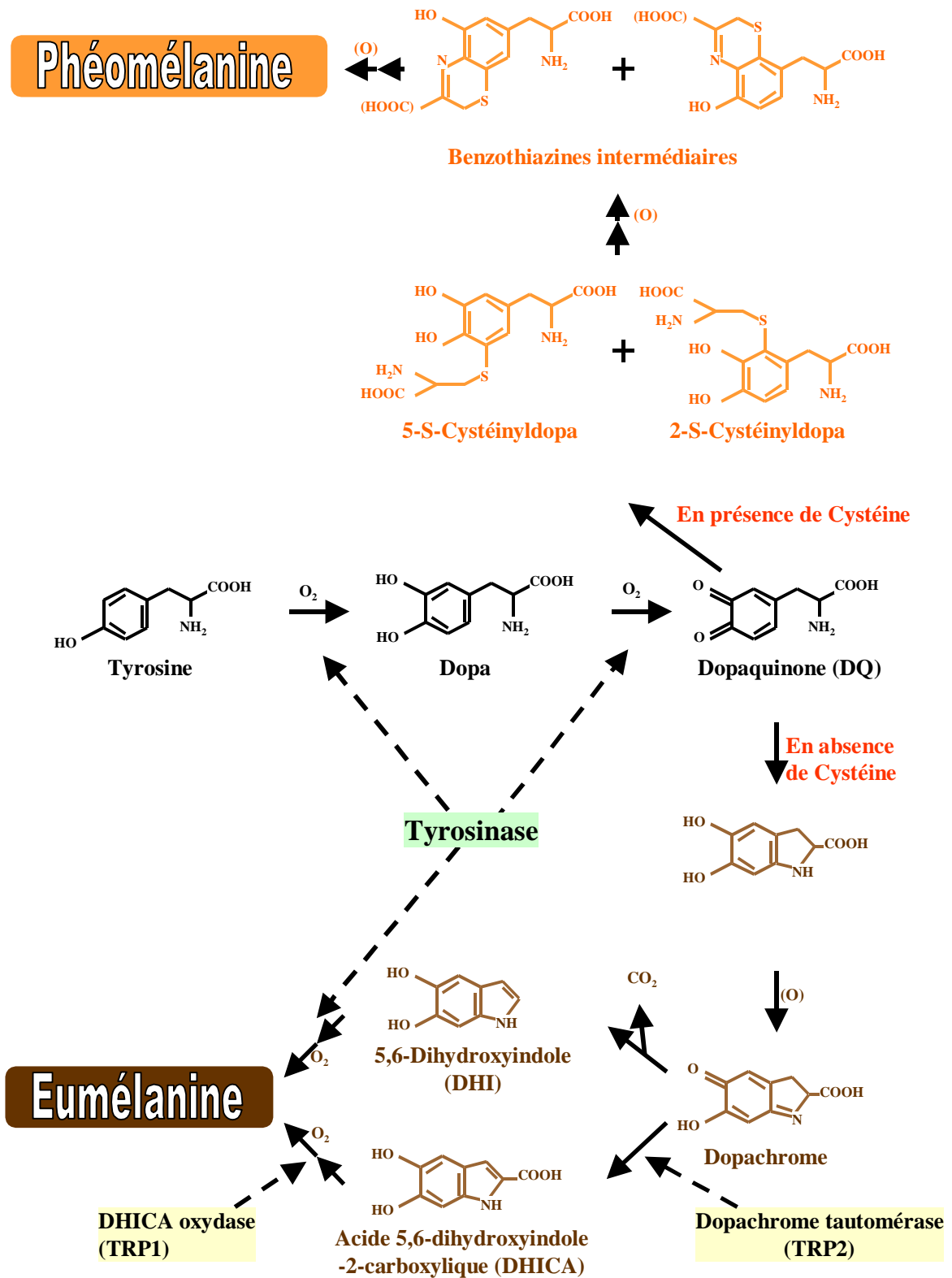


Figure 7 : Eu. et Phéomélanogénèse (d'après Ito, (1998))

1.3 La pigmentation

La pigmentation de la peau est assurée par les mélanocytes qui transfèrent leurs mélanosomes aux kératinocytes adjacents.

Il existe deux types de mélanine dans les cellules épidermiques, la phéomélanine et l'eumélanine. Dans les mélanocytes cohabitent des eumélanosomes et des phéomélanosomes. Le nombre de mélanocytes exprimant la tyrosinase, TRP-1 et TRP-2 est similaire dans les différents types de peau (Tobin et al, 1994).

Les 6 principaux phototypes sont établis à partir de la capacité des individus à attraper un coup de soleil, à bronzer et de leur carnation. Ces phototypes permettent d'estimer la dose érythémale minimale (DEM) ainsi que le SPF (sun protecting factor) des crèmes solaires à utiliser.

Phototype	Exemple	Carnation	Réaction solaire	DEM mJ.cm ⁻²	SPF suggéré
I	Celtiques, Irlandais, Roux	Blanche	Brûlent toujours Ne bronzent jamais	15-30	25-30
II	Individus à peau claire	Blanche	Brûlent facilement Bronzent peu, avec difficulté	25-40	25-30
III	Majorité des Caucasoïdes	Blanche	Brûlent parfois Bronzent progressivement	30-40	15
IV	Asiatiques Hispaniques	Mate	Brûlent peu Bronzent toujours bien	40-60	15
V	Indiens Moyen- orientaux	Brune	Brûlent rarement Bronzent intensément	60-90	15
VI	Africains	Brun foncé à noire	Ne brûlent jamais Bronzent intensément	90-150	15

Tableau 1 : Classification des phototypes (d'après Pathak (1995) et Lowe et Friedlander, (1997))

Les mélanocytes cutanés de phototype VI possèdent plus d'eumélanine et de phéomélanine que les mélanocytes de phototype I en culture comme in vivo (Wenczl et al., 1998). De même, les mélanocytes isolés d'épidermes d'Asiatiques possèdent plus d'eumélanine et de phéomélanine que les mélanocytes isolés d'épidermes d'européens (Hunt et al., 1995a). Toutefois le rapport phéomélanine/eumélanine est plus faible dans les mélanocytes d'Asiatiques (Hunt et al., 1995a).

Le rapport entre les 2 isomères de la phéomélanine, établi grâce à leurs produits de dégradation (aminotyrosine (AT) et aminohydroxyphenylalanine (AHP)), varie entre les

phototypes (Wenczl et al., 1998). La signification de cette variation, pour l'instant, n'a pas été élucidée (Wenczl et al., 1998).

1.3.1 Mélanogenèse

La tyrosinase est l'enzyme qui régule les premières étapes de la synthèse de la phéomélanine et de l'eumélanine. Ces deux types diffèrent par leur formule chimique et leurs propriétés physico-chimiques. L'eumélanine et la phéomélanine sont issues de la conversion de la L-tyrosine en L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) qui est oxydée en dopaquinone. Ces deux étapes sont catalysées par la tyrosinase. A partir de la dopaquinone, les voies de synthèse diffèrent pour l'eu- et la phéomélanine (cf. *Figure 7 : Eu. et Phéomélanogenèse (d'après Ito, (1998), p.23)*).

Chez la souris, la tyrosinase est plus importante pour la synthèse d'eumélanine que pour la synthèse de phéomélanine et son niveau de production peut déterminer le type de mélanine produite (Burchill et al., 1986, 1989; Thody et Burchill, 1992).

La présence de groupements thiols induit une production exclusive d'adduits thiols sur la DOPA favorisant ainsi la voie de la phéomélanogenèse (Ito, 1998). Ceci explique que la culture de mélanocytes en milieu MCDB153, riche en cystéine, favorise la phéomélanogenèse (Hunt et al., 1995a).

1.3.1.1 Eumélananogenèse

L'eumélanine est un pigment de couleur brun-noir. Elle est produite dans des mélanosomes ellipsoïdaux dans lesquels elle se distribue le long de filaments protéiques structuraux possédant une périodicité caractéristique (Donois, 1998).

L'eumélanine est obtenue par une suite de processus enzymatiques et résulte de la copolymérisation du DHI (dihydroxyindole) et du DHICA (acide dihydroxyindole carboxylique) en proportions variables (cf. *Figure 7 : Eu. et Phéomélanogenèse (d'après Ito, (1998), p. 23)*). Les enzymes nécessaires sont la TRP-1 (DHICA-oxydase), qui aurait également une activité catalase (Halaban et Moellmann, 1990), et la TRP-2 (dopachrome tautomérase). Une forte concentration de tyrosinase favorise l'eumélanogenèse (Tobin et al, 1994) probablement parce qu'elle catalyse l'oxydation du DHI (précurseur de l'eumélanine) (Ito, 1998).

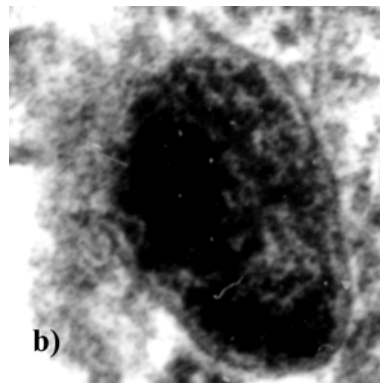
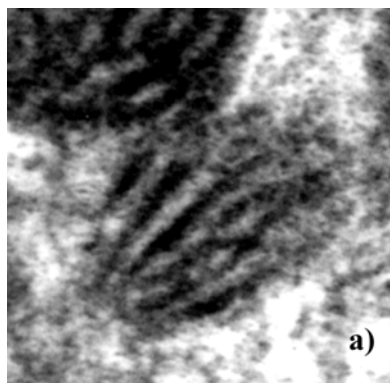


Figure 8 : Eumélanosomes en microscopie électronique observés dans les mélanocytes d'un épiderme reconstruit caucasoïde (a) stade II ; b) stade IV) (Collection personnelle)

1.3.1.2 Phéomélanogenèse

La phéomélanine est un pigment de couleur jaune-rouge. Elle est produite dans des mélanosomes sphériques dans lesquels elle se distribue en motte.

La voie de la phéomélanogenèse fait intervenir des composés soufrés. Le soufre est présent dans la cellule soit sous la forme d'un acide aminé, la cystéine, soit sous la forme d'un tripeptide, le glutathion qui sous l'action d'une glutamyl-transpeptidase peut libérer une cystéine. La phéomélanine est obtenue par réaction spontanée de la cystéine avec le dopachrome donc sa formation dépend de la concentration en cystéine libre dans le cytoplasme.



Figure 9 : Phéomélanosome en microscopie électronique observé dans un mélanocyte d'un épiderme reconstruit Caucasoïde (stade II) (Collection personnelle)

1.3.1.3 Transfert des mélanosomes

La migration des mélanosomes au sein des dendrites se fait grâce au réseau de microtubules, à la dynéine et à la kinésine (*Figure 10 : Transfert de mélanosomes au sein de l'unité épidermique de mélanisation (d'après Vancoillie et al., 2000), p. 27*).

Le mode de transfert des mélanosomes aux kératinocytes n'est pas vraiment connu. Plusieurs hypothèses ont été formulées : cytophagocytose, relargage des mélanosomes dans l'espace intercellulaire suivi d'une endocytose, voie de communication entre le mélanocyte et le kératinocyte ou inoculation directe (Yamamoto et Bahwan, 1994).

Les mélanosomes sont retrouvés sous forme isolée dans les peaux de type négroïde et sous forme de complexe dans les peaux de type caucasoïde.

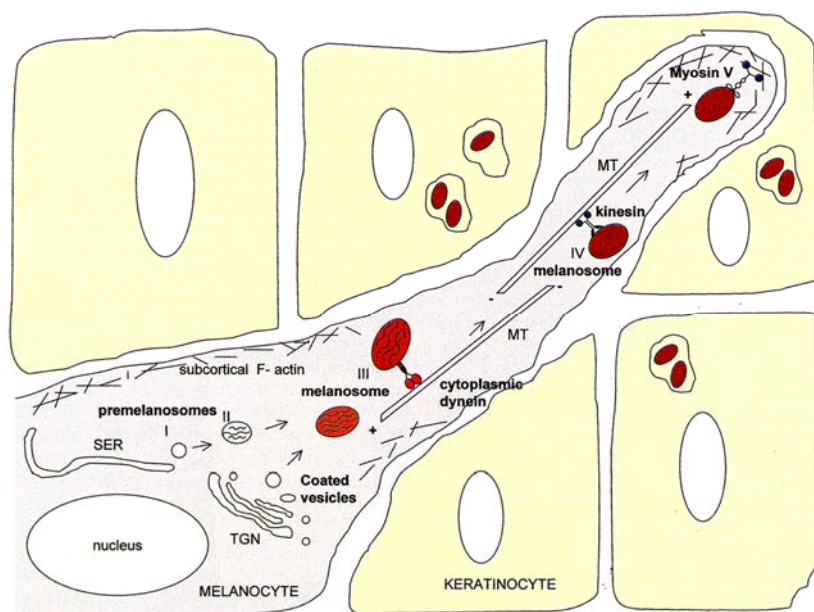


Figure 10 : Transfert de mélanosomes au sein de l'unité épidermique de mélanisation
(d'après Vancoillie et al., 2000)

1.3.2 α -MSH

La tyrosinase, enzyme de la mélanogénèse, est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif. Cette proenzyme est activée lorsque les mélanocytes sont stimulés par l' α -MSH via l'AMPc. L' α -MSH et l'ACTH sont produites par épissage alternatif du gène POMC (propiomélanocortine) dans la glande pituitaire (Forlot, 1987) et dans la peau, aussi bien par les kératinocytes que par les mélanocytes (Thody et al., 1983 ; Iyengar, 1995 ; Wintzen et al., 1996). La protéine agouti est un antagoniste de l' α -MSH. Elle empêche d'une part la fixation de l' α -MSH sur son récepteur et donc l'activation du récepteur et d'autre part elle stabilise la forme inactive du récepteur (Lu et al., 1998). De ce fait, la protéine agouti empêche l'initiation de la cascade de réactions aboutissant à l'activation de la tyrosinase.

Le mélanocyte est également capable de sécréter les protéines impliquées dans la régulation de l'expression du POMC (Slominski et al., 1995).

L' α -MSH ne stimule pas l'activité de la tyrosinase dans des biopsies cutanées quel que soit leur phototype (Burchill et al., 1990). En effet, il semble que l' α -MSH nécessite la présence du bFGF pour augmenter aussi bien l'activité dopa-oxydase (tyrosinase) que la quantité de mélanine des mélanocytes en culture (Hedley et al., 1998). L' α -MSH pourrait influencer le ratio eumélanine/ phéomélanine (Hunt et al. 1995b; Lu et al. 1998).

Les taux d' α -MSH et d'ACTH (Schauer et al, 1994 ; Iyengar et al., 1995) ainsi que le taux de bFGF (Halaban et al., 1992) sont augmentés après irradiation.

1.4 Rôle des lipides

La composition en lipides diffère en fonction des couches épidermiques. Les phospholipides qui correspondent à 45 % des lipides totaux dans la basale et l'épineuse ne sont plus que de 25-30 % dans la granuleuse et sont négligeables dans le stratum corneum. Par contre, les pourcentages d'acides gras libres et de sphingolipides (générateurs de céramides) sont plus élevés dans le stratum corneum (Elias, 1992).

Les lipides représentent 10 % du poids sec de la couche cornée et jouent un rôle crucial dans l'homéostasie de la barrière cutanée et dans la perméabilité sélective de celle-ci à certaines substances.

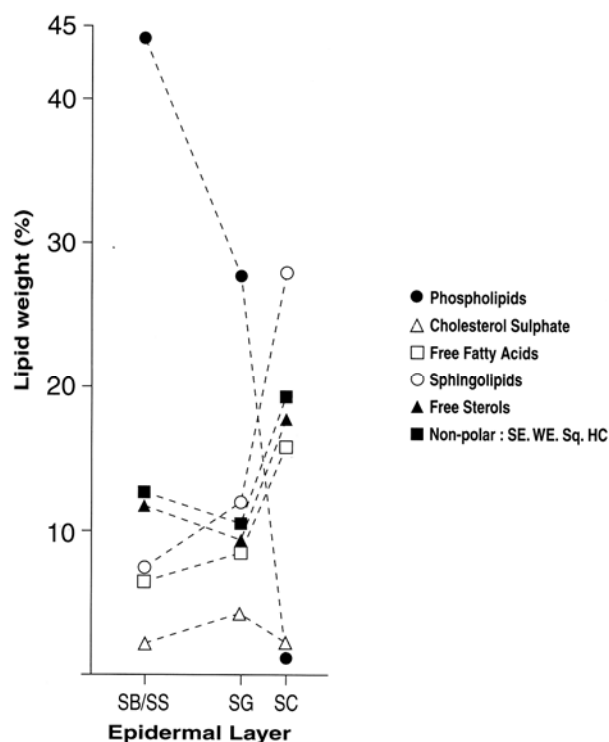


Figure 11 : Répartition des lipides au sein de l'épiderme (d'après Elias, 1992)

Les acides gras sont responsables de la fluidité membranaire. Cette fluidité est d'autant plus importante que le nombre d'insaturations des acides gras est important.

Les acides gras, en particulier l'acide linoléique et l'acide arachidonique, tous deux insaturés, sont essentiels pour le fonctionnement et la structure de la peau. En effet, ce sont des composants essentiels des membranes cellulaires et des précurseurs des éicosanoïdes (molécules de l'inflammation). L'acide linoléique et l'acide arachidonique font partie des acides gras essentiels. Cependant, la plupart des tissus, excepté l'épiderme, possède les

enzymes nécessaires à la conversion de l'acide linoléique en acide arachidonique (Proksh, 1999).

Les acides gras saturés peuvent être synthétisés dans l'épiderme, principalement dans les couches basale, épineuse et granuleuse, le stratum corneum n'ayant lui qu'une faible capacité synthétique.

Une carence en acides gras insaturés induit une hyperprolifération de l'épiderme, une différenciation anormale et une fonction barrière anormale (Wright, 1991). Ces symptômes sont fortement diminués par application topique d'acide linoléique (Lowe et Stroughton, 1977).

2 Peau et rayonnement solaire

Le rayonnement solaire est composé de rayons cosmiques, de rayons gamma, de rayons X, d'ultraviolets (200-400 nm), de la lumière visible (400-800 nm), des infra-rouges (800-5000 nm) et des ondes radio.

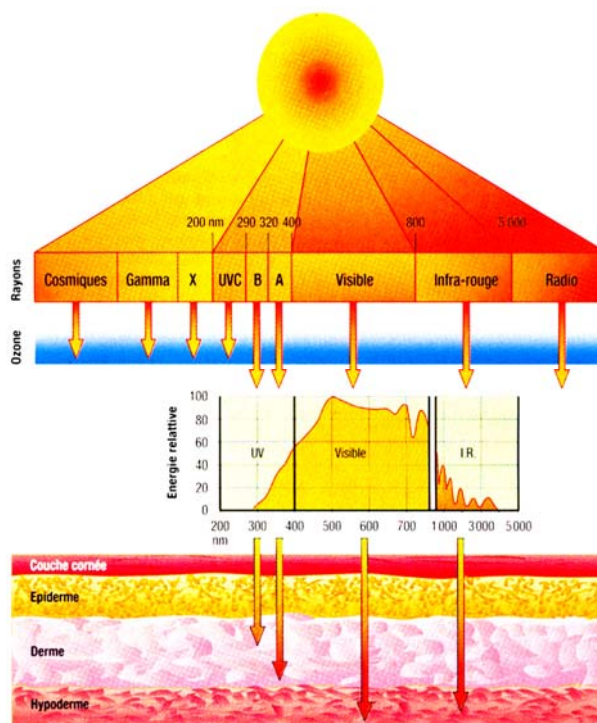


Figure 12 : Pénétration des radiations solaires dans la peau (d'après Sciences et Avenir, Dossier spécial "Le soleil et la beauté", (1999))

La couche d'ozone arrête les rayons dont la longueur d'onde est inférieure à 300 nm environ.

Les rayons visibles et infra-rouges traversent l'épiderme et le derme jusqu'à l'hypoderme superficiel.

Cependant, peu de recherches ont été faites sur l'effet de la lumière visible et des infra-rouges sur la peau.

Les études récentes prêtent, aux infra-rouges, un rôle protecteur. Ils provoquent une augmentation de la température qui via l'induction des protéines de choc thermique (HSP) (Lindquist, 1986; Maytin et al., 1993) pourrait protéger la peau. Cependant, Menezes et al. (1998) ont montré que la cytotoxicité induite par les UVA et les UVB, dans les fibroblastes humains dermiques peut être limitée par les infrarouges sans induction des HSP. De plus, les infra-rouges peuvent augmenter le taux de ferritine et ainsi limiter les réactions impliquant le fer (*cf. p. 34*) à des doses n'induisant ni lésions de l'ADN (photoproduit), ni protéines de

stress oxydatif (hème oxygénase, NOsynthase, superoxyde dismutase, protéines de choc thermique ou des protéases impliquées dans la dégradation de la peau (collagénase, stromélysine, gélatinase) (Applegate et al., 2000)).

Les infrarouges ne protègent pas de la lipoperoxydation UVA-induite (Menezes et al., 1998) mais protègent de la formation des sunburn cells (kératinocytes apoptotiques) induite par les UVB (Danno et al., 1992).

2.1 Les ultraviolets

Les ultraviolets C, qui sont les ultraviolets les plus délétères, sont arrêtés par la couche d'ozone. Mais avec son amincissement, la protection vis à vis des UVC commence à se poser. Les UVB (295-320 nm) pénètrent dans l'épiderme et dans le derme superficiel alors que les UVA (320-400 nm) pénètrent jusqu'au derme profond. Les UVA peuvent être subdivisés en UVA II (320-340) et UVA I (340-400) par leur différence de spectres d'action. Les UVAII ont un comportement pigmentogène semblable aux UVB (Fitzpatrick, 1986), alors que les UVA I, comme les UVB induisent la formation de photoproduits.

En une journée à la surface de la terre, nous recevons environ 15 DEM d'UVB et 4-5 DEM d'UVA (Pathak, 1997).

Plus de 60 % de l'irradiation UV totale est reçue entre 11 h et 15 h (heure solaire). Le flux de radiation UVB solaire est maximum entre 11h et 13h (heure solaire).

L'incidence des UV ne dépend pas uniquement de la course du soleil dans la journée (lever-coucher) mais également de l'emplacement de la terre par rapport au soleil (rotation de la terre autour du soleil) ainsi que de la latitude et de la longitude. Le flux d'UVB varie beaucoup plus que le flux d'UVA en fonction de la latitude.

La lumière solaire, avant atténuation par l'atmosphère terrestre, comprend 6,3 % d'UVA et 1,5 % d'UVB soit 13 fois plus d'UVA que d'UVB (Pathak, 1997), alors qu'après atténuation par l'atmosphère terrestre, la lumière solaire comprend 10^2 à 10^3 fois plus d'UVA que d'UVB (Morlière, 1995).

Les UVB sont 10 à 100 fois plus efficaces pour induire l'oxydation des lipides dans les fibroblastes. Du fait, de leur faible pourcentage par rapport aux UVA, la génération des espèces réactives de l'oxygène, qui induisent l'oxydation des lipides, provient essentiellement des UVA (Pourzand et Tyrrell, 1999).

Les UVA, quant à eux, sont 600 à 1000 fois moins efficaces que les UVB pour induire un « coup de soleil » (Pathak, 1997).

2.1.1 Effets biochimiques des UV

Les UV induisent principalement des lésions indirectes via les espèces réactives de l'oxygène. Cependant, des lésions directes de l'ADN sont observables puisque les spectres d'émission des UVB et des UVA I coïncident avec le spectre d'absorption de l'ADN. Selon l'importance des lésions, la cellule va soit mourir par apoptose ou nécrose soit survivre. L'apoptose ou la

survie sont sous contrôle de la cellule (p53 en particulier) alors que la nécrose n'est pas programmée.

Le spectre d'action pour la formation des dimères de thymine est similaire à celui d'induction de l'érythème (Young et al, 1998). L'érythème est diminué par utilisation de liposomes contenant une photolyase (Stege et al., 2000). Ces deux observations suggèrent que l'ADN est le chromophore déterminant l'érythème.

2.1.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène constituent une famille de petites molécules qui contiennent un électron non apparié (les radicaux libres) ou qui génèrent une molécule hautement réactive, comme le peroxyde d'hydrogène (Darr et Pinnell, 1997).

Les radicaux libres sont formés par des molécules endogènes photosensibles après absorption des radiations solaires (Kvam et Tyrrell, 1999).

Les espèces réactives de l'oxygène sont formées non seulement après irradiation UV, mais également après exposition à des agents chimiques tels que pesticides, herbicides ou à la chaleur et au froid (Darr et Pinnell, 1997). De même, les espèces réactives de l'oxygène sont formées de façon endogène au cours de la respiration cellulaire.

Les principaux radicaux libres sont : le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (HO^{\cdot}), le radical hydroperoxyde (HO_2^{\cdot}) et la forme radicalaire du monoxyde d'azote (NO^{\cdot}).

La réaction entre l'anion superoxyde et le NO^{\cdot} produit un puissant oxydant, le peroxynitrite ($ONOO^-$).

Les radicaux libres réagissent avec la première molécule rencontrée car ils ont une demi-vie très courte et sont peu diffusibles. Par contre, le peroxyde d'hydrogène, du fait de sa petite taille et de son absence de charge, est très diffusible (Darr et Pinnell, 1997).

Les UVA induisent l'oxygène singulet, ainsi que la production d'anions superoxyde et, de façon consécutive, de peroxydes d'hydrogène qui peuvent être formés par la réaction d'Haber-Weiss en présence de fer (*cf. p.34*) (Vile et Tyrrell, 1995; Morlière et al., 1998).

Les UVB n'induisent pas l'oxygène singulet mais induisent la formation d'anions superoxyde et donc de peroxydes d'hydrogène, de radicaux hydroxyle et le relargage de fer.

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent réagir avec les lipides, les protéines, l'ADN, la mélanine. L'oxydation de ces diverses molécules produit, de façon indirecte, des modifications d'activité enzymatique et de la régulation de la transcription ainsi que des mutations de l'ADN (transition de C \rightarrow T et de T \rightarrow C ou transversion de G \rightarrow T). Si les lésions sont trop importantes et que les systèmes de réparation ou de détoxification ne sont pas assez efficaces, les cellules subissent l'apoptose ou la nécrose.

2.1.1.1.1 Superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle

2.1.1.1.1.1 Réactions en absence d'ions métalliques

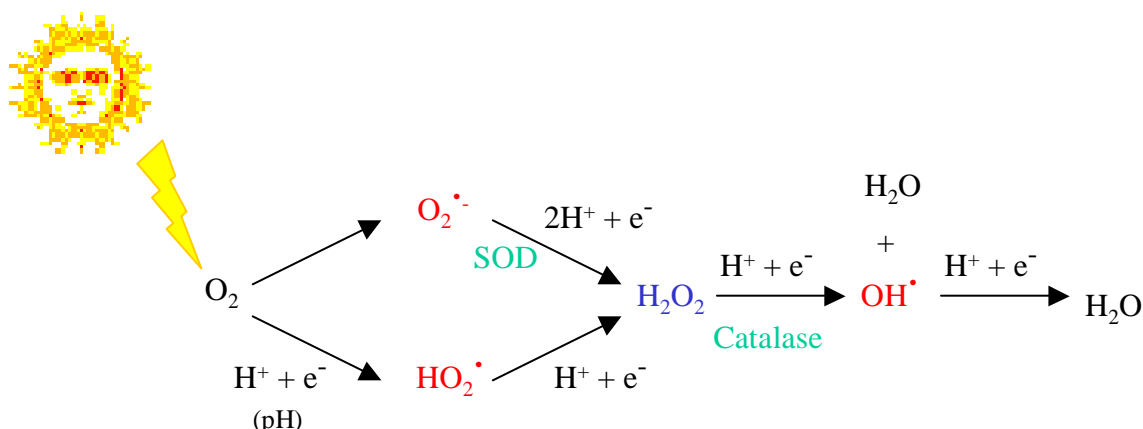


Figure 13 : Voie de réduction de l'oxygène par les UV en absence d'ion métallique
(d'après Darr et Pinnell, 1997)

Remarque : Si le pH est suffisamment acide, la formation de HO_2^\bullet est possible.

➤ Le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) est soit formé par captation d'un électron par le dioxygène présent dans la cellule, soit formé à partir de l'oxygène singulet. Dans la mitochondrie la réduction du dioxygène en eau se fait selon 2 processus (Pré, 1981).

Le processus majoritaire fait intervenir la cytochrome oxydase : $\text{O}_2 + 4 \text{e}^- + 4 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$

Le deuxième processus fait intervenir le coenzyme Q et un seul électron. Ce processus est réalisé en plusieurs étapes : $\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\bullet -} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}$

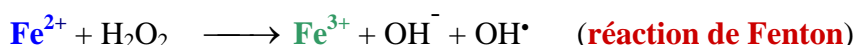
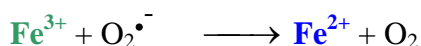
Le radical superoxyde peut être oxydant ou réducteur. En effet, lors de la dismutation, spontanée ou enzymatique, deux radicaux superoxydes donnent naissance à un dioxygène et un peroxyde d'hydrogène (Darr et Pinnell, 1997).

➤ Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est formé soit par dismutation du radical superoxyde soit directement au sein de la cellule par une grande variété d'oxydases. Il est très dangereux car il peut générer le radical hydroxyle et ceci à distance de son site de production du fait de sa capacité à diffuser et à traverser les membranes.

Le radical hydroxyle est le radical le plus réactif, le plus instable et le plus puissant des oxydants (Deligné, 1985a,b). Il peut réagir de façon non discriminatoire avec toutes les molécules (Darr et Pinnell, 1997).

2.1.1.1.1.2 Réaction en présence d'ions métalliques

Les UVA et les UVB, induisent un relargage de fer via le radical superoxyde (Masaki et al., 1995) ou via l'induction d'hème-oxygénase (Vile et Tyrrell, 1993). Le radical superoxyde est capable d'induire le relargage de Fe^{2+} à partir des centres [4Fe-4S] (mitochondrie) ou de la ferritine (Liochev et Fridovitch, 1994) ce qui conduit indirectement à la formation du radical hydroxyle par la réaction d'Haber-Weiss. Le Fe^{3+} et le Cu^{2+} peuvent être réduits par le radical superoxyde, formant ainsi le Fe^{2+} et le Cu^+ . Le peroxyde d'hydrogène peut former le radical hydroxyle par irradiation UV ou par la réaction de Fenton catalysée par Fe^{2+} et Cu^{2+} .



Le fer est surtout utilisé pour catalyser la formation de OH^{\bullet} . OH^{\bullet} ne peut pas diffuser dans le noyau mais H_2O_2 en est capable, comme l'ADN est complexé avec des cations métalliques, HO^{\bullet} peut être formé par la réaction de Fenton à proximité de l'ADN et ainsi l'oxyder (Brenneisen et al., 1999).

Les ions métalliques sont impliqués dans de nombreux phénomènes puisque des chélateurs de fer préviennent l'érythème, l'apparition des SBC et l'induction de l'ODC (ornithine décarboxylase) qui est impliquée dans l'hyperplasie et l'épaississement épidermique (Bissett et Mc Bride, 1996).

2.1.1.1.2 Monoxyde d'azote, peroxydinitrite

Dans la peau, le NO est produit de façon constitutive par la NO synthase constitutive (cNOS) dans les kératinocytes, les mélanocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Bruch-Gerharz et al., 1998).

Les UV induisent une augmentation du taux de NO par induction de la NO synthase inductible (iNOS) qui est exprimée dans les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules de Langerhans et les cellules endothéliales mais pas dans les mélanocytes (Bruch-Gerharz et al., 1998).

Le NO agit soit sous sa forme radicalaire (NO^{\bullet}), soit par l'intermédiaire de l'ion nitronium (NO_2^+) ou du peroxydinitrite (ONOO^-).

➤ Le NO est impliqué dans l'apparition de l'érythème solaire et d'œdèmes (Deliconstantinos et al., 1995 ; Goldsmith et al., 1996). Sa production est liée aux UV de façon directe et indirecte via l'inflammation (Novellino et al., 1998) (cf. Figure 14 : Diagramme schématique de l'action du NO (d'après Novellino et al., 1998) p .35).

➤ Le peroxy-nitrite induit l'oxydation des lipides et des protéines et la nitration des tyrosines (Kröncke et al., 1997).

➤ NO• induit des lésions de l'ADN par désamination des purines et des pyrimidines induisant des cassures de l'ADN et des mutations (Nguyen et al., 1992). Le NO•, via les lésions de l'ADN, induirait la PARP (poly (ADP-ribose) polymérase) et dépleterait la cellule en NAD et ATP, ce qui induirait la mort cellulaire par manque d'énergie (Heller et al, 1995). L'induction de l'apoptose par le NO• via les lésions de l'ADN a été montrée dans différentes cellules (macrophages, lymphocytes et thymocytes) (Fehsel et al., 1995).

Le NO• peut aussi agir sur la pigmentation en stimulant la tyrosinase (Roméro-Graillet et al., 1996) ou en oxydant le DHI et le DHICA ce qui peut induire une hyperpigmentation.

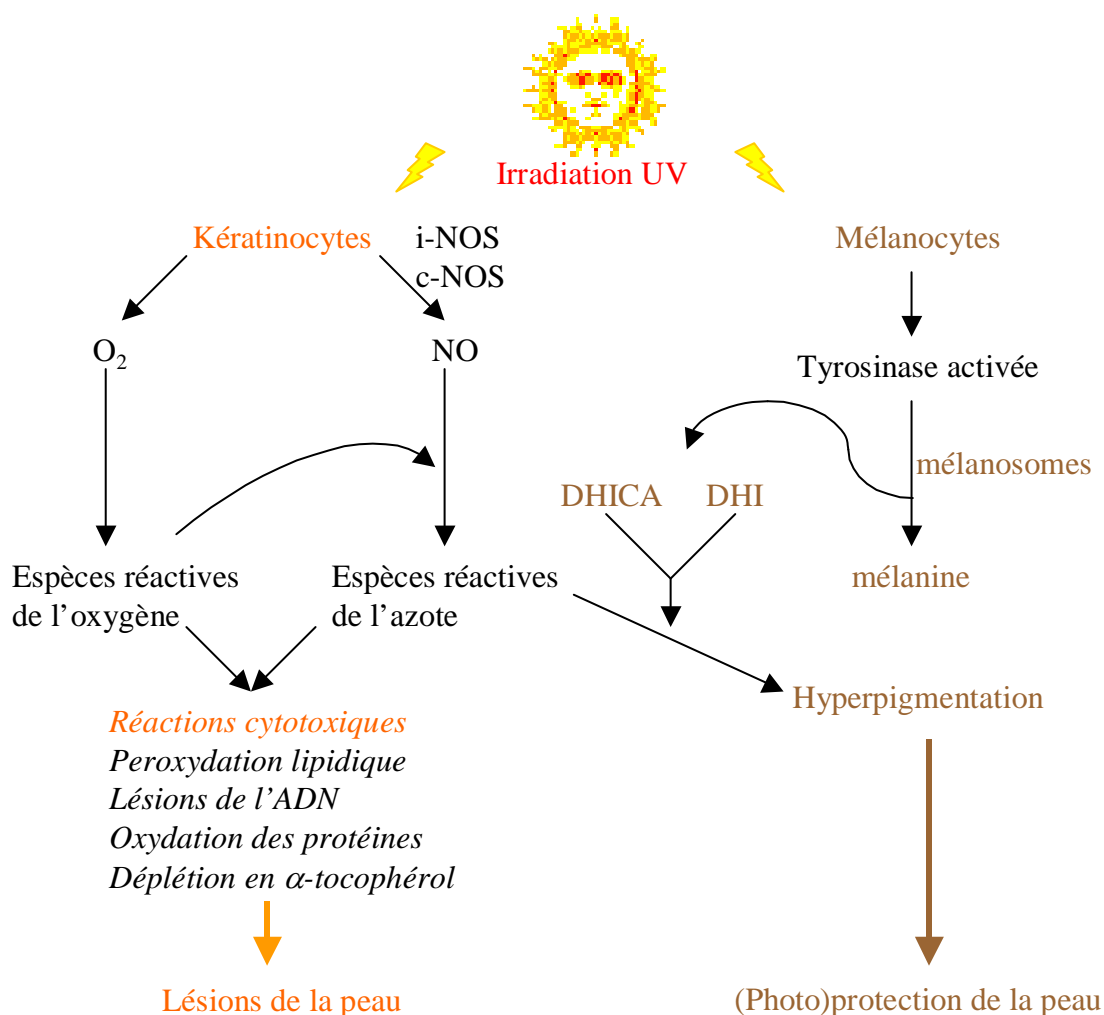
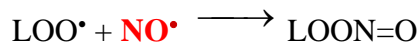


Figure 14 : Diagramme schématisé de l'action du NO (d'après Novellino et al., 1998)

Si le peroxynitrite (ONOO^-) induit la peroxydation lipidique, le NO^\bullet , quant à lui, peut, comme le tocophérol, arrêter la cascade de lipoperoxydation (*cf. p. 41*) (Schafer et al., ICP 2000 ; Buettner et al., ICP 2000) selon les réactions suivantes :



Le NO^\bullet protège également de la lipoperoxydation induite par le fer (Buettner et al., ICP 2000).

2.1.1.2 Autres espèces réactives

Ces espèces sont des oxydants potentiels qui sont majoritairement représentés par : l'oxygène singulet ($^1\Delta\text{O}_2$) et l'acide hypochlorique (HOCl).

2.1.1.2.1 Oxygène singulet

L'oxygène singulet ($^1\Delta\text{O}_2$) est majoritairement formé par un mécanisme de photosensibilisation mettant en jeu principalement les UVA. En effet, l'oxygène n'absorbe pas les radiations dans la région UV du spectre. La molécule « photosensible » est excitée et transmet son énergie au dioxygène. L'oxygène singulet correspond donc à un état excité de la molécule de dioxygène (Darr et Pinnell, 1997). Il peut également être formé par excitation chimique (NaOCl).

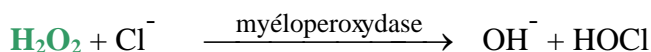
Ses cibles principales sont l'ADN, les protéines et les membranes. Il peut être désactivé par certaines molécules comme le β -carotène, certaines amines, les phénols... (Pierre, 1998). Il peut également conduire à la formation de radical superoxyde.

L'oxygène singulet, induit par les UVA, active la transcription de HO-1 (hème-oxygénase) dans les fibroblastes en culture (Basu-Modak et Tyrrell, 1993 ; Tyrrell, 1991). L'hème-oxygénase induit la libération de l'hème et augmente le taux de fer intracellulaire ce qui semble être à l'origine de l'augmentation de la synthèse de ferritine (Vile et Tyrrell, 1993).

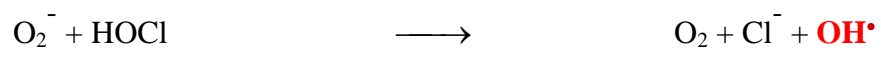
L'hème oxygénase est une molécule chaperonne qui, comme les HSP, peut redonner une conformation native à la p53 et ainsi prévenir l'apoptose (Vigh, 1997).

2.1.1.2.2 Acide hypochlorique

L'acide hypochlorique (HOCl) est formé dans les polynucléaires neutrophiles aux dépens du peroxyde d'hydrogène en présence de myéloperoxydase. HOCl induit la formation de chloramines qui sont oxydantes et très diffusibles. Il peut également réagir avec l'anion superoxyde pour donner le radical hydroxyle selon la réaction ci-dessous.



Muriel Cario-André



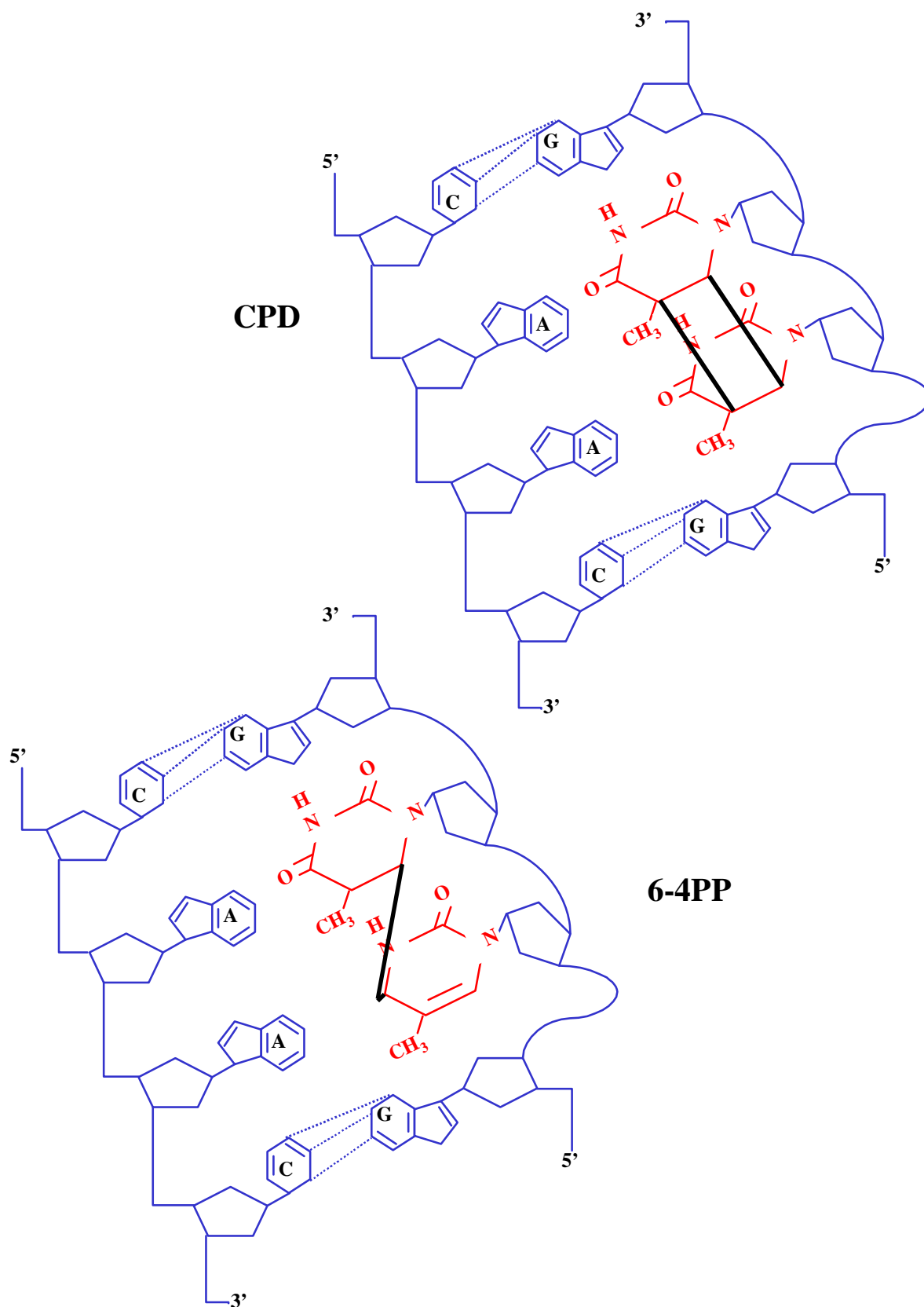


Figure 15 : CPD et 6-4 photoproduits

2.1.1.3 Lésions UV induites

2.1.1.3.1 Les lésions de l'ADN

Les lésions de l'ADN peuvent être regroupées en deux catégories ; les lésions directes et les lésions indirectes produites via la génération d'espèces réactives de l'oxygène.

➤ Les lésions directes sont plutôt liées à l'action des UVB sur l'ADN mais les UVA I sont également capables de les induire (Perdiz et al., 2000). Ces lésions résultent de l'absorption directe des photons par les bases de l'ADN. Les principales lésions sont les CPD, les 6-4 PP et les isomères de Dewar (Dewar PP) qui sont formés par photoisomérisation autour de 320 nm (Taylor et al., 1990 ; Mitchell et Rosenstein, 1987). Les isomères de Dewar sont peu nombreux après irradiation UVA ou UVB mais leur quantité est très augmentée après irradiation avec un simulateur solaire (Perdiz et al., 2000).

➤ Les lésions oxydatives (indirectes) de l'ADN sont produites par photosensibilisation soit par transfert de charge d'un chromophore endogène (quinone, flavine, ...) excité, soit par réaction avec les espèces réactives de l'oxygène produites à ces longueurs d'onde (Perdiz et al., 2000). Les lésions oxydatives photoinduites peuvent être des oxydations de bases telles que la 7,8-dihydro-8-oxodésoxyguanosine (8-oxodG), la 5-hydroxy-2'-désoxycytosine (5OHdC), des cassures simples ou doubles brins et des interactions protéines-ADN (DPC, DNA protein crosslink) (Sage, 1993). Le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène ne peuvent pas agir directement sur l'ADN. Ils agissent par le biais du radical hydroxyle qui oxyde l'ADN (Lesko et al., 1980 ; Halliwell, 1989).

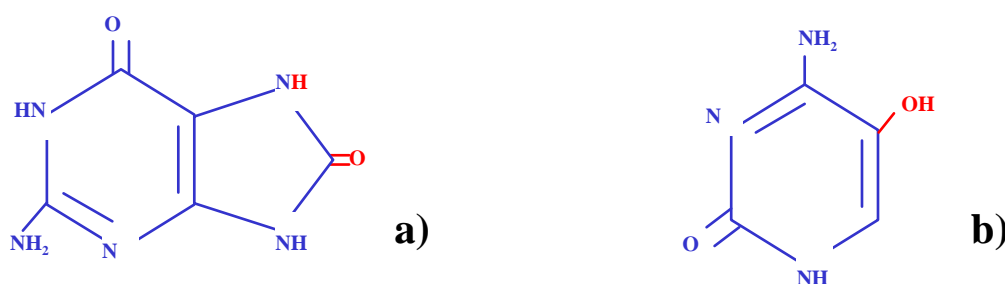


Figure 16 : Formules semi-développées de bases oxydées (a) 8-oxodG ; b) 5OHdC

La 7,8-dihydro-8-oxodésoxyguanosine est induite dans les fibroblastes humains par des radiations monochromatiques comprises entre 312 nm (UVB) et 434 nm (visible). Cette lésion n'est pas induite uniquement par HO• mais également par l'oxygène singulet.

La condensation de l'ADN avec les histones (chromatine) protège, d'un facteur 100, l'ADN des attaques radicalaires (Ljungman et Hanawalt, 1992).

Les rayons solaires qui induisent le plus d'oxydation de la guanine, dans les fibroblastes, sont les UVA et le proche visible (Kvam et Tyrrel, 1997).

Les irradiations UVA induisent autant de CPD que de 8-oxodG (Douki et al., 1999).

Les CPD bloquent les ADN et ARN polymérases *in vitro* (Shibutani et al., 1991) et *in vivo* (Jiang et Taylor, 1993; Gibbs et al., 1993) alors que la 8-oxodG est plus efficacement « court-circuitée » (Le Page et al., 1995; Grollman et Morija, 1993).

Les lésions de l'ADN qui ne sont pas réparées par excision-resynthèse de nucléotides (NER) ou excision-resynthèse de base (BER) (*cf. p. 48-52*) peuvent, soit être réparées lors de la réplication soit induire des mutations (transition de C → T et de T → C ou transversion de G → T) et ainsi conduire au développement de cancers (*cf. p. 63*).

L'excision des fragments lors de la réparation par NER (*cf. p. 48*) stimule la pigmentation (Gilchrest et Eller, 1999), ce qui en retour prévient la formation de CPD ou 6-4 PP lors des irradiations ultérieures puisque la mélanine absorbe les UV (Kobayashi et al., 1998).

2.1.1.3.2 L'oxydation des protéines

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent directement altérer les protéines en induisant la formation de ponts disulfure, l'oxydation des acides aminés, des cassures de protéines et des interactions protéines-lipides.

Dans les conditions normales (absence de stress), l'oxydation des protéines est probablement impliquée dans la différenciation et la croissance des cellules (Dean et al., 1997).

La modification des acides aminés induit des changements fonctionnels notamment des protéines de structure et des enzymes (Dean et al., 1997; Grune et al., 1997; Faure et Lafond, 1995). Les protéines peuvent être oxydées principalement sur leurs groupements thiols ou sur les résidus aminoacyles induisant ainsi la formation de groupements carbonyles.

➤ Les **groupements carbonyles** peuvent être formés par clivage oxydatif ou par oxydation directe des résidus lysyl, arginyl, prolyl, thréonyl (Berlett et Stadman, 1997) et tyrosyl (Morin et al., 1998). Les groupements carbonyles peuvent également être introduits par réaction avec les aldéhydes (4-hydroxy-2-nonenal (HNE), malondialdéhyde (MDA)) qui sont produits durant la lipoperoxydation (Esterbauer et al., 1991).

De nombreux groupements carbonyles ont été détectés au niveau des kératines, protéines majoritaires des kératinocytes, et notamment au niveau du stratum corneum (Thiele et al., 1999). Dans l'épiderme, le gradient d'oxydation des protéines (groupements carbonyles) est peut-être impliqué dans le processus de desquamation. D'après Thiele et al. (1999) les protéines oxydées du stratum corneum pourraient prévenir les couches sous-jacentes de l'oxydation. Cependant, ce gradient pourrait tout simplement être la conséquence de l'atténuation de la pénétration des UV dans l'épiderme. En effet, le pourcentage d'UV atteignant et traversant le stratum corneum est de 67 % pour les UVB contre 80 % pour les

UVA alors que le pourcentage d'UV atteignant la basale est de 9,5 % pour les UVB contre 19 % pour les UVA (Bruls et al., 1984).

L'oxydation sur les résidus tyrosyls des protéines par le radical hydroxyle induit la formation de protéines avec un groupement 3-4 dihydroxyphénylalanine (PB-DOPA). En présence d'oxygène et d'ions métalliques (cuivre ou fer), les PB-DOPA induisent la formation de 8-oxodG et de 5OHdC (Morin et al., 1998).

L'oxydation induit également la fragmentation des polypeptides et des « cross-links » inter et intramoléculaires (Davies, 1987 ; Stadtman, 1992 ; Grune et al., 1997) ainsi que l'agrégation des protéines détruisant ainsi les résidus tryptophane, modifiant la sensibilité protéolytique des enzymes et créant des ponts bi-tyrosine (Stadtman et al., 1992).

➤ L'oxydation des **groupements thiols** (cystéine) se traduit par la formation de ponts disulfures (Di Simplicio et al., 1991). Les lésions oxydatives protéiques, principalement liées à l'anion superoxyde, diminuent la teneur en radicaux thiols des protéines membranaires. Ceci pourrait induire des changements de viscoélasticité de la membrane (Wang et al., 1999).

L'oxydation des groupements thiols sous irradiation UVA est dépendante de l'oxygène singulet, du fer et du peroxyde d'hydrogène mais n'implique pas le radical hydroperoxyde (Vile et Tyrrell, 1995).

Le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA) peuvent également se lier de façon covalente aux groupements thiols.

L'oxydation des thiols, par exemple des métallothionéines (*cf. p. 57*), peut constituer un moyen de défense par rétention des espèces réactives de l'oxygène (Min et al., 1999). De même, l'oxydation des groupements thiols du glutathion (*cf. p. 57*) et de la thioredoxine (*cf. p. 57*) protège la cellule par l'activation du facteur de transcription NF- κ B et par conséquent de AP-1 (protéine activatrice-1) (Hirota et al., 1999).

De nombreuses protéines (c-Jun, c-Fos, Myb, p53, PEBP2 et récepteurs nucléaires (récepteurs aux glucocorticoïdes, aux estrogènes, p50, p65/Rel A)) possèdent une cystéine dans leur site de fixation à l'ADN et sont donc potentiellement sous influence du système redox (Hirota et al., 1999). De même, la protéine p53 pourrait être régulée par l'oxydation de ses groupements thiols (Dean et al., 1997).

2.1.1.3.3 UV et lipides

2.1.1.3.3.1 Lipoperoxydation

La lipoperoxydation peut endommager les membranes cellulaires et générer des radicaux qui peuvent propager les lésions à distance du site de production. La lipoperoxydation induit une diminution de la fluidité membranaire, altère la fonction barrière de la membrane (Cheeseman, 1993), modifie l'activité des enzymes liées à la membrane. Cette modification peut être une stimulation comme pour la phospholipase A₂ (Cheeseman, 1993).

La lipoperoxydation est un processus autocatalytique, incontrôlé, qui conduit dans un premier temps à la formation d'hydroperoxydes puis dans un deuxième temps à de nombreux composés tels que les aldéhydes, les alcools (Cheeseman, 1993). Les membranes cellulaires et les lipoprotéines sont sensibles à la peroxydation lipidique car elles contiennent, entre autres, de l'acide linoléique (18 :2), de l'acide arachidonique (20 :4) et de l'acide docosahexaénoïque (22 :6) qui sont des cibles de choix pour les radicaux libres. La susceptibilité à l'oxydation des acides gras insaturés augmente avec le nombre de double liaisons.

Le radical hydroxyle (HO•), le radical hydroperoxyde (HO₂•) les radicaux peroxyde (ROO•), les radicaux alkoxy (RO•) ainsi que l'ion nitronium (NO₂⁺) sont capables d'oxyder les acides gras polyinsaturés alors que le radical superoxyde (O₂^{-•}) ne le peut pas (Cheeseman, 1993; Pierre, 1998).

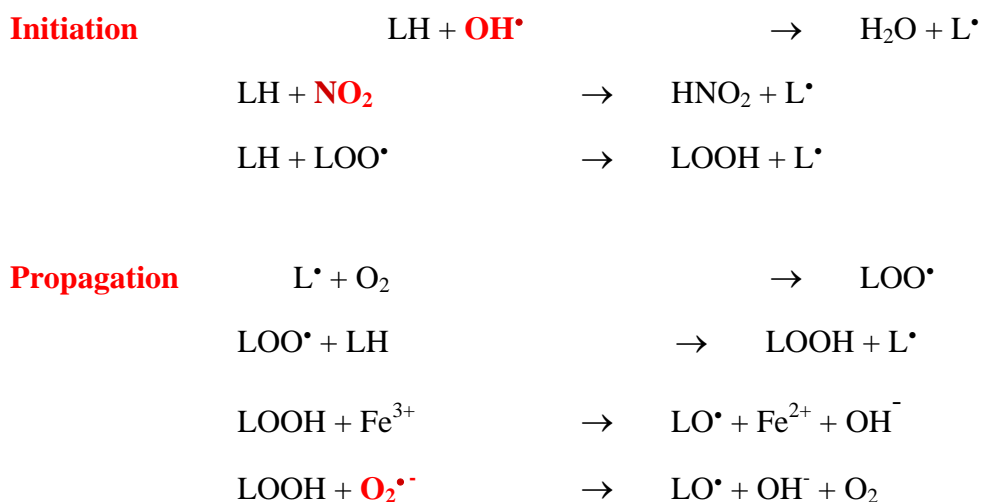
L'initiation de la lipoperoxydation par les UVA n'est réalisée ni par les ions métalliques, ni par l'anion superoxyde, ni par le radical hydroxyle (Bose et al., 1990), par contre, l'oxygène singulet est impliqué dans cette initiation (Bose et al., 1989).

La **première étape appelée initiation** consiste en la soustraction d'un atome d'hydrogène à un groupement méthylène (-CH₂-) d'une chaîne acylée d'acide gras, essentiellement polyinsaturée (LH) (Pré, 1991). N'importe quelle espèce chimique suffisamment réactive peut réaliser cette soustraction. Ceci donne naissance à un radical carbonyle (L•) qui réagit très rapidement avec le dioxygène et forme ainsi une molécule très réactive, le radical peroxyde LOO•, qui peut réagir avec un nouvel acide gras.

La **phase de propagation** correspond au phénomène qui en amplifie la peroxydation lipidique et induit la génération de nouveaux radicaux libres.

En plus de LO• et de LOO•, qui ont le même nombre d'atomes de carbones que les acides gras de départ, il y a formation de radicaux (L'•) de plus petite taille, issus des réactions de cassure.

La **phase de terminaison** s'effectue soit grâce à l'intervention d'un antioxydant comme la vitamine E (α-tocophérol) (cf. p. 56), soit par association de 2 radicaux qui forment une structure stable.



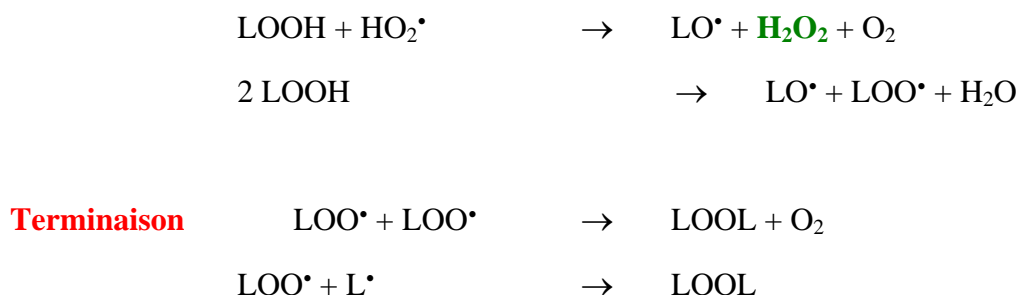


Figure 17 : Principales étapes de la lipoperoxydation

Les produits ultimes de la lipoperoxydation sont des aldéhydes, des acides et des hydrocarbures qui sont issus de la coupure des hydroperoxydes (LOOH) dont l'instabilité est grande en présence de fer ionisé et hémique (Esterbauer et al., 1982). Les hydroperoxydes peuvent également être formés par action des lipoxygénases.

Parmi les aldéhydes il faut retenir le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE).

Le HNE peut réagir avec les groupements thiols et amines des protéines et ainsi inhiber leur activité enzymatique. A concentration élevée le HNE induit la déplétion en GSH, la perte de l'homéostasie calcique, inhibe la respiration mitochondriale ainsi que la synthèse des acides nucléiques et des protéines (Cheeseman, 1993). Son effet peut donc être cytotoxique.

Le HNE, in vitro, peut induire les caspases, le clivage de la PARP et la fragmentation de l'ADN (*cf. p. 62*) (Liu et al., 2000).

2.1.1.3.3.2 Phospholipases, cyclooxygénases, sphingomyélinase

Les phospholipases, dont la A₂, assurent le relargage des acides gras. Elles sont activées par les UV. La phospholipase A₂ a apparemment une préférence pour les phospholipides membranaires oxydés (Cheeseman, 1993).

Les cyclooxygénases donnent naissance à divers eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines et thromboxane) principalement à partir de l'acide arachidonique « relargué ». Les eicosanoïdes sont des seconds messagers impliqués dans de nombreux processus dont l'érythémogénèse et la mélanogénèse (Carsberg et al., 1995).

Remarque : Les hydroperoxydes peuvent également donner naissance à des eicosanoïdes (leucotriènes).

La sphingomyélinase peut être activée par de nombreux facteurs entre autres : IL-1, Fas ligand, 1,25 dihydroxyvitamine D3, IFN- γ (interféron) (Hannun, 1994), TNF- α (tumor necrosis factor) (Kock et al., 1990; Obeid et al., 1993)) dont les concentrations sont

augmentées par les UV. La sphingomyélinase hydrolyse la sphingomyéline (céramide + choline) et libère les céramides. Les céramides (*cf. p.62*) (sphingosine associée à un acide gras comportant un groupement aminé) sont des molécules impliquées dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Geilen et al., 1997). Les céramides peuvent également avoir un effet protecteur par induction de la MnSOD (Pahan et al., 1999).

2.1.1.3.4 UV et mélanocyte

2.1.1.3.4.1 Données générales

Le bronzage résulte de l'effet direct des photons sur les mélanocytes (Friedmann et Gilchrest, 1987) et d'effets indirects passant par les kératinocytes, mais également à un moindre degré par les fibroblastes, les neurones et les mastocytes et probablement par d'autres cellules résidentes de la peau (Gilchrest et Eller, 1999).

Les UVB induisent le relargage de bFGF par les kératinocytes et les fibroblastes, ce qui stimule la prolifération des mélanocytes (Halaban et al., 1992).

2.1.1.3.4.2 UV et mélanogénèse

La mélanogénèse est principalement sous la dépendance de l'activité tyrosinase qui est, elle-même, contrôlée par de nombreux métabolites.

Les UV induisent une augmentation de la concentration en IL-1 qui, elle-même, stimule la synthèse d'ET-1, d' α -MSH et d'ACTH (Imokawa et al., 1992 ; Kippenberger et al., 1995) dans les kératinocytes (Imokawa et al., 1992; Schauer et al. 1994). L'IL-1 aurait donc un double rôle puisqu'elle augmente la mélanogénèse par stimulation de l' α -MSH mais qu'elle diminue le taux de tyrosinase, de TRP-1 et de TRP-2 comme TNF- α (Abdel-Malek et al., 1993).

Après irradiation UV, la concentration en prostaglandines augmente (Black et al., 1980) puisqu'elles sont obtenues par clivage de l'acide arachidonique par action de la phospholipase A₂. Les prostaglandines, notamment la prostaglandine E₂, induisent une augmentation de la dendricité du mélanocyte et de la mélanogénèse (Tomita et al., 1987).

Les UV stimulent le clivage et le renouvellement des constituants phospholipidiques de la membrane par activation des phospholipases, en particulier la phospholipase A₂, générant des médiateurs tels que le diacylglycérol (DAG) (DeLeo et al., 1984; Punnonen et Yuspa, 1992). Le diacylglycérol active la protéine kinase C (PKC) qui active la tyrosinase par phosphorylation de ses résidus sérine (Gordon et Gilchrest, 1989; Park et al., 1999).

Les UV induisent également une augmentation de la synthèse d'ET-1 qui, comme le DAG, stimule la PKC (Imokawa et al., 1992; Kippenberger et al., 1995).

Les UV induisent une levée de l'inhibition de la tyrosinase puisqu'ils oxydent la thioredoxine (Sundaram et al., 1990). En effet, la forme réduite de la thioredoxine inhibe la tyrosinase alors que la thioredoxine oxydée n'a pas d'effet sur l'activité de cette enzyme (Schallreuter et Wood, 1986).

Après irradiation, la synthèse de la vitamine D3, pour laquelle les mélanocytes possèdent des récepteurs, augmente (Abdel-Malek, 1988; Abdel-Malek et al., 1988). Le rôle de la vitamine D3 dans la stimulation de la mélanogénèse est très controversé sur des cellules en culture. D'après Mansur et al. (1988), la vitamine D3 ou ses métabolites n'agissent pas directement sur la mélanogénèse, par contre Tomita et al. (1986) ont observé qu'elle induisait une augmentation de la dendricité et une augmentation du taux de tyrosinase. De même, Hosoi et al. (1985) ont observé que la vitamine D3 induisait une augmentation de l'activité tyrosinase. Dans la peau, la vitamine D3 augmente la formation de la mélanine, conséquemment une déficience en vitamine D3 peut abroger la capacité de la peau à bronzer en réponse à une stimulation UV (Nordlund et Ortonne, 1998).

Il a été montré par le groupe de Gilchrest (Eller et al., 1996) que les UV induisent une réponse SOS-like, qui est initiée par les lésions de l'ADN, plus particulièrement par les fragments d'ADN excisés. Cette induction peut être reproduite par addition de pTpT qui induit l'augmentation de la tyrosinase et de la fixation de l' α -MSH (Eller et al., 1996).

L' α -MSH, qui augmente après irradiation UV (Imokawa et al., 1992; Kippenberger et al., 1995; Schauer et al., 1994), stimule la prolifération des mélanocytes en augmentant leur entrée en phase S de mitose et augmente la mélanogénèse (Abdel-Malek et al., 1994a).

Les UV induisent une stimulation de la mélanogénèse par augmentation de l'activité tyrosinase sans augmentation du taux de tyrosinase et du taux de TRP-1, par contre le taux de TRP-2 diminue (Abdel-Malek et al., 1994b).

La tyrosine, qui est une cible pour les radicaux libres, est plus rapidement convertie en mélanine à l'état partiellement oxydée (Forlot, 1987).

2.1.1.3.4.3 Rôles de la mélanine

La mélanine peut absorber les photons et ainsi protéger l'ADN contre les effets directs des UV (CPD, 6-4PP, DewarPP) (Kobayashi et al., 1993; 1998). Ceci se traduit par une diminution de la formation des CPD chez les individus fortement pigmentés (Strickland et al., 1988, Barker et al., 1995).

La mélanine et ses précurseurs ont un double rôle prooxydant ou antioxydant (Schmitz et al., 1995 ; Krol et Liebler, 1998). Ils peuvent soit induire, soit prévenir des lésions de l'ADN et de la cytotoxicité UV-induites.

L'oxydation de la tyrosine (précurseurs primaire de la mélanine) induit la formation de DOPA qui en présence d'oxygène et d'ions métalliques (cuivre ou fer), induit la formation de 8-oxodG et de 5OHdC *in vitro* (Morin et al., 1998).

Les études avec de la mélanine synthétique ou naturelle sont contradictoires. Certaines études ont montré un rôle de « scavenger » (épuration, piègeur) de radicaux libres (Korytowski et al., 1986 ; Sarna et al., 1986 ; Rozanowska et al., 1999), d'autres un rôle de générateur de radicaux libres (Kvam et Tyrrell, 1999). Le DHI et la 5-S-cysteinyl-dopa (précurseurs des mélanines) par photolyse UV-induite produisent des radicaux libres et des lésions de l'ADN (Koch et Chedekel, 1986; Costantini et al., 1994) mais le DHI et le DHICA ont un rôle antioxydant plus important que la mélanine (Zhang et al., 2000). Le DHICA a également un rôle antioxydant envers OH[•] (Novellino et al., 1999).

Les mêmes résultats contradictoires sont observés sur cellules en culture. Les mélanocytes en culture sont photosensibilisés par leurs propres chromophores, plus particulièrement par la phéomélanine ou les intermédiaires de la mélanine (eu et phéo), ce qui se traduit par une augmentation des cassures de l'ADN (Wenczl et al., 1998). Sur cellules mélanomateuses en culture, l'induction de bases oxydées est également observée (Kvam et Tyrrell, 1999). Cependant, la mélanine est très efficace pour diminuer la lipoperoxydation UV-induite par « scavenging » (épuration) des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Schmitz et al., 1995) et peut ainsi protéger la cellule pigmentée des lésions induites par les ROS (Menon et Haberman, 1977).

De même, le rôle moins cytotoxique des UV sur les mélanocytes noirs, observés par Yohn et al., (1992) est remis en cause par Hill et al. (1997) et Wenczl et al. (1998).

Ce double rôle peut dépendre de la concentration en ions métalliques (Schmitz et al., 1995). En effet, en présence de fer (Fe³⁺), la phéomélanine devient prooxydante et génère des radicaux libres qui stimulent la lipoperoxydation induite par les UVA/B, tandis que la complexation de l'eumélanine avec le fer inhibe son activité antioxydante mais sans la rendre pour autant prooxydante (Krol et Liebler, 1998).

Le pH et le mode de genèse des radicaux libres peuvent également influencer sur le rôle de la mélanine (Korytowski et al., 1986; Novellino et al., 1999; Hill et al., 1997; Cieczka et al., 1997).

2.1.2 Changements morphologiques de la peau après irradiation

2.1.2.1 UVA

➤ Les UVA induisent d'un point de vue **macroscopique** un érythème immédiat, une pigmentation immédiate due à la photooxydation de la mélanine et non à une néomélanogenèse, ainsi qu'une pigmentation retardée due à une néomélanogenèse (18-24h) (Fitzpatrick, 1986).

➤ L'observation en **microscopie optique** montre que les UVA induisent un œdème de l'épiderme, des « sunburn cells » (Kumakiri et al., 1977), une hyperplasie des cellules endothéliales et une infiltration du derme par des lymphocytes et des neutrophiles ainsi qu'une dégranulation des mastocytes. Ils n'induisent pas véritablement d'augmentation de l'épaisseur du stratum corneum. Ils n'induisent pas de transfert de la mélanine qui reste localisée au niveau de la basale. Ils ne semblent pas être mitogènes pour les mélanocytes mais stimulent la tyrosinase (Fitzpatrick, 1986).

➤ L'observation en **microscopie électronique** révèle que le nombre de mélanosomes est augmenté, que leur stade de maturation est avancé, et qu'ils sont localisés dans les dendrites (Fitzpatrick, 1986).

2.1.2.2 UVB

➤ Les UVB induisent d'un point de vue **macroscopique** un érythème retardé (18 heures) et une pigmentation retardée (48-72h) due à une néomélanogenèse (Fitzpatrick, 1986).

➤ La **microscopie optique** révèle qu'ils induisent l'apparition de « sunburn cells », une hyperplasie des cellules endothéliales et une dégranulation des mastocytes. Ils induisent une augmentation de l'épaisseur du stratum corneum. Dans ce cas, la mélanine est retrouvée dans toutes les couches de l'épiderme. Ils sont mitogènes pour les mélanocytes et stimulent la tyrosinase.

➤ L'observation en **microscopie électronique** révèle que le nombre et la taille des mélanosomes sont augmentés, que leur stade de maturation est avancé, et qu'ils sont localisés dans les dendrites (Fitzpatrick, 1986).

2.1.2.3 Influence du phototype

Le nombre de mélanocytes n'est pas significativement différent entre les peaux de phototypes I/II et III/IV, mais l'activité tyrosinase est plus importante dans les phototypes III/IV après irradiation UVB (Tobin et al., 1994).

Les peaux de phototypes I/II sont plus susceptibles à l'immunosuppression UV-induite que les peaux de phototype III/IV (Young ICP, 2000).

2.2 Systèmes de défense et de réparation

2.2.1 Réparation des lésions de l'ADN

2.2.1.1 Réparation par excision de nucléotides

Dans les cellules de mammifères, les photoproduits sont éliminés par le mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER) soit par **réparation couplée à la transcription** (TCR) soit par **réparation globale du génome** (GGR) (Friedberg et al., 1995) (*cf. Figure 18 : Principales étapes de la réparation par excision de nucléotides : a) réparation globale, b) réparation couplée à la transcription (d'après Quillet, 1997 ; Tornaletti et Pfeiffer, 1996), p.49*). Les photolésions (oxydations) peuvent également être réparées par TCR (Mullenders, ICP 2000).

La réparation des 6-4 PP est de 90 % en 3 heures dans des fibroblastes en culture (Nakagawa et al., 1998). Ils sont complètement réparés 6 heures après irradiation dans les fibroblastes en culture (Perdiz et al., 2000).

La réparation des CPD est de 10 % en 3 heures et de seulement 20 % en 6 heures dans des fibroblastes en culture (Nakagawa et al., 1998). Les CPD et les DewarPP sont éliminés selon la même cinétique et avec la même efficacité (Perdiz et al., 2000).

Les 6-4 PP sont réparés plus rapidement et plus efficacement que les CPD probablement par la réparation globale alors que les CPD sont réparés plus lentement et de façon incomplète (Friedberg et al., 1995). La réparation plus rapide des 6-4 PP pourrait être liée au fait qu'ils induisent une plus grande distorsion de l'ADN que les CPD (Hwang et al., 1996 ; Jing et al., 1998). Les 6-4 PP sont probablement réparés par réparation globale alors que les CPD sont probablement réparés par réparation couplée à la transcription. Les DewarPP sont réparés, soit par réparation couplée à la transcription, soit par réparation globale, mais, dans ce cas, le complexe XPC/HHR23B (« UV excision repair protein RAD23 homologue B ») se fixerait avec une affinité inférieure à celle observée pour les 6-4 PP probablement du fait d'une moins grande distorsion de l'ADN (Perdiz et al., 2000).

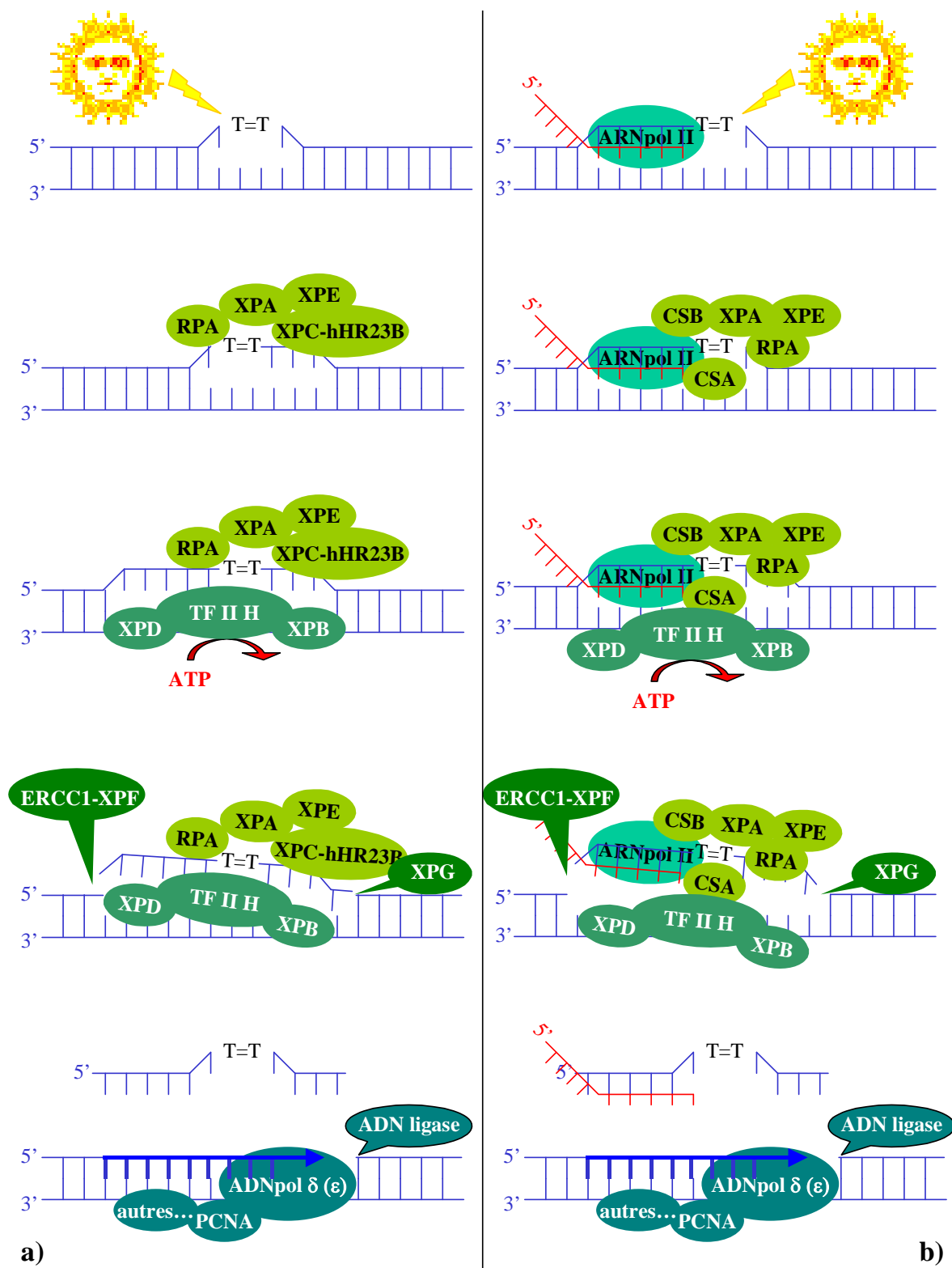


Figure 18 : Principales étapes de la réparation par excision de nucléotides : a) réparation globale, b) réparation couplée à la transcription (d'après Quillet, 1997 ; Tornaletti et Pfeiffer, 1996)

La première étape de la **réparation couplée à la transcription** est le blocage de l'ARN polymérase II, tandis que la première étape de la **réparation globale du génome** est la

reconnaissance et la fixation de XPC (Mullenders, 2000 ICP). XPA associé à XPE et RPA (Protéine de Réplication A) ont longtemps été considérées comme les protéines impliquées dans la reconnaissance de la lésion (Tornaletti et Pfeifer, 1996 ; Quillet, 1997). XPE serait impliqué dans la reconnaissance des 6-4 PP alors que XPA reconnaîtrait une grande variété de lésions dont les dimères de pyrimidine (Boulikas, 1996). Cependant, il semble que ce soit XPC qui induise véritablement la reconnaissance de la lésion (Mullenders, ICP 2000). La recherche de la lésion semble être également liée à la détection des distorsions de l'ADN par les hélicases (XPB et XPD associées à TFIIH).

La reconnaissance est suivie des clivages endonucléasiques en 3' et en 5'. Ensuite il y a excision d'un oligonucléotide de 29 bases, puis resynthèse par l'ADN polymérase (δ ou ϵ) et enfin ligation. L'ADN polymérase est stimulée par le PCNA (antigène nucléaire de prolifération cellulaire). Le PCNA mélanocytaire peut être transféré aux kératinocytes en association avec les mélanosomes (Iyengar, 1998).

Influence de la p53 dans la NER

Les lésions de l'ADN stimulent la synthèse de la p53 qui possède de nombreux effecteurs.

De ce fait, elle induit trois types de réponses (Ford ICP, 2000) :

- ✎ l'**arrêt du cycle cellulaire** (p21, GADD 45),
- ✎ la **réparation par excision de nucléotides** (p48-XPE, GADD45),
- ✎ l'**apoptose** (bax, bcl2, PIG).

L'arrêt du cycle cellulaire facilite la réparation de l'ADN en allongeant le temps avant la nouvelle réplication.

L'addition de pTpT, qui mime l'effet de l'excision de fragments d'ADN, stimule la transcription et la traduction de XPA et de p53 et conséquemment de p21, PCNA, GADD45 (Eller et al., 1997) et facilite donc la réparation de l'ADN.

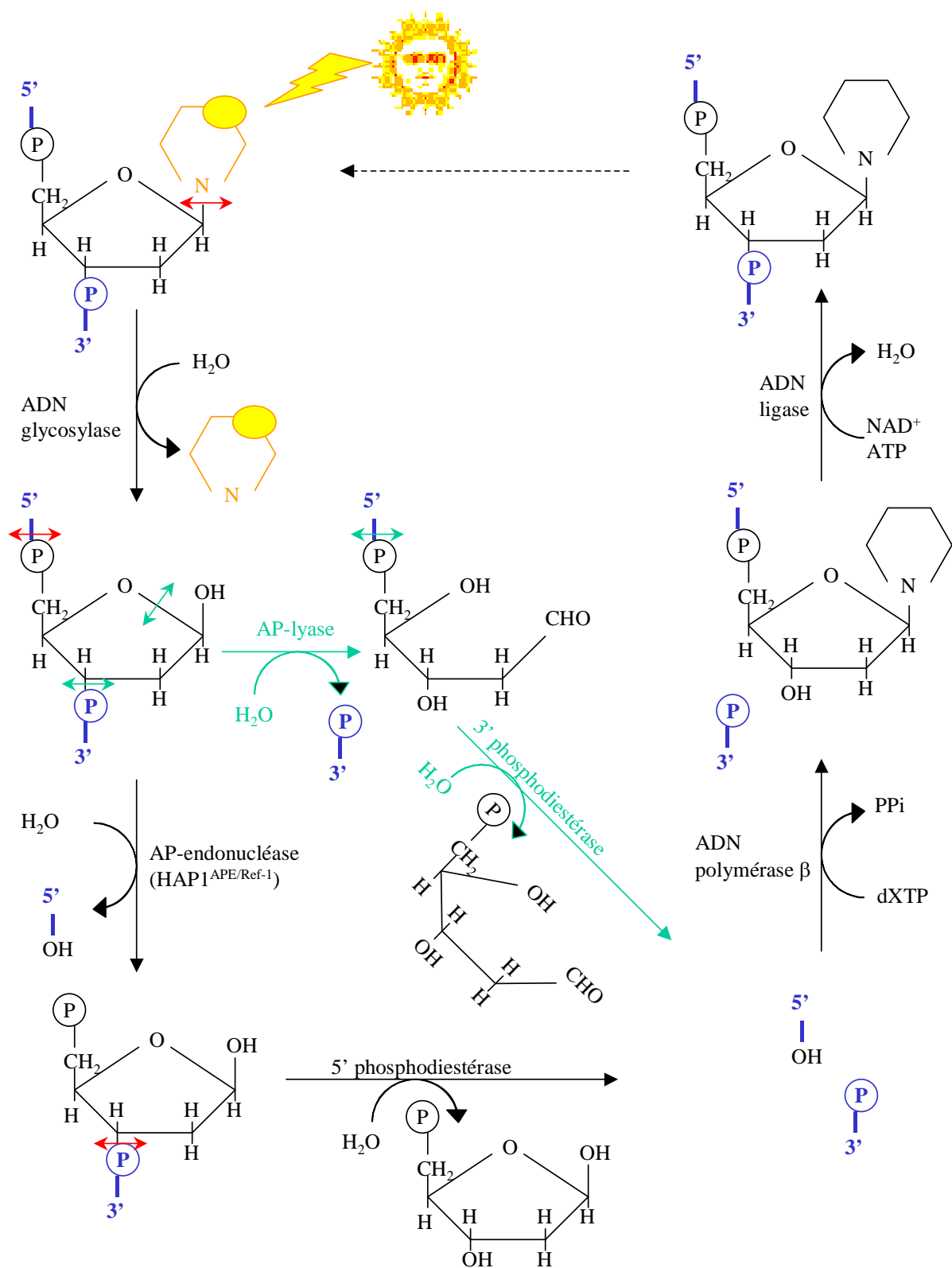


Figure 19 : Principales étapes de la réparation par excision de base (d'après Seeberg et al., 1995)

2.2.1.2 Réparation par excision de base

Les photolésions et les cassures simples brins sont éliminées principalement par excision de base (BER) (Friedberg et al., 1995).

La réparation par excision de base (cf. *Figure 19 : Principales étapes de la réparation par excision de base (d'après Seeberg et al., 1995), p. 51*) implique des ADN glycosylases qui enlèvent les bases modifiées ou lésées par clivage de la liaison N-glycosidique entre la base et le désoxyribose d'un nucléotide. (remarque : Il existe différentes glycosylases spécifiques du type de lésion). Une fois la base enlevée, on obtient un site apurique ou apyrimidique qui est clivé ; soit par une endonucléase spécifique (voie en noir sur le schéma), soit par une lyase spécifique (voie en bleu sur le schéma). Un deuxième clivage par une phosphodiesterase permet d'éliminer le désoxyribose lié au phosphate. L'ADN polymérase et la ligase permettent alors la restauration de l'ADN (Seeberg et al., 1995).

Les cassures de l'ADN sont réparées en 1 heure alors que les bases oxydées sont réparées en 4 heures (Weiss et Gallager, 1993; Collins et al., 1995).

2.2.1.3 Réparation par photoréactivation

La réparation des lésions par photoréactivation est toujours très débattue chez l'homme. Il existe une photolyase spécifique pour les 6-4 PP et une photolyase spécifique pour les CPD.

La photolyase reconnaît spécifiquement la lésion et s'y fixe. L'exposition du complexe photolyase-dimère à la lumière photoréactive (300-500 nm) convertit la forme dimérique en sa forme monomérique (Stege et al., 2000).

Dans les cellules de poissons l'activité photolyase peut être induite par un stress oxydatif (Mitani et Shima, 1995).

Chez l'homme, 2 gènes photolyase-like, très similaires de la 6-4 PP photolyase, ont été identifiés (Todo et al., 1996; Hsu et al., 1996) mais leur activité photolyase n'a pas été prouvée (Todo et al., 1997).

La photoréactivation pour la réparation des CPD chez l'homme a été observée, dans les fibroblastes (Zolzer et al., 1993), dans la peau (D'Ambrosio et al., 1981; Sutherland et al., 1980; Roza et al., 1991). Cependant de nombreuses autres publications indiquent une absence de photoréactivation dans les cellules humaines (De Gruijl et Roza, 1991; Ley, 1993) et dans la peau (Stege et al., 2000). Ces différences peuvent être attribuées à la méthode de détermination et aux conditions expérimentales (Stege et al., 2000).

2.2.1.4 Réparation post-réplivative

Les 6-4 PP et les CPD bloquent l'ADN polymérase et donc la réplication. Cependant ce blocage peut être circonvenu par la réinitiation de la synthèse d'ADN au-delà de la lésion bloquante. Le brin ainsi formé est discontinu mais la brèche peut être comblée soit par synthèse translésionnelle d'ADN soit par recombinaison avec le brin complémentaire (Quillet, 1997, Vos, 1992).

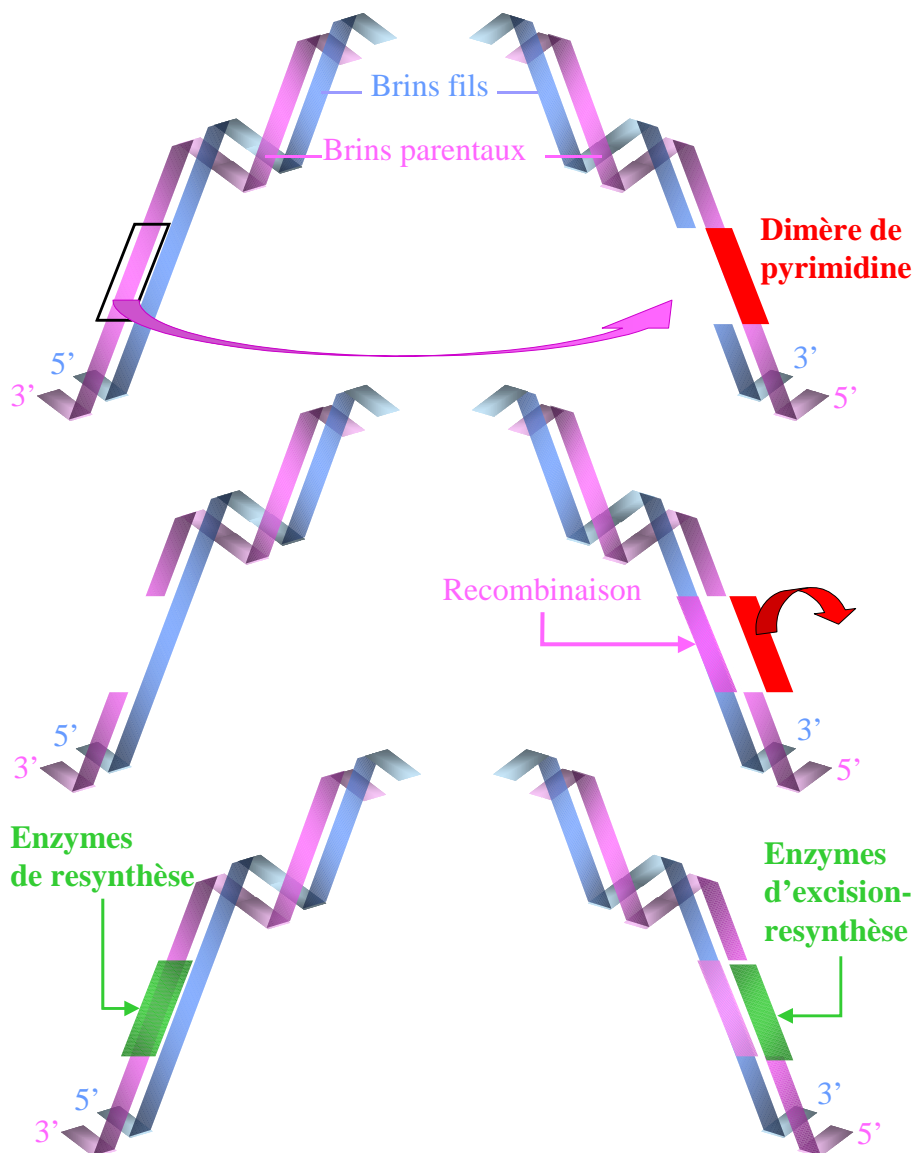


Figure 20 : Réparation post-réplivative (Biochimie génétique. Biologie Moléculaire, Etienne, Masson (ed), 1996)

2.2.2 Protection de la lipoperoxydation

La protection de la lipoperoxydation est réalisée par les enzymes cytosoliques (SOD, catalase, GSHPx) et les antioxydants (*cf. p. 55*).

La phospholipase A₂, qui est activée par peroxydation, peut exciser les acides gras oxydés des phospholipides. Les hydroperoxydes ainsi formés peuvent alors être réduits par la GSHPx. Le monoacylphosphoglycérol ainsi obtenu est régénéré en phospholipide par une acyltransférase utilisant l'acyl-CoA. L'organisation de la bicouche lipidique est corrigée par une translocase (Lubin et Kuypers, 1991).

Les aldéhydes, formés durant la lipoperoxydation comme le MDA et le HNE, sont détoxiqués par les antioxydants. Le MDA peut également être converti en acétyl-CoA et en acétate qui peuvent ensuite être métabolisés (Sies, 1998).

2.2.3 Réparation et dégradation des protéines oxydées

Les cellules de mammifères ont une réparation directe mais limitée des protéines. La plupart des protéines oxydées subissent une protéolyse.

2.2.3.1 Réparation des protéines oxydées

De nombreuses protéines (de stress ou de choc) constitutives ou inductibles par le stress oxydatif sont capables d'assister la reconstitution de la structure tertiaire des protéines mais leur mode d'action est inconnu (Grune et al., 1997). Les HSP et l'hème-oxygénase (*cf. p.36*) font partie de ces protéines. La thioredoxine, quant à elle, est une petite molécule qui sert de source d'électrons dans de nombreux processus métaboliques (Holmgren, 1989) (*cf. p. 57*) et qui permet la réparation des ponts disulfure. Les ponts disulfure sont également réparés par la protéine disulfure isomérase. Les méthionines oxydées peuvent être réparées par les méthionines sulfoxyde réductases (Grune et al., 1997).

2.2.3.2 Dégradation des protéines oxydées

De nombreuses protéases dégradent plus rapidement les protéines oxydées que leurs contreparties non oxydées (Davies et al., 1987; Stadtman, 1992). L'oxydation des protéines augmente leur susceptibilité à la protéolyse jusqu'à un certain degré au-delà duquel une augmentation des lésions se traduit par une diminution de la susceptibilité à la protéolyse et conduit à des « cross-links » inter- et intra-protéiques et à des agrégations protéiques (Grune et al., 1997; Sommerburg et al., 1997).

La dégradation des protéines oxydées peut se faire selon 2 voies :

➤ les **protéases lysosomales**. La rupture de la membrane lysosomale, induite par la lipoperoxydation UV-induite, peut libérer les protéases lysosomales (Pourzand et Tyrrell, 1999)

➤ les **protéasomes**. (Grune et al., 1997). Il existe 2 complexes protéasomiques :

le **26 S** qui nécessite la présence d'un substrat ubiquitinylé et d'ATP

le **20S** qui agit indépendamment de l'ATP et de l'ubiquitine et qui est le seul impliqué dans la dégradation des protéines oxydées sous l'effet d'un stress oxydatif.

Les acides aminés provenant de la dégradation des protéines sont ensuite utilisés pour synthétiser de nouvelles protéines.

2.2.4 Défenses envers les espèces réactives de l'oxygène

2.2.4.1 Enzymes antioxydantes principales

2.2.4.1.1 Superoxyde dismutases

Il existe deux types de superoxyde dismutases (SOD) dans l'épiderme : la Mn-SOD mitochondriale et la Cu-Zn SOD cytoplasmique. Les SOD assurent la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène. L'activité des SOD est contrôlée par le taux de $O_2^{\cdot -}$ (Escobar et al., 1996).

Les protéines SOD sont peu sensibles à l'oxydation protéique. Cependant l'oxydation d'un seul de leurs sites induit une diminution de leur activité de 20 % (Escobar et al., 1996). Les deux formes de SOD sont inactivées par H_2O_2 (Fridovitch, 1986).

Le gène de la MnSOD est activé par la fixation de NF- κ B (Jones et al., 1997) et par les céramides (Pahan et al., 1999).

2.2.4.1.2 Catalase

La catalase assure la détoxification du peroxyde d'hydrogène. La catalase peut se trouver au niveau des peroxysomes (80 %) et du cytoplasme (20 %). L'activité de la catalase est contrôlée par le taux d'anions superoxyde.

La protéine catalase est très sensible à sa propre oxydation protéique. Cependant l'oxydation de nombreux sites est nécessaire pour induire une diminution de son activité (Escobar et al., 1996). La catalase agit pour des concentrations en H_2O_2 inférieure ou égale à 100 μ M alors que la GSHPx agit pour des concentrations supérieures à 100 μ M (Masaki et al., 1998).

La catalase, en diminuant le taux d' H_2O_2 , protège l'ADN des cassures simple brin et de la formation de 8oxodG. Elle réduit également les lésions des enzymes GSHPx-like et SOD, permettant ainsi le maintien de leur activité lors d'irradiations chroniques (Brenneisen et al., 1999).

2.2.4.1.3 Glutathion peroxydases / glutathion réductase

Il existe au moins 5 types de glutathion peroxydases séléno-dépendantes. La glutathion peroxydase (GSHPx) agit en collaboration avec la glutathion réductase. Les glutathion peroxydases assurent, comme la catalase, la détoxification du peroxyde d'hydrogène. L'activité des GSHPx est contrôlée par le taux d'anions superoxyde (Fridovith, 1986) et est inhibée par

le NO (Asahi et al., 1995). La GSHPx est inactivée de façon irréversible par H_2O_2 et OH^\bullet en absence de glutathion. OH^\bullet et $O_2^{\bullet-}$ peuvent induire la fragmentation de la GSHPx et OH^\bullet augmente sa susceptibilité à la protéolyse (Pigeolet et Remacle, 1991).

Il existe également une glutathion peroxydase spécifique des phospholipides (PHGSHPx). Elle enlève les hydroperoxydes (LOOH), ce qui inhibe la cascade induite par la lipoperoxydation. De ce fait, elle protège de la nécrose et de l'apoptose (Wang, ICP 2000).

La GSHPx et la PHGSHPx, en présence de glutathion, diminuent l'activité des cyclooxygénases (Warso et Lands, 1985) et de certaines lipoxygénases (Schnurr et al., 1996), ce qui diminue la formation des eicosanoïdes (molécule de l'inflammation) (*cf. p.43*).

2.2.4.1.4 Thioredoxine peroxydase / thioredoxine réductase

La thioredoxine peroxydase peut réduire le peroxyde d'hydrogène et les alkylperoxydes en oxydant la thioredoxine. Cette dernière est régénérée par la sélénium thioredoxine réductase (Cha et Kim, 1995).

La thioredoxine réductase assure la réduction de la thioredoxine par transfert d'électrons au $NADP^+$ grâce à une flavine (Sies, 1998). La thioredoxine réductase peut également utiliser l'anion superoxyde pour réduire la thioredoxine. Elle joue donc un rôle très important dans la peau où l'activité SOD est faible (Schallreuter et Wood, 1989).

La thioredoxine réductase, quant à elle, est réduite de la même façon que la glutathion réductase, grâce au $NADP^+$.

2.2.4.2 Principaux antioxydants naturels non-enzymatiques

2.2.4.2.1 Vitamine E (α -tocophérol)

L' α -tocophérol protège de la lipoperoxydation induite par le fer (Buettner et al., 2000 ICP).

L' α -tocophérol détoxique le radical superoxyde, l'oxygène singulet, les radicaux hydroxyle et hydroperoxyde ainsi que les radicaux lipidiques avant qu'ils n'induisent des lésions (Darr et Fridovitch, 1994). Cette réaction aboutit à l'oxydation du tocophérol en radical tocophéroxyde qui est alors réduit par l'acide ascorbique (Bose et al., 1990).

2.2.4.2.2 Acide ascorbique ou Vitamine C

L'acide ascorbique assure la réduction du radical tocophéroxyle. Il peut également réagir avec le radical superoxyde et l'oxygène singulet (Darr et Pinnell, 1997).

Il protège de la lipoperoxydation induite par le fer (Buettner et al., 2000 ICP).

Ces réactions conduisent à la formation d'un radical ascorbyl qui est réduit soit par l'ascorbate réductase en présence de glutathion, soit par une autre réductase utilisant comme cofacteur le NADH, H⁺.

2.2.4.2.3 Caroténoïdes

Les caroténoïdes, dont le plus important est le β-carotène, détournent l'oxygène singulet, selon la réaction ci-après (Shafer, ICP 2000). Leur rôle est très important dans la peau (Kinsky, 1989). Ils peuvent stopper la lipoperoxydation en formant un radical peroxyde stable in vitro (Sies, 1998).



2.2.4.2.4 Glutathion

Il peut réduire les radicaux libres et réduire les ponts disulfure des protéines. Le radical formé est toxique et il doit être réduit par la glutathion réductase (*cf. p. 55*).

2.2.4.2.5 Métallothionéines

Les métallothionéines (protéines à zinc) sont de forts antioxydants du fait du nombre important de groupements thiols (cystéines). Ce sont des protéines nucléaires qui sont exprimées de façon constitutive mais sous l'action des UVB ou en présence de fer leur transcription est activée (Parat et al., 1999). Les métallothionéines peuvent protéger l'ADN des attaques par les radicaux hydroxyles probablement grâce à leurs nombreux groupements thiols (Min et al., 1999). Elles peuvent séquestrer les métaux et ainsi limiter la formation de radical hydroxyle via la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$) (Sies, 1998).

2.2.4.2.6 Thioredoxine

L'irradiation UVB induit une translocation de la thioredoxine du cytoplasme vers le noyau (Hirota et al., 1999) et augmente son expression (Nakamura et al., 1994; Taniguchi et al., 1996). La thioredoxine augmente la capacité de fixation de NF- κ B (facteur nucléaire) à l'ADN et stimule ainsi la transcription de divers gènes codant pour des protéines impliquées dans l'inflammation et les réponses immunitaires (Hirota et al., 1999). Elle augmente aussi la transcription de AP-1 (Hirota et al., 1999). La thioredoxine stimule également la tyrosinase (Schallreuter et Wood, 1986). Elle assure pareillement la réparation des ponts disulfure (Holmgren, 1989). Par contre, dans le cytoplasme, la thioredoxine inhibe la dégradation de I- κ B (inhibiteur de NF- κ B) et donc l'activation de NF- κ B.

2.2.4.3 Effet des UV sur les défenses antioxydantes de la peau

➤ Les **UVB** induisent, dans la peau murine, cultivée in vitro, une inhibition significative des activités de la superoxyde dismutase et de la catalase (Fuchs et al., 1989a ; Pence et Naylor, 1990; Shindo et al., 1993) ainsi qu'une déplétion en α -tocophérol (Fuchs et al., 1989a; Shindo et al., 1993) et en acide ascorbique (Shindo et al., 1993).

Une irradiation UVB chronique de la peau humaine induit une augmentation de la CuZn SOD (Punnonen et al., 1995) alors qu'une irradiation aiguë la diminue (Punnonen et al., 1991b).

➤ Les **UVA** diminuent l'activité catalase (Fuchs et al 1989b ; Punnonen et al., 1991a), mais n'affectent pas les activités SOD et GSHPx (Punnonen et al., 1991a, Moysan et al., 1993).

L'irradiation UVA chronique de fibroblastes en culture augmente le taux de transcrits de la MnSOD ainsi que son taux protéique (Poswig et al., 1999).

Les UVA I sont beaucoup plus cytotoxiques pour les fibroblastes en culture que pour les kératinocytes en culture probablement du fait d'une concentration plus faible en antioxydants (GSH, GSHPx, SOD) (Leccia et al., 1998).

✎ Les **UVA combinés aux UVB** induisent une diminution des activités SOD, catalase et GSHPx beaucoup plus importante que celle observée avec les UVB seuls (Punnonen et al., 1991a).

✎ Une **irradiation solaire simulée** aiguë induit une diminution des activités SOD, catalase, et à un moindre degré des activités glutathion peroxydases et glutathion réductase dans la peau murine. Elle induit également une déplétion en α -tocophérol, en acide ascorbique dans la peau murine (Shindo et al., 1994a et b).

En résumé, après une irradiation aiguë, l'activité SOD est diminuée, excepté après irradiation UVA alors qu'après une irradiation chronique, l'activité de la SOD est toujours augmentée montrant une adaptation du système antioxydant.

2.2.5 Apoptose UV-induite

L'apoptose se traduit par une rétraction de la cellule suivie de sa fragmentation (corps apoptotique), sans rupture de la membrane cellulaire, et s'accompagne de la fragmentation de l'ADN et de la condensation de la chromatine. Les corps apoptotiques sont ensuite éliminés par phagocytose (Mathieu et al., 1996).

La nécrose, elle, se traduit par un gonflement des mitochondries et une rupture de la membrane cellulaire associés à une réponse inflammatoire (Mathieu et al., 1996).

➤ Il existe une **apoptose immédiate** qui intervient dans la ½ heure qui suit l'irradiation

UVA I. Elle est liée à un changement de potentiel transmembranaire de la mitochondrie et à l'ouverture des MPTP (mitochondrial permeability transition pore). Ceci induit le relargage direct d'AIF (apoptosis-inducing factor) et de cytochrome c (cyt c) par la mitochondrie (Godar, 1999; Pourzand et Tyrrell, 1999). Cependant le cytochrome c peut être aussi relargué sans qu'il y ait changement de potentiel transmembranaire, il peut même l'induire (Pourzand et Tyrrell, 1999).

➤ Il existe une **apoptose intermédiaire**, principalement liée aux UVB, comprise entre ½ heure et 4 heures après irradiation, induite par la fixation de FasL sur Fas (CD95) (Godar, 1999).

➤ Il existe une **apoptose retardée**, principalement liée aux UVB, induite majoritairement par les lésions de l'ADN et, pour une moindre part, par la voie de CD95 (Godar, 1999 ; Kulms et al., 1999).

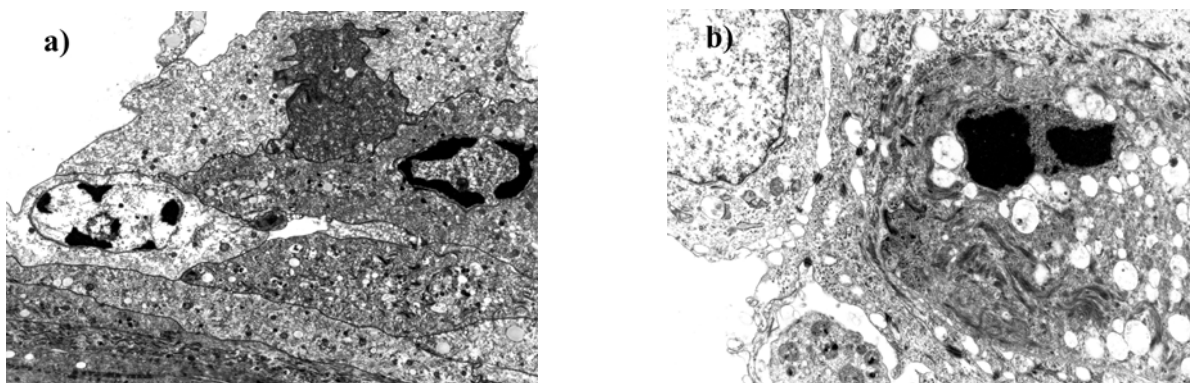


Figure 21 : Microscopies électroniques de cellules en apoptose : a) stade précoce, b) stade tardif (collection personnelle)

Les « sunburn cells » (SBC), kératinocytes apoptotiques, apparaissent 6 heures après irradiation. Elles correspondent donc à une apoptose retardée. Les SBC sont produites aussi bien par les lésions directes de l'ADN (CPD, 6-4 PP) que par les lésions liées aux radicaux libres. En effet des « scavengers » (« épurateurs, piègeurs ») de radicaux libres comme la

SOD, la catalase ou le D-mannitol préviennent partiellement la formation des SBC (Miyachi et al., 1983).

Une étude récente de Kulms et al., (1999) montre que l'apoptose UV-induite des kératinocytes (SBC) est médiée en partie par les lésions de l'ADN et que cette apoptose peut être prévenue même si tous les CPD ne sont pas réparés. Cette observation est corrélée avec l'hypothèse de Stege et al. (2000) selon laquelle il y aurait un seuil en deçà duquel l'apoptose ne serait pas induite.

2.2.5.1 Rôle des mitochondries dans l'apoptose

Le stress oxydatif qui induit des changements dans la chaîne respiratoire mitochondriale est impliqué dans l'ouverture du MPTP (mitochondrial permeability transient pore) (Pourzand et Tyrrell, 1999). L'ouverture du MPTP provoque un gonflement puis une rupture de la membrane externe de la mitochondrie, ce qui induit le relargage de cytochrome c et de AIF (apoptosis inducible factor) (Pourzand et Tyrrell, 1999; Halestrap et al., 2000). L'apoptose induite par le cytochrome c est caspase-dépendante alors que celle induite par l'AIF est caspase-indépendante (Daugasab et al., 2000 ; Daugas et al., 2000). L'AIF est une flavoprotéine qui induit la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN en grands fragments de 50 kb (Daugasab et al., 2000; Daugas et al., 2000; Lorenzo et al 1999).

L'apoptose passant par le relargage de AIF ou du cytochrome c par la mitochondrie est plus ou moins directe suivant les intermédiaires impliqués (Godar, 1999, Pourzand et Tyrrell, 1999).

Les lésions de l'ADN induisent l'activation de la transcription de p53 ce qui en augmentant l'expression de Bax, membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, localisé dans la membrane externe de la mitochondrie, induit la mort cellulaire. Bax induit, d'une part, le relargage de cytochrome c probablement en créant un canal et d'autre part, inhibe les régulateurs cellulaires des caspases (Jurgensmeier et al., 1998) (*cf. Figure 22: Schéma des différentes voies induisant l'apoptose., p 61*).

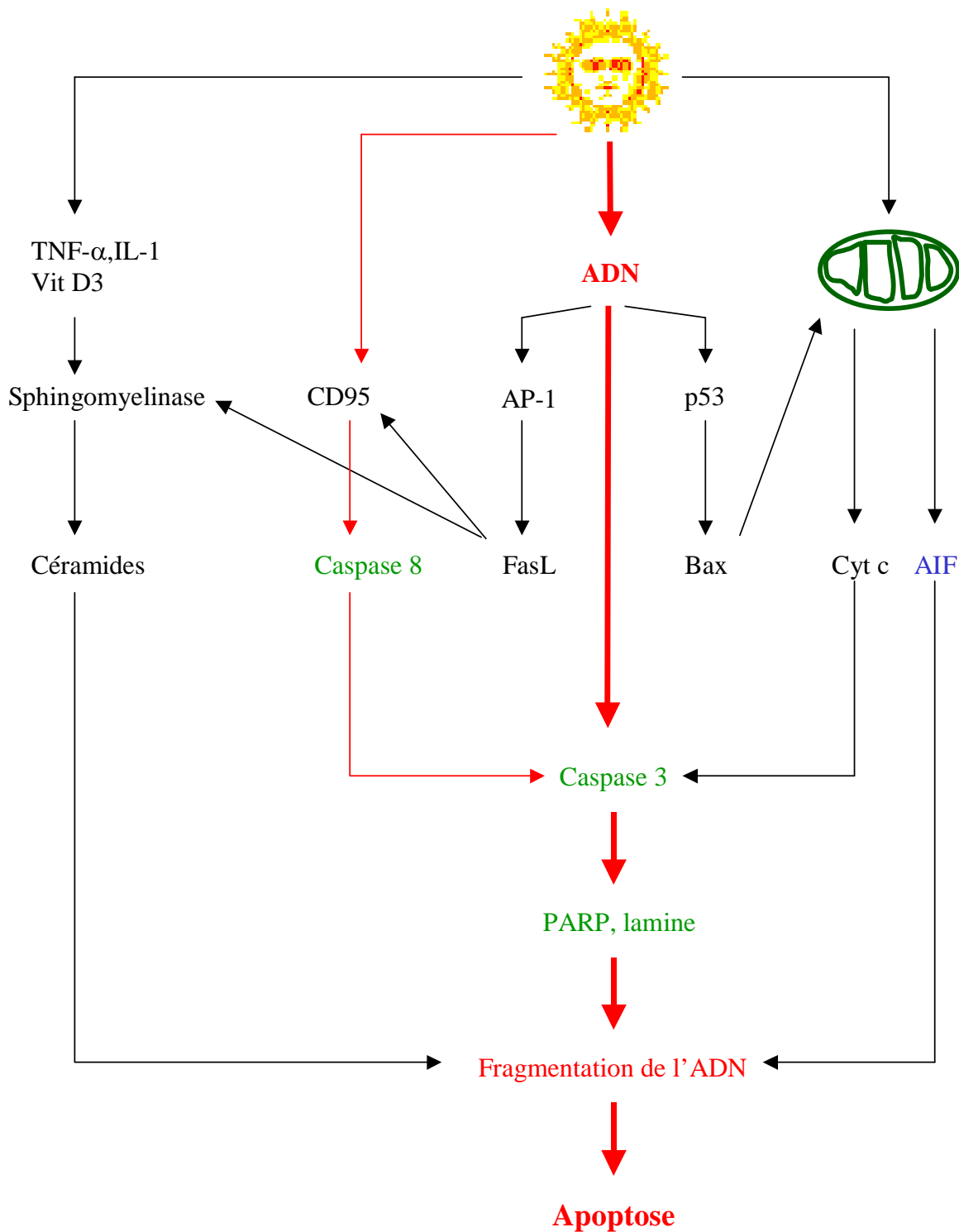


Figure 22: Schéma des différentes voies induisant l'apoptose.

2.2.5.2 Les caspases

Les caspases sont des protéases à cystéine. Elles sont présentes sous la forme de proenzymes inactives qui doivent être activées.

Les caspases initiatrices, telles que la 8, sont activées par la fixation de récepteurs « mort spécifique » (CD95 et TNFR1). Les UV peuvent activer CD95 (Fas récepteur) directement sans son ligand (Aragane et al.; 1998, Rehemtulla et al., 1997) ou indirectement via l'augmentation de son ligand (FasL) par AP-1 (Godar, 1999).

Les caspases exécutrices, comme la 3, sont clivées par diverses protéines.

Le cytochrome c s'associe avec Apaf1 (apoptosis protease-activating factor-1). En présence d'ATP ou de dATP ce complexe provoque le clivage de la procaspase 9. La caspase 9 activée clive et active la caspase 3. (Pourzand et Tyrrell, 1999).

La caspase 3 clive différents facteurs tels que la caspase 6, la PARP (poly (ADP-ribose) polymérase), le DFF (DNA fragmentation factor). Elle induit également l'activation de la

PKC δ (Cross et al., 2000; Denning et al., 1998).

La lamine-B est phosphorylée par la PKC δ puis elle est protéolysée par la caspase 6 (Buendia et al., 1999) ce qui induit un désassemblage de la lamine (Cross et al., 2000). La lamina nucléaire formée par les différentes lamines est une structure d'ancrage de la chromatine qui pourrait être responsable de la formation des structures en boucles. La dissociation de la chromatine associée à la lamina nucléaire pourrait faciliter l'activité des nucléases ainsi que le clivage et le relargage des boucles de chromatine durant l'apoptose (Shimizu et al., 1998).

La PARP assure la ribosylation de la $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ endonucléase qui est alors inactivée. Le clivage de PARP lève l'inhibition de l'endonucléase qui peut alors fragmenter l'ADN (Yakovlev et al., 2000).

2.2.5.3 Les céramides

Les céramides sont impliquées dans l'apoptose (*cf Figure 22: Schéma des différentes voies induisant l'apoptose., p. 61*) et l'arrêt du cycle cellulaire (Hannun, 1996).

Les UV, via la sphingomyélinase, induisent l'hydrolyse de la sphingomyéline et ainsi la genèse de céramides (Obeid et al., 1993) (*cf. p. 43*). La production de céramides, particulièrement les C2-céramides, provoque la fragmentation de l'ADN (Obeid et al., 1993) et donc l'apoptose.

La production de céramides peut être induite par les UV via le TNF- α . Les céramides ainsi produites activeraient NF- κ B, facteur de transcription nucléaire (Schütze et al., 1992). NF- κ B induit l'expression de gènes codant pour des cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α) et des chemokines (IL-8, MIP-1) et induit ainsi une immunomodulation et peut donc contrecarrer l'apoptose (Baichwal et Baeuerle, 1997).

Remarque : La PKC qui est activée par les UV via TNF- α a plutôt un rôle antagoniste de l'apoptose liée aux céramides (Hannun, 1996).

2.3 Cancers cutanés

Les deux principaux types de cancers cutanés sont les carcinomes qui se développent à partir des kératinocytes et les mélanomes qui se développent à partir des mélanocytes. La fréquence des cancers cutanés est en constante augmentation. Les carcinomes représentent 95 % des cancers cutanés. Les sujets les plus touchés, par les carcinomes et les mélanomes, sont les individus à peau claire.

Il semble que les « coups de soleil » reçus dans l'enfance augmentent plus le risque de déclencher un cancer cutané que ceux reçus à l'âge adulte.

Le soleil semble être à la fois initiateur et promoteur de tumeurs cutanées (Leffell et Brash, 1996). En effet, il n'induit pas que des mutations, il induit aussi une immunosuppression qui semble très importante dans le développement des tumeurs en empêchant le rejet des cellules mutées (Grossman et Leffell, 1997).

2.3.1 Mutations de l'ADN

Les mutations sont des modifications de la nature ou de la séquence de l'ADN qui affecte le patrimoine génétique et qui peuvent induire la survenue de cancers.

Les mutations spontanées qui surviennent lors de la réplication sont rares.

Les UV sont des agents mutagènes et donc potentiellement cancérigènes.

Les CPD et les 6-4PP sont des lésions prémutagéniques pour les transitions C → T. Par contre, il semble que seuls les 6-4 PP soient des lésions prémutagéniques pour les transitions T → C (Otoshi et al., ICP 2000) (*cf. Figure 23 : Schéma d'introduction d'une mutation par transition, p. 64*).

Les 8-oxodG, quant à elles, induisent, in vivo, des transversions G → T (Wood et al., 1990).

Des transversions de T → G sont également très souvent observées après irradiation UVA (Grossman et Leffell, 1997).

Le gène de la p53 est très fréquemment muté dans les carcinomes spinocellulaires (80-90 % des cas) (Leffell, 2000; Brash et al., 1991; Sarasin et al., ICP 2000; Berg et al, ICP 2000). Des mutations de p53 sont également trouvées dans à peu près 50 % des cas de carcinomes basocellulaires (Ziegler et al., 1993).

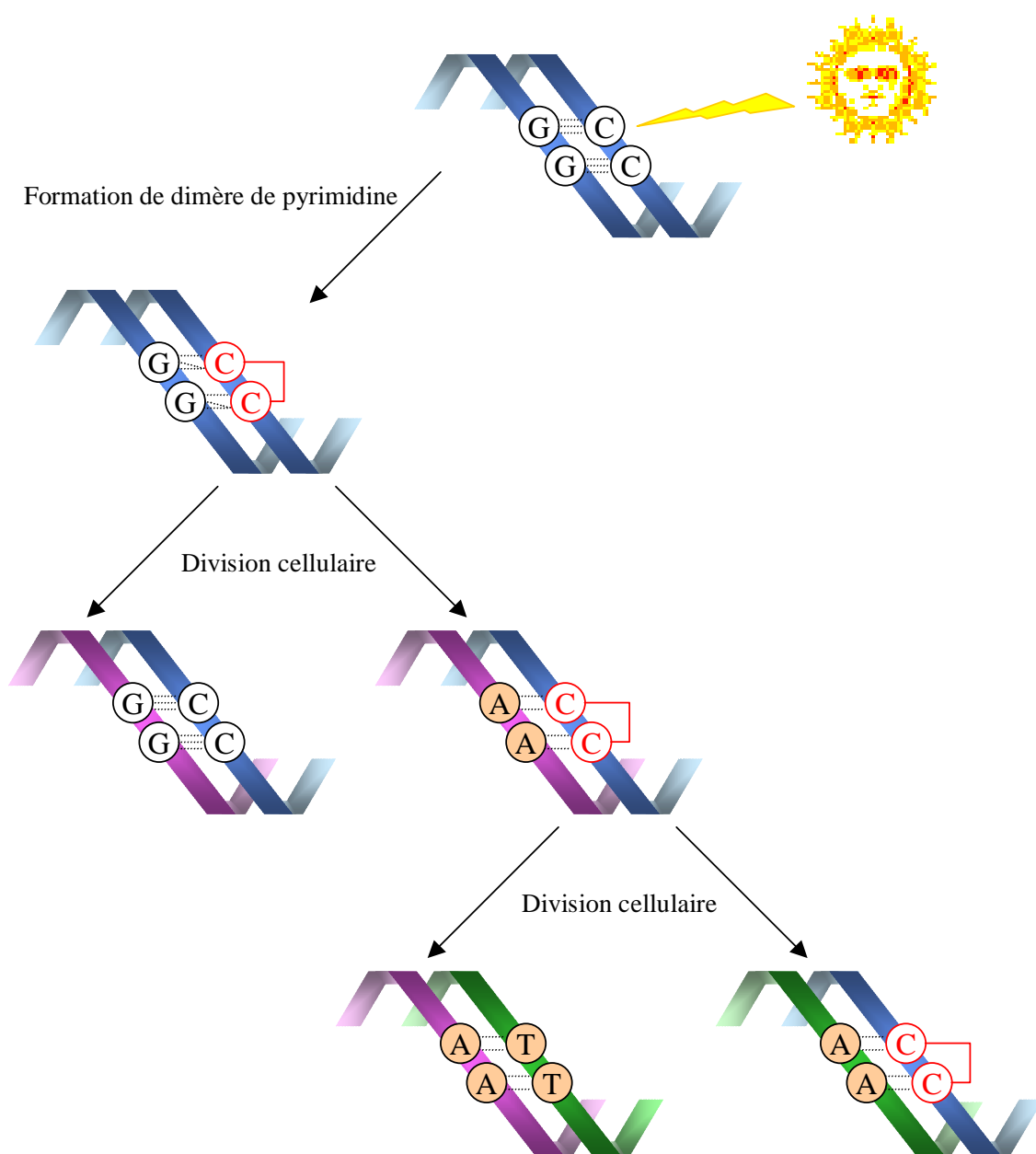


Figure 23 : Schéma d'introduction d'une mutation par transition

2.3.2 Carcinomes

Les carcinomes se développent à partir des kératinocytes et surviennent dans 90 % des cas dans les zones exposées (visage, oreilles, nuque). Les carcinomes basocellulaires (BCC), comme leur nom l'indique, se développent à partir des cellules basales alors que les carcinomes spinocellulaires (SCC) se développent à partir des kératinocytes plus différenciés (Hoerni et al., 1995). Les carcinomes basocellulaires sont 4 fois plus fréquents que les

carcinomes spinocellulaires et ne produisent pas de métastases à la différence des carcinomes spinocellulaires.

Pour Kvam et Tyrrell (1999), les carcinomes sont induits par les UVB, qui sont efficacement absorbés par l'ADN. Par contre, pour Christophers (1998), l'apparition des carcinomes spinocellulaires est corrélée à l'exposition solaire mais l'apparition de carcinomes basocellulaires n'est que partiellement corrélée. La pathogénie des carcinomes basocellulaires n'est pas attribuable entièrement aux expositions solaires. En effet, les observations de Green et al. (1999) indiquent que les écrans solaires préviennent les SCC mais pas les BCC.

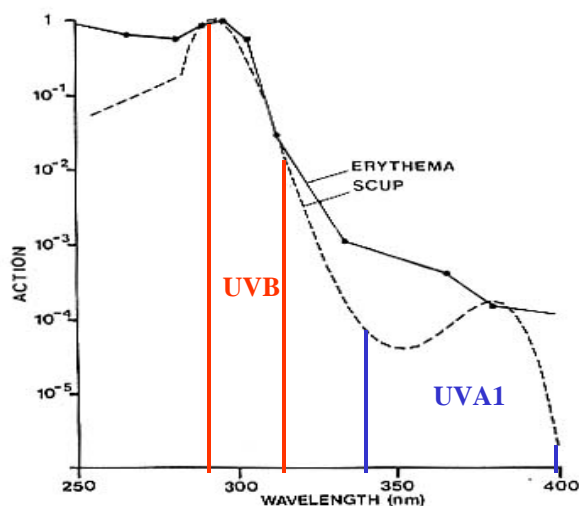
Les études de de Laat et al. (1997) sur la souris indiquent que les UVA constituent 10 à 20 pourcent de la dose carcinogénique et que les UVA 1 sont plus carcinogéniques que les UVB.

Van Kranen et al. (1997) ont également montré l'induction de tumeurs avec des irradiations à 365 nm (UVA) chez des souris.

De plus, chez les animaux, les UVA augmentent la carcinogénèse induite par les UVB (Brodthagen, 1986 ; van Weelden et al., 1986).

Les UVA sont donc peut-être également importants dans le développement des carcinomes humains (Epstein, 1997).

Le spectre d'apparition des cancers de la peau, chez l'homme, est biphasique avec des maxima à 293 nm et 385 nm (De Gruijl, 1995). Le spectre UVB de la carcinogénèse correspond à celui de l'érythémogénèse, ce qui n'est pas le cas pour le spectre UVA (cf *Grphe 1 : Spectre d'action de la photocarcinogénèse (d'après de Gruijl, 1995), p65.*)



Grphe 1 : Spectre d'action de la photocarcinogénèse (d'après de Gruijl, 1995)

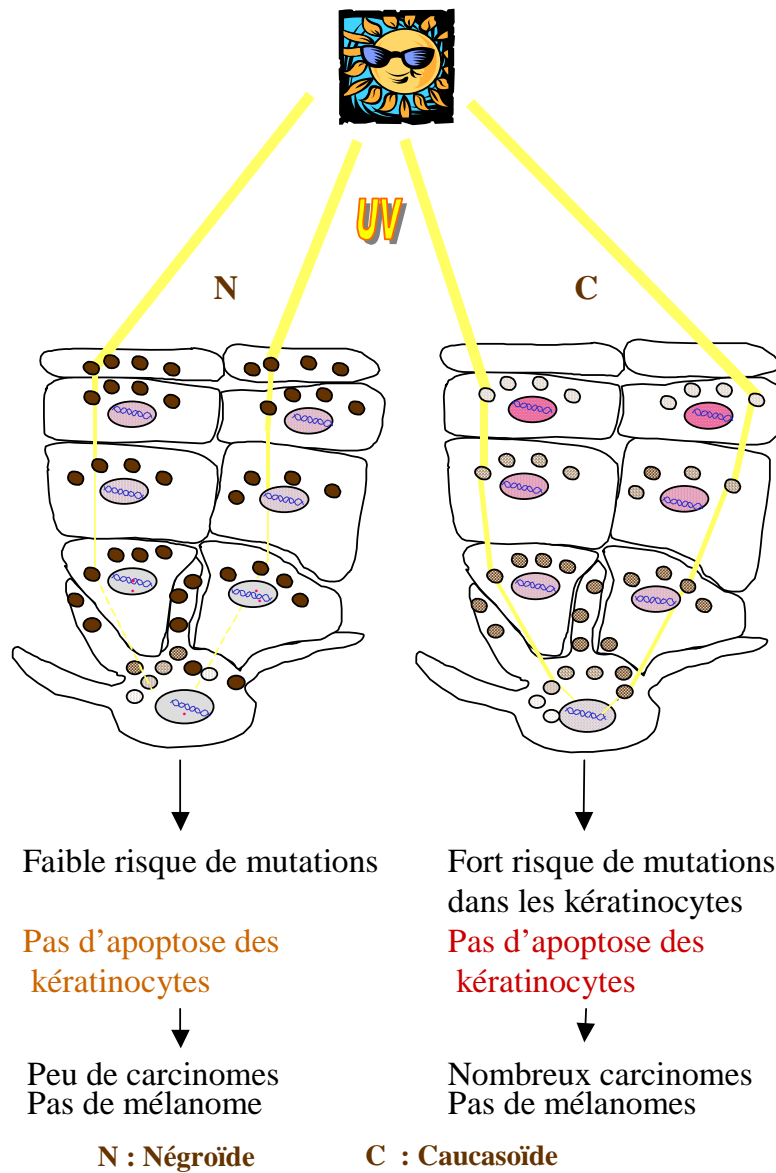
D'après Gilchrest et al. (1999), les carcinomes ne seraient pas liés à des expositions intenses et intermittentes car celles-ci provoqueraient suffisamment de lésions de l'ADN pour induire l'apoptose.

Par contre, lors d'irradiations faibles et fréquentes, il n'y aurait pas assez de lésions de l'ADN pour induire l'apoptose. Certaines lésions ne seraient pas réparées et introduiraient ainsi des mutations.

Les sujets à peau noire présentent de la mélanine dans toutes les couches épidermiques y compris le stratum corneum, à la différence des sujets à peau blanche. Le nombre de photons atteignant les couches viables de l'épiderme (basale et suprabasale) est donc, du fait de leur absorption par la mélanine, beaucoup plus faible dans les peaux de types négroïdes (*cf. Figure 24 : Hypothèse concernant la différence d'incidence des carcinomes et des mélanomes en fonction du phototype, de la dose d'irradiation et du mode de délivrance de l'irradiation. p.68*). Il y aurait donc très peu de CPD et 6-4 PP formés et le risque de mutation serait faible chez les individus de type négroïde. Par contre, chez les sujets à peau claire, du fait de sa faible concentration et de son absence dans le stratum corneum, la mélanine n'atténuerait que peu le nombre de photons incidents. Cette atténuation serait suffisante pour diminuer le nombre de lésions de l'ADN en dessous du seuil d'induction de l'apoptose mais ce nombre resterait néanmoins important. De ce fait, le risque de mutations serait accru chez les sujets de faible phototype.

a)

Irradiation faible chronique



b)

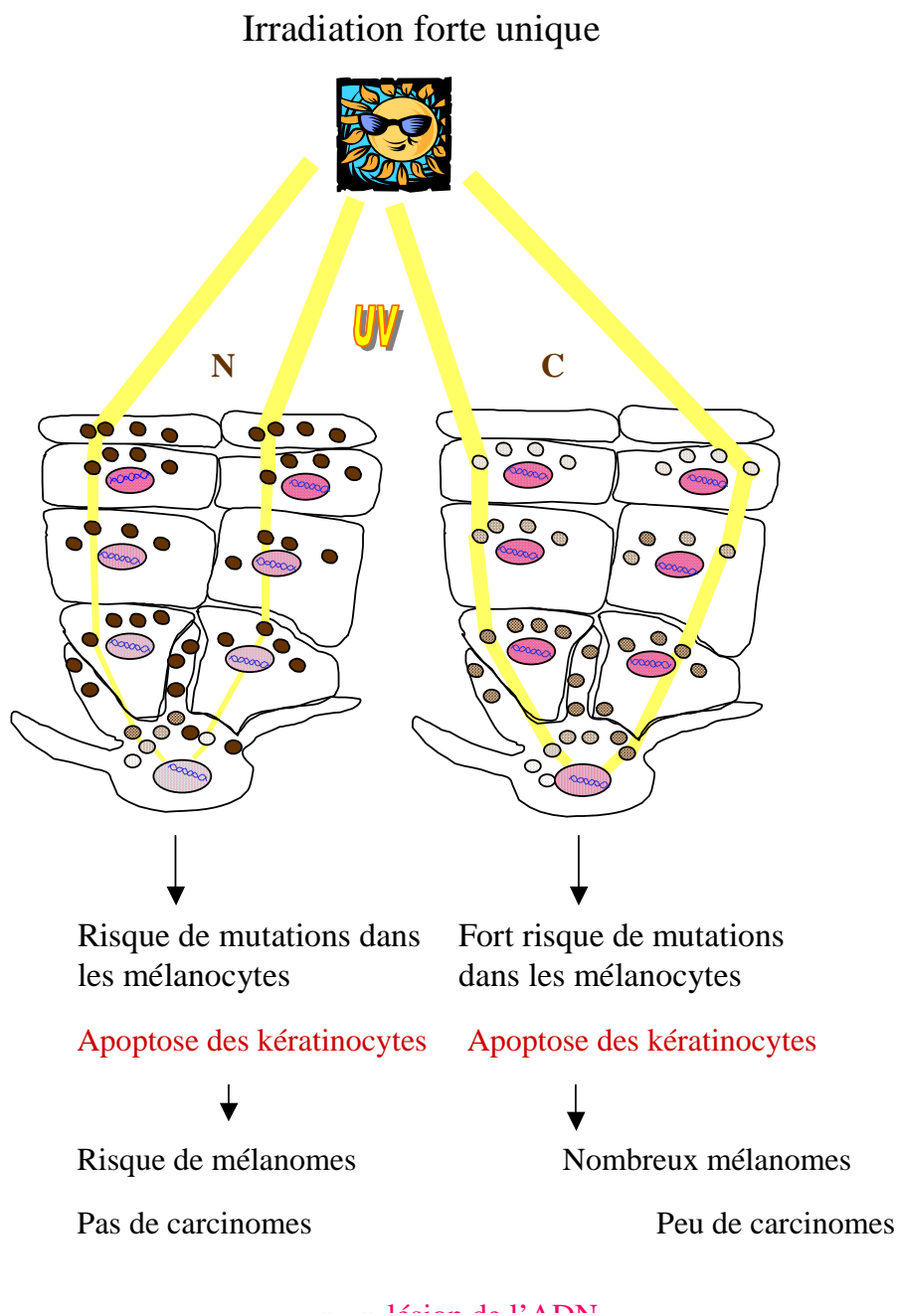


Figure 24 : Hypothèse concernant la différence d'incidence des carcinomes et des mélanomes en fonction du phototype, de la dose d'irradiation et du mode de délivrance de l'irradiation. a) irradiation faible et chronique, b) irradiation forte et aigüe

2.3.3 Mélanomes

Les mélanomes sont des cancers qui se développent à partir des mélanocytes, ils ne sont pas tous invasifs.

L'effet des UV sur l'induction des mélanomes est très controversé.

Pour Christophers (1998) le mélanome n'est pas lié à l'exposition solaire, il serait lié à une augmentation de la température de la peau.

Pour Kvam et Tyrrell (1999); Moan et al. (1999), le mélanome est induit par les longueurs d'onde comprises entre 320-800 nm (UVA et lumière visible).

Pour Atillasoy et al. (1998), les mélanomes peuvent également être induits par les UVB.

Les mélanomes chez les Africains à peau noire et les Asiatiques apparaissent dans des endroits non exposés tels que la plante des pieds (Hoerni et al., 1995 ; Koh 1991). Les UVB induisent une prolifération des mélanocytes aussi bien dans les zones exposées que dans les zones non exposées. Ceci pourrait expliquer pourquoi les mélanomes se développent parfois dans des zones n'ayant pas subi d'expositions significatives (Kaplan, 1992).

D'autre part, des études épidémiologiques ont indiqué que les écrans solaires ne protègent pas efficacement des mélanomes (Moan et al., 1999; Stelow, 2000 ICP), probablement car, pendant longtemps, les écrans solaires étaient uniquement anti-UVB, laissant ainsi pénétrer les UVA (Garland et al., 1993).

D'après Gilchrest et al. (1999), les mélanomes seraient liés à des expositions intenses et intermittentes qui induiraient de nombreuses lésions de l'ADN. Etant donné qu'il n'y a pas description de mélanocytes en apoptose, il y a une forte probabilité pour que des mutations apparaissent, s'accumulent et induisent l'apparition d'un mélanome.

Pour des irradiations chroniques et faibles, il y aurait synthèse de mélanine qui, en se disposant en « cap » supranucléaire, protégerait l'ADN mélanocytaire et ainsi il y aurait diminution du risque de mutations.

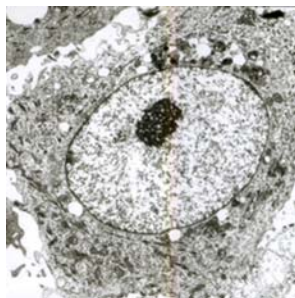


Figure 25 : "Cap" supranucléaire de mélanine observée en microscopie électronique (Collection personnelle)

2.3.4 Conclusions

Le **rapport mélanome/SCC** chez les individus à peau noire est plus important que celui observés chez les individus de type Européen (Moan et al., 1999). Cependant, les Africains à peau noire déclenchent moins de cancers cutanés que les individus de type européen. L'analyse combinée des observations de Moan et al. (1999) et Gilchrest et al. (1999) permet de supposer que face à des irradiations faibles et chroniques les Africains, du fait de la répartition de leur mélanine, seraient mieux protégés que les individus de type Européen. Par contre face à des irradiations intenses, la différence entre les phototypes serait moins importante. Cette différence de comportement de la peau face au type d'irradiation expliquerait la variation du rapport mélanome/SCC.

De même, il semble que les albinos africains aient un **rapport mélanome/SCC** plus faible que les Africains pigmentés. (Moan et al., 1999). La présence de mélanine serait donc importante. Moan et al. (1999) ont émis l'hypothèse que la mélanine dans les mélanocytes de la peau serait un chromophore pour l'induction des mélanomes, tandis que la mélanine dans les couches supérieures pourrait agir de façon protectrice par absorption des UV n'induisant pas la production de molécules toxiques et ainsi atténuerait la quantité d'UV arrivant au niveau de la basale.

2.4 Photoprotection

2.4.1 Photoprotection naturelle

La mélanine quelle soit constitutive ou inductible est le composant photoprotecteur majeur de la peau (Nordlund et al., 1998 ; Pathak, 1995). En effet, elle peut absorber directement les photons et indirectement les radicaux libres générés par l'interaction des photons avec les lipides ou d'autres chromophores (McGregor et Hawk, 1999). Cependant dans certaines conditions, elle peut être prooxydante (*cf. p.45*).

La photoprotection apportée par l'exposition solaire (bronzage) correspond à un SPF (sun protecting factor) de 3 à 5 en fonction de la capacité des individus à bronzer (Gilchrest et al., 1996) (cf. *Tableau 1 : Classification des phototypes* (d'après Pathak (1995) et Lowe et Friedlander, (1997) p. 24).

Les photons peuvent également être reflétés et dispersés par les protéines du stratum corneum. Cette capacité de photoprotection est renforcée par l'épaississement du stratum corneum après irradiations (McGregor et Hawk, 1999). Ce dernier phénomène est d'autant plus important quand les individus sont de faible phototype.

2.4.2 Photoprotecteurs externes

La photoprotection externe est assurée par 2 classes de substances, les écrans et les filtres qui sont incorporés dans un véhicule approprié liquide (lait), pâte (émulsion ou gel) ou solide (sticks) ainsi que par les accessoires vestimentaires.

Un bon photoprotecteur doit absorber les radiations nocives, présenter une bonne stabilité photochimique, résister aux bains et à la sueur et ne doit pas pénétrer trop profondément dans l'épiderme.

Pendant longtemps les photoprotecteurs ont principalement été ciblés pour prévenir les coups de soleil et le vieillissement cutané. Maintenant les photoprotecteurs visent à assurer la protection de l'ADN.

2.4.2.1 Les écrans physiques

Ce sont des substances opaques, inertes qui assurent une protection par réflexion et une dispersion du rayonnement de façon à ce qu'il ne soit pas absorbé par la peau.

Ce sont des poudres blanches très finement divisées à fort pouvoir couvrant. Les plus employées sont le dioxyde de titane, l'oxyde de zinc et le talc.

A titre d'exemple, l'oxyde de titane, utilisé à la concentration minimale de 5% dans une préparation antisolaires, réfléchit 90 % des rayonnements UV et visibles.

2.4.2.2 Les filtres chimiques

Ce sont des substances chimiques, souvent d'origine synthétique, caractérisées par la présence de double liaisons conjuguées.

Leur action protectrice est due à leur capacité d'absorber les photons incidents avant qu'ils n'atteignent les couches basales de l'épiderme. Secondairement, ils peuvent soit libérer lentement l'énergie, correspondant aux transferts d'électrons induits par les photons, par échange thermique avec le milieu ambiant et sans émission de radiation, soit rester stable à l'état excité.

Il existe des filtres à spectre d'absorption restreint dont le spectre d'absorption est maximum dans les UVB et des filtres à large spectre dont le spectre est étendu des UVB aux UVA.

2.4.2.2.1 Les filtres à spectre étroit

Les plus courants sont l'acide para-amino-benzoïque (PABA) et ses dérivés et les dérivés de l'acide cinnamique. Ils peuvent être hydrosolubles ou liposolubles.

Le PABA est le meilleur des filtres UVB cependant c'est une molécule photosensibilisante. Il est donc déconseillé chez les sujets photoallergiques.

Les esters cinnamiques ont une stabilité photochimique médiocre, ils sont donc utilisés en association avec des filtres à large spectre.

2.4.2.2.2 Les filtres à spectre large

Ils protègent contre les photodermatoses et préviennent la sénescence cutanée. Ils sont représentés par les dérivés des benzophénones, les dérivés du dibenzoylméthane et de nouvelles molécules comme le Mexoryl SX ou le Tinosorb.

➤ Les benzophénones ont une bonne stabilité photochimique et possèdent 2 pics d'absorption l'un à 290 nm (UVB) et l'autre à 330 nm (UVA).

➤ Les dibenzoylméthanes ne sont pas de très bons photoprotecteurs en UVB mais sont très efficaces envers les UVA I puisque leur pic d'absorption est à 360 nm.

➤ Le Tinosorb est un écran organique qui agit par absorption et diffusion du rayonnement UV incident (UVA, UVB).

➤ Le Mexoryl SX est le nom commun du terephthaldene Dicamphor sulfonic acid. Il absorbe les UV compris entre 290 nm et 400 nm et présente un maximum d'absorption à 345 nm.

Le Mexoryl SX est plus efficace dans les UVB que les esters cinnamiques (EMC) (Fourtanier, 1997). Le Mexoryl SX protège efficacement des irradiations UVB répétées (Seité, 1998).

2.4.2.3 Autres agents photoprotecteurs

➤ L'application de **pTpT** (*cf. p.44*) sur de la peau porcine induit une pigmentation qui protège efficacement (6 fois la DEM) (Gilchrest et Eller, 1999) de la mort cellulaire. Les pTpT pourraient agir en se fixant sur une protéase qui inactiverait le répresseur d'une famille de gène dont les protéines sont impliquées dans la réparation de l'ADN et la survie cellulaire.

➤ La **mélatonine**, qui est capable d'absorber les radicaux libres, a également été utilisée, par des volontaires humains, en combinaison ou non avec les vitamines E ou C (Dreher et al., 1998). Les vitamines seules préviennent peu l'érythème par contre, la combinaison vitamine E + vitamine C + mélatonine prévient efficacement de l'érythème.

➤ L'application topique de 5% d'**acide urocanique** (trans) sur volontaire humain induit une prévention de l'érythème (de Fine Olivarius et al., 1996).

➤ La supplémentation en **zinc** du milieu de culture de fibroblastes induit une protection de l'ADN et prévient l'apoptose (Leccia et al., 1999).

➤ La supplémentation en **sélénium** du milieu de culture de fibroblastes induit une protection de l'ADN (Emonet-Piccardi et al., 1998) et protège de la lipoperoxydation (Leccia et al., 1993).

➤ Les **antioxydants** comme la vitamine E, la vitamine C, le β -carotène, le glutathion ont été utilisés comme photoprotecteurs chez des souris (Chen et al., 1997; Lopez-Torres et al., 1998; Mac Vean et Liebler, 1997; Keller et Fenske, 1998) ainsi que chez des volontaires (Eberlein-Konig et al., 1998). Les résultats obtenus montrent un effet protecteur vis-à-vis du stress oxydant (lipoperoxydation), de la photoimmunosuppression et du « coup de soleil » (Fuchs, 1998).

La protection envers la formation des lésions de l'ADN des animaux par le tocophérol n'est pas démontrée par toutes les études (Fuchs, 1998; Sugiyama et al., 1992 ; Mc Vean et Liebler, 1997 ; Chen et al., 1997). Par contre, l' α -tocophérol diminuerait l'incidence des tumeurs UV-induites chez la souris (Fuchs, 1998).

Le β -carotène, quant-à-lui, aurait un effet anti-carcinogénique uniquement pour des irradiations faibles et chroniques (Fuchs, 1998).

✎ Les **enzymes antioxydantes**, comme la SOD, la catalase, la GSHPx, ont été appliquées sur des volontaires (Niwa, 1989; Mizushima et al., 1991) ou injectées à des souris sous forme de liposomes (Miyachi et al., 1987). La SOD et la catalase ont également été intégrées dans des vecteurs et transfectées à des cellules de souris (Amstad et al., 1991). Ces études ont révélé que ces enzymes pouvaient protéger du stress oxydatif mais elles ont également mis en exergue l'importance du respect de l'équilibre entre la SOD et la catalase

2.4.2.4 Les vêtements

Les vêtements comme les lunettes et les chapeaux sont des éléments photoprotecteurs de par leur pouvoir réfléchissant. Cependant le potentiel photoprotecteur des vêtements est variable

(1,3 à 1700 (Berne et Fisher, 1980)) en fonction de la texture, de la couleur et de l'épaisseur du vêtement. Différentes sociétés se sont appliquées à développer de nouveaux concepts pour augmenter le pouvoir photoprotecteur des vêtements. Ainsi la société Solumbra™ développe depuis 1992 des vêtements présentant un SPF de 30 (Sayre et Lowe, 1992) qui pour l'anecdote, sont recommandés, notamment pour les athlètes, par l'Académie Américaine de Dermatologie (sunprecautions.com). De même, les vêtements alpha 100+ sont réalisés avec une fibre unique et un certain tricotage qui permet d'obtenir un SPF de 100. Ces vêtements sont particulièrement recommandés pour les enfants (vipimage.com).

Le Tinosorb™ a également été introduit dans des assouplissants par la société Ciba, ce qui permettrait, lors du lavage, son intégration au sein des vêtements et ainsi conférerait aux vêtements un pouvoir photoprotecteur (cibasc.com).

2.4.2.5 Les préparations solaires

Les préparations solaires sont des associations de filtres et/ou d'écrans à diverses concentrations ce qui détermine le SPF (sun protecting factor) et leur efficacité anti-UVA et anti-UVB (Shaath, 1997).

La dernière formulation créée par les laboratoires Pierre-Fabre et qui semble très prometteuse est le MPI-sorb. Le MPI-sorb est un écran organo-minéral réalisé par association de deux écrans minéraux (TiO_2 et ZnO) et d'un écran organique le Tinosorb (Ginestar-Gonzalez, 2000). Cet écran est photostable et présente une protection à large spectre (UVB, UVA long et court). De plus, il protège de façon équivalente des UVA et des UVB. (Baudouin et al., 2000).

2.4.3 Intérêts et limites des photoprotecteurs externes

2.4.3.1 Effets à court terme

Les études sur peaux murines (Elmets et al., 1992) et sur peaux équivalentes (Augustin et al., 1997) démontrent que les photoprotecteurs externes préviennent l'érythème et la formation de sunburn cells. De même, les études sur souris (Mc Vean et Liebler, 1997), sur épidermes reconstruits (Bernerd et al., 2000) et sur volontaires humains (Young et al., 2000) montrent l'efficacité des photoprotecteurs externes dans la prévention des lésions de l'ADN. En outre, les études sur souris (Fourtanier et al., 1997) et sur épidermes reconstruits (Cohen et al., 1998) prouvent leur efficacité dans la prévention de la lipoperoxydation. Les études sur explants (Davenport et al., 1997 ; Péguet-Navarro et al., 2000) et sur volontaires humains (Hurks et al., 1997) confirment également l'efficacité des photoprotecteurs externes dans la prévention de l'immunosuppression

Les antioxydants et plus particulièrement la vitamine E protègent, les volontaires humains, de l'érythème (Eberlein-König et al., 1998). Les études sur peaux porcines démontrent que les antioxydants préviennent la formation des sunburn cells (Darr et al., 1996). Les études sur peaux murines démontrent que les antioxydants préviennent la formation des lésions de

l'ADN (Mc Vean et Liebler, 1997 ; Chen et al., 1997), et la lipoperoxydation (Lopez-Torres et al., 1998).

2.4.3.2 Effets à long terme

Les photoprotecteurs externes, chez la souris, protègent du photovieillissement (Bernstein et al., 1997).

Les études concernant l'effet protecteur des antioxydants et des filtres et écrans envers le développement des cancers cutanés sont contradictoires.

Wolf et al. (1994) ont observé que si les 3 formulations anti-solaires testées diminuaient la formation de « sunburn cells », l'hyperplasie, l'infiltration du derme par les cellules mononucléaires, elles n'induisaient aucune protection envers le développement tumorale (incidence et croissance) des cellules mélanomateuses injectées chez les souris.

Le mexoryl comme l'éthyl-exyl-méthoxycinnamate retardent la formation des tumeurs chez la souris (Fourtanier, 1996), le PABA et la benzophénone agissant de même (Gurish et al., 1981).

Chez la souris, Berton et al., (1998) ont observé que même si la vitamine E protège partiellement des effets initiateurs de tumeurs induits par les UV (lésions de l'ADN, expression de p53), elle n'induit qu'une prévention du développement des étapes précoces de la carcinogenèse et n'a pas d'effet sur l'incidence finale des tumeurs. Par contre, Gensler et Magdaleno (1991) ont observé une diminution de la formation des tumeurs.

2.4.3.3 Epidémiologie des cancers cutanés et photoprotecteurs externes et naturels

Les études chez l'homme sont également contradictoires et controversées en raison de leur difficulté de réalisation (Keller et Fenske, 1998).

D'autant plus qu'il est très difficile d'extrapoler les résultats obtenus sur animaux, explants ou épidermes reconstruits, car pour les crèmes solaires par exemple, la dose testée pour la validation des molécules est de 2 mg.cm^{-2} , alors que l'application réelle par l'utilisateur est

d'environ 0,7 mg.cm⁻². De plus, l'application régulière n'est pas toujours réalisée, notamment après la baignade.

La plupart des études épidémiologiques révèlent que les crèmes solaires ne sont pas efficaces pour prévenir la survenue de mélanome. On aurait pu penser que l'évolution de la formulation depuis le début des années 80 aurait permis une meilleure protection des mélanomes, mais ce n'est pas le cas (*Cf. tableau ci-dessous*).

Année	Effet de l'utilisation de crème sur la survenue de mélanome	Auteurs
1979	Augmente le risque	Kleep et al.
1985	Augmente le risque	Graham et al.
1986	Pas d'effet	Holman et al.
1988	Augmente le risque	Osterlind et al.
1990	Augmente le risque	Beitner et al.
1993	Pas d'effet	Herzfeld et al.
1995	Augmente le risque	Autier et al.
1995	Augmente le risque	Westerdahl et al.
1999	Augmente le risque	Bigby
2000	Pas de diminution du risque	Westerdahl et al.
2000	Augmente le risque	Autier
2000	Pas d'effet	Naldi et al.

Tableau 2 : Récapitulatif bibliographique de l'effet des crèmes solaires sur la survenue de mélanome

Moins d'études ont été réalisées en ce qui concerne les carcinomes basocellulaires et spinocellulaires. Green et al. (1999) ont montré que les crèmes solaires prévenaient les SCC mais pas les BCC. Kricer et al. (1994) et Harvey et al. (1996) quant à eux ont montré que l'utilisation de crèmes solaires augmentée le risque de BCC. De même une étude prospective révèle que la probabilité de développer un cancer basocellulaire augmenterait, chez la femme, avec la fréquence d'utilisation des crèmes solaires (Hunter et al., 1990).

Une étude réalisée sur les carcinomes basocellulaires indique que les crèmes solaires préviennent la survenue de mutations UVB-induites dans la p53. La survenue de BCC chez les sujets utilisateurs de crèmes solaires serait donc soit lié à une voie p53 indépendante, soit

lié aux UVA qui ne sont pas bloqués par les crèmes solaires utilisées et qui ont donc pu induire des mutations dans des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur autres que p53 (Rosenstein et al., 1999).

Dans la plupart des cas, l'application de crèmes solaires ne fait qu'allonger le temps d'exposition solaire des individus en augmentant la DEM (Araki et al., 1999 ; Westerdahl et al., 2000). L'efficacité des crèmes solaires est discutable puisqu'en protégeant contre les UVB et en augmentant le temps d'exposition, elles augmenteraient l'exposition aux UVA et à la lumière visible (Rosenstein et al., 1999) ce qui selon Setlow (1999) pourrait être responsable du développement des mélanomes.

Selon Autier (2000), l'utilisation des crèmes solaires lors des loisirs augmenterait le risque de cancers cutanés, par contre leur utilisation lors d'exposition « non-intentionnelle » induirait une diminution de la survenue des carcinomes spinocellulaires.

Les crèmes solaires devraient donc, comme le MPI-Sorb, couvrir tout le spectre de façon identique.

L'utilisation de photoprotecteurs « naturels » pose également problème car, à la différence des photoprotecteurs externes, qui ne doivent pas pénétrer profondément dans l'épiderme, ils sont circulants, et peuvent interférer avec le métabolisme cellulaire.

En effet, plusieurs études épidémiologiques montrent une relation inverse entre supplémentation en β -carotène et risque de cancer (Fuchs, 1998). D'autre part, Green et al. (1999) ont observé que le β -carotène ne prévient ni le BCC ni le SCC à moyen terme. Cependant si le β -carotène ne semble pas prévenir la formation des carcinomes chez des sujets prédisposés, il augmenterait le risque chez les fumeurs (Greenberg et al. 1990, Fuchs, 1998).

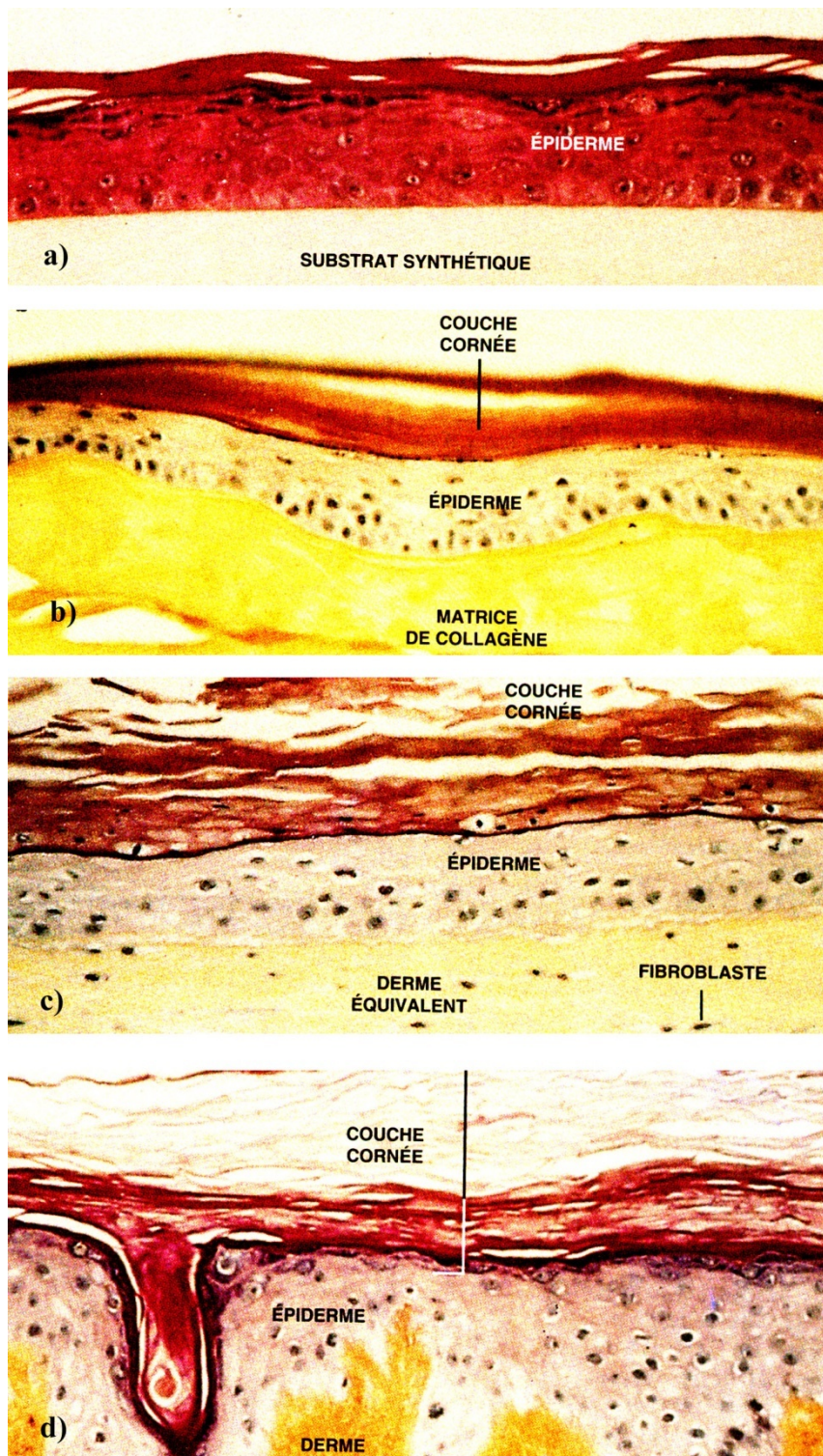


Figure 26 : Modèles d'épidermes reconstruits : a) sur substrat synthétique, b) sur matrice de collagène, c) sur derme équivalent, d) sur derme acellulaire déépidermisé (d'après Régnier et Staquet, pour la science, 1999)

3 Epidermes reconstruits

L'épiderme reconstruit est un modèle tridimensionnel dont l'étude s'est considérablement développée ces dernières années, d'une part en vue de mieux comprendre la physiopathologie de la peau et, d'autre part, pour tester de nouvelles molécules.

Il existe différents supports pour permettre la reconstruction : filtre de polycarbonate (substrat synthétique) (Skinethic), lattice de collagène contractée par des fibroblastes (derme équivalent) (Bell et al., 1983), ou non contractée (matrice de collagène) (Episkin), derme acellulaire déépidermisé (DED) (Prunières et al., 1979) (cf. *Figure 26 : Modèles d'épidermes reconstruits : a) sur substrat synthétique, b) sur matrice de collagène, c) sur derme équivalent, d) sur derme acellulaire déépidermisé (d'après Régnier et Staquet, pour la science, 1999), p. 78*).

L'intérêt du derme acellulaire déépidermisé est qu'il est le seul à présenter une membrane basale permettant la cohésion épiderme-derme.

3.1 Epidermes reconstruits sur DED

La difficulté pour comparer les différentes études sur les épidermes reconstruits n'est pas tant le mode de culture que le milieu de culture utilisé (cf. *Tableau 3 : Composition des milieux de bases (DMEM/Ham et IMDM/MCDB153) pour les épidermes reconstruits, p. 84*). En effet, si la technique de réalisation du modèle d'épiderme reconstruit sur DED utilisée par les différentes équipes ne varie pas, ce n'est pas le cas pour la composition du milieu. Or la composition du milieu peut influencer sur la structuration de l'épiderme, ses propriétés biochimiques, son comportement face au stress oxydatif...

COMPOSANTS	DMEM (mg.L ⁻¹)	IMDM (mg.L ⁻¹)
Sels inorganiques		
CaCl ₂ 2H ₂ O	264,00	219,00
Fe(NO ₃) 9H ₂ O	0,10	

COMPOSANTS	Ham F12 (mg.L ⁻¹)	MCDB 153(mg.L ⁻¹)
Sels inorganiques		
CaCl ₂ 2H ₂ O	44,00	4,41
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0024	0,00275

KCl	400,00	330,00
KNO ₃		0,076
MgSO ₄ 7H ₂ O	200,00	200,00
NaCl	6400,00	4505,00
NaHCO ₃	3700,00	3024,00
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	141,00	141,00
Na ₂ SeO ₃ 5H ₂ O		0,017
Autres composants		
D-Glucose	4500,00	4500,00
Rouge de Phénol	15,00	15,00
HEPES		5958,00
Pyruvate de Sodium		110,00
Aminoptérine	0,176	
Hypoxanthine	13,60	
Thymidine	3,88	
Acides aminés		
L-Alanine		25,00
L-Asparagine H ₂ O		28,40
L-arginine HCl	84,00	84,00
Acide L-Aspartique		30,00
L-Cystéine	48,00	70,00
Acide L-Glutamique		75,00
L-Glutamine	580,00	584,00
Glycine	30,00	30,00
L-Histidine HCl H ₂ O	42,00	42,00

KCl	223,60	111,83
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,83	1,39
MgCl ₂ 6H ₂ O	122,00	122,00
NaCl	7599,00	7599,00
NaHCO ₃	1176,00	
NaH ₂ PO ₄	142,00	284,088
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,86	0,144
NiCl 6H ₂ O		0,00012
FeCl ₂ 2H ₂ O		0,00113
Na ₂ SeO ₃		0,0038
MnSO ₄		0,000151
NaSiO ₃ 9H ₂ O		0,142
Métavanate d'ammonium		0,000585
CH ₃ CO ₂ Na		301,53
Acide molybdique 4H ₂ O		0,00124
Autres composants		
D-Glucose	1802,00	1081,00
Rouge de Phénol	1,20	1,242
Acide Linoléique	0,084	
Pyruvate de Sodium	110,00	55,00
Acide DL-68 Thioctique	0,20	0,206
Hypoxanthine	4,00	
Thymidine	0,70	0,727
Putrescine 2HCl	0,161	0,161
Adénine HCl		30,88
HEPES		6600
Acides aminés		
L-Alanine	8,90	8,91
L-Arginine HCl	211,00	210,7
L-Asparagine	13,00	15,00
Acide L-Aspartique	13,30	3,99
L-Cystéine HCl	36,00	42,04
Acide L-Glutamique	14,70	14,71
L-Glutamine	146,00	877,2
Glycine	7,50	7,51
L-Histidine HCl H ₂ O	21,00	16,77

COMPOSANTS	DMEM (mg.L ⁻¹)	IMDM (mg.L ⁻¹)
------------	-------------------------------	-------------------------------

COMPOSANTS	Ham F12	MCDB 153(mg.L ⁻¹)
------------	------------	----------------------------------

L-Isoleucine	105,00	105,00
L-Leucine	105,00	105,00
L-Lysine HCl	146,00	146,00
L-Méthionine	30,00	30,00
L-Phénylalanine	66,00	66,00
L-Sérine	42,00	42,00
L-Thréonine	95,00	95,00
L-Tryptophane	16,00	16,00
L-Tyrosine	72,00	104,20
L-Valine	94,00	94,00
Vitamines		
Biotine		0,013
Pantothénate de calcium	4,00	4,00
Chlorure de Choline	4,00	4,00
Acide Folique	4,00	4,00
i-Inositol	7,20	7,20
Nicotinamide	4,00	4,00
Pyridoxal HCl	4,00	4,00
Riboflavine	0,40	0,40
Thiamine HCl	4,00	4,00
Vitamine B ₁₂		0,013

	(mg.L ⁻¹)	
L-Isoleucine	4,00	1,968
L-Leucine	13,00	65,6
L-Lysine HCl	36,50	18,27
L-Méthionine	4,50	4,48
L-Phénylalanine	5,00	4,96
L-Proline		34,53
L-Sérine	10,50	63,06
L-Thréonine	12,00	11,91
L-Tryptophane	2,00	3,06
L-Tyrosine	5,40	3,41
L-Valine	11,70	35,13
Vitamines		
Biotine	0,0073	0,0146
Pantothénate de calcium	0,50	0,238
Chlorure de Choline	14,00	13,96
Acide Folique	1,30	0,79
i-Inositol	18,00	18,02
Nicotinamide	0,036	
Pyridoxine HCl	0,06	
Riboflavine	0,037	0,0376
Thiamine HCl	0,30	0,0337
Vitamine B ₁₂	1,40	0,407

Tableau 3: Composition des 2 principaux milieux de base (DMEM/Ham et IMDM/MCB153) pour les épidermes reconstruits.

En plus des différences des milieux de base, la supplémentation par les additifs tels que l'insuline, l'EGF (epidermal growth factor), le bFGF (fibroblast growth factor), le BPE (bovine pituitary extract), l'hydrocortisone peut varier.

3.1.1 Epidermes reconstruits avec des kératinocytes

3.1.1.1 Epidermes reconstruits en milieu DMEM/Ham/sérum bovin

Les épidermes ainsi reconstruits sont observés après 15 jours de culture à l'interface air-liquide. Dans ce milieu, la composition en lipides de l'épiderme reproduit la composition de l'épiderme natif (Ponec et al., 1988). Il existe cependant quelques différences mineures dans la concentration en triglycérides et en glycosphingolipides et des différences majeures dans la concentration en acides gras telle qu'une concentration faible en acide linoléique qui est important pour la fonction barrière (Ponec et al., 1988).

La morphologie de ces épidermes reconstruits est normale.

Les kératinocytes cultivés sur DED sont capables de synthétiser tous les lipides qui sont dans le tissu natif, et même les céramides formées à partir de l'acide linoléique (Ponec, 1991).

Seules les kératines K1 et K10 sont exprimées correctement dans les couches suprabasales ; la kératine K6 qui n'est pas exprimée dans la peau normale est exprimée dans l'épiderme reconstruit. L'involucrine, la transglutaminase et la filaggrine sont exprimées dans la couche épineuse alors que l'involucrine et la filaggrine sont exprimées seulement dans le stratum corneum dans l'épiderme normal (Ponec, 1991). Ceci est en contradiction avec les résultats de Régnier et al. (1988) qui ont observé que l'involucrine, la transglutaminase et la filaggrine, ainsi que la kératine K1 avaient une distribution similaire à celle de la peau normale.

La différence de composition en lipides et d'expression des marqueurs peut être liée à la composition du milieu (*cf. p. 87*).

Une étude comparative en fonction du nombre de semaines de culture à l'interface air-liquide, de la température de culture et de la présence ou l'absence d'EGF dans le milieu de culture, a montré ; d'une part qu'à 37 °C l'épiderme se différencie plus vite qu'à 33 °C, ce qui se traduit par une augmentation de l'épaisseur du stratum corneum; d'autre part qu'en présence d'EGF, l'épiderme est hyperprolifératif la première semaine, puis devient rapidement sénescant (Gibbs et al., 1997).

Le gradient de calcium dans l'épiderme reconstruit n'est pas tout à fait comparable à celui de l'épiderme natif. La concentration en calcium est plus élevée dans les couches supérieures ce qui se traduit par une desquamation insuffisante. La différenciation terminale incomplète des cornéocytes est corrélée avec une accumulation de calcium dans le stratum corneum (Vicanova et al., 1998).

Tissu	Localisation	Basale	Epineuse	Granuleuse inférieure	Granuleuse supérieure	Stratum corneum interne	Stratum corneum externe
Epiderme natif	Cellulaire	++	++/+++	+++	++++	+/++	0
	Extracellulaire	++	++	++	+++	+	0
Epiderme reconstruit	Cellulaire	+/++	++	+++	+++ /++++	+++	+++
	Extracellulaire	++	++	++	++/+++	+	+

Tableau 4 : Estimations du taux de calcium dans les couches des épidermes natif et reconstruit (d'après Vicanova et al., 1998)

L'épiderme reconstruit a une fonction barrière similaire qualitativement parlant à celle de la peau normale (*cf. 1 La peau p. 19.*). Cependant, il est plus perméable que la peau normale (Régnier et al., 1993). Ceci est sûrement attribuable à la différenciation incomplète du stratum corneum.

3.1.2 Epidermes reconstruits avec des kératinocytes et des mélanocytes

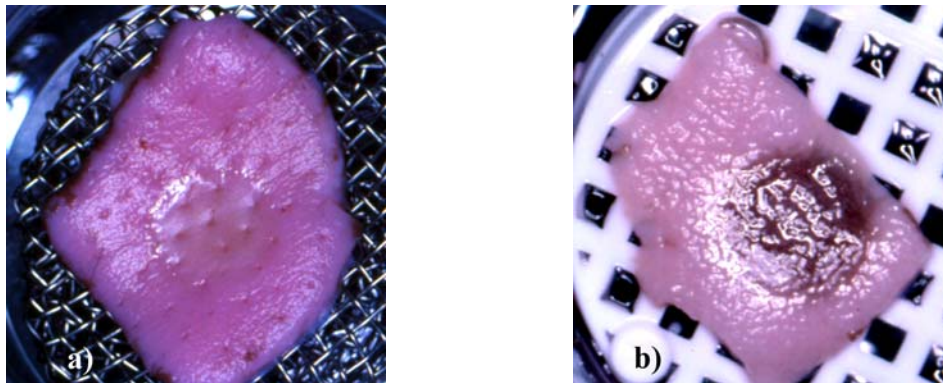


Figure 27 : Epidermes reconstruits sur DED avec 95 % de kératinocytes et 5 % de mélanocytes : a) phototype II, b) phototype VI (Collection personnelle)

3.1.2.1 Epidermes reconstruits avec des mélanocytes en milieu IMDM/MCDB153/SVF

Après 15 jours de culture à l'interface air/liquide, l'épiderme reconstruit avec 10 % de mélanocytes, 90 % de kératinocytes est correctement différencié avec présence de mélanocytes basaux fonctionnels et d'un stratum corneum. La culture d'épidermes reconstruits avec des mélanocytes de différentes origines a permis de reconstruire les différents phototypes (Bessou et al., 1996).

Dans l'épiderme reconstruit, l'anti-filaggrine marque la granuleuse et le stratum corneum alors que dans la peau normale, seul le stratum corneum est marqué.

De même l'anti-involucrine marque l'épineuse, la granuleuse et le stratum corneum dans l'épiderme reconstruit alors que seul le stratum corneum est marqué dans la peau normale (Bessou et al., 1995).

Les kératines K1 et K10 sont exprimées correctement dans les couches suprabasales. Les kératines K14 et K5 sont exprimées correctement dans la couche basale.

Les kératines K6, K17 et K16 qui ne sont pas exprimées normalement dans l'épiderme stratifié sont présentes dans l'épiderme reconstruit (Bessou et al., 1995).

L'acide linoléique (18: 2) et l'acide arachidonique (20: 4) sont des acides gras essentiels dont les concentrations dans le milieu de culture sont sûrement insuffisantes. Dans les kératinocytes en culture la conversion du 18: 2 en 20: 4 (Isserof et al., 1987) se réalise ce qui n'est pas le cas in vivo. L'acide palmitique (16: 0) et l'acide oléique (18 :1) semblent compenser l'absence en 18 :2 et 20 :4.

Acides gras membranaires %	Epiderme natif	Epiderme reconstruit avec des mélanocytes 15 jours
16 :0	15.3	26
18 :0	13.8	12.42
18 :1	22.7	40.43
18 :2	41.5	16.9
20 :0	1.4	0.9
20 :1	0	1.51
20 :4	5.3	0.78
22 :0	0	0.98
Total	100	100

Tableau 5 : Pourcentages d'acides gras membranaires dans l'épiderme natif (adapté d'après Vicanova et al., 1999) **et dans l'épiderme reconstruit** (d'après Bessou, 1997)

3.1.2.2 Epidermes reconstruits avec des mélanocytes en milieu DMEM/Ham/sérum bovin

La culture d'épidermes reconstruits avec des mélanocytes de différentes origines a permis comme dans le modèle cultivé dans le milieu (IMDM/MCDB153/SVF) de reconstruire des épidermes de différents phototypes. De même, ce modèle possède un système pigmentaire bien développé et fonctionnel puisque d'une part l'irradiation UVB induit la pigmentation et que celle-ci est prévenue par un écran solaire (Mexoryl) et d'autre part puisque l'acide kojique (produit dépigmentant) induit une dépigmentation de l'épiderme (Régnier et al., 1999).

3.1.2.3 Epidermes reconstruits avec des mélanocytes en milieu Rheinwald-Green modifié

Les épidermes reconstruits avec 10 ou 20 % de mélanocytes présentent un nombre de mélanocytes proportionnel au nombre de cellules ensemencées (Franchi et al., 1994). Ils sont correctement localisés au niveau de la basale. Ce résultat est différent de celui de Bessou et al. (1995) qui ont observé qu'il y avait un seuil (5-10 %) au-delà duquel les mélanocytes étaient éliminés. Les mélanocytes possèdent une activité tyrosinase, une activité dopa-oxydasique et des mélanosomes à différents stades de maturation (Franchi et al., 1994).

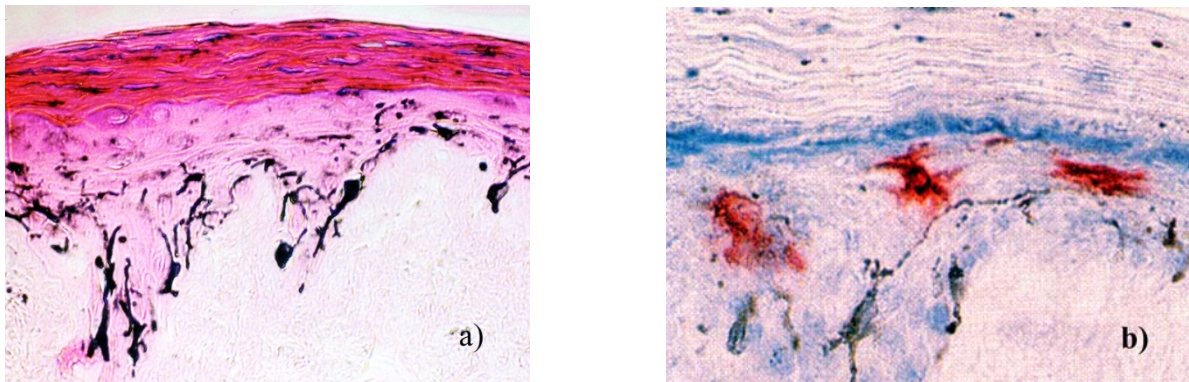


Figure 28 : Epidermes reconstruits : a) avec des mélanocytes (en noir) (collection personnelle), b) avec des mélanocytes (en noir) et des cellules de Langerhans (en rouge) (d'après Régnier et al., 1997)

3.1.3 Epidermes reconstruits avec des kératinocytes, des mélanocytes et des cellules de Langerhans

Le modèle d'épiderme reconstruit avec des kératinocytes et des mélanocytes ne permet pas d'estimer les réactions immunitaires. Dans ce modèle, des cellules de Langerhans obtenues à partir de leurs progéniteurs hématopoïétiques ont été co-ensemencées avec des kératinocytes et des mélanocytes. L'épiderme ainsi obtenu est correctement reconstruit avec des mélanocytes basaux transférant la mélanine. Les cellules de Langerhans sont correctement localisées dans l'épinoïse (Régnier et al., 1997, 1998; Staquet et al., 2000). Ce modèle va permettre de mieux comprendre les interactions cellulaires et l'influence de chaque type cellulaire dans la prolifération, la pigmentation et d'autre part d'appréhender la photosensibilité et la toxicité de diverses molécules. Des études préliminaires ont déjà montré une modification des cellules de Langerhans après irradiation et application de photosensibilisateurs (Staquet et al., 2000).

3.2 Effet des UV sur les épidermes reconstruits

Peu d'études ont été réalisées sur le modèle d'épiderme reconstruit sur DED, la plupart ont été réalisées sur lattice de collagène.

3.2.1 Effet des UV sur les épidermes reconstruits avec des mélanocytes sur DED

Les épidermes reconstruits avec des mélanocytes cultivés en milieu IMDM / MCDB153 et irradiés de façon chronique présentent une stimulation de la synthèse de mélanine et du transfert des mélanosomes, une augmentation du nombre de mélanocytes et de leur dendricité (Bessou et al., 1995). De même, en milieu DMEM/Ham les UVB induisent une stimulation de la pigmentation (Régnier et al., 1999).

Les UVB en irradiation chronique induisent une diminution de l'ubiquinone, de la vitamine E, de l'activité catalase et une légère augmentation de l'activité SOD. En ce qui concerne les acides gras, une diminution du taux d'acide oléique et une légère diminution du taux d'acide arachidonique sont observées (Bessou, 1997).

3.2.2 Effet des UV sur les épidermes reconstruits sur lattices ou peaux équivalentes

Après irradiation (UVA, UVB) les peaux équivalentes comme les peaux normales relarguent des médiateurs de l'inflammation comme IL-1, TNF- α , PGE-2 qui sont impliqués dans l'érythème (Nelson et Gay, 1993).

Après irradiation UVB chronique, le nombre et la dendricité des mélanocytes des peaux équivalentes augmentent. Les mélanocytes dans ce modèle sont donc fonctionnels et capables de répondre aux UV (Todd et al., 1993).

Archambault et al. (1995) ont comparé l'effet d'irradiations chroniques sur des mélanocytes seuls ou dans une peau équivalente. Ils ont observé que les UV induisent une augmentation de la dendricité des mélanocytes dans la peau équivalente et que les mélanocytes se comportent comme dans la peau normale. De plus, la production de mélanine est plus importante lorsque les mélanocytes sont intégrés dans une peau équivalente avec kératinocytes et fibroblastes que lorsqu'ils sont seuls en monocouche. De même, la survie des mélanocytes est plus importante dans la peau équivalente. Les kératinocytes et les fibroblastes influent donc sur le fonctionnement des mélanocytes dans la peau. Ce modèle est parfaitement adapté à l'étude des régulations paracrines des mélanocytes après irradiation .

Trois jours après une irradiation aiguë UVB (50 mJ.cm⁻²), Bernerd et Asselineau (1997) ont observé une parakératose de l'épiderme caractérisée par une couche cornée nucléé, une

diminution des marqueurs de différenciation telles que la kératine K10, la lorocrine, la filaggrine et la transglutaminase I, par contre, l'involucrine n'est pas affectée. La morphogénèse de l'épiderme redevient normale après 14 jours de culture.

Les épidermes reconstruits, comme l'épiderme normal, expriment la galectine-7, un marqueur de stratification épithéliale, dans toutes les couches de l'épiderme. Après irradiation UVB, dans les deux types d'épidermes, il y a surexpression de galectine-7 dans les « sunburn cells » (Bernerd et al., 1999).

3.3 Champs d'application du modèle d'épiderme reconstruit

3.3.1 Etudes cellulaires

Le modèle d'épiderme reconstruit permet d'associer des cellules d'origines différentes, d'associer un ou plusieurs types cellulaires afin d'étudier l'influence d'un type cellulaire au sein d'un organe, de faire varier la composition du milieu ou d'appliquer des molécules en topique.

3.3.1.1 Mélanocytes

Des études à partir de reconstructions chimériques ont permis de démontrer que c'est l'origine du mélanocyte qui détermine le phototype de la peau (Bessou et al., 1996).

3.3.1.2 Kératinocytes

Des études sur épidermes reconstruits ont permis de montrer qu'il existe 2 populations de kératinocytes basaux présentant une expression différente de l'intégrine β -1. Ces 2 populations répondent différemment aux UV ce qui se traduit par une expression différentielle de la p53, Bcl-2 et de la cycline E (Hendrix et al., 1998). L'influence de p53 (apoptose ou réparation) est peut-être prédéterminée par le type de la cellule.

3.3.1.3 Supplémentation du milieu

Ce modèle a permis de montrer que la 1,25-dihydroxyvitamine D3 stimule la différenciation terminale des kératinocytes en cornéocytes (Régnier et Darmon, 1991).

Il a également permis de montrer que l'acide rétinoïque inhibe la formation de l'enveloppe cornée. En effet, le traitement par l'acide rétinoïque induit une inhibition de la différenciation terminale en inhibant la transcription de la lorocrine mais pas celle de l'involucrine qui est,

comme la loricrine, impliquée dans la différenciation terminale des kératinocytes (Magnaldo et al., 1992).

Une étude a été réalisée sur l'effet de l'EGF et du KGF (kératinocyte growth factor) qui semblent impliqués dans la régénération de l'épiderme après une blessure. Cette étude a permis de montrer que l'EGF joue un rôle majeur dans les événements précoces de la réparation par stimulation de la prolifération et de la migration des kératinocytes tandis que le KGF joue un rôle tardif par stabilisation du renouvellement (« turn-over ») de l'épiderme et de la fonction barrière (Gibbs et al., 2000).

Le milieu de culture (DMEM/Ham) (*cf. Tableau 3 : Composition des milieux de bases (DMEM/Ham et IMDM/MCDB153) pour les épidermes reconstruits, p. 84*) des épidermes reconstruits avec des kératinocytes a été supplémenté avec de l'acide linoléique (18 :2) afin de compenser le déficit en cet acide gras des épidermes reconstruits (Vicanova et al., 1999). L'assimilation de l'acide linoléique par les kératinocytes est plus importante sur DED que sur filtre de polyester. La modification du milieu de culture a permis de rapprocher les taux des phospholipides et des céramides issus l'acide linoléique des valeurs de l'épiderme natif mais ce n'est pas le cas pour les triglycérides, ce qui indique la persistance d'anomalies de la lipogénèse (*cf. Tableau 5 : Pourcentages d'acides gras membranaires dans l'épiderme natif (adapté d'après Vicanova et al., 1999) et dans l'épiderme reconstruit (d'après Bessou, 1997), p. 84*).

	Phospholipides		Triglycérides		Acides gras libres		Céramides	
	Epiderme natif	Epiderme reconstruit	Epiderme natif	Epiderme reconstruit	Epiderme natif	Epiderme reconstruit	Epiderme natif	Epiderme reconstruit
% Lipides totaux	36,5 +/- 3,2	36,8 +/- 3,4	6,0 +/- 2,0	9,8 +/- 3,1	10,3 +/- 1,8	6,2 +/- 1,2	14,3 +/- 2,3	15,6 +/- 2,0
Acides gras %								
14 :0	0,2 +/- 0,2	1,2 +/- 0,3	1,5 +/- 0,7	0,9 +/- 0,9	0,9 +/- 0,1	4,8 +/- 1,1	2,0 +/- 0,4	1,9 +/- 0,2
16 :0	12,6 +/- 1,1	15,7 +/- 0,8	18,1 +/- 1,1	10,6 +/- 0,5	8,3 +/- 1,4	26,5 +/- 0,5	8,7 +/- 2,7	10,4 +/- 0,3
16 :1		0,7 +/- 0,2	7,2 +/- 0,2	0	0	0	1,0 +/- 1,0	1,1 +/- 0,2
18 :0	15,2 +/- 1,2	19,8 +/- 0,5	7,7 +/- 0,6	8,0 +/- 0,3	4,88 +/- 0,4	26,1 +/- 0,6	3,8 +/- 0,3	10,8 +/- 1,6
18 :1	16,5 +/- 0,3	21,2 +/- 1,1	42,0 +/- 0,2	20,2 +/- 0,1	3,0 +/- 0,3	15,9 +/- 2,2	3,9 +/- 0,9	6,8 +/- 0,7
18 :2	42,4 +/- 1,2	31,5 +/- 1,7	18,4 +/- 1,4	55,1 +/- 1,3	5,1 +/- 0,5	5,3 +/- 1,7	6,3 +/- 0,6	4,6 +/- 0,0
20 :0	2,1 +/- 0,1	1,6 +/- 0,1	0	1,5 +/- 0,1	3,1 +/- 0,2	3,2 +/- 0,2	1,1 +/- 0,2	2,2 +/- 0,0
20 :3	1,0 +/- 0,1	1,4 +/- 0,1	0	1,2 +/- 0,3	0	0	0	0
20 :4	5,2 +/- 0,2	3,5 +/- 0,1	0,5 +/- 0,5	1,8 +/- 0,4	0	1,1 +/- 1,1	0	0,5 +/- 0,1
22 :0	1,6 +/- 0,2	1,1 +/- 0,0	0,4 +/- 0,4	0	3,1 +/- 0,7	3,8 +/- 0,4	1,1 +/- 0,2	6,3 +/- 0,0
22 :1	0,1 +/- 0,1	0	0	0	0	0	0	0,6 +/- 0,2
22 :2		0	0	0	0	1,3 +/- 1,3	0	0
24 :0	2,5 +/- 0,1	2,3 +/- 0,1	2,4 +/- 0,2	0,6 +/- 0,6	34,3 +/- 1,6	8,3 +/- 0,5	27,3 +/- 1,6	32,1 +/- 1,4
24 :1	0,2 +/- 0,1	0	0	0	0	0	0	0
25 :0		0	0	0	6,1 +/- 0,3	0,9 +/- 0,9	6,9 +/- 1,0	1,4 +/- 0,0
26 :0	0,2 +/- 0,2	0	1,1 +/- 0,1	0	25,8 +/- 1,7	2,9 +/- 0,8	37,9 +/- 0,1	21,4 +/- 1,8
28 :0		0	0	0	5,4 +/- 0,7	0	0	0
18 :0/18 :1/18 :2	1/1,1/2,8	1/1,1/1,6	1/5,5/2,4	1/2,5/6,8	1/0,6/1,1	1/0,6/0,2	1/1/1,7	1/0,6/0,4

Tableau 6 : Composition en acides gras de l'épiderme natif et de l'épiderme reconstruit avec des kératinocytes cultivés dans un milieu enrichi avec 30 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ d'acide linoléique (Vicanova et al., 1999)

3.3.2 Etude de différentes affections

3.3.2.1 Carcinomes

Des cellules de carcinomes spinocellulaires (SCC) ont été cultivées sur DED et ont induit la formation d'un épithélium similaire aux tissus pathologiques avec une distribution des marqueurs tels que l'involucrine et la filaggrine, similaire à la distribution dans le carcinome (Régnier et al., 1988).

Des cellules de SCC ont également été cultivées sur matrice de collagène colonisée ou non par des fibroblastes. L'épiderme témoin a été réalisé avec des cellules HaCaT (lignée kératinocytaire). Cette étude a permis de montrer qu'en absence de fibroblastes les SCC expriment plus de MMP-9 (métalloprotéinase) que les HaCaT et qu'en présence de fibroblastes seules les cellules de SCC expriment la MMP-9. Ceci montre l'importance des interactions entre les cellules malignes et les fibroblastes du stroma dans l'expression de MMP-9 et donc probablement dans le développement de métastases dans les SCC humains (Borchers et al., 1997).

3.3.2.2 Mélanomes

L'épiderme reconstruit peut servir de modèle pour l'étude des mélanomes par co-ensemencement de kératinocytes et de cellules mélanomateuses. Les épidermes, ainsi reconstruits, miment la situation in vivo.

Seuls les épidermes reconstruits avec des cellules de mélanomes invasifs présentent une invasion du derme (Dekker et al., 2000; Berthier-Vergnes et al., 2000).

La migration des cellules de mélanomes dans le derme, qu'il présente ou non une membrane basale, n'est possible qu'en présence de kératinocytes et de fibroblastes (Eves et al., 2000).

Les mélanocytes, quelles que soient les conditions, ne migrent pas dans le derme, par contre, les kératinocytes, en absence de membrane basale migrent dans le derme (Eves et al., 2000) (*cf. Figure 2 : Structure de l'épiderme (d'après Dominice-Franchi, 1999), p. 19*).

3.3.2.3 Nævus pigmentaires

Les naevi pigmentaires sont des taches pigmentées de la peau constituées de cellules pigmentaires groupées en amas ou thèques. Ils peuvent être congénitaux ou acquis. Ils peuvent, dans certaines circonstances, se transformer en mélanomes.

Il a été possible de reconstruire ex-vivo des nævi pigmentés à partir de cellules fraîchement isolées ou de cultures primaires provenant de nævus dermiques et de kératinocytes normaux (Bessou-Touya et al., 1999). Le développement de ce modèle a pour but de comprendre les stimuli induisant l'apparition des nævi.

3.3.2.4 Vitiligo

Le vitiligo est une affection cutanée qui se traduit par la dépigmentation de certaines zones de peau due à la disparition des mélanocytes. La reconstruction d'épidermes avec des cellules de patients atteints de vitiligo n'a pas permis de le reproduire ex-vivo. Un stress est sûrement nécessaire pour induire la mort des mélanocytes (Bessou et al., 1997b).

3.3.2.5 Epidermolyse bulleuse

L'épidermolyse bulleuse jonctionnelle, qui se traduit par l'absence de formation des hémidesmosomes, qui assurent la cohésion de l'épiderme au derme, est liée à une mutation dans le gène codant pour la chaîne $\beta 3$ de la laminine. Un épiderme reconstruit avec des kératinocytes corrigés par transfert de l'ADNc de la $\beta 3$ laminine présente, dès lors, une jonction dermo-épidermique normale (Vailly et al., 1998). Cette étude montre l'intérêt d'un tel modèle pour le développement de nouvelles thérapies dans le cas de graves pathologies génétiques.

3.3.2.6 Xeroderma pigmentosum

Le xeroderma pigmentosum (XP) est une maladie caractérisée par un défaut de réparation de l'ADN. Les patients atteints de XP présentent une forte photosensibilité et développent de nombreuses tumeurs. Il a été possible de reconstruire un épiderme XP en utilisant des kératinocytes de patients XP (Bernerd et al., ICP 2000). La reconstruction d'un épiderme XP montre que les kératinocytes, comme les fibroblastes, expriment intrinsèquement un phénotype anormal. Dans ce système l'effet d'une dose d'UVB induit des lésions de l'ADN qui sont toujours présentes 4 jours après irradiation. Ce modèle semble prometteur pour l'étude des hyperphotosensibilités génétiques.

3.3.2.7 Candidoses cutanées

Les candidoses cutanées sont dues au développement des levures du genre *candida*. Elles se traduisent par le développement de zones inflammatoires au niveau des plis (intertrigo) ou de lésions suppuratives (pyodermites). La reconstruction, grâce au modèle d'épiderme reconstruit, d'une candidose cutanée a permis de montrer que ce modèle répond comme les modèles animaux aux liposomes contenant de l'econazole. Ce modèle semble tout à fait adéquat pour se substituer aux modèles animaux et à l'étude de cette pathologie sur volontaires (Korting et al., 2000).

3.3.3 Test de molécules actives

La législation demande des contrôles de qualité combinés à de sévères mesures de sécurité et à une limitation du nombre d'animaux pouvant être utilisé. De ce fait, les méthodes alternatives, plus particulièrement les substituts cutanés, pour l'évaluation des tests pharmacotoxicologiques de nouvelles formulations cosmétiques sont appelées à se développer.

3.3.3.1 Etude des modificateurs de la pigmentation

L'épiderme reconstruit avec des mélanocytes répond aux modificateurs de la pigmentation. Comme dans l'épiderme normal l'IBMX et l'OAG augmentent la pigmentation tandis que l'acide kojique et le mequinol diminuent la pigmentation (Bessou et al., 1997a).

3.3.3.2 Etude des écrans solaires

L'irradiation UVA (50 J.cm^{-2}) d'épidermes reconstruits selon la technique Episkin traités avec différents écrans a permis d'établir que l'épiderme reconstruit peut constituer un modèle utile pour l'étude des lésions induites par les UVA (lipoperoxydation, déplétion en glutathion) et pour tester le potentiel des molécules photoprotectrices (Cohen et al., 1998).

Le derme équivalent (collagène-glycosaminoglycanes-chitosane + fibroblastes) et l'épiderme équivalent réagissent aux effets délétères des UVA et des UVB (diminution de la viabilité et réponse inflammatoire (IL-1). L'application topique, avant exposition, d'un écran solaire protège les cellules de la mort UV-induite (Augustin et al., 1997).

L'évaluation de la photoprotection sur épidermes reconstruits sur lattice montre une bonne efficacité de filtres anti-UVB et anti-UVA dans la protection des cellules épidermiques envers la formation des SBC et des dimères de pyrimidine, cependant seul le filtre anti-UVA protège les fibroblastes (Bernerd et al., 2000).

L'épiderme reconstruit est donc un modèle approprié pour l'étude des effets des UV et des filtres solaires (Bernerd et al., 2000).

3.3.3.3 Etude de l'irritation

Le modèle SkinEthic a été validé pour prédire le potentiel irritant de produits topiques après une ou plusieurs applications chroniques ou topiques (de Brugerolle de Fraissinette et al., 1999).

3.3.4 Amélioration du modèle d'épiderme reconstruit

Il est possible d'améliorer le derme déépidermisé en lui intégrant des fibroblastes (Chakrabarty et al., 1999) et même des cellules endothéliales (Black et al., 2000).

Les épidermes reconstruits sur derme acellulaire déépidermisé et sur matrice de collagène colonisée par des fibroblastes ressemblent histologiquement à l'épiderme natif. Cependant, il y a quelques anomalies en particulier dans l'expression de certains marqueurs de différenciation (*cf. p.81-85*).

Sur la matrice de collagène contractée par des fibroblastes a été déposée un derme acellulaire déépidermisé. Sur cet assemblage des kératinocytes ont étéensemencés et ont permis la reconstruction d'un épiderme présentant une morphologie similaire à l'épiderme natif (Lee et al., 2000). Dans ce type d'épidermes, les marqueurs de différenciation tels que l'involucrine, la lorricrine, la filaggrine sont exprimés selon le même profil que l'épiderme natif. La kératine K1, quant à elle, n'est pas exprimée correctement.

Dans ce modèle, des fibroblastes colonisent le derme acellulaire déépidermisé mimant la migration des fibroblastes *in vivo*. Ce modèle semble plus physiologique que les autres modèles d'épidermes reconstruits. De plus, il confirme que la présence des fibroblastes accentue la différenciation épidermique.

3.3.5 Conclusions

Le modèle d'épiderme reconstruit sur lattice est parfaitement adapté pour des tests d'irritation cutanée, de phototoxicité, de photoprotection et cosmétologique (Damour et al., 1998).

L'adéquation de ce modèle avec les modèles animaux et l'extrapolation possible à l'*in vivo* se sont traduits par la réalisation de tests *in vitro* uniquement sur peau équivalente au sein des laboratoires L'OREAL (LeClaire et de Silva, 1998).

Les différents modèles d'épidermes reconstruits possèdent un épithélium complètement stratifié qui ressemble étroitement à l'épiderme humain normal quel que soit le milieu de culture utilisé. Tous les modèles présentent une expression aberrante de la kératine 6, de la skalp (skin-derived antileukoproteinase), de l'involucrine, de la transglutaminase et des petites protéines riches en proline (Boelsma et al., 2000), excepté le modèle développé par Lee et al. (2000).

Tous les modèles d'épidermes reconstruits reproduisent la plupart des caractéristiques de l'épiderme humain normal et sont donc appropriés aux études *in vitro* de diverses molécules (Boelsma et al., 2000).

Ce modèle est tout à fait adapté à l'étude des interactions cellulaires puisqu'il est modulable à souhait et peut ainsi permettre d'approfondir les connaissances sur

l'apparition et l'évolution de certaines maladies cutanées et ainsi permettre de développer de nouvelles thérapies mieux adaptées.

RESULTATS

1 Arrière-plan général

Les sujets négroïdes développent moins de tumeurs cutanées que les individus caucasoïdes. Ceci pourrait résulter d'une exposition solaire moindre, ce qui est peu probable, ou de la forte activité mélanogénique de leurs mélanocytes qui protégerait efficacement de la survenue des tumeurs. Ceci est également suggéré par le fait que les albinos négroïdes présentent de nombreux cancers cutanés, tout en étant dotés de mélanocytes, mais ceux-ci ont une activité mélanogénique altérée.

Le rôle photoprotecteur du mélanocyte pourrait donc être lié à la présence de mélanine.

Si le mélanocyte a un rôle photoprotecteur dans l'épiderme, son absence devrait se traduire par une plus grande photosensibilité de l'épiderme, avec risque accru de mutations et donc de cancers. Très peu de cancers sont observés chez les personnes développant un vitiligo, affection caractérisée par la perte progressive de mélanocytes. Ces données peuvent être interprétées de façon non univoque: soit les études épidémiologiques sont « biaisées » par la non-exposition des atteintes vitiligineuses aux UV, soit les mélanocytes n'ont pas un rôle fondamental dans la prévention des cancers cutanés.

Le mélanocyte, outre la mélanine, possède une concentration élevée en acides gras polyinsaturés qui sont des cibles privilégiées des radicaux libres. Ils peuvent donc être considérés comme des molécules « photosensibilisantes » et pourraient expliquer la différence entre albinos et vitiligo face aux cancers.

De plus, les mélanocytes de faible phototype, en plus d'une faible production de mélanine, possèdent une forte teneur en acides gras insaturés.

A ce stade, nous nous sommes interrogés sur le rôle du mélanocyte caucasoïde de sujets à peau claire au sein de l'unité épidermique de mélanisation. A-t-il un effet photoprotecteur ?

Cette étude ne pouvait être réalisée qu'à partir d'un épiderme entier. L'étude aurait pu être réalisée sur explants cutanés mais ceux-ci présentent deux désavantages : d'une part, ils possèdent d'autres cellules épidermiques et dermiques qui influent sur le comportement du mélanocyte au sein de l'unité épidermique de mélanisation ; d'autre part, les explants doivent être traités rapidement après obtention et le mode vie du donneur (irradiations antérieures, régime alimentaire riche en graisses insaturées) pourrait influencer les résultats.

L'épiderme reconstitué pigmenté qui est réalisé à partir de cellules cultivées pendant 2 à 3 semaines permet de s'affranchir du mode de vie du donneur. De plus, étant réalisé uniquement avec des kératinocytes et des mélanocytes, il permet d'étudier le rôle réel du mélanocyte. Cependant, ce modèle qui avait été validé pour la pigmentation dans le laboratoire, devait être d'abord validé après irradiation pour pouvoir étudier la contribution du mélanocyte.

Le but de ma thèse a donc été d'étudier le comportement de ce modèle d'épiderme reconstruit pigmenté après irradiation aiguë, et d'étudier le rôle propre du mélanocyte caucasioïde. Pour cela, des reconstructions ont été réalisées en parallèle avec et sans mélanocytes. Elles ont permis, d'une part, de comparer l'épiderme mélanisé avec la peau normale afin de le valider globalement les paramètres du stress UV-induit, et, d'autre part, d'évaluer l'influence des mélanocytes.

Au vu des résultats, nous avons proposé une modélisation du mélanocyte caucasioïde. Ayant considéré que son rôle était lié en grande partie à la présence des acides gras polyinsaturés, nous avons étudié l'effet de la supplémentation en acides gras insaturés du milieu de culture d'un épiderme reconstruit avec des kératinocytes sur son comportement face aux UV, en comparaison avec des cultures témoin avec ou sans mélanocytes caucasioïdes.

Nous avons également étudié l'effet de molécules photoprotectrices topiques ou systémiques d'action connue afin de confirmer l'intérêt du modèle en photoprotection.

2 Etude de l'influence des mélanocytes caucasioïdes dans les réponses épidermiques induites par une irradiation aiguë

2.1 Arrière-plan

L'incidence des cancers de la peau a énormément augmenté ces dernières décennies. Ce sont les cancers les plus importants en nombre. Si les carcinomes basocellulaires et les carcinomes spinocellulaires sont facilement curables, les mélanomes, quant à eux, sont incurables au stade de métastase viscérale. L'incidence des cancers est plus importante dans les populations de type caucasioïde mais le pourcentage relatif de mélanomes semble plus important dans la population de type négroïde.

L'incidence de ces cancers semble d'une part corrélée avec l'augmentation des expositions solaires (*cf. p.63 Cancer*) et, d'autre part, dépendante du phototype du mélanocyte.

Il est donc important d'approfondir nos connaissances sur l'épiderme et sa réponse au stress UV ainsi que nos connaissances sur le rôle du mélanocyte, et plus particulièrement sur celui de la mélanine car il varie énormément selon les conditions expérimentales (*cf. p.44, UV et mélanocytes*). L'influence du soleil sur l'épiderme peut être étudiée sur explants de peau mais, pour cela, il est nécessaire de connaître parfaitement le comportement du donneur vis-à-vis des expositions solaires ou ultraviolettes.

Par contre, le rôle du mélanocyte ne peut-être réellement étudié que dans des modèles en culture qui permettent de réaliser des épidermes autologues ou hétérologues avec ou sans mélanocytes.

Les explants ou les épidermes reconstruits permettent d'observer les lésions prémutagéniques (CPD, 6-4PP et 8oxodG). Toutefois l'étude du développement des cancers n'est pas réalisable, que ce soit avec les explants ou les épidermes reconstruits. Pour cela, il faut utiliser des modèles animaux tels que les souris ou le poisson (xiphophore), modèles pour le mélanome.

2.2 But de l'étude

Le but de cette étude est :

➤ de démontrer que l'épiderme reconstruit se comporte vis-à-vis des UVB de façon similaire à l'épiderme humain normal, *in vivo*, et de ce fait que les données obtenues sur l'épiderme reconstruit sont extrapolables à l'épiderme humain normal

➤ d'évaluer le rôle du mélanocyte caucasoïde au sein de l'épiderme, après une irradiation UVB aiguë.

2.3 Méthodologie générale

Des épidermes ont été reconstruits avec des cellules provenant de donneurs de phototype II/III selon la technique de Pruniéras et al. (1979). Afin d'observer l'influence des mélanocytes, des épidermes ont été reconstruits, parallèlement, avec 100 % de kératinocytes ou 95 % de kératinocytes et 5 % de mélanocytes. Après 8 jours de culture à l'interface air/liquide, les épidermes ont été irradiés avec une dose de $0,10 \text{ J.cm}^{-2}$ ou de $0,15 \text{ J.cm}^{-2}$. Les cultures ont été arrêtées à différents temps compris entre 0 et 24 heures afin d'établir les cinétiques d'apparition et de réparation des lésions de l'ADN (CPD et 6-4PP) et des SBC (sunburn cells).

Les CPD et les 6-4PP ont été mis en évidence par immunohistochimie.

Les SBC ont été mises en évidence par coloration à l'hématoxyline-éosine.

2.4 Principaux résultats

- Les mélanocytes au sein de l'épiderme sont fonctionnels.

A l'état basal les mélanocytes contiennent des mélanosomes qui sont transférés aux kératinocytes. Les deux types de mélanosomes eu- et phéomélanosomes ont été observés, cependant le stade final de maturation n'est pas atteint. La présence de mélanine n'a pu être observée que par microscopie électronique (concentration trop faible).

- L'épiderme reconstruit se comporte de façon similaire à la peau normale après irradiation.

L'apparition des lésions est dose dépendante.

Les 6-4PP sont moins nombreux que les CPD et sont réparés plus rapidement que les CPD.

Les SBC apparaissent après 6 heures et sont très importantes à 24 heures.

- L'absence de mélanocytes induit une diminution de la viabilité des cellules épidermiques (traduit par la présence de SBC). Cependant, le nombre de cellules contenant des 6-4PP ou des CPD qui sont impliqués dans l'apoptose sont similaires dans les deux types de reconstructions (épiderme reconstruit avec ou sans mélanocytes). La méthode immunohistochimique n'est probablement pas assez sensible pour détecter de faibles variations du nombre de lésions de l'ADN.

2.5 Résultats complémentaires

- Comme dans la peau normale (Sheehan et Young, ICP 2000), le nombre de cellules révélé par la méthode TUNEL n'est pas corrélé au nombre de SBC. La méthode TUNEL met en évidence la fragmentation de l'ADN qui est une étape tardive de l'apoptose alors que les SBC sont révélées par leur cytoplasme éosinophile et leur noyau rétréci qui sont eux des phénomènes précoces.

- A la différence des études sur peau normale ou sur cellules, nous avons observé que le nombre de CPD et de 6-4 PP n'était pas maximal immédiatement après irradiation mais 1 à 2 heures après irradiation. Les études sur biopsies ou sur cellules montrent soit une décroissance importante et immédiate du nombre de photoproduits traduisant une réparation immédiate

(Reusch et al., 1988), soit une diminution très faible (10 % en 3 heures pour les CPD) (Nakagawa et al., 1998).

L'hypothèse émise est que la technique développée par Mori et al. (1991) que nous avons utilisée pour mettre en évidence les CPD et les 6-4PP ne permet pas à l'anticorps d'accéder correctement à l'ADN. Nous avons donc utilisé la technique d'accessibilité à l'ADN de Fukuda et al. (1993) pour révéler d'une part l'ADN et d'autre part, après adaptation de la technique, les CPD.

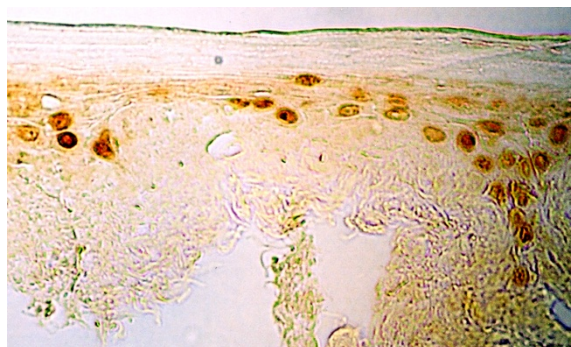


Figure 29 : Révélation de l'ADN par la technique de Fukuda et al., (1993)

Par cette technique nous avons observé que le nombre de cellules marquées et l'intensité de leur marquage par l'anticorps anti-dimère de thymine étaient similaires à 0 et 2 heures.

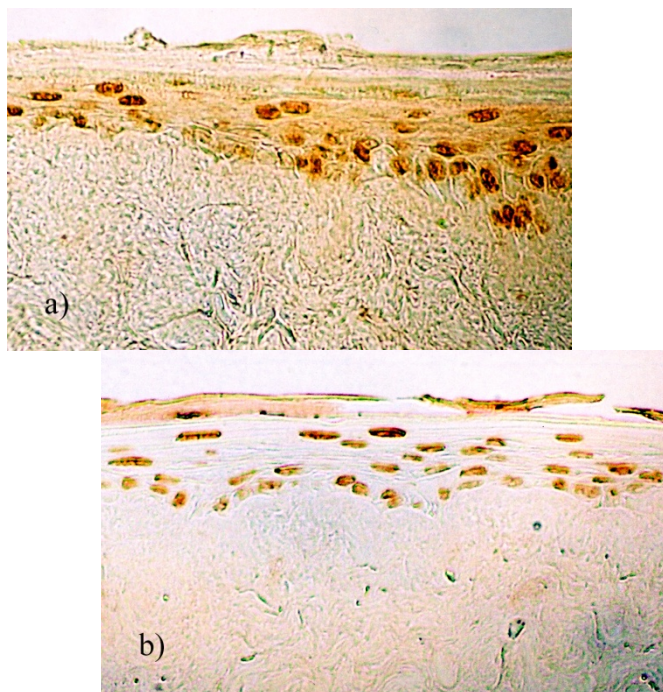


Figure 30: Révélation des CPD par la technique adaptée de Fukuda et al., (1993) : a) 10 minutes après irradiation, b) 1 heure après irradiation

2.6 Conclusions

L'ADN n'est pas complètement accessible aux anticorps durant les 2 premières heures suivant l'irradiation par la technique de Mori et al. (1991) probablement de part sa condensation avec les molécules d'histones. Cette condensation expliquerait pourquoi nous observons comme Nakagawa et al. (1998), peu ou pas de réparation pendant les 2 premières heures après irradiation. De plus, selon Thoma et al. (1999) et Smerdon (ICP, 2000), les degrés d'enroulements et de repliements de l'ADN inhibent fortement la réparation des CPD par excision-resynthèse *in vitro* et *in vivo*.

L'apparition des CPD, des 6-4PP et des SBC est dose-dépendante ce qui corrobore les observations de Young (1987) et Bayerl et al. (1995) qui ont établi une corrélation entre la formation des CPD et des 6-4PP, leur réparation et la formation de « sunburn cells ».

L'observation d'une moindre induction de l'apoptose dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes est probablement liée à la présence de mélanine. En effet, Kobayashi et al. (1998) ont observé que la « cap » supranucléaire de mélanine prévient la formation des CPD et des 6-4 PP. Toutefois, la protection induite par la mélanine, qui permet de ne pas déclencher le programme de mort cellulaire, est probablement faible et ne pourrait donc pas être détectée par marquage immunohistochimique des CPD.

Ces résultats corroborent l'hypothèse de Stege et al., (2000), selon laquelle il y aurait un **nombre seuil** de lésions induisant l'apoptose.

Le modèle d'épiderme reconstruit sur DED est extrapolable, à l'épiderme *in vivo*, pour l'étude des réponses UVB-induites

La faible induction de l'apoptose dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes pourrait se traduire par la non-élimination de cellules ayant un fort risque tumorigène et donc conférer au mélanocyte de faible phototype un rôle dans l'induction et le développement des cancers cutanés.

2.7 Article : Studies on epidermis with and without melanocytes : melanocytes prevent sunburn cell formation but not appearance of DNA damaged cells in fair-skinned caucasians

3 Importance de la concentration en mélanine et en acides gras polyinsaturés dans les réponses épidermiques UV-induites

3.1 Arrière-plan

La majorité des UV arrivant sur terre sont des UVA qui sont plus pénétrants que les UVB mais moins énergétiques. Les UVB et les UVA sont connus pour avoir un effet différent sur la peau (*cf. p. 46 ; 2.1.2. Changements morphologiques de la peau après irradiation*).

Les UVA induisent notamment la genèse de radicaux libres qui provoquent non seulement des lésions de l'ADN mais également des oxydations des lipides et des protéines

La mélanine peut protéger de l'action des radicaux libres (Rozanowska et al., 1998) mais elle peut également générer des radicaux libres (*cf. p. 45 ; 2.1.1.3.4.3: Rôles de la mélanine*). De plus, les mélanocytes possèdent plus d'acides gras polyinsaturés que les kératinocytes (Picardo et al., 1996), ce qui les rend plus susceptibles à la lipoperoxydation (*cf. p. 41 ; 2.1.1.3.3.1 : Lipoperoxydation*).

Les UVA semblent très importants dans l'induction des mélanomes et semblent augmenter la mutagenicité des UVB (*cf. p. 63 ; 2.3 : Cancers cutanés*).

3.2 But de l'étude

Le but de cette étude est :

- de comparer l'effet des UVA seuls, des UVB seuls et des UVA+B sur l'épiderme avec comme corollaire de démontrer que l'épiderme reconstitué se comporte vis à vis des UVA et des UVA + B de façon similaire à l'épiderme humain normal, *in vivo*, et de ce fait que les données obtenues sur ER sont extrapolables à l'épiderme humain normal.
- d'évaluer le rôle du mélanocyte caucasoïde, au sein de l'épiderme, après une irradiation aiguë UVA ou UVA+B.

3.3 Méthodologie générale

Des épidermes ont été reconstruits avec des cellules provenant de donneurs de phototype II/III selon la technique de Pruniéras et al. (1979). Afin d'observer l'influence des mélanocytes, des épidermes ont été reconstruits, parallèlement, avec 100 % de kératinocytes ou 95 % de

kératinocytes et 5 % de mélanocytes. Au bout de 8 jours de culture à l'interface air/liquide, les épidermes ont été irradiés avec une dose d'UVA (8 J.cm^{-2}) ou d'UVB ($0,15 \text{ J.cm}^{-2}$) ou UVA+B ($8 \text{ J.cm}^{-2} + 0,15 \text{ J.cm}^{-2}$). Les épidermes ont été analysés 24 heures après irradiation afin de pouvoir étudier de nombreux marqueurs.

Les CPD ont été mis en évidence par immunohistochimie.

Les SBC ont été mises en évidence par coloration à l'hématoxyline-éosine.

Les protéines oxydées ont été mises en évidence par révélation des groupements carbonyles grâce à leur réaction avec la 2,4 dinitrophénylhydrazine.

L'oxydation des lipides membranaires, le taux de vitamine E et les activités superoxydase et catalase ont été réalisées, en Italie, dans le laboratoire du Dr Picardo.

3.4 Principaux résultats

➤ Les UVA induisent une protection de l'apoptose UVB-induite. A la différence de l'irradiation UVB qui induit beaucoup plus de mortalité dans les épidermes reconstruits uniquement avec des kératinocytes que dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes, après irradiation UVA+B, il n'y a pas de différence significative de mortalité entre les 2 types de reconstructions.

➤ 24 heures après irradiation UVA+B, il y a moins de CPD qu'après irradiation UVB.

Les UVA n'induisent pas la formation de CPD, à la dose utilisée (de 8 J.cm^{-2}).

24 heures après irradiation, les 8-oxodG sont peu nombreuses mais à 2 heures, aux doses utilisées 8 J.cm^{-2} pour les UVA et $0,15 \text{ J.cm}^{-2}$ pour les UVB, nous observons que ce sont les UVB qui induisent le plus de 8-oxodG. A deux heures, il semble qu'il y ait, en présence de mélanocytes, légèrement plus de 8-oxodG dans les couches basale et suprabasale.

➤ Les UVB induisent plus d'oxydation des protéines que les UVA. Les UVA+B induisent une oxydation intermédiaire qui est proche de celle des UVA dans les épidermes reconstruits avec des kératinocytes et proche de celle des UVB dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes.

En présence de mélanocytes l'oxydation protéique est plus importante.

➤ Les UV induisent une oxydation des phospholipides qui est plus importante sous UVB dans nos conditions expérimentales.

L'oxydation des phospholipides est beaucoup plus importante en présence de mélanocytes.

- Les UV, notamment les UVA, induisent une diminution des activités catalase et SOD.

La catalase agissant après la SOD dans la voie de détoxification enzymatique de l'anion superoxyde, le rapport entre la SOD et la catalase ne doit pas être trop déséquilibré pour ne pas induire l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène notamment de peroxyde d'hydrogène. La présence de mélanocytes dans les épidermes induit un déséquilibre moins important du rapport SOD/catalase.

- Les UV induisent une déplétion en vitamine E qui est du même ordre de grandeur quel que soit le type d'irradiation.

3.5 Résultats complémentaires

- Les protéines oxydées se trouvent dans la gamme de poids moléculaire correspondant aux kératines mais il ne s'agit pas de kératines oxydées. En effet, après élimination des kératines de l'extrait protéique, le profil des protéines oxydées ne change pas.

- Nous n'avons pas pu mettre en évidence une production de NO après irradiation que ce soit en dosant les nitrates ou les nitrites.

3.6 Conclusions

- Dans nos conditions de culture, il semble qu'il n'y ait pas d'activation de la NOSynthase inductible. Les effets induits par les radicaux libres semblent donc attribuables aux espèces réactives de l'oxygène et non aux espèces réactives de l'azote. L'activation de la NOSynthase inductible nécessite certaines conditions de culture, qui ne sont peut-être pas optimale dans notre modèle, telles que la présence de L-Arginine (Didier et al., 1999), la présence de cytokines proinflammatoires ou une concentration importante de calcium (Romero-Graillet et al., 1996).

- La combinaison des UVA et des UVB est modératrice notamment envers les CPD et les SBC. Etant donné que la formation des SBC est liée aux lésions de l'ADN (Young, 1987 ; Bayerl et al., 1995), la moindre formation des SBC observée après UVA+B est probablement liée à la diminution du nombre de CPD. A la différence de la protection offerte par la mélanine, la protection induite par les UVA est probablement due à une augmentation de la

réparation soit par activation ou stimulation de la synthèse de facteurs impliqués dans la réparation (PCNA,...), soit par augmentation de l'accessibilité à l'ADN des facteurs et des enzymes de la réparation.

Ceci tend à démontrer que l'activation des facteurs de réparation, de dégradation ou inducteurs d'apoptose est dépendante de la longueur d'onde. Toutefois cette longueur d'onde activatrice est probablement différente de celle induisant les lésions de ses cibles.

Des doses faibles d'irradiation UVA I induisent, chez les souris, un délai dans l'apparition des tumeurs induites par les UVB (Bech-Thomsen et al., 1994), ce qui sous-entend un effet protecteur des UVA face aux UVB.

➤ La présence de mélanocytes caucasoïdes, qui prévient la formation des CPD et permet le maintien du rapport SOD/catalase, est un facteur prooxydant pour les protéines et les lipides.

Cet effet peut être lié à la concentration plus importante en acides gras polyinsaturés des mélanocytes et/ou à la présence de mélanine constitutive dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes.

La peroxydation lipidique induit une diminution de la fluidité membranaire, donc probablement une diminution du transfert des mélanosomes des mélanocytes vers les kératinocytes. Toutefois, cette lipoperoxydation va induire une rupture des membranes lysosomales et libérer les peroxydases lysosomales (Pourzand et Tyrrell, 1999) qui peuvent alors dégrader les protéines oxydées.

L'oxydation des protéines induit souvent une diminution de l'activité protéique. Par ailleurs, la plupart des protéines oxydées sont plus sensibles à la protéolyse que leur contrepartie non oxydée mais jusqu'à un certain seuil (*cf. p. 54 ; 2.2.3 : Réparation et dégradation des protéines oxydées*).

Il semble donc qu'une exposition ultraviolette avec une lampe présentant une bande spectrale étroite ou avec une protection restreinte à un seul type d'UV soit plus néfaste qu'une exposition spectrale totale.

Le rôle du mélanocyte caucasoïde est difficile à interpréter. Pour l'interpréter plus précisément il faudrait pouvoir observer l'épiderme à plus long terme mais avec les doses d'irradiations que nous utilisons, nous observons, 48 heures après irradiation, une mortalité de plus de 50 % et ceci quelque soit le type d'UV, ce qui fragilise les épidermes et les rend difficilement analysables.

3.7 Article : Comparative study of UVB, UVA and UVA plus B on Reconstructed Epidermis with and without Melanocytes :

**Importance of Melanin and Unsaturated Fatty Acids
concentrations in Epidermal Responses to UV**

3.8 Article : The reconstructed epidermis with melanocytes: a new tool to study pigmentation and photoprotection

4 Le mélanocyte peut-il être assimilé à un mélange d'acides gras polyinsaturés et de mélanine

4.1 Arrière-plan

Les résultats obtenus après irradiations UVA, UVB et UVA+B ont montré, en présence de mélanocytes, une augmentation des lésions radicalaires notamment pour les lipides et les protéines.

Les mélanocytes possèdent une plus grande concentration en acides gras insaturés que les kératinocytes et sont donc plus sensibles à la lipoperoxydation. De plus, après initiation de la lipoperoxydation, il y a une phase de propagation qui se traduit par la genèse de radicaux libres qui amplifient ainsi le stress oxydatif.

D'autre part ils possèdent de la mélanine qui selon les conditions peut-être pro ou antioxydante (*cf. p. 45 ; 2.1.1.3.4.3 : Rôles de la mélanine*).

Lors du transfert de mélanosomes, il y a transfert de mélanine et probablement de lipides mélanosomiaux aux kératinocytes de l'unité épidermique de mélanisation qui rendent ces kératinocytes plus sensibles au stress oxydatif.

4.2 But de l'étude

Le but de cette étude est d'évaluer l'importance des acides gras insaturés mélanocytaires dans les réponses UV-induites aiguës avec comme corollaire de valider l'hypothèse que les acides gras sont aussi importants que la mélanine dans les réponses UV-induites.

En effet, une irradiation UVB aiguë n'induit pas la mélanogenèse dans les peaux de phototype II/III (Barker et al., 1995). Donc, seule la mélanine constitutive pourra être impliquée dans les effets observés sur nos épidermes dans nos conditions d'irradiation.

Pour réaliser cette étude nous avons donc supplémenté le milieu de culture, des épidermes reconstruits avec des kératinocytes, avec des acides gras polyinsaturés (PUFA).

4.3 Méthodologie générale

Des épidermes ont été reconstruits avec des cellules provenant de donneurs de phototype II/III selon la technique de Pruniéras et al. (1979). L'importance des acides gras insaturés a été

étudiée à partir d'épidermes reconstruits avec 100 % de kératinocytes placés, 48 heures avant irradiation, dans des milieux de culture enrichis avec 7.10^{-5} M d'acide linoléique et/ou 3.10^{-5} M d'acide arachidonique. Ces derniers ont été comparés avec des épidermes reconstruits avec 100 % de kératinocytes ou 95 % de kératinocytes et 5 % de mélanocytes non supplémenté en acides gras.

Après 8 jours de culture à l'interface air/liquide, les épidermes reconstruits avec des kératinocytes supplémentés ou non avec les acides gras polyinsaturés, et les épidermes reconstruits avec des mélanocytes ont été irradiés avec une dose d'UVA (8 J.cm^{-2}) ou d'UVB ($0,15 \text{ J.cm}^{-2}$) ou UVA +B ($8 \text{ J.cm}^{-2} + 0,15 \text{ J.cm}^{-2}$).

Les épidermes ont été étudiés avant irradiation et 24 heures après irradiation.

Les CPD ont été mis en évidence par immunohistochimie.

Les 8-oxodG ont été mises en évidence sur section grâce à leur affinité pour l'avidine et ses dérivés.

Les SBC ont été mises en évidence par coloration à l'hématoxyline-éosine.

Les protéines oxydées ont été mises en évidence par révélation des groupements carbonyles grâce à leur réaction avec la 2,4 dinitrophénylhydrazine.

L'oxydation des lipides membranaires, le taux de vitamine E et les activités superoxydase et catalase ont été réalisées, en Italie, par le groupe du Dr Picardo.

4.4 Principaux résultats

➤ Le taux d'acides gras polyinsaturés membranaires augmente dans les épidermes témoins supplémentés traduisant une incorporation des acides gras additionnels. Cette augmentation de la concentration en PUFA est associée à une augmentation de la concentration en vitamine E. Les concentrations en acides gras polyinsaturés et en vitamine E des épidermes supplémentés sont comprises entre celles des épidermes reconstruits avec des kératinocytes et celles des épidermes reconstruits avec des mélanocytes.

➤ Dans les conditions basales (sans irradiation), les épidermes reconstruits avec des kératinocytes supplémentés en PUFA se comportent de façon similaire aux épidermes reconstruits avec des mélanocytes.

➤ Après irradiation aiguë, les épidermes reconstruits avec des kératinocytes supplémentés avec des PUFA ne se comportent pas complètement comme les épidermes reconstruits avec des mélanocytes. En effet si les taux de lipoperoxydation et d'oxydation protéique ainsi que le rapport SOD/catalase varient dans le même sens pour les épidermes reconstitués avec des kératinocytes supplémentés avec les PUFA que pour les épidermes reconstruits avec des mélanocytes, ce n'est pas le cas pour la formation des CPD et des SBC.

De plus, la supplémentation en PUFA induit une forte augmentation du nombre de cellules possédant des 8 oxodG et ceci dans toutes les couches de l'épiderme.

4.5 Conclusions

➤ Dans les conditions basales (sans irradiation), la concentration en acides gras polyinsaturés membranaires des épidermes reconstruits supplémentés en PUFA est inférieure à ce que l'on suppose la concentration en vitamine E. En effet, Avula et Fernandes (1999) ont montré que chez la souris plus il y avait d'insaturation dans les lipides apportés par l'alimentation, plus l'alimentation doit être enrichie en vitamine E. Cette différence de concentration en acide gras sous-entend qu'une partie des acides gras additionnels reste libre dans le cytoplasme. Cette hypothèse est renforcée par le fait que la technique de préparation des échantillons ne permet de mesurer que le taux d'acides gras membranaires.

La différence dans le taux d'oxydation endogène protéique peut s'expliquer par un effet compétiteur, aussi bien dans le cytoplasme que dans les membranes, des acides gras additionnels libres ou membranaires, pour les radicaux libres endogènes qui sont principalement produits par les mitochondries.

➤ Après irradiation, les épidermes reconstruits avec des kératinocytes supplémentés avec des PUFA et les épidermes reconstruits avec des mélanocytes, non supplémentés, se comportent différemment notamment vis-à-vis de la formation des SBC (liées à l'accumulation des lésions de l'ADN). En effet les SBC sont moins nombreuses dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes.

Cette différence est probablement liée :

- à la localisation des PUFA au sein de l'épiderme.

En effet, ils sont localisés dans toutes les couches des épidermes reconstruits avec des kératinocytes supplémentés alors que seuls les mélanocytes et les kératinocytes basaux et suprabasaux ayant reçu des mélanosomes sont enrichis dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes. Hattori et al. (1996) ont observé que la formation de 8-oxodG, après irradiation UVB, est en partie régulée par la peroxydation lipidique. De plus, les radicaux libres induisent l'apoptose (Mates et al., 2000; Miyachi et al., 1983) mais le rôle de la 8oxodG dans l'apoptose est controversé (Douki et al., 1999; Stewart et al., 1999).

- à l'absence de mélanine.

La mélanine diminue le nombre de CPD (Kobayashi et al., 1998) et de 8-oxodG dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes. En effet, l'intensité du marquage de la 8-oxodG dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes n'est pas corrélée au taux de lipoperoxydation alors que l'intensité du marquage et le nombre de cellules marquées sont corrélées au taux de lipoperoxydation dans les épidermes reconstruits avec des kératinocytes supplémentés avec des acides gras polyinsaturés.

Les acides gras mélanocytaires seraient responsables des oxydations lipidiques et protéiques observées dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes.

La mélanine, quant-à elle, protégerait l'ADN aussi bien des effets directs que des oxydations.

Dans les conditions basales (sans irradiation) le mélanocyte peut donc être assimilé à un complexe d'acides gras ce qui n'est pas le cas après irradiation.

Dans les conditions de stress UV, le mélanocyte peut donc être considéré comme un complexe PUFA-mélanine.

4.6 Article : Influence of Polyunsaturated Fatty acids concentration on Basal Epidermal Status And in Epidermal Responses to UV : Comparative study on Non-Irradiated and Irradiated Reconstructed Epidermis with or without Melanocytes supplemented or not with PUFA

5 L'épiderme reconstruit est-il un bon modèle pour étudier les molécules photoprotectrices topiques et systémiques

5.1 But de l'étude

Le développement d'un modèle d'expérimentation, le plus proche possible de la peau humaine est nécessaire afin de permettre de tester les photoprotecteurs en alternative à l'expérimentation animale.

Les effets des UVA, UVB et UVA+B sur les épidermes reconstruits étant extrapolables à l'épiderme *in vivo*, le test de molécules anti-solaires d'effets connus en application topique ou systémique est la dernière étape permettant de valider complètement le modèle d'épiderme reconstruit en photoprotection.

5.2 Méthodologie générale

Des épidermes ont été reconstruits avec des cellules provenant de donneurs de phototype II/III selon la technique de Pruniéras et al. (1979).

Au bout de 8 jours à l'interface air/liquide, les épidermes ont été soit :

➤ placés 20 minutes avant irradiation dans une solution alcoolique contenant soit :

0,5 à 2 % d' α -tocophérol

2 ou 5 % d'acide ascorbique

0,5 % d' α -tocophérol + 2 % d'acide ascorbique

2 % d' α -tocophérol + 5 % d'acide ascorbique

➤ traités en topique avec des crèmes antisolaires de SPF 12, fournies par les laboratoires Pierre Fabre, à raison de 2 mg.cm⁻².

Les crèmes se répartissent comme tel :

un **témoin** qui correspond à l'excipient

un **anti-UVB** qui est composé de l'excipient + cinnamate

un **anti-UVA/B** avec un **écran minéral** composé de :

l'excipient + cinnamate + TiO₂ + **2 % ZnO**

un **anti-UVA/B** avec un **filtre chimique** composé de :

l'excipient + cinnamate + TiO₂ + **2 % butylmethoxy-dibenzoylméthane**

Les épidermes ont ensuite été irradiés avec une dose de 0,15 J.cm⁻² d'UVB ou de 8 J.cm⁻² d'UVA ou avec une combinaison des deux.

Trois types de témoins ont été réalisés : non traités-non irradiés ; traités-non irradiés ; non traités-irradiés.

Les analyses ont été réalisées 24 heures après irradiation.

Les CPD ont été mis en évidence par immunohistochimie.

Les SBC ont été mises en évidence par coloration à l'hématoxyline-éosine.

Les protéines oxydées ont été mises en évidence par révélation des groupements carbonyles grâce à leur réaction avec la 2,4 dinitrophénylhydrazine.

L'oxydation des lipides membranaires, le taux de vitamine E et les activités superoxydase et catalase ont été réalisées, en Italie, par le groupe du Dr Picardo.

5.3 Principaux résultats

➤ Les crèmes solaires protègent efficacement de la formation des « sunburn cells » et des CPD, notamment celle contenant le filtre chimique. Elles sont peu efficaces pour protéger des oxydations protéiques et lipidiques et de la déplétion en antioxydants. L'anti-UVB seul est moins efficace que les formulations anti-UVA/B.

➤ Les antioxydants (vitamine E et C) protègent efficacement de la formation des « sunburn cells » quelle que soit leur concentration. Par contre les antioxydants n'ont aucun effet protecteur vis-à-vis des CPD. A faible concentration, l' α -tocophérol protège de l'oxydation protéique, par contre, à forte concentration, il a plutôt un rôle pro-oxydant sauf s'il est combiné avec de l'acide ascorbique.

5.4 Résultats complémentaires

Les antioxydants, quelle que soit leur concentration, ne semblent pas inhiber ou augmenter de façon très significative la formation des 8-oxodG.

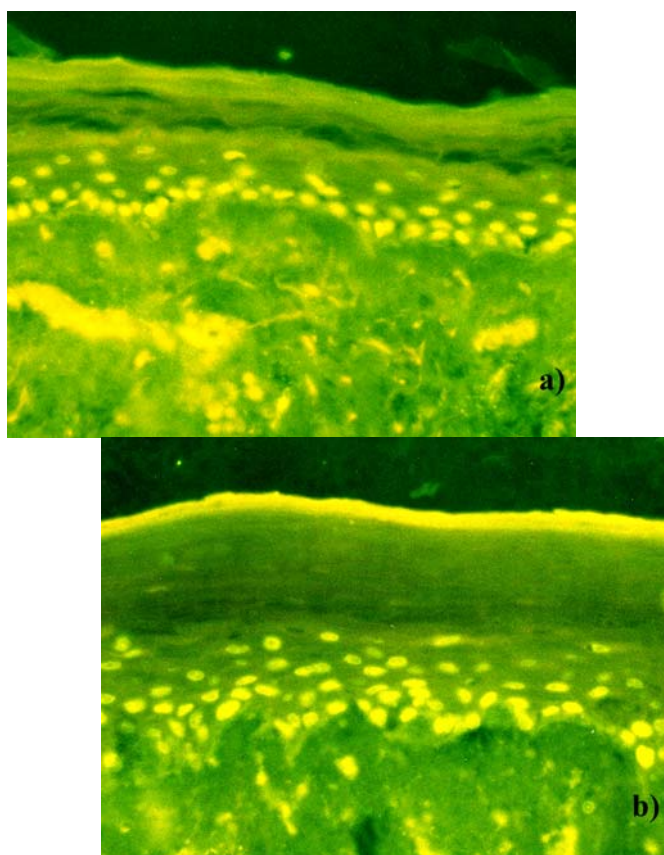


Figure 31 : Détection des 8-oxodG dans des épidermes reconstruits avec des kératinocytes, 2 heures après irradiation UVB a) témoin, b) traité avec 2 % d' α -tocophérol. (x 40)

5.5 Conclusions

Le modèle d'épiderme reconstruit permet l'étude de molécules photoprotectrices systémiques et de molécules à application topique. Cependant, il est plus adapté pour l'étude systémique puisque l'application de 1 mg (dose 2 mg.cm^{-2}) de crème de façon uniforme et en milieu stérile sur des épidermes de $0,5 \text{ cm}^2$ est relativement délicate.

De ce fait l'efficacité des crèmes peut être sous-estimée dans les analyses réalisées sur extraits (oxydation des protéines, activité enzymatique, lipoperoxydation) car la qualité de l'application n'est pas vérifiable.

Cette étude démontre l'importance des radicaux libres dans l'induction des SBC, puisqu'en présence d'antioxydants, les SBC sont absentes alors que le nombre de cellules contenant des CPD est aussi important que dans les épidermes non traités. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus lors de la supplémentation en acides gras des épidermes reconstruits puisque l'augmentation de la concentration en acide gras induit une augmentation des SBC sans augmenter le nombre de cellules contenant des CPD.

L'observation de l'effet des molécules anti-solaires révèle qu'elles protègent de l'apoptose sans protéger totalement l'ADN. L'utilisation de molécules anti-solaires, en empêchant l'apoptose, pourrait donc favoriser le développement de cancers cutanés comme le suggère certaines études épidémiologiques (Weinstock, 1999, revue).

Au vu de ces résultats il semble important d'associer des antioxydants aux filtres chimiques et écrans minéraux pour assurer la meilleure protection possible.

5.6 Article : Epidermal Reconstructs : A new tool to study topical and systemic photoprotective molecules



**CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES**

1- Conclusions

Les résultats obtenus permettent de confirmer l'intérêt du modèle d'épiderme reconstruit :

pour l'étude des relations inter-cellulaires

pour le test de molécules actives photoprotectrices

pour l'étude de régimes alimentaires

Nos travaux sur le modèle d'épiderme reconstruit soulignent le bien-fondé de l'extrapolation des résultats obtenus à l'épiderme in vivo, ce qui est en accord avec les conclusions de Boelsma et al. (2000).

➤ Les points suivants ont été confirmés:

Les UV induisent une diminution de l'activité catalase.

Les UV induisent une faible diminution de l'activité SOD.

Les UV induisent une déplétion en vitamine E.

Les UV induisent l'oxydation des protéines, de l'ADN et des lipides.

Les UVB induisent plus efficacement la formation de radicaux libres que les UVA.

Les UVB induisent des lésions directes de l'ADN.

L'induction des 6-4 PP et des CPD augmente avec la dose d'UVB.

Les CPD sont induits par des doses d'UVB plus faibles que celles induisant des 6-4PP.

Les 6-4PP sont réparés plus rapidement que les CPD.

Les radicaux libres n'induisent pas la formation de CPD.

Les radicaux libres induisent la formation de SBC.

La lipoperoxydation induit des 8oxodG.

Les 8oxodG sont réparés très rapidement.

Les formulations (cinnamate + oxyde de titane + oxyde de zinc) et (cinnamate + oxyde de titane + butylmethoxydibenzoylméthane) préviennent l'induction des CPD, des SBC et de l'hyperplasie épidermique.

➤ **Nous n'avons pas confirmé que les UVA induisent des CPD**

➤ **Nous avons confirmé l'importance de la composition de l'alimentation en acides gras dans la réponse au stress oxydatif.** En effet, les lésions induites par le stress oxydatif augmentent avec l'enrichissement de l'alimentation en acides gras polyinsaturés.

➤ **Nous avons mis en évidence :**

➤ l'importance du respect de l'équilibre métabolique dans les suppléments. En effet la supplémentation avec 2 % d' α -tocophérol seul induit un stress oxydatif, alors que combiné à 5 % d'acide ascorbique (qui permet la réduction biochimique de l' α -tocophérol), il protège du stress oxydatif.

➤ l'importance du spectre incident. En effet, les UVA ont un effet protecteur vis à vis de l'induction par les UVB des CPD et des SBC.

➤ **Nous avons mis en évidence, au sein de l'unité épidermique de mélanisation, un équilibre « *genèse ROS* \Leftrightarrow *détoxication ROS* »**

➤ la présence de mélanocytes amplifie la lipoperoxydation et l'oxydation protéique mais permet un maintien du rapport SOD/Cat d'où une moindre accumulation de peroxyde d'hydrogène.

➤ la formation de 8-oxodG dans la couche basale épidermique est moins importante que ne le laisse supposer les taux d'oxydation lipidique et protéique.

⇒ **Ces données suggèrent que la mélanine ou ses précurseurs protègent l'ADN par neutralisation des radicaux libres.**

➤ **Hypothèse concernant le rôle de la mélanine**

Les résultats rapportés dans la littérature sur le rôle des mélanines (eu et phéo), de leurs précurseurs et de leurs produits de dégradation, obtenus à partir de mélanocytes en culture, cellules mélanomateuses, mélanines synthétiques et mélanines naturelles, sont contradictoires.

Les conditions expérimentales (concentration en fer, pH, stress oxydatif), variables selon les études, expliquent en partie cette contradiction (*cf. p.45*).

Les études avec de la mélanine synthétique ou naturelle montrent que, selon les conditions, celle-ci peut être anti- ou pro-oxydante.

Les études sur cellules, qui tiennent compte de toutes les molécules impliquées dans la mélanogénèse, et qui pourraient mettre en évidence un effet global de ces molécules ne tiennent pas compte de la concentration en acides gras polyinsaturés des membranes mélanocytaires. Celles-ci sont également des cibles et des générateurs de radicaux libres. Ceci peut introduire un biais dans les expériences, notamment celles comparant les cellules provenant de phototypes variés, puisque la concentration en acide linoléique est inversement corrélée avec le phototype (Bessou-Touya et al., 1998).

La comparaison des épidermes reconstruits avec des kératinocytes supplémentés en acide gras et des épidermes reconstruits avec des mélanocytes suggère qu'**au sein de l'unité épidermique de mélanisation caucasoïde, la mélanine et ses précurseurs ont un rôle globalement antioxydant après irradiation UVB, UVA et UVA+B.**

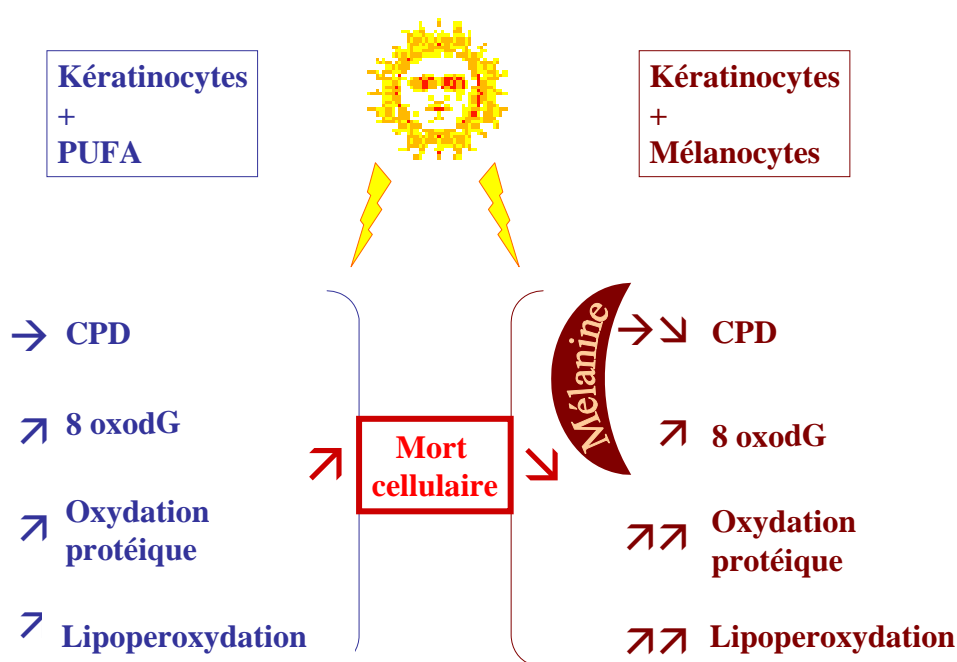


Figure 32 : Représentation schématique de l'effet des acides gras et de la mélanine dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes et les épidermes reconstruits avec des kératinocytes supplémentés en acides gras insaturés par comparaison avec les épidermes reconstruits avec des kératinocytes

➤ **En conclusion ces travaux ont permis de confirmer que le mélanocyte caucasoïde au sein de l'épiderme a un rôle photoprotecteur**

➤ La présence de mélanocytes entraîne une diminution de l'apoptose, probablement via la mélanine, qui par absorption des UV, semble diminuer le nombre de lésions de l'ADN aussi bien des kératinocytes que des mélanocytes.

Ce rôle photoprotecteur de la mélanine envers les 6-4PP et CPD dans l'épiderme in situ a déjà été démontré (Kobayashi et al., 1998).

➤ Vis-à-vis des radicaux libres, la mélanine aurait un rôle réellement protecteur dans les kératinocytes. Dans les mélanocytes, du fait de la forte concentration en acides gras polyinsaturés qui, après oxydation, peuvent générer des radicaux libres (*cf. p. 41*), elle ne pourrait que limiter leur effet.

➤ **La protection anti-apoptotique offerte par le mélanocyte ou l'application d'anti-solaires est-elle bénéfique ou non ? Permet-elle de prévenir l'induction des cancers ?**

Si l'on accepte l'hypothèse que l'apoptose n'est induite qu'à partir d'un certain seuil de lésions de l'ADN et que l'apoptose prévient la formation de cellules pré-cancéreuses (Owen-Schaub et al., ICP 2000; Ananthaswamy et al., 1999), une diminution du nombre de lésions juste en dessous du seuil peut être considérée comme un facteur favorisant la survenue de mutations.

Les écrans solaires et la mélanine qui permettent un abaissement du nombre de lésions pourraient donc être considérés comme des facteurs favorisant la survenue de tumeurs.

On peut supposer que le nombre moindre de carcinomes chez les individus négroïdes provient de la protection plus efficace de l'eumélanine. Cette dernière limite l'induction de ces lésions, car elle est répartie dans toutes les couches de l'épiderme (stratum corneum inclus) permettant par absorption, de diminuer la quantité d'UV arrivant aux couches épineuse et basale. Elle permet également une détoxification efficace des radicaux libres.

Par contre, on peut supposer que chez les individus caucasoïdes, du fait d'une moins grande quantité de mélanine et d'une absence de mélanine dans le stratum corneum, cette protection est moins importante. Le nombre de lésions de l'ADN après une faible exposition, chez les individus caucasoïdes, pourrait être très peu inférieur au seuil induisant l'apoptose. La répétition de faibles irradiations se traduirait par l'accumulation de mutations (*cf. p.63*) ce qui expliquerait le nombre important de carcinomes chez les individus caucasoïdes. Par contre, le nombre de lésions après un coup de soleil serait suffisamment important pour induire l'apoptose des kératinocytes. Les carcinomes seraient donc liés à de faibles irradiations chroniques.

Le mélanocyte aurait un rôle « préventif de carcinomes » chez les individus de type négroïde alors qu'il serait « initiateur de carcinomes » chez les individus caucasoïdes et celtiques. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les albinos développent des carcinomes cutanés.

Cette supposition permet également d'expliquer que le rapport mélanome / carcinome est plus élevé chez les individus noirs du fait d'un moindre nombre de carcinomes.

Les patients atteints de vitiligo, quant à eux, ne développent que très rarement des cancers cutanés. Au vu de nos résultats, cette absence de tumeurs ne semble pas liée à l'absence de mélanine. Les patients atteints de vitiligo présentent un déficit de l'activité catalasique (Schallreuter et al., 1991), ils sont donc plus sensibles au stress oxydatif. Ces cellules vitiligineuses, après exposition, accumuleraient peut-être de ce fait plus de lésions de l'ADN et donc le programme d'apoptose serait induit.

De plus les zones dépigmentées ne se situent pas forcément dans des zones fortement exposées, l'absence de tumeurs dans ces zones pourrait donc être également due à une non-exposition.

Précédemment l'efficacité des écrans solaires était mesurée par la prévention de l'érythème (coup de soleil). Les écrans solaires étaient donc, classifiés en fonction du SPF qui est établi en tenant compte de la dose minimale érythémateuse. La mise en cause des lésions de l'ADN UV-induites en tant que lésions prémutagéniques a conduit à tester l'efficacité des écrans solaires en terme de protection de l'ADN et a permis l'introduction d'un terme spécifique **DPF** (DNA protection factor).

2- Perspectives

➤ Confirmation du rôle antioxydant de la mélanine au sein de l'unité épidermique de mélanisation

En principe, le rôle antioxydant de la mélanine au sein de l'unité épidermique de mélanisation pourrait être confirmé par un modèle d'épiderme reconstruit avec des cellules basales dont on

ferait varier indépendamment le taux d'acides gras polyinsaturés (cibles des radicaux libres et générateur de radicaux libres) et/ou le taux et le type de mélanine.

Toutefois, la comparaison de reconstructions chimériques utilisant des kératinocytes de même origine et des mélanocytes de phototypes différents ne permettrait pas de mieux apprécier l'interaction mélanine-acides gras polyinsaturés. En effet, l'étude d'épidermes reconstruits de phototypes variés a révélé que la concentration en acide linoléique dans l'épiderme est corrélée négativement avec son phototype (Bessou-Touya et al., 1998). En conséquence, plus les épidermes contiennent de mélanine moins ils possèdent d'acides gras insaturés membranaires.

De ce fait, la seule solution pour évaluer le rôle de la mélanine vis-à-vis des radicaux libres serait de modifier les conditions de culture des mélanocytes avant la reconstruction :

➤ soit en augmentant la concentration en acide arachidonique ou docosahexaénoïque pour faire varier la concentration en acide gras sans affecter la mélanogénèse basale. L'acide linoléique ne peut pas être utilisé car il inhibe la production UVB-induite de la mélanine dans des cellules de mélanome (Ando et al., 1998).

➤ soit en faisant varier la concentration en cystéine, α -MSH, phosphotyrosine du milieu de culture pour modifier la synthèse de mélanine sans faire varier le profil en acides gras.

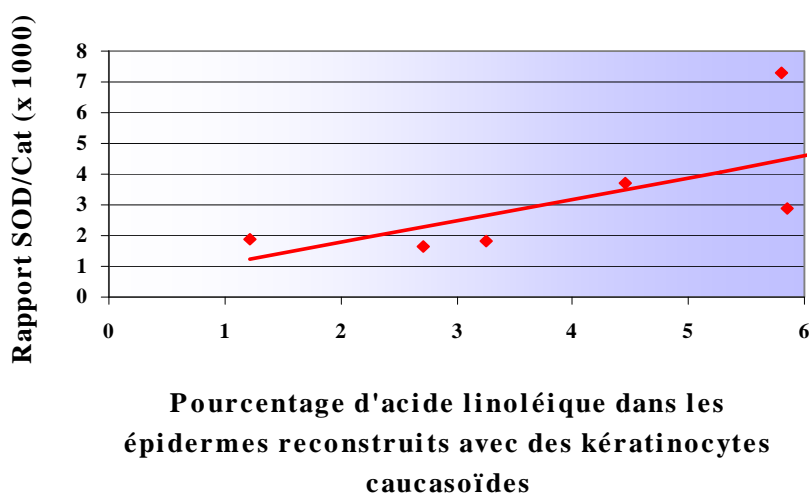
➤ **Prévention du stress oxydatif**

Les individus de faible phototype possèdent un rapport SOD/Cat et un taux d'acides linoléiques plus élevés que les individus de haut phototype. De ce fait les individus de faible phototype sont beaucoup plus sensibles au stress oxydatif que les individus de phototype élevé. On peut supposer que le faible taux d'acides gras insaturés et le faible rapport SOD/Cat dans les phototypes élevés, résultent d'une adaptation de la peau au stress UV important sous leurs latitudes d'origine. Ce faible rapport SOD/Cat peut également être du à l'activité catalase liée à la TRP-1 (Halaban et Moellmann, 1990)

Dans les reconstructions avec des kératinocytes de phototype II/III, le taux d'acide linoléique est hétérogène. Une corrélation positive peut être observée entre le rapport SOD/Cat et le pourcentage d'acide linoléique. (*cf.*

*Graph 2 : Corrélation entre le pourcentage d'acide linoléique et le rapport SOD/Cat dans des épidermes reconstruits uniquement avec des **kératinocytes**, p. 207).* Au sein d'un même phototype, tous les individus ne sont pas équivalents face au stress oxydant.

Cette corrélation n'est pas observée en présence de mélanocytes ou lors de la supplémentation des épidermes reconstruits avec des acides gras polyinsaturés. Le régime alimentaire n'expliquerait donc pas cette différence interindividuelle.



Graph 2 : Corrélation entre le pourcentage d'acide linoléique et le rapport SOD/Cat dans des épidermes reconstruits uniquement avec des kératinocytes

Face au stress oxydant, il existe non seulement une inégalité ethnique mais également une inégalité interindividuelle.

La prévention des cancers cutanés chez les sujets de type caucasoïdes ou celtiques vivant dans des pays pour lesquels ils ne sont pas adaptés, par exemple la population australienne d'origine celtique, pourrait en partie être réalisée par un rééquilibrage des défenses antioxydantes.

L'application topique de SOD ou de catalase dans des crèmes ou la supplémentation orale sont difficilement envisageables d'une part du fait qu'il s'agit d'enzymes (pénétration, stabilité, dégradation, dénaturation) et d'autre part du fait de la contrainte liée à ce type de méthodes (quantité, fréquence).

Notre laboratoire envisage le développement d'un épiderme génétiquement modifié par transduction des kératinocytes primaires par un vecteur rétroviral contenant l'ADNc codant pour la SOD et/ou la catalase.

En parallèle un changement du régime alimentaire lipidique pourrait diminuer le stress oxydatif (diminution de l'apport d'acides gras polyinsaturés).


Cependant, la transduction de la SOD et de la catalase ne permettra de protéger que des lésions oxydatives de l'ADN comme la 8-oxodG mais pas de la formation des CPD et des 6-4 PP. Pour prévenir ces lésions prémutagéniques (CPD, 6-4PP), il faudrait, de préférence, envisager de stimuler la production de la mélanine et plus particulièrement d'eumélanine par transfert de l'ADNc de la tyrosinase ou des TRP-1 et 2.

Une autre voie envisageable serait la stimulation de la réparation de l'ADN qui pourrait être réalisée par transduction des kératinocytes par un vecteur contenant les ADNc de photolyase puisque ces enzymes agissent beaucoup plus rapidement que celles impliquées dans la réparation par excision de nucléotides ou de bases.

➤ **Autres voies envisageables de protection de la peau**

L'élucidation du mode de transfert des mélanosomes ainsi que du processus de dégradation et d'élimination de la mélanine dans les kératinocytes pourrait permettre de développer de nouvelles voies de protection.

En effet, la mélanine n'est présente que dans la basale et l'épineuse pour les Celtes, la basale, l'épineuse et la granuleuse pour les caucasoïdes mais par contre elle est présente dans toutes les couches épidermiques pour les négroïdes. Cette localisation traduit sûrement une adaptation évolutive de la peau au climat. Si nous pouvions sur un épiderme reconstruit caucasoïde ou celte induire une distribution de la mélanine jusque dans le stratum corneum le nombre de lésions de l'ADN serait probablement diminué, et la réparation serait peut-être stimulée (PCNA, cf. p.48).



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Abdel-Malek Z, Swope V, Akkcali C, Harriger MD, Boyce ST, Urabe K and Hearing VJ: The mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocyte by melanotropic peptides human melanocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* J 1994a

Abdel-Malek Z, Swope V, Collins C, Boissy R, Zhao H and Nordlund J: Contribution of melanogenic proteins to the heterogeneous pigmentation of human melanocytes. *J Cell Sci* 106 : 1323-1331, 1993

Abdel-Malek Z, Swope V, Smalara D, Babcock G, Dawes S and Nordlund J : Analysis of the UV-induced melanogenesis and growth arrest of human melanocytes. *Pig Cell Res* 7 : 326-332, 1994b

Abdel-Malek ZA : Endocrine factors as effectors of integumental pigmentation . *Dermologic clinics* vol 6, J Nordlund (ed) Philadelphia : WB Saunders pp 175-183, 1988

Abdel-Malek ZA, Ross R, Pije JW, Trinkle L, Swope V and Nordlund JJ : Hormonal effects of vitamine D3 on epidermal melanocytes. *J Cell Physiol* 136 : 273-280, 1988

Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, Zbinden I and Cerrutti P : The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* 30 : 9305-9313, 1991

Ananthaswamy HN, Ouhtit A, Evans RL, Gorny A, Khaskina P, Sands AT and Conti CJ : Persistence of p53 mutations and resistance of keratinocytes to apoptosis are associated with the increased susceptibility of mice lacking the XPC gene to UV carcinogenesis. *Oncogene* 18 : 7395-7398, 1999

Ando H, Ryu A, Hashimoto A, Oka M and Ichihashi M. Linoleic acid and alpha-linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. *Arch Dermatol Res* 290 :375-81, 1998

Applegate LA, Scaletta C, Panizzon R, Frenk E, Hohfeld P and Schwarzkopf S : Induction of the putative protective protein ferritin by infrared radiation : implication in skin repair. *Int J Mol Med*, 5 : 247-251, 2000

Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wikles G, Poppelmann B, Luger TA and Schwarz t : Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* 140: 171-182, 1998

Araki K, Nagano T, Ueda M, Washio F, Watanabe S, Yamaguchi N and Ichihashi M: Incidence of skin cancers and precancerous lesions in Japanese--risk factors and prevention. *J Epidemiol.* 9 : S14-21,1999

Archambault M, Yaar M and Gilchrist BA: Kératinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol*, 104 : 859-867, 1995

Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M, Tada M, Fujii S and Taniguchi N :

Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem* 270:21035-9, 1995

Atilasoy EC, Seykora JT, Soballe PW, Elenbistas R, Nesbit M, Emlender DE, Montone KT, Sauter E and Herlyn B : UVB induces atypical melanocytic lesions and melanoma in human skin. *Am J Pathol* 152 : 1179-1186, 1998

Augustin C, Collombel C and Damour O : Measurements of the protective effect of topically applied sunscreens using in-vitro three-dimensional dermal and skin equivalents. *Photochem Photobiol* 66 : 853-859, 1997

Autier P : Do high factor sunscreens offer protection from melanoma? *West J Med* 173 :58, 2000

Autier P, Dore JF, Schiffllers E, Cesarini JP, Bollaerts A, Koelmel KF, Gefeller O, Liabeuf A, Lejeune F, Lienard D, et al : Melanoma and use of sunscreens: an EORTC case-control study in Germany, Belgium and France. The EORTC Melanoma Cooperative Group. *Int J Cancer* 61 :749-55, 1995

Avula CP and Fernandes G : Modulation of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in murine salivary gland by dietary fatty acid ethyl esters. *Life Sci* 65 : 2373-2383, 1999

-B-

Baichwal VR, Baeuerle PA : Activate NF-kappa B or die ? *Curr Biol* 7: R94-6, 1997

Barker D, Dixon K, Medrano EE, Smalara D, Im S, Mitchek D, Babcock G and Abdel-Malek ZA : Comparison of the response of human melanocytes with different melanin contents to ultraviolet B radiation. *Cancer Res* 55 : 4041-4046, 1995

Basu-Modak S and Tyrrell R : Singlet oxygen : a primary effector in the ultraviolet A/near visible light induction of the human heme oxygenase gene. *Cancer Res* 53 : 4505-4510, 1993

Baudouin C, Javard I, Ceruti I, Ginestar J, Charveron M and Gall Y: Evaluation de l'efficacité photoprotectrice d'un nouvel écran organo-minéral : Analyse de la lipoperoxydation, de l'endommagement de l'ADN et de l'oxydation des protéines. *CARD*, 2000

Bayerl C, Taake S, Moll I and Jung EG : Characterisation of sunburn cells after exposure to ultraviolet light. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 11: 149-154, 1995

Bech-Thomsen N, Poulsen T, Christensen FG, Lundgren K and Wulf HC : Near-visible-UV radiation delays UVB tumorigenesis. *J Photochem Photobiol* 22 : 119-123, 1994

Beitner H, Norell SE, Ringborg U, Wennersten G and Mattson B. Malignant melanoma: aetiological importance of individual pigmentation and sun exposure. *Br J Dermatol* 122:43-51, 1990

Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Chamson A, Asselineau D, Dubertret L, Coulomb B, Lapierre C, Nusgens B and Neveux Y : The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol* 81 : 2s-10s, 1983

Berg RJ, Rebel H, Van Kranen HJ, Van Volten WA and De Gruijl FR : UV-induced “P53 Patches” and skin carcinoma in hairless P53^{-/-}-knockout mice, *International Congress of Photobiology*, 2000

Berlett BS and Stadman ER: Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J Biol Chem* 272 : 20313-20316, 1997

Berne B and Fischer T : Protective effects of various types of clothes against UV radiation. *Acta Dermatol Venereol* 60 : 459-460, 1980

Berne B and Fischer T : Protective effects of various types of clothes against UV radiation. *Acta Derm Venereol.* 60:459-60, 1980

Bernerd F and Asselineau D : Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in vitro. *Dev Biol* 183 : 123-138, 1997

Bernerd F, Asselineau D, Boudjar B, Sarasin A and Magnaldo T : Reconstruction of xeroderma pigmentosum in vitro : a new approach to study genetic hypersensitivity to UV light, *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Bernerd F, Sarasin A and Magnaldo T : Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn kératinocytes. *Proc Natl A S* 96 : 11329-11334, 1999

Bernerd F, Vioux C and Asselineau D : Evaluation of the protective effect of sunscreens on in vitro reconstructed human skin exposed to UVB or UVA irradiation. *Photochem Photobiol* 71 : 314-320, 2000

Bernstein EF, Brown DB, Takeuchi T, Kong SK and Uitto J : Evaluation of sunscreens with various sun protection factors in a new transgenic mouse model of cutaneous photoaging that measures elastin promoter activation. *J Am Acad Dermatol* 37 : 725-729, 1997

Berthier-Vergnes O, B echetoille N, Guacherand M and Schmitt D : Modèles expérimentaux d’étude de la m etastase du mélanome malin. Nouveau modèle appliqu e au mélanome cutan e humain in *Biologie de la peau humaine* Schmitt D (ed) 343-365, 2000

Berton TR, Conti CJ, Mitchell DL, Aldaz CM, Lubet RA and Fisher SM : The effect of α -tocopherol acetate on ultraviolet-induced mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 23 : 175-184, 1998

Bessou S : Epiderme reconstitu e ex-vivo avec des melanocytes : validation d’un nouveau modèle d’étude de la pigmentation. *Thèse de doctorat*, 1997

Bessou S, Gauthier Y, Surleve-Bazeille JE, Pain C and Taieb A : Epidermal reconstructs in vitiligo: an extrinsic factor is needed to trigger the disease. *Br J Dermatol* 137:890-7, 1997b

- Bessou S, Pain C, and Taieb A : Use of human skin reconstructs in the study of pigment modifiers. *Arch Dermatol* 133:331-6, 1997a
- Bessou S, Surleve-Bazeille JE, Pain C, Donatien P, and Taieb A : Ex vivo study of skin phototypes. *J Invest Dermatol* 107:684-8, 1996
- Bessou S, Surlève-Bazeille JE, Sorbier E and Taïeb A : Ex vivo reconstruction of the epidermis with melanocytes and the influence of UVB. *Pig Cell Res* 8 : 241-249, 1995
- Bessou-Touya S, Morichon F, Surleve-Bazeille JE, Bioulac-Sage P, Pain C and Taieb A: An ex vivo study of congenital pigmented nevi in epidermal reconstructs. *Pigment Cell Res* 12:164-74, 1999
- Bessou-Touya S, Picardo M, Maresca V, Surlève-Bazeille JE, Pain C and Taïeb A : Chimeric human epidermal reconstructs to study the role of melanocytes and keratinocytes in pigmentation and photoprotection. *J Invest Dermatol* 111 : 1103-1108, 1998
- Bigby M : The sunscreen and melanoma controversy. *Arch Dermatol*.135:1526-7.1999
- Bissett DL and Mc Bride JF: Synergistic topical photoprotection by a combination of the iron chelator 2-furildioxime and sunscreen. *J Am acad Dermatol* 35 : 546-549, 1996
- Black AF, Auger FA and Damour O : Du substrat dermique à la peau reconstruite endothélialisée. In *Biologie de la peau humaine*, INSERM Schmitt D (ed), 367-392, 2000
- Black AKN, Fincham N, Greaves MW and Hensby CN : Time course changes in levels of arachidonic acid and prostaglandins D₂ E₂ F_{2α} in human skin following UltravioletB irradiation. *Br J Clin Pharmacol* 10 : 453-457, 1980
- Boelsma E, Gibbs S, Faller C and Ponc M : Characterization and comparison of reconstructed skin models : morphological and immunohistochemical evaluation. *Acta Derm Venereol* 80 : 82-88, 2000
- Borchers AH, Steinbauer H, Schafer BS, Kramer M, Bowden GT and Fusenig NE : Fibroblast-directed expression and localization of 92-kDa type IV collagenase along the tumor-stroma interface in an in vitro three-dimensional model of human squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 19 : 258-266, 1997
- Bose B, Agarwal S and Chatterjee : Membrane lipid peroxidation by UVA : Mechanism and implications. *Biotechnology and applied Biochemistry* 12 : 557-561, 1990
- Bose B, Agarwal S and Chatterjee SN : UV-A induced lipid peroxidation in liposomal membrane. *Radiat Environ Biophys* 28 : 59-65, 1989
- Boulikas T : Xeroderma pigmentosum and molecular cloning of DNA repair genes. *Anticancer Res* 16 : 693-708, 1996
- Brash DE, Rudolph JA, Simon JA et al: A role for sunlight in skin cancer : UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 10124-10128, 1991
- Brenneisen P, Wenk J, Wlaschek M, Blaudschun R and Scharffetter-Kochanek K : A newly adapted pulsed-field gel electrophoresis technique allows to detect distinct types of DNA

damage at low frequencies in human dermal fibroblasts upon exposure to non-toxic H₂O₂ concentrations. *Free Radic Research* 31 : 405-418, 1999

Brodthagen, H : Interaction of UVA and UVB in photocarcinogenesis. In *The biological effects of UVA radiation*. Urbach F and Gange RW (eds), Praeger, Westport, CT pp137-146, 1986

Bruch-Gerharz D, Ruzicka T and Kolb-Bachofen V : Nitric oxide in human skin: Current status and future prospects. *J Invest Dermatol* 110 : 1-7, 1998

Bruls WAG, Slaper H, Van der Leun JC and Berrens L : Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem Photobiol* 40 :485-494, 1984

Buendia B, Santa-Maria A and Courvalin JC : Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112 : 1743-1753, 1999

Buettner GR, Schafer FQ, Wang HP, Kelley EE and Qian SY : Antioxidants and their networks of protection. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Burchill SA, Marks JM and Thody AJ : Tyrosinase synthesis in different skin types and the effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone and cyclic AMP. *J Invest Dermatol* 95 : 558-561, 1990

Burchill SA, Thody AJ and Ito S : Melanocyte stimulating hormone, tyrosinase activity and the regulation of eumelanogenesis and pheomelanogenesis in the hair follicular melanocytes of the mouse. *J Endocrinol* 109 : 236-240, 1986

-C-

Carsberg CJ, Ohanian J and Friedmann PS : Ultraviolet radiation stimulates a biphasic pattern of 1,2 diacylglycerol formation in cultured human melanocytes and keratinocytes by activation of phospholipases C and D. *Biochem J* 305 : 471-477, 1995

Cha MK and Kim IH : Thioredoxine-linked "thiol peroxidase" from human red blood cell : evidence for the existence of thioredoxine and thioredoxine reductase in human red blood cell. *Biochem Biophys Res Com*, 217 : 900-907, 1995

Chakrabarty KH, Dawson RA, Harris P, Layton C, Babu M, Gould L, Phillips J, Leigh I, Green C, Freedlander E and Mac Neil S: Development of autologous human dermal-epidermal composites based on sterilized human allodermis for clinical use. *Br J Dermatol* 141 : 811-23, 1999

Cheeseman KH: Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec Aspects Med* 14 : 191-197, 1993

Chen W, Barthelman M, Martinez J, Alberts D and Gensler HL : Inhibition of cyclobutane pyrimidine dimer formation in epidermal p53 gene of UV-irradiated mice by alpha-tocopherol. *Nutr Cancer* 29 : 205-211, 1997

Christophers AJ : Melanoma is not caused by sunlight. *Mutat Res* 422: 113-117, 1998

Cieszka K, Hill HZ, Xin P, Azure M, Hill GJ, Meyenhofer MF, Boissy RE and Mitchell DL: Survival of Cloudman mouse melanoma cells after irradiation by solar wavelengths of light. *Pig Cell Res* 10:193-200, 1997

Cohen C, Roguet R, Cottin M, Grandidier E, Popovic J, Leclaire J and Rougier A : The use of reconstructed epidermis in the evaluation of protective effect of sunscreens against lipoperoxidation induced by UVA in *Protection of the skin against ultraviolet radiations A Rougier, H Schafer (eds)*189-194, 1998

Collins AR, Ma AG and Duthie SJ : The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 336:69-77, 1995

Costantini C, D'Ischia M, palumbo A and Prota G : Photochemistry of 5-s-cysteinyldopa. *Photochem Photobiol* 60 : 33-37, 1994

Cross T, Griffiths G, Deacon E, Sallis R, Gough M, Watters D and Lord JM : PKC-delta is an apoptotic lamin kinase. *Oncogene* 19 : 2331-2337, 2000

-D-

D'Ambrosio SM, Whetstone JW, Slazinski L and Lowney E : Photorepair of pyrimidine dimers in human skin in vivo. *Photochem Photobiol* 34 : 461-464, 1981

Damour O, Augustin C and Black AF : Applications of reconstructed skin models in pharmaco-toxicological trials. *Med Biol Eng Comput* 36 : 825-832, 1998

Danno K, Hori T and Imamura S : Infrared radiation suppresses ultraviolet B-induced sunburn-cell formation. *Arch Dermatol Res* 284 : 92-94, 1992

Darr D and Fridovith I : Free radical in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 102 : 671-675, 1994

Darr D and Pinnell S: Reactive oxygen species and antioxidant protection in photodermatology In *Sunscreens second edition*, Lowe NJ, Shaath NA and Pathak MA (eds) pp155-171, 1997

Darr D, Dunston S, Faust H and Pinnell S : Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoprotectants. *Act Derm Venereol* 76 : 264-268, 1996

Daugas E, Suzin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC Leber B, Andrews D, Penninger J and Kroemer G : Mitochondrial-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14: 729-739, 2000

Daugasab E, Nochyc D, Ravagnana L, Loefflera M, Suzina SA, Zamzamia N and Kroemera G : Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476 : 118-123, 2000

Davenport V, Morris JF and Chu AC : Immunologic protection afforded by sunscreens in vitro. *J Invest Dermatol* 108:859-63, 1997

Davies KJA : Protein damage and degradation by oxygen radicals : I. General Aspects. *J Biol Chem* 262 : 9895-9901, 1987

Davies KJA, Lin SW and Pacifici RE : Protein damage and degradation by oxygen radicals : Degradation of denatured protein. *J Biol Chem* 262 : 9914-9920, 1987

de Brugerolle de Fraissinette, Picarles V, Chibout S, Kolopp M, Medina J, Burtin P, Ebelin ME, Osborne S, Mayer FK, Spake A, Rosdy M, De Wever B, Ettlin RA and Cordier A : Predictivity of an in vitro model for acute and chronic skin irritation (SkinEthic) applied to the testing of topical vehicles. *Cell Biol and toxicol* 15 : 121-135, 1999

de Fine Olivarius, Wulf HC, Crosby J and Norval M : The suncreening effect of urocanic acid. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 12 : 95-99, 1996

de Gruijl FR and Roza L : Photoreactivation in humans. *J Photochem Photobiol B* 10:367-71. Review, 1991

De Gruijl FR : Action spectrum for photocarcinogenesis. *Recent results in cancer research*. 139: 21-30, 1995

de Laat A, van der Leun JC and de Gruijl FR : Carcinogenesis induced by UVA (365-nm) radiation: the dose-time dependence of tumor formation in hairless mice. *Carcinogenesis*. 18:1013-20, 1997 .

Dean RT, Fu S, Stocker R and Davies MJ : Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 : 1-18, 1997

Dekker SK, van Doorn, Kempenaar J, Gruis NA, Vermeer BJ and Ponc M : Skin equivalent : an attractive model to evaluate early melanoma metastasis. *Melanoma Res* 10 : 127-140, 2000

DeLeo VA, Horlick H, Hanson D, Eisinger M and Harber LC : Ultraviolet radiation induces changes in membrane metabolism of human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 83 : 323-326, 1984

Deliconstantinos G, Vassiliki V and Sravides JC : Release by ultraviolet B radiation of nitric oxide from human keratinocytes : a potential role for nitric oxide in erythema formation . *Br J Pharmacol* 114 : 1257-1265, 1995

Deligné P : Les radicaux libres I- Reduction de l'oxygène et lipoperoxidation membranaire. *Conv Med* 4 : 49-59, 1985a

Deligné P : Les radicaux libres II- Detoxication enzymatique, anti-oxydants et autres dépolluants. *Conv Med* 4 : 145-158, 1985b

Denning MF, Wang Y, Nickoloff BJ and Wrone-Smith T : Protein kinase C delta is activated by a caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of keratinocytes. *J Biol Chem* 273 : 29995-30002, 1998

Di Simplicio P, Cheeseman KH and Slater TF : The reactivity of the SH group of bovine serum albumin with free radicals. *Free Radic Res Commun* 14 : 253-262, 1991

Didier C, Emonet-Piccardi N, Beani JC, Cadet J and Richard MJ: L-arginine increases UVA cytotoxicity in irradiated human keratinocyte cell line: a potential role of nitric oxide. *FASEB J* 13 : 1817-1824, 1999

Dominice-Franchi J : Le mélanocyte humain in vitro moyen d'étude de la pigmentation cutanée en dermocosmétologie. *Thèse de doctorat*, 1999

Donois E : Mise au point, optimisation et évaluation d'une méthode stéréologique d'analyse d'image pour la quantification des mélanines au niveau ultrastructural. *Thèse de doctorat*, 1998

Douki T, Perdiz D, Grof P, Kuluncsics Z, Moustacchi E, Cadet J and Sage E: Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation : Biological role. *Photochem and Photobiol* 70 : 184-190, 1999

Dreher F, Gabard B, Schwindt DA and Maibach HI : Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from ultraviolet-induced erythema : a human study in vivo. *Br J Dermatol* 139 : 332-339, 1998

-E-

Eberlein-Konig B, Placzek M and Przybilla B : Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d- α -tocopherol (vitamin E). *J Am Acad Dermatol* 38 : 45-48, 1998

Elias PM : Dynamics of epidermal barrier : new implications for percutaneous drug delivery, topical therapeutics and disease pathogenesis. *Progress in Dermatology* 2 : 1-8, 1992

Eller MS, Maeda T, Magnoni C, Atwal D and Gilchrest BA : Enhancement of DNA repair in human skin cells by thymine dinucleotides: evidence for a p53-mediated mammalian SOS response. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 : 12627-12632, 1997

Eller MS, Ostrom K and Gilchrest BA : DNA damage enhances melanogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 1087-1092, 1996

Elmets CA, Vargas A and Oresajo C : Photoprotective effects of sunscreens in cosmetics on sunburn and Langherans cell photodamage. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 9 : 113-120, 1992

Emonet-Piccardi N, Richard MJ, Ravanat JL, Signorini N, Cadet J and Beani JC : Protective effects of antioxidants against UVA-induced DNA damage in human skin fibroblasts in culture. *Free Radic Res* 29:307-13, 1998

Epstein JH : Biological effect of sunlight. In *Sunscreens second edition*, Lowe NJ, Shaath NA and Pathak MA (eds) pp 83-100, 1997

Escobar JA, Rubio MA and Lissi EA : SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radic Biol Med* 20 : 285-290, 1996

Esterbauer H, Cheeseman H, Dianzini M, Poli G and Stater T : Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem J* 208 : 129-140, 1982

Esterbauer H, Schur RJ and Zollner H: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malnoaldehydes and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-129, 1991

Eves P, Layton C, F S, Dawson RA, Wagner M, Morandini R, Ghanem G and Mac Neil S : Characterization of an in vitro model of human melanoma invasion based on reconstructed human epidermis. *Br J Dermatol*, 145 : 1-13, 2000

-F-

Faure P and Lafond JL : Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In *Analysis of free radicals in biological systems, Favier et al (eds)* 238-248, 1995

Fehsel K, Kröncke KD, Mayer KL, Wahn VL, Huber H and Kolb-Bachofe V : Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol* 155 : 2858-2865, 1995

Fitzpatrick TB : Ultraviolet-induced pigmentary changes : benefits and hazards. *Curr Probl Derm* 15 : 25-38, 1986

Fitzpatrick TB, Szabo G, Seiji M and Quevedo WC : Biology of the melanin pigmentary system. In *Dermatology in General Medicine, 2nd ed, Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freeberg IW, Austin KF (eds)*, Mc Graw Hill, New York, 131-163, 1979

Ford JM : Regulation of global genomic nucleotide excision repair by p53 transactivated genes. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Forlot P. : Phénomènes pigmentaires. *Parfums, cosmétiques, arômes* 74: 61-68, 1987

Fourtanier A, Cohen C, Guéniche A, Ley R, Moyal D and Seité S : Wich kind of protection a broad absorption UVA sunscreen provide. In *Protection of the skin against ultraviolet radiations, La Roche Posay and L'OREAL (eds)*: 9-12, 1997

Fourtanier A: Mexoryl SX protects against solar-simulated UVR-induced photo-carcinogenesis in mice. *Photochem Photobiol* 64 : 688-693, 1996

Franchi J, Fitoussi R and Redziniak G : A suitable adult human pigmented epidermal construct. A morphological and physiological approach. *Eur J Dermatol* 4 : 632-636, 1994

Fridovich I : Biologic effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 246 : 245-256, 1986

Friedberg EC, Bardwell AJ, Bardwell L, Feaver WJ, Kornberg RD, Svejstrup JQ, Tomkinson AE and Wang Z : Nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 347 :63-8. Review, 1995

Friedmann PS and Gilchrist BA : Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultures human melanocytes. *J Cell Physiol* 133 : 88-94, 1987

Fuchs J : Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotène in cutaneous photoprotection. *Free Radic Biol Med* 25 : 848-873, 1998

Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G and Packer L : Impairment of enzymatic and non enzymatic antioxidants in skin by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 93 : 769-773, 1989a

Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G and Packer L: Acute effects of near ultraviolet and visible light on the cutaneous antioxidant defense system. *Photochem Photobiol* 50 : 729-744, 1989b

Fukuda M, Noriki S, Imamura Y, Miyoshi N, Kimura S, Koizumi K, Suzuki K, Sakurai H and Sakaguchi R : Differential immunohistochemical staining of cancerous cells with anti-single-stranded DNA antiserum in ordinary pathological paraffin section after DNA-denaturation by acid hydrolysis. *Eur J Histochem* 34 : 309-319, 1993

-G-

Garland CF, Garland FC and Gorham ED : Rising trends in melanoma. An hypothesis concerning sunscreen effectiveness. *Ann Epidemiol* 3:103-10. Review, 1993

Geilen CC, Wieder T and Orfanos CE : Ceramide signalling : regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis. *Arch Dermatol Res* 289 : 559-566, 1997

Gensler HL and Magdaleno M: Topical vitamin E inhibition of immunosuppression and tumorigenesis induced by ultraviolet irradiation. *Nutr Canc* 15 : 97-106, 1991

Gibbs PE, Kilbey BJ, Banerjee SK and Lawrence CW : The frequency and accuracy of replication past a thymine-thymine cyclobutane dimer are very different in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175:2607-12, 1993

Gibbs S, Silva Pinto AN, Murli S, Huber M, Hohl D and Ponc M : Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth and differentiation. *Wound Repair Regen* 8 : 192-203, 2000

Gibbs S, Vicanova, Bouwstra J, Valstar D, Kempenaar J and Ponc M : Culture of reconstructed epidermis in a defined medium at 33 °C shows a delayed epidermal maturation, prolonged lifespan and improved stratum corneum. *Arch Dermatol Res* 289 : 585-595, 1997

Gilchrest BA and Eller MS : DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4 : 35-40, 1999

Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC and Yaar M : The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *In Mechanisms of Disease* 340 : 1341-1348, 1999

Gilchrest BA, Park HY, Eller MS and Yaar M : Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol* 63 : 1-10, 1996

Ginestar-Gonzalez J, Hemmerlé J and Carrière F: Microscopic, analysis and spectrophotometric evaluation of a new photoprotection system (MPI-SORB). *13th International Congress of Photobiology*, 2000

Godar DE : UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J Invest Dermatol* 112 : 3-12, 1999

Goldsmith PC, Leslie TA, Hayes NA, Levell NJ, Dowd PM and Forman JC : Inhibitors of nitric oxide synthase in human skin. *J Invest Dermatol* 106: 113-118, 1996

Gordon PR and Gilchrest BA : Human melanogenesis is stimulated by diacylglycerol. *J Invest Dermatol* 93 : 700-702, 1989

Graham S, Marshall J, Haughey B, Stoll H, Zielezny M, Brasure J and West D : An inquiry into the epidemiology of melanoma. *Am J Epidemiol.* 122 :606-19, 1985

Green A, Whiteman D, Frost C and Battistutta D : Sun exposure, skin cancers and related skin conditions. *J Epidemiol.* 9:S7-13. Review, 1999.

Green A, Williams G, Neale R, Hart V, Leslie D, Parsons P, Marks GC, Gaffney P, Battistutta D, Frost C, Lang C and Russell A: Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomised controlled trial. *Lancet* 348:723-9, 1999.

Greenberg ER, Baron JA, Stukel TA, Stevens MM, Mandel JS, Spencer SK, Elias PM, Lowe N et al. : The alpha-tocopherol, beta carotene cancer prevention study group. A clinical trial of beta-carotene to prevent basal-cell and squamous-cell cancer on the skin. *N Engl J Med* 323: 789-795, 1990

Greenberg ER, Baron JA, Stukel TA, Stevens MM, Mandel JS, Spencer SK, Elias PM, Lowe N, Nierenberg DW, Bayrd G, et al : A clinical trial of beta carotene to prevent basal-cell and squamous-cell cancers of the skin. The Skin Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med.* 323 :789-95, 1990.

Grollman AP and Morija M : Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet* 9 : 246-249, 1993

Grossman D and Leffell DJ : The molecular basis of nonmelanoma skin cancer. *Arch Dermatol* 133 : 1263-1270, 1997

Grune T, Reinheckel T and Davies KJ : Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 11:526-534, 1997

Gurish MF, Roberts LK, Krueger GG and Daynes RA : The effects of various sunscreen agents on skin damage and the induction of tumor susceptibility in mice subjected to ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 76 : 246-251, 1981

-H-

Halaban R and Moellmann GE : Murine and human b locus pigmentation genes encode a glycoprotein (gp75) with catalase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4809-4813, 1990

Halaban R, Rubin JS, Funasaka Y, Cobb M, Boulton T, Faletto D, Rosen E, Chan A, Yoko K, White W, et al : Met and hepatocyte growth factor/scatter factor signal transduction in normal melanocytes and melanoma cells. *Oncogene*. 7:2195-206, 1992

Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP and O'Toole A : Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans* 28 : 170-177, 2000

Halliwell B and Gutteridge JMC : Free radicals in biology and medicine. *Oxford University press*, New York, 1989

Hannun YA : Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, 274: 1855-1859, 1996

Hannun YA : The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem* 269 : 3125-3128, 1994

Harvey I, Frankel S, Marks R, Shalom D and Nolan-Farrell M : Non-melanoma skin cancer and solar keratoses. I. Methods and descriptive results of the South Wales Skin Cancer Study. *Br J Cancer* 74:1302-7, 1996

Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, Uchida K, Nikaido O, Osawa T, Hiai H, Imamura S and Toyokuni S : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* 107 : 733-737, 1996

Hedley SJ, Gawkrödger DJ, Weetman AP, Morandini R, Boeynaems JM, Ghanem G, and Neil SM : alpha-Melanocyte stimulating hormone inhibits tumour necrosis factor-alpha stimulated intercellular adhesion molecule-1 expression in normal cutaneous human melanocytes and in melanoma cell lines. *Br J Dermatol* 138:536-43,1998

Heller B, Wang ZQ, Wagner EF et al : Poly(ADP-ribose)polymerase dependent and independent toxicity of oxygen radicals and nitric oxide in murine islets cells. *J Biol Chem* 270 : 11176-11180, 1995

Hendrix SW, Rogers JV and Hull BE : Differential response of basal keratinocytes in a human skin equivalent to ultraviolet irradiation. *Arch Dermatol Res* 290 : 420-424, 1998

Herzfeld PM, Fitzgerald EF, Hwang SA and Stark A : A case-control study of malignant melanoma of the trunk among white males in upstate New York. *Cancer Detect Prev*. 17 :601-8, 1993.

Hill HZ, Li W, Xin P and Mitchell DL : Melanin : a two edged sword ? *Pig Cell Res* 10 : 158-161,1997

Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K and Yodoi J : Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in nucleus. *J Biol Chem* 274: 27891-27897, 1999

Hoerni B et al : Les cancers de A à Z : Dictionnaire médical, scientifique, culturels des cancers. *Alain Schrotter Editions*,1995

Holman CD, Armstrong BK and Heenan PJ : Relationship of cutaneous malignant melanoma to individual sunlight-exposure habits. *J Natl Cancer Inst* 76: 403-14, 1986.

Holmgren A : Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264: 13963-6. Review, 1989

Hosoi J, Abe E, Suda T and Kuroki T : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res* 45:1474-1478, 1985

Hsu DS, Zhao X, Zhao S, Kazantsev A, Wang RP, Todo T, Wei YF and Sancar A : Putative human blue-light photoreceptor hYCR1 and hCRY2 and flavoproteins. *Biochemistry* 35 : 13871-13877, 1996

Hunt G, Kyne S, Ito S, Wakamatsu K, Ito S and Thody AJ : Nle4Dphe7a-melanocyte stimulating hormone increases the eumelanin : pheomelanin ratio in cultured melanocytes. *J Invest Dermatol* 104: 83-85, 1995 b

Hunt G, Kyne S, Ito S, Wakamatsu K, Todd C and Thody AJ : Eumelanin and pheomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes.*Pig Cell Res* 8: 202-208, 1995a

Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, Rosner B, Willett WC and Speizer FE : Risk factors for basal cell carcinoma in a prospective cohort of women. *Ann Epidemiol.* 1:13-23, 1990.

Hurks HM, van der Molen RG, Out-Luiting C, Vermeer BJ, Claas FH and Mommaas AM: Differential effects of sunscreens on UVB-induced immunomodulation in humans. *J Invest Dermatol* 109:699-703, 1997

Hwang GS, Kim JK and Choi BS : The solution structure of a psoralen cross-linked DNA duplex by NMR and relaxation matrix refinement.*Biochem Biophys Res Commun* 219:191-7, 1996

-I-

Imokawa G, Yada Y and Miyagishi M : Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem* 267 : 24675-24680, 1992

Isseroff RR, Ziboh VA, Chapkin RS and Martinez DT : Conversion of linoleic acid into arachidonic acid by cultures murine and human keratinocytes. *J Lipid Res* 28 : 1342-1349, 1987

Ito S : Advances in chemical analysis of melanins. Nordlund J, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP (eds). In *The pigmentary system*. New York : Oxford University Press, pp 439-450, 1998

Iyengar B : The role of melanocytes in the repair of UV related DNA Damage in keratinocytes. *Pig Cell Res* 11 : 110-113, 1998

Iyengar B, Misra RS and Subalakshmi : ACTH acts directly on melanocytes to stimulate melanogenesis-an in vitro study. *Indian J Pathol Microbiol* 38 : 399-402, 1995

-J-

Jiang N and Taylor JS : In vivo evidence that UV-induced C →T mutations at dipyrimidine sites could result from the replicative bypass of cis-syn cyclobutane dimers or their deamination products. *Biochemistry*, 32 : 472-481, 1993

Jing Y, Kao JF and Taylor JS : Thermodynamic and base-pairing studies of matched and mismatched DNA dodecamer duplexes containing cis-syn, (6-4) and Dewar photoproducts of TT. *Nucleic Acids Res* 26:3845-53, 1998

Jones PL, Ping D and Boss JM : Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-KappaB. *Mol Cell Biol* 17 : 6970-6981, 1997

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredsen D and Reed JC : Bax directly release cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 4997-5002, 1998

-K-

Kanitakis J : Structure histologique de la peau. Biologie de la peau humaine. *Editions Inserm* 1-25, 1997

Kaplan LA : Suntan, sunburn and sun protection. *J Wilderness Med* 3 : 173-196, 1992

Keller KL and Fenske NA : Uses of vitamins A, C and E and related compounds in dermatology : A review. *J Am Acad Dermatol* 39 : 611-625, 1998

Kinsky N : Antioxidants function of carotenoids. *Free Radic Biol Med* 7 : 617-635, 1989

Kippenberger S, Bernd A, Loitsch S, Ramirez-Bosca A, Bereiter-Hahn J and Holzmann H : α-MSH is expressed in cultured human melanocytes and keratinocytes. *Eur J Dermatol* 5 : 395-397, 1995

Kleep O and Magnus K : Some environmental and bodily characteristics of melanoma patients . A case control study. *Int J Cancer* 23 : 482-486, 1979

Kobayashi N, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Ohnishi T and Mori T : Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultures human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 101 : 685-689, 1993

Kobayashi N, Nakagawa A, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, Ishigaki Y, Ohnishi T and Mori T : Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J Invest Dermatol* 110: 800-810, 1998

Koch WH and Chedekel MR : Photoinitiated DNA damage by melanogenic intermediates in vitro. *Photochem Photobiol* 44 : 703-710, 1986

Kock A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC and Luger TA : Human keratinocytes are a source of tumor necrosis factor alpha. Evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* 172 : 1609-1614, 1990

Koh HK : Cutaneous melanoma. *N Engl Med* 325 : 171-182, 1991

Korting HC, Patzak U, Schaller M and Maibach HI : A model of human cutaneous candidosis based on reconstructed human epidermis for the light and electron microscopic study of pathogenesis and treatment. *J Infect* 36 : 259-267, 1998

Korytowski W, Kalyanaraman B, Menon IA, Sarna T and Sealy RC : Reaction of superoxide anions with melanins: electron spin resonance and spin trapping studies. *Biochim Biophys Acta*. 882:145-53, 1986

Kricker A, Armstrong BK, English DR and Heenan PJ : Does intermittent sun exposure cause basal cell carcinoma? a case-control study in Western Australia. *Int J Cancer*. 60: 489-94,1995.

Krol ES and Liebler DC : Photoprotective actions of natural and synthetic melanins. *Chem Res Toxicol* 11 : 1434-1440, 1998

Kromberg JG, Castle D, Zwane EM and Jenkins T : Albinism and skin cancer in Southern Africa. *Clin Genet* 36 : 43-52, 1989

Kröncke KD, Fehsel K and Kolb-Bachofen V : Nitric oxide : cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, where ? *Nitric Oxide* 1 : 107-120, 1997

Kulms D, Poppelman B, Yarosh D, Luger TA, Krutmann J and Schwarz T : Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc Nat Acad Sc* 96 : 7974-7979, 1999

Kumakiri M, Hashimoto K and Willis I : Biologic changes due to long-Wave ultraviolet irradiation on human skin : ultrastructural study. *J Invest Dermatol* 69 : 392-400, 1977

Kvam E and Tyrrell RM : The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. *J Invest Dermatol* 113 : 209-213, 1999

Kvam E and Tyrrell RM : Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis* 18 : 2379-2384, 1997

-L-

- Lavker RM and Matoltsy AG : Formation of horny cells: the fate of cell organelles and differentiation products in ruminal epithelium. *J Cell Biol* 44 : 501-12, 1970
- Leccia MT, Richard MJ, Beani JC, Faure H, Monjo AM, Cadet J, Amblard P and Favier A: Protective effect of selenium and zinc on UV-A damage in human skin fibroblasts. *Photochem Photobiol* 58:548-53, 1993
- Le Page F, Margot A, Grollman AP, Sarasin A and Gentil A : Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells. *Carcinogenesis* 16 : 2779-2784, 1995
- Leccia MT, Richard MJ, Favier A and Beani JC : Zinc protects against ultraviolet A1-induced DNA damage and apoptosis in cultured human fibroblasts. *Biol Trace Elem Res* 69 :177-90, 1999
- Leccia MT, Richard MJ, Joanny-Crisci F and Beani JC : UV-A1 cytotoxicity and antioxidant defence in keratinocytes and fibroblasts. *Eur J Dermatol* 8 : 478-82, 1998
- LeClaire J and de Silva O : Industry experience with alternative methods. *Toxicol Lett* 102 : 575-579, 1998
- Lee DY, Ahn HT and Cho KH : A new skin equivalent model: dermal substrate that combines de-epidermized dermis with fibroblast-populated collagen matrix. *J Dermatol Sci* 23 :132-7, 2000
- Leffell DJ : The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 42:18-22, 2000
- Leffell DJ and Brash DE : Sunlight and skin cancer. *Sci Am* 275:52-3, 56-9, 1996
- Lesko SA, Lorentzen RJ and Ts'o POP : Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission. *Biochemistry* 19:3023-3028, 1980
- Ley RD : Photoreactivation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4337. Review, 1993
- Lindquist S : The heat shock response. *Ann Rev Biochem* 55 : 1151-1191, 1986
- Liochev SI and Fridovitch I : The role of O_2^- in the production of HO: In vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 16 : 29-33, 1994
- Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa S, Suzuki H, Miyata T, Kurokawa K, Hotta Y, Ishikawa N and Nakashima : 4-hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci* 113 : 635-641, 2000
- Ljungman M and Hanawalt P : Efficient protection against oxidative DNA damage in Chromatin. *Mol Carcinog* 5 : 264-269, 1992
- Lopez-Torres M, Thiele JJ, Shindo Y, Han D and Packer L : Topical application of alpha-tocopherol modulates the antioxidant network and diminishes ultraviolet-induced oxidative damage in murine skin. *Br J Dermatol* 138 : 207-215, 1998

Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J and Kroemer G : Apoptosis-inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6 : 516-524, 1999

Lowe NJ and Friedlander J : Sunscreens : Rationale for use to reduce photodamage and phototoxicity. In *Sunscreens second edition*. Lowe NJ, Shaath NA and Pathak MA (eds) 35-58, 1997

Lowe NJ and Stoughton RB : Essential fatty acid deficient hairless mouse: a model of chronic epidermal hyperproliferation. *Br J Dermatol* 96 : 155-162, 1977

Lu D, Chen W and Cone RD : Regulation of melanogenesis by the MSH receptor. In *The pigmentary system*. Nordlund J, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP (eds). New York : Oxford University Press, pp183-198, 1998

Lubin B and Kuypers F : Phospholipid repair in human erythrocytes in : Oxidative damage and repair. *Davies K (eds)* 557-563, 1991

-M-

Magnaldo T, Bernerd F, Asselineau D and Darmon M : Expression of loricerin is negatively controlled by retinoic acid in human epidermis reconstructed in vitro. *Differentiation* 49 : 39-46, 1992

Mansur CP, Gordon PR, Ray S, Holick MF and Gilchrest BA : Vitamin D, its precursors, and metabolites do not affect melanization of cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol* 91 : 16-21, 1988

Masaki H, Atsumi T and Sakurai H : Protective activity of hamamelitannin on cell damage of murine skin fibroblasts induced by UVB irradiation. *J Dermatol Sci* 10 : 25-34, 1995

Masaki H, Okano Y, and Sakurai H. Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H₂O₂ or ultraviolet B light. *Arch Dermatol Res* 290:113-8, 1998

Mates JM and Sanchez-Jimenez FM : Role of reactive oxygen species in apoptosis : implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32 : 157-170, 2000

Mathieu J, Chancerelle Y, Hérodin F, Multon E, Drouet M, Mestries JC and Kergonou JF : Stress oxydatif et apoptose. *Ann pharmaceutiques françaises* 54 : 193-201, 1996

Maytin EV, Murphy LA and Merrill MA : Hyperthermia induces resistance to ultraviolet light B in primary and immortalized murine keratinocytes. *Cancer Res* 53 : 4952-4959, 1993

Mc Gregor JM and Hawk JLM : Acute effects of ultraviolet radiation in the skin. In: *Dermatology in general Medicine*. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen F, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB (eds) New York : McGraw-Hill, 1999

Mc Vean M and Liebler DC : Inhibition of UVB induced DNA photodamage in mouse

epidermis by topically applied α -tocopherol. *Carcinogenesis* 18 : 1617-1622, 1997

Mc Vean M and Liebler DC : Prevention of DNA photodamage by α -tocopherol compounds and sunscreens : roles of ultraviolet absorbance and cellular uptake. *Mol Carcinog* 24 : 169-176, 1999

Mélessopoulos A and Levacher C : La peau, structure et physiologie. *Lavoisier (eds)*1-131, 1998

Menezes S, Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L : Non-coherent near infrared radiation protects normal human dermal fibroblast from solar ultraviolet toxicity. *J Invest Dermatol* 111 : 629-633, 1998

Menon IA and Haberman HF : Mechanisms of action of melanins. *Br J Dermatol* 97 : 109-112, 1977

Min KS, Nishida K and Onosaka S : Protective effect of metallothionein to ras DNA damage induced by hydrogen peroxide and ferric ion-nitrilotriacetic acid. *Chem Biol Interact* 122:137-52,1999

Mitani H and Shima A : Induction of cyclobutane pyrimidine dimer photolyase in cultured fish cells by fluorescent light and oxygen stress. *Photochem Photobiol* 1995 61:373-7, 1995

Mitchell DL, Rosenstein BS : The use of specific radioimmunoassay to determine action spectra for the photolysis of (6-4) photoproducts. *Photochem Photobiol* 45:781-6, 1987

Miyachi Y, Horio T and Imamura S : Sunburn cell formation is prevented by scavenging oxygen intermediates. *Clin Exp Dermatol*, 8 : 305-310, 1983

Miyachi Y, Imamura S and Niwa Y : Decreased skin superoxide dismutase activity by a single exposure of ultraviolet radiation is reduced by liposomal superoxide dismutase treatment . *J Invest Dermatol* 89 : 111-112, 1987

Mizushima Y, Hoshi K, Yanagawa A and Takano K : Topical application of superoxide dismutase in a cream. *Drugs Exp Clin Res* 127-131, 1991

Moan J, Dahlback A and Setlow RB : Epidemiological support for hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. *Photochem Photobiol* 70 : 243-247, 1999

Mori T, Nakane T, Hattori T, Matsunaga T, Ihara M and Nikaido O : Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA. *Photochem Photobiol* 54 : 225-232, 1991

Morin B, Davies MJ and Dean RT : The protein oxidation product 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) mediates oxidative DNA damage. *Biochem J* 330 : 1059-1067, 1998

Morlière P and Santus R : Pro-oxidant role of superoxide dismutase in ultraviolet-A-induced lipid peroxidation in cultured normal human skin fibroblasts. *Eur J Biochem* 256 : 184-189, 1998

Morlière P, Moysan A and Tirache I : Action spectrum fo UV-induced lipid peroxidation in

culture human skin fibroblast. *Free radic Bio Med* 9 : 365-371, 1995

Moysan A, Marquis I, Gaboriau F, Santus R, Dubertret L and Morlière P : Ultraviolet A-induced lipid peroxidation and antioxidant defense systems in cultured human skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 100 : 692-698, 1993

Mullenders L : Transcription-coupled repair and acute responses to UV. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

-N-

Nakagawa A, Kobayashi N, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, Ikenaga M, Mori T : Three-dimensional visualisation of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei. *J Invest Dermat* 110 : 143-148, 1998

Nakamura H, Matsuda M, Furuke K, Kitaoka Y, Iwata S, Toda K, Inamoto T, Yamaoka Y, Ozawa K and Yodoi J : Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunol Let* 42 :75-80, 1994

Naldi L, Gallus S, Imberti GL, Cainelli T, Negri E and La Vecchia C : Sunscreens and cutaneous malignant melanoma: an Italian case-control study. *Int J Cancer*. 86:879-82, 2000

Nelson D and Gay RJ: Effects of UV irradiation on a living skin equivalent. *Photochem Photobiol* 57:830-7, 1993

Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnock JS and Tannenbaum SR : DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 3030-3034, 1992

Niwa Y : Lipid peroxides and superoxide dismutase (SOD) induction in skin inflammatory diseases and treatment with SOD preparation. *Dermatologica* 179 : 101-106, 1989

Nordlund J, Boissy RE, Hearing VJ, King RA and Ortonne JP (eds) : The pigimentary System. New York . *Oxford University Press*, 1998

Nordlund JJ and Ortonne JP : The normal color of human skin Nordlund J, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne JP (eds). *The pigimentary system*. New York : *Oxford University Press*, pp475-488, 1998

Novellino L, d'Ischia M and Prota G : Nitric oxide-induced oxidation of 5,6-dihydroxyindole and 5,6 dihydroxyindole-2-carboxylic acid under aerobic aonditions : non-enzymatic route to melanin pigments of potential relevance to skin (photo)protection. *Biochem Biophys Acta* 1425 : 27-35, 1998

Novellino L, Napolitano A, Prota G : 5,6-Dihydroxyindoles in the fenton reaction: a model study of the role of melanin precursors in oxidative stress and hyperpigmentary processes. *Chem Res Toxicol* 12:985-92, 1999

-O-

Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA and Hannun YA : Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259 : 1769-1771, 1993

Osterlind A, Tucker MA, Stone BJ and Jensen OM : The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma. III. Hormonal and reproductive factors in women. *Int J Cancer*. 42:821-4,1988.

Otoshi E, Yagi T, Mori T, Matsunaga T, Miyachi Y and Todo T : Respective roles of cyclobutane pyrimidine dimers, (6-4)photoproducts in UV mutagenesis of repair deficient xeroderma pigmentosum A cells. *13 th International Congress of Photobiology 2000*

Owen-Schaub LB, Ouhit A, Ananthaswamy HN, Kripke ML and Hill HH : Fas Ligand-mediated death after UVB : Beyond repair. *13 th International Congress of Photobiology 2000*

-P-

Pahan K, Dobashi K, Ghosh B and Singh I : Induction of manganese superoxide dismutase gene by sphingomyelinase and ceramide . *J Neurochem* 73 : 513-520, 1999

Parat MO, Richard MJ, Meplan C, Favier A, Beani JC : Impairment of cultured cell proliferation and metallothionein expression by metal chelator NNN'N'-tetrakis-(2-pyridylmethylethylene) diamine. *Biol Trace Elem Res* 70: 51-68, 1999

Park HY, Perez JM, Laursen R, Hara M and Gilchrest BA : Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 274 : 16470-16478, 1999

Pathak MA : Functions of melanin and protection by melanin. In : Zeise L, Chedekel MR, Thomas B (eds). *Melanin : its role in human photoprotection*. Overland Park : Valdemar Publishing, p 125-134, 1995

- Pathak MA : Photoprotection against harmful effects of solar UVB and UVA radiation: An update. Evolution of modern sunscreen chemicals. *Cosmetic Science and Technology : Sunscreens second edition*, 15 : 59-79, 1997
- Péguet-Navarro J, Dalbiez-Gauthier C, Courtellement P et Schmitt D : In vitro determination of sunscreen immune protection factors. *Arch Dermatol Res* 292 : 306-311, 2000
- Pence BC and Naylor MF: Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase and xanthine oxidase in hairless mice. *J Invest Dermat* 95 : 213-216, 1990
- Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E and Sage E : Distribution and repair of bypyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar Photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem*, May 2000
- Picardo M, Grammatico P, Roccella F, Roccela M, Grandinetti M, del Porto G and Passi S : Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. *J Invest Dermatol* 107 : 322-326, 1996
- Pierre JL : Chemistry of molecular oxygen. In *Training in free radical methodologies* CERLIB, 1997
- Pigeolet E and Remacle J : Susceptibility of glutathione peroxidase to proteolysis after oxidative alteration by peroxides and hydroxyl radicals. *Free radic Biol Med* 11 : 191-195, 1991
- Ponec M : Reconstructed of human epidermis on de-epidermized dermis : expression of differentiation-specific protein markers and lipid composition. *Toxic in Vitro* 5 : 597-606, 1991
- Ponec M, Weerheim A, Kempenaar J, Mommaas AM and Nugteren DH : Lipid composition of cultured human keratinocytes in relation to their differentiation. *Journal of Lipid Research* 29 : 949-961, 1988
- Poswig A, Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Hommel C, Quel G, Faisst K, Dissemond J, Briviba K, Krieg T and Scharffetter-Kochanek K : Adaptative antioxidant response of manganese-superoxide dimutase following repetitive UVA irradiation . *J Invest Dermatol* 112 : 13-18, 1999
- Pourzand C and Tyrrell RM : Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol* 70 : 380-390, 1999
- Pré J : La lipoperoxydation. *Path Biol* 39 : 716-736, 1991
- Proksh E: Biosynthesis of fatty acids in the skin and their role in epidermal barrier function. *In Fatty acids and inflammatory skin disease*, Schröder JM (eds) p1-13, 1999
- Pruniéras M, Regnier M and Schlottere M : Nouveau procédé de culture des cellules épidermiques humaines sur derme homologue ou hétérologue : préparation de greffons recombinés . *Ann Chir Plast* 24 : 357-362, 1979
- Punnonen K and Yuspa SH : Ultraviolet light irradiation increases cellular diacylglycerol and induces translocation of diacylglycerol kinase in murine keratinocytes. *J Invest Dermatol* 99 : 221-226, 1992

Punnonen K, Autio P, Kiistala U and Ahotupa M : In vivo effects of solar simulated ultraviolet irradiation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in human epidermis. *Br J Dermatol* 125 : 18:20, 1991b

Punnonen K, Lehtola K, Autio P, Kiistala U and Ahotupa M : Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis in vivo. *J Photochem Photobiol Biol* 30 : 43-48, 1995

Punnonen K, Puntala A and Ahotupa M : Effects of ultraviolet A and B on lipid peroxidation and activity of the antioxidant enzymes in keratinocytes in culture. *Photoderm Photobiol Photomed* 8: 3:6, 1991a

-Q-

Quillet X. : Transfert de gènes dans des fibroblastes de patients atteints de xeroderma pigmentosum : correction des phénotypes anormaux. *Thèse de doctorat*, 1997

-R-

Régnier M and Darmon M : 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates specifically the last steps of epidermal differentiation of cultures human keratinocytes. *Differentiation* 47 : 173-188, 1991

Régnier M and Staquet MJ : La peau reconstruite. *Pour la Science* 266 : 154-159, 1999

Régnier M, Caron D, Reichert U and Shaefer H : Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. *J Pharm Sci* 82: 404-407, 1993

Régnier M, Desbas C, Bailly C and Darmon M : Differentiation of normal and tumoral human keratinocytes cultured on dermis : reconstruction of either normal or tumoral architecture. *In vitro Cell Dev Biol* 24 : 625-632, 1988

Régnier M, Duval C, Galey JB, Phillippe M, Lagrange A, Tuloup and Schmidt R : Keratinocyte-melanocyte co-cultures and pigmented reconstructed human epidermis : Models to study modulation of melanogenesis. *Cell mol Biol* 45 : 969-980, 1999

Régnier M, Patwardhan A, Scheynius A and Schmidt R : Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langherans cells . *Med Biol Eng Computl* 36 : 821-824, 1998

Régnier M, Stacquet MJ, Schmitt D and Schmidt R : Integration of Langherans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J Invest Dermatol* 109 : 510-512, 1997

Rehemtulla A, Hamilton CA, Chinnaiyan AM and Dixit VM : Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (FAS/APO-1). *J Biol Chem* 272 : 25783-25786,

1997

Reusch MK, Meager K, Leadon SA and Hanawalt PC : Comparative removal of pyrimidine dimers from human epidermal keratinocytes in vivo and in vitro. *J Invest Dermat* 91 : 349-352, 1988

Roméro-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP and Balloti R : Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem* 271 : 28052-28056, 1996

Rosenstein BS, Phelps RG, Weinstock MA, Bernstein JL, Gordon ML, Rudikoff D, Kantor I, Shelton R, Lebowitz MG. p53 mutations in basal cell carcinomas arising in routine users of sunscreens. *Photochem Photobiol.* 70 :798-806, 1999

Roza L, De Gruijl FR, Bergen Henegouwen JBA, Guikers K, Van Weelden H, Van Der Shans GP and Baan RA : Detection of photorepair of UV-induced thymine dimers in human epidermis by immunofluorescence microscopy. *J Invest Dermatol* 96 : 903-907, 1991

Rozanowska M, Sarna T, Land EJ and Truscott TG: Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin with reducing and oxidising radicals. *Free Radic Biol Med* 26 : 518-525, 1999

-S-

Sarasin A : Mutation in UV-induced tumors and NER. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Sarna T, Pilas B, Land EJ and Truscott TG : Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochim Biophys Acta* 883:162-7, 1986

Sayre RM and Lowe NJ : Scientific poster presentation at the american academy of dermatology meeting, 1992

Schafer FQ and Buettner GR : Nitric oxide protects cell membranes from free radical-mediated lipid peroxidation. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Schafer FQ, Wang HP, Cuesno KL and Buettner GR : Protection of different antioxidants against singlet oxygen-induced cells damage. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Schallreuter KU and Wood JM : Free radical reduction in the human epidermis. *Free Rad Biol Med* 6 : 519-532, 1989

Schallreuter KU and Wood JM : The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 136 : 630-637, 1986

Schallreuter KU, Wood JM and Berger J : Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 97:1081-5, 1991

Schauer E, Trautinger F, Kock A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, Ansel JC, Schwarz T and Luger TA : Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest* 93 : 2258-2260, 1994

Schmitz S, Thomas PD, Allen TM, Poznansky MJ and Jimbow K : Dual role of melanins and melanin precursors as photoprotective and phototoxic agents : inhibition of ultraviolet radiation induced lipid peroxidation. *Photochem Photobiol* 61: 650-655, 1995

Schnurr K, Belkner J, Ursini F, Schewe T and Kühn H : The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products. *J Biol Chem* 271 : 4653-4658, 1996

Schütze S, Potthoff K, Macheildt T, Berkovic D, Wiegmann K and Krönke M : TNF activates NF- κ B by phosphatidyl-choline-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 71 :765-776, 1992

Seeberg E, Eide L and Bjoras M : The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 20:391-7. Review, 1995

Seite S, Moyal D, Richard S, de Rigal J, Leveque JL, Hourseau C and Fourtanier A : Mexoryl SX: a broad absorption UVA filter protects human skin from the effects of repeated suberythemal doses of UVA. *J Photochem Photobiol B*. 44 : 69-76, 1998

Setlow RB : Spectral regions contributing to melanoma: a personal view. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 4: 46-9, 1999

Setlow RB : Melanoma and UVA : a fish story and other consideration. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Shaath NA : Evolution of modern sunscreen chemicals. In *Cosmetic Science and Technology: Sunscreens second edition* 15 : 3-33,1997

Sheehan JM and Young AR : UVR-induced apoptosis in human skin type II and IV in vivo. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Shibutani S, Takeshita M and Gollman AP : Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 340 : 431-434, 1991

Shimizu T, Cao CX, Shao RG, and Pommier Y : Lamin B phosphorylation by protein kinase C and proteolysis during apoptosis in human leukemia HL60 Cells. *J Biol Chem* 273 : 8669-8674, 1998

Shindo Y, Witt E and Packer L : Antioxidant defense mechanism in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 100 : 260-265, 1993

Shindo Y, Witt E, Han D and Packer L : Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol* 102 : 470-475, 1994b

Shindo Y, Witt E, Han D, Tzeng B, Aziz T, Nguyen L and Packer L : Recovery of antioxidants and reduction in lipid hydroperoxides in murine epidermis and dermis after acute ultraviolet radiation exposure. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 10 : 183-191, 1994a

Sies H : Natural protection from oxidative damage. In *Training in free radical methodologies* CERLIB, 1997

Slominski A, Ermak G, Hwang J, Chakraborty A, Mazurkiewicz JE and Mihm M: Proopiomelanocortin, and corticotropin releasing hormone *FEBS Lett.* 374:113-6, 1995

Smerdon MJ : Modulation of DNA damage and DNA repair in chromatin. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Sommerburg O, Ullrich O, von Sitte N, Zglinicki D, Siems W and Grune T : Dose-and wavelength-dependent oxidation of crystallins by UV light-selective recognition and degradation by the 20s proteasome. *Free Radic Biol Med* 24 : 1369-1374, 1997

Stadman ER : Protein oxidation and aging. *Science* 257 : 1220-1224, 1992

Staquet MJ, Jacquet C and Régnier M : Epiderme humain reconstruit in vitro contenant des mélanocytes et des cellules de Langherans. In *Biologie de la peau humaine* Schmitt D (ed) 171-176, 2000

Steevoorden DPT and Beijersbergen van Henegouwen GMJ : The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B: Biology* 4 : 1-10, 1997

Stege H, Roza L, Vink AA, Grewe M, Ruzicka T, Grether-Beck S and Krutmann J : Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 1790-1795, 2000

Stewart MS, Spallholz JE, Nedler KH and Pence BC : Selenium compounds disparate abilities to impose oxidative stress and induces apoptosis. *Free Radic Biol Med* 26 : 42-48, 1999

Strickland PT : Distribution of thymine dimers induced in mouse skin by ultraviolet radiation. *Photodermatol* 5 : 1-8, 1988

Sugiyama M, Tsuzuki K, Matsumoto K and Ogura R: Effect of vitamin E on cytotoxicity, DNA single strand breaks, chromosomal aberrations, and mutation in Chinese hamster v-79 cells exposed to ultraviolet-B light. *Photochem Photobiol* 56: 31-3,1992)

Sundaram C, Koster W and Schallreuter KU : The effect of UV radiation and sun blockers on free radical defence in human and guinea pig epidermis. *Arch Dermatol Res* 282 : 526-31, 1990

Sutherland BM, Harber LC and Kochevar IE : Pyrimidine dimer formation and repair in human skin. *Cancer Res* 40 : 3181-3185, 1980

-T-

Taniguchi Y, Taniguchi-Ueda Y, Mori K and Yodoi J : A novel promoter sequence is involved in the oxidative stress-induced expression of the adult T-cell leukemia-derived factor (ADF)/human thioredoxin (Trx) gene. *Nucleic Acids Res* 24 : 2746-52, 1996

Taylor JS, Lu HF and Kotyk JJ : Quantitative conversion of the (6-4) photoproduct of TpdC

to its Dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight. *Photochem Photobiol* 51:161-7, 1990

Thiele JJ, Hsieh SN, Briviba K and Sies H : Protein oxidation in human stratum corneum : Susceptibility of keratins to oxidation *in vivo* and presence of a keratin oxidation gradient. *J Invest Dermatol* 113 : 335-339, 1999

Thody AJ and Burchill SA : Tyrosinase and the regulation of coat color changes in C3H-HeA mice. *Pig Cell Res* 5 : 335-339, 1992

Thody AJ, Ridley K, Penny RJ, Chalmers R, Fisher C and Shuster S : MSH peptides are present in mammalian skin. *Peptides* 4 : 813-816, 1983

Thoma F : Light and dark in chromatin repair : repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *Embo J* 18 : 6585-6598, 1999

Tobin D, Quinn AG, Ito S and Thody AJ : The presence of tyrosinase and related proteins in human epidermis and their relationship to melanin type. *Pig Cell Res* 7 : 204-209, 1994

Todd C, Hewitt SD, Kempenaar J, Noz K, Thody AJ and Ponc M : Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model : effect of ultraviolet radiation. *Arch Dermatol Res* 285 : 455-459, 1993

Todo T, Ryo H, Yakamoto K, Toh H, Inui T, Ayaki H, Hormura T and Ikenaga M: Similarity among the drosophila (6-4) photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science* 272: 109-112, 1996

Todo T, Tsuji H, Otsu E, Hitomi K, Kim ST and Ikegana M : Characterization of human homologue of (6-4) photolyase. *Mutation Research* 384: 195-204, 1997

Tomita Y, Fukushima M and Tagami H: Stimulation of melanogenesis by cholecalciferol in cultured human melanocytes: a possible mechanism underlying pigmentation after ultraviolet irradiation. *Tohoku J Exp Med* 149 : 451-452, 1986

Tomita Y, Iwamoto M, Masuda T and Tagami H: Stimulatory effect of prostaglandin E₂ on the configuration of normal human melanocytes. *J Invest Dermatol* 89: 299-301, 1987

Tornaletti S and Pfeifer G P: UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *BioEssays* 18: 221-228, 1996

Tyrrell RM: UVA (320-380 nm) radiation as an oxidative stress. In Sies H (eds) *Oxidative stress : Oxidants and antioxidants*. Academic Press, 57-83, 1991

-V-

Vailly J, Gagnoux-Palacios L, Dell'Ambra E, Roméro C, Pinola M, Zambruno G, De Luce M, Ortonne J-P and Meneguzzi G: Corrective gene transfer of keratinocytes from patients with junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epidermis. *Gene Therapy* 5 : 1322-1332, 1998

van Kranen HJ, de Laat A, van de Ven J, Wester PW, de Vries A, Berg RJ, van Kreijl CF and de Gruijl FR : Low incidence of p53 mutations in UVA (365-nm)-induced skin tumors in hairless mice. *Cancer Res.* 1:1238-40, 1997

Van Weelden H, de Gruijl FR, van der Putte SC, Toonstra J and van der Leun JC : The carcinogenic risks of modern tanning equipment: Is UVA safer than UVB ? *Arch Dermatol Res* 280 : 300-307, 1988

Van Weelden H, de Gruijl FR, and van der Leun JC : Carcinogenesis by UVA, with an attempt to assess carcinogenic risks of tanning with UVA and UVB. In *The biological effects of UVA radiation*. Urbach F and Gange RW (eds), Praeger, Westport, CT pp137-146, 1986

Vancoillie G, Lambert J, Mulder A, Koerten HK, Mommaas AM, Van Oostveldt P and Naeyaert JM: Kinesin and kinectin can associate with the melanosomal surface and form a link with microtubules in normal human melanocytes. *J Invest Dermatol* 114: 421-429, 2000

Vicanova J, Boelsma E, Mommaas AM, Kempenaar JA, Forslind B, Pallon J, Egelrud T, Koerten H and Ponec M : Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *J Invest Dermatol* 111 : 97-106, 1998

Vicanova J, Weerheim AM, Kempenaar JA and Ponec M : Incorporation of linoleic acid by cultured human. *Arch Dermatol Res* 291 : 405-412, 1999

Vigh L, Literati PN, Horvath I, Torok Z, Balogh G, Glatz A, Kovacs E, Boros I, Ferdinandy P, Farkas B, Jaszlits L, Jednakovits A, Koranyi L, Maresca B : Bimocloamol: a nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. *Nat med* 10 : 1150-1154, 1997

Vile GT and Tyrrell RM : Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 268 : 14678-14681, 1993

Vile GT and Tyrrell RM : UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic Biol Med* 18 : 721-730, 1995

Vos JM : Cis and trans mechanisms of DNA repair. *Curr Opin Cell Biol.* 385-95, 1992

-W-

Wang HP: Phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase protects cells from $^1\text{O}_2$ -induced oxidative damage. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Wang X, Wu Z, Song G, Wang H, Long M and Cai S : Effects of oxidative damage of membrane protein thiol groups on erythrocyte membrane viscoelasticities. *Clin Hemorheol Microcirc* 21:137-46, 1999

Warso MA et Lands WE: Presence of lipid hydroperoxide in human plasma. *J Clin Invest* 75 : 667-671, 1985

Weinstock MA: Do sunscreens increase or decrease melanoma risk : An epidemiologic evaluation. *J Invest Dermatol* 4: 97-100, 1999

Weiss RB and Gallagher PE: In vivo repair of cytosine hydrates in DNA of cultured human lymphoblasts. *Photochem Photobiol* 58:219-25, 1993

Wenczl E, Van der Schans GP, Roza L, Klob RM, Timmerman AJ, Smit NPM, Pavel S and Schothorst AA: (Pheo)melanin photosensitizes UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes. *J Invest Dermatol* 111: 678-682, 1998

Westerdahl J, Ingvar C, Masback A and Olsson H : Sunscreen use and malignant melanoma. *Int J Cancer*. 87:145-50, 2000.

Westerdahl J, Olsson H, Masback A, Ingvar C and Jonsson N: Is the use of sunscreens a risk factor for malignant melanoma? *Melanoma Res*. 5:59-65, 1995.

Wintzen M, Yaar M, Burbach JP and Gilchrest BA : Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106 : 673-678, 1996

Wolf P, Donawho CK and Kripke ML : Effects of sunscreens on UV radiation-induced enhancement of melanoma growth in mice. *J Natl Cancer Inst* 86 : 99-105, 1994

Wood ML, Dizdaroglu M, Gajexski E and Essingmann JM : Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis : genetic effects of a single 8-hydroxyguanine residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* 29 : 7024-7032, 1990

Wright S : Essential fatty acids and the skin. *Br J Dermatol* 96 : 155-162, 1991

-Y-

Yakolev AG, Wang G, Stoica BA, Boulares HA, Sponde AY, Yoshira K and Smulson ME : A role of the Ca²⁺/Mg²⁺ dependent endonuclease in apoptosis and its inhibition by Poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 275 : 21302-21308, 2000

Yakubu A and Mabogunje OA : Skin cancer in african albinos. *Acad Oncol* 32 : 621-622, 1993

Yamamoto O and Bhawan J : Three modes of melanosome transfers in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. *Pig Cell Res* 7:158-69, 1994

Yohn JJ, Lyons MB and Norris DA : Cultured human melanocytes from black and white donors have different sunlight and ultraviolet A radiation sensitivities. *J Invest Dermatol* 99:454-9, 1992

Young AR : The ability of sunscreens to protect against endpoints other than erythema. *13 th International Congress of Photobiology*, 2000

Young AR, Chadwick CA, Harrison GI, Nikaido O, Ramsden J and Potten CS: The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema. *J Invest Dermatol* 111: 982-988, 1998

Young AR, Gibbs NK and Magnus IA: Modification of 5-methoxypsoralen phototumorigenesis by UVB sunscreens: a statistical and histologic study in the hairless albino mouse. *J Invest Dermatol* 89: 611-7, 1987

Young AR, Sheehan JM, Chadwick CA and Potten C: Protection by ultraviolet A and B sunscreens against *in situ* dipyrimidine photolesions in human epidermis is comparable to protection against sunburn. *J Invest Dermatol* 115: 37-41, 2000

-Z-

Zhang X, Erb C, Flammer J and Nau WM: Absolute rate constants for the quenching of reactive excited states by melanin and related 5,6-dihydroxyindole metabolites: implications for their antioxidant activity. *Photochem Photobiol* 71:524-33, 2000

Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, Halperin AJ, Baden HP, Shapiro PE, Bale AE, et al: Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4216-20, 1993

Zolzer F, Belisheva NK, Levin VL and Samoilova KA: Photoreactivation of DNA synthetic activity in human embryo fibroblasts. *J Photochem Photobiol B* 18: 87-9, 1993

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la peau (Science & Vie, édition spéciale « Corps Humain », 1999)... 18

Figure 2 : Structure de l'épiderme (d'après Dominice-Franchi, 1999).....	19
Figure 3 : Mélanocytes en culture observés en microscopie photonique. a) x200, b) x600 (Collection personnelle)	21
Figure 4 : Le processus de kératinisation (d'après Lavker et Maltosky, 1970).....	21
Figure 5 : Kératinocytes confluents en culture observés en microscopie photonique (x 200) (Collection personnelle)	22
Figure 6 : Cellules de Langerhans sur le feuillet épidermique reconstruit (d'après Staquet et al., 2000).....	22
Figure 7 : Eu. et Phéomélanogenèse (d'après Ito, (1998)).....	23
Figure 8 : Eumélanosomes en microscopie électronique observés dans les mélanocytes d'un épiderme reconstruit caucasoïde (a) stade II ; b) stade IV) (Collection personnelle)	26
Figure 9 : Phéomélanosome en microscopie électronique observé dans un mélanocyte d'un épiderme reconstruit Caucasoïde (stade II) (Collection personnelle)	26
Figure 10 : Transfert de mélanosomes au sein de l'unité épidermique de mélanisation (d'après Vancoillie et al., 2000)	27
Figure 11 : Répartition des lipides au sein de l'épiderme (d'après Elias, 1992).....	28
Figure 12 : Pénétration des radiations solaires dans la peau (d'après Sciences et Avenir, Dossier spécial "Le soleil et la beauté", (1999))	30
Figure 13 : Voie de réduction de l'oxygène par les UV en absence d'ion métallique (d'après Darr et Pinnell, 1997)	33
Figure 14 : Diagramme schématique de l'action du NO (d'après Novellino et al., 1998)	35
Figure 15 : CPD et 6-4 photoproduits	38
Figure 16 : Formules semi-développées de bases oxydées (a) 8-oxodG ; b) 5OHdC	39
Figure 17 : Principales étapes de la lipoperoxydation.....	43
Figure 18 : Principales étapes de la réparation par excision de nucléotides : a) réparation globale, b) réparation couplée à la transcription (d'après Quillet, 1997 ; Tornaletti et Pfeiffer, 1996)	49
Figure 19 : Principales étapes de la réparation par excision de base (d'après Seeberg et al., 1995).....	51
Figure 20 : Réparation post-répllicative (Biochimie génétique. Biologie Moléculaire, Etienne, Masson (ed), 1996).....	53
Figure 21 : Microscopies électroniques de cellules en apoptose : a) stade précoce, b) stade tardif (collection personnelle)	59
Figure 22: Schéma des différentes voies induisant l'apoptose.	61

Figure 23 : Schéma d'introduction d'une mutation par transition	64
Figure 24 : Hypothèse concernant la différence d'incidence des carcinomes et des mélanomes en fonction du phototype, de la dose d'irradiation et du mode de délivrance de l'irradiation. a) irradiation faible et chronique, b) irradiation forte et aiguë.....	68
Figure 25 : "Cap" supranucléaire de mélanine observée en microscopie électronique (Collection personnelle)	70
Figure 26 : Modèles d'épidermes reconstruits : a) sur substrat synthétique, b) sur matrice de collagène, c) sur derme équivalent, d) sur derme acellulaire déépidermisé (d'après Régnier et Staquet, pour la science, 1999).....	78
Figure 27 : Epidermes reconstruits sur DED avec 95 % de kératinocytes et 5 % de mélanocytes : a) phototype II, b) phototype VI (Collection personnelle).....	83
Figure 28 : Epidermes reconstruits : a) avec des mélanocytes (en noir) (collection personnelle), b) avec des mélanocytes (en noir) et des cellules de Langerhans (en rouge) (d'après Régnier et al., 1997).....	85
Figure 29 : Révélation de l'ADN par la technique de Fukuda et al., (1993).....	100
Figure 30: Révélation des CPD par la technique adaptée de Fukuda et al., (1993) : a) 10 minutes après irradiation, b) 1 heure après irradiation.....	100
Figure 31 : Détection des 8-oxodG dans des épidermes reconstruits avec des kératinocytes, 2 heures après irradiation UVB a) témoin, b) traité avec 2 % d' α -tocophérol. (x 40).....	175
Figure 32 : Représentation schématique de l'effet des acides gras et de la mélanine dans les épidermes reconstruits avec des mélanocytes et les épidermes reconstruits avec des kératinocytes supplémentés en acides gras insaturés par comparaison avec les épidermes reconstruits avec des kératinocytes	203

Liste des tableaux et graphes

Tableau 1 : Classification des phototypes (d'après Pathak (1995) et Lowe et Friedlander, (1997)).....	24
Tableau 2 : Récapitulatif bibliographique de l'effet des crèmes solaires sur la survenue de mélanome	76
Tableau 3: Composition des 2 principaux milieux de base (DMEM/Ham et IMDM/MCB153) pour les épidermes reconstruits.	81
Tableau 4 : Estimations du taux de calcium dans les couches des épidermes natif et reconstruit (d'après Vicanova et al., 1998).....	83
Tableau 5 : Pourcentages d'acides gras membranaires dans l'épiderme natif (adapté d'après Vicanova et al., 1999) et dans l'épiderme reconstruit (d'après Bessou, 1997).....	84
Tableau 6 : Composition en acides gras de l'épiderme natif et de l'épiderme reconstruit avec des kératinocytes cultivés dans un milieu enrichi avec 30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ d'acide linoléique (Vicanova et al., 1999).....	89
Graphe 1 : Spectre d'action de la photocarcinogénèse (d'après de Gruijl, 1995).....	65
Graphe 2 : Corrélation entre le pourcentage d'acide linoléique et le rapport SOD/Cat dans des épidermes reconstruits uniquement avec des kératinocytes.....	207

Liste des communications

Posters :

Photoprotection assays on reconstructed epidermis with or without melanocytes :

M. Cario-André, C. Pain, O. Nikaido, Y. Gall and A. Taieb, *International Investigative Dermatology*, Cologne, Mai 1998

Are melanocytes photoprotective ? An ex-vivo study in reconstructed epidermis : M.

Cario-André, C. Pain, O. Nikaido and A. Taieb, *8th ESPCR Meeting*, Prague, Septembre 1998

Epidermes reconstitués avec des mélanocytes : validation du modèle en

photoprotection : M. Cario-André, J. Ginestar, Y. Gall et A. Taieb, CARD, Paris, Décembre 1998

Reconstructed epidermis with and without low phototype melanocytes : comparative study of UVB, UVA and UVA + B irradiation : M. Cario-André, S Briganti, M Picardo,

Ginestar, Y. Gall and A. Taieb, ESDR, Montpellier, Septembre 1999

Reconstructed epidermis with and without melanocytes : Do low phototype melanocyte protect against free radicals ? : M. Cario-André, S Briganti, M Picardo, J. Ginestar, Y. Gall

and A. Taieb, IPCC, Nagoya, Octobre 1999

Communications Orales :

How do UV interact with the cells of the epidermal-melanin unit ? : M. Cario-André, S Briganti, O Nikaido, V. Maresca, M Picardo and A. Taieb, ESPCR, Ulm, Septembre 2000

Symposium :

Do caucasoid melanocytes protect against ultraviolet radiation ? : M. Cario-André, S Briganti, M Picardo, J. Ginestar, Y. Gall and A. Taieb, ESP, Grenade, Septembre 1999

Photoprotection within the epidermal melanin unit : M. Cario-André, G. Farout, S Briganti, M Picardo, J. Ginestar, Y. Gall and A. Taieb, ISP, San Francisco, Juillet 2000