Perte d'homogénéité du teint chez la femme à peau mature : approches biométrologique et cellulaire du lentigo actinique

Ranesha Goorochurn

▶ **To cite this version:**

Ranesha Goorochurn. Perte d'homogénéité du teint chez la femme à peau mature : approches biométrologique et cellulaire du lentigo actinique. Dermatologie. Université de Franche-Comté, 2016. Français. NNT : 2016BESA3002 . tel-01775167

HAL Id: tel-01775167
https://theses.hal.science/tel-01775167

Submitted on 24 Apr 2018

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.

UNIVERSITE DE FRANCHE COMTE

ECOLE DOCTORALE « ENVIRONNEMENTS-SANTE »

Année 2016

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Franche-Comté
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 mars 2016

Par
Ranesha Goorochurn

LA PERTE D'HOMOGENEITE DU TEINT CHEZ LA FEMME A PEAU MATURE : APPROCHES BIOMETROLOGIQUE ET CELLULAIRE DU LENTIGO ACTINIQUE.

Co-directeurs : Dr. Christine Le Roy et Pr. Philipe Humbert

Monsieur Piccerelle Philippe, Professeur des Universités (PU)	Rapporteur
Monsieur Blank Ulrich, DR1 CNRS	Rapporteur
Madame Lafforgue Christine, Maître de conférences	Examinatrice
Madame Viennet Céline, Ingénieure d'Etudes Universitaire	Encadrante de thèse
Madame Granger Corinne, Docteur	Directrice scientifique de DERMANCE
Monsieur Humbert Philippe, PU-Praticien Hospitalier	Co-directeur de thèse
Madame Le Roy Christine, CR1 INSERM	Co-directrice de thèse

À NOS RAPPORTEURS

Monsieur Philippe PICCERELLE et Monsieur Ulrich BLANK

Vous nous faites l'honneur d'accepter et de juger ce travail.

Nous vous prions de trouver ici l'expression de toute notre gratitude.

À NOTRE EXAMINATRICE

Madame Christine LAFFORGUE

Merci de me faire l'honneur d'examiner ce travail de thèse.

Nous vous prions de trouver ici l'expression de toute notre gratitude.

À NOTRE CO-DIRECTRICE DE THESE

Madame Christine LE ROY

Tu es celle qui m'a donnée goût à la Recherche. La preuve, trois ans après je te contacte pour te parler de ce projet fou que j'ai en tête; tu n'as pas hésité une seule seconde à m'aider, me soutenir et me pousser à aller de l'avant.

Tout au long de ces années, tu as été ma lumière, celle qui m'a guidée et qui a su éclairer mon chemin, même quand celui-ci s'assombrissait. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, pour ton soutien, ta joie et ta bonne humeur au quotidien.

Je tenais à te témoigner toute ma reconnaissance, je ne te remercierais jamais assez pour m'avoir permis d'atteindre chacun de mes objectifs.

Le rayon de soleil de la Recherche.

À NOTRE CO-DIRECTEUR DE THESE

Monsieur Philippe HUMBERT

Vous m'avez accueillie au sein de votre équipe et m'avez fait découvrir le domaine de la biométrologie.

Vous avez su répondre présent lorsque j'ai dû contourner les obstacles rencontrés.

Merci pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'encadrer ce travail de thèse. Je souhaitais vous témoigner toute ma gratitude.

Madame Céline VIENNET

Ton encadrement, ton partage, ta disponibilité afin de me faire progresser dans mes travaux en biologie cellulaire, et ton soutien lors des moments difficiles m'ont été d'une grande aide. Je t'en remercie.

Madame Corinne GRANGER

Votre encadrement scientifique et vos précieux conseils m'ont permis de progresser rapidement dans les phases bloquantes de ce travail de thèse. Je vous en suis très reconnaissante.

Madame Nadine VARIN-BLANK

Tu m'as accueillie les bras grand ouverts une première fois lorsque j'ai souhaité intégrer ton unité.

De nouveau, les bras grand ouverts, tu n'as pas hésité à m'accueillir une seconde fois.

Tu as su faire preuve d'une grande générosité, pour cela, je te remercie sincèrement.

Ton sourire et ton soutien m'ont aidé à toujours aller de l'avant.

Cette dernière ligne droite n'aurait pas été aussi droite, sans tes encouragements.

Monsieur Philippe SAAS

Vous m'avez accueillie au sein de votre équipe.

Votre appui et vos encouragements m'ont permis de rendre ce travail aujourd'hui.

Aux BATATAS…

Il était une fois la naissance d'une amitié profonde et sincère.

À Anouchka, pour ta gentillesse, ton sourire, ton réconfort et ton aide. Tes talents de pâtissière qui éveillent sans cesse nos papilles.

À Lamia, pour ton soutien, ta fraîcheur, ton franc parler, les fous rires partagés. Ta voix mélodieuse arrive toujours à trouver nos oreilles.

À Maïssa, pour ta bonne humeur, ta patience, ton réconfort, ton soutien et ton aide. Pour cette cohésion qui ne serait jamais arrivée sans toi.

À Vanessa pour ton rire, ta joie de vivre, ton soutien, ta bonne humeur et ton aide. Pour ta personnalité haute en couleurs qui illumine notre quotidien.

Je vous adresse tous mes vœux de réussite.

A vous les hommes qui savez nous épauler dans nos moments difficiles, merci : Sidney, Patrick, Ouramdan.

À Hédia, Gisèle, Ouyame et Fred, depuis le lycée, notre amitié perdure. Vous m'avez toujours soutenue dans mes démarches et toujours poussée à aller plus loin. Merci pour votre présence rassurante et pour tous ces bons moments partagés.

À l'équipe Inserm U978 et U1098

Stéphanie et Anne, mes « collocs » de bureau. Merci pour ces fous rires partagés. Assise seule sur ma chaise de salon, je vous assure, vous me manquez déjà.

Un grand merci à Laura G., pour tes talents d'anglophone, ta contribution, ton sourire.

Dominique, merci d'avoir su répondre présent lors de mes doutes et de mes craintes.

Betty, merci de m'avoir montré comment exploiter mes résultats sous Metamorph*.*

Marion, pour m'avoir prise sous ton aile, moi la parisienne qui trouve destination à Besançon. Pour ton soutien sans faille.

À l'équipe CERT et SkinExigence

Isabelle, pour ton aide, ta disponibilité et ton sourire

Céline, Vanessa et Aurélie pour votre aide dans le perfectionnement à l'utilisation des outils biométrologiques, merci.

Brigitte et Agnès pour votre aide dans la gestion administrative de la thèse.

Ahmed, merci pour ton écoute, tes conseils et ton sourire.

Adeline, merci pour ton écoute, ton aide et ton orientation dans mes travaux de clinique.

Thomas, merci pour ton écoute, ton aide dans les statistiques et pour avoir su trouver les mots face aux frayeurs que j'ai pu avoir devant ces chiffres.

Sophie et Jean-Marie : pour vos nombreux conseils et vos orientations dans mes travaux de recherche clinique, votre disponibilité et votre positivité dans mes avancées.

L'équipe de DERMANCE

Isabelle RABIER, tu m'as accueillie au sein de DERMANCE et m'as permis de m'épanouir professionnellement en me permettant d'avoir la double casquette en Marketing et R&D. Tu m'as aidée à avancer et à concrétiser mes projets.

Pour cela, je souhaite te remercier et te témoigner toute ma reconnaissance.

Les filles de DERMANCE Chloé, Virginie, Alice, Christelle, Elsa pour votre soutien lors des mes moments de faiblesse. Votre énergie m'a grandement aidée !

Le garçon de DERMANCE : Pierre, toi qui réponds toujours présent, merci !

Anaïs pour nos fous rires, ton écoute, ton soutien et ton réconfort.

Gregory pour ton début d'encadrement en tant que directeur scientifique, pour ta joie de vivre et tes précieux conseils

À une belle rencontre chez Emoi-Emoi: Nelly pour avoir cru en moi avant même que je démarre cette thèse !

À mon coup de cœur de l'année : Jennifer pour m'avoir écoutée, rassurée et aidée à finir cette thèse dans les meilleures conditions.

A Jean-Claude Allart, une personne que j'admirais. Je souhaite lui dédier ce travail.

À mes parents, eux qui ont toujours su trouver les mots pour que je puisse repousser mes limites et développer mon potentiel.

Papa,

Depuis toute petite, je suis de nature à me préoccuper de ce que je ne sais pas encore faire. Tu me le rappelles assez souvent en me remémorant cette question que je t'ai posée lors de mon premier jour d'école : " Papa, comment je vais faire, je ne sais pas lire ? " et tu m'as répondu " Ma fille, ne t'inquiètes pas, tu vas apprendre " ...

Tes paroles sages m'apaisent et m'apaiseront toujours, merci …

Maman,

Ma source d'inspiration

Pour notre complicité ... Tu m'as appris à m'affirmer et à avoir confiance en moi, à ne jamais baisser les bras.

Tu réponds toujours présente lorsque je n'arrive plus à me relever. Du coin de l'œil, tu me protèges et ne laisses personne m'atteindre …

Ma sœur,

Tu es la chair de ma chair

Au delà des liens du sang ... tu es mon amie, ma confidente, mon pilier, rien ne pourra nous séparer

Prends ma main, allons voir ensemble de quoi la vie future est faite…

Natasha,

Ma cousine, ma sœur, toi qui as su répondre présente à chaque instant de ma vie, toi qui m'a aidée à franchir certains obstacles, nos fous rires, ta joie, ta générosité, sans toi ma vie serait bien morose …

Reeta,

La sœur de ma maman mais, tout comme une seconde maman, tu n'as pas hésité à m'aider pour me soulager dans mes tâches quotidiennes. La générosité te définit tellement bien !

Kris,

Ma moitié...

Ton sourire et ton humour ensoleillent ma vie

Tu m'as toujours poussée et soutenue dans mes études

Tu as su me supporter durant cette période très difficile de ma vie

Ton soutien est très important pour moi et m'aide au quotidien

Reste mon pilier éternellement…

Résumé

La couleur de la peau chez un individu, appelée teint ou complexion, évolue au cours du temps et dépend de facteurs extrinsèques et intrinsèques. Une perte de son homogénéité est liée à l'apparition de lésions cutanées hyperpigmentées. Elles sont notamment provoquées par une exposition chronique au soleil et apparaissent avec l'âge, comme dans le cas du lentigo actinique. Si cette lésion hyperpigmentée bénigne est bien caractérisée à l'échelle macroscopique, peu d'études explorent ses fonctions cutanées grâce à des outils non invasifs. À l'échelle cellulaire et moléculaire, cette lésion hyperpigmentée bénigne résulte d'une altération du processus de pigmentation lors de la régulation du phénomène de photo-protection cutané. Si le modèle actuel d'une perte de cette régulation prend en compte l'altération du dialogue fonctionnel entre les couches épidermique et dermique, aucune étude ne décrit les caractéristiques fonctionnelles des cellules primaires extraites du lentigo actinique.

Le premier objectif de mon projet a consisté en une exploration fonctionnelle du lentigo actinique par l'utilisation de divers paramètres biométrologiques. L'étude a été réalisée sur une cohorte de 80 femmes dont certaines présentent peu (grade 1) et, d'autres plusieurs, lentigos actiniques (grade 2) sur le visage. Après illustration du grade par une mesure photographique, différentes approches biométrologiques ont quantifié les taux de sébum, de mélanine, d'hémoglobine, d'hydratation, de réflexion de la lumière et de couleur (L*, a*, b* et ITA). Les résultats des analyses statistiques montrent que 1) la quantité de sébum discrimine les territoires cutanés de la joue et du front, 2) les taux de mélanine, d'hémoglobine, de réflexion de la lumière et de couleur sont différentiels entre les zones lésées (lentigo actinique) et non lésées, adjacentes au sein du territoire de la joue chez un volontaire, 3)que la diminution des taux de réflexion de la lumière et d'hémoglobine, ainsi que l'augmentation du taux d'hydratation, est observée au sein de la zone lésée entre les grades 1 et 2. L'ensemble de ces données ont mis en évidence certains paramètres biométrologiques comme indicateurs du territoire cutané, de la zone lésée *vs* non lésée et de l'évolution (grade 2 vs 1) du lentigo actinique.

Le second objectif a porté sur une analyse morphologique et fonctionnelle des fibroblastes primaires du lentigo actinique. L'étude a été réalisée sur une cohorte de 10 volontaires sur lesquels deux biopsies contenant les zones lésées et non lésées, adjacentes ont été prélevées. À partir de ces biopsies, les fibroblastes primaires humains ont été mis en culture. Une approche d'immunofluorescence révèle que les fibroblastes de lentigo actinique (FL) et ceux de la zone saine adjacente (FS) n'ont pas les mêmes caractéristiques morphologiques avec une organisation différentielle de leur cytosquelette d'actine. Une approche fonctionnelle montre que les FL ont une diminution de leur activité métabolique, de leur taux de prolifération et de leur capacité migratoire. À l'inverse, les FL sont dotés d'une augmentation de leur capacité sécrétoire en terme de facteurs solubles. Notre modèle *in vitro* de fibroblastes primaires (couples FL/FS), qui présentent des similitudes avec les caractéristiques décrites *in vivo*, représenterait un modèle cellulaire adéquat pour tester des principes actifs dont l'efficacité permettrait de réduire l'hétérogénéité du teint chez les femmes à peaux matures.

Ces deux objectifs, qui ont été réalisés par des approches en recherche clinique et translationnelle, ont permis de mettre en évidence des indicateurs et des biomarqueurs du lentigo actinique qui permettront de mieux comprendre l'impact des facteurs intrinsèques et extrinsèques dans la perte d'homogénéité du teint liée au lentigo actinique.

Mots-clés : lentigo actinique, biométrologie, indicateur, fibroblaste primaire, biomarqueur

Abstract

Based on extrinsic and intrinsic factors, skin complexion of an individual evolves in time. The loss of its homogeneity is linked to the appearance of hyperpigmented lesions. The latters are induced by chronic sun exposure and appear with the age, as in the solar lentigo disorder. Despite its well-known characterization at the macroscopic levels, only few studies explore the skin functions of the solar lentigo with non-invasive tools. At the cellular and molecular levels, this lesion results from an altered process of pigmentation that is involved in the regulation of the cutaneous photo-protection. Despite the changes of the functional dialogue between the epidermic and dermic layers, no study describes the functional characteristics of primary cells isolated from the solar lentigo.

The first aim of my project consisted on a functional exploration of the solar lentigo by the use of diverse biometrological parameters. The study was carried out on a cohort of 80 women, some of them had few (grade 1) and others many solar lentiges (grade 2) on their faces. Thanks to photographic measurements to determine the grade, various biometrological approaches had quantified the rates of sebum, melanin, hemoglobin, moisturizing, light reflection and the colour (L*, a*, b* and ITA). Results of the statistical analyses revealed that the quantity of sebum discriminates the skin territories of the cheek and forehead, 2) the rates of melanin, hemoglobin, light reflection and the colour were differential between affected (solar lentigo) and not affected zones, within the volunteers' cheek territory, and 3) decreased rates of light reflection and hemoglobin, as well as, increased rate moisturizing, were observed within the lesional zone between both grades. Altogether, our data highlighted some of the biometrological parameters, as indicators of the skin territory, the lesional vs non lesional areas and the progression (grade 2 vs 1) of solar lentigo.

The second aim covered morphological and functional analyses of the solar lentigo's primary fibroblasts. This study was carried out on a cohort of 10 volunteers and two biopsies, containing the peri-lesional and lesional areas, were taken from each person. From these biopsies, human primary fibroblasts were isolated and grown. An immunofluorescence approach revealed that the fibroblasts of solar lentigo (FL) and those from adjacent healthy areas (FS) did not depict similar morphological characteristics with a differential organization of their actin cytoskeleton. Functional approaches demonstrated that FL displayed decrease of their metabolic activity, their proliferation rates and their migration capacity, compared to FS. On the contrary, FL showed increased secretion capacity in terms of soluble factors. Our *in vitro* model of primary fibroblasts (FL/FS), which showed similarities with *in vivo* fibroblast's characteristics, might be considered as an appropriate cellular model to test active principles targeting skin complexion heterogeneity in women with mature skin.

Using clinical and translational research approaches, both objectives highlighted indicators and biomarkers of the solar lentigo. This work contributed to better understand the impact of the intrinsic and extrinsic factors in the loss of complexion homogeneity.

Keywords: solar lentigo, biometrology, indicator, primary fibroblast, biomarker

Table des matières

INTRODUCTION 19

Première partie : 20

L'homogénéité du teint 20

I. Principales fonctions et structure de la peau 21

1. Fonction sociale de la peau et représentation de soi 21

2. Fonctions physiques de la peau 21

2.1. La protection 21

2.2. Régulation sensorielle et nutritionnelle 22

2.3. La fonction immunitaire 23

3. Les constituants structuraux cutanés 23

3.1. La couche épidermique 24

3.2. La couche dermique 28

3.3. La jonction dermo-épidermique 32

3.4. L'hypoderme 34

4. Le processus physiologique de la pigmentation cutanée 34

4.1. La mélanogénèse 35

4.2. Les voies de signalisation impliquées dans la mélanogénèse 37

4.3. Autres cytokines sécrétées et impliquées dans la mélanogénèse 41

Deuxième partie : 45

L'hétérogénéité du teint 45

II. Le vieillissement cutané et hétérogénéité du teint 46

1. Déséquilibres hormonaux 46

1.1. Estrogènes et progestérone 46

1.2. Mélatonine 47

2. Modifications des fonctions physiques 48

2.1. Altération de la fonction de protection 48

3. Modifications des constituants structuraux cutanés 50
3.1. Altération de la couche épidermique 50
3.2. Altération de la couche dermique 52
3.3. Altération de la jonction dermo-épidermique 59
3.4. L'altération de la couche hypodermique 62
4. Dérégulation de la pigmentation cutanée dans le lentigo actinique 63
4.1. Le contexte macroscopique du lentigo actinique 63
4.2. Altération de la mélanogénèse dans le lentigo actinique 64
MES TRAVAUX 67
Mes travaux en recherche clinique 68
I. Synthèse des résultats de mes recherches en clinique 69
Article : Exploration fonctionnelle du lentigo actinique par l'utilisation de divers paramètres biométrologiques : indicateurs d'une lésion hyperpigmentée bénigne 71
II. Introduction 72
III. Matériel et Méthode 73
IV. Résultats 76
V. Discussion 86
Mes travaux en recherche translationnelle 90
I. Synthèse des résultats de mes travaux en recherche translationnelle 91
Article : Caractérisations morphologiques et fonctionnelles des fibroblastes isolés du lentigo actinique 92
DISCUSSION 126
I. Exploration fonctionnelle du lentigo actinique par l'utilisation de divers paramètres biométrologiques : indicateurs d'une lésion hyperpigmentée bénigne 128
II. Caractérisations morphologiques et fonctionnelles des fibroblastes isolés du lentigo actinique 132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 137
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 146
ANNEXES 148

ANNEXE 1: Composition cosmétique et dermatologique revitalisante 149

ANNEXE 2 : Composition cosmétique et/ou dermatologique comprenant un extrait végétal et un activateur de gènes 177

ANNEXE 3: Biological process in solar lentigo: a look on experimental models 190

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Représentation schématique d'une peau normale 24
Figure 2: La pénétration des rayonnements UVs dans les couches cutanées. 26
Figure 3: Représentation schématique des 4 modèles du transfert de mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes. 27
Figure 4: Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique. 33
Figure 5: Le processus de la mélanogénèse (production de l'eumélanine et la phéomélanine) 36
Figure 6: Augmentation du nombre de cellules du stratum corneum dans le lentigo actinique. 51
Figure 7: Représentation schématique du remodelage de la matrice extracellulaire dans les processus de vieillissement chronologique (old photoprotected), de vieillissement photo-induit (old photoexposed) par rapport au processus normal (young). 53
Figure 8 : Comparaison morphologique de fibroblastes photo-exposés et jeunes. 54
Figure 9 : Coupes histologiques colorées de peaux reconstruites à partir de fibroblastes papillaires et réticulaires extraits de peau jeune (A, B) et âgée (C, D). 56
Figure 10 : Mesure de la pigmentation dans les deux modèles de peau reconstruite à partir des fibroblastes jeunes et des fibroblastes photo-âgés. 57
Figure 11: Marquage du CD31 sur des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies de zone non pigmentée (a) et de zone hyperpigmentée de lentigo actinique (b). 59
Figure 12: Comparaison des jonctions dermo-épidermiques sur coupes histologiques de biopsies issues d'une peau jeune et d'une peau âgée. 60
Figure 13: Epiderme et complexité des jonctions épidermiques sur des coupes histologiques issues de biopsies de zones cutanées saine, non lésée et lésée (lentigo actinique). 61
Figure 14: Modification du niveau de pigmentation suite à un traitement par un inhibiteur d'héparanase dans un modèle de peau reconstruite. 62
Figure 15: Observation macroscopique de 4 lésions hyperpigmentées : le lentigo actinique (A), la kératose séborrhéique (B), la kératose actinique (C) et mélanome lentigo malin (D). 64

Tableau 1 : La classification de phototype de peau selon Fitzpatrick 34

Liste des abréviations

ADN: Acide DesoxyriboNucléique

α-MSH : alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone

ARNm : Acide RiboNucléique messager

α-SMA : alpha-Smooth Muscle Actin

Cellule T-γδ : Cellule T Gamma Delta

DKK : Dikkopf

ET-1: Endothéline-1

ETBR: ETB type endothéline receptor

FGF: Fibroblast Growth Factor

GM-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor

HGF: Hepatocyte Growth Factor

IL : Interleukine

IL-1α : Interleukine 1-alpha

JDE : Jonction Dermo-Epidermique

KGF: Keratinocyte Growth Factor

L-DOPA: L-didroxyphenylalanine

MC1-R: Mélanocortine 1 Receptor

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MIFT: Microphthalmia-associated transcription factor

PAR-2: Protease Activated Receptor -2

POMC: Proopiomelanocortine

SCF: Stem Cell Factor

SMAD: Mothers against decapentaplegic

SMAD-1: Mothers against decapentaplegic homolog 1

SMAD-4: Mothers against decapentaplegic homolog 4

TGFβ1: Transforming Growth Factor Beta 1

Trp-1: Tyrosinase-related protein-1

Trp-2: Tyrosinase-related protein-2

Tyr: Tyrosinase

UV(s): Ultraviolet(s)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Wnt: Wingless-type

Avant-propos

Mon projet de thèse a consisté en l'étude de « la perte d'homogénéité du teint chez la femme à peau mature ». Ce projet s'est déroulé au sein de deux sites de recherche académiques, les laboratoires LIBC (UMR1098 UFC/INSERM/EFS) de Besançon et ASIH (UMR978 INSERM/Université Paris 13) de Bobigny, ainsi que dans l'entreprise DERMANCE à Paris dans laquelle j'ai gardé une activité professionnelle. Mon contrat doctoral a été financé par une convention OSEO/Bip et un contrat CIFRE/ARNT.

Dans un contexte physiologique, la peau protège l'organisme de facteurs extrinsèques et intrinsèques. Sa couleur chez un individu, appelée teint ou complexion, évolue au cours du temps et dépend d'une multitude de paramètres. Les fonctions cutanées sont assurées par sa structure organisée en 3 couches superposées qui comprend l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Dans un contexte pathologique, une perte de l'homogénéité du teint est notamment liée à une diminution de l'épaisseur de l'épiderme, à une perte de certaines de ses propriétés telle que l'élasticité, et à l'apparition de lésions hyperpigmentées qui peuvent être induites par une exposition au soleil.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée au modèle du lentigo actinique (communément appelé «tache de vieillesse») qui est une lésion cutanée hyperpigmentée bénigne. Par des approches en recherche clinique et en recherche translationnelle, mes principaux objectifs ont consisté en l'identification de paramètres biométrologiques et en une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires/moléculaires déclenchés par les facteurs extrinsèques et intrinsèques dans l'altération de l'homogénéité du teint.

Sachant que le lentigo actinique est considéré comme un signe de vieillissement cutané et qu'il a des conséquences esthétiques et psychologiques négatives chez la femme, l'objectif à plus long terme de ce projet réside dans le développement de nouvelles formulations « anti-taches et éclat du teint » en application topique.

INTRODUCTION

Première partie :

L’homogénéité du teint

I. Principales fonctions et structure de la peau

Nommée aussi tégument, la peau est l’organe dont la superficie est la plus grande du corps humain. Elle représente la première interface sociale et physique de l’individu avec son environnement (1).

1. Fonction sociale de la peau et représentation de soi

L’apparence de la peau par sa couleur (teint ou complexion) est un facteur important au sein de notre société. En dehors d’être le reflet de notre personnalité, la peau peut exprimer non seulement nos émotions mais également être un indicateur de notre état physique et psychologique. Par exemple, la timidité peut se manifester par des rougeurs localisées, la fatigue se traduire par un teint terne et la tristesse par des traits marqués. L’aspect de la peau est donc un paramètre important dans le contact avec autrui.

Elle joue également un rôle essentiel dans la représentation de soi. En effet, des études cliniques montrent qu’une faible attirance physique augmente le risque de maladies psychiatriques (2). Sachant que les pathologies cutanées touchent environ 1,9 milliards d’individus, soit un tiers de la population mondiale (3), elles impactent donc considérablement le facteur « estime de soi ». Au-delà de cette interface sociale, la peau joue un rôle fondamental en tant que barrière physique qu’elle remplit notamment par ses fonctions de protection, de régulation thermique et de défense immunitaire.

2. Fonctions physiques de la peau

2.1. La protection

La peau protège l’organisme contre les agressions du milieu extérieur comme les attaques mécaniques, chimiques et pathogènes. Elle consiste en une barrière dynamique qui prévient principalement la perte ou l’excès d’eau, en assurant un contrôle hydrique bidirectionnel (4). Ce contrôle est assuré notamment par deux sortes de glandes. Dans un sens, les glandes sudoripares, en sécrétant de l'eau, des sels minéraux et des déchets métaboliques, participent à la constance du milieu intérieur. Dans l’autre sens, les glandes sébacées, en fabriquant du sébum composé de lipides (majoritairement des céramides), contribuent à la rétention de l’eau (5).

L’équilibre homéostasique est également soutenu par la présence d’antioxydants cutanés, comme les vitamines C et E, les α-/γ-tocophérols et certains flavonoïdes, qui préviennent

l’oxydation des lipides du sébum (4). Cet équilibre est également assuré par une acidité (pH < 5.5) de la surface de la peau qui participe à la construction d’une barrière antimicrobienne (4, 6). De plus, la sécrétion de sébum garantit une barrière photo-protectrice contre les rayonnements ultraviolets (UVs). En effet, le sébum permet une réflexion d’une partie de la lumière qui réduit ainsi la dose d’exposition aux irradiations. Cette première ligne de défense est secondée par la synthèse de mélanine, un pigment généré suite à une exposition aux UVs et dont la fonction consiste à absorber et diffuser les UVs (4 , 5 , 6). L’acide urocanique, un métabolite de l’histidine présent dans la couche cutanée la plus externe, aurait également un rôle dans l’absorption des rayonnements UVs (5).

2.2. Régulation sensorielle et nutritionnelle

En dehors de sa fonction protectrice, la peau remplit un rôle fondamental dans le processus de thermorégulation grâce aux systèmes microcirculatoires et nerveux.

Le système microcirculatoire est un microsystème intégré dans les organes, les tissus et notamment dans le tissu cutané (7). De part sa fonction de nutrition et d’oxygénation de la peau (5), ce système vasculaire cutané concoure à la couleur de la peau avec l’oxyhémoglobine de couleur rouge et la carboxyhémoglobine de couleur pourpre. Dans des conditions physiologiques, la proportion de ces deux transporteurs se traduit par un teint rosé et lumineux qui participe à un effet « bonne mine ». La fonction essentielle de la microcirculation réside dans la régulation de la température corporelle. En effet, son réseau de micro-vaisseaux se dilate lors d’un stress lié à la chaleur et inversement, se contracte lors d’un stress lié au froid (8).

Cette réponse au stress est liée au système nerveux périphérique de la peau. Principalement en contact avec l’environnement extérieur, ce système détecte continuellement une variété de stimuli qu’il traduit et transmet au système nerveux central. Ainsi par les récepteurs sensoriels, tels que les thermorécepteurs, le système nerveux périphérique de la peau permet un maintien de la température corporelle sous le contrôle de l’hypothalamus et ce, quel que soit le niveau d’activité métabolique de l’individu et la température du milieu environnant. D’autres récepteurs sensoriels, tels que les mécanorécepteurs, sont quant à eux sollicités en réponse à une stimulation tactile. Par exemple, les mécanorécepteurs comme les corpuscules de Meissner et de Pacini sont sensibles au toucher léger, alors que les corpuscules de Merkel et de Ruffini permettent une perception tactile de haute résolution (9).

2.3. La fonction immunitaire

Lorsqu'elle est intacte, la peau constitue une barrière résistante aux attaques microbiennes tout en étant soutenu par le système immunitaire cutané. Ce système d'immuno-surveillance intervient lors de la menace d'un micro-organisme et/ou lorsque le tissu cutané est lésé. Son déclenchement met en jeu des cellules sentinelles et effectrices de l'immunité innée et adaptative pour protéger l'individu contre des infections et restaurer l'intégrité de la peau.

L'immunité de la peau est constituée d'une première barrière de défenses biochimiques constituées par les acides gras du sébum ainsi que des protéines et peptides antimicrobiens. Cette défense antimicrobienne est assurée par les cellules sentinelles cutanées que sont les kératinocytes. Elle aboutit à l'activation des mastocytes et au recrutement des cellules du système inflammatoire ainsi que des cellules dendritiques.

En cas de rupture de cette barrière, des cellules des systèmes immunitaires inné/adaptatif et des facteurs solubles entrent en action pour éliminer les agents pathogènes dans les tissus sous-jacents. Deux types de cellules immunitaires sont particulièrement retrouvées dans la peau, à savoir les cellules de Langerhans, qui sont des cellules présentatrices d'antigènes de l'épiderme, et des sous-populations de lymphocytes T du derme qui une fois stimulées prolifèrent dans le tissu cutané lésé (5).

La synthèse de nombreuses cytokines et facteurs de croissance par les cellules cutanées et immunitaires permet de déclencher et d'amplifier la réponse inflammatoire afin d'amorcer la régénération cutanée. Cette dernière est accompagnée d'une vascularisation *de novo* du tissu lésé qui permet l'apport de constituants importants pour la fermeture de la plaie. Cette fermeture implique un remodelage cutané par la production de composants structuraux de la matrice extracellulaire comme le collagène permettant de rétablir l'intégrité de la peau (10).

3. Les constituants structuraux cutanés

Les différentes fonctions du tégument, décrites brièvement ci-dessus, sont liées à la structure de la peau qui est organisée en trois couches superposées que sont l'épiderme, le derme et l'hypoderme [**Figure 1 : .** Il est important de noter que les couches épidermique et dermique sont séparées par une jonction dermo-épidermique qui contrôle leurs échanges. L'épiderme et le derme sont principalement composés de kératinocytes/mélanocytes et de fibroblastes, respectivement. Les glandes sébacées et sudoripares sont, quant à elles, localisées dans la couche dermique et participent à l'équilibre cutané.

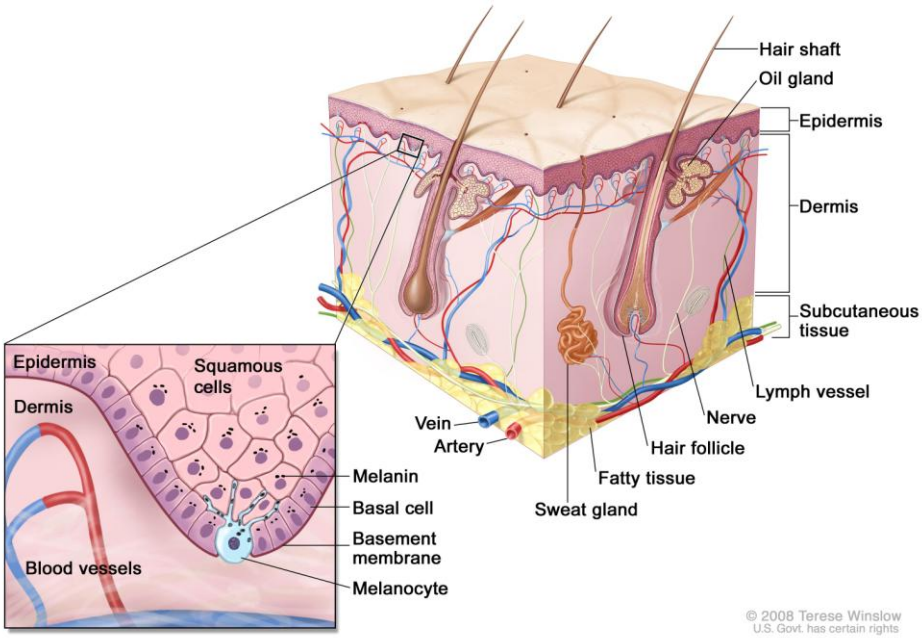


Figure 1 : Représentation schématique d’une peau normale

La peau est composée de trois couches superposées : l’épiderme (epidermis), le derme (dermis) et l’hypoderme (subcutaneous tissue). Les couches épidermique et dermique sont séparées par la jonction dermo-épidermique (basement membrane) qui est localisée juste au dessous des kératinocytes de la couche basale (basal cell). La peau est constituée d’un complexe de vascularisation localisé dans le derme ainsi que d’un réseau de nerfs. Les glandes sébacées (oil gland) et sudoripares (sweat gland) sont également situées dans le derme. Bien que le poil (hair shaft) soit présent à la surface de l’épiderme, le follicule pileux (hair follicle) est, quant à lui, situé dans la couche dermique.
D’après : www.cancer.gov/types/skin/hp/skin-genetics-pdq, en date du 06/12/2015.

3.1. La couche épidermique

En superficie, l’épiderme se divise en quatre couches avec les couches germinale (stratum basale), à épines (stratum spinosum), granuleuse (stratum gransulosum) et cornée (stratum corneum). Le stratum corneum est une barrière métaboliquement active avec 60 % de protéines de structure, 20 % de lipides et 20 % d’eau (11). Son intégrité dépend de sa composition lipidique (le cholestérol, les céramides, et les acides gras) (11). La couche épidermique est majoritairement composée de kératinocytes (environ 90 %) et de mélanocytes auxquels s’associent les cellules de Langherans et cellules de Merkel. Si cette couche cutanée ne contient pas de vaisseaux sanguins ou lymphatiques, elle est dotée de multiples terminaisons nerveuses.

3.1.1. Les kératinocytes

Les kératinocytes, qui structurent la couche épidermique, lui confèrent un rôle protecteur vis à vis de l’environnement. Directement en contact avec le milieu externe, la couche cornée est composée de kératinocytes, nommés cornéocytes, qui sont dépourvus de noyau et à un stade de

différenciation terminale. La différenciation kératinocytaire, qui se déroule chronologiquement de la couche basale à la couche cornée, permet un renouvellement du tissu cutané (12) et un maintien de l’hydratation cutanée qui met en jeu les cornéodesmosomes dont la fonction consiste à unir les cornéocytes. Ce processus de kératinisation est particulièrement retrouvé lors d’une exposition solaire de l’individu **[Figure 3 :]**. En effet, la multiplication des kératinocytes se produit dans la couche germinale dans laquelle les kératinocytes contiennent de nombreux grains de mélanine phagocytés qui permettent à l’épiderme de se protéger contre les effets nocifs des rayonnements UVs. La présence de ces grains dans les kératinocytes suggère leur rôle dans la régulation de la pigmentation cutanée. Au cours de la différentiation kératinocytaire, les cellules s’aplatissent et leur cytoplasme se charge de filaments de kératine groupés en faisceaux denses (couche spineuse), puis en grains de kératinosomes (couche granuleuse) qui seront exocytés dans les espaces extracellulaires de la couche cornée. L’exposition solaire se traduit ainsi par un épaississement de l’épiderme (13) grâce à un phénomène d’hyperplasie cutané qui protège naturellement l’individu en limitant la pénétration des rayons UVs. Cette augmentation du volume tissulaire est causée par une hyper-prolifération des kératinocytes qui sécrètent des cytokines capables de moduler l’activité des mélanocytes (14).

3.1.2. Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques qui se sont différenciées à partir de mélanoblastes. Ils migrent et prolifèrent au niveau du stratum basal pour se différencier en mélanocytes matures (14). Suite à une exposition aux rayonnements UVs [**Figure 3**], les mélanocytes produisent de la mélanine dans des organelles spécifiques retrouvés dans leur cytoplasme, les mélanosomes. Ces derniers, une fois matures, sont alors transférés aux kératinocytes (14).

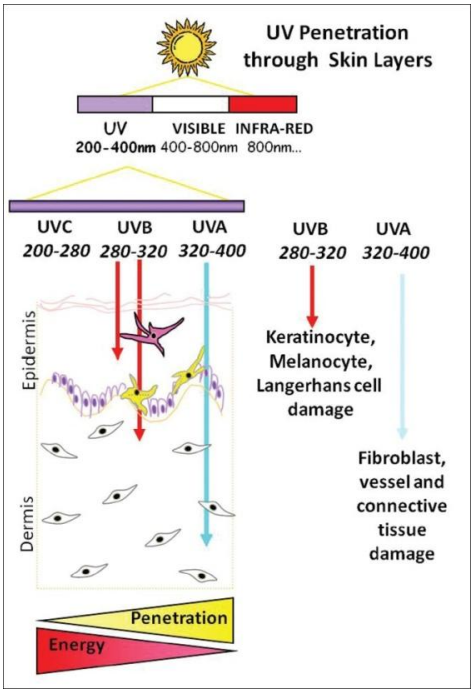


Figure 2: La pénétration des rayonnements UVs dans les couches cutanées.

La lumière solaire est constituée notamment de longueurs d'onde correspondant aux UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) et UVC (100–280 nm, absorbées dans l'atmosphère), ainsi qu'aux infrarouges (760 – 1440 nm).
Les UVA, dont les longueurs d'onde sont les plus fortes, pénètrent la couche la plus profonde de la peau et atteignent les constituants du derme (fibroblastes et vaisseaux sanguins). Les UVB, quant à eux, infiltrent l'épiderme et peuvent entrainer des lésions des kératinocytes, des mélanocytes et des cellules de Langherans.
D'après Battie C. et al Indian J Dermatol Venereol Leprol, 78 Suppl 1, S9-S14, 2012.

A l'heure actuelle, le processus de transfert de mélanine n'est pas complètement élucidé et donne lieu aux 4 modèles suivants [**Figure 3**] : 1) « la cytophagie » dans laquelle, les kératinocytes sont des partenaires actifs, phagocytant les pointes des dendrites des mélanocytes qui contiennent les mélanosomes matures ; 2) « la fusion » qui implique un passage des mélanosomes d'un type cellulaire à autre par une fusion des membranes plasmiques des mélanocytes et kératinocytes; 3) « la cytocrinie » dans laquelle les mélanocytes injectent leur contenu en mélanine aux kératinocytes voisins; et enfin 4) « la décharge » au cours de laquelle, les mélanosomes matures sont libérés dans l'espace intercellulaire et sont internalisés par les kératinocytes adjacents (15 , 16). Cette translocation se fait par l'intermédiaire de Protease Activated Receptor -2, un récepteur exprimé à la surface des kératinocytes. De façon intéressante, PAR-2 est surexprimé lors d'une irradiation UV (Seiberg M. *et al.*, 2001), renforçant son rôle dans le processus de pigmentation. Une fois transférée dans le cytoplasme des kératinocytes, la mélanine se répartie au-dessus des noyaux (17) et protège ainsi l'ADN cellulaire des effets toxiques des irradiations (5). Une unité épidermique de mélanisation (UEM) correspond à l'association d'un mélanocyte capable de synthétiser et de transférer sa mélanine à 30 ou 40 kératinocytes (14, 18).

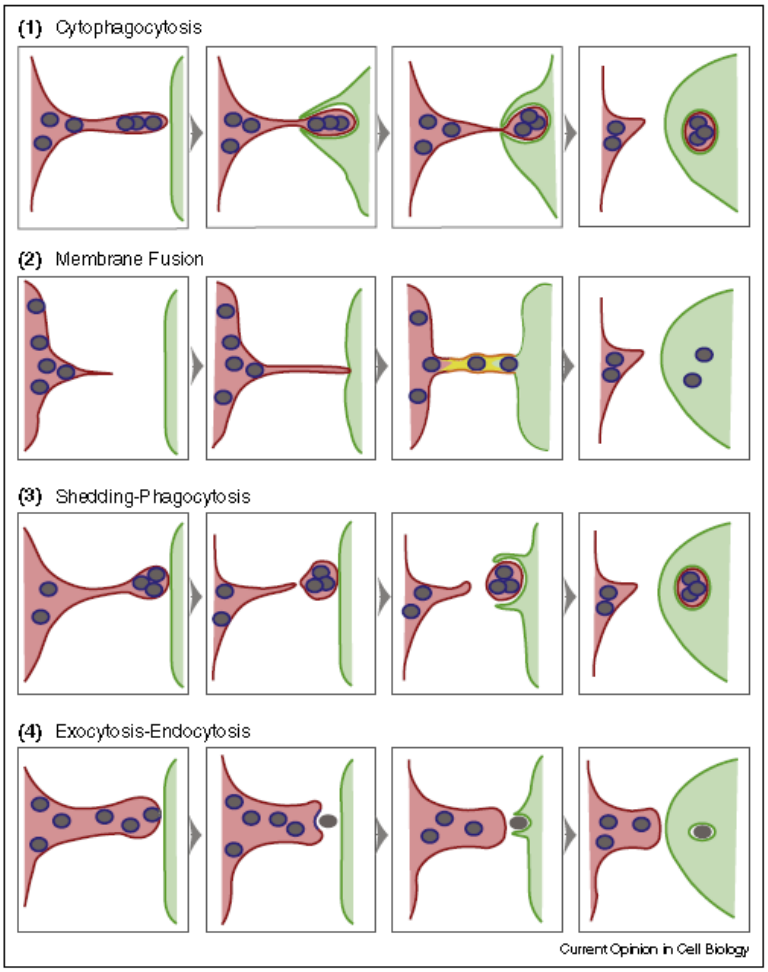


Figure 3 : Représentation schématique des 4 modèles du transfert de mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes.

Le mécanisme de transfert des mélanosomes met en jeu trois types de membrane: la membrane des mélanosomes (bleu), la membrane plasmique des mélanocytes (rouge) et celle des kératinocytes (vert). Dans le modèle de « fusion » (2), la fusion des deux membranes est indiquée en jaune. Les modèles 1, 3 et 4 nécessitent une phagocytose des kératinocytes pour accomplir le transfert des mélanosomes ; processus qui requière l’expression de PAR-2 à la surface membranaire des kératinocytes.
D’après Wu X. et al Current Opinion in Cell Biology, 29, 1-7, 2014.

3.1.3. L’unité cutanée de mélanisation

Les mélanocytes de l’épiderme sont entourés de différents types cellulaires qui produisent des cytokines, hormones et facteurs de croissance modulant non seulement leur production de mélanine mais également leur prolifération et leur survie. Cette dépendance vis à vis des facteurs solubles sécrétés est suggérée par une survie plus courte des mélanocytes cultivés *in vitro* (18). En revanche, une survie plus longue et une morphologie dendritique normale des mélanocytes est observée lorsque ces derniers sont co-cultivés en présence de kératinocytes (19). De plus, si une mono-culture de mélanocytes produit peu de mélanine en réponse à une forte exposition aux UVB, une co-culture de mélanocytes et kératinocytes conduit à une synthèse plus forte du

pigment, à une dose plus faible d'UVB (19), suggérant une contribution essentielle des kératinocytes dans la survie et la mélanogénèse des mélanocytes.

Plus récemment, ce modèle d'UEM a été élargi par l'intégration des cellules de Langerhans, donnant ainsi naissance à l'unité « Kératinocytes Langerhans Mélanocytes (KLM) ». En effet, les mélanocytes exercent non seulement une fonction photo-protective par la synthèse de mélanine, mais également une fonction d'immuno-compétence par la présentation d'antigènes qui déclenche la prolifération des cellules T (18). Les cellules de Langerhans, qui se déplacent dans les strates les plus superficielles de l'épiderme, interagissent avec les mélanocytes et kératinocytes et capturent les agents pathogènes. Elles sécrètent aussi des facteurs qui influencent les principales fonctions de différenciation des kératinocytes et des mélanocytes (18). Les cellules de Langerhans sécrètent, en effet, l'α–MSH qui stimule la synthèse de mélanine; l'expression du récepteur à cette hormone étant présent à la surface des cellules de Langerhans, des mélanocytes et kératinocytes (18).

La notion d'unité « KLM » peut être étendue à celle d'une unité épidermique – dermique, désignée comme « unité cutanée de mélanisation ». En effet, de plus en plus de travaux démontrent le rôle fondamental des fibroblastes dans la régulation pigmentaire cutanée (18).

3.2. La couche dermique

Le derme est la couche cutanée située entre l'épiderme et l'hypoderme et se divise en deux avec le derme papillaire et le derme réticulaire. Le derme papillaire est une couche cellulaire fine et sa fusion avec la couche basale de l'épiderme permet la formation de la jonction dermo-épidermique (JDE). Le derme réticulaire est, quant à lui, la couche la plus profonde. Ce tissu conjonctif est composé de cellules et de fibres qui lui confèrent non seulement des propriétés mécaniques et protectives mais également un rôle nutritionnel par sa détention du système vasculaire de la peau (5).

La matrice extracellulaire (MEC) regroupe l'ensemble des macromolécules, la substance fondamentale et les fibres qui sont situées entre les cellules. Considérée comme le « ciment intercellulaire », elle est sécrétée et organisée par les cellules du derme, et notamment par les fibroblastes.

Les macromolécules ou les protéoglycanes sont la combinaison de protéines et de chaînes polysaccharidiques de glyco-aminoglycanes « GAG ». Les principaux GAG retrouvés dans la peau, comme l'héparane sulfate, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'acide

hyaluronique, apportent des propriétés hygroscopiques et des capacités de filtration et de diffusion de molécules de signalisation comme les cytokines (20).

Le collagène et l'élastine, qui représentent les fibres de la MEC, sont synthétisés par les fibroblastes. Le collagène, qui représente jusqu'à 30 % du volume du derme avec 65 % de collagène de type I et 15 % du type III (5), procure à la peau de bonnes propriétés de résistance cutanée. L'élastine, quant à elle, garantit le maintien de l'élasticité de la peau (12).

3.2.1. Les cellules dermiques

Les cellules qui composent le derme sont essentiellement des fibroblastes. Il est important de noter que les cellules endothéliales qui y résident ne participent pas à la structure de celui-ci.

3.2.1.1. Les fibroblastes

Les fibroblastes sont les constituants cellulaires principaux du tissu conjonctif qui est retrouvé au sein de chaque tissu et organe de l'organisme. D'origine mésenchymateuse (21), les fibroblastes forment une population cellulaire hétérogène sur les plans morphologique et fonctionnel (22). Une telle diversité donnerait naissance aux couches papillaire et réticulaire du derme qui sont composées de deux types fibroblastiques (22).

3.2.1.2. La sous-population des fibroblastes dermiques

Les fibroblastes papillaires et réticulaires sont deux types cellulaires difficiles à distinguer puisqu'ils n'expriment pas de marqueurs stables spécifiques. Il est tout de même intéressant de noter que les fibroblastes papillaires produisent moins de collagène que leur homologues réticulaires, leur permettant d'aboutir à la guérison d'une blessure sans entrainer une fibrose pathologique (21). Les fibroblastes réticulaires ont, quant à eux, la capacité de se différencier en adipocytes tout en produisant du collagène en grande quantité ; ceci leur confère un éventuel rôle fonctionnel dans la reconstruction mammaire lors d'une mammectomie (21). Malgré l'absence de marqueurs, les fibroblastes papillaires et réticulaires peuvent être distingués sur leur profil de sécrétion cytokinique. En effet, les fibroblastes « papillaire-like » produisent en plus grande quantité du GM-CSF et en plus faible quantité du KGF par rapport aux fibroblastes « réticulaire-like » (22).

Par ailleurs, des populations cellulaires liées à celles des fibroblastes permettraient la formation des myofibroblastes. Ces derniers ont pour caractéristique principale d'exprimer une isoforme de l'actine qui est l'alpha-smooth muscle actin (α-SMA). Sous la forme de filaments, l'

α -SMA permet aux cellules d'acquérir des propriétés contractiles (22) qui sont nécessaires au processus de cicatrisation cutanée (21).

3.2.1.3. L'interaction des fibroblastes avec les autres cellules cutanées

Les interactions entre les cellules mésenchymateuses et épithéliales jouent un rôle crucial au cours de l'embryogénèse et du maintien de homéostasie cutanée.

La génération de différents modèles biologiques *in vitro* a permis de mieux comprendre l'implication fonctionnelle des différentes types cellulaires cutanés étudiés. En effet, l'évolution des systèmes de co-cultures en 2 dimensions (2D) vers des systèmes de co-cultures en 3 dimensions (3D) de peau reconstruite a permis de préciser le rôle des fibroblastes, et particulièrement leur impact sur les fonctions des mélanocytes et des kératinocytes différenciés.

Tout d'abord, les travaux de Lee *et al.* ont montré que les cellules d'une monocouche de ménalocytes prolifèrent plus rapidement en présence de milieu conditionné issu d'une culture de fibroblastes (23). Sur la base de ce même modèle, le travail d'Imokawa *et al.* qui s'intéressait aux facteurs mitogéniques produits par les fibroblastes et stimulant la croissance des mélanocytes, a révélé d'importants taux de sécrétion d'HGF et de SCF par les fibroblastes âgés (24). Les expériences effectuées par Cario-André *et al.,* montrent, quant à elles, que l'ajout de surnageant provenant d'une culture fibroblastique humaine n'influence pas la prolifération des mélanocytes en culture. En revanche, l'addition de fibroblastes humains préalablement privés de milieu de culture augmente significativement la prolifération, suggérant que le stress fibroblastique influence la prolifération des mélanocytes (25). Récemment, les études de Wang *et al.* ont montré l'existence d'un lien étroit entre les fibroblastes et les kératinocytes. Par la sécrétion de facteurs solubles comme l'IL-1α et le TGF-β1, les fibroblastes participent à l'augmentation de la prolifération et la migration des kératinocytes (26). Par ailleurs, le rôle des fibroblastes en tant que cellules du système d'immuno-surveillance a été établi en démontrant leur capacité à sécréter des cytokines capables d'attirer les cellules T. Dans une co-culture entre les fibroblastes dermiques et les cellules T où l'IL-15 a été ajoutée, les fibroblastes montrent une capacité à soutenir la prolifération de cellules T indépendamment de la reconnaissance antigénique (22). Le perfectionnement des systèmes 3D, qui miment *in vitro* l'environnement physiologique cutané, a conduit au développement de modèles de peau reconstruite constitués de kératinocytes cultivés sur une matrice de collagène de type I peuplée de fibroblastes. La différenciation épidermique est optimale lorsque les kératinocytes sont cultivés à l'interface air-liquide (27). L'ensemble de ces modèles 3D a permis d'étudier les fonctions fibroblastiques dans un contexte cutané proche de l'environnement physiologique.

D'autres travaux utilisant les modèles 3D ont démontré la capacité des fibroblastes à attirer les cellules T provenant d'un explant, par la libération de diverses cytokines et chimiokines, telles que l'IL-8, l'Interferon-Inducible Protein-10, la Monocyte Chemotatic protein-1/-3, et la Macrophage Inflammatory Protein-3α (22). De plus, une reconstruction cutanée « immuno-compétente » en 3D, à savoir l'intégration de cellules dendritiques aux cultures de kératinocytes et de fibroblastes, a mis en évidence un niveau d'expression plus élevé du marqueur de surface des cellules dendritiques (CD86) en présence des deux autres types cellulaires et du sensibilisant cutané, le dinitro-chlorobenzène. Ces travaux suggèrent que les kératinocytes et les fibroblastes amplifient la réponse immunitaire et que les modèles de peau reconstruite permettent une meilleure appréhension de la sensibilité cutanée (28).

Récemment, l'implication fonctionnelle des fibroblastes dans les zones hypo-pigmentées des paumes de mains et des plantes de pieds a été démontrée (29). Cette étude révèle que la zone palmo-plantaire est composée de cinq fois moins de mélanocytes par rapport à une zone non palmo-plantaire. De plus, les capacités de prolifération et de différenciation des mélanocytes *in vitro* sont diminuées en présence de fibroblastes palmo-plantaires, suggérant l'implication de facteurs solubles sécrétés par ces fibroblastes. Cette hypothèse a été confirmée par des études comparatives d'expression génique entre les zones palmo-plantaire et non palmo-plantaire qui démontrent une surexpression du gène DKK-1 (un inhibiteur de la voie de signalisation canonique Wnt) dans la zone palmo-plantaire (29). Ces données soulignent le rôle fondamental des fibroblastes dans la régulation du processus de pigmentation et dans le maintien de l'état physiologique cutané.

L'implication fonctionnelle des fibroblastes dans le processus de pigmentation cutanée a été également précisée grâce à l'utilisation de modèles cellulaires 3D. En effet, ces modèles de peau reconstruite montrent, à l'échelle macroscopique, une hyperpigmentation cutanée en absence de fibroblastes, suggérant un rôle négatif des fibroblastes sur la mélanogénèse *in vitro* (30). De plus, une diminution de la survie et de la prolifération des mélanocytes sont observées en absence de fibroblastes alors qu'une augmentation de la prolifération et de la différentiation des kératinocytes sont mesurées en leur présence (23, 30, 31). Ces données mettent en évidence une régulation complexe de la fonction des mélanocytes et des kératinocytes de la peau par les fibroblastes.

L'ensemble de ces systèmes indique que le « dialogue » entre les fibroblastes, les cellules immunitaires, les kératinocytes et les mélanocytes revêt une importance considérable. Ces échanges s'établissent probablement par l'intermédiaire d'un réseau de sécrétion de facteurs solubles. Ainsi, la sécrétion paracrine de facteurs par les fibroblastes participe à la régulation du processus de mélanogénèse et permet aux différentes cellules environnantes de répondre à divers stimuli.

3.2.1.4. Les cellules endothéliales

D’origine mésenchymateuse, les cellules endothéliales se différencient pour assurer le développement et le maintien des fonctions vasculaires. La vascularisation cutanée est localisée au niveau du derme, elle est assurée par des vaisseaux sanguins composés de cellules endothéliales constitutives de l’endothélium. L’épiderme n’est pas vascularisé et il limite la diffusion d’agents contaminants comme les bactéries, champignons et composants chimiques toxiques provenant du flux sanguin. Cependant, la nutrition de cette couche épidermique avascularisée est assurée par des capillaires localisés dans le derme papillaire le plus proche de l’épiderme. En plus, de leur rôle de nutrition, les cellules endothéliales sont entourées de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques qui assurent leur fonction de vasoconstriction et vasodilatation (32).

La présence de cellules endothéliales dans le derme présage une possible interaction avec les cellules fibroblastiques dermiques. L’utilisation d’un système de co-culture a montré que les fibroblastes sécrètent des facteurs pro-angiogéniques (tels que le VEGF, le FGF, le TGFβ1 et le HGF) qui induisent la différentiation, la migration des cellules endothéliales ainsi que la formation de tubules (22). Par ailleurs, des études menées avec des co-cultures de sous-populations fibroblastiques papillaires ou réticulaires ont révélé que les fibroblastes papillaires participent à la formation de tubules contrairement aux fibroblastes réticulaires qui présentent une production limitée d’HGF (22).

3.3. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique, appelée aussi lame basale épidermique, est une région « acellulaire » qui sépare le derme et l’épiderme [**Figure 4**].

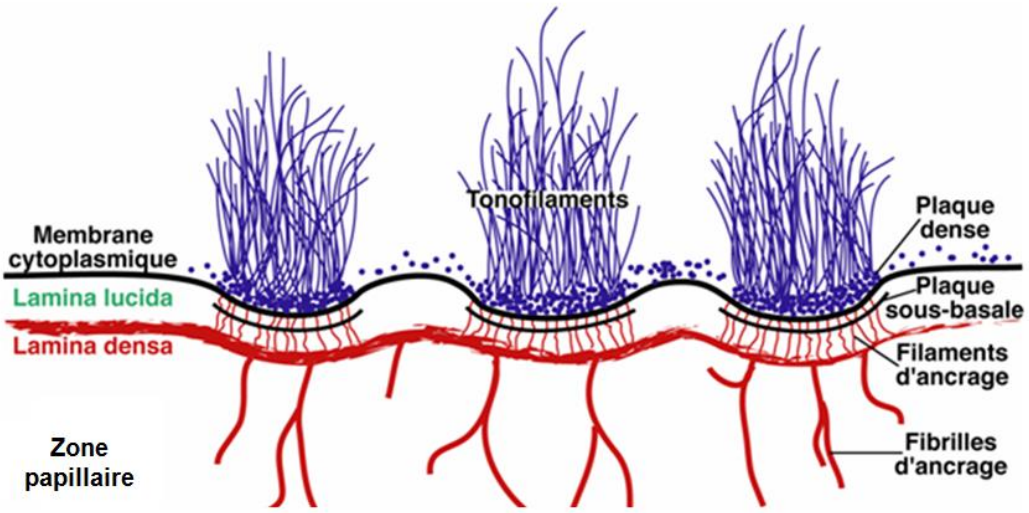


Figure 4: Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique.

La jonction se compose de la membrane cytoplasmique des kératinocytes du stratum basale (plaque sous-basale), de la lamina lucida constituée de filaments d'ancrage dont la lamine, de la lamina densa faite principalement de collagène de type IV, et de la zone fibrillaire du derme papillaire sous-jacent dans laquelle les fibres d'ancrage (collagène de type VII) relient la lamina densa aux fibres de collagène de type I et II. Modifié d'après Laplante A. Thèse electronique de l'Université de Laval, 2002

Les rôles de cette jonction dermo-épidermique consistent à:

- Former une barrière sélective entre les 2 couches par le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires.
- Maintenir une cohésion entre le derme et l'épiderme par la production de composants de la MEC (12).
- Polariser la différenciation des kératinocytes; seuls les kératinocytes attachés à la jonction dermo-épidermique sont capables de proliférer.
- Assurer le processus de cicatrisation cutanée en servant de support à l'adhésion et la migration des kératinocytes.

Cette jonction dermo-épithéliale, et notamment la lame basale, a été étudiée grâce à un système de co-culture: kératinocytes/fibroblastes. En absence de fibroblastes, les composants de la lame basale sécrétés uniquement par les kératinocytes sont fortement diminués, suggérant un effet paracrine des fibroblastes lors de l'établissement de la lame basale. Il existe également une influence paracrine des kératinocytes sur les fibroblastes. En effet, en présence de kératinocytes une augmentation des niveaux d'ARNm du collagène de type IV dans les fibroblastes est observée (33). Le dialogue entre ces deux types cellulaires est donc crucial pour la production des composants de la lame basale.

3.4. L'hypoderme

L'hypoderme est le tissu adipeux sous-cutané constitué principalement d'adipocytes. Il est important de noter que seuls les fibroblastes réticulaires sont capables de se différencier en adipocytes (21). Ce tissu est considéré comme un réservoir énergétique de l'organisme, un amortisseur mécanique et un isolant thermique participant ainsi à la thermorégulation (12).

4. Le processus physiologique de la pigmentation cutanée

La pigmentation cutanée est apportée par la mélanine qui contribue à la couleur de la peau chez un individu. Les variations de la quantité et de la nature de ce pigment définissent les différents types de peau. La classification de Fitzpatrick s'effectue en fonction de la réaction au soleil de la peau et permet de classer les types de peau en 4 catégories (phototype de I à IV) (34) **[Tableau 1]**. En clinique, les termes « teint » ou « complexion » sont utilisés pour désigner la couleur de la peau chez un individu.

Phototypes	Types de peaux	Caractéristiques
I	Peau très claire, taches de rousseurs	Yeux noisettes Cheveux blonds ou roux Erythème facile Ne bronze pas
II	Peau claire, taches de rousseurs	Yeux clairs Cheveux blonds ou châtains Erythème facile Bronzage pauvre
III	Peau mate	Yeux foncés Cheveux châtains ou bruns Erythème facile Bronzage après érythème
IV	Peau foncée : marron	Yeux foncés Cheveux châtains ou bruns Peu d'érythème Bronzage foncé et facile
V	Peau très foncée : marron ou noire	Yeux foncés Erythème rare Bronzage facile
VI	Peau extrêmement foncée : noire	Absence d'érythème Bronzage facile

Tableau 1 : La classification de phototype de peau selon Fitzpatrick

Cette classification permet d'identifier les types de peaux allant d'une carnation très claire à une carnation extrêmement foncée. Elle renseigne sur les principales caractéristiques de chaque type de peau, comme la couleur des yeux et des cheveux, ainsi que la capacité de réponse en termes de réaction et de protection de la peau suite à une exposition au soleil.
D'après Fitzpatrick T. B. *et al.* Arch Dermatol, 124, 869-71, 1988.

4.1. La mélanogénèse

La mélanogénèse est le processus de synthèse de la mélanine qui assure un rôle photo-protecteur à la peau suite à une exposition aux rayonnements UVs. Ce processus se déroule dans les mélanosomes et implique une cascade enzymatique régulée par différentes voies de signalisation.

4.1.1. La voie enzymatique

La voie enzymatique de la mélanogénèse repose principalement sur trois enzymes: la tyrosinase (Tyr), la tyrosinase-related protein 1 (Trp-1) et la tyrosinase-related protein 2 (Trp-2 ou dopachrome tautomérase (DCT)). Ces enzymes sont localisées dans la membrane des mélanosomes (35).

L’initiation de la mélanogénèse s’effectue à partir de l’acide aminé tyrosine qui est activé par hydroxylation par l’enzyme Tyr et conduit à la formation de L-didroxyphenylalanine (L-DOPA). Cette voie métabolique est commune à la formation des deux types de mélanine: l’eumélanine (pigment brun et noir) et la phéomélanine (pigment rouge et jaune). Le mélange des deux constitue le pigment mélanine. Puis, l’oxydation de la L-DOPA en dopaquinone (DQ) permet la formation d’eumélanine par l’intermédiaire des 2 enzymes Trp-1 et Trp-2 alors que celle de la phéomélanine ne nécessite pas ces 2 réactions enzymatiques mais requiert la conjugaison préalable d’une cystéine sur DQ (15).

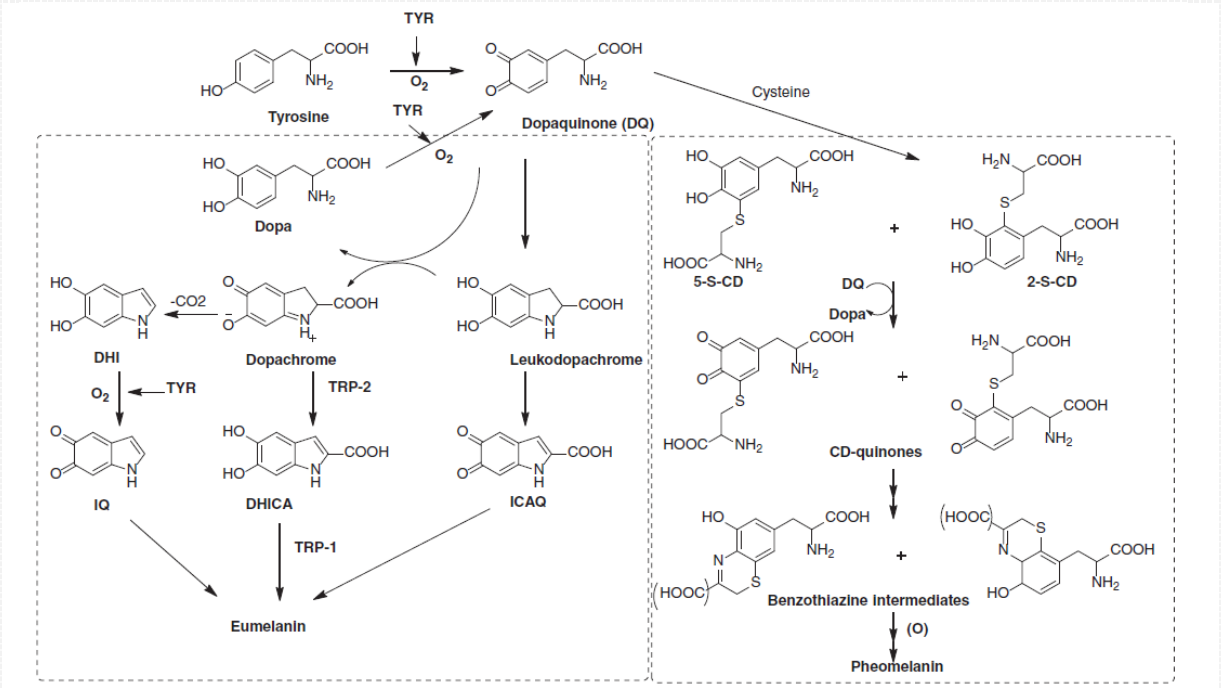


Figure 5: Le processus de la mélanogénèse (production de l'eumélanine et la phéomélanine)

La mélanine est composée d'un équilibre entre les deux pigments eumélanine et phéomélanine. La synthèse des deux pigments met en jeu deux voies enzymatiques différentes: celle de l'eumélanine dans laquelle participent les enzymes Tyr, Trp-1 et Trp-2, et celle de la phéomélanine qui requiert uniquement l'enzyme Tyr. D'après Pillaiyar T. *et al.* Expert Opin Ther Pat, 25, 775-88, 2015.

La régulation transcriptionnelle de ces trois enzymes dépend du facteur de transcription MIFT (microphthalmia-associated transcription factor) qui se fixe sur la séquence M-box présente dans le promoteur de ces gènes mélanocytaires. MIFT est donc un régulateur clé de la mélanogénèse en contrôlant l'expression des gènes Tyr, Trp-1 et Trp-2 (35).

La séquence protéique des 3 tyrosinases Tyr, Trp-1 et Trp-2 est hautement conservée au sein des différentes espèces et possède une forte homologie (15). Des mutations qui altèrent la fonction de ces enzymes sont reliées à des formes sévères de l'albinisme caractérisé par un déficit de mélanine. La mutation du gène Tyr conduit à un albinisme de type 1 (Oculocutaneous albinism type 1, OA1) alors que celle du gène Trp1 mène à un albinisme plus grave de type 3 (OA3) qui se traduit par une hypo-pigmentation au niveau cutané et capillaire (36).

Différentes voies de signalisation régulent la synthèse de mélanine. Ces voies sont déclenchées par des facteurs sécrétés par les kératinocytes, les fibroblastes et les mélanocytes eux-mêmes. L'établissement d'un contact cellulaire étroit entre les mélanocytes et les kératinocytes est primordial à l'obtention d'un équilibre physiologique du taux de synthèse de phéomélanine et d'eumélanine. En effet, un faible contact cellulaire entre les mélanocytes et kératinocytes provoque un déséquilibre de la balance phéomélanine/eumélanine en faveur d'une forte synthèse de phéomélanine et de la suppression l'eumélanine, confirmant ainsi le rôle essentiel de cette

interaction sur la régulation de la mélanogénèse (19). De plus, les facteurs sécrétés par ces 3 types cellulaires permettent un dialogue intercellulaire qui influence la pigmentation cutanée. Même si les facteurs sécrétés par les kératinocytes ont été plus étudiés que celle des fibroblastes, le rôle de ces derniers dans le processus de pigmentation commence à être défini par l'établissement de modèles cellulaires 3D. Cependant, peu de données ont été publiées sur les facteurs provenant des fibroblastes notamment sur leurs fonctions régulatrices de la mélanogénèse.

Le complexe formé par les kératinocytes, mélanocytes et fibroblastes est décrit pour être sensible aux stimuli environnementaux tels que les radiations UVs. La réponse de ce complexe se traduit par un réseau de sécrétions cytokiniques paracrine et/ou autocrine.

4.2. Les voies de signalisation impliquées dans la mélanogénèse

Le dialogue cytokinique établi par le complexe kératinocyte-mélanocytes-fibroblastes régule la mélanogénèse par l'implication de différentes voies de signalisation. Les kératinocytes participent à cette régulation par l'intermédiaire de la sécrétion d'une variété de cytokines comme l'ET-1, le bFbF, le GM-CSF et l'HGF dont l'action passe notamment par la voie ERK/MAPK (17). Les fibroblastes, quant à eux, sécrètent également des facteurs qui sont communs à ceux sécrétés par les kératinocytes tels que le SCF, l'HGF et le bFGF qui agissent de façon paracrine. D'autres cytokines dérivées des fibroblastes ont également été identifiées pour contrôler la pigmentation cutanée comme le KGF et le TGFβ1 (37).

4.2.1. La voie AMP-c dépendante

La voie de signalisation dépendante de l'AMP-c (Adénosine Monophosphate - cyclique) est activée par l'α–MSH qui se fixe à son récepteur MC1-R (Melanocortin 1 Receptor). Appartenant à la famille des mélanocortines, cette hormone peptidique a pour précurseur la POMC (Proopiomelanocortine) qui est clivée et forme des dérivés à forte activité mélanogénique tels que l'α–MSH, la β-MSH et l'ACTH (15). Après une exposition aux UVs, les kératinocytes synthétisent une plus grande quantité de POMC libérant la α–MSH et l'ACTH qui se fixent au récepteur MCR-1. En réponse à cette synthèse kératinocytaire, les mélanocytes augmentent l'expression des récepteurs MCR-1 à leur membrane plasmique (17). Le complexe α–MSH/MC1-R induit alors l'activation intracellulaire de l'adénylyle cyclase (AC), qui conduit à l'augmentation de la production de AMP-c et à l'activation de la protéine kinase A (PKA) (17, 35). La PKA phosphoryle et active à son tour le facteur de transcription CREB (C-AMP Response Element-binding protein) qui se lie aux éléments CRE (C-AMP Response Element). Le complexe CREB/CRE se fixe sur le promoteur du gène MIFT-M dont il induit la transcription puis une

expression plus importante des enzymes Tyr, Trp-1 et Trp-2 impliquées dans la mélanogénèse (17).

La voie α–MSH permet ainsi de réguler la formation de dendrites et le processus de mélanogénèse (17). Un autre peptide, l'Agouti signalling, intervient également dans la production de mélanine et plus particulièrement sur la balance d'eumélanine et de phéomélanine. En effet, antagoniste de MCR-1 par compétition avec l'α–MSH, l'Agouti signalling stimule plus la synthèse de phéomélanine que celle d'eumélanine ; l'eumélanine étant préférentiellement stimulée par les dérivés de POMC (36).

4.2.2. La voie Wnt / ß-caténine

La voie wingless-type (Wnt) est déterminante dans le développement embryonnaire, spécifiquement au cours de la différentiation des mélanocytes provenant de la crête neurale. Le ligand Wnt se fixe à son récepteur Frizzled qui est exprimé à la surface des mélanocytes. L'activation de cette cascade de signalisation aboutit à l'accumulation intracellulaire de la β-caténine qui sera transloquée dans le compartiment nucléaire. La β-caténine interagit avec le facteur de transcription Lef1 (Lymphoid Enhancer binding Factor 1) pour induire l'activation du promoteur du gène MIFT-M, important régulateur de la mélanogénèse (35). La transfection de fibroblastes avec le gène DKK-1, un inhibiteur de la voie Wnt, co-cultivés avec des mélanocytes, provoque dans ces cellules, une diminution de l'expression de la β-caténine (29), suggérant que la voie de signalisation Wnt/β-caténine participe aux fonctions mélanocytaires. Par ailleurs, la régulation par les fibroblastes *via* DKK-1, provoquerait une diminution des fonctions des mélanocytes en inactivant MIFT, renforçant ainsi le rétro-contrôle négatif des fibroblastes sur la mélanogénèse (38).

4.2.3. La voie ERK / MAPK

La voie ERK (Extracellular-signal-Regulated Kinases) / MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) implique de nombreuses protéines dont les MAP Kinases. Certaines cytokines sécrétées par les kératinocytes et/ou fibroblastes dépendent de la voie ERK/MAPK comme le SCF, l'ET-1, le GM-CSF, le HGF et le bFGF.

4.2.3.1. La voie du SCF / c-kit

La cytokine SCF est non seulement sécrétée de manière constitutive par les kératinocytes normaux (15) mais également par les fibroblastes (14, 24). Par sa liaison au récepteur c-kit exprimé à la surface des mélanocytes, elle permet l'activation consécutive des protéines Ras, Raf

et des MAP kinases. Ces dernières aboutissent à la phosphorylation de MIFT qui est lié à une sécrétion des enzymes mélanogéniques Tyr, Trp-1 et Trp-2. La présence de SCF stimule la prolifération et la différenciation des mélanocytes en présence ou en absence de facteurs sécrétés par les kératinocytes dont l'AMPc, l'ET-1, le bFGF (37). En revanche, l'absence de SCF est liée à un défaut de prolifération des mélanocytes (24). La contribution du SCF sur la mélanogénèse a été démontrée par l'utilisation d'un modèle reconstruit d'épiderme, incubé dans du milieu conditionné de fibroblastes humains ou du milieu supplémenté en SCF. Seul l'ajout de SCF entraîne une faible augmentation de la pigmentation du tissu au niveau macroscopique et du nombre de mélanocytes (25). La fixation du SCF à son récepteur c-kit est également nécessaire à la survie des mélanocytes. En effet, la présence d'un anticorps bloquant c-kit (ACK2), induit l'apoptose des mélanocytes murins (17). L'importance de la voie SCF/c-kit a aussi été montrée dans le développement des mélanoblastes. En liant le SCF, c-kit qui est exprimé à la membrane plasmique des mélanoblastes, permet le développement et la prolifération des mélanoblastes et inhibe l'apoptose (14). Des mutations des gènes humains codant pour le SCF et son récepteur sont responsables du piébaldisme qui est caractérisé par un défaut de la prolifération des mélanoblastes et la présence de zones hypopigmentées (15, 36). L'ensemble de ces données démontre le rôle de la voie SCF/c-kit dans le processus de mélanogénèse, même si cette voie ne suffit pas en elle-même à induire une augmentation de la pigmentation.

4.2.3.2. La voie d'ET-1 / ETBR

La cytokine ET-1 a été isolée à partir de cellules endothéliales. Elle possède des propriétés vasoconstrictrices puissantes sur les cellules musculaires lisses qui entourent l'endothélium vasculaire. Elle est également sécrétée par les kératinocytes de la peau après une exposition au soleil. Par sa liaison au récepteur ETBR (Endothelin receptor type B), localisé à la surface des mélanocytes, l'ET-1 déclenche une mobilisation du calcium intracellulaire, conduit à l'activation des PKCs et permet l'expression du facteur MIFT impliqué dans le processus de mélanogénèse. Cette mobilisation calcique participe aussi à l'augmentation des niveaux d'AMP-c et des MAPKs (17). Le rayonnement UV, considéré comme un stress, provoque la sécrétion de l'IL-1, qui induit l'expression de l'ET-1 qui agit en retour de façon autocrine sur les kératinocytes et de façon paracrine sur les mélanocytes (39). En effet, des mélanocytes en culture exposés aux irradiations UVs, ou incubés avec du milieu conditionné issus de culture de kératinocytes préalablement traités aux UVs, montrent une augmentation de leur synthèse d'ADN. Cet effet mitogène de l'ET-1 sur les mélanocytes a été confirmé par l'utilisation d'un anticorps bloquant l'activité de l'ET-1 (39). D'autre part, des cultures de mélanocytes dans un milieu supplémenté en ET-1 s'accompagnent d'une augmentation de l'expression transcriptionnelle des enzymes Tyr et Trp-1,

montrant ainsi un potentiel effet mélanogénique de l'ET-1 (40) et une augmentation du nombre de cellules. De manière intéressante, une corrélation inverse a été établie entre l'augmentation de la prolifération des mélanocytes et la diminution de la quantité de mélanine (25). L'ensemble de ces données suggère que l'ET-1 agit comme un facteur mitogène et régule l'expression des enzymes de la mélanogénèse. Cependant, cette cytokine n'est pas suffisante à l'induction de la pigmentation épidermique.

4.2.3.3. La voie du GM-CSF / GM-CSFR

La cytokine GM-CSF est nécessaire au fonctionnement physiologique des cellules hématopoïétiques et possède des propriétés pro-inflammatoires. Elle est sécrétée par de nombreuses cellules dont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les kératinocytes (41). Cette cytokine se lie à son récepteur GM-CSFR et enclenche une cascade de signalisation qui active les MAPKs et les facteurs de transcription de la famille STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription family avec STAT-1, STAT-3 et STAT-5). Cette voie de signalisation se traduit par l'augmentation de la sécrétion des enzymes de la mélanogénèse et de facteurs mélanogéniques qui régulent la prolifération des mélanocytes (17). L'impact fonctionnel du GM-CSF sécrété par les kératinocytes a été montré dans des modèles murins. Si la sur-expression du gène entraîne une ré-épithélialisation de la couche basale de l'épiderme, sa délétion est marquée par l'absence d'épithélialisation (42). La régulation de l'expression du GM-SCF impliquerait les facteurs de transcription c-Jun et Jun B de la famille AP-1 (Adaptor Protein 1). En effet, les fibroblastes extraits des souris invalidées pour le gène c-Jun ont une diminution des expressions transcriptionnelle et traductionnelle du GM-SCF. A l'inverse, les fibroblastes issus de souris invalidées pour le gène Jun B montrent une augmentation de l'expression du transcrit et de la protéine du GM-SCF (43). Ainsi, l'interaction entre les cellules mésenchymateuses et épithéliales est essentielle à la régulation de la mélanogénèse.

4.2.3.4. La voie du HGF / c-Met

La cytokine HGF est exprimée de façon ubiquitaire chez l'homme et sécrétée par les fibroblastes dermiques (44, 45). Initialement caractérisée comme un facteur mitogène, cette cytokine forme un complexe avec le récepteur c-Met, majoritairement localisé sur les cellules épithéliales, et permet, entre autres, l'activation de STAT-3 qui est lié à la migration des kératinocytes ; la transfection d'un mutant de STAT-3 a un effet dominant négatif bloquant la capacité pro-migratoire de l'HGF sur les kératinocytes (42). L'HGF, par l'activation de MAPKs, permet également la production de facteurs requis à la prolifération des mélanocytes (17). L'étude d'un modèle d'épiderme reconstruit montre, qu'au niveau macroscopique, l'HGF exogène

entraîne une augmentation de la pigmentation qui est plus importante que celle induite par l'ajout du SCF. Cependant, l'HGF seul n'est pas suffisant à l'augmentation du nombre de mélanocytes par comparaison avec les milieux conditionnés des fibroblastes dermiques humains (25). Par ailleurs, l'HGF est sécrété par les fibroblastes dermiques en réponse aux sécrétions des kératinocytes irradiés par UVs. En effet, suite à un traitement aux UVB, les cytokines IL-1α et TNF-α sont surexprimées par les kératinocytes irradiés. La mise en culture de fibroblastes dans un milieu conditionné provenant de ces kératinocytes, leur permet de produire du HGF. Si la neutralisation de l'IL-1α avec un anticorps anti-IL-1α interfère avec la régulation de l'ARNm du HGF, la neutralisation du TNF-α n'a quant à elle aucun effet. De plus, l'effet anti-apoptotique du HGF sécrété par les fibroblastes sur les kératinocytes, propose le rôle protecteur de cette cytokine sur les kératinocytes. Enfin, des expériences avec des anticorps bloquants ou des ARN interférants ont montré la fonction autocrine de l'HGF dans la protection contre l'apoptose des fibroblastes eux-mêmes traités aux UVA (46).

Le HGF protège les kératinocytes et les fibroblastes des effets apoptotiques des UVs, et contribue ainsi à l'homéostasie cutanée. De plus, des données de la littérature suggèrent la nécessité de formation d'un complexe HGF/c-Met pour induire la sécrétion d'autres cytokines qui agissent de manière paracrine sur les kératinocytes et les mélanocytes.

4.2.3.5. La voie de bFGF / FGFR-1/2

Le facteur de croissance bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) se fixe à ses récepteurs FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) 1 et 2 qui sont localisés à la surface des mélanocytes. Le bFGF sécrété est non seulement impliqué dans la prolifération des mélanocytes normaux, mais également dans la formation des dendrites mélanocytaires au cours de la mélanogénèse (17).

4.3. Autres cytokines sécrétées et impliquées dans la mélanogénèse

4.3.1. La voie KGF / KGFR

Le facteur de croissance KGF (Keratinocyte Growth Factor), également nommé KGF-1 ou FGF-7, stimule la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales ; les kératinocytes possédant le récepteur KGFR. La sécrétion de ce facteur par les fibroblastes participe à la physiologie de la pigmentation (22). En effet, l'IL-1α stimule les kératinocytes et entraîne une augmentation de la sécrétion du KGF par les fibroblastes (22). En revanche, l'inhibition de cette interleukine dans le milieu de culture kératinocytaire ne supprime pas totalement l'expression du KGF fibroblastique, suggérant que ce facteur n'est pas uniquement induit par l'IL-1α (47). D'un point de vue fonctionnel, le KGF inhibe la prolifération des kératinocytes chez la souris (48). La

régulation de l'expression de ce facteur *via* l'IL-1α impliquerait les facteurs de transcription c-Jun et Jun B. Les résultats montrent que, pour les kératinocytes mis en co-cultures avec des fibroblastes de souris invalidées pour le gène de c-Jun, il existe une diminution de la prolifération et de la différenciation ayant un effet négatif sur l'expression du KGF. En revanche, les co-cultures de kératinocytes avec des fibroblastes murins dont l'expression du gène Jun B a été abolie, montrent une hyper-prolifération et -différentiation kératinocytaires, qui, à l'inverse, permettent l'augmentation de l'expression du KGF. Ces résultats ont permis de mieux comprendre la régulation du KGF par ces 2 facteurs de transcription qui agissent de façon antagoniste pour réguler l'interaction entre cellules mésenchymateuses et épithéliales (43).

Par ailleurs, des co-cultures de mélanocytes avec des kératinocytes démontrent que sans l'ajout de KGF, la prolifération des mélanocytes n'est pas stimulée et ce, même après l'addition de fibroblastes. En revanche, les co-cultures de mélanocytes en présence de fibroblastes augmente la dendritogénèse des mélanocytes (37).

4.3.2. La voie TGFβ1 / TGFβR

Le facteur de croissance TGFβ1 (Transforming Growth Factor Beta 1) est abondamment exprimé dans la plupart des cellules de l'organisme. Il régule diverses fonctions cellulaires comme la prolifération, la survie, la différentiation et la migration. De plus, son action passe par la synthèse de molécules de la MEC, telles que le collagène ou les GAGs, par des fibroblastes stimulées (49).

La signalisation du TGFβ1 passe par l'hétéro-dimérisation de récepteurs membranaires (TβRII and TβRI) (50) qui activent au cours de leur internalisation les effecteurs intracellulaires Smads (51). En s'associant à divers partenaires, les Smads modulent la transcription de multiples gènes. Alternativement à cette voie canonique, d'autres voies intracellulaires permettent la transmission des signaux du TGFβ1 (52).

Dans le contexte de la peau, qui est un organe particulièrement sensible à l'action du TGFβ1, les études *in vivo* dans des modèles transgéniques murins démontrent qu'une quantité élevée de TGFβ1 a un effet inhibiteur sur la croissance des kératinocytes de l'épiderme alors qu'une faible concentration du facteur ne montre aucun effet (53). De plus, le TGFβ1 sécrété par les kératinocytes est impliqué dans le trafic des cellules dendritiques du tissu cutané, expliquant l'inflammation observé dans le psoriasis (54). Sécrété *in vitro* par les mélanocytes (18), le TGFβ1 est un inhibiteur de la différenciation des mélanocytes avec un effet hypo-pigmentant qui passe par la modulation négative de certaines enzymes de la mélanogénèse (15, 55, 56).

Le rôle des TGFβs (57), et plus spécifiquement de l'isoforme TGFβ1 (58), a été précisé dans la mélanogénèse. L'ajout de TGFβ1 au milieu de culture de mélanocytes normaux humains montre une inhibition de leur prolifération (58), suggérant, que ce facteur de croissance joue un rôle dans l'hypopigmentation. Un traitement au TGFβ1 de mélanocytes murins, immortalisés révèle une diminution de l'activité Tyr liée à une baisse de la quantité de mélanine (59). Cette baisse passe par une diminution de l'expression des enzymes Tyr, TRP-1 et TRP-2 et du facteur de transcription MIFT ainsi que de son activité (59). Une mutation du gène MIFT est associée au syndrome de Tiez qui est caractérisé par une hypo-pigmentation de la peau et de l'iris (36). Par ailleurs, les gènes impliqués dans le développement des mélanocytes, tels que MIFT, PAX3 et SOX10 (14), sont affectés et conduisent à un défaut de prolifération des mélanoblastes dans le syndrome de Waardenburg (36) ; ces 3 facteurs étant intimement liés puisque PAX3 fonctionne en synergie avec SOX10 pour réguler la transcription de MIFT (55). De façon intéressante, la reprogrammation de fibroblastes humains (hiMels) et murins (iMels) en mélanocytes fonctionnels a été possible grâce à l'expression de MIFT, SOX10 et PAX3 dans les fibroblastes. En effet, les hiMels expriment alors les gènes Tyr, TRP-1 et TRP-2, produisent de la mélanine et sont capables de synthétiser de l'α-MSH (60).

Des études de la modulation de l'expression du TGFβ montrent que les irradiations aux UVs sont des régulateurs. En effet, ils bloquent *in vitro* l'expression protéique et le niveau de sécrétion du TGFβ dans les kératinocytes (58 , 59) et inhibent l'expression du TGFβ dans le tissu cutané humain (61 , 62). L'activation de la signalisation du TGFβ aboutit à la suppression de l'expression de PAX3 qui régule l'expression de MIFT dans la mélanogénèse (55). En l'absence d'UVs, il existe une répression des expressions transcriptionnelle et traductionnelle de PAX3 dans les mélanocytes. En revanche, suite au traitement des mélanocytes avec un milieu conditionné de kératinocytes préalablement irradiés aux UVs, l'expression de PAX3 est augmentée, ainsi que celle de MIFT. Ces données suggèrent que la sécrétion de TGFβ inhiberait l'expression de PAX3, qui lui-même régulerait négativement la transcription de MIFT dans les mélanocytes. Une étude de la région promotrice du gène PAX3 révèle qu'elle contient un domaine de liaison aux Smads (SBEs : Smad-binding elements), reconnu par Smad4. L'ensemble de ces résultats démontre que la voie du TGFβ passant par les Smads inhibe l'expression de PAX3 en l'absence d'irradiations aux UVs (55).

Par ailleurs, la mélanogénèse dépend de l'activation de la voie impliquant la protéine p53 qui est déclenchée par les rayonnements UVs et induit la régulation de POMC/MSH dans les kératinocytes (57). En effet, les kératinocytes issus de souris invalidées pour le gène de la p53, exposées aux UVs, montrent une faible quantité de transcrits et de la protéine TGFβ. D'autre part,

l’addition d’un inhibiteur d’AP-1 (c-Jun) au milieu de culture des kératinocytes, préalable à des irradiations UVs, entraîne une augmentation de la quantité d’ARNm et de l’expression de la protéine TGFβ (55). Ainsi, la suppression de l’expression du TGFβ passe par AP-1 qui doit être auparavant activée par p53, pour ensuite initier la cascade de signalisation de MIFT dans les mélanocytes.

4.3.3. La voie IL13 / IL13R

La cytokine IL13 a initialement été découverte pour être produite par les cellules T de type helper 2 (T_h2). Elle possède un rôle immuno-régulateur par sa capacité à inhiber la production de médiateurs pro-inflammatoires, tels que IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, sécrétés par les macrophages et monocytes (63). De plus, l’IL-13 a été décrite pour jouer un rôle sur les cellules cutanées, et notamment sur les fibroblastes dermiques humains, en induisant leur prolifération et la synthèse de collagène de type I (63). Pour propager de tels effets, l’IL-13 lie le récepteur membranaire IL-13R□1 qui s’associe au récepteur membranaire IL-4R□□ Ce complexe membranaire recrute les protéines intracellulaires JAKs et STAT6 (64), induisant la phosphorylation, la dimérisation et translocation nucléaire de STAT6 qui va activer la transcription de gènes cibles (65).

À ce jour, aucune étude ne mentionne la sécrétion de l’IL-13 par les fibroblastes cutanés, ni ne décrit la fonction de l’IL-13 endogène sur la multiplication et la différenciation des kératinocytes et mélanocytes primaires.

De façon intéressante, l’impact fonctionnel de l’IL-13 exogène a été établi sur le processus de mélanogénèse des cellules d’une lignée mélanocytaire humaine (NHEM) (66). En effet, l’ajout d’IL-13 diminue l’expression de l’ARNm de Tyr, de Trp-2 ainsi que la synthèse de mélanine dans les NHEM (66). Cette régulation serait à la base de celle impliquant les cellules T-γδ, retrouvées dans le tissu cutané (67). Une autre étude révèle une plus forte expression du gène de l’IL-13 Rα2 dans les fibroblastes palmo-plantaires alors que le gène IL-13 est, quant à lui, plus exprimé dans la zone non palmo-plantaire (29). Cependant, l’expression plus importante du gène de l’IL-13 dans la zone pigmentée par rapport à la non-pigmentée, (29) semble contradictoire avec l’effet hypo-pigmentant de cette cytokine ajoutée de façon exogène (66). Par ailleurs, l’addition d’IL-13 exogène provoque un blocage de la différenciation des cellules de la lignée kératinocytaire HaCaT et des kératinocytes psoriasiques (68, 69).

Deuxième partie :

L’hétérogénéité du teint

II. Le vieillissement cutané et hétérogénéité du teint

Le vieillissement cutané ou le vieillissement intrinsèque, ou le vieillissement chronologique est génétiquement déterminé. Lié à un déséquilibre des mécanismes biologiques de dégradation et de réparation, ainsi qu’à des modifications structurelles intrinsèques, le vieillissement chronobiologique a des répercussions sur les fonctions cutanées. Un des facteurs intrinsèques lié à l’âge est la ménopause, qui induit un vieillissement chronobiologique chez la femme. Ce dernier est soumis à de divers facteurs extrinsèques, dont le taux d’exposition aux rayonnements UVs, qui est considéré comme l’un des facteurs majeur du vieillissement chronobiologique. En effet, l’accentuation des signes de vieillissement cutané comme les rides, le relâchement cutané, les rougeurs et un teint terne peuvent être induits par le photo-vieillissement (70).

Le vieillissement cutané chronologique peut être accéléré par des facteurs mécaniques, personnels et socio-économiques. L’acceptation d’un changement de l’homogénéité du teint a un impact social important.

Chez un individu, la couleur de la peau évolue dans le temps et ce, principalement à cause du photo-vieillissement. En effet, une perte de son homogénéité est notamment liée à l’apparition de lésions hyper-pigmentées suite à une exposition chronique aux rayonnements UVs, comme dans le cas du lentigo actinique qui est une lésion bénigne. En revanche, ce signe bénin de vieillissement cutané a des conséquences esthétiques et psychologiques négatives chez un individu. Dans ce contexte, des dérégulations du processus de mélanogénèse, de l’inflammation cutanée et de la microcirculation de la peau contribueraient à affecter l’homogénéité du teint des individus.

1. Déséquilibres hormonaux

1.1. Estrogènes et progestérone

L’équilibre des hormones féminines est nécessaire au bon fonctionnement des ovaires. En effet, les hormones ovariennes qui sont l’œstrogène et la progestérone sont régulées par des hormones folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH), sécrétée par la glande pituitaire antérieure sous le contrôle de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) de l'hypothalamus. Durant la phase ovulatoire, les hormones pituitaires agissent en synergie, la FSH permet la production de l’estrogène et l’augmentation de sa production est déclenchée par un pic de LH. Après l’ovulation et sous l’influence de la LH, la progestérone est synthétisée et son taux diminue en l’absence de fécondation (71).

La ménopause est caractérisée par une cession de l'ovulation. Elle est une période de transition physiologique caractérisée par une rupture de cet équilibre hormonal et permettant de définir la peau de ces femmes comme une « peau mature ». Un déséquilibre des taux d'hormones féminines, comme l'estrogène et la progestérone notamment par leur diminution, affecte plusieurs fonctions de la peau comme sa vascularisation, son élasticité et sa capacité à maintenir un certain niveau d'hydratation (72).

En effet, la diminution des fonctions ovariennes entraîne une baisse de la synthèse des œstrogènes (73) qui propagent leurs effets par l'intermédiaire de récepteurs ER (Estrogen Receptors) α et β retrouvés à la membrane plasmique et dans le noyau des cellules (17, 72). Ces récepteurs sont fortement exprimés au niveau des constituants structuraux de la peau, tels que l'épiderme, le derme et les vaisseaux sanguins. Au niveau de l'épiderme, les kératinocytes de la couche basale et spineuse expriment les formes α et β des récepteurs, localisés dans le compartiment nucléaire. Dans les mélanocytes, la forme α du récepteur ER est retrouvée quant à elle dans le noyau. Dans le derme, les fibroblastes et les vaisseaux sanguins expriment fortement l'ER-β nucléaire (17, 72). Des expériences de mono-culture *in vitro* montrent que les œstrogènes augmentent l'activité mitotique des kératinocytes, l'activité tyrosinase, la production de mélanine par les mélanocytes, ainsi que la cicatrisation cutanée et la quantité de collagène des fibroblastes (17).

Cette perte hormonale oestrogénique est associée à un vieillissement biologique (à partir de 50 ans) (73) et engendre des changements considérables du tissu cutané aussi bien sur le plan fonctionnel que structural (74). Ce vieillissement cutané se caractérise par un amincissement de l'épiderme, une diminution du renouvellement cellulaire, une perte de la souplesse et de l'élasticité tissulaire, et l'apparition de lésions hyper-pigmentaires (75). La peau des femmes photo-exposées, à savoir celles qui ont une exposition solaire moyenne de plus de 2 heures par jour (76), est davantage soumise à une accélération du vieillissement cutané.

1.2. Mélatonine

Ce processus de vieillissement cutané est dépendant non seulement de différents facteurs intrinsèques mais également de facteurs extrinsèques tels que l'âge et l'exposition solaire.

L'évolution de la structure cutanée dépend de l'état physique et mental d'un individu. Par exemple, la fatigue se traduit par des signes visibles sur le visage tels que les poches et les cernes sous les yeux, des traits marqués et un teint terne. La fatigue peut être causée par des troubles du sommeil qui sont notamment placé sous le contrôle de la mélatonine. Cette hormone sécrétée par la glande pinéale et le tissu cutané a une concentration sanguine maximale durant la nuit, période

de la journée durant laquelle l'individu n'est pas exposé à la lumière solaire (77). Au cours de la vie d'un individu, la sécrétion de mélatonine diminue d'environ 80 % à l'âge de 60 ans et, est quasi-indétectable après 70 ans. La mélatonine joue un rôle important dans la diminution de la température corporelle nécessaire à la phase d'endormissement (77). La mélatonine module la rythmicité biologique journalière en contrôlant l'expression des gènes circadiens (78) tels que les gènes codant pour les protéines CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycle Kaput) et BAML-1 (Brain And Muscle ARNT-like gene 1). Ces deux familles de protéines forment un hétérodimère qui régule positivement la transcription des gènes period (per1, per2, per3) et cryptochromes (Cry 1 et Cry 2). Une fois traduites, ces protéines forment un hétérodimère qui est phosphorylé par des kinases dont la GSK3 (glycogen synthase kinase 3 beta) ; modification post-traductionnelle qui a lieu qu'en présence de lumière car en son absence le complexe est dégradé (79). Un certain nombre d'études récentes montre l'implication fonctionnelle de protéines codées par les gènes circadiens dans les cellules cutanées humaines, et notamment dans les kératinocytes, mélanocytes et fibroblastes. Au cours du processus de vieillissement, une désynchronisation des horloges biologiques est observée suite à une exposition aux rayonnements UVB. Elle est expliquée par la suppression de l'expression de certains gènes circadiens dont les gènes CLOCK et BAML-1 (78).

2. Modifications des fonctions physiques

2.1. Altération de la fonction de protection

Les fonctions du tissu cutané se modifient au cours du temps avec notamment la fonction de barrière physique contre les agressions extérieures et celle de barrière dynamique dans le contrôle hydrique bidirectionnel. Cette fonction protectrice de la peau est maintenue entre autres par les glandes sudoripares et sébacées qui peuvent être altérées. En effet, les glandes sudoripares se raréfient et produisent moins de sueur, entrainant un déséquilibre de la constance du milieu intérieur (80), une baisse de la sortie d'eau et une altération de la thermorégulation (81). Si le photo-vieillissement n'amplifie pas les modifications intrinsèques des glandes sudoripares, il entraîne une hyperplasie des glandes sébacées (82) ralentissant les fonctions de celles-ci dont notamment la production de sébum (60 % en moins), et il induit une baisse de la photo-protection cutanée (80). Par ailleurs, la protection de la peau est diminuée par un pH qui devient basique (pH > 7), mais aussi par une production incontrôlée de la mélanine et un déséquilibre de l'isomérisation cis / trans de l'acide urocanique. Ceci se traduit par une dyschromie qui amplifie le trouble de la photo-protection (80, 82, 83).

2.1.1. Altération de la fonction de régulation nutritionnelle et sensorielle

La fonction de régulation sensorielle et nutritionnelle du tissu cutané, qui met en jeu les systèmes microcirculatoire et nerveux, est également altérée par le vieillissement intrinsèque.

Avec l'âge, la microcirculation cutanée est perturbée par une diminution du nombre et de l'épaisseur des vaisseaux sanguins. En réponse à un vieillissement photo-induit, les micro-vaisseaux cutanés sont soumis à un processus de dilatation qui finit par les déformer de façon permanente et, à un processus d'angiogénèse qui est déclenché (81, 82). Fortement fragilisé par les dommages photo-biologiques, une altération du système vasculaire cutané se traduit par une pâleur du teint (84), une augmentation en nombre et en intensité des rougeurs (85), ainsi qu'une perte de la régulation thermique corporelle (32).

Le système nerveux cutané est, quant à lui, moins réceptif à l'environnement extérieur. Une diminution de certains mécanorécepteurs, comme les corpuscules de Meissner et de Pacini, ainsi que du nombre de terminaisons nerveuses, conduit à une perte de sensibilité cutanée lors du processus de vieillissement chrono-biologique (81).

2.1.2. Altération de la fonction immune

Le vieillissement chronologique s'exprime par une modification de la fonction immunitaire et de la réponse inflammatoire au sein du tissu cutané.

Le nombre de cellules immunitaires est progressivement diminué. Par exemple, les cellules de Langerhans se raréfient et présentent un défaut de formation de dendrites se traduisant par une altération de leur capacité à présenter l'antigène (81). Les macrophages, quant à eux, perdent également une partie de leur fonction avec une phagocytose altérée qui retarde l'infiltration des lymphocytes T lors d'une rupture de l'intégrité cutanée (10).

Parce que la vascularisation *de novo* du tissu lésé est ralentie, l'apport de constituants requis à la fermeture d'une plaie cutanée est amoindri. Cette diminution d'apport dérégule la production de certains composants de la matrice extracellulaire et perturbe le remodelage cutané (10). Une diminution de la production de cytokines, qui déclenche et amplifie la réponse inflammatoire lors de la régénération cutanée, et une augmentation de certaines cytokines pro-inflammatoires, ont été observées lors du processus de vieillissement chronologique. Ce déséquilibre entre les réponses pro- et anti-inflammatoires participe à la perturbation du processus de cicatrisation (10).

3. Modifications des constituants structuraux cutanés

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons au processus de vieillissement photo-induit qui engendre une perte de l'homogénéité du teint liée à l'apparition d'une tache hyper-pigmentée, le lentigo actinique. Ce type de vieillissement entraîne des modifications des constituants structuraux du tissu cutané que nous décrirons dans la section ci-dessous.

3.1. Altération de la couche épidermique

Au cours du vieillissement photo-induit, la couche épidermique subit des dommages distincts de ceux provoqués par un vieillissement intrinsèque. Ainsi, si le vieillissement intrinsèque provoque une diminution de l'épaisseur de la couche épidermique de 6,4 % par décennie chez la femme (80), le vieillissement photo-induit entraîne, quant à lui, une augmentation de la couche épidermique (81). Dans le cas du lentigo actinique, la présence d'une hyperplasie épidermique (86) suggère une plus grande capacité de protection de cette couche cutanée. Cependant, il est à noter qu'à un stade d'évolution avancée du lentigo actinique, l'épiderme de cette lésion hyper-pigmentaire est plus fin que celui de la zone saine adjacente non pigmentée (87) [**Figure 13 a**].

3.1.1. A l'échelle des kératinocytes

Lors du processus de vieillissement chronologique, l'amincissement de la couche épidermique peut être causé par une atrophie de la couche spineuse qui viendrait d'un nombre plus faible de kératinocytes dotés d'une morphologie cellulaire plus courte et plus large. Les cornéocytes changent également sur les plans morphologique et fonctionnel avec une diminution de leur propriété d'adhérence entraînant des conséquences sur le renouvellement cellulaire (80). Ce phénomène cellulaire est particulièrement observé chez les femmes ménopausées. Il viendrait d'une modification de la cohésion des cornéocytes ou d'une diminution de la dégradation des cornéo-desmosomes (88).

L'implication du vieillissement chronologique sur la détérioration de la couche épidermique a été modélisée par l'utilisation d'un système de peau âgée reconstruite. Un anticorps dirigé contre la protéine Ki67, un marqueur de la prolifération cellulaire des phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) (89), montre un taux de prolifération qui diminue progressivement au cours de l'âge (90). En accord avec ces données, un marquage de la protéine p16, un inhibiteur de la division cellulaire, montre une augmentation de son expression dans les couches basales et spineuses de l'épiderme, confirmant le ralentissement de la prolifération cellulaire au cours du vieillissement. D'autre part, des anticorps qui reconnaissent des protéines

impliquées dans la différenciation tardive des kératinocytes, comme l'involucrine et la filaggrine, révèlent une diminution de l'expression de ces marqueurs de différenciation au cours du vieillissement chronologique (90). Par ailleurs, il a été montré que les rayonnements UVs altèrent davantage les mécanismes de prolifération et de différentiation kératinocytaires et parfois même ceux de desquamation (81).

Dans le cas du lentigo actinique, si les stades les plus précoces montrent une augmentation de l'expression du marqueur Ki67 par rapport aux zones non pigmentées, les stades les plus tardifs révèlent une diminution (87). L'augmentation de la prolifération des kératinocytes des stades précoces serait confortée par une hyperplasie tissulaire où les kératinocytes ont une morphologie plus large que ceux de la zone saine adjacente, suggèrant ainsi un processus de desquamation de l'épiderme retardé (91, 92). Aux stades les plus tardifs du lentigo actinique, la différenciation cellulaire est particulièrement altérée. Une perte de l'expression des protéines exprimées dans la couche basale (la cytokératine 15) et dans la couche cornée (la filaggrine et l'involucrine) a été observée par rapport à la zone saine adjacente (91), révélant un défaut de prolifération et de cornification des kératinocytes dans le lentigo actinique [**Figure 6].**

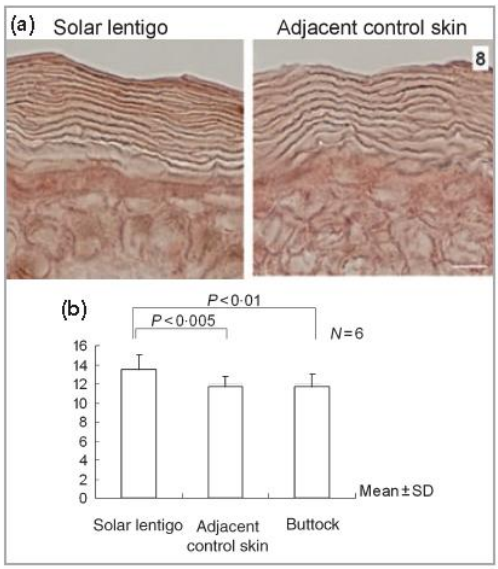


Figure 6: Augmentation du nombre de cellules du stratum corneum dans le lentigo actinique.

Le panel (a) montre les coupes histologiques issues de biopsies du lentigo actinique et de la zone contrôle adjacente avec des couches cellulaires plus larges pour le lentigo actinique. La quantification (b) des couches cellulaires entre le lentigo actinique, la zone adjacente et la zone non-exposée montre une augmentation significative du nombre de couches du stratum corneum dans le lentigo actinique.
D'après Aoki. *et al.* Clinical and Laboratoru investigation, 156,1214-1223, 2007.

3.1.2. A l'échelle des mélanocytes

Lors du vieillissement chronologique, la pigmentation cutanée devient hétérogène. Cette hétérogénéité est liée à une diminution du nombre de mélanocytes (11) et à une baisse de l'activité des enzymes de la mélanogénèse (8 % à 20 % par décennie) (80,81) qui participent à une réduction de la capacité de la peau à se protéger contre les radiations du soleil. L'hétérogénéité de la couleur est particulièrement renforcée dans les zones exposées de façon chronique aux rayonnements UV, comme le dos de la main et le visage. Le vieillissement photo-induit entraîne une augmentation du nombre de mélanocytes, une accumulation hétérogène de mélanine dans les cellules épidermiques et une perte de l'interaction entre les kératinocytes et les mélanocytes (82). Ces caractéristiques sont retrouvées dans la lésion du lentigo actinique.

Dans ce modèle d'hyperpigmentation bénigne, un marquage avec un anticorps dirigé contre une protéine membranaire des mélanocytes, Melan-A, conclut à un nombre plus important de mélanocytes, l'expression de Melan-A étant maintenue au cours de l'évolution de stade du lentigo actinique (93 , 94). Le marquage simultané avec des anticorps reconnaissant Melan-A et Ki67 de coupes histologiques de lentigo actinique révèle que l'augmentation du nombre de mélanocytes n'est pas provoquée par la prolifération des mélanocytes de la couche basale épidermique. En revanche, le dépôt de mélanine est progressif au cours de l'évolution du lentigo actinique (93).

3.2. Altération de la couche dermique

La MEC est le substrat de l'adhésion, la migration, la croissance, la différentiation cellulaire, mais elle sert également de support mécanique au tissu cutané. Elle se remodèle pour s'adapter à différents contextes physiologiques ou environnementaux. Les macromolécules de la MEC sont activement synthétisées pendant le développement et la croissance de l'homme. Chez l'adulte, leur renouvellement est lent. Au cours du vieillissement, l'interaction des macromolécules avec les facteurs environnementaux, l'altération des processus de synthèse et de dégradation perturbent l'homéostasie de la matrice et la fonctionnalité du derme.

Avec l'âge, l'épaisseur de la couche dermique diminue. Cette atrophie est retrouvée dans le lentigo actinique particulièrement au niveau du derme papillaire (22, 80, 95).

La sécrétion des composants de la substance fondamentale de la MEC par les fibroblastes est également soumise à modulation [**Figure 7**]. En effet, une diminution de la production des GAG, comme l'acide hyaluronique, est observée et induit une perte du maintien et de l'hydratation du

tissu cutané (80). Une réduction de la synthèse des fibres de la MEC, telles que le collagène et l'élastine, est aussi observée. D'une part, les fibres d'élastine soumises à une calcification, sont dégradées et favorisent la perte d'élasticité du tissu cutané. D'autre part, les fibres de collagène qui s'organisent de façon anarchique, conduisent aussi à une perte de fermeté cutanée (80). Ces modifications de fibres de la MEC ont des répercussions visibles avec la formation de rides et ridules (96).

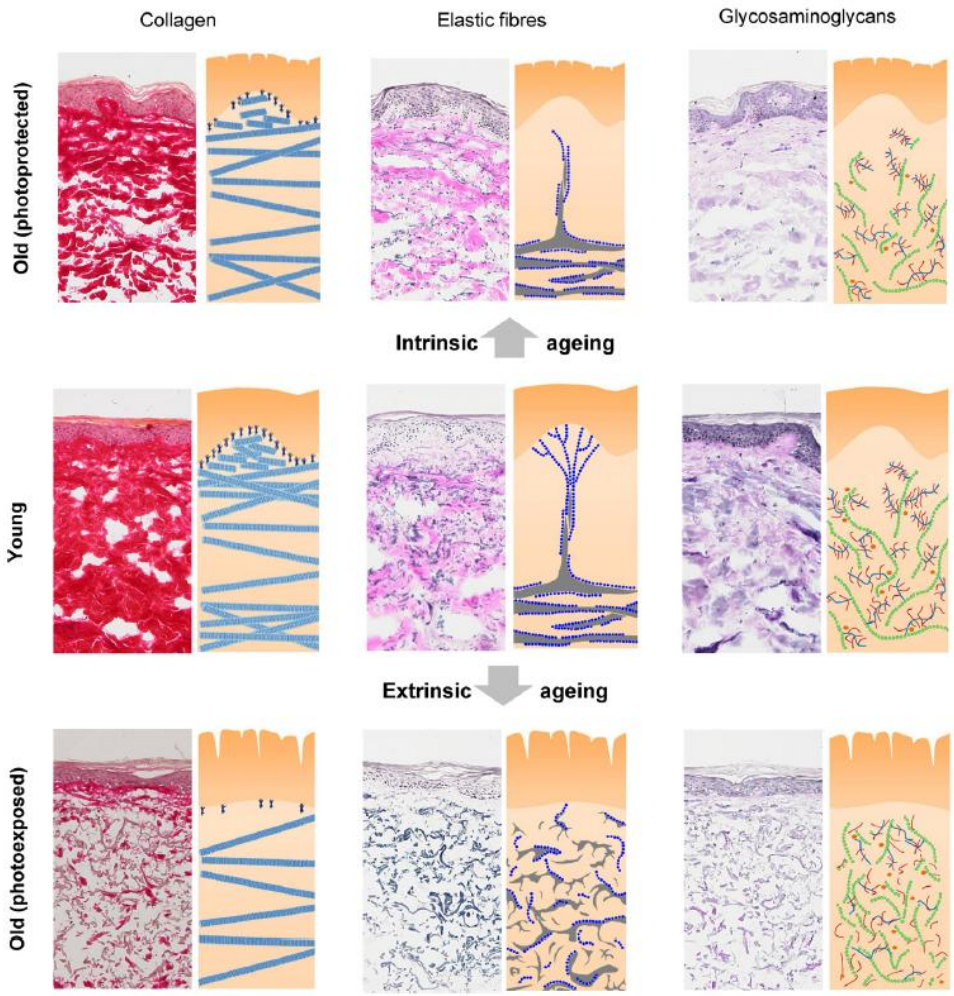


Figure 7: Représentation schématique du remodelage de la matrice extracellulaire dans les processus de vieillissement chronologique (old photoprotected), de vieillissement photo-induit (old photoexposed) par rapport au processus normal (young).

Au cours du vieillissement chronologique, une atrophie des fibres de collagène, est observée, particulièrement dans le derme réticulaire; cette atrophie est d'autant plus marquée dans la zone photo-exposée. Au cours du vieillissement cutané, les fibres d'élastine et les GAG diminuent, alors qu'au cours du vieillissement photo-induit, ils s'accumulent et se répartissent de manière désorganisée. Modifiée d'après Naylor. *et al.* Molecular aspects of skin ageing, 69, 249-56, 2011.

Le vieillissement photo-induit amplifie la dégradation de la couche dermique. En agissant principalement sur les protéines de la MEC, ce type de vieillissement perturbe l'équilibre entre les

enzymes qui participent au remodelage de cette matrice. En effet, la production des métallo-protéinases matricielles (MMP), qui dégradent les composants de la matrice, est augmentée (notamment MMP-1 qui dégrade les collagènes de type I, II, et III) alors que celle de leurs inhibiteurs (TIMP pour Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase notamment TIMP-1) est diminuée. (97).

3.2.1. Les cellules dermiques

3.2.1.1. Les fibroblastes

En dehors des altérations de la MEC, l'atrophie de la couche dermique est expliquée par une diminution du nombre de fibroblastes (80), une modification de leur morphologie et de leur capacité migratoire (95). Une étude des effets du rayonnement UV sur des fibroblastes en culture montre qu'il induit un changement morphologique caractéristique (30) **[Figure 8].**

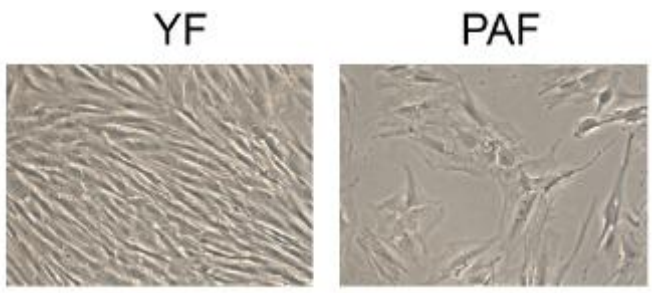


Figure 8 : Comparaison morphologique de fibroblastes photo-exposés et jeunes.

Les fibroblastes jeunes (YF) et photo-exposés (PAF), extraits respectivement à partir de biopsies de donneurs âgé et jeune, montrent des caractéristiques morphologiques distinctes. En effet, les fibroblastes jeunes ont une morphologie fusiforme/allongée alors que les fibroblastes photo-exposés sont plus étoilés/aplatis avec un cytoplasme plus élargi.
Modifiée d'après Duval. *et al.* Plus One, 9, e114182, 2014.

3.2.1.2. Les sous-populations de fibroblastes dermiques

Le vieillissement cutané affecte davantage les fibroblastes papillaires que les fibroblastes réticulaires. En effet, une exposition prolongée aux rayonnements UV touche principalement la couche dermique la moins profonde du tissu cutané, à savoir la couche papillaire (22). Par ailleurs, des expériences *in vitro* effectuées avec des cultures de fibroblastes ont montré une différenciation des fibroblastes papillaires en fibroblastes réticulaires, suggérant un déséquilibre de l'homéostasie fibroblastique qui contribuerait au vieillissement cutané (95). Il est intéressant de noter que la diminution du volume papillaire (22) pourrait être induit par une perte du phénotype papillaire.

D’autre part, la population des fibroblastes papillaires au cours du processus de vieillissement a été montrée pour gagner en hétérogénéité en terme de taille et diminuer leur prolifération (22, 98). Dans le cas du lentigo actinique, les fibroblastes papillaires voient leur nombre augmenter par rapport à ceux de la zone saine adjacente (99). De plus, les fibroblastes papillaires montrent une hausse de leur capacité contractile au cours de l’âge (98), suggérant une différenciation vers des cellules « myofibroblastes-like ». Ces fibroblastes papillaires « âgés » ont également un profil de sécrétion différent de celui des fibroblastes réticulaires, à savoir un taux plus élevé de KGF, VEGF, MMP-1,-2,-3 et TIMP-1,-2 (98). Ces niveaux de sécrétion différentiels modulent les interactions entre les fibroblastes et les autres types cellulaires de l’environnement cutané.

3.2.1.3. Interactions entre les fibroblastes et les autres types cellulaires

Les interactions entre les cellules mésenchymateuses et les cellules épithéliales sont modifiées avec l’âge de l’individu. En effet, une différenciation incomplète des kératinocytes a été observée lors d’une co-culture de kératinocytes avec des fibroblastes extraits d’une peau âgée. Ceci suggère une contribution des fibroblastes dans la différentiation des kératinocytes (98). Une culture de fibroblastes papillaires et réticulaires extraits de biopsies de peau âgée et jeune, démontre que les fibroblastes papillaires « jeunes » participent davantage à la différenciation kératinocytaire (98). Ces travaux soulignent l’importance fonctionnelle de cette sous-population fibroblastique dans la perte de la fonction protectrice du tissu cutané au cours du vieillissement [**Figure 9**].

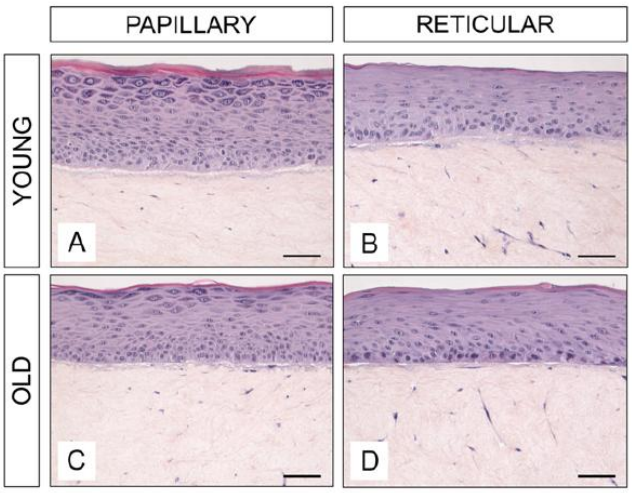


Figure 9 : Coupes histologiques colorées de peaux reconstruites à partir de fibroblastes papillaires et réticulaires extraits de peau jeune (A, B) et âgée (C, D).

Une comparaison des différentes coupes colorées montre des modifications de la différenciation de la peau reconstruite à partir des fibroblastes papillaires (A, C) ou des fibroblastes réticulaires (B, D). Si la présence des fibroblastes réticulaires conduit à la formation d'un fin épiderme, celle des fibroblastes papillaires aboutit à un épiderme plus épais avec un nombre de couches et une différenciation cellulaire plus importants. Quelque soit l'âge, les fibroblastes papillaires ont une plus grande capacité à induire la différenciation épidermique que les fibroblastes réticulaires.
Modifiée d'après Mine. *et al.* PloS one, 3, e4066, 2008.

Au cours du vieillissement photo-induit, les fibroblastes contribuent à une modification de la pigmentation cutanée. Afin de mieux comprendre les effets d'une exposition chronologique au soleil dans le processus d'hyperpigmentation, des modèles cellulaires *in vitro* et *ex vivo* ont été développés.

Kovacs *et al.* ont proposé un modèle à partir de fibroblastes photo-vieillis par des expositions répétées aux radiations UVA. Dans ce modèle 1 dimension (D), les taux de transcription des facteurs de croissance HGF, KGF et SCF sont augmentés et agiraient directement ou indirectement (par l'intermédiaire des kératinocytes) pour induire une hyperpigmentation photo-induite comme dans le cas du lentigo actinique (100). Imokawa *et al.* ont développé un système « cellulaire-like » en cultivant des mélanocytes en présence de milieux conditionnés de fibroblastes extraits de biopsies cutanées de donneurs jeunes et âgés. Cette étude montre que les sécrétions de HGF et SCF sont augmentées en présence des surnageants de fibroblastes âgés, confirmant le rôle de ces 2 cytokines dans la modulation de la pigmentation cutanée au cours du vieillissement (24). De plus, Salducci *et al.* ont généré un modèle 3D-like à partir d'une co-culture de kératinocytes et mélanocytes incubés en présence du surnageant de fibroblastes âgés pré-traités avec des rayonnements UVs. Ce modèle reproduit les principales caractéristiques histologiques décrites dans le cas du lentigo actinique (101). Enfin, Duval *et al.*

ont élaboré un modèle 3D de peau reconstruite à partir d'une co-culture de kératinocytes, de mélanocytes et de différents types de fibroblastes. Les résultats montrent une hyperpigmentation plus importante dans le modèle impliquant les fibroblastes issus d'une peau âgée photo-exposée par rapport aux fibroblastes extraits d'une biopsie cutanée jeune. Cette hyperpigmentation étant liée à une augmentation de la production de mélanine qui découle d'une régulation positive de l'expression de gènes impliqués dans la mélanogénèse (30) **[Figure 10]**.

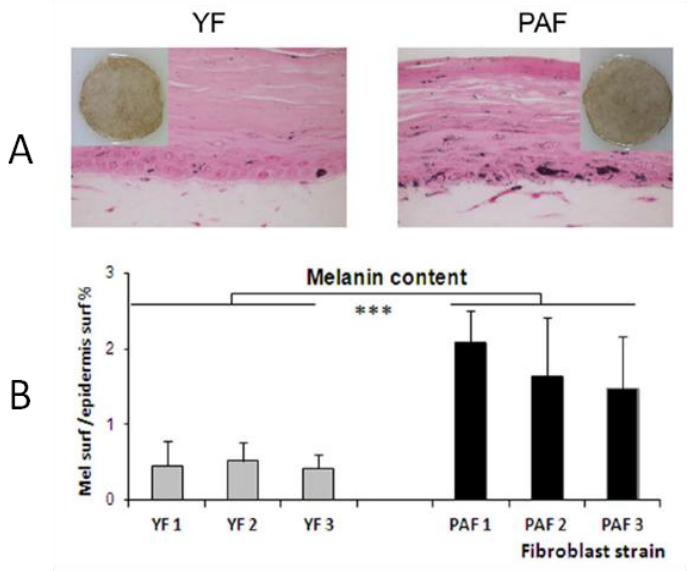


Figure 10 : Mesure de la pigmentation dans les deux modèles de peau reconstruite à partir des fibroblastes jeunes et des fibroblastes photo-âgés.

A) Observation macroscopique du niveau de pigmentation des deux modèles de peau reconstruite (encadré) et coloration au Masson-Fontana des coupes histologiques générées. La présence de fibroblastes photo-âgés (PAF) révèle une hyperpigmentation plus importante à l'échelle macroscopique. B) Une quantification de la mélanine sur les sections histologiques confirme une plus forte concentration du pigment en présence des fibroblastes photo-âgés.
Modifiée d'après Duval. *et al.* Plus One, 9, e114182, 2014.

Au stade précoce du lentigo actinique, le niveau d'expression de PAR-2, un récepteur qui participe au transfert des mélanomes, est quasi similaire à celui de la zone non-pigmentée avec une expression plus prononcée dans la totalité de l'épiderme sauf la couche basale. Au stade tardif du lentigo actinique, le taux d'expression de PAR-2 est réduit, ce qui suggère une éventuelle inactivation du transfert des mélanosomes dans les kératinocytes (87).

3.2.1.4. Les cellules endothéliales

Le vieillissement chronologique diminue le nombre de vaisseaux sanguins et entraîne une baisse de la vascularisation du tissu cutané. Par des modifications structurales de l'endothélium des vaisseaux et particulièrement par son impact sur les cellules musculaires lisses,

le vieillissement chronologique agit directement sur le processus de vasoconstriction des vaisseaux et en particulier, sur la réduction du processus de vasodilatation qui a plusieurs fois été décrite dans des modèles âgés chez l’animal et l’humain, (102).

Au cours de la ménopause, les symptômes vasomoteurs se manifestent par une « onde de chaleur » ressentie depuis la partie supérieure du corps, qui se propage ensuite à l’ensemble de l’organisme puis se dissipe sous forme de transpiration. Même si le mécanisme physiopathologique n’est pas élucidé, les symptômes vasomoteurs sont associés à des modifications de la pression sanguine provenant d’une anomalie centrale de la thermorégulation et d’une vasodilatation périphérique (103, 104). Certaines études constatent une pression sanguine élevée lors des symptômes vasomoteurs qui est sous l’influence du système nerveux sympathique. En effet, après un traitement à la toxine botulique pour bloquer la neurotransmission cholinergique dans la femme ménopausée, la vasodilatation lors des symptômes vasomoteurs est bloquée voir partiellement diminuée par la toxine botulique (104). Ceci suggère que le système neural influence l’augmentation de la pression sanguine lors des symptômes vasomoteurs et donc que la carence oestrogénique impacte sur la microcirculation cutanée.

La fonction des cellules endothéliales est altérée et notamment avec la baisse de sécrétion des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF. La restriction de la sécrétion de ce dernier défavorise une cicatrisation cutanée optimale (10). En revanche, l’exposition aux irradiations UVs favorise l’angiogénèse et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par l’amplification de l’expression de VEGF (81, 82). Par conséquent, les nouveaux vaisseaux formés sont immatures et sont responsables de l’initiation de l’inflammation locale (81).

En accord avec une angiogénèse plus élevée dans la peau photo-exposée, une augmentation de la densité et de la taille des vaisseaux sanguins est retrouvée dans les biopsies de lentigo actinique. Un marqueur des cellules endothéliales, le CD31, montre davantage de signal dans les lésions hyper-pigmentées et révèle la présence de larges vaisseaux sanguins dans le derme papillaire, (105) **[Figure 11]**.

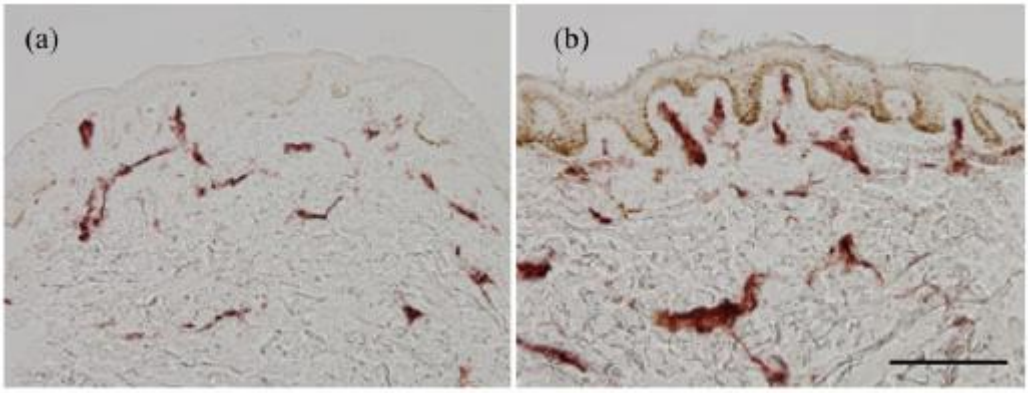


Figure 11: Marquage du CD31 sur des coupes histologiques effectuées à partir de biopsies de zone non pigmentée (a) et de zone hyperpigmentée de lentigo actinique (b).

Suite à un marquage des cellules endothéliales avec un anticorps dirigé contre la protéine CD31, une comparaison entre les zones non-pigmentée et hyper-pigmentée montre un élargissement des vaisseaux sanguins dans le lentigo actinique.
Modifiée d’après Iriyama. *et al.* Journal of dermatological science, 64, 223-8, 2011.

3.3. Altération de la jonction dermo-épidermique

Sur le plan histologique, le vieillissement chronologique entraîne des modifications de la jonction dermo-épidermique qui s’aplatit et se linéarise avec une perte « des motifs ondulatoires ». Cette linéarisation serait principalement causée par une perte des fibroblastes papillaires (22) qui sont des marqueurs du vieillissement de la lame basale épidermique (11). Ces changements structuraux modifient les échanges de matériel entre le derme et l’épiderme avec une réduction de l’apport en nutriments et en oxygène (11). De plus, la linéarisation de cette jonction augmente le potentiel de séparation des couches dermique et épidermique et entraîne la formation de rides (11) [**Figure 12**].

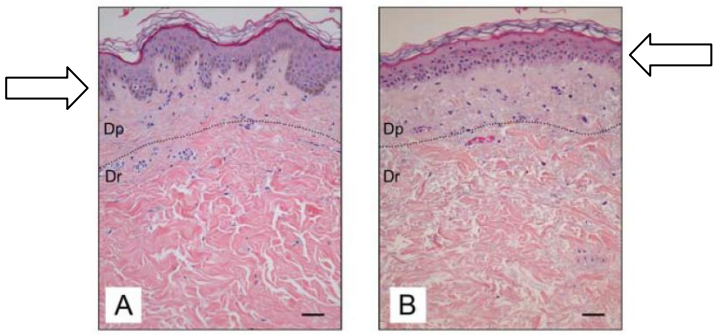


Figure 12: Comparaison des jonctions dermo-épidermiques sur coupes histologiques de biopsies issues d'une peau jeune et d'une peau âgée.

Après coloration à l'hématoxyline, l'éosine et au safran, le derme papillaire (Dp) et le derme réticulaire (Dr) ont été repérés sur les coupes histologiques. Les motifs ondulatoires de la jonction dermo-épidermique sont clairement observés dans la peau jeune (A, donneur âgé de 19 ans), alors qu'ils sont absents avec une linéarisation de la jonction dans la peau âgée (B, donneur âgé de 74 ans). La structure désorganisée des fibres de collagène est également visible dans le derme de peau âgée.
Modifiée d'après Mine. *et al.* PloS one, 3, e4066, 2008.

Le vieillissement photo-induit renforce les effets du vieillissement chronologique sur la jonction dermo-épidermique. En effet, les rayonnements UVs accélèrent la dégradation des fibres d'ancrage responsables de la cohésion entre les couches épidermique et dermique (81). De ce fait, une perte de collagène VII ne permet plus l'ancrage à la lamina densa (96).

Dans le lentigo actinique, la jonction dermo-épidermique est altérée; altération qui est d'autant plus forte que la lésion progresse. Sur des coupes histologiques de lentigo actinique à des stades précoces, la jonction dermo-épidermique montre des ondulations simples et courtes. En revanche, à des stades tardifs, cette jonction révèle des ondulations complexes, intriquées et qui s'affaissent dans le derme (87, 91, 94) **[Figure 13 b]**.

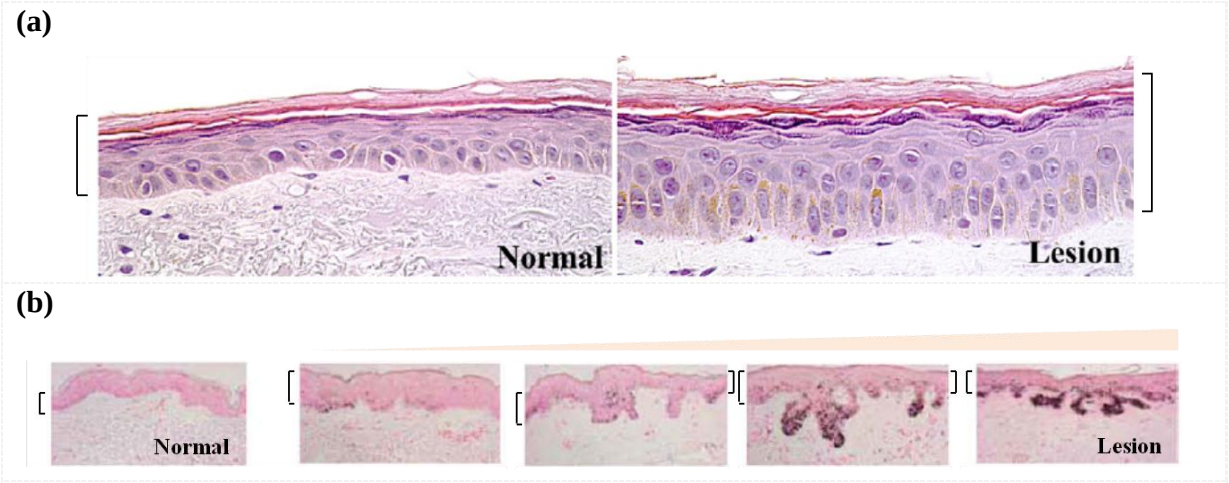


Figure 13: Epiderme et complexité des jonctions épidermiques sur des coupes histologiques issues de biopsies de zones cutanées saine, non lésée et lésée (lentigo actinique).

Après coloration à l'hématoxyline, l'éosine et au Masson-Fontana des coupes histologiques, une comparaison entre la lésion et la contrepartie adjacente montre (a) un épaississement de l'épiderme et une linéarisation de la jonction-dermo épidermique dans le lentigo actinique. (b) un amincissement progressif de l'épiderme et une complexité grandissante de la jonction dermo-épidermique dans le lentigo actinique.
Modifiée d'après Shin. *et al.* Clinical and experimental dermatology, 40,489-494, 2015 (a) et de Lin. et al Journal of dermatological science, 59, 91-97, 2010 (b)

Les modifications structurales de la jonction dermo-épidermique entraînent un dysfonctionnement des échanges bi-directionnels entre l'épiderme et le derme. Cette altération se traduit dans le lentigo actinique par une dégradation des chaînes d'héparane sulfate qui servent de réservoirs aux facteurs de croissance tels que le bFGF, le HGF, le GM-SCF et le VEGF-A. Lors d'une exposition au soleil, cette dégradation est accélérée suite à une activation des protéases héparanases. Ce mécanisme moléculaire a été décrit dans le processus d'hyperpigmentation d'un modèle de peau reconstruite mimant le lentigo actinique. En effet, l'implication fonctionnelle des héparanases a été démontrée par l'utilisation d'un inhibiteur qui bloque leur activité enzymatique; cet inhibiteur décroit le niveau de pigmentation dans un modèle de peau reconstruite (105) **[Figure 14]**.

Figure 14: Modification du niveau de pigmentation suite à un traitement par un inhibiteur d’héparanase dans un modèle de peau reconstruite.

En présence d’un inhibiteur d’héparanase (With heparanase inhibiteur ; 1-[4-(1H-Benzoimidazol-2-yl)phenyl]-3-[4-(1H-benzoimidazol-2-yl)phenyl]urea), une diminution du taux de pigmentation est observée par rapport à son contrôle (Control).
Modifiée d’après à partir de Iriyama. *et al.* Journal of Dermatological Science, 64,223-228, 2011.

3.4. L’altération de la couche hypodermique

La distribution corporelle de la couche hypodermique se modifie avec l’âge. Si la proportion du tissu adipeux augmente dans certaines zones comme les hanches, l’abdomen et les cuisses, elle diminue dans d’autres zones comme le visage, les mains et les pieds. Ces changements provoquent une accentuation du relâchement cutané, la formation de rides et une modification de la thermorégulation (11).

4. Dérégulation de la pigmentation cutanée dans le lentigo actinique

4.1. Le contexte macroscopique du lentigo actinique

Macroscopiquement, de nombreuses lésions hyper-pigmentaires sont observées chez l’homme. Elles peuvent être d’origine génétique, liées au vieillissement cutané et, pour certaines d’entre elles, se manifester dans le cadre d’un vieillissement photo-induit **[Figure 15]**. J’ai choisi de décrire uniquement certaines de ces lésions pour leurs spécificités cliniques qui doivent être distinguées du lentigo actinique.

Le lentigo actinique est un spot hyper-pigmenté. Il est considéré comme provenant d’un changement cutané au cours de l’âge et se développe principalement sur les zones photo-exposées. Ses caractéristiques morphologiques macroscopiques le définissent comme une tache pigmentaire aux bords bien définis et ayant un aspect plat. En dehors du facteur extrinsèque correspondant à une exposition chronique aux rayonnements UVs, d’autres facteurs environnementaux, comme la pollution de l’air, contribueraient au développement du lentigo actinique. En dépit de leur nature bénigne, l’impact social de l’acceptation de ces lésions, apparaissant principalement sur le visage et les membres exposés, n’est pas négligeable.

Les éphélides sont des macules caractérisées par leur forme plate, et leur petite taille. Compte tenu de leur caractère bénin, ces hyperpigmentations se distinguent du lentigo actinique par leur apparence moins pigmentée.

Les kératoses séborrhéiques sont des taches pigmentaires plus rondes, bombées et arborant un spectre de couleur marron clair à marron foncé.

Contrairement aux trois lésions hyperpigmentées bénignes décrites ci-dessus, la kératose actinique apparait comme une forme précurseur du carcinome épidermoïde. Elle est rugueuse au toucher, de petite taille et de couleur rouge à marron suite à une exposition accrue au soleil.

Enfin, défini comme une lésion hyperpigmentée maligne, le mélanome lentigo malin se développe suite à une exposition chronique aux irradiations UVs. Il a un aspect asymétrique avec des bords irréguliers et une hétérogénéité pigmentaire.

Hormis leurs caractéristiques et leurs mécanismes pathologiques propres, ces lésions partagent un processus de mélanogénèse régulé par des interactions cellulaires mettant en jeu non seulement les kératinocytes et les mélanocytes de l’épiderme mais également les fibroblastes du derme. Diverses approches à l’échelle tissulaire et cellulaire ont été utilisées pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les désordres du lentigo actinique. Elles

incluent des modèles biologiques comme des biopsies de peau, des cellules primaires irradiées aux rayonnements UVs et des cultures de peaux.

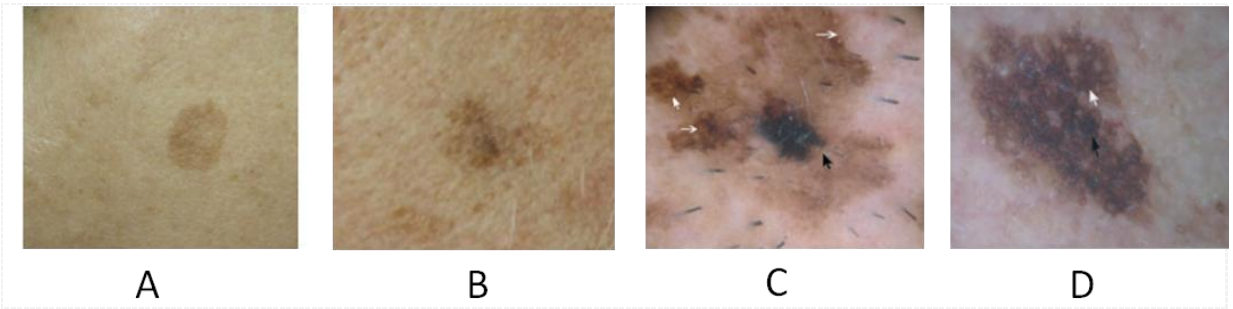


Figure 15: Observation macroscopique de 4 lésions hyperpigmentées : le lentigo actinique (A), la kératose séborrhéique (B), la kératose actinique (C) et mélanome lentigo malin (D).

Les observations macroscopiques permettent de distinguer le lentigo actinique (A) de d'autres lésions hyperpigmentées en fonction de la taille et de la couleur, comme dans le cas de la kératose séborrhéique (B), la kératose actinique (C), et le mélanome lentigo malin (D)
Modifiée d'après Goncharova. *et al.* ISRN Dermatol, 2013, 546813, 2013 (A, B) (106) et de Akay. et al Br J Dermatol, 163, 1212-7, 2010 (C, D) (107).

Au regard d'une littérature en plein développement sur les mécanismes physiopathologiques du lentigo actinique, j'aborderai le prochain chapitre en me concentrant sur l'identification et l'expression différentielle de biomarqueurs en lien avec l'hyperpigmentation.

4.2. Altération de la mélanogénèse dans le lentigo actinique

La plupart des modèles biologiques du lentigo actinique utilisent des contrôles inter-individuels et/ou intra-individuels qui permettent d'identifier des biomarqueurs selon leur présence/absence ou leur niveau d'expression. Ces derniers participent à des voies enzymatiques et/ou des cascades de signalisation qui régulent la mélanogénèse au cours de l'évolution de ce désordre hyper-pigmentaire. Par ailleurs, l'étude de l'implication des rayonnements UVs dans le développement du lentigo actinique a mis en œuvre des approches immunohistochimiques qualitatives et des analyses génomiques quantitatives dans divers processus biologiques.

4.2.1. Biomarqueurs de la voie enzymatique de la mélanogénèse

La mélanogénèse met en jeu une voie enzymatique qui repose principalement sur trois enzymes, la Tyr, la Trp-1 et la Trp-2, localisées dans la membrane des mélanosomes. En tant que marqueurs de la mélanogénèse, le marquage de ces enzymes a permis de valider l'hyperpigmentation du lentigo actinique. Dans un premier temps, une approche d'immunohistochimique qualitative montre une augmentation de l'expression des Tyr et Trp-1 sur une coupe de lentigo actinique comparativement à une coupe de la zone saine adjacente ou d'une zone non pigmentée (87, 91, 93, 108). Dans un second temps, différentes approches quantitatives

démontrent une importante régulation des protéines Tyr et Trp-1 et l'implication Trp-2 dans la production d'eumélanine et de phéomélanine au sein du lentigo actinique (91, 109). L'éventuelle participation d'une protéine impliquée dans la biogénèse du pré-mélanosome, PMEL 17, a également été démontrée. En effet, une augmentation de sa transcription a été détéctée dans le lentigo actinique par rapport à la zone saine adjacente et à la zone normale non photo-exposée (91, 109).

4.2.2. Biomarqueurs des voies de signalisation régulant la mélanogénèse

La plupart des protéines impliquées dans la production de mélanine sont régulées par le facteur de transcription MIFT. Les études transcriptionnelles et traductionnelles de MIFT montrent une expression plus élevée de ce facteur dans le lentigo actinique par rapport aux zones saine adjacente et normale non-exposée (86, 91, 109). Sachant que MIFT est un régulateur majeur du développement et de la différenciation des mélanocytes, son augmentation suggère une prolifération plus importante des mélanocytes au sein de cette lésion hyperpigmentée.

Par ailleurs, le stress UV contribue à une modification de l'expression de nombreuses cytokines provoquant une altération de la communication cellulaire au sein du tissu hyperpigmenté. Au niveau de l'épiderme du lentigo actinique, l'expression du TNF-α est augmentée alors que celle de l'IL1-α est diminuée par rapport à la zone adjacente non-pigmentée (110). Sachant que les kératinocytes secrètent ces deux cytokines en réponse à une irradiation aux UVs, ces données impliquent fonctionnellement le TNF-α et l'IL1-α dans le développement du lentigo actinique et argumentent en faveur d'un environnement inflammatoire dans cette pathologie (111, 112).

Les kératinocytes régulent la croissance et l'activité des mélanocytes par des mécanismes de sécrétion paracrine impliquant l'ET-1, le GM-SCF, le bFGF et le SCF (111). L'hyperpigmentation du lentigo actinique est liée à une augmentation de l'intensité du marquage de l'ET-1 et du SCF dans l'épiderme de la lésion par rapport à la zone saine adjacente (110, 113). Ce marquage protéique a été confirmé par une approche transcriptomique qui montre une transcription d'ARNm plus importante de l'ET-1 et du SCF. Leurs récepteurs membranaires respectifs, à savoir l'ETBR et le c-kit, sont également surexprimés dans le lentigo actinique (91, 110, 113). La production de ces cytokines mélanogéniques par les kératinocytes, est stimulée par le TNF-α et l'IL1-α, ces travaux suggèrent que le développement du lentigo actinique implique une altération du dialogue entre les mélanocytes et les kératinocytes. Au niveau de la couche basale, le rôle principal des mélanocytes consiste à protéger les kératinocytes des dommages des rayonnements UVs. En réponse à ce stress, les mélanocytes produisent les pigments de mélanine

stockés dans les mélanosomes, puis les transférent aux kératinocytes grâce à leursdendrites. L'activation des mélanocytes passe notamment par la voie de signalisation de Wnt/β-caténine, et est liée à une accélération du processus de différenciation des cellules souches (mélanoblastes) qui amène à la formation de macula hyperpigmentée (93). Dans le lentigo actinique, l'augmentation du nombre de mélanocytes viendrait d'une augmentation anormale des cellules souches au niveau du bulbe du follicule pileux (93). Une étude récente a établi que le niveau d'expression de la protéine secreted Frizzled protein-2 (sFRP2), un modulateur de la voie Wnt, est augmenté dans l'épiderme et le derme. Ces données argumentent en faveur de l'implication fonctionnelle de sFRP2 dans le développement des désordres hyperpgimentaires (38).

Dans le derme, les fibroblastes interagissent indirectement avec les mélanocytes par l'intermédiaire de nombreuses de cytokines comme le SCF, le HGF, et le KGF. Ce réseau de cytokines influence la croissance, l'activité pigmentaire et la morphologie des mélanocytes (114). Le HGF et le KGF sont exprimés au sein du derme supérieur du lentigo actinique (100, 115). Les niveaux d'expression de KGF et de son récepteur KGFR sont augmentés dans la couche basale de l'épiderme du lentigo actinique par rapport à la zone adjacente ou normale (87, 100, 108, 116). Le facteur de croissance HGFa également un niveau augmenté dans le lentigo actinique par rapport à la zone non-pigmentée (115). Il est intéressant de noter que la présence d'HGF est associée à celle des cellules « mélanophages-like », qui contiennent de larges complexes mélanosomaux avec des structures granulaires remplies de mélanine. L'utilisation combinée de microcopie électronique et d'immuno-histologie a permis de mieux caractériser ce type cellulaire par un marquage spécifique (FXIIIa+) des macrophages situés dans le derme, nommés les dendrocytes dermiques (92). Les résultats montrent un nombre plus important de dendrocytes dermiques dans les biopsies de lentigo actinique par rapport aux biopsies de la zone cutanée non-lésée. Ces cellules seraient impliquées dans l'absorption massive de mélanine qui contribuerait au processus d'hyperpigmentation.

L'ensemble de ces différents travaux souligne l'importance d'un dialogue direct ou indirect entre les mélanocytes, kératinocytes et fibroblastes de l'épiderme et du derme cutanés. Une altération de cette communication cellulaire se produit en réponse aux rayonnements UVs et conduit au développement du lentigo actinique. Une analyse de l'expression des divers facteurs solubles sécrétés par l'épiderme et le derme, à différents stades d'évolution du lentigo actinique, révèle que certains d'entre eux constituent des biomarqueurs du développement du lentigo actinique.

MES TRAVAUX

Mes travaux en recherche clinique

I. Synthèse des résultats de mes recherches en clinique

L'homogénéité du teint évolue au cours du temps et dépend de certains facteurs extrinsèques, dont le rayonnement ultraviolet. S'accentuant avec l'âge, l'hétérogénéité cutanée se traduit par une perte de la régulation de la fonction de photo-protection de la peau. Cette hétérogénéité s'exprime notamment par l'accentuation de signes de vieillissement (les rides, le relâchement cutané et un teint plus terne) et par l'apparition de désordres pigmentaires (70). Par l'acceptation d'un changement physique de l'individu au sein de notre société, cette perte d'homogénéité du teint a des conséquences socio-économiques importantes (1).

Dans ce contexte, mes travaux en recherche clinique se sont déclinés sous la forme de 3 études dont le principal objectif consistait à diminuer l'impact de facteurs extrinsèques tout en identifiant des indicateurs d'un des désordres pigmentaires, à savoir le lentigo actinique.

La première étude a tout d'abord consisté en l'élimination des cellules superficielles du stratum corneum par une double action mécanique et enzymatique grâce à l'ajout d'un principe actif qui stimule les enzymes impliquées dans la desquamation de la peau. Cette étape a été suivie par l'optimisation du transfert du principe actif dans l'épiderme par une augmentation de l'énergie mitochondriale des cellules cutanées en réponse à l'ajout d'un second principe actif. Les résultats des analyses biométrologiques ont montré une augmentation de la desquamation, de la réflexion de la lumière et de l'hydratation cutanée. Ils démontrent donc que la composition séquentielle des principes actifs utilisés dans notre étude contribue à l'amélioration de l'homogénéité du teint **(cf. brevet en Annexe 1)**.

L'absence de lumière est décrite pour augmenter la synthèse de la mélatonine, qui est produite par les cellules cutanées, et pour réguler l'expression de divers gènes circadiens. Le rayonnement ultraviolet est, quant à lui, connu pour entrainer une diminution de la mélatonine et une baisse de l'expression de gènes circadiens. La seconde étude du versant clinique de mes travaux a été, premièrement, d'ajouter un peptide qui augmente l'expression de gènes circadiens dans les cellules cutanées. Puis, d'ajouter un second principe actif qui augmente la synthèse de mélatonine par les cellules cutanées. Les résultats de notre essai clinique montrent que ce traitement topique entraine une réduction des signes de fatigue chez les volontaires et permet une amélioration de l'homogénéité du teint **(cf. brevet Annexe 2)**.

La troisième étude clinique a consisté en l'exploration fonctionnelle du lentigo actinique grâce à la constitution d'une cohorte de 80 femmes présentant peu (grade 1) ou ayant plusieurs

lentigos actiniques (grade 2) sur le visage. Après illustration du grade par une mesure photographique, différentes mesures biométrologiques ont quantifié les taux de sébum, de mélanine, d'hémoglobine, d'hydratation, de couleur et de réflexion de lumière. Des analyses statistiques comparatives de ces différentes mesures montrent que la quantité de sébum discrimine les territoires cutanés de la joue et du front. De plus, les taux de mélanine, d'hémoglobine, de réflexion de la lumière et de couleur sont différentiels entre les zones lésée (lentigo actinique) et non lésée adjacente au sein du territoire de la joue chez un volontaire. Enfin, une diminution des taux de réflexion de la lumière et d'hémoglobine, ainsi qu'une augmentation du taux d'hydratation, sont observées entre les grades 1 et 2 au sein de la zone lésée. L'ensemble de ces données mettent en évidence certains paramètres biométrologiques comme indicateurs du territoire cutané, de la zone lésée *vs* non lésée et de l'évolution du lentigo actinique (cf. ci-après).

En résumé, nos travaux en recherche clinique ont contribué à développer non seulement des « formules topiques » qui améliorent l'homogénéité du teint mais également des outils indicateurs qui pourraient être utilisés comme « références » pour le développement de nouveaux traitements topiques visant à réduire l'hétérogénéité du teint.

Exploration fonctionnelle du lentigo actinique par l’utilisation de divers paramètres biométrologiques : indicateurs d’une lésion hyperpigmentée bénigne

II. Introduction

A l'échelle macroscopique, les lentigos actiniques sont caractérisés par des macules brunâtres à l'aspect plat. Ces lésions cutanées bénignes apparaissent généralement sur le dos des mains, le visage, le cou et/ou les bras. L'apparition de ces lésions hyperpigmentées est décrite pour être induite sur les parties du corps exposées aux rayonnements ultra-violets, de manière chronique ou par intermittence, et également associée à l'âge (117, 118).

A l'échelle histologique, la structure du lentigo actinique montre une hyperpigmentation de la couche basale, un allongement de la jonction dermo-épidermique qui est associé à des ondulations complexes et intriquées, ainsi qu'à une augmentation du nombre de mélanocytes de la couche basale de l'épiderme (cf. références dans (119)).

Diverses approches tissulaire et cellulaire sont utilisées pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le désordre hyperpigmentaire du lentigo actinique (cf. références dans (119)). Cependant, très peu d'études se sont intéressées à l'exploration fonctionnelle de la peau dans le cas du lentigo actinique. Cette approche consiste en à la mesure objective de propriétés de la peau. Elle permet d'apporter une notation quantitative d'évaluations visuelles ou tactiles qui aide le clinicien dans son examen physique. Ces mesures sont dites biométrologiques et apprécient les fonctions de la peau sans intervention invasive.

La recherche biométrologique s'est particulièrement intéressée à la couleur de cette lésion hyperpigmentée et ses teneurs en hémoglobine et en mélanine. Les lentigos actiniques montrent une couleur plus foncée au niveau de la zone lésée, ainsi que des taux de mélanine et d'hémoglobine plus élevés. De plus, l'étude de l'évolution du lentigo actinique au cours du temps révèle une augmentation de sa taille et une intensification de sa couleur sombre (99, 120). Notre travail se focalise sur l'analyse du lentigo actinique par l'utilisation de divers outils biométrologiques, que sont le mexamètre® (teneurs en mélanine et hémoglobine), le chromamètre® (paramètre colorimétriques L*, a* et b*) en plus de ceux déjà décrits dans la littérature, à savoir le sébumètre® (quantité de sébum), le cornéomètre® (taux d'hydratation) et le glossymètre® (taux de réflexion de la lumière). Cette étude a été réalisée suite à la constitution d'une cohorte de 80 volontaires, dont certains présentent peu de lentigos actiniques (grade 1) et d'autres plusieurs lentigos actiniques (grade 2) sur le visage. Par des analyses statistiques comparant deux territoires du visage, les zones lésée et non lésée adjacentes d'un même volontaire au sein d'un même territoire et, la zone lésée de volontaires d'un même grade, nos

données proposent que certains des paramètres biométrologiques soient des indicateurs de localisation et d'évolution du lentigo actinique.

III. Matériel et Méthode

Mesures *in vivo*

Après accord du comité d'éthique de la protection à la personne (13/24, 17/10/13, CPP Est II) et par consentement écrit pour la participation à l'étude, le groupe expérimental a regroupé un nombre de 80 femmes, de peaux caucasiennes aux phototypes I à IV, âgées de 49 à 69 ans, pré-ménopausées ou ménopausées sans traitement hormonal ou traitement influençant sur les paramètres biométrologiques. Les volontaires ont été regroupées selon deux critères, le nombre et la taille de la lésion, constituant ainsi 2 groupes repartis sous un grade 1 et un grade 2. Les mesures *in vivo* ont été réalisées sur le visage (joue, n=61 et front, n=16), répétées en triplicate et moyennées. Chez un même volontaire, une comparaison entre la zone lésée contenant un lentigo actinique et une région non pigmentée adjacente à la zone lésée a été effectuée. Chaque mesure a été effectuée des conditions ambiantes, une chambre climatisée à 20-23°C et un taux d'humidité relatif à 40-60%. Chaque volontaire a respecté une période d'acclimatation d'un minimum de 20 minutes avant le début de chaque session de mesures.

Les modifications caractéristiques fonctionnelles de la peau liée à l'hyperpigmentation du lentigo actinique ont été réalisées en utilisant des instruments non invasifs décrits ci-dessous.

Mesures instrumentales non-invasives

Illustration des régions d'intérêt

Chaque volontaire a été photographié par le Visia® CR system (Canfield Imaging Systems, Fairfield, Connecticut) (121). A l'aide de ces illustrations, les régions d'intérêt ont été obtenues à partir des zones lésée et non lésée adjacente. Ce système permet de générer une série de photographies sous un éclairage standard, ultra-violet et sous une lumière polarisée croisée. Ces photographies ont permis d'observer les régions d'intérêt afin d'illustrer l'évolution du lentigo actinique.

Mesure de la quantité de sébum de la peau

Le taux de sébum des zones d'intérêt a été évalué par le Sébumètre® SM815 (Courage & Khazaka, Cologne, Allemagne) (122). La mesure est basée sur l'absorption du sébum en utilisant

la méthode photométrique. La « bande mat » de l'appareil est appliquée sur la peau et devient transparente au contact du sébum présent à la surface cutanée. Cette bande est ensuite insérée dans le dispositif et la transparence est analysée grâce à une cellule photo-électrique. La transmission de la lumière représente le taux de sébum en $\mu g.cm^{-2}$. Celui-ci indique l'état du film hydrolipidique et indirectement la capacité de la peau à maintenir son taux d'hydratation.

Mesure de l'hydratation de surface cutanée

L'hydratation cutanée a été mesurée par le Cornéomètre® CM825 (Courage & Khazaka, Cologne, Allemagne) (123). La mesure est basée sur la capacité d'un milieu diélectrique. Chaque région d'intérêt a été analysée par une sonde appliquée sur la surface de la peau et agit donc comme un indicateur de l'état de l'hydratation de la couche cornée. Le dispositif mesure la variation de la constante diélectrique due aux modifications de la capacitance, c'est-à-dire la capacité de l'eau intercellulaire à conduire les électrons et à changer la capacité du condensateur. Cet procédé instrumental indique le niveau d'hydratation de la peau par les propriétés électriques de celle-ci.

Les taux de mélanine et d'hémoglobine

Les quantités de mélanine et d'hémoglobine sont mesurées par le Mexamètre® MX 18 (Courage & Khazaka, Cologne, Allemagne) (124).; ces deux paramètres sont exprimés en unité arbitraire. La mesure est basée sur l'absorption et la réflexion. Chaque région d'intérêt a été analysée par une sonde appliquée sur la surface de la peau qui émet trois longueurs d'onde spécifiques à 568 nm (vert), 660 nm (rouge) et 880 nm (infrarouge). Un photo-détecteur mesure la lumière réfléchie par la peau et le dispositif quantifie la lumière absorbée par la peau. La mélanine et l'hémoglobine ont été mesurées grâce à des longueurs d'onde spécifiques entre 660 et 880 nm et entre 568 et 660 nm, respectivement.

La couleur de la peau

La couleur de la peau est obtenue à l'aide du Chromamètre® CR400 (Minolta, Osaka, Japon) qui mesure les paramètres colorimétriques L*, a* et b*(124, 125). La mesure est basée sur la lumière réfléchie perpendiculairement à la surface de la peau et les données recueillies permettent une analyse trichromatique L *, a *, b * à 450, 560 et 600 nm, respectivement. Chaque région d'intérêt a été analysée par une sonde appliquée sur la surface de la peau. Le paramètre L * correspond à la luminosité de la peau et est exprimée en pourcentage, entre la luminosité du noir (0) et le blanc (100). Le paramètre a* représente la couleur et la saturation sur un axe du rouge (+ 299 valeur positive) au vert (- 300 valeur négative). Le paramètre b *, quant à lui, définit la couleur et la saturation sur un axe du jaune (+ 299 valeur positive) au bleu (- 300 valeur négative). A l'aide des

paramètres colorimétriques L* et b*, le paramètre ITA qui est l'angle individuelle de typologie est calculé selon la littérature (126). L'ITA caractérise une zone pigmentée par sa valeur faible par rapport au contrôle.

L'absorption et la réflexion de la lumière

La surface cutanée est analysée par le Glossymètre® GL200 qui mesure les paramètres GV (Gloss Value) et gDSC (gloss with Diffuse Scattering Correction). La mesure est basée sur la réflexion avec un émetteur de lumière qui est réfléchie grâce aux miroirs de la tête de la sonde de l'appareil. Chaque région d'intérêt a été analysée par la sonde appliquée sur la surface de la peau, et les deux paramètres distincts mesurent la lumière réfléchie directe et diffuse (GV) qui dépend de la brillance de la peau et de la lumière réfléchie directe (gDSC) qui représente la luminosité de la peau.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, Etats-Unis). L'ensemble des données a été recueilli sur le lentigo actinique et la zone saine adjacente contrôle. Les comparaisons entre les zones lésée et non lésée ont été soumises au test t de Student apparié. Chez un même individu, une comparaison entre deux territoires cutanés (joue et front) au sein de la zone lésée est soumise à un test t de Student non apparié. Pour déterminer le lien entre l'hyperpigmentation du lentigo actinique et les autres paramètres, un calcul du coefficient de régression linéaire a été utilisé. L'évolution du lentigo actinique a été déterminée à l'aide d'une analyse de co-variances. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives lorsque la valeur du p est inférieure à 0,05.

IV. Résultats

Afin de déterminer si les paramètres biométrologiques (les quantités de sébum, de mélanine, d'hémoglobine, les paramètres colorimétriques L*, a*, b*, ITA, et les taux d'hydratation et de réflexion de la lumière) étaient associés à la présence de lentigos actiniques sur le visage, des comparaisons ont été effectuées entre 2 territoires cutanés du visage et entre les zones non lésées et lésées de cette hyperpigmentation bénigne.

La quantité de Sébum est un paramètre discriminant entre les territoires cutanés « joue » et « front » dans l'étude du lentigo actinique

Une première analyse statistique a consisté à déterminer les différences significatives parmi les 10 paramètres biométrologiques mesurés entre les territoires de peau (la joue et le front) au sein de la zone lésée et de la zone saine adjacente.

Les résultats indiquent que seul le paramètre biométrologique sébum est significativement différent ($p < 0,0001$) (**Tableau 1**). En effet, la quantité de sébum est plus importante sur le territoire cutané du front que celui de la joue, démontrant que ce paramètre biométrologique est différentiel selon le territoire cutané. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui montrent une plus grande quantité de sébum sur le front que sur la joue (127). Il est important de noter que le sébum prélevé sur la joue (< 70 µg.cm^{-2}) et le front (< 100 µg.cm^{-2}) révèle une sécheresse cutanée largement inférieure au seuil normalement mesuré (128).

Sébum (µg/cm^2)	**Joue**	**Front**	p
N échantillon	61	16	-
Zone lésée	22,02 ± 2,20	62,38 ± 11,44	< 0,0001
Zone non lésée	20,10 ± 2,55	64,94 ± 8,68	< 0,0001
Âge	58,00 ± 5,00	57,00 ± 5,00	

Tableau 1 : Moyenne de la quantité de sébum prélevée (valeur ± SD) sur les territoires de la joue et du front des les zones lésées et non lésées. Des analyses statistiques de t-test apparié et non apparié ont été réalisées et la significativité du test est indiquée par la valeur p.

Les mesures biométrologiques discriminantes entre la zone du lentigo actinique et sa zone saine adjacente au sein d'un territoire cutané.

La seconde analyse statistique a été axée sur l'identification de paramètres biométrologiques discriminants entre les zones lésée et non lésée au sein des territoires cutanés de la joue et du front**.**

Les résultats de cette analyse statistique montrent que les mesures biométrologiques qui diffèrent entre les zones lésée et non lésée dans le territoire de la joue, sont les taux de mélanine, d'hémoglobine, de réflexion de la lumière (GV et DSC), ainsi que les paramètres colorimétriques L*, a*, b* et y compris le paramètre ITA (**Tableau 2**). Concernant le territoire du front, les résultats révèlent une différence entre les deux zones avec les paramètres biométrologiques b* ainsi que les taux de mélanine et d'hydratation.

Tout d'abord, la quantité de mélanine est significativement différente entre les zones lésée et non lésée du lentigo actinique, que ce soit sur le front ($p = 0,0018$) ou sur la joue ($p < 0,0001$). Cette quantité plus importante dans la zone lésée confirme bien la présence d'une hyperpigmentation correspondant à la présence du lentigo actinique. De plus, le paramètre colorimétrique L* diminue significativement entre les zones sur la joue ($p < 0,0001$) alors qu'il n'est différent entre ces deux zones sur le front. La mesure L* est confortée par le calcul du paramètre ITA, qui diminue significativement entre les deux zones lésée sur les deux territoires avec une significativité plus importante sur la joue (joue $p < 0,0001$ et front $p = 0,0098$). Associée à une diminution des paramètres colorimétriques dans les zones lésées de chaque territoire, une baisse du taux de réflexion directe gDSC, mesuré par la réflexion de la lumière, est également observée ($p = 0,0006$), suggérant la présence de chromophores qui absorbent plus fortement la lumière dans la zones lésées. Ces diminutions sont caractéristiques de la couleur plus foncée de la zone lésée et corrobore la présence d'une lésion cutanée hyperpigmentée. A l'inverse, les paramètres colorimétriques b* sur les 2 territoires (joue $p < 0,0001$ et front $p = 0,0031$) et a* (joue $p = 0,0027$), qui renseignent respectivement sur l'intensité des couleurs jaune et rouge, sont plus importants au niveau de la zone lésée. Le paramètre a* suggère la présence sous-jacente d'une micro-vascularisation abondante, qui est confirmée par l'augmentation de la quantité d'hémoglobine dans la zone lésée au niveau de la joue ($p < 0,0001$). Sachant que la quantité de sébum reste inchangée entre les zones lésée et non lésée au sein des territoires cutanés, et qu'une perte d'hydratation est observée dans la zone lésée uniquement sur le territoire du front ($p=0,0013$), ces résultats suggèrent que la zone lésée du front est déshydratée.

Joue	ZL	ZNL	p
ITA	33,38± 8,22	39,13±6,88	< 0,0001
Mélanine (u.a)	173,80 ± 47,97	122,77 ± 33,44	< 0,0001
Hémoglobine (u.a)	275,91 ± 63,80	234,32 ± 66,00	< 0,0001
L*	61,59 ± 2,96	63,45 ± 2,69	< 0,0001
a*	11,80 ± 2,31	11,00 ± 2,38	0,0027
b*	17,51 ± 2,00	16,41 ± 1,80	< 0,0001
GV	6,86 ± 1,34	7,78 ± 1,22	< 0,0001
DSC	4,89 ± 1,33	5,61 ± 1,23	0,0008
Cornéométrie (u.a)	52,00 ± 12,81	54,92 ± 14,30	ns
Sébum (µg/cm^2)	21,87 ± 17,32	19,64 ± 24,97	ns
Âge		58,00 ± 5,00	

Front	ZL	ZNL	P
ITA	31,72± 7,80	36,38±7,10	0,0098
Mélanine (u.a)	173,80 ± 47,97	141,58 ± 38,98	0,0018
b*	17,52 ± 1,71	15,74 ± 2,08	0,0031
Cornéométrie (u.a)	50,55 ± 14,08	63,44 ± 9,25	0,0013
Hémoglobine (u.a)	275,91 ± 63,80	254,64 ± 50,12	ns
L*	60,86 ± 2,67	61,55 ± 2,05	ns
a*	11,92 ± 2,08	11,33 ± 1,84	ns
GV	6,81 ± 1,61	8,12 ± 1,93	ns
DSC	4,91 ± 1,42	6,04 ± 1,96	ns
Sébum (µg/cm^2)	62,38 ± 45,75	64,94 ± 34,73	ns
Âge		57,00 ± 5,00	

Tableau 2 : Moyenne des paramètres biométrologiques mesurés (valeur ± SD) sur la joue et le front entre les zones lésées (ZL) et non lésées (ZNL). Un t-test apparié a été réalisé et la significativité du test est indiquée par la valeur p.

Les mesures biométrologiques discriminantes entre le lentigo actinique et de sa zone saine adjacente au cours du développement de cette lésion hyperpigmentée.

Notre stratégie a ensuite consisté à répartir les volontaires en 2 groupes selon de 2 critères que sont le nombre et la taille des lésions. Ces deux critères illustrés et quantifiés ont été soumis à une analyse statistique différentielle (test Anova) qui a permis de classer les volontaires en deux grades, à savoir le grade 1 ou le grade 2. Les volontaires du grade 1 sont définis par un petit nombre et une taille faible de leur lésions alors que les volontaires du grade 2 sont caractérisés par des lésions multiples et par conséquent des tailles de lésions plus importantes (**Tableau 3 et Figure 1**).

	G1	G2	**p**
Nombre de volontaires	25	53	-
Nombre total de petites et moyennes lésions	4,80 ± 2,40	35,38 ± 13,63	0,000
Nombre total de grosses lésions*	0	2,00± 2,6	0,000

Tableau 3 : Moyenne du nombre de petites, moyennes et grosses lésions (valeur ± SD) au sein des volontaires classés en grade 1 (G1) et grade 2 (G2). Un test Anova à un facteur a été réalisé pour cette analyse et la significativité du test est indiquée par la valeur p.

Figure 1 : Illustrations des grades 1 et 2 par des photographies prises en lumière standard qui montrent principalement la taille du lentigo actinique.

A partir de cette classification en grade des volontaires, nous avons déterminé si les paramètres biométrologiques mesurés étaient liés à la progression du lentigo actinique. Cette hypothèse a été testée par une analyse statistique différentielle (t-test) segmentée par « grade » entre les zones lésées et non lésées. Nota bene : cette analyse a été effectuée en ciblant uniquement le territoire de la joue.

Les chiffres indiqués dans le tableau 4 révèlent qu'au sein du grade 1, les mesures biométrologiques qui diffèrent entre les zones lésée et non lésée correspondent aux taux de mélanine, d'hémoglobine, de réflexion de la lumière et les paramètres colorimétriques a* et ITA. Dans le cas du grade 2, les paramètres biométrologiques qui différent entre les zones lésées et non lésées sont les mêmes que ceux décrits dans le grade 1, à l'exception du paramètre a*, et supplémentés du taux d'hydratation et des paramètres colorimétriques L*, b*.

L'augmentation de la quantité de mélanine entre les deux grades dans la zone lésée ($p<0,0001$) confirme bien une progression du processus d'hyperpigmentation du lentigo actinique. Cette augmentation est renforcée par une diminution du paramètre ITA et du taux de réflexion de la lumière pour les deux grades. D'autre part, l'évolution du processus d'hyperpigmentation est liée à l'intensité croissante de la couleur rouge (augmentation du paramètre a*) pour le grade 1 et de la couleur jaune (augmentation du paramètre b*) pour le grade 2. L'intensité de la couleur rouge s'expliquerait par un taux d'hémoglobine plus important dans la zone hyperpigmentée pour l'ensemble des grades. En accord avec les résultats précédents, la quantité de sébum reste inchangée au sein des grades même si une perte d'hydratation est observée pour le grade 2 ($p=0,025$). Ces résultats suggèrent un lien entre la progression du lentigo actinique et le processus de déshydratation cutanée dans la zone lésée.

Joue G1	ZL	ZNL	p
Mélanine (u.a)	160,58 ± 37,21	127,63 ± 36,43	< 0,0001
ITA	34,49±7,16	37,62 ± 7,38	0,007
L*	61,90 ± 2,72	62,74 ± 2,44	ns p=0,008
b*	17,21 ± 1,87	16,57 ± 2,32	ns p=0,052
GV	7,08 ± 1,20	7,97 ± 1,08	0,013
DSC	5,09 ± 1,16	5,86 ± 0,98	0,02
Cornéométrie (u.a)	54,41 ± 13,67	49,97 ± 23,70	ns
Sébum (µg/cm^2)	24,15 ± 19,99	20,95 ± 23,70	ns
Hémoglobine	282,50 ± 71,47	239,13 ± 67,53	0,002
a*	12,23 ± 2,38	11,15± 2,27	0,006
Âge		57,5 ± 4	

Joue G2	ZL	ZNL	p
Mélanine (u.a)	180,24 ± 51,62	120,39 ± 32,39	< 0,0001
ITA	32,83± 8,73	39,87 ± 6,59	< 0,0001
L*	61,44 ± 3,09	63,79 ± 2,77	< 0,0001
b*	17,65 ± 2,06	16,33 ± 1,50	< 0,0001
Hémoglobine (u.a)	272,70 ± 60,39	231,97 ± 65,97	< 0,0001
Cornéométrie (u.a)	50,83 ± 12,38	57,33 ± 13,00	0,0025
GV	6,75 ± 1,41	7,69 ± 1,28	0,0007
DSC	4,80 ± 1,41	5,49 ± 1,32	0,01
a*	11,59 ± 2,28	10,93 ± 2,45	ns p=0,06
Sébum (µg/cm^2)	20,76 ± 16,01	19,00 ± 18,82	ns
Âge		58,9 ± 5	

Tableau 4 : Moyenne de l'ensemble des paramètres biométrologiques (valeur ± SD) segmentés par grade et étudiés sur le territoire cutané de la joue entre les zones non lésées (ZNL) et lésées (ZL). Un t-test apparié a été réalisé et la significativité du test est indiquée par la valeur p.

Lien entre l'hyperpigmentation du lentigo actinique et les paramètres biométrologiques

Pour identifier les paramètres biométrologiques qui seraient liés de l'hyperpigmentation du lentigo actinique, une analyse de corrélation entre la mélanine et l'ensemble des paramètres biométrologiques au sein du territoire cutané de la joue a été réalisée en ciblant la zone lésée **(Figure 2)**.

Les résultats du tableau de la Figure 2 et leur représentation graphique montrent une corrélation entre la quantité de mélanine et les mesures biométrologiques correspondant aux paramètres ITA (r = 0,60), L* (r = 0,49)et b* (r = 0,37), ainsi qu'au taux d'hémoglobine (r = 0,17), à la cornéométrie (r = 0,49) et à la réflexion de la lumière (gDSC ; r = 0,13).

Ces données révèlent que plus l'hyperpigmentation de la zone lésée est importante, plus le paramètre ITA diminue, confirmant ainsi que ce dernier paramètre est un bon indicateur de l'évolution du lentigo actinique. De plus, l'augmentation graduelle de mélanine dans la zone lésée est liée à une diminution de la réflexion de la lumière. De manière intéressante, le paramètre b* indique une augmentation d'intensité de la couleur jaune dans l'évolution de l'hyperpigmentation de la zone lésée. De plus, il est à noter qu'il existe une tendance à l'augmentation de l'intensité de la couleur rouge (le paramètre a*) qui est confirmée par l'augmentation du paramètre hémoglobine lorsque l'intensité de la mélanine est plus élevée. Par ailleurs, un faible lien existe entre une forte intensité mélanique et une hausse de l'hydratation au sein de la zone lésée.

Joue	**r**	**p**
ITA	0,60	< 0,0001
L*	0,49	< 0,0001
b*	0,37	< 0,0001
Hémoglobine (u.a)	0,17	0,0001
DSC	0,13	0,004
Cornéométrie (u.a)	0,09	0,02
a*	0,06	ns
GV	0,006	ns
Sébum (µg/cm^2)	-	ns

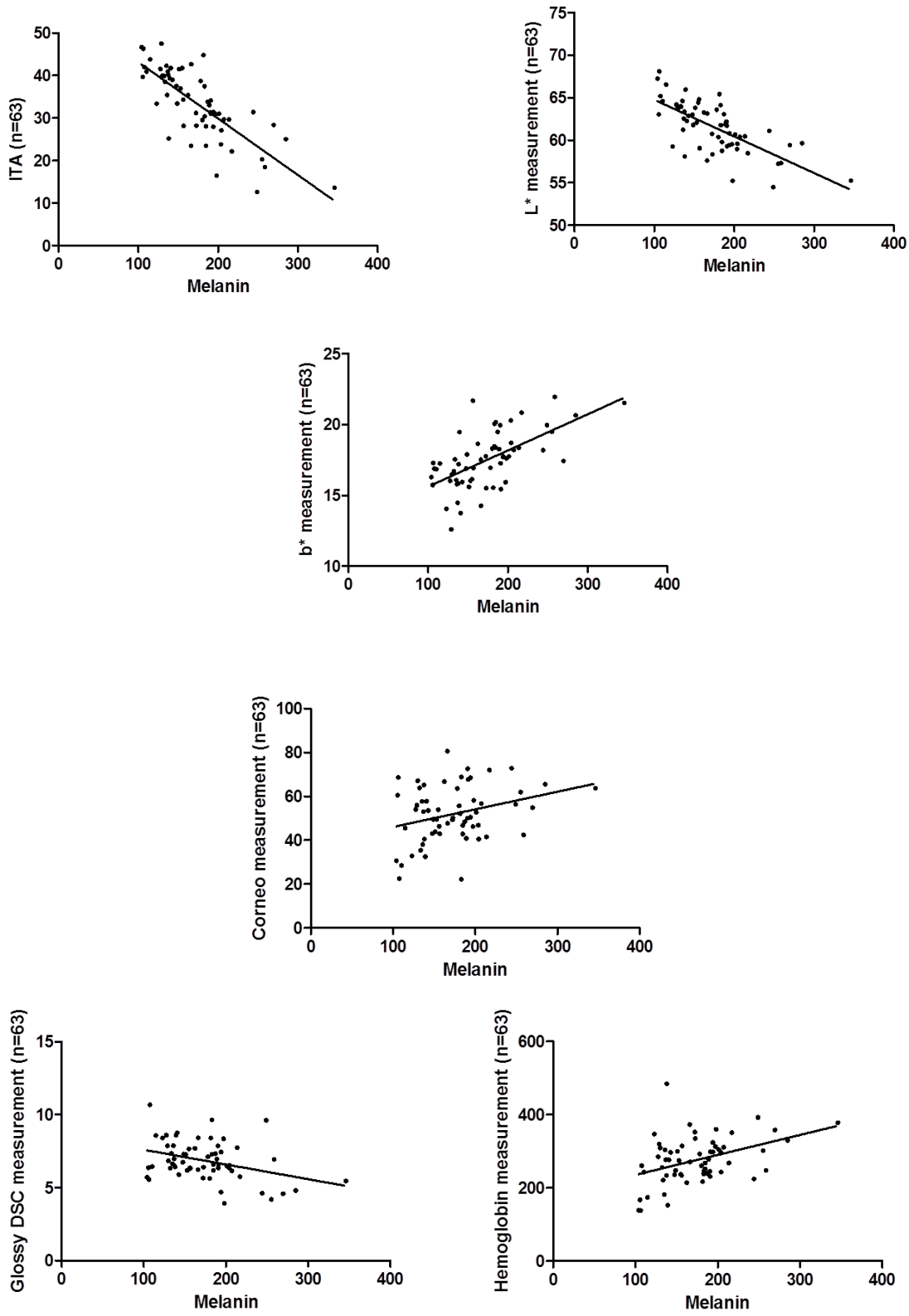


Figure 2 : Lien entre le paramètre mélanine et les paramètres biométrologiques étudiés sur la joue des deux zones lésée et non lésée. Un test de corrélation linéaire est réalisé pour cette analyse et représentée sous forme de dotplots.

Les indicateurs de progression du lentigo actinique

L'analyse statistique suivante de corrélation et complétée par une analyse de co-variances a permis d'identifier les indicateurs de l'évolution du lentigo actinique grâce à une segmentation par grade **(Tableau 5)**.

Les résultats de cette nouvelle analyse statistique montre que la quantité de mélanine est significativement corrélés aux paramètres colorimétriques L*, b* et ITA dans le cas du grade 1 alors qu'elle l'est avec les paramètres colorimétriques ITA, L*, b*, a*, les taux d'hémoglobine et d'hydratation (Cornéométrie) et le GV dans le grade 2. Ces résultats suggèrent que les différents paramètres cités ci-dessus sont des indicateurs du grade dans lequel ils sont corrélés à la quantité de mélanine.

L'indicateur le plus fort de l'évolution de l'hyperpigmentation est l'ITA. En effet, ce paramètre montre une corrélation au grade 2 ($r = 0,62$) qui est plus élevée qu'au grade 1 ($r = 0,53$), suggérant une couleur plus foncée de la zone lésée dans le grade 2. Cette l'intensification de la couleur est liée à une augmentation de la réflexion de la lumière ($r = 0,11$). De nouveau observé seul, le paramètre b* est plus fortement corrélé à l'accentuation des pigments mélaniques de la zone lésée du grade 2 ($r = 0,42$) en comparaison au grade 1 ($r = 0,23$), suggérant une accentuation de la couleur jaune au cours de l'évolution du lentigo actinique. Le paramètre colorimétrique a* montre une tendance à l'augmentation de l'intensité de la couleur rouge uniquement dans le grade 2 ($p = 0,053$) avec une corrélation très faible à l'hyperpigmentation ($r = 0,09$). La tendance à la hausse du paramètre de mesure de l'intensité rouge dans la zone lésée au sein du grade 2 seulement serait en accord avec sa corrélation au paramètre hémoglobine pour ce même grade ($r = 0,25$). Enfin, la corrélation entre l'hyperpigmentation du lentigo actinique et l'hydratation ($r = 0,17$) est uniquement présente au sein du grade 2.

Enfin, suite à une classification des paramètres mélanine et grade, une analyse de co-variances montre une association entre les indicateurs cornéométrie, sébum, hémoglobine et colorimétriques a* et b*. Cette association renforcerait sur l'orientation de l'évolution du grade des lentigos actiniques ($p=0,031$).

Joue	G1	r	p
Mélanine (u.a)	160,58 ± 37,21	-	-
ITA	34,49±7,16	- 0,53	0,0002
L*	61,90 ± 2,72	- 0,40	0,0025
b*	17,21 ± 1,87	0,23	0,031
GV	7,08 ± 1,20	- 0,17	ns
DSC	5,09 ± 1,16		ns
Cornéométrie (u.a)	54,41 ± 13,67		ns
Sébum (µg/cm^2)	24,15 ± 19,99		ns
Hémoglobine (u.a)	282,50 ± 71,47		ns
a*	12,23 ± 2,38		ns

Joue	G2	r	p
Mélanine (u.a)	180,24 ± 51,62	-	-
ITA	32,83± 8,73	- 0,62	< 0,0001
L*	61,44 ± 3,09	- 0,52	< 0,0001
b*	17,65 ± 2,06	0,42	< 0,0001
Hémoglobine (u.a)	272,70 ± 60,39	0,25	0,0007
Cornéométrie (u.a)	50,83 ± 12,38	0,17	0,008
GV	6,75 ± 1,41	- 0,11	0,04
a*	11,59 ± 2,28	0,09	ns
DSC	4,80 ± 1,41	-	ns
Sébum (µg/cm^2)	20,76 ± 16,01	-	ns

Tableau 5 : Lien entre le paramètre mélanine et l'ensemble des paramètres biométrologiques, segmentés par grade, est étudié dans la zone lésée de la joue. Un test de corrélation linéaire est réalisé pour cette analyse.

V. Discussion

A notre connaissance, cette étude statistique effectuée avec différents paramètres biométrologiques entre les zones non lésées et lésées du lentigo actinique est la première qui propose des indicateurs de l'évolution de cette lésion hyperpigmentée.

Dans notre étude, parmi l'ensemble des paramètres biométrologiques étudiés, seul le paramètre sébum diffère entre la joue et le front avec une quantité mesurée plus élevée au niveau du front. Ce paramètre sébum peut être considéré comme un indicateur différentiel entre les territoires de la joue et du front.

Le processus d'hyperpigmentation du lentigo actinique a été quantifié grâce à deux paramètres biométrologiques, que sont la mélanine et l'ITA. Comme attendu, la quantité de mélanine mesurée est plus importante dans la zone lésée alors que le paramètre ITA diminue dans cette même zone. Sachant que l'ITA est un indicateur de l'hyperpigmentation des territoires de la joue et du front et que le L* est un indicateur de l'hyperpigmentation du territoire de la joue uniquement, le paramètre ITA (qui prend en considération les paramètres colorimétriques L* et b*) semble être un indicateur pertinent de la présence du lentigo actinique.

Une étude détaillée des différences entre les deux zones lésées et non lésées a aussi été informative. En effet, l'augmentation des paramètres colorimétriques b* et a* dans la zone lésée du lentigo actinique renseigne respectivement sur l'intensité des couleurs rouge et jaune au cours du processus d'évolution d'hyperpigmentation de cette lésion. Ces résultats suggèrent un déséquilibre au niveau de la mélanogénèse avec une synthèse plus importante des pigments jaunes et rouges de la phéomélanine dans la zone lésée (19). Ils peuvent également suggérer avec le paramètre a*, la présence sous-jacente d'une micro-vascularisation abondante dans la zone hyperpigmentée qui est liée à l'augmentation du paramètre « hémoglobine » dans la zone lésée. De plus, l'hétérogénéité du teint causée par l'apparition de lésions hyperpigmentées est liée à une diminution de la réflexion de la lumière suggérant une absorption plus forte des chromophores de la peau.

Afin d'étudier quels paramètres biométrologiques reflèteraient l'évolution de l'hyperpigmentation du lentigo actinique, une segmentation par grade a préalablement été réalisée lors du recrutement des volontaires selon le nombre de lésions et leur taille. Notre classification en deux grades (1 et 2), qui a été validée statistiquement, est en accord avec les résultats d'une étude de microscopie confocale par réflectance qui démontre qu'un de nos 2 critères, à savoir la taille du lentigo actinique, augmente chez les individus suivis sur une période de 5 ans (99). L'augmentation de la

quantité de mélanine, ainsi que la diminution du paramètre ITA, au sein des deux grades entre la zone lésée et non lésée, corroborent une évolution du processus d'hyperpigmentation. Il est important de noter que nos résultats montrent également une intensité plus importante de la couleur rouge au stade précoce G1 alors qu'il existe une intensité plus prononcée de la couleur jaune au stade tardif G2. Ces données sont en faveur d'un défaut en phéomélanine puisque il existe une augmentation du paramètre hémoglobine pour l'ensemble des grades qui lui renforce l'hypothèse d'une plus grande micro-vascularisation dans la zone hyperpigmentée. Une analyse de corrélation, uniquement focalisée sur la zone lésée, conforte cette hypothèse en montrant une plus grande intensité de la couleur jaune (augmentation du paramètre b*) au cours des grades. L'hydratation apparaît comme augmentée lorsque l'intensité de la mélanine l'est, ce qui est contradictoire avec l'observation d'une déshydratation au sein du grade 2 du lentigo actinique. En revanche, comme la zone saine adjacente montre le même profil, ces résultats suggèrent que les femmes apportent une importance particulière à l'hydratation de leur peau lorsqu'elles sont dans le groupe du grade 2. De manière intéressante, une étude sur une cohorte de 300 femmes volontaires montre que l'hydratation de la peau est augmentée avec l'âge (83).

La focalisation sur la zone lésée couplée à la segmentation par grade a montré par une analyse de corrélation, une réflexion de la lumière diminuée, une quantité d'hémoglobine en hausse et un taux d'hydratation augmenté spécifiques au grade 2. Ces données suggèrent que ces paramètres sont des « indicateurs de grade ». Cette notion est également liée à la corrélation plus forte de la couleur jaune et une tendance à la hausse de l'intensité de couleur rouge qui supportée par une augmentation de l'hémoglobine dans le grade 2.

L'orientation vers l'évolution du lentigo actinique a été renforcée par l'étude des indicateurs cornéométrie, sébum, hémoglobine et colorimétriques a* et b*. En effet, les résultats de l'analyse de la co-variance nous oriente vers une synthèse en faveur de pigments jaunes (augmentation du paramètre b*) et une microcirculation sous-jacente plus importante (augmentation du paramètre Hg et a*), suggérant qu'un défaut de la mélanogénèse et une amplification de la microcirculation participent à l'évolution du lentigo actinique. Il serait intéressant d'approfondir cette étude les indicateurs sébum et cornéométrie. En effet, l'irrégularité de la surface cutanée est connue pour impacter la réflexion de la lumière et amplifier l'hétérogénéité du teint tout en influençant la capacité de la peau à maintenir une hydratation cutanée. Une augmentation du nombre de volontaires de notre cohorte contribuerait à définir ces différents paramètres comme des outils diagnostiques de l'évolution du processus d'hyperpigmentation du lentigo actinique. Cet enrichissement de la cohorte de volontaires dans les 2 grades permettrait de déterminer une valeur seuil en termes de quantité de mélanine et d'ITA qui serait utilisable par les cliniciens. De plus,

cette valeur servirait de référence dans les traitements cosmétologiques de ces lésions hyperpigmentées bénignes.

En conclusion, l'approche biométrologique est une méthode non invasive pour l'évaluation d'une hyperpigmentation bénigne chez un individu. L'étude des indicateurs biométrologiques, comme la quantité de mélanine, le taux d'hémoglobine combiné au paramètre colorimétrique a*, ainsi que les autres paramètres colorimétriques ITA et b*, a permis une meilleure compréhension du développement du lentigo actinique au niveau clinique. L'ensemble de ces données ont permis de mettre en évidence certains paramètres biométrologiques comme indicateurs du territoire cutané, de la zone lésée *vs* non lésée et de l'évolution (grade 2 vs 1) du lentigo actinique.

Mes travaux en recherche translationnelle

I. Synthèse des résultats de mes travaux en recherche translationnelle

L'exposition chronique au soleil entraine une hétérogénéité cutanée par l'apparition de zones lésionnelles. Parmi ces altérations, le lentigo actinique, qui est une lésion hyperpigmentée bénigne, est considéré comme un marqueur du photo-vieillissement. Si les évidences s'accumulent dans la littérature sur la description des processus cellulaires et moléculaires impliqués dans le maintien et le développement du lentigo actinique, peu d'études s'intéressent à la contribution fonctionnelle des fibroblastes dermiques (cf. références dans (119))

Dans l'objectif de mieux comprendre le rôle des fibroblastes situés dans la couche dermique du lentigo actinique, nous avons établi un modèle *in vitro* de fibroblastes primaires isolés à partir de biopsies de la zone lésée (FL) et non lésée adjacente (FS) ; ces biopsies ayant été recueillies à partir d'une cohorte de 10 volontaires présentant un lentigo actinique. Par l'utilisation d'approches en immunofluorescence et de méthodes d'études de l'activité métabolique, de la prolifération et, des capacités de migration et de sécrétion cellulaires, nous avons déterminé les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles du modèle fibroblastique *in vitro*. Les résultats montrent que les FS et FL ont des formes distinctes qui sont liées à une organisation différentielle de leur cytosquelette de F-actine. De plus, les FL montrent des activités métabolique, prolifération et migratoire diminuées par rapport à leur homologues sains. Enfin, le milieu conditionné des FL contient une quantité plus élevée de certains facteurs solubles (KGF, HGF, SCF, IL-13 et TGFβ1) comparativement à celui des FS.

Pour la première fois, l'extraction et la mise en culture de fibroblastes primaires de lentigo actinique a permis d'identifier *in vitro* leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles. Les similitudes entre certaines de ces caractéristiques et celles des fibroblastes de lentigo actinique décrites *ex-vivo*, nous indiquent que notre modèle cellulaire est proche de celui de ces cellules dans un contexte *in vivo*. De plus, notre modèle fibroblastique a permis d'identifier une signature sécrétoire des fibroblastes de lentigo actinique. Cette signature pourrait être utilisée comme « biomarqueur » dans le ciblage de principes actifs ayant pour but de réduire l'hétérogénéité du teint (cf manuscrit ci-après).

Caractérisations morphologiques et fonctionnelles des fibroblastes isolés du lentigo actinique

Morphological and functional characterizations of fibroblasts extracted from Solar Lentigo

Ranesha Goorochurn [1, 2, 3, 5, *], Céline Viennet [1, *], Marion Tissot [1], Fanny Locatelli [4], Corinne Granger [5], Nadine Varin-Blank [2, 3], Philippe Humbert [1, 4, **] and Christine Le Roy [2, 3, **]

[1] LIBC, Engineering and Cutaneous Biology Laboratory, UMR 1098 INSERM, University of Franche-Comte, SFR FED 4234, Besançon, France

[2] UMR U978 INSERM, Bobigny Cedex, France.

[3] ASIH, Signaling Adaptors in Hematology, University SPC, Paris 13, UFR-SMBH, Labex INFLAMEX, Bobigny Cedex, France.

[4] Department of Dermatology, Research and Studies Center on the Integument (CERT), Clinical Investigation Center (CIC 1431), Besançon University Hospital, Besançon, France

[5] Dermance Laboratoire, dermo-cosmetic and mature skin expertise Paris, France

* RG and CV contributed equally to the work

** PH and CLR are co-corresponding authors

Correspondence to Dr. Christine Le Roy, UMR978 INSERM-Université Paris 13, Adaptateurs de Signalisation en Hématologie, UFR-SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny Cedex, France; Phone: 33 1 48 38 73 90; Fax 33 1 48 38 73 69; E-mail: christine.leroy@inserm.fr or Pr. Philippe Humbert, Département de Dermatologie, CHRU, 3 bd Alexandre Fleming 25000, Besançon, France; Phone: 33 3 81 21 83 01; Fax: 33 3 81 21 82 79; E-mail: philippe.humbert@univ-fcomte.fr

Running head: **Differential features of fibroblasts isolated from Solar Lentigo**

Funding sources: ANRT/CIFRE

Disclosure and conflicts of interests: **There are no conflicts of interest to declare by any of the authors**

Keywords: Solar Lentigo, fibroblasts, cytokines, growth factors, biomarkers

Text word count: 2989/3000; Abstract 243/250; 4 figures and 1 table; 1 supplementary figure and 0 supplementary table; 47 references

Bulleted statements:

what's already known about this topic? what does this study add?

Dermal fibroblasts, which contribute to skin homeostasis, are involved in pigmentary disorders but the roles of these cells in the solar lentigo (SL) model are not completely defined.

Extracted fibroblasts from SL and their adjacent skin biopsies revealed *in vitro* morphological and functional distinctive characteristics. Our cellular model may help in understanding the pathogenesis of this lesion and facilitate the screening of anti-ageing actives.

Structured abstract:

Background: Chronic sun exposure induces skin heterogeneity with the presence of non-lesional and lesional areas. Among these skin alterations, Solar Lentigo maculae (SL) are benign and hyper-pigmented lesions. Despite the recent literature describing some molecular and cellular events involved in the SL development, little is known about the contribution of the dermal fibroblasts.

Objectives: In this context, we established an *in vitro* model of primary fibroblasts isolated from SL (FL) and peri-lesional (FS) biopsies, which were collected from a cohort of 10 volunteers, and then defined morphological and functional characteristics of both dermal cells.

Methods: Once validating peri-lesional and Solar Lentigo biopsies by Fontana-Masson staining, FS and FL were isolated from their respective skin tissue and cultured. Morphological features of both fibroblasts were determined by immunofluorescence experiments and functional characteristics were studied using proliferation, wound healing, ELISA and V-Plex assays.

Results: Immunofluorescence studies of F-actin revealed differential morphological features with FL displaying elongated shape and FS presented flattened morphology; no difference was observed in their myofibroblatic phenotype. Moreover, both fibroblasts demonstrated distinct functionally characteristics with FL exhibiting a lower proliferation rate and migration capacity, as well as a higher ability to secrete KGF, HGF, SCF, IL-13 and TGFβ1.

Conclusions: For the first time, establishment of primary FS and FL from the same volunteer identified cellular morphological and functional features in SL. Both types of primary fibroblasts might represent a good model to screen active principles for the development of whitening and anti-ageing agents.

Introduction:

In physiological conditions, human skin undertakes physical protection against outside environment factors, such as microorganisms and ultraviolet (UV) radiations, as well as intrinsic components, including inflammation and cancers [1]. This protective function is mediated through the epidermis that is mainly composed in its basal layer of melanocytes that synthetize the melanin pigment [2] and adjacent keratinocytes that collect and dispense the pigment to the upper layers of the skin [3-5]. The underlying dermis includes fibroblasts, which mostly produce extracellular matrix components, and immune cells [6, 7]. While the molecular and cellular events controlling pigmentation are not completely elucidated, increasing evidence point out the role of fibroblasts in impacting the functions of melanocytes and keratinocytes by secreting various factors in response to numerous signals from the epidermis [1, 8, 9]. The influence of dermal fibroblasts is highlighted through *in vitro* reconstructed pigmented skin models, in which normal fibroblasts play a crucial role in the regulation of the melanogenesis process through direct or indirect interactions [10-12], and might be at the origin of some functional melanocytes [13].

Dysregulation of skin homeostasis manifests as altered pigmentation processes, such as hyperpigmentation in the benign Solar Lentigo (SL). This lesion increases with age and results from chronic exposure to UV radiations and pollution [8, 14-20]. Defined histologically by a higher melanin deposition in the basal layer, elongated epidermal ridges and large melanosomal complexes [12, 21, 22], SL is distinguishable from other hyper-pigmented diseases [14] and classified in function of its evolution [23]. Differential gene-profiling analyses between SL and normal skin biopsies revealed that SL tissues are mainly composed of activated melanocytes as well as hypo-proliferating and -differentiated keratinocytes on the background of chronic inflammation [8, 24, 25]. Transcriptomic and proteomic studies begin deciphering the network of soluble factors at the

tissue scale and cellular levels involved in the initiation and formation of SL spots [8, 26]. Intense staining for HGF (Hepatocyte Growth Factor), KGF (Keratinocyte Growth Factor), SCF (Stem Cell Factor) and sFRP2 (secreted Frizzled Related Protein 2) in the upper dermis of SL biopsies strongly suggests that dermal fibroblasts contribute to synthetize these factors [27, 28]. These data were supported by their transcriptional up-regulation in an *in vitro* model of photo-ageing induced fibroblasts, evoking their potential functional paracrine involvement [27]. Analysis of a 3D reconstructed skin model containing epidermal and dermal cells showed higher levels of pigmentation in tissues with natural photo-aged fibroblasts *vs* young photo-protected fibroblasts, suggesting that both types of fibroblasts communicate with their neighbouring epidermal cells through differential secreted protein networks [10]. Surprisingly, among the quantified soluble factors known to modulate pigmentation, such as HGF and KGF, solely GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) secretion level was significantly decreased in photo-aged fibroblast conditioned media [10], suggesting functional differences between *in vitro* photo-aged fibroblasts and SL fibroblasts.

In this study, we established an *in vitro* model of primary fibroblasts extracted from SL and peri-lesional biopsies, which were collected from a cohort of volunteers. Cultured fibroblasts allowed us to define their differential morphological features and functional characteristics, notably their secretion capacity of cytokines and growth factors that might be biomarkers of the SL.

Materials and methods:

Materials

Phosphate buffer solution (PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), gentamycin, trypsin and all cell culture plastics were purchased from Dutscher (Brumath, France); paraformaldehyde (PFA), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sodium dodecyl sulfate (SDS), dimethylformamide (DMF), glycine, acetone, triton X-100, bovine serum albumin (BSA), mouse anti-human α-SM actin antibody, goat anti-mouse IgG-FITC antibody, rhodamine-conjugated phalloidin, Hoechst were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

Human skin biopsies

Skin specimens were obtained from 13 volunteers on the back of the hands (Caucasian females, 67–89 years of age) after written informed consent (Pr. P. Humbert, department of dermatology, University hospital of Besançon, France[11]). Two biopsies of 3-mm punches were collected from the same patient with one solar lentigo lesional skin and one non-pigmented peri-lesional skin.

Histological detection of melanin

Briefly, Solar Lentigo (SL) and Peri-lesional (PL) biopsies were fixed in PFA solution (3% in PBS), dehydrated and embedded in paraffin. Seven-µm thick sections were cut using a rotary microtome (Leitz 1512; Leica) and stained with Fontana-Masson following the manufacturer's

instructions (Diapath). After mounting, histological features of the skin sections were examined by optical microscopy (Axioskop 40, Zeiss).

Cell cultures

Primary culture of human dermal fibroblasts obtained from SL (FL) and PL (FS) of 10 patients were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS and 1% Gentamycin in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37°C. FL and FS cells were maintained until the monolayer cultures reached 80% confluency and were passaged twice using a trypsin (0.05%)/EDTA (0.02%) solution.

Cell proliferation

Proliferation of FL and FS was determined by measuring metabolic activity (colorimetric MTT assay) [29] and by counting viable cells (Trypan blue exclusion assay).

MTT assay

FL and FS were seeded into 96-well plates ($5x10^3$ cells/well) and incubated with DMEM supplemented for 24 h. After removing supernatant and washing by PBS 1X, 10 µl of MTT solution (0.5 mg/mL in DMEM) were added for 4 h at 37°C. The formazan-blue crystals were dissolved overnight at 37°C in 100 µL of extraction medium (10% SDS/0.04% DMF in H_2O). The optical density was read at 570 nm with a Multiskan FC™ spectrophotometer (Fisher Scientific).

Trypan blue exclusion assay

FL and FS were seeded at a density of $7x10^5$ cells/T75 flask and were incubated with DMEM supplemented for 4 days. Cells were trypsinized and count by Trypan blue stain.

Fluorescence staining

Primary FL and FS were seeded in Lab-Tek chamber slides at $1x10^4$ cells/chamber and maintained in culture at 37°C for 24 h. They were then fixed 10 min in PFA solution (3% in PBS) and permeabilized for 10 min with cold acetone at -20 °C. Nonspecific adhesion sites were blocked by a 10 min incubation in glycine solution (1% in PBS) followed by a 1 h incubation in BSA solution (3% BSA/10% serum/0.1% triton X-100 in PBS). Primary antibody directed against human α-SMA was then added (1: 100 in PBS/1%BSA/0.1% triton X-100) and incubated overnight at 4°C in a moist chamber. Cells were then incubated with the FITC conjugated secondary antibody (1: 40 in PBS) for 1 h and further 30 min with rhodamine-conjugated phalloidin for filamentous actin (F-actin) staining (2.5 µg/ml). Cellular nuclei were countermarked with Hoechst solution. Cells were then mounted in Dako fluorescent medium, observed under fluorescence microscopy (Axioskop 40, Zeiss) and further analyzed using Metamorph software (Molecular Devices).

Wound healing assay

Primary FL and FS were grown on 12-well Falcon® plates for 24 h to 48 h to reach 100% cell confluent monolayers. Wounds were done using a sterile 10 µl-pipette tip across each well. After gently washes, cells were incubated with supplemented DMEM w/o Red phenol, covered with mineral oil and placed in the incubator at 37°C with 5% CO_2 of the BD Pathway 855 Bioimaging

(Becton Dickinson). Image captures at 1h-regular intervals using the AttoVision Software (Becton Dickinson) allowed calculating the percentage of wound closure for each time point (ImageJ Software).

ELISA and V-plex assays

Secreted factors in paired FL/FS-conditioned media were quantified by ELISA kits (Quantikine® for KGF, HGF, SCF and TGF-β1; R&D Systems) or by MSD 30-PLEX™ Proinflammatory Panel1, Cytokine Panel1, Chemokine Panel1 kits and TGFβ1 kit, according to the manufacture's protocols.

Statistical analysis

Statistical significance was assessed using paired Student's t test (Prism5.0, Graph Pad Software). P values <0.05 were considered significant with the following degrees: *$p<0.05$; **$p<0.01$; ***$p<0.001$.

Results:

Melanin staining of human SL and peri-lesional skin biopsies

To check that human skin fibroblasts used in this study were isolated from peri-lesional and lesional skins, biopsies from 3 volunteers who presented solar lentigo were subjected to Fontana-Masson staining. Peri-lesional (PL (a)) and lesional (SL (b)) tissues displayed different histological features (Figure 1). SL showed a thin epidermis, disorganized basement membrane, a high melanin staining of the basal layer and elongated rete ridges collapsing into the dermis. Altogether, microscopic analysis validated the SL origin of our *in vitro* fibroblastic model.

Differential morphological features between isolated fibroblasts from peri-lesional and SL skin biopsies

Then, we undertook the morphological characterization of the fibroblasts isolated from non-lesional (FS) and solar lentigo (FL) skin biopsies. Global microscopic examination revealed that both types of primary fibroblasts exhibited a variety of shapes and sizes (Fig. 2a and 2b). Fluorescent phalloidin staining showed that FL exhibited a more heterogeneous network of F-actin with a much denser labelling of stress fibers (Fig. 2c and 2d). Quantification of the F-actin intensity staining in FS (n=119) and FL (n=102) revealed that FL staining level was significantly higher relative to FS (Fig. 2e). Moreover, analysis of the cellular body and nuclear appearances showed that FL displayed more elongated shapes (Fig. 2f) with an elliptical shaped nucleus (Fig. 2g) as compared with FS. In contrast, immunofluorescence analysis for the α-SMA, a hallmark of the myofibroblastic phenotype, did not show difference in its intensity between FS and FL (Supplementary Fig. 1a, b and c).

Altogether, these data demonstrate distinct morphological characteristics between both fibroblastic cell types without any difference in their myofibroblastic feature.

Differential functional characteristics between isolated fibroblasts from peri-lesional and SL skin biopsies

To functionally explore both types of fibroblasts, we first analysed their proliferation rate by seeding equal number of FS and FL and counting them at 96 h of culture. As shown in the Figure 3a, cell number was significantly lower in FL relative to FS. Accordingly, measurement of metabolically intact cells demonstrated that FL proliferation was significantly reduced as compared to FS (Fig. 3b). Next, we examined the migration capacity of both fibroblastic types by wound healing assay and after calculating the percentage of wound closure for each time point. Results presented in the Figure 3c demonstrated that migration kinetics of FL were significantly lower relative to FS. Finally, secretion capacity of both types of fibroblasts was determined by quantifying cytokines and growth factors present in their respective conditioned media by ELISA and V-plex assays. As shown in Figure 4a, HGF, KGF and SCF were detected in both FS and FL and significantly highly secreted in FL. We further investigated the secretion pattern of 31 additional soluble factors that were chosen based on their role in inflammation. Interestingly, the cytokine IL-13 and the growth factor TGFβ1 were significantly increased in the FL media as compared to the FS one (Figure 4b); the concentration of the 29 other soluble factors was neither differentially secreted (Eotaxin, Eotaxin-3, GM-CSF, IFN-γ, IL-10, IL-12p70, IL-16, IL-17A, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8/IL-8 (HA), IP-10, MCP-4, MDC, MIP-1α, MIP-1β, TARC, TNF-α, VEGF-A)

nor detectable (IL-12/IL-23p40, IL-15, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-5, IL8 cck, MCP-1, TNF-β) (Table 1).

Collectively, functional study of the fibroblasts isolated from SL demonstrated that their proliferation rate, metabolic activity and migration capacity were lower as compared to their intra-individual counterparts whereas their secretion profiles were higher for some soluble factors.

Discussion:

To our knowledge, this study is the first one describing the isolation of primary fibroblasts from peri-lesional and SL biopsies that were removed from the same volunteer. By staining human peri-lesional and SL skin samples for melanin, we validated the origin of the FS and FL and identified some of their morphological and functional features.

It is now accepted that fibroblasts represent a heterogeneous population of cells found in most the tissues [6, 7]. Accordingly, our microscopic observations revealed that FS and FL exhibit large heterogeneous shapes and sizes with FL characterized with more elongated shapes and elliptical shaped nuclei. Given that actin isoforms are markers of the fibroblast heterogeneity with their differential expression and organization of cytoskeletal proteins [30, 31], we looked at the F-actin isoform. Spread FS and FL showed bundles that were quite similar but not identical in terms of cables length, number and distribution. Indeed, FL showed noticeable actin stress fibers in their cytoplasm that were linked to higher quantity of F-actin, suggesting that both types of fibroblasts have different actin-based cytoskeletal frameworks. Looking at the α-SM actin isoform, similar quantities of this myofibroblast marker were found in FS and FL. This observation was in agreement with the absence of difference between peri-lesional and SL skin in terms of α-SMA-positive cells in the dermis [32]. Despite evidence describing that fibroblasts isolated from tissues continually "differentiate" into myofibroblast-like cells with different degrees of α-SMA expression once they are grown in culture [33, 34], its is tempting to speculate that our primary SL-fibroblast model behaves, in terms of myofibroblast differentiation, like the fibroblasts described in SL biopsies.

Functional studies demonstrated that both fibroblasts displayed differential proliferation rate with a lower level for FL. Apparent conflicting immunohistochemistry data, generated with the

proliferation marker Ki67, were brought back together by demonstrating that expression of this marker is modulated during SL development. Indeed, Ki67-positive cells are strongly reduced at the later stages relative to early stages [23]. Despite the association between Ki67-positive cells and supra-basal keratinocytes in tissue sections [23] and, given that our SL samples were probably of the later SL stages, our results strongly suggested that fibroblasts contribute to the cellular quiescent status observed in advanced SL.

Another biological function of the fibroblast consists on its migration capacity that is related to actin cytoskeleton, integrin adhesion molecules and extracellular matrix proteins [35]. According to the different cell morphology and cytoplasmic structural organization between FL and FS, cell mobility was also different between FS and FL. The decrease of FL motility relative to FS could be explained by impaired integrin or extracellular matrix protein expression.

The last function studied was the secretion profile of FS and FL, which contributes to cellular functional crosstalks. Indeed, melanocytes and their neighbouring keratinocytes regulate mutually their functions through networks of factors [10, 26, 36, 37]. Moreover, recent evidence points out functional implication of dermal fibroblast secretion in modulating not only constitutive pigmentation [10, 11, 38-40] but also the development of various hyper-pigmented disorders, *via* the secretion of growth factors such as SCF [41-43], HGF [41, 43] and KGF [44]. In this context, we first quantified these melanogenic factors in our primary fibroblastic models that were issued from peri-lesional and SL biopsies. Higher secretion levels of SCF, HGF and KGF detected in FL media supported published data showing higher immuno-detection levels of these 3 growth factors in the upper dermis of SL skin [27]. This strongly suggests that the secretion capacity of our *in vitro* primary fibroblast model was close to fibroblasts located in the upper dermis of SL.

In line with the chronic inflammatory context of the SL [8, 24, 25], our findings also demonstrated that TGFβ1 and IL-13 [45, 46] were differentially secreted between FS and FL with a higher level for FL. While the ubiquitous TGFβ1 has been reported to inhibit *in vivo* keratinocyte proliferation [45, 47] and *in vitro* melanocyte differentiation [2], the endogenous secretion of the cytokine IL-13 by dermal fibroblasts, melanocytes and keratinocytes has never been described. Nevertheless, further mechanism studies using neutralizing antibodies should clarify the role of these soluble factors in SL progression.

In conclusion, isolation of fibroblasts from adjacent- and SL-skin biopsies allowed establishing primary dermal cell models with some specific morphological and functional features that are similar to those described in SL biopsies. By identifying FS and FL secretion signatures, new investigations are required to clarify the autocrine/paracrine roles of the differential concentrations of soluble factors on melanocyte and keratinocyte functions. It is tempting to speculate that our primary fibroblast model might constitute a good cellular tool to test compounds for the development of whitening and anti-ageing agents in topical treatments.

Acknowledgments:

This study was supported by INSERM, University Paris 13, Labex Inflamex n°ANR11 IDEX00502. RG was the recipient of a CIFRE grant (n° 1722/11). We acknowledge Dr. Karine Bailly for processing the MDS kits at the core facilities from Cochin Institute. We also thank the biobank BB-0033-00024 "Tumorothèque Régionale de Franche-Comté" for biobanking.

Authorship Contributions:

RG and CV performed the experiments and analysed the data. MT and FL provided human skin biopsies. CG and NVB criticized the manuscript. PH and CLR designed experiments, interpreted the data and wrote the manuscript.

Figure and Table Legends:

Fig 1. **Differential histology features between peri-lesional and solar lentigo skin biopsies.** Following dehydration and embedding, peri-lesional (PL, panel a) and solar lentigo (SL, panel b) skin biopsies (n=3) were subjected to Fontana-Masson staining for melanin detection. SL staining displayed a thin epidermis layer, elongated rete ridges collapsing into the dermis and intense melanin deposition [23]. Bar scale equal 50 mm.

Fig 2. **Differential cellular features between adjacent- and solar lentigo-isolated fibroblasts.** Representative heterogeneous morphologies of fibroblasts isolated from peri-lesional (FS) (a) and solar lentigo (FL) (b) skin biopsies after examination by phase contrast microscopy (n=10 FS/FL couples; bars equal 40 μm). Representative immunofluorescence images of FS (c) and FL (d) fibroblasts (n=10) showing F-actin labelling (red) with Hoechst (blue, nuclei); bars equal 20 μm. (e) F-actin staining was quantified in both FS (n=119) and FL (n=102) and graphed. Based on elliptical form factor parameter, quantitative analyses of cellular body shape (f) and nuclei shape (g) of both FS and FL fibroblasts are shown; ***$p<0.0001$.

Fig 3. **Differential proliferation rates and migration capacities between FL and FS.** Equal number of FS and FL were seeded at time 0. Proliferation rate was determined after counting cells 96 hours later **(a;** **$p<0.002$; n=10**)** and metabolic activity was assessed using MTT assay after 24 hours **(b;** **$p<0.003$**;** n=10). FS and FL migration capacity was determined after a wound healing assay (c). Percentage of wound closure was calculated for each point time point

and average of percentages in 5 FS/FL samples were plotted. The difference of wound closure kinetics between FS and FL was significant (****$p<0.0001$).

Fig 4. **Differential secretion profiles for HGF, KGF, SCF, IL-13 and TGFβ1 between FL and FS.** FL- and FS-conditioned media (n=10 couples) were subjected to quantification of 3 growth factors using ELISA (a) and 31 other soluble factors using V-Plex (b and Table 1). After normalization to FS or FL number, concentration of these factors was determined and graphed (HGF ***$p<0.0005$, KGF *$p<0.05$, SCF *$p<0.05$, IL-13 *$p<0.0294$ and TGFβ1 **$p< 0.0076$).

Table 1. **Soluble factors that were not differentially secreted between FL and FS**. FL- and FS-conditioned media (n=10 couples) were subjected to quantification of 29 soluble factors using V-Plex (b and Table 1). Concentration of each factor was calculated by normalization to cell number. Means of concentration (columns "Mean"), their standard deviations (columns "ET") and *p* values (column "p") were calculated using paired Student't test. Grey lines corresponded to quantification of factors with concentration below detection (BD).

Supplementary Fig 1. **α-SMA staining intensity is similar between FS and FL.** (a & b) Representative immunofluorescence images of FS and FL fibroblasts (n=10) showing α-SMA labelling (green, a & b) with Hoechst (blue, nuclei); bars equal 20 μm. α-SMA staining was quantified in both FS (n=119) and FL (n=102) and graphed as relative intensity (c). ns: non significant.

REFERENCES:

1. Yamaguchi, Y. & Hearing, V.J. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* **35**, 193-9 (2009).
2. Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S. & Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* **84**, 1155-228 (2004).
3. Matsui, T. & Amagai, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol* **27**, 269-280 (2015).
4. Haniffa, M., Gunawan, M. & Jardine, L. Human skin dendritic cells in health and disease. *J Dermatol Sci* **77**, 85-92 (2015).
5. Woo, S.H., Lumpkin, E.A. & Patapoutian, A. Merkel cells and neurons keep in touch. *Trends Cell Biol* **25**, 74-81 (2015).
6. Driskell, R.R. & Watt, F.M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol* **25**, 92-9 (2015).
7. Sorrell, J.M. & Caplan, A.I. Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. *Int Rev Cell Mol Biol* **276**, 161-214 (2009).
8. Cardinali, G., Kovacs, D. & Picardo, M. [Mechanisms underlying post-inflammatory hyperpigmentation: lessons from solar lentigo]. *Ann Dermatol Venereol* **139 Suppl 3**, S96-101 (2012).
9. Kondo, T. & Hearing, V.J. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. *Expert Rev Dermatol* **6**, 97-108 (2011).
10. Duval, C. et al. Key regulatory role of dermal fibroblasts in pigmentation as demonstrated using a reconstructed skin model: impact of photo-aging. *PLoS One* **9**, e114182 (2014).
11. Hedley, S.J. et al. Fibroblasts play a regulatory role in the control of pigmentation in reconstructed human skin from skin types I and II. *Pigment Cell Res* **15**, 49-56 (2002).

12. Cario-Andre, M., Pain, C., Gauthier, Y., Casoli, V. & Taieb, A. In vivo and in vitro evidence of dermal fibroblasts influence on human epidermal pigmentation. *Pigment Cell Res* **19**, 434-42 (2006).

13. Yang, R. et al. Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors. *Nat Commun* **5**, 5807 (2014).

14. Praetorius, C., Sturm, R.A. & Steingrimsson, E. Sun-induced freckling: ephelides and solar lentigines. *Pigment Cell Melanoma Res* **27**, 339-50 (2014).

15. Cayce, K.A., McMichael, A.J. & Feldman, S.R. Hyperpigmentation: an overview of the common afflictions. *Dermatol Nurs* **16**, 401-6, 413-6; quiz 417 (2004).

16. Bastiaens, M., Hoefnagel, J., Westendorp, R., Vermeer, B.J. & Bouwes Bavinck, J.N. Solar lentigines are strongly related to sun exposure in contrast to ephelides. *Pigment Cell Res* **17**, 225-9 (2004).

17. Nouveau-Richard, S. et al. Skin ageing: a comparison between Chinese and European populations. A pilot study. *J Dermatol Sci* **40**, 187-93 (2005).

18. Monestier, S., Gaudy, C., Gouvernet, J., Richard, M.A. & Grob, J.J. Multiple senile lentigos of the face, a skin ageing pattern resulting from a life excess of intermittent sun exposure in dark-skinned caucasians: a case-control study. *Br J Dermatol* **154**, 438-44 (2006).

19. Ortonne, J.P. & Bissett, D.L. Latest insights into skin hyperpigmentation. *J Investig Dermatol Symp Proc* **13**, 10-4 (2008).

20. Nakamura, M. et al. Environment-induced lentigines: formation of solar lentigines beyond ultraviolet radiation. *Exp Dermatol* **24**, 407-11 (2015).

21. Andersen, W.K., Labadie, R.R. & Bhawan, J. Histopathology of solar lentigines of the face: a quantitative study. *J Am Acad Dermatol* **36**, 444-7 (1997).

22. Unver, N. et al. Alterations in the epidermal-dermal melanin axis and factor XIIIa melanophages in senile lentigo and ageing skin. *Br J Dermatol* **155**, 119-28 (2006).

23. Lin, C.B. et al. Immuno-histochemical evaluation of solar lentigines: The association of KGF/KGFR and other factors with lesion development. *J Dermatol Sci* **59**, 91-7 (2010).

24. Aoki, H., Moro, O., Tagami, H. & Kishimoto, J. Gene expression profiling analysis of solar lentigo in relation to immunohistochemical characteristics. *Br J Dermatol* **156**, 1214-23 (2007).

25. Goyarts, E., Muizzuddin, N., Maes, D. & Giacomoni, P.U. Morphological changes associated with aging: age spots and the microinflammatory model of skin aging. *Ann N Y Acad Sci* **1119**, 32-9 (2007).

26. Imokawa, G. Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* **17**, 96-110 (2004).

27. Kovacs, D. et al. Role of fibroblast-derived growth factors in regulating hyperpigmentation of solar lentigo. *Br J Dermatol* **163**, 1020-7 (2010).

28. Kim, M., Han, J.H., Kim, J.H., Park, T.J. & Kang, H.Y. Secreted Frizzled-Related Protein 2 (sFRP2) Functions as a Melanogenic Stimulator; The Role of sFRP2 in UV-Induced Hyperpigmentary Disorders. *J Invest Dermatol* (2015).

29. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63 (1983).

30. Sappino, A.P., Schurch, W. & Gabbiani, G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* **63**, 144-61 (1990).

31. Gardel, M.L., Schneider, I.C., Aratyn-Schaus, Y. & Waterman, C.M. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**, 315-33 (2010).

32. Cario-Andre, M. et al. Perilesional vs. lesional skin changes in senile lentigo. *J Cutan Pathol* **31**, 441-7 (2004).

33. Dugina, V., Alexandrova, A., Chaponnier, C., Vasiliev, J. & Gabbiani, G. Rat fibroblasts cultured from various organs exhibit differences in alpha-smooth muscle actin expression, cytoskeletal pattern, and adhesive structure organization. *Exp Cell Res* **238**, 481-90 (1998).

34. Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J.J., Gabbiani, G. & Chaponnier, C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* **12**, 2730-41 (2001).

35. Li, W., Fan, J., Chen, M. & Woodley, D.T. Mechanisms of human skin cell motility. *Histol Histopathol* **19**, 1311-24 (2004).

36. Duval, C., Regnier, M. & Schmidt, R. Distinct melanogenic response of human melanocytes in mono-culture, in co-culture with keratinocytes and in reconstructed epidermis, to UV exposure. *Pigment Cell Res* **14**, 348-55 (2001).

37. Hirobe, T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment Cell Melanoma Res* **24**, 462-78 (2011).

38. Yamaguchi, Y. et al. Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. *J Cell Biol* **165**, 275-85 (2004).

39. Yamaguchi, Y. et al. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. *FASEB J* **22**, 1009-20 (2008).

40. Choi, W., Kolbe, L. & Hearing, V.J. Characterization of the bioactive motif of neuregulin-1, a fibroblast-derived paracrine factor that regulates the constitutive color and the function of melanocytes in human skin. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**, 477-81 (2012).

41. Shishido, E., Kadono, S., Manaka, I., Kawashima, M. & Imokawa, G. The mechanism of epidermal hyperpigmentation in dermatofibroma is associated with stem cell factor and hepatocyte growth factor expression. *J Invest Dermatol* **117**, 627-33 (2001).

42. Kihira, C., Mizutani, H., Asahi, K., Hamanaka, H. & Shimizu, M. Increased cutaneous immunoreactive stem cell factor expression and serum stem cell factor level in systemic scleroderma. *J Dermatol Sci* **20**, 72-8 (1998).

43. Okazaki, M. et al. The mechanism of epidermal hyperpigmentation in cafe-au-lait macules of neurofibromatosis type 1 (von Recklinghausen's disease) may be associated with dermal

fibroblast-derived stem cell factor and hepatocyte growth factor. *Br J Dermatol* **148**, 689-97 (2003).

44. Cardinali, G. et al. A kindred with familial progressive hyperpigmentation-like disorder: implication of fibroblast-derived growth factors in pigmentation. *Eur J Dermatol* **19**, 469-73 (2009).

45. Shull, M.M. et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693-9 (1992).

46. O'Reilly, S. Role of interleukin-13 in fibrosis, particularly systemic sclerosis. *Biofactors* **39**, 593-6 (2013).

47. Siegel, P.M. & Massague, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 807-21 (2003).

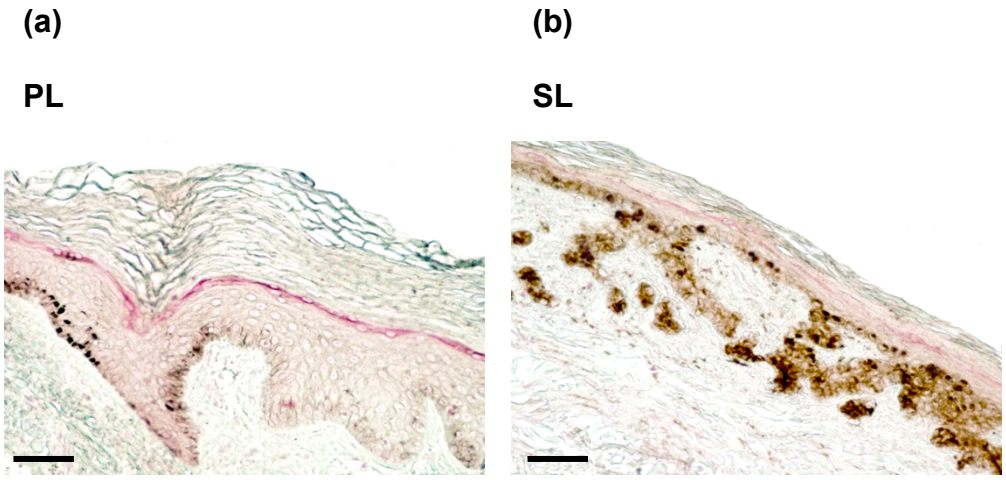


Figure 1

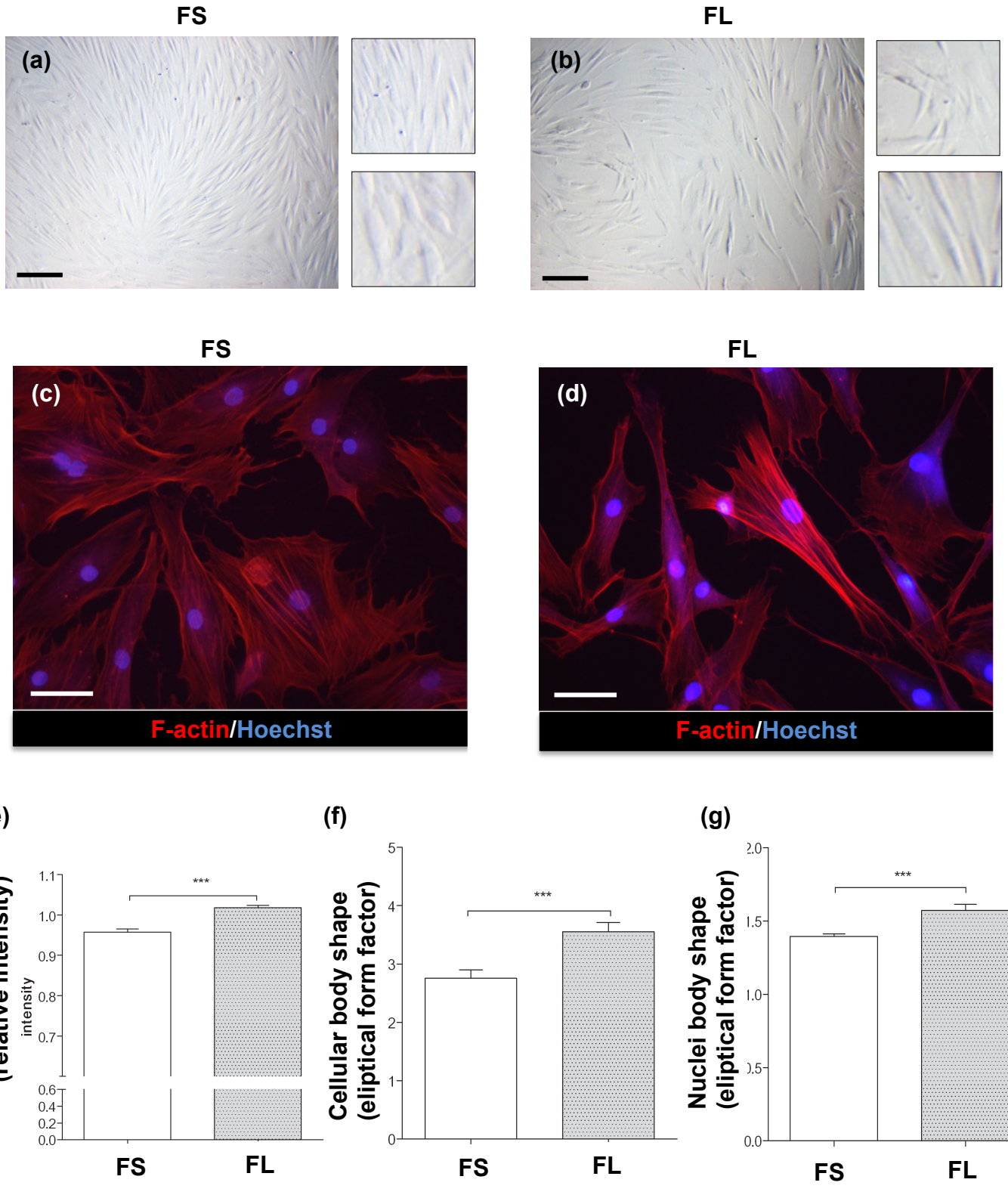

FS
FL
(a)
(b)
(c)
(d)
F-actin/Hoechst
F-actin/Hoechst
(e)
(f)
(g)
F-actin (relative intensity)
intensity
Cellular body shape (eliptical form factor)
Nuclei body shape (eliptical form factor)
***
***
***
FS
FL
FS
FL
FS
FL

Figure 2

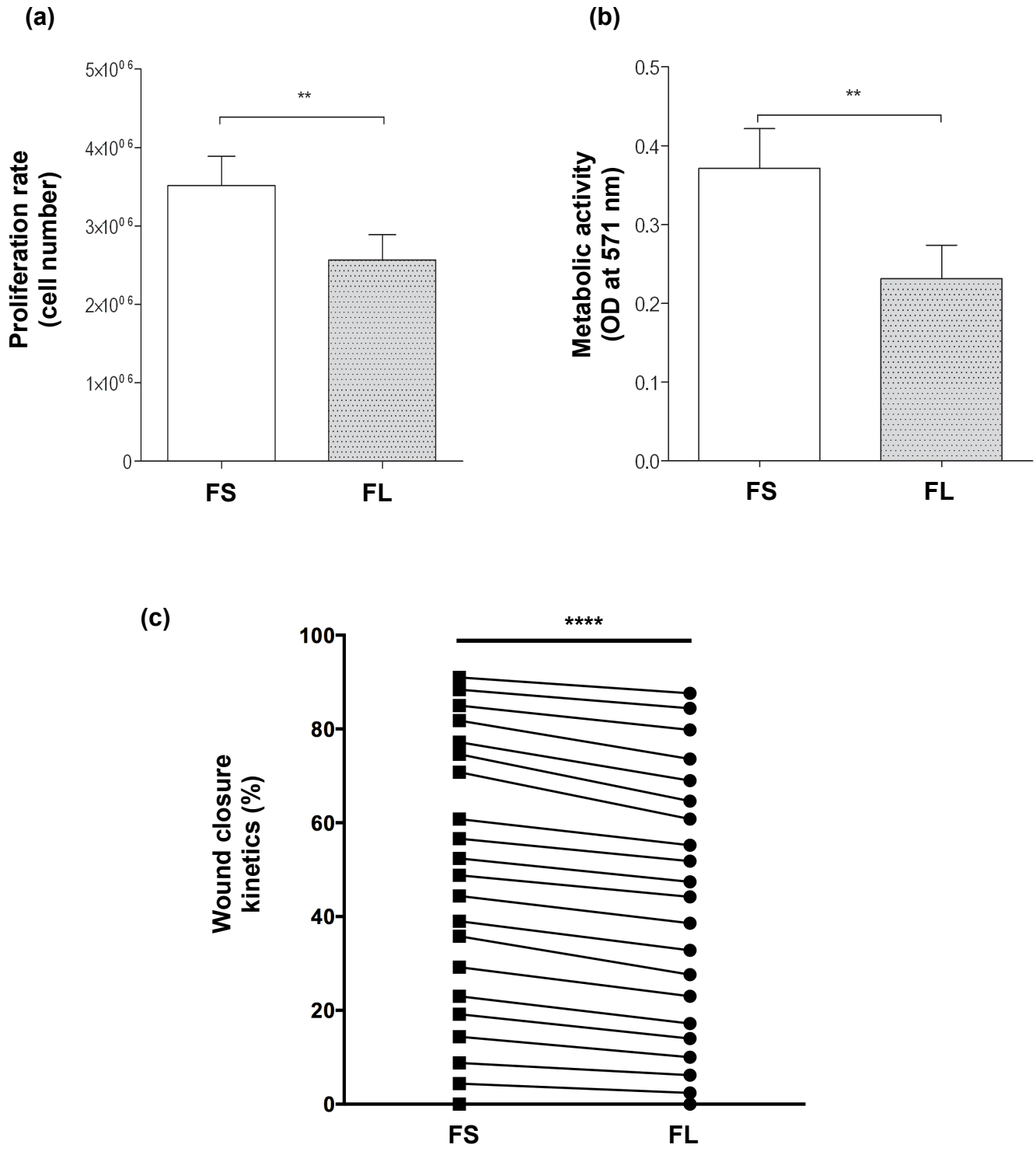

(a)
Proliferation rate (cell number)
5x10^06
4x10^06
3x10^06
2x10^06
1x10^06
0
**
FS
FL
(b)
Metabolic activity (OD at 571 nm)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
FS
FL
(c)
Wound closure kinetics (%)
100
80
60
40
20
0
****
FS
FL

Figure 3

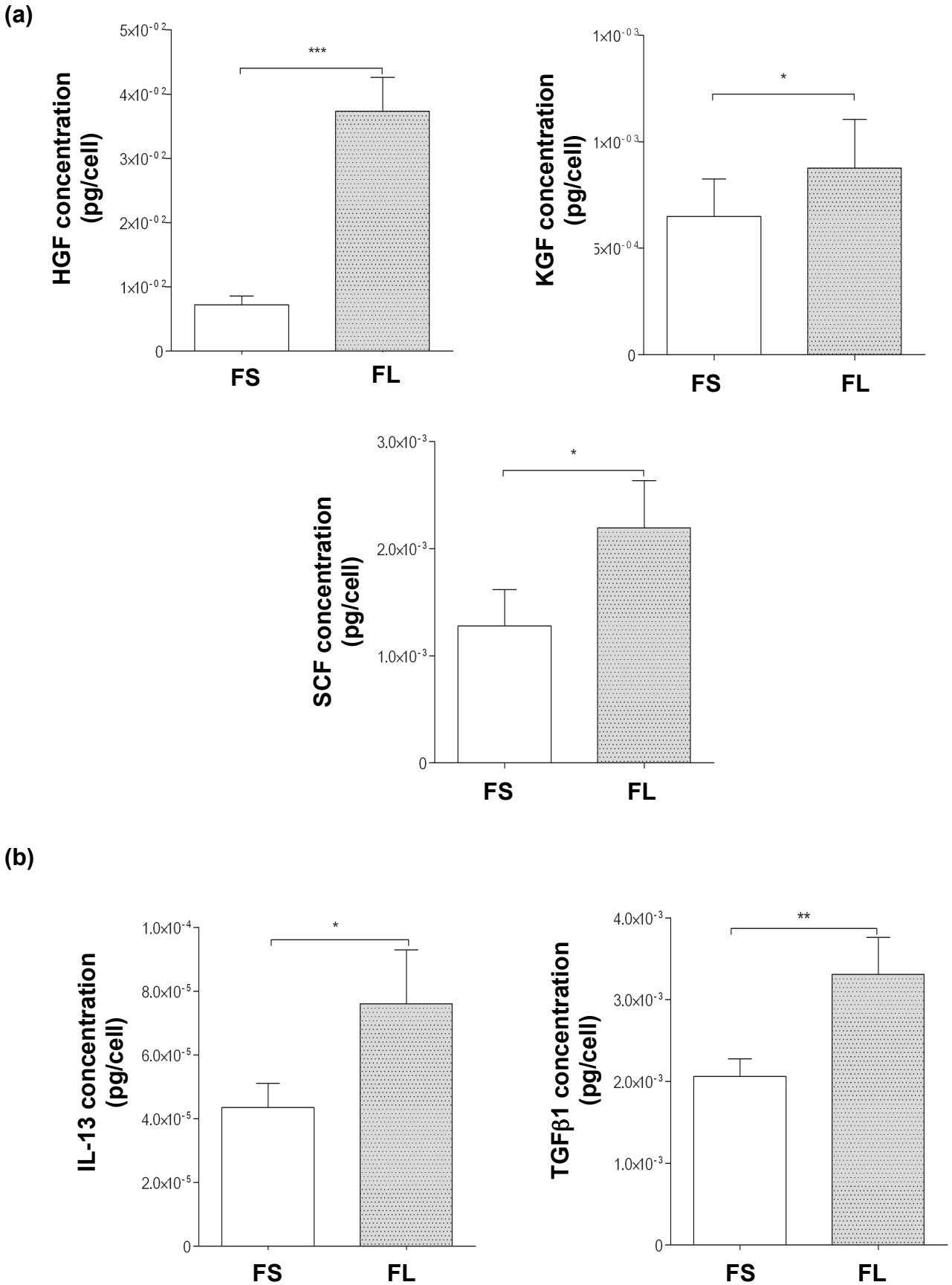
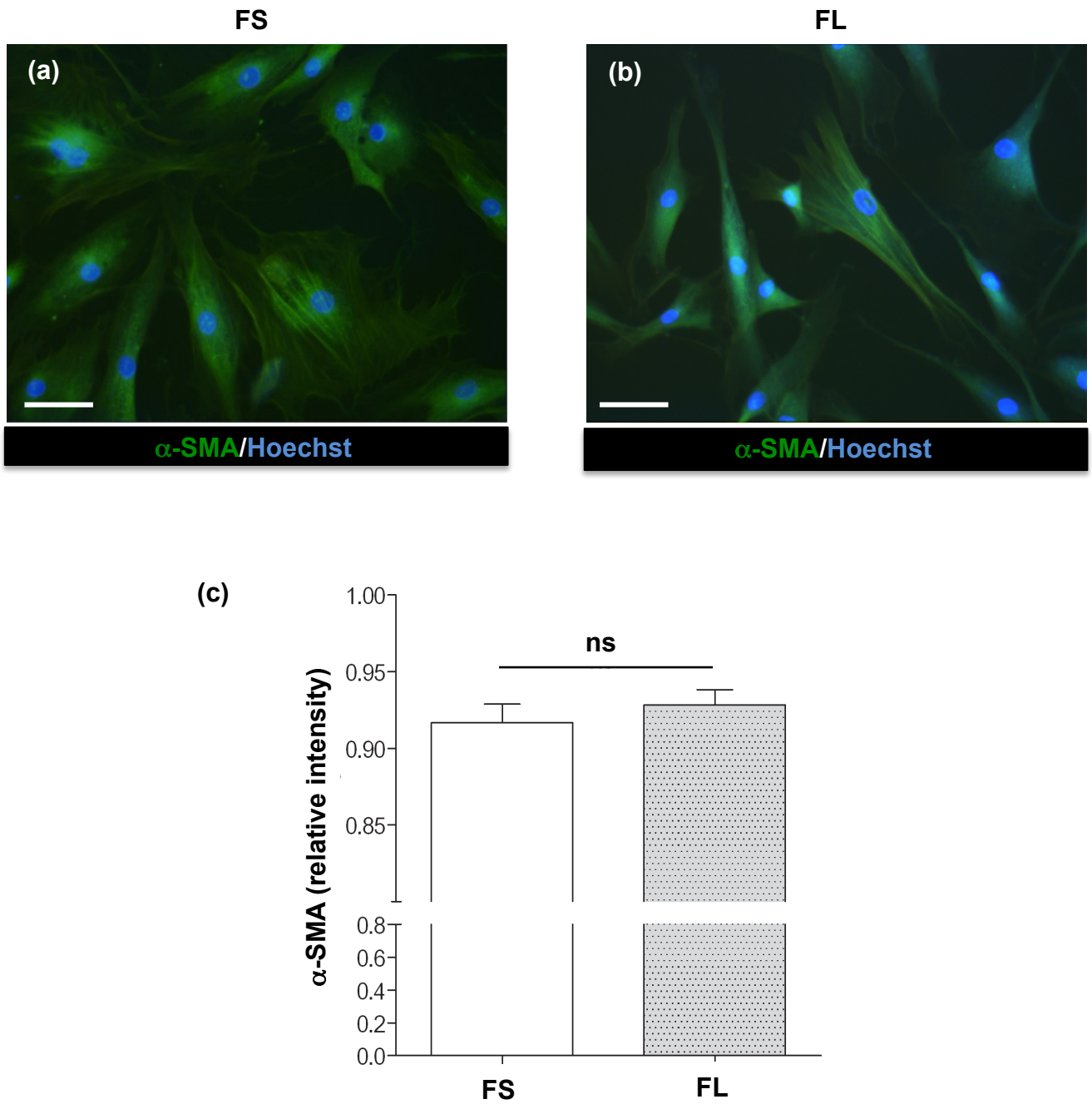

(a)
HGF concentration (pg/cell)
5x10-02
4x10-02
3x10-02
2x10-02
1x10-02
0
***
FS
FL
KGF concentration (pg/cell)
1x10-03
1x10-03
5x10-04
0
*
FS
FL
SCF concentration (pg/cell)
3.0x10-3
2.0x10-3
1.0x10-3
0
*
FS
FL
(b)
IL-13 concentration (pg/cell)
1.0x10-4
8.0x10-5
6.0x10-5
4.0x10-5
2.0x10-5
0
*
FS
FL
TGFβ1 concentration (pg/cell)
4.0x10-3
3.0x10-3
2.0x10-3
1.0x10-3
0
**
FS
FL

Figure 4

	FL		FS		
Soluble Factors	**Mean (pg/cell)**	**ET**	**Mean (pg/cell)**	**ET**	**p**
Eotaxin	8,98E-05	6,69E-05	6,30E-05	5,58E-05	0,152
Eotaxin-3	1,38E-04	1,16E-04	8,88E-05	4,70E-05	0,192
GM-CSF	1,14E-05	1,42E-05	4,90E-06	3,93E-06	0,167
IFN-γ	1,25E-05	1,15E-05	6,69E-06	4,86E-06	0,102
IL-10	3,41E-06	3,93E-06	1,49E-06	9,92E-07	0,102
IL-12	BD		BD		
IL-12p70	6,83E-06	5,93E-06	3,99E-06	2,12E-06	0,089
IL-15	BD		BD		
IL-16	3,60E-05	2,20E-05	2,45E-05	1,27E-05	0,116
IL-17A	7,43E-06	3,67E-06	5,17E-06	2,21E-06	0,110
IL-1α	BD		BD		
IL-1β	BD		BD		
IL-2	BD		BD		
IL-4	1,80E-06	1,62E-06	1,13E-06	6,95E-07	0,133
IL-5	ND		ND		
IL-6	1,06E-03	1,20E-03	7,54E-04	5,29E-04	0,258
IL-7	5,45E-05	5,15E-05	2,79E-05	2,24E-05	0,135
IL-8	3,46E-03	4,49E-03	1,60E-03	1,67E-03	0,168
IL-8 cck	BD		BD		
IP-10	2,12E-05	2,42E-05	1,20E-05	1,02E-05	0,094
MCP-1	BD		BD		
MCP-4	4,54E-05	7,11E-05	2,84E-05	2,48E-05	0,430
MDC	2,01E-04	1,12E-04	1,73E-04	1,36E-04	0,470
MIP-1α	2,01E-04	1,12E-04	1,73E-04	1,36E-04	0,470

MIP-1β	3,13E-05	4,02E-05	1,60E-05	1,03E-05	0,260
TARC	7,72E-05	4,78E-05	5,04E-05	4,53E-05	0,201
TNF-α	6,17E-06	5,84E-06	2,99E-06	2,48E-06	0,089
TNF-β	BD		BD		
VEGF-A	2,20E-03	1,23E-03	1,76E-03	1,09E-03	0,366

Table 1



Supplementary Figure 1

DISCUSSION

La peau est un organe qui protège l'organisme contre les facteurs extrinsèques (microorganismes, pollution, agressions physiques et rayonnements UV) et intrinsèques (dérèglements hormonaux, cancers et inflammation). L'ensemble de ces fonctions est assuré par sa structure organisée en 3 couches superposées qui comprend l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est principalement composé de kératinocytes, de cellules dendritiques et de mélanocytes qui produisent de la mélanine. Ce pigment, qui est transféré aux kératinocytes, les protège des effets nuisibles des rayonnements UV. Le derme, quant à lui, est majoritairement constitué de fibroblastes qui contribuent à une modulation des fonctions mélanocytaires par la sécrétion de divers facteurs solubles. Il existerait donc un dialogue fonctionnel entre les couches épidermique et dermique qui permet une régulation du phénomène de photo-protection cutanée.

Une perte de cette régulation se traduit par des altérations du processus de pigmentation qui peuvent conduire à des désordres hyperpigmentaires, comme celui du lentigo actinique. Ces lésions bénignes sont un motif fréquent de consultation clinique malgré le peu de traitements disponibles (129).

Dans ce projet de thèse, je me suis intéressée aux facteurs biométrologiques qui pourraient être des marqueurs cliniques du lentigo actinique, ainsi qu'à la caractérisation fonctionnelle des fibroblastes de la couche dermique de cette lésion bénigne. Ces deux aspects de mon projet ont été réalisés par des approches de recherche clinique et translationnelle qui ont contribué à mieux comprendre l'impact des facteurs extrinsèques et intrinsèques dans la perte d'homogénéité du teint.

I. Exploration fonctionnelle du lentigo actinique par l'utilisation de divers paramètres biométrologiques : indicateurs d'une lésion hyperpigmentée bénigne

L'originalité de nos travaux cliniques repose sur l'analyse comparative de plusieurs paramètres biométrologiques, à savoir la quantité de sébum, le taux d'hydratation, les quantités de mélanine et d'hémoglobine, la couleur et la réflexion de la lumière, chez un même volontaire. Cette comparaison intra-individuelle entre la zone lésée, qui correspond au lentigo actinique, et la zone saine adjacente n'ayant été effectuée, à ce jour, que séparément. De plus, nos travaux orientent les praticiens vers l'utilisation combinée de différents paramètres biométrologiques pour l'évaluation clinique du lentigo actinique en fonction de son grade.

Aujourd'hui, les outils diagnostiques utilisés pour décrire les lésions d'hyperpigmentation reposent essentiellement sur des classifications clinique et histologique de type maligne. Ces systèmes d'orientation clinique se basent sur un examen anatomopathologique suivant la méthode ABCDE qui visualise si la lésion est asymétrique (A), à bord (B) irréguliers, à couleur (C) hétérogène, avec un diamètre (D) supérieur à 6 mm et à évolution (E) suivant l'extension de sa taille, sa forme, sa couleur et son relief. La suspicion d'un mélanome est confirmée par une exérèse cutanée qui est soumise à un examen histologique. Ce dernier confirme alors la nature mélanocytaire de la tumeur, son degré de malignité, la profondeur de l'invasion du tissu cutané (épiderme, jonction dermo-épidermique et/ou derme (le niveau de Clark) et son épaisseur (indice de Breslow) (130). Par conséquent, la caractérisation de ces hyperpigmentations malignes, qui requiert la détermination du degré d'invasion de la tumeur, nécessite le prélèvement du tissu cutané lésé par une intervention invasive. Concernant la caractérisation des hyperpigmentations bénignes, qui ne justifient pas la réalisation d'une biopsie cutanée, elle repose principalement sur une approche clinique qui reste le meilleur outil pour comprendre l'hétérogénéité de la pigmentation cutanée.

Dans le cas du lentigo actinique, les données cliniques publiées sont peu nombreuses. Pour contribuer à l'établissement d'une approche clinique de ces lésions bénignes, notre stratégie a tout d'abord consisté en une classification des volontaires. Sur ces derniers, 2 critères, que sont le nombre et la taille des lésions, ont été quantifiés et ont permis de constituer 2 groupes de sujets en fonction de leur grade, à savoir le grade 1 ou le grade 2. Nos analyses statistiques différentielles entre les grades 1 et 2 montrent un nombre plus élevé et une taille plus importante des lésions chez les volontaires du « grade 2 ». Hormis l'intensification de l'hétérogénéité du teint en fonction

du grade, nos données proposent que les grades 1 et 2 soient des « marqueurs cliniques » de la progression du lentigo actinique. En effet, notre modèle est en accord avec les résultats d'une étude de microscopie confocale par réflectance qui démontre qu'un de nos 2 critères, à savoir la taille du lentigo actinique, augmente chez les individus suivis sur une période de 5 ans (99). En revanche, aucune étude n'a démontré un lien entre le nombre de lentigo actinique chez un volontaire et la progression de cette hyperpigmentation bénigne au sens général de cette pathologie. De plus, il serait intéressant de démontrer l'existence d'un lien entre notre classification clinique et la classification histologique de Lin *et al.* qui propose une graduation de l'évolution du lentigo actinique (87).

L'approche biométrologique que nous avons utilisée est une méthode non invasive d'évaluation *in vivo* du lentigo actinique et contribue à une meilleure connaissance des caractéristiques cliniques de cette lésion hyperpigmentée. En effet, par l'étude de divers paramètres biométrologiques entre les zones non lésées et lésées du lentigo actinique, nos données proposent que certains de ces paramètres soient des indicateurs de la progression de cette lésion hyperpigmentée.

Une quantification du processus d'hyperpigmentation du lentigo actinique a été effectuée par les mesures de deux paramètres biométrologiques, que sont le taux de mélanine et la couleur de la peau révélée par l'ITA. Nos données montrent une quantité de mélanine plus importante et une valeur d'ITA plus faible dans la zone lésée du groupe de volontaires classés en grade 2. Il est important de noter que l'ITA, qui considère les paramètres colorimétriques L* et b*, apparaît comme un indicateur pertinent, face au L* seul, pour rendre compte de la couleur sombre du lentigo actinique. Ainsi, la hausse de la quantité de mélanine, la baisse de l'ITA et l'augmentation de la taille de la lésion chez les individus du grade 2 (notre étude et une autre (99)), renforcent notre modèle clinique de segmentation en grades du lentigo actinique. En effet, au cours de la progression du lentigo actinique, le processus d'hyperpigmentation s'amplifie et se traduit par une couleur plus foncée de la lésion.

D'autres paramètres colorimétriques, tels que le b* et le a* qui renseignent respectivement sur l'intensité des couleurs rouge et jaune, ont également permis d'apporter des précisions sur l'altération du processus de pigmentation observée dans le lentigo actinique. Notre étude de segmentation par grade montre une plus grande intensité de la couleur rouge au grade 1 alors qu'une plus grande intensité de la couleur jaune est observée au grade 2. Nos données suggèrent un déséquilibre des enzymes de la mélanogénèse qui est supportée par la description d'une synthèse plus importante des pigments jaunes et rouges de la phéomélanine dans le lentigo

actinique (19). Notre analyse de corrélation entre les paramètres mélanine et colorimétrique b* au sein de la zone lésée montre une augmentation de l'intensité de la couleur jaune (augmentation du paramètre b*) au cours des grades proposant un excès de phéomélanine et un défaut d'eumélanine. Sachant que les peaux caucasiennes aux phototypes foncés (III et IV) développent davantage de lentigos actiniques que les peaux aux phototypes clairs (I et II) (118), nos résultats suggèreraient que les peaux aux phototypes clairs ont un ratio phéomélanine/eumélanine plus fort au cours de la progression en grade du lentigo actinique. En revanche, ce ratio est remis en question par une étude récente qui montre que la proportion de phéomélanine et d'eumélanine ne dépend pas du degré de pigmentation cutané (131). En accord avec l'étude de la taille et de la couleur du lentigo actinique au cours du temps sur des volontaires ayant un même phototype (II et III) (99), la différence significative pour le paramètre colorimétique b* entre les grades 1 et 2 de notre étude suggère que ce paramètre est un indicateur discriminant du grade du lentigo actinique. Pour expliquer l'augmentation du paramètre colorimétrique b* à l'échelle cellulaire / moléculaire, il est intéressant de noter que les mélanocytes et les kératinocytes de la couche basale établissent un contact par l'intermédiaire de glycoprotéines transmembranaires comme la E-cadhérine (130). Une potentielle diminution de l'expression de la E-cadhérine, qui affaiblirait le contact et donc la communication entre les kératinocytes et les mélanocytes, pourrait être à l'origine d'un déséquilibre de la balance phéomélanine / eumélanine qui serait en faveur d'une synthèse plus forte de phéomélanine (19). Des études complémentaires *ex-vivo* visant à quantifier ces 2 pigments par des expériences de chromatographie en phase liquide à haute performance (99) confirmerait cette hypothèse.

Lié au paramètre colorimétrique a*, notre étude a également considéré le paramètre « hémoglobine ». Comme précédemment proposé (85, 99), l'augmentation du paramètre colorimétrique a*, qui est associée à celle de la quantité d'hémoglobine, dans la zone lésée suggère la présence sous-jacente d'une micro-vascularisation abondante dans cette zone. Dans le contexte de l'étude entre grades, cette hausse du paramètre hémoglobine qui sous-tend le développement d'une micro-vascularisation dans la zone hyperpigmentée est supportée par une autre étude montrant une déformation structurale profonde du derme papillaire au cours du temps dans le cas du lentigo actinique (99)**.**

Par ailleurs, il serait intéressant de comparer les paramètres biométrologiques « mélanine », « hémoglobine », « colorimétriques a* et b* » entre le lentigo actinique et le lentigo malin afin de définir si seuls ou en combinaison ces paramètres pourraient constituer un outil « diagnostic » différentiel des lentigos. En effet, ces deux formes de lentigo peuvent toucher les mêmes régions corporelles (tête et cou) et présenter certaines ressemblances morphologiques à l'examen

physique. De plus, des études épidémiologiques portant sur le lentigo malin tendent à démontrer que son apparition est liée à des antécédents de coups de soleil répétés chez des sujets âgés au phototype clair qui ont aussi tendance à développer des lentigos actiniques (132).

Si les approches cliniques sont des outils précieux pour le diagnostic et le pronostic des lésions hyperpigmentées, l'étude de la physiopathologie permet de les renforcer en établissant un lien cellulaire et/ou moléculaire entre les processus d'hyperpigmentation et la progression des lésions hyperpigmentées.

Toujours dans un contexte d'exposition aux rayonnements UVs, une autre forme d'hyperpigmentation cutanée maligne est le mélanome. Son développement peut être associé non seulement à une exposition ponctuelle au soleil qui est liée à des mutations des gènes *BRAF* et *NRAS*, mais également à une exposition faible au soleil, voire chronique, qui est davantage liée à une mutation du gène *c-KIT* (132). À des fins diagnostiques et thérapeutiques, seule l'analyse mutationnelle des gènes *BRAF* et *NRAS* est utilisée. Si elles co-existent rarement au sein d'un mélanome, ces mutations codent pour des protéines qui activent constitutivement la voie de signalisation ERK/MAPK, qui est elle-même est impliquée dans des processus cellulaires comme la prolifération, la survie, la résistance à l'apoptose et l'invasion (132). L'hypothèse d'un lien entre le processus d'hyperpigmentation et BRAF a été émise lors de la mise en évidence d'une induction de l'expression du gène MIFT en réponse à une activation de BRAF. Même si l'implication fonctionnelle de MIFT n'est pas complètement définie dans les mélanomes, cette protéine a été montrée pour favoriser la survie ou pour réprimer la prolifération des cellules tumorales en fonction du contexte mutationnel de BRAF (99, 133). Sachant que les lésions précoces du mélanome montrent une faible prévalence de la mutation de BRAF par rapport aux lésions tardives, il serait également intéressant de regarder le statut mutationnel de ce gène dans le cadre de la progression du lentigo actinique. Par ailleurs, si des mutations de BRAF ont été mises en évidence dans le lentigo malin, ce désordre hyperpigmentaire est caractérisé par une fréquence de mutation plus élevée du gène p53 (132). Au regard de l'absence d'étude sur les mutations du gène p53 dans le lentigo actinique et des nombreux rôles de cette protéine dans des conditions normales et pathologiques, il serait également intéressant d'étudier le statut mutationnel du gène p53 dans le développement et le maintien du lentigo actinique.

Pour résumer ces travaux en recherche clinique, l'exploration fonctionnelle du lentigo actinique, effectuée grâce à des analyses statistiques comparatives de mesures de divers paramètres biométrologiques entre les zones lésée et non lésée, propose certains de ces paramètres comme des indicateurs de territoire cutané, de zones ou d'évolution de cette lésion

hyperpigmentée bénigne. Ces indicateurs biométrologiques du lentigo actinique pourraient être utilisés comme « références » dans le développement de traitements topiques visant à réduire l'hétérogénéité du teint.

II. Caractérisations morphologiques et fonctionnelles des fibroblastes isolés du lentigo actinique

Suite à notre étude clinique de paramètres biométrologiques comme indicateurs du lentigo actinique lors d'un examen physique, je me suis ensuite intéressée à la caractérisation fonctionnelle des fibroblastes du derme dans ce désordre pigmentaire par une approche de recherche translationnelle. À notre connaissance, cette étude est la première qui décrit l'extraction et la mise en culture de fibroblastes primaires obtenus à partir de biopsies cutanées issues d'une zone lésée (FL) et d'une zone adjacente saine (FS) d'un lentigo actinique chez un même individu. Il est à noter que si l'extraction des mélanocytes et des kératinocytes primaires à partir de biopsies de lentigo actinique a été fructueuse, le maintien en culture de ces deux types de cellules épidermiques a été un échec, probablement causé par des conditions de culture inadaptées à ce modèle pathologique. Quoi qu'il en soit, l'origine *ex-vivo* de notre modèle fibroblastique a été validée par des colorations au Masson-Fontana réalisées sur des coupes de tissus cutanés comportant des zones lésées et non lésées. Cette coloration confirme les caractéristiques histologiques de l'hyperpigmentation du lentigo actinique avec un dépôt plus important de mélanine au niveau de la couche basale et de la jonction dermo-épidermique, ainsi qu'une perte « des motifs ondulatoires » due à l'aplatissement de cette jonction. De plus, les caractéristiques histologiques observées correspondent à celles de lentigos actiniques considérés à un stade tardif de progression (87).

Pour valider notre modèle de fibroblastes primaires normaux et pathologiques par rapport aux données publiées sur le lentigo actinique, nous nous sommes focalisés sur les différences morphologiques et fonctionnelles entre les FL et les FS.

Il est admis que les fibroblastes forment une population cellulaire hétérogène dans la plupart des tissus (21, 22). En accord avec cette hétérogénéité fibroblastique, les FS et FL de notre modèle de cellules primaires présentent des différences morphologiques en termes de taille et de forme. Les FL étant dotées de morphologies cytoplasmiques plus allongées avec des formes nucléaires plus elliptiques. De plus, la visualisation de la F-actine qui participe à la composition du cytosquelette (134, 135) supporte cette morphologie différentielle entre FS et FL. En effet, la

quantité plus importante de F-actine détectée dans les FL tend à démontrer que les FL et les FS diffèrent dans l'organisation de leur cytosquelette d'actine, suggérant des caractéristiques fonctionnelles différentielles.

Tout d'abord, l'étude de l'α–SMA révèle que les FS et les FL ne présentent pas de différence quantitative de ce marqueur myofibroblastique. Ces données corroborent avec celles démontrant l'absence de différence d'intensité de marquage de l'α–SMA entre les zones lésées et saines de la couche dermique de biopsies de lentigo actinique (94). En revanche, elles ne confirment pas les travaux décrivant que la plupart des fibroblastes isolés à partir de tissus cutanés acquièrent des caractéristiques myofibroblastiques, en terme d'α–SMA, une fois mis en culture (136, 137). Il est donc tentant de conclure que notre modèle *in vitro* de fibroblastes primaires ressemble aux fibroblastes de biopsies du lentigo actinique, en termes de différenciation myofibroblastique. Cependant, la détection de l'α–SMA dans nos fibroblastes primaires en culture et dans les fibroblastes des biopsies de lentigo actinique ne renseigne pas sur la fonction de cette forme d'actine. De façon intéressante, l'expression des filaments d'α–SMA a été corrélée aux propriétés contractiles des fibroblastes (138). Par la mise en œuvre de l'approche technologique développée par les membres de notre équipe Inserm U1018, l'analyse différentielle des forces contractiles générées par nos fibroblastes primaires permettrait de déterminer si ce marqueur myofibroblastique est à l'origine d'une distinction fonctionnelle entre les FL et les FS. Un certain nombre d'évidences décrites dans la littérature met en évidence un lien entre l'expression et la fonction de l'α–SMA. Premièrement, l'α–SMA est impliquée dans la guérison de plaies chroniques traitées par ultrasons. Ce traitement augmentant l'expression de l'α–SMA dans les fibroblastes dermiques humains et favorisant le processus de cicatrisation cutanée (139). Deuxièmement, si l'expression de l'α–SMA est largement retrouvée dans les lésions bénignes telles que les naevus, elle n'est pas détectée dans les lésions malignes comme les mélanomes. En revanche, les fibroblastes du tissu stromal proche des cellules du mélanome voient une augmentation de leur expression de l'α–SMA, suggérant que les cellules tumorales sont capables d'induire une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes par la sécrétion probable de facteurs solubles (140). Ces données contribuent également à argumenter pour un rôle déterminant des fibroblastes dans des processus d'hyperpigmentation bénins et malins.

Toujours dans l'objectif de caractériser la fonction des fibroblastes primaires extraits de biopsies de lentigo actinique, nos études ont démontré que les FL ont un taux de prolifération plus faible que les FS. Sachant que nos fibroblastes primaires extraits de biopsies de lentigos actiniques ont des caractéristiques histologiques de lésions tardives, nos données supportent celles générées par des expériences d'immuno-histochimie effectuées avec le marqueur de prolifération

Ki67 (87). En effet, ces expériences démontrent que l'expression de ce marqueur est modulée au cours de la progression du lentigo actinique avec un nombre de cellules positives pour le Ki67 fortement réduit dans les stades tardifs (87). Même si cette diminution des cellules positives pour le Ki67 a été attribuée aux kératinocytes supra-basaux (87), nos résultats ne peuvent exclure que les fibroblastes puissent contribuer également à cette diminution dans le lentigo actinique à un stade avancé.

Une autre fonction biologique des fibroblastes primaires que nous avons étudiée est leur capacité à migrer. Cette capacité est décrite pour être liée non seulement à la composition du cytosquelette d'actine mais également aux molécules d'adhésion, aux intégrines et aux protéines de la matrice extracellulaire (141). Nos données montrent que les FL ont une moins grande capacité à refermer une blessure, au cours du temps, générée dans leur monocouche. Il serait intéressant de tester cette même capacité des FL en recouvrant le plastique du support avec des protéines pour mimer l'environnement *in vivo* de ces fibroblastes primaires (141). Malgré des conditions peu physiologiques et l'absence de résultats complémentaires, la diminution de la capacité migratoire des FL pourrait être expliquée non seulement par un défaut de l'expression d'une intégrine (141) mais également par un défaut d'une des étapes de la migration cellulaire impliquant la F-actine. Brièvement, la première étape de la migration consiste en la protrusion de la cellule qui fait appel à une polymérisation de la F-actine pour générer une force mécanique et induire un changement morphologique nécessaire à l'envahissement de la zone lésée. La seconde étape, consiste en l'adhésion cellulaire qui nécessite, quant à elle, une dépolymérisation de la F-actine et l'intervention éventuelle de fibres de stress contractiles de F-actine pour immobiliser la cellule à une surface adhérente ou une à matrice extracellulaire. Enfin, la troisième étape permet à la cellule de retrouver sa morphologie initiale en inhibant la protusion cellulaire (135). Sachant que nos données montrent une quantité de F-actine plus importante dans les FL, il est tentant de spéculer que les FL ont un défaut d'adhésion cellulaire avec une altération du processus de dépolymérisation de la F-actine.

Une dernière fonction étudiée des fibroblastes primaires extraits de biopsies de lentigo actinique est leur capacité sécrétoire. Cette fonction, qui permet aux fibroblastes de dialoguer avec leur environnement cellulaire, explique en partie l'impact fonctionnel des fibroblastes sur d'autres types cellulaires cutanés. Malgré un nombre grandissant de publications sur les lentigos actiniques qui permet de proposer un modèle sur le maintien et la progression de cette hyperpigmentation bénigne (cf. Viewpoint en annexe pour les références (119)), aucune donnée n'existe sur la signature sécrétoire des fibroblastes de lentigo actinique.

En ligne avec le contexte inflammatoire chronique du lentigo actinique (91, 142, 143), nos données démontrent que le facteur de croissance TGFβ1 et la cytokine IL-13 sont sécrétés de

façon différentielle entre les FS et les FL avec un taux plus élevé pour les FL. L'impact fonctionnel du TGFβ1 au niveau de tissu cutané a été rapporté pour inhiber *in vivo* la prolifération des kératinocytes (144, 145) et la différenciation des mélanocytes *in vitro* (15). En revanche, aucune donnée ne démontre la sécrétion endogène d'IL-13 par les fibroblastes, les mélanocytes et les kératinocytes de la peau. Seule l'addition d'IL-13 exogène, sensée mimer une inflammation de type Th2, révèle que cette cytokine inhibe la différenciation des kératinocytes psoriasiques (68), des cellules de la lignée kératinocytaire HaCaT (69), et diminue la mélanogénèse de la lignée NHEM (66). Sur la base de ces données bibliographiques, il est tentant de postuler que le plus fort taux de sécrétion du TGFβ1 et d'IL-13 par les FL contrôlerait la progression du lentigo actinique, voir même son éventuelle transformation maligne. En dehors d'être des biomarqueurs de sécrétion des fibroblastes de lentigo actinique, des expériences complémentaires sont nécessaires pour démontrer que le TGFβ1 et l'IL-13 endogènes sont des biomarqueurs fonctionnels du lentigo actinique.

Des données récentes tendent à impliquer fonctionnellement les fibroblastes du derme non seulement dans les phénomènes de pigmentation constitutive mais également dans le développement de troubles hyperpigmentaires (29-31, 146, 147). Cette implication passe par l'intermédiaire de la sécrétion de certains facteurs de croissance tels que le SCF (148-150), le HGF (148, 150) et le KGF (148, 151). La vérification de la participation de ces 3 facteurs mélanogéniques à la signature sécrétoire du lentigo actinique *in vitro*, montre qu'ils sont bien sécrétés par nos fibroblastes primaires et que le taux de sécrétion du SCF, HGF et KGF détectés dans les surnageants des FL est plus élevé. Ces données sont en accord avec celles détectant des niveaux plus importants de ces 3 facteurs de croissance dans le derme supérieur de biopsies du lentigo actinique (100). Ces résultats tendent à démontrer que la capacité de sécrétion de notre modèle *in vitro* de fibroblastes primaires est proche de celle des fibroblastes situés dans le derme du lentigo actinique.

Dans le but de vérifier si cette signature sécrétoire a un impact fonctionnel sur les cellules cutanées environnantes, l'établissement d'un modèle de co-cultures entre les fibroblastes extraits des biopsies de lentigo actinique et, des mélanocytes et/ou des kératinocytes isolées à partir de biopsies de cette lésion hyperpigmentée, est requis. En revanche, comme décrit précédemment, aucun des protocoles utilisés n'a abouti au maintien en culture des mélanocytes et des kératinocytes primaires du lentigo actinique. Pour contourner ces verrous technologiques, des cellules humaines primaires kératinocytaires et mélanocytaires, qui sont disponibles commercialement, peuvent être utilisées dans un modèle de co-culture cellulaire semblable à celui publié récemment (30). Ce modèle permettra de déterminer *in vitro* si la signature sécrétoire des

FL modifie la mélanogénèse des mélanocytes et la différenciation des kératinocytes. D'autre part, par l'addition de cellules primaires endothéliales microvasculaires à ce modèle de co-culture cellulaire devrait permettre de mettre à jour les mécanismes cellulaires sous-jacents à nos données sur le lien clinique établi entre l'hyperpigmentation et la microcirculation.

Pour conclure sur ce travail translationnel, l'isolation des fibroblastes provenant de biopsies de lentigo actinique et de la zone saine adjacente a permis d'établir un modèle de fibroblastes primaires dont les certaines caractéristiques morphologiques et fonctionnelles sont proches de celles décrites dans les fibroblastes de biopsies de lentigo actinique. En identifiant les profils de sécrétion différentiels entre les FS et les FL, de nouvelles investigations sont nécessaires pour clarifier les rôles autocrine et/ou paracrine des facteurs solubles identifiés sur les fonctions de différenciation et de prolifération des mélanocytes et des kératinocytes. Il est tentant de spéculer que notre modèle de fibroblastes primaires constituerait un bon outil cellulaire pour tester des principes actifs dans le but de réduire l'hétérogénéité du teint chez les femmes à peaux matures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hay RJ, Augustin M, Griffiths CE, Sterry W, Board of the International League of Dermatological S, the Grand Challenges Consultation g. The global challenge for skin health. The British journal of dermatology. 2015;172(6):1469-72.
2. Kligman AM, Koblenzer C. Demographics and psychological implications for the aging population. Dermatologic clinics. 1997;15(4):549-53. Epub 1997/12/31.
3. Hay RJ, Johns NE, Williams HC, Bolliger IW, Dellavalle RP, Margolis DJ, *et al.* The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. The Journal of investigative dermatology. 2014;134(6):1527-34.
4. Park K. Role of micronutrients in skin health and function. Biomolecules & therapeutics. 2015;23(3):207-17.
5. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. Surgery (Oxford). 2010;28(10):469-72.
6. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. Clinics in dermatology. 2012;30(3):257-62.
7. Bentov I, Reed MJ. The effect of aging on the cutaneous microvasculature. Microvascular research. 2015;100:25-31.
8. Kellogg DL, Jr. In vivo mechanisms of cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans during thermoregulatory challenges. Journal of applied physiology. 2006;100(5):1709-18.
9. Roudaut Y, Lonigro A, Coste B, Hao J, Delmas P, Crest M. Touch sense: functional organization and molecular determinants of mechanosensitive receptors. Channels. 2012;6(4):234-45. Epub 2012/11/14.
10. Bentov I, Reed MJ. Anesthesia, microcirculation, and wound repair in aging. Anesthesiology. 2014;120(3):760-72.
11. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Structural characteristics of the aging skin: a review. Cutaneous and ocular toxicology. 2007;26(4):343-57. Epub 2007/12/07.
12. Kolarsick P.A.J, Kolarsick M.A, C. G. Anatomy and Physiology of the Skin. Journal of the Dermatology Nurses' Association. 2011;3(4):214-5.
13. Benedetto AV. The environment and skin aging. Clinics in dermatology. 1998;16(1):129-39.
14. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. Postepy dermatologii i alergologii. 2013;30(1):30-41.
15. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. Physiological reviews. 2004;84(4):1155-228.
16. Wu X, Hammer JA. Melanosome transfer: it is best to give and receive. Current opinion in cell biology. 2014;29:1-7.
17. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2007;21(4):976-94.
18. Plonka PM, Passeron T, Brenner M, Tobin DJ, Shibahara S, Thomas A, *et al.* What are melanocytes really doing all day long...? Experimental dermatology. 2009;18(9):799-819.
19. Duval C, Smit NP, Kolb AM, Regnier M, Pavel S, Schmidt R. Keratinocytes control the pheo/eumelanin ratio in cultured normal human melanocytes. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society. 2002;15(6):440-6.
20. Praillet C, Grimaud J, Lortat-Jacob H. Les protéoglycanes. (I) Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques ? Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research. 1998;14(4):412-20.
21. Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. Trends in cell biology. 2015;25(2):92-9.
22. Sorrell JM, Caplan AI. Chapter 4 Fibroblasts—A Diverse Population at the Center of It All. 2009;276:161-214.
23. Lee DY, Lee JH, Lee ES, Cho KH, Yang JM. Fibroblasts play a stimulatory role in keratinocyte proliferation but an inhibitory role in melanocyte growth and pigmentation in a skin equivalent system from skin type IV. Archives of dermatological research. 2003;294(10-11):444-6.
24. Imokawa G, Yada Y, Morisaki N, Kimura M. Biological characterization of human fibroblast-derived mitogenic factors for human melanocytes. The Biochemical journal. 1998;330 (Pt 3):1235-9.

25. Cario-Andre M, Pain C, Gauthier Y, Casoli V, Taieb A. In vivo and in vitro evidence of dermal fibroblasts influence on human epidermal pigmentation. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society. 2006;19(5):434-42.
26. Wang Z, Wang Y, Farhangfar F, Zimmer M, Zhang Y. Enhanced keratinocyte proliferation and migration in co-culture with fibroblasts. PloS one. 2012;7(7):e40951.
27. Frankart A, Malaisse J, De Vuyst E, Minner F, de Rouvroit CL, Poumay Y. Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. Experimental dermatology. 2012;21(11):871-5.
28. Chau DY, Johnson C, MacNeil S, Haycock JW, Ghaemmaghami AM. The development of a 3D immunocompetent model of human skin. Biofabrication. 2013;5(3):035011.
29. Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, Yasumoto K, Abdel-Malek ZA, Kubo T, *et al.* Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: increased expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts inhibits melanocyte growth and differentiation. The Journal of cell biology. 2004;165(2):275-85.
30. Duval C, Cohen C, Chagnoleau C, Flouret V, Bourreau E, Bernerd F. Key regulatory role of dermal fibroblasts in pigmentation as demonstrated using a reconstructed skin model: impact of photo-aging. PloS one. 2014;9(12):e114182. Epub 2014/12/10.
31. Hedley SJ, Layton C, Heaton M, Chakrabarty KH, Dawson RA, Gawkrodger DJ, *et al.* Fibroblasts play a regulatory role in the control of pigmentation in reconstructed human skin from skin types I and II. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society. 2002;15(1):49-56. Epub 2002/02/12.
32. Braverman IM. The cutaneous microcirculation. The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research. 2000;5(1):3-9. Epub 2001/01/09.
33. Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. Journal of cell science. 2004;117(Pt 5):667-75.
34. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. Archives of dermatology. 1988;124(6):869-71. Epub 1988/06/01.
35. Pillaiyar T, Manickam M, Jung SH. Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009 - 2014). Expert opinion on therapeutic patents. 2015;25(7):775-88.
36. Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. Anais brasileiros de dermatologia. 2013;88(1):76-83.
37. Hirobe T, Hasegawa K, Furuya R, Fujiwara R, Sato K. Effects of fibroblast-derived factors on the proliferation and differentiation of human melanocytes in culture. Journal of dermatological science. 2013;71(1):45-57.
38. Kim M, Han JH, Kim JH, Park TJ, Kang HY. Secreted Frizzled-Related Protein 2 (sFRP2) Functions as a Melanogenic Stimulator; the Role of sFRP2 in UV-Induced Hyperpigmentary Disorders. The Journal of investigative dermatology. 2016;136(1):236-44. Epub 2016/01/15.
39. Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. The Journal of biological chemistry. 1992;267(34):24675-80. Epub 1992/12/05.
40. Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M, Higashi K, Yada Y. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society. 1997;10(4):218-28. Epub 1997/08/01.
41. Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Barrios-Payan J, *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. Medical oncology. 2014;31(1):774. Epub 2013/11/23.
42. Shirakata Y. Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. Journal of dermatological science. 2010;59(2):73-80. Epub 2010/06/24.
43. Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Fusenig NE, *et al.* c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. Cell. 2000;103(5):745-55.

44. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. Therapeutic advances in medical oncology. 2011;3(1 Suppl):S7-S19.
45. Stoker M, Perryman M. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. Journal of cell science. 1985;77:209-23.
46. Mildner M, Mlitz V, Gruber F, Wojta J, Tschachler E. Hepatocyte growth factor establishes autocrine and paracrine feedback loops for the protection of skin cells after UV irradiation. The Journal of investigative dermatology. 2007;127(11):2637-44.
47. Werner S, Smola H. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. Trends in cell biology. 2001;11(4):143-6.
48. Peng C, He Q, Luo C. Lack of keratinocyte growth factor retards angiogenesis in cutaneous wounds. The Journal of international medical research. 2011;39(2):416-23.
49. Vaidya A, Kale VP. TGF-beta signaling and its role in the regulation of hematopoietic stem cells. Systems and synthetic biology. 2015;9(1-2):1-10.
50. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature. 1994;370(6488):341-7. Epub 1994/08/04.
51. Le Roy C, Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. Nature reviews Molecular cell biology. 2005;6(2):112-26. Epub 2005/02/03.
52. Massague J. TGFbeta signalling in context. Nature reviews Molecular cell biology. 2012;13(10):616-30. Epub 2012/09/21.
53. Wang XJ, Liefer KM, Tsai S, O'Malley BW, Roop DR. Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor beta1 in the epidermis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999;96(15):8483-8. Epub 1999/07/21.
54. Mohammed J, Gunderson AJ, Khong HH, Koubek RD, Udey MC, Glick AB. TGFbeta1 overexpression by keratinocytes alters skin dendritic cell homeostasis and enhances contact hypersensitivity. The Journal of investigative dermatology. 2013;133(1):135-43. Epub 2012/07/27.
55. Yang G, Li Y, Nishimura EK, Xin H, Zhou A, Guo Y, *et al.* Inhibition of PAX3 by TGF-beta modulates melanocyte viability. Molecular cell. 2008;32(4):554-63.
56. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Beermann F, Aparicio P, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Transforming growth factor-beta1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1. The Journal of biological chemistry. 1997;272(7):3967-72. Epub 1997/02/14.
57. Moustakas A. TGF-beta targets PAX3 to control melanocyte differentiation. Developmental cell. 2008;15(6):797-9.
58. Rodeck U, Bossler A, Graeven U, Fox FE, Nowell PC, Knabbe C, *et al.* Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. Cancer research. 1994;54(2):575-81.
59. Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor-beta1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. The international journal of biochemistry & cell biology. 2004;36(8):1482-91.
60. Yang R, Zheng Y, Li L, Liu S, Burrows M, Wei Z, *et al.* Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors. Nat Commun. 2014;5:5807.
61. Gambichler T, Skrygan M, Tomi NS, Breuksch S, Altmeyer P, Kreuter A. Significant downregulation of transforming growth factor-beta signal transducers in human skin following ultraviolet-A1 irradiation. The British journal of dermatology. 2007;156(5):951-6. Epub 2007/03/27.
62. Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ. Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. The American journal of pathology. 2004;165(3):741-51. Epub 2004/08/28.
63. Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. The Journal of allergy and clinical immunology. 2003;111(4):677-90; quiz 91. Epub 2003/04/22.
64. Murata T, Husain SR, Mohri H, Puri RK. Two different IL-13 receptor chains are expressed in normal human skin fibroblasts, and IL-4 and IL-13 mediate signal transduction through a common pathway. International immunology. 1998;10(8):1103-10. Epub 1998/09/02.
65. McCormick SM, Heller NM. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. Cytokine. 2015;75(1):38-50. Epub 2015/07/19.

66. Han J, Lee E, Kim E, Yeom MH, Kwon O, Yoon TH, *et al.* Role of epidermal gammadelta T-cell-derived interleukin 13 in the skin-whitening effect of Ginsenoside F1. Experimental dermatology. 2014;23(11):860-2. Epub 2014/08/06.
67. Choi H, Choi H, Han J, Jin SH, Park JY, Shin DW, *et al.* IL-4 inhibits the melanogenesis of normal human melanocytes through the JAK2-STAT6 signaling pathway. The Journal of investigative dermatology. 2013;133(2):528-36. Epub 2012/09/21.
68. Man XY, Chen XB, Li W, Landeck L, Dou TT, Chen JQ, *et al.* Analysis of epithelial-mesenchymal transition markers in psoriatic epidermal keratinocytes. Open biology. 2015;5(8). Epub 2015/08/14.
69. Omori-Miyake M, Yamashita M, Tsunemi Y, Kawashima M, Yagi J. In vitro assessment of IL-4- or IL-13-mediated changes in the structural components of keratinocytes in mice and humans. The Journal of investigative dermatology. 2014;134(5):1342-50. Epub 2013/11/28.
70. Mac-Mary S, Sainthillier JM, Jeudy A, Sladen C, Williams C, Bell M, *et al.* Assessment of cumulative exposure to UVA through the study of asymmetrical facial skin aging. Clin Interv Aging. 2010;5:277-84. Epub 2010/10/07.
71. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. The Journal of clinical investigation. 2010;120(4):963-72. Epub 2010/04/07.
72. Verdier-Sevrain S, Bonte F, Gilchrest B. Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. Experimental dermatology. 2006;15(2):83-94. Epub 2006/01/26.
73. Thornton MJ. Estrogens and aging skin. Dermato-endocrinology. 2013;5(2):264-70.
74. Archer DF. Postmenopausal skin and estrogen. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2012;28 Suppl 2:2-6. Epub 2012/08/02.
75. Baumann L. Cosmetic Dermatology: Principles and Practice. 2 edition ed: McGraw-Hill Education / Medical; 2009. 336 p.
76. Yin L, Morita A, Tsuji T. Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. Photodermatology, photoimmunology & photomedicine. 2001;17(4):178-83. Epub 2001/08/14.
77. Bubenik GA, Konturek SJ. Melatonin and aging: prospects for human treatment. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society. 2011;62(1):13-9. Epub 2011/04/01.
78. Desotelle JA, Wilking MJ, Ahmad N. The circadian control of skin and cutaneous photodamage. Photochemistry and photobiology. 2012;88(5):1037-47. Epub 2012/01/27.
79. Abreu T, Braganca M. The bipolarity of light and dark: A review on Bipolar Disorder and circadian cycles. Journal of affective disorders. 2015;185:219-29. Epub 2015/08/05.
80. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. Advances in wound care. 2013;2(1):5-10. Epub 2014/02/15.
81. Zouboulis CC, Makrantonaki E. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. Clinics in dermatology. 2011;29(1):3-14. Epub 2010/12/15.
82. Bilac C, Sahin MT, Ozturkcan S. Chronic actinic damage of facial skin. Clinics in dermatology. 2014;32(6):752-62. Epub 2014/12/03.
83. Luebberding S, Krueger N, Kerscher M. Skin physiology in men and women: in vivo evaluation of 300 people including TEWL, SC hydration, sebum content and skin surface pH. International journal of cosmetic science. 2013;35(5):477-83. Epub 2013/05/30.
84. Yaar M, Gilchrest BA. Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. Clinical and experimental dermatology. 2001;26(7):583-91. Epub 2001/11/07.
85. Li L, Mac-Mary S, Sainthillier JM, Nouveau S, de Lacharriere O, Humbert P. Age-related changes of the cutaneous microcirculation in vivo. Gerontology. 2006;52(3):142-53.
86. Shin J, Park JY, Kim SJ, Kang HY. Characteristics of keratinocytes in facial solar lentigo with flattened rete ridges: comparison with melasma. Clinical and experimental dermatology. 2015;40(5):489-94. Epub 2015/02/24.
87. Lin CB, Hu Y, Rossetti D, Chen N, David C, Slominski A, *et al.* Immuno-histochemical evaluation of solar lentigines: The association of KGF/KGFR and other factors with lesion development. Journal of dermatological science. 2010;59(2):91-7. Epub 2010/07/14.

88. Delattre C, Winstall E, Lessard C, Donovan M, Simonetti L, Minondo AM, *et al.* Proteomic analysis identifies new biomarkers for postmenopausal and dry skin. Experimental dermatology. 2012;21(3):205-10. Epub 2012/03/03.
89. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. Journal of cellular physiology. 2000;182(3):311-22. Epub 2000/02/01.
90. Dos Santos M, Metral E, Boher A, Rousselle P, Thepot A, Damour O. In vitro 3-D model based on extending time of culture for studying chronological epidermis aging. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. 2015;47:85-97. Epub 2015/04/04.
91. Aoki H, Moro O, Tagami H, Kishimoto J. Gene expression profiling analysis of solar lentigo in relation to immunohistochemical characteristics. The British journal of dermatology. 2007;156(6):1214-23. Epub 2007/04/11.
92. Unver N, Freyschmidt-Paul P, Horster S, Wenck H, Stab F, Blatt T, *et al.* Alterations in the epidermal-dermal melanin axis and factor XIIIa melanophages in senile lentigo and ageing skin. The British journal of dermatology. 2006;155(1):119-28. Epub 2006/06/24.
93. Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y, Date Y, Arima M, Yagami A, *et al.* Comprehensive analysis of melanogenesis and proliferation potential of melanocyte lineage in solar lentigines. Journal of dermatological science. 2014;73(3):251-7.
94. Cario-Andre M, Lepreux S, Pain C, Nizard C, Noblesse E, Taieb A. Perilesional vs. lesional skin changes in senile lentigo. Journal of cutaneous pathology. 2004;31(6):441-7. Epub 2004/06/10.
95. Tigges J, Krutmann J, Fritsche E, Haendeler J, Schaal H, Fischer JW, *et al.* The hallmarks of fibroblast ageing. Mechanisms of ageing and development. 2014;138:26-44. Epub 2014/04/02.
96. Naylor EC, Watson RE, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. Maturitas. 2011;69(3):249-56.
97. . !!! INVALID CITATION !!!
98. Mine S, Fortunel NO, Pageon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. PloS one. 2008;3(12):e4066. Epub 2008/12/31.
99. Pollefliet C, Corstjens H, Gonzalez S, Hellemans L, Declercq L, Yarosh D. Morphological characterization of solar lentigines by in vivo reflectance confocal microscopy: a longitudinal approach. International journal of cosmetic science. 2013;35(2):149-55. Epub 2012/10/19.
100. Kovacs D, Cardinali G, Aspite N, Cota C, Luzi F, Bellei B, *et al.* Role of fibroblast-derived growth factors in regulating hyperpigmentation of solar lentigo. The British journal of dermatology. 2010;163(5):1020-7. Epub 2010/07/29.
101. Salducci M, Andre N, Guere C, Martin M, Fitoussi R, Vie K, *et al.* Factors secreted by irradiated aged fibroblasts induce solar lentigo in pigmented reconstructed epidermis. Pigment cell & melanoma research. 2014;27(3):502-4. Epub 2014/02/19.
102. El Assar M, Angulo J, Vallejo S, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF, Rodriguez-Manas L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. Frontiers in physiology. 2012;3:132. Epub 2012/07/12.
103. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. Steroids. 2004;69(8-9):537-42. Epub 2004/08/04.
104. Charkoudian N, Stachenfeld N. Sex hormone effects on autonomic mechanisms of thermoregulation in humans. Autonomic neuroscience : basic & clinical. 2015. Epub 2015/12/18.
105. Iriyama S, Ono T, Aoki H, Amano S. Hyperpigmentation in human solar lentigo is promoted by heparanase-induced loss of heparan sulfate chains at the dermal-epidermal junction. Journal of dermatological science. 2011;64(3):223-8. Epub 2011/10/19.
106. Goncharova Y, Attia EA, Souid K, Vasilenko IV. Dermoscopic features of facial pigmented skin lesions. ISRN dermatology. 2013;2013:546813. Epub 2013/02/23.
107. Akay BN, Bozkir M, Anadolu Y, Gullu S. Epidemiology of vitiligo, associated autoimmune diseases and audiological abnormalities: Ankara study of 80 patients in Turkey. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 2010;24(10):1144-50. Epub 2010/03/06.
108. Chen N, Hu Y, Li WH, Eisinger M, Seiberg M, Lin CB. The role of keratinocyte growth factor in melanogenesis: a possible mechanism for the initiation of solar lentigines. Experimental dermatology. 2010;19(10):865-72. Epub 2009/09/29.

109. Motokawa T, Kato T, Katagiri T, Matsunaga J, Takeuchi I, Tomita Y, *et al.* Messenger RNA levels of melanogenesis-associated genes in lentigo senilis lesions. Journal of dermatological science. 2005;37(2):120-3.
110. Kadono S, Manaka I, Kawashima M, Kobayashi T, Imokawa G. The role of the epidermal endothelin cascade in the hyperpigmentation mechanism of lentigo senilis. The Journal of investigative dermatology. 2001;116(4):571-7. Epub 2001/04/05.
111. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. BioFactors. 2009;35(2):193-9. Epub 2009/05/19.
112. Yaar M, Gilchrest BA. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. The British journal of dermatology. 2007;157(5):874-87. Epub 2007/08/23.
113. Hattori H, Kawashima M, Ichikawa Y, Imokawa G. The epidermal stem cell factor is over-expressed in lentigo senilis: implication for the mechanism of hyperpigmentation. The Journal of investigative dermatology. 2004;122(5):1256-65. Epub 2004/05/14.
114. Cardinali G, Kovacs D, Picardo M. Mechanisms underlying post-inflammatory hyperpigmentation: lessons from solar lentigo. Annales de dermatologie et de venereologie. 2012;139 Suppl 4:S148-52. Epub 2013/04/03.
115. Shamis Y, Silva EA, Hewitt KJ, Brudno Y, Levenberg S, Mooney DJ, *et al.* Fibroblasts derived from human pluripotent stem cells activate angiogenic responses in vitro and in vivo. PloS one. 2013;8(12):e83755. Epub 2014/01/05.
116. Hasegawa K, Fujiwara R, Sato K, Shin J, Kim SJ, Kim M, *et al.* Possible Involvement of Keratinocyte Growth Factor in the Persistence of Hyperpigmentation in both Human Facial Solar Lentigines and Melasma. Annals of dermatology. 2015;27(5):626-9. Epub 2015/10/30.
117. Bastiaens M, Hoefnagel J, Westendorp R, Vermeer BJ, Bouwes Bavinck JN. Solar lentigines are strongly related to sun exposure in contrast to ephelides. Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society. 2004;17(3):225-9. Epub 2004/05/14.
118. Monestier S, Gaudy C, Gouvernet J, Richard MA, Grob JJ. Multiple senile lentigos of the face, a skin ageing pattern resulting from a life excess of intermittent sun exposure in dark-skinned caucasians: a case-control study. The British journal of dermatology. 2006;154(3):438-44. Epub 2006/02/01.
119. Goorochurn R, Viennet C, Granger C, Fanian F, Varin-Blank N, Le Roy C, *et al.* Biological processes in solar lentigo: insights brought by experimental models. Experimental dermatology. 2016. Epub 2016/01/08.
120. Kim JS, Nam CH, Kim JY, Gye JW, Hong SP, Kim MH, *et al.* Objective Evaluation of the Effect of Q-Switched Nd:YAG (532 nm) Laser on Solar Lentigo by Using a Colorimeter. Annals of dermatology. 2015;27(3):326-8. Epub 2015/06/18.
121. Sainthillier JM, Mac-Mary S, Humbert P. [Digital photography as a scientific tool]. Annales de dermatologie et de venereologie. 2009;136 Suppl 6:S280-6. Epub 2010/01/14. La photographie numerique: un outil scientifique.
122. Pande SY, Misri R. Sebumeter. Indian journal of dermatology, venereology and leprology. 2005;71(6):444-6. Epub 2006/01/06.
123. Mac-Mary S, Creidi P, Marsaut D, Courderot-Masuyer C, Cochet V, Gharbi T, *et al.* Assessment of effects of an additional dietary natural mineral water uptake on skin hydration in healthy subjects by dynamic barrier function measurements and clinic scoring. Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin. 2006;12(3):199-205. Epub 2006/07/11.
124. Petitjean A, Sainthillier JM, Mac-Mary S, Muret P, Closs B, Gharbi T, *et al.* Skin radiance: how to quantify? Validation of an optical method. Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin. 2007;13(1):2-8. Epub 2007/01/26.
125. Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter(R), the DermaSpectrometer(R) and the Mexameter(R). Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin. 2000;6(4):230-8. Epub 2001/06/29.
126. Chardon A, Cretois I, Hourseau C. Skin colour typology and suntanning pathways. International journal of cosmetic science. 1991;13(4):191-208. Epub 1991/08/01.

127. Tagami H. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. International journal of cosmetic science. 2008;30(6):413-34. Epub 2008/12/23.
128. Firooz A, Sadr B, Babakoohi S, Sarraf-Yazdy M, Fanian F, Kazerouni-Timsar A, *et al.* Variation of biophysical parameters of the skin with age, gender, and body region. TheScientificWorldJournal. 2012;2012:386936. Epub 2012/04/27.
129. Speeckaert R, Van Gele M, Speeckaert MM, Lambert J, van Geel N. The biology of hyperpigmentation syndromes. Pigment cell & melanoma research. 2014;27(4):512-24. Epub 2014/03/13.
130. Liu Y, Sheikh MS. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. Molecular and cellular pharmacology. 2014;6(3):228. Epub 2014/01/01.
131. Del Bino S, Ito S, Sok J, Nakanishi Y, Bastien P, Wakamatsu K, *et al.* Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio. Pigment cell & melanoma research. 2015;28(6):707-17. Epub 2015/08/19.
132. Kasprzak JM, Xu YG. Diagnosis and management of lentigo maligna: a review. Drugs in context. 2015;4:212281. Epub 2015/06/18.
133. Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, *et al.* Main roads to melanoma. Journal of translational medicine. 2009;7:86. Epub 2009/10/16.
134. Sappino AP, Schurch W, Gabbiani G. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1990;63(2):144-61. Epub 1990/08/01.
135. Stricker J, Falzone T, Gardel ML. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. Journal of biomechanics. 2010;43(1):9-14.
136. Dugina V, Alexandrova A, Chaponnier C, Vasiliev J, Gabbiani G. Rat fibroblasts cultured from various organs exhibit differences in alpha-smooth muscle actin expression, cytoskeletal pattern, and adhesive structure organization. Experimental cell research. 1998;238(2):481-90. Epub 1998/03/14.
137. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. Molecular biology of the cell. 2001;12(9):2730-41. Epub 2001/09/13.
138. Viennet C, Bride J, Armbruster V, Aubin F, Gabiot AC, Gharbi T, *et al.* Contractile forces generated by striae distensae fibroblasts embedded in collagen lattices. Archives of dermatological research. 2005;297(1):10-7. Epub 2005/05/11.
139. Maeshige N, Terashi H, Aoyama M, Torii K, Sugimoto M, Usami M. Effect of ultrasound irradiation on alpha-SMA and TGF-beta1 expression in human dermal fibroblasts. The Kobe journal of medical sciences. 2011;56(6):E242-52. Epub 2011/09/23.
140. Tsukamoto H, Mishima Y, Hayashibe K, Sasase A. Alpha-smooth muscle actin expression in tumor and stromal cells of benign and malignant human pigment cell tumors. The Journal of investigative dermatology. 1992;98(1):116-20. Epub 1992/01/01.
141. Li W, Fan J, Chen M, Woodley DT. Mechanisms of human skin cell motility. Histology and histopathology. 2004;19(4):1311-24. Epub 2004/09/18.
142. Goyarts E, Muizzuddin N, Maes D, Giacomoni PU. Morphological changes associated with aging: age spots and the microinflammatory model of skin aging. Annals of the New York Academy of Sciences. 2007;1119:32-9. Epub 2007/12/07.
143. Cardinali G, Kovacs D, Picardo M. [Mechanisms underlying post-inflammatory hyperpigmentation: lessons from solar lentigo]. Annales de dermatologie et de venereologie. 2012;139 Suppl 3:S96-101. Epub 2012/12/25. Mecanismes de l'hyperpigmentation post-inflammatoire: ce que le lentigo actinique nous a appris.
144. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature. 1992;359(6397):693-9. Epub 1992/10/22.
145. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. Nature reviews Cancer. 2003;3(11):807-21. Epub 2003/10/15.
146. Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, Watabe H, Rouzaud F, Yasumoto K, *et al.* Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in

keratinocytes. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2008;22(4):1009-20. Epub 2007/11/07.
147. Choi W, Kolbe L, Hearing VJ. Characterization of the bioactive motif of neuregulin-1, a fibroblast-derived paracrine factor that regulates the constitutive color and the function of melanocytes in human skin. Pigment cell & melanoma research. 2012;25(4):477-81. Epub 2012/04/13.
148. Shishido E, Kadono S, Manaka I, Kawashima M, Imokawa G. The mechanism of epidermal hyperpigmentation in dermatofibroma is associated with stem cell factor and hepatocyte growth factor expression. The Journal of investigative dermatology. 2001;117(3):627-33. Epub 2001/09/21.
149. Kihira C, Mizutani H, Asahi K, Hamanaka H, Shimizu M. Increased cutaneous immunoreactive stem cell factor expression and serum stem cell factor level in systemic scleroderma. Journal of dermatological science. 1998;20(1):72-8. Epub 1999/05/26.
150. Okazaki M, Yoshimura K, Suzuki Y, Uchida G, Kitano Y, Harii K, *et al.* The mechanism of epidermal hyperpigmentation in cafe-au-lait macules of neurofibromatosis type 1 (von Recklinghausen's disease) may be associated with dermal fibroblast-derived stem cell factor and hepatocyte growth factor. The British journal of dermatology. 2003;148(4):689-97. Epub 2003/05/20.
151. Cardinali G, Kovacs D, Giglio MD, Cota C, Aspite N, Amantea A, *et al.* A kindred with familial progressive hyperpigmentation-like disorder: implication of fibroblast-derived growth factors in pigmentation. European journal of dermatology : EJD. 2009;19(5):469-73. Epub 2009/06/10.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Brevets

Cytokines et facteurs de croissance du Solar Lentigo, Goorochurn R. & Le Roy C. (co-inventeurs), avis favorable des comités Inserm-Transfert et de la SATT IDF Innov à la demande de dépôt de brevet (en cours de dépôt).

Composition cosmétique et/ou dermatologique comprenant un extrait végétal et un activateur de gènes, Goorochurn R., n°1454793.

Composition cosmétique et dermatologique revitalisante, Goorochurn R. & Allart JC., FR2985183.

Publications

Biological process in solar lentigo: a look on experimental models, Goorochurn R., Viennet C., Granger C., Fanian F., Varin-Blank N., Le Roy C. *and Humbert P.* *co-corresponding authors, Viewpoint (en presse).

Morphological and functional characterizations of fibroblats extracted from solar lentigo, Goorochurn R.*, Viennet C.*, Tissot M. , Locatelli F. , Granger C., Varin-Blank N. , Humbert P.** and Le Roy C.** *co-authors **co-corresponding authors, Article Original (soumis)

Communications affichées en congrès

Functional characterization and biomarkers of solar lentigo extracted-primary fibroblasts, Goorochurn R. *et al.*, The **Young Researchers in Life Science**.

Functional characterization and biomarkers of solar lentigo extracted-primary fibroblasts, Goorochurn R. *et al.*, Institut Fédératif de Recherche Biomédicale de l'Université Paris 13 **(IFRB)**

ANNEXES

ANNEXE 1: Composition cosmétique et dermatologique revitalisante

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** **2 985 183**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **11 62565**

(51) Int Cl[8] : ***A 61 K 8/97*** *(2013.01), A 61 K 36/00, A 61 Q 19/08, A 61 P 17/00*

(12) **BREVET D'INVENTION** **B1**

(54) COMPOSITION COSMETIQUE ET DERMATOLOGIQUE REVITALISANTE.

(22) **Date de dépôt :** 30.12.11.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 05.07.13 Bulletin 13/27.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 06.06.14 Bulletin 14/23.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :**

Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *DERMANCE* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** GOOROCHURN RANESHA et ALLART JEAN CLAUDE.

(73) **Titulaire(s) :** DERMANCE.

(74) **Mandataire(s) :** IPSILON - BREMA-LOYER Société par actions simplifiée.

FR 2 985 183 - B1

La présente invention concerne une nouvelle composition à propriétés revitalisantes de la peau, et plus particulièrement une nouvelle composition cosmétique et/ou dermatologique associant un exfoliant et un masque, permettant de revitaliser efficacement des peaux matures.

La peau constitue une barrière anatomique vivante et une zone d'échange entre le corps et son environnement, dont l'efficacité conditionne le maintien d'un bon équilibre homéostasique. La peau est un véritable organe comprenant plusieurs couches intégrées, allant de la couche superficielle, l'épiderme, jusqu'aux couches plus profondes, le derme et l'hypoderme, où chacune de ces couches remplit des fonctions permettant à l'ensemble de réagir et de s'adapter à son environnement.

L'épiderme principalement composé de kératinocytes (90% des cellules épidermiques) qui synthétisent la kératine, de mélanocytes et des cellules de Langerhans, a une épaisseur variable selon les différentes parties du corps, et constitue la couche externe de la peau pour assurer la protection du corps vis-à-vis de son environnement extérieur.

Le derme est la couche la plus épaisse, traversées par des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins, se composant principalement de collagène, d'élastine, de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes, principalement synthétisés par les fibroblastes dermiques. Les fibres de collagène assurent la résistance mécanique et la texture de la peau, l'élastine est responsable de son élasticité, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes jouent un rôle majeur de structure et d'hydratation de la peau. La couche la plus profonde de la peau forme l'hypoderme, contenant les adipocytes qui produisent des lipides assurant la formation d'une couche grasse protégeant les muscles, les os et les organes internes contre les chocs.

La jonction dermo-épidermique est la zone de rattachement de l'épiderme au derme, en particulier par le réseau de fibres de collagène, qui contrôle les échanges entre ces deux

couches. Elle constitue le support des kératinocytes lors du processus de cicatrisation.

L'épiderme humain présente la particularité de se renouveler complètement en l'espace de 4 à 6 semaines environ, et ce renouvellement des cellules se réalise de la couche basale épidermique où le kératinocyte se divise pour migrer en se différenciant, vers la surface de l'épiderme où, transformé en cornéocyte suivant un processus de cornéification, il finit par s'éliminer à la surface de la peau. Dans une peau saine, un équilibre entre prolifération et désquamation permet d'assurer à l'épiderme le maintien de son architecture et une fonction barrière efficace.

De nombreux facteurs exerçant un effet de stimulation ou au contraire d'inhibition, participent à la régulation de cet équilibre. Ainsi le derme joue son rôle de support, et d'autres éléments interviennent tels que les facteurs de croissance (EGF, TGF, KGF) et le calcium extra-cellulaire, les cytokines, le statut hormonal, des vitamines (A et D). Il en résulte une parfaite harmonie dont l'exfoliation naturelle est un des éléments importants.

Cet équilibre se traduit dans une peau en bonne santé par une peau lisse, douce et souple, avec un teint clair.

La peau se dégrade avec le temps et ce vieillissement de la peau peut être intrinsèque, c'est-à-dire chrono-biologique, ou extrinsèque c'est-à-dire provoqué par l'environnement, y compris les agressions climatiques, comme la pollution, le tabagisme, l'exposition au soleil et les variations de températures, qui peuvent contribuer à accélérer la dégradation du collagène du derme. L'utilisation de produits lavants ou moussants agressifs peut aussi contribuer à dégrader la peau et accentuer les effets du vieillissement chrono-biologique.

Les premiers signes du vieillissement de la peau, tels que les rides et ridules, sont généralement provoqués par le stress et les changements biologiques et physiologiques,

accélérés par les modes de vie ou par l'environnement. L'apparition de marques pigmentaires, la diminution de l'épaisseur de la peau, sa perte d'élasticité et son affaissement sont également des changements observés au cours du vieillissement. On sait que la capacité de la peau à remplacer le collagène endommagé diminue avec le temps, et en conséquence des espaces et des irrégularités apparaissent dans le réseau du collagène. Au niveau de l'épiderme on observe une désquamation de plus en plus irrégulière par dysfonctionnement du système enzymatique assurant la disparition des cornéosomes, et une désorganisation progressive de la structure stratifiée compacte, aggravée par la moindre capacité des kératinocytes à proliférer et à migrer vers la surface.

Ainsi, en vieillissant, la peau se fragilise progressivement, ce qui entraîne des modifications dans ses capacités intrinsèques de protection et dans son apparence. Son teint devient terne, sa surface n'est plus homogène, la microcirculation épidermique est ralentie, l'hydratation est perturbée et l'épaisseur du derme se réduit.

De nombreuses études ont été consacrées au traitement et à la prévention des signes du vieillissement cutané, afin de mettre au point des compositions dermatologiques ou cosmétiques susceptibles de favoriser la restructuration tissulaire, et en particulier la néosynthèse d'éléments constitutifs de la peau comme le collagène, les glycosaminoglycannes (GAGs) et les protéoglycannes (PGs) de la matrice extracellulaire.

Diverses compositions ont été mises au point dans l'état de la technique, et par exemple le brevet FR-A-2.761.607 décrit une composition dermatologique destinée au traitement des symptômes du vieillissement de la peau, comportant un dérivé de silanol méthylé et un dérivé d'une protéine végétale hydrolysée, additionnée le cas échéant d'un dérivé de vitamine C. L'utilisation de pentapeptides du type Lys-Thr-Thr-Lys-Ser dans des compositions topiques a été proposée suivant le brevet FR-A-2.783.169, pour favoriser la synthèse du collagène

et des glycosaminoglycannes, et par conséquent la régénération cutanée.

Depuis de nombreuses années on a aussi proposé d'utiliser des compositions contenant des substances à action exfoliante comme les alpha-hydroxy acides, par exemple l'acide lactique, l'acide glycolique, l'acide mandélique, l'acide tartrique et l'acide malique, pour faciliter l'élimination des cellules mortes et stimuler la formation de collagène et d'élastine. Ces acides faibles ont une action variable en fonction notamment de leur concentration et de la durée d'utilisation. Ils entraînent une désquamation superficielle et le renouvellement cellulaire de l'épiderme. Cependant, ils peuvent provoquer des réactions épidermiques importantes telles que des érythèmes inflammatoires, et être mal supportés par les utilisateurs.

On a aussi proposé d'utiliser des acides bêta-hydroxylés, en particulier l'acide salicylique, qui peuvent provoquer un ramollissement de la couche cornée et une solubilisation du cément intercellulaire, entraînant une perte de cohésion intercornéocytaire et une désquamation. Toutefois, l'utilisation de l'acide salicylique aux concentrations efficaces comporte des risques, notamment de kératolyse, et doit se faire sous contrôle médical.

On peut aussi provoquer une exfoliation au moyen de compositions à base d'acide trichloracétique, de résorcine ou de phénol, mais ces compositions entraînent une exfoliation profonde et leur utilisation doit être étroitement contrôlée.

Outre les méthodes d'exfoliation chimiques ci-dessus, on connaît aussi des méthodes mécaniques consistant à frotter physiquement la peau au moyen d'une matière abrasive de manière à provoquer l'élimination des couches superficielles de l'épiderme (dermabrasion). On a ainsi proposé l'utilisation de poudre de noyaux d'abricot, de pierre ponce, de cristaux de sel, d'éponge végétale, etc. Cependant, ces méthodes mécaniques peuvent non seulement provoquer une dégradation mécanique

de la couche superficielle de la peau mais aussi une inflammation.

Outre la dermabrasion, on a aussi proposé des implants de collagène et d'acide hyaluronique pour dissimuler les lignes d'expression autour des yeux ou de la bouche, la chirurgie esthétique, telle que la blépharoplastie (chirurgie des paupières) ou un lifting pour retendre une peau présentant un affaissement, ou encore une restructuration à l'aide d'un laser au dioxyde de carbone pour éliminer les ridules. Ces méthodes sont agressives pour la peau et ne peuvent être utilisées que sous contrôle médical.

Pour contourner ces difficultés, des méthodes d'exfoliation enzymatique ont été proposées, qui peuvent présenter quelques avantages comme une bonne sécurité à l'usage et une efficacité satisfaisante sans sensibilisation de la peau. En effet, on sait que plusieurs protéases exprimées dans la couche cornée semblent jouer un rôle important dans la désquamation des couches superficielles de la peau.

Toutefois, les enzymes comme les protéases ou glycosidases ont généralement une stabilité médiocre dans un milieu aqueux. On a ainsi proposé d'utiliser une enzyme telle que la papaïne, en la stabilisant comme dans la demande de brevet WO 0166066 où elle est liée à un acide polyacrylique à haut poids moléculaire. L'utilisation d'enzymes en combinaison avec des exfoliants classiques tels que des hydroxy-acides a aussi été décrite, comme par exemple dans WO 9747283 et WO 0222102.

Cependant, malgré les diverses compositions dermatologiques et/ou cosmétiques disponibles, il existe toujours un besoin de pouvoir disposer de nouvelles compositions topiques alternatives permettant de lutter efficacement contre les effets du vieillissement cutané.

Les études effectuées par la demanderesse ont permis de mettre au point une nouvelle méthode et une composition adaptée, procurant une meilleure vitalité immédiate de la peau et renforçant l'efficacité de soins ciblés classiques. Cette

méthode est fondée sur la synergie d'action de deux actifs topiques appliqués successivement dans un ordre déterminé. Ainsi, il est possible de modifier dans un premier temps les paramètres de la surface de la peau par une action ciblée sur les mécanismes de l'exfoliation naturelle afin d'optimiser, dans un second temps, l'efficacité d'actifs vectorisés dans un support adapté.

L'objet de la présente invention est donc de mettre au point une nouvelle composition topique possédant des propriétés revitalisantes permettant de régénérer efficacement une peau mature présentant des premiers signes de vieillissement cutané se manifestant par une diminution des paramètres de vitalité de la peau, à savoir l'hydratation, l'oxygénation, la nutrition, la tonicité, la fermeté et l'éclat du teint.

Cet objet est atteint suivant l'invention par l'utilisation d'une composition topique associant successivement au moins un actif stimulant l'exfoliation naturelle de la peau et au moins un actif stimulant l'énergie mitochondriale et renforçant les structures dermo-épidermiques.

La présente invention a pour objet une composition cosmétique et dermatologique, associant au moins une composition à action enzymatique exfoliante et au moins un actif cosmétologique présent dans un masque rinçable applicable sur la peau.

La présente invention a encore pour objet une composition comprenant au moins une composition à action enzymatique exfoliante et un masque rinçable applicable sur la peau contenant au moins un actif cosmétologique, en association, pour utilisation dans le traitement des peaux matures.

Enfin, la présente invention a pour objet un procédé de traitement cosmétique de la peau, comprenant au moins l'application d'une composition à action enzymatique exfoliante et d'un masque cosmétique, séquentiellement, ainsi qu'un kit de traitement cosmétique des signes du vieillissement cutané comprenant au moins une composition à action enzymatique

exfoliante et un masque rinçable applicable sur la peau contenant au moins un actif cosmétologique.

L'actif stimulant l'exfoliation naturelle de la peau peut être un exfoliant enzymatique ou un agent stimulant l'action des enzymes naturels de désquamation.

Suivant une forme avantageuse de réalisation, la composition de l'invention comprend en outre un ou plusieurs actifs complémentaires susceptibles de renforcer ou compléter l'effet régénérant sur les cellules épidermiques.

Une telle composition est utile en cosmétique et en dermatologie humaine pour les soins des peaux matures, pour masquer et atténuer les signes du vieillissement cutané, afin de redonner à la peau ses paramètres de vitalité à savoir l'hydratation, l'oxygénation, la nutrition, la tonicité, la fermeté et l'éclat du teint, en une seule application, suivant un mode séquentiel déterminé. Elle est également utile en applications régulières, espacées dans le temps, par exemple une à trois fois par semaine pendant une période de quelques semaines, pour un entretien de la peau, voire une amélioration de ses paramètres de vitalité.

La composition et la méthode de traitement cosmétique de la présente invention sont tout particulièrement remarquables par la mise à disposition de deux compositions associées pour utilisation séquentielle dans un ordre déterminé, c'est-à-dire une composition à activité exfoliante enzymatique et un masque cosmétique contenant des actifs connus pour leur fonction d'amplification de l'énergie mitochondriale et renforcement des structures dermo-épidermiques.

La composition suivant l'invention est tout particulièrement destinée aux peaux matures, susceptibles de présenter les premiers signes du vieillissement cutané. Les caractéristiques des peaux matures peuvent être résumées dans le tableau ci-après.

	xérose	fermeté	laxité	rides	teint terne	traces pigment.	tissu s/c
Stade 1	+	+++	+	+	+	+	+ ou –
Stade 2	++	++	++	++	++	++	+
Stade 3	++++	+	+++	+++	++++	++	++++

Les symboles "+" à "++++" représentent la gradation de la caractéristique concernée. Cette classification en trois stades est fondée sur les paramètres de vitalité. En particulier, l'état de sécheresse, ou xérose, renseigne sur l'effet barrière, la kératinisation et l'hydratation de la peau. L'éclat du teint, plus ou moins terne, renseigne sur la microcirculation épidermique (nutrition et oxygénation) et la tonicité (laxité, fermeté). L'effet revitalisant de l'association de compositions suivant l'invention se traduit par une réduction des signes d'une peau mature tendant à la faire passer du Stade 3 vers le Stade 2, ou du Stade 2 vers le Stade 1, ou l'atténuation des signes de vieillissement cutané indiqués au tableau ci-dessus, dans le cas d'une peau mature de Stade 1.

La composition à activité exfoliante suivant la présente invention comprend généralement entre 0,1 et 15%, de préférence entre 1 et 10%, en poids d'exfoliant, par rapport au poids total de la composition exfoliante.

Les enzymes à action exfoliante utilisées dans la présente invention sont des protéases, ou des stimulants des processus enzymatiques des protéases, et de préférence des enzymes protéolytiques capables d'hydrolyser des liaisons peptidiques et de scinder une protéine en peptides, comme par exemple la papaïne, la trypsine, la chymotrypsine, la subtilisine, etc.

De telles enzymes à action exfoliante de même que des actifs stimulant leur action sont bien connus, et disponibles dans le commerce. Ainsi, suivant l'invention on peut utiliser des enzymes ou actifs stimulant les enzymes naturelles tels que subtilisine, protéase issue de Bacillus subtilis

(Sederma), Keratoline (Sederma) contenant une enzyme protéolytique obtenue par fermentation de Bacillus subtilis, Exfolactive EL® (Silab) contenant un extrait d'Opuntia ficus indica, X-Pressin® (BASF) qui est une papaïne stabilisée, ou Exo-T® (Unipex) qui stimule l'activité protéolytique de la kallicréine. Ces enzymes ou actifs stimulant les enzymes peuvent être utilisés isolément ou en combinaison.

Comme indiqué ci-dessus, la composition contenant l'enzyme à action exfoliante procure un gommage exfoliant qui évite toute irritation cutanée susceptible de provoquer une réaction inflammatoire. Cette composition de gommage exfoliant est appliquée sur la zone de la peau à traiter, par exemple le visage ou le cou, en une couche mince par léger massage circulaire pendant une période de 1 à 10 minutes environ, puis elle est éliminée par rinçage à l'eau, de préférence à l'eau tiède.

La deuxième composition de l'invention est alors appliquée sur la même zone de la peau sous forme de masque rinçable contenant un ou plusieurs actifs destinés à renforcer l'énergie mitochondriale et à renforcer les structures dermo-épidermiques. Cette deuxième composition sous forme de masque est appliquée en une couche épaisse, c'est-à-dire d'au moins 2 mm, et uniforme sur toute la zone à traiter, immédiatement après le rinçage de la composition de gommage exfoliant, et elle est maintenue sur la peau pendant une période pouvant être comprise entre 1 et 60 minutes, de préférence entre 5 et 15 minutes.

Au terme de cette période, la composition constituant le masque est éliminée par rinçage à l'eau, de préférence à l'eau tiède, sans utilisation de savon ou produit détergent.

La deuxième composition constituant un masque cosmétique contient au moins un actif dont l'action est potentialisée après l'application de la première composition. Ces actifs sont ceux connus pour leur fonction d'amplification de l'énergie mitochondriale, c'est-à-dire le métabolisme dermique, et de renforcement des structures dermo-épidermiques.

Les actifs du masque sont des substances capables de régénérer la peau, de rétablir son hydratation et d'entraîner l'intensification des réponses cellulaires. Ils peuvent être avantageusement choisis parmi des substances d'origine végétale telles qu'un extrait de Verbena officinalis, un extrait de lavande (Lavandula stoechas), un extrait d'huile de graines de tournesol (Helianthus anuus), un extrait de levure tel que Pichia anomala, ces substances étant connues pour leur effet de renforcement des structures épidermiques (fonction "barrière"). On peut aussi utiliser un extrait de maca (Lepidium meyenii W), un extrait d'algue tel que Alaria esculenta, Laminaria digitata, Chlorella vulgaris, Eugenia gracilis, un extrait d'Arnica montana ou encore une association de peptides et de protéines et d'extrait de pseudoalteromonas ferment, ayant une action d'amplification de l'énergie mitochondriale.

Ces actifs sont disponibles dans le commerce et par exemple on peut utiliser l'extrait de Verbena officinalis disponible sous la marque Vitalayer® (Silab), l'extrait de lavande disponible sous la marque Aroleat Lavanda (CODIF), l'extrait d'huile de tournesol disponible sous la marque Soline Bio (Expanscience), l'extrait de Pichia anomala disponible sous la marque Lipiskin (Silab) et l'extrait de levure disponible sous la marque Toniskin (Silab), l'extrait d'algue (Alaria esculenta) disponible sous la marque Kalpariane® (BiotechMarine), l'extrait d'algue (Laminaria digitata) disponible sous la marque Phycojuvenine (CODIF), l'extrait d'algue verte (Chlorella vulgaris) disponible sous la marque Dermochlorella (CODIF), l'extrait d'algue (Eugenia gracilis) disponible sous la marque Chronodyn (Sederma), l'extrait d'Arnica montana disponible sous la marque Phytelene (Greentech) et l'association de peptides et protéines disponible sous la marque Trylagen (Lipotec).

Le masque a pour fonction de contrôler le transfert de l'actif vers la couche cornée de l'épiderme, et donc de

libérer l'actif de manière contrôlée, en le partageant entre les composants du masque et ceux de la couche cornée, en particulier lipides cutanés et cornéocytes. Le coefficient de partage de l'actif présent dans le masque repose principalement sur ses caractéristiques de solubilité. Une fois libéré du masque, l'actif peut diffuser dans la couche cornée et se distribuer dans le tégument.

La forme galénique du masque est une caractéristique importante de la présente invention.

Les formes galéniques usuelles sont le "peel-off", le masque émulsion, et le masque rinçable. Le masque "peel-off" ou pelliculable est une formulation comprenant un gel acrylique liquide contenant les actifs et un agent de polymérisation, le mélange se faisant extemporanément, au moment de l'application sur la peau. Au contact de la peau, le mélange se solidifie sous forme de film semi-épais et souple, qui peut être enlevé par traction douce après le temps de pose choisi. Le masque émulsion st une formulation galénique où les actifs sont dispersés dans une émulsion huile-dans-eau ou eau-dans-huile enrichie en poudres minérales. La texture est adaptée pour une application en couche semi-épaisse sur la surface de la peau. La température cutanée a pour effet de modifier la fluidité permettant une pénétration complète des actifs au terme du temps de pose déterminé, sans nécessiter de rinçage.

Le masque rinçable est une formulation riche en agents minéraux (poudres et argiles diverses) dans un support hydrolipidique souple contenant les actifs. Après application en couche épaisse sur la zone de la peau à traiter, la perte d'eau au contact de la peau entraîne une solidification partielle procurant une liaison étroite avec le tégument. Ce masque est ensuite enlevé par rinçage au terme du temps de pose approprié.

Conformément à la présente invention, le masque utilisé est un masque rinçable. Ainsi, le changemetn de phase inter-

venant au contact de la peau suivi du rinçage a pour effet de faire pénétrer les actifs mais pas les excipients.

Les compositions selon l'invention peuvent contenir en outre des actifs secondaires renforçant ou complétant avantageusement l'activité de l'association de l'exfoliant et du masque, et compatibles, c'est-à-dire non susceptibles de réagir les uns sur les autres ou de masquer ou limiter leurs effets respectifs.

Les actifs secondaires peuvent être avantageusement choisis parmi, par exemple, un anti-oxydant tel que le sulforaphane, par exemple Detoxophane® (Mibelle), un stimulant de la mitochondrie, par exemple Chondricare® (Vincience) ou un détoxifiant cellulaire, par exemple Bioplasma FA® contenant un extrait de plancton (BiotechMarine).

Comme le montrent les résultats exposés ci-après, la composition de l'invention a une activité revitalisante de la peau. En effet, les études effectuées ont montré que les compositions suivant l'invention, appliquées séquentiellement, ont pour effet de rétablir les paramètres de vitalité de la peau en une seule application.

La composition exfoliante selon la présente invention peut se présenter sous toutes les formes galéniques usuelles pour une application topique externe. Elle peut se présenter par exemple sous forme de solution huileuse ou hydro-alcoolique, de dispersions, de sérums, de lingettes, de patchs à libération contrôlée, de gels (anhydres ou lipophiles), de pommades, de suspensions, de dispersions vésiculaires ioniques ou non ioniques, d'émulsions liquides ou semi-liquides (par exemple un lait), solide ou semi-solide. Les émulsions peuvent être du type huile dans eau (H/E) ou eau dans huile (E/H), par exemple des gels ou des crèmes.

Les excipients et supports utilisables pour la préparation de la composition conforme à la présente invention sont ceux couramment utilisés dans les préparations à usage cosmétique, et choisis en fonction de la forme d'adminis-

tration retenue. A titre d'exemple, on peut citer des conservateurs, des adoucissants, des gélifiants, des émulsionnants, des épaississants, ainsi que des parfums.

Les compositions peuvent contenir divers excipients et notamment des agents hydratants tels que la glycérine, le propylène glycol, le butylène glycol, le pentylène glycol, le sel de sodium de l'acide pyrrolidone carboxylique (sodium PCA), ainsi des associations de dérivés glucosiques à effet hydratant et restructurant comme le produit Aquaxyl® (xylityl-glucoside et anhydroxylytol et xylitol), et également des vitamines antioxydantes telles que la vitamine E, par exemple l'acétate de tocophérol, la vitamine C, ou des polyphénols naturels. On utilise des émulsionnants en fonction du type d'émulsion recherché, et par exemple un Polysorbate, un ester d'acide gras et de polyol oxyéthyléné ou non et par exemple un ester de sorbitane tel que le stéarate ou le laurate de sorbitane, ou des esters d'acide gras et de polyéthylène glycol tels que des dérivés d'acide stéarique comme le stéarate de glycérol, un stéarate de propylène glycol, un stéarate de polyéthylène glycol, un stéareth, un dérivé de polyglycérol ou encore un dérivé de sucrose (par exemple un ester) non éthoxylé. On peut aussi ajouter des émollients tels qu'un myristate ou palmitate d'isopropyle, des triglycérides d'acides gras l'alcool cétylique, le palmitate cétylique, l'octyldodécanol ou le beurre de karité qui présente aussi des propriétés calmantes et adoucissantes.

La composition de masque tout particulièrement contient avantageusement un gélifiant ou épaississant qui peut être choisi parmi les polyacrylamides (par exemple du type Carbopol), les copolymères acrylate/acide acrylique ou acrylamide/acide acrylamido propane sulfonique, des polyacrylamides, et par exemple un mélange de polyacrylamide, C13-14-isoparaffine et Laureth-7 (Sepigel 305®, Seppic), des dérivés de cellulose comme l'hydroxypropyl cellulose, des argiles ou des gommes naturelles comme la gomme de xanthane ou de

tragacanthe. Il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un gélifiant lipophile, compatible avec une émulsion à face externe huileuse, par exemple du talc, de l'amidon, de l'oxyde de zinc, du dioxyde titane, ou des argiles modifiées.

Les compositions conformes à la présente invention sont préparées par les techniques usuelles, en fonction de la forme d'administration choisie, les quantités voulues étant mélangées avec les supports et excipients, dans un milieu physiologiquement acceptable.

Par exemple, dans le cas d'une crème, on peut procéder par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse pour obtenir une émulsion huile dans eau, ou inversement pour préparer une émulsion eau dans huile, les principes actifs étant dans l'une ou l'autre phase.

Les exemples suivants illustrent l'invention plus en détail sans en limiter la portée. Dans tous les exemples de compositions qui suivent, les parties sont exprimées en poids, sauf indication contraire.

Exemple 1

On prépare, par un procédé usuel connu, une crème à usage topique ayant la composition indiquée ci-après.

Glycérine		18,00
Triéthylhexanoine		9,00
Extrait d'Opuntia ficus-indica		2,50
Acryloyldiméthyltaurate d'ammonium		1,80
Extrait de plancton		1,00
Beurre de karité		1,00
Pentylène glycol		1,00
Cellulose microcristallisée		0,20
Chlorphénésine		0,20
EDTA disodique		0,10
Parfums		0,10
Eau déminéralisée	qsp	100,00

L'extrait d'Opuntia ficus-indica utilisé dans cette composition est un actif exfoliant doux dans la forme disponible dans le commerce sous la marque Exfolactive EL® associant l'extrait hydrolysé, éthylhexylglycérine, phénoxy-éthanol et eau. L'extrait de plancton utilisé est un actif exfoliant doux disponible dans le commerce sous la marque Bioplasma FA® associant l'extrait de planton, butylène glycol et férulate d'arginine

Cette crème est appliquée sur la zone de la peau à traiter, par exemple le visage, le cou et le décolleté,

Après application pendant environ 5 minutes puis rinçage à l'eau tiède, on applique, sur la même zone de la peau, le masque cosmétique de composition indiquée ci-après.

Glycérine		5,00
Cetearyl alcohol & cetearyl glucoside		3,00
Myristyl alcohol & myristyl glucoside		2,00
Octyldodécanol		3,00
Extrait de Verbena officinalis (Vitalayer)		3,00
Beurre de karité		2,00
Pentylène glycol		1,00
Extrait d'Alaria esculenta		1,00
Alcool cétéarylique		0,50
Polyacrylate de sodium		0,50
Stéaroyl glutamate de sodium		0,30
Acrylate/C10-30 alkylacrylate crosspolymer		0,20
Chlorphénésine		0,20
Gomme de xanthane		0,10
EDTA disodique		0,10
Parfums		0,10
Eau déminéralisée	qsp	100,00

Ce masque est appliqué sur la peau pendant une période de 1 à 60 minutes, le plus généralement pendant 5 à 15 minutes, puis il est rincé abondamment à l'eau tiède, sans savon ni produit détergent.

L'extrait de Verbena officinalis utilisé dans la composition du masque ci-dessus peut être celui disponible dans le commerce sous la marque Vitalayer® (Silab) où l'extrait est stabilisé par de l'éthylhexylglycérine et du phénoxyéthanol. L'extrait d'algue (Alaria esculenta) peut être celui disponible dans le commerce sous la marque Kalpariane® (BiotechMarine) où il est dans un solvant constitué par un triglycéride caprylique / caprique.

Exemple 2

L'étude de l'effet de l'association utilisée dans la présente invention sur la revitalisation de la peau a été faite sur 15 volontaires répartis en trois groupes.

Groupe A : gommage

Groupe B : masque

Groupe C : Gommage + Masque

Les personnes du groupe A reçoivent seulement l'application d'une composition de gommage exfoliant tandis que celles du groupe B ne reçoivent que la composition du masque. Les personnes du groupe C reçoivent successivement le gommage exfoliant puis le masque.

Des mesures ont été faites immédiatement avant application de la composition exfoliante (T0), puis après application de la composition exfoliante puis du masque (T0 + 30 min) afin d'évaluer les caractéristiques de mouillabilité, d'éclat du teint, de microcirculation et de désquamation.

Une évaluation de l'hydratation a aussi été faite par mesure de la mouillabilité et de la cornéométrie à T0, T0 + 30 min, et T0 + 4h.

La mouillabilité correspond à l'état de surface de la peau (hydrophobie/hydrophilie). L'influence de l'équilibre hydrophobe/hydrophile de la peau sur le coefficient de friction est constatée et l'effet de la modification de la surface sur ce coefficient est corrélé avec sa mouillabilité. On en déduit l'appréciation de l'état du stratum corneum.

L'état du teint est évalué par un glossymètre, ce qui permet d'apprécier l'état de santé de la peau, c'est-à-dire l'oxygénation, la nutrition de la peau et la réflexion de la lumière sur la peau.

L'indice de désquamation est évalué par la technique D'squame® qui permet de quantifier les cellules mortes, et donc de juger de la qualité de l'exfoliation.

La qualité de la microcirculation est évaluée par vidéo capillaroscopie, ce qui renseigne sur le drainage et l'apport d'oxygène et de nutriments.

Enfin, la cornéométrie est utilisée pour évaluer l'hydratation des couches superficielles de la peau. Cette méthode est fondée sur la relation existant entre les propriétés électriques des tissus et leur contenu en eau. Une variation d'hydratation de la couche cornée cutanée a pour conséquence une modification de la capacitance totale du système.

Les diagrammes joints représentent:

Fig. 1 : Glossymètre (DSC)

Fig. 2 : Désquamation (DI)

Fig. 3 : Désquamation (scaling index)

Fig. 4 : Hydratation

Fig. 5 : Sébum

Fig. 6 : Densité capllaire (capillaroscopie)

La mesure du glossymètre DSC (Diffusion Scattering Correction) est une mesure corrigée écartant l'influence de la couleur de la peau.

Le diagramme de désquamation DI (Desquamation Index) de la Fig. 2 montre que la composition de l'invention (masque + gommage) a une action nette sur la désquamation, tandis que le Scaling Index (Fig. 3) montre l'effet régulateur de l'application de l'association gommage + masque de l'invention par comparaison avec le gommage et l'exfoliant isolément, se traduisant par une cinétique d'action renforçant l'effet barrière.

Le diagramme d'hydratation (Fig. 4) confirme que le masque isolément n'a pas d'action sur l'hydratation tandis que l'action hydratante de l'association de l'invention est optimisée.

L'étude du sébum (Fig. 5) montre que l'association de l'invention réduit significativement le taux de sébum, procurant ainsi un effet matifiant.

Enfin l'étude de la densité capillaire (Fig. 6) met en évidence une réduction de la densité capillaire, témoignant de l'effet apaisant de l'association de l'invention sur la peau du fait de l'atrophie dermo-épidermique.

Les diagrammes joints montrent clairement qu'une application unique de la composition exfoliante suivie du masque, conformément à l'invention, procure :

- une amélioration significative des paramètres de vitalité de la peau mise en évidence par le glossymètre.
- une action rapide, constatée après une seule application.
- une action significativement supérieure à celles de l'exfoliant et du masque utilisés isolément.

Ces résultats montrent que l'association de l'invention est efficace dans le traitement des peaux matures afin de les revitaliser.

REVENDICATIONS

1. Composition cosmétique topique, comprenant en association au moins une composition à action enzymatique exfoliante et au moins un actif cosmétologique connu pour sa fonction d'amplification de l'énergie mitochondriale et de renforcement des structures dermo-épidermiques présent dans un masque rinçable applicable sur la peau.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition à action enzymatique exfoliante comprend au moins un exfoliant enzymatique ou un agent stimulant l'action des enzymes naturels de désquamation.

3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce l'exfoliant enzymatique est choisi parmi des enzymes protéolytiques, capables d'hydrolyser des liaisons peptidiques et de scinder une protéine en peptides.

4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'enzyme est choisie parmi la papaïne, la trypsine, la chymotrypsine, la subtilisine.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition à action enzymatique exfoliante comprend entre 0,1 et 15%, de préférence entre 1 et 10%, en poids d'exfoliant, par rapport au poids total de la composition exfoliante.

6. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce l'actif présent dans le masque est choisi parmi un extrait de Verbena officinalis, un extrait de lavande (Lavandula stoechas), un extrait d'huile de graines de tournesol (Helianthus anuus), un extrait de levure tel que Pichia anomala.

7. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce l'actif présent dans le masque est choisi parmi un extrait de maca (Lepidium meyenii W), un extrait d'algue tel que Alaria esculenta, Laminaria digitata, Chlorella vulgaris, Eugenia gracilis, un extrait d'Arnica montana.

8. Composition topique comprenant au moins une composition à action enzymatique exfoliante et un masque rinçable applicable sur la peau contenant au moins un actif cosmétologique connu pour sa fonction d'amplification de l'énergie mitochondriale et de renforcement des structures dermo-épidermiques, en association, pour utilisation dans le traitement des peaux matures.

9. Procédé de traitement cosmétique de la peau, comprenant au moins l'application d'une composition à action enzymatique exfoliante et d'un masque cosmétique contenant au moins un actif cosmétologique connu pour sa fonction d'amplification de l'énergie mitochondriale et de renforcement des structures dermo-épidermiques, séquentiellement.

10. Kit de traitement cosmétique des signes du vieillissement cutané comprenant au moins une composition à action enzymatique exfoliante et un masque rinçable applicable sur la peau contenant au moins un actif cosmétologique connu pour sa fonction d'amplification de l'énergie mitochondriale et de renforcement des structures dermo-épidermiques.

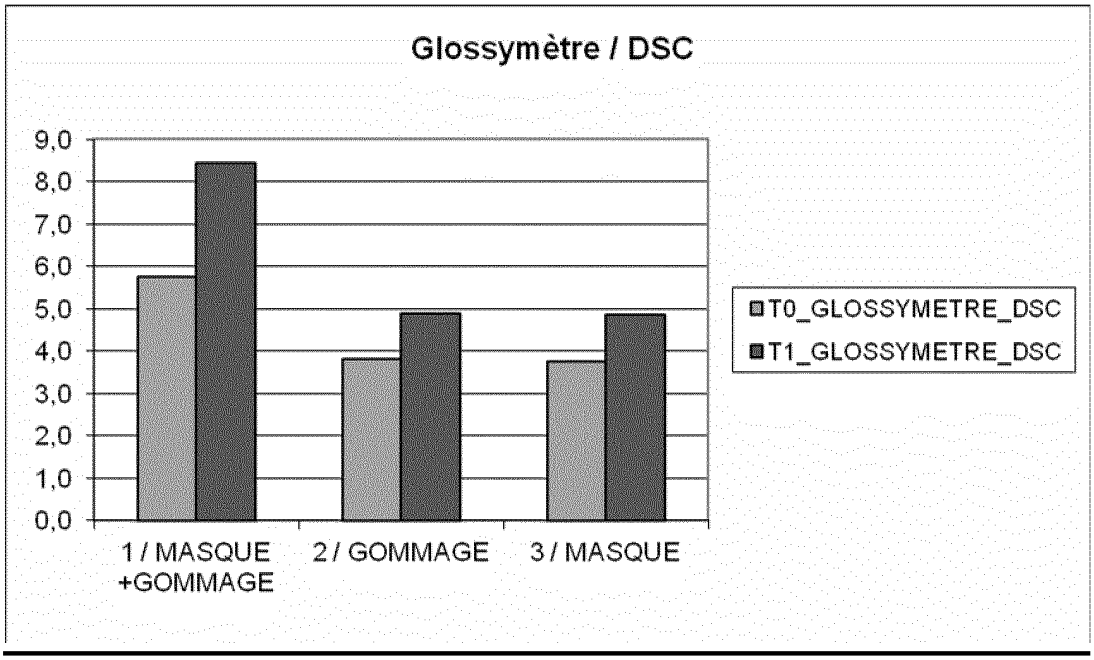

Glossymètre / DSC
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
1 / MASQUE +GOMMAGE
2 / GOMMAGE
3 / MASQUE
T0_GLOSSYMETRE_DSC
T1_GLOSSYMETRE_DSC

FIG. 1

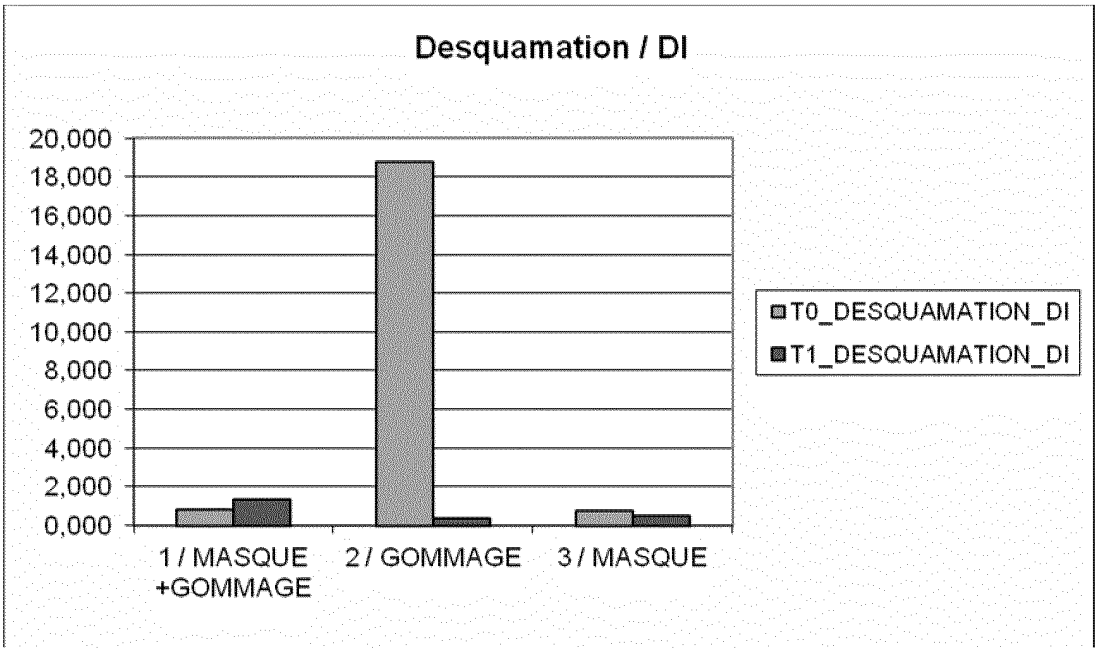

Desquamation / DI
20,000
18,000
16,000
14,000
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0,000
1 / MASQUE +GOMMAGE
2 / GOMMAGE
3 / MASQUE
T0_DESQUAMATION_DI
T1_DESQUAMATION_DI

FIG. 2

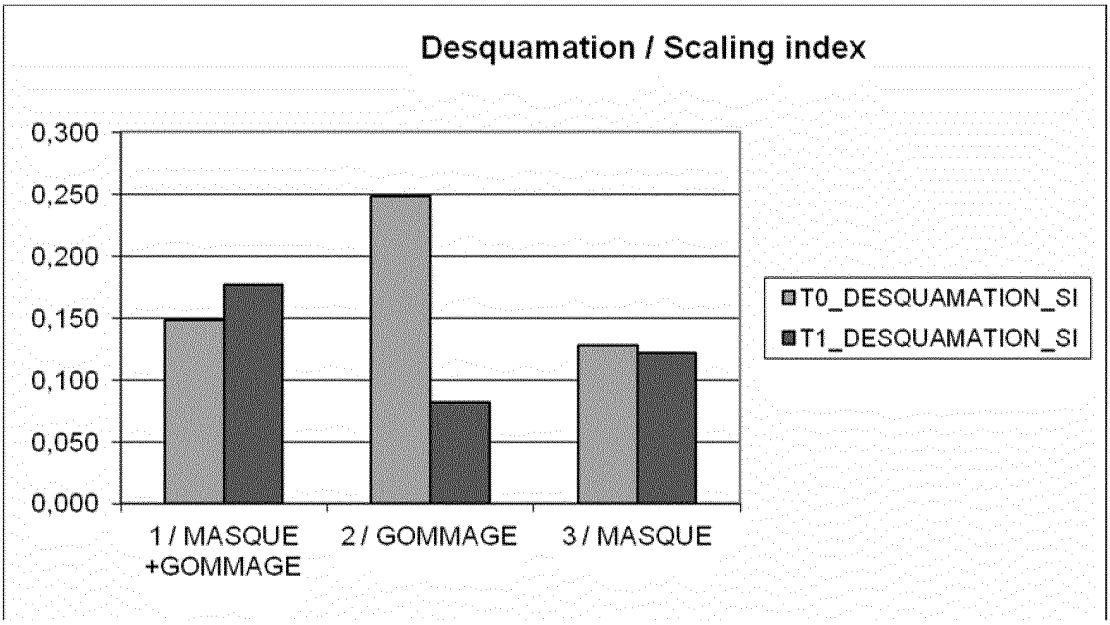

Desquamation / Scaling index
0,300
0,250
0,200
0,150
0,100
0,050
0,000
1 / MASQUE +GOMMAGE
2 / GOMMAGE
3 / MASQUE
T0_DESQUAMATION_SI
T1_DESQUAMATION_SI

FIG. 3

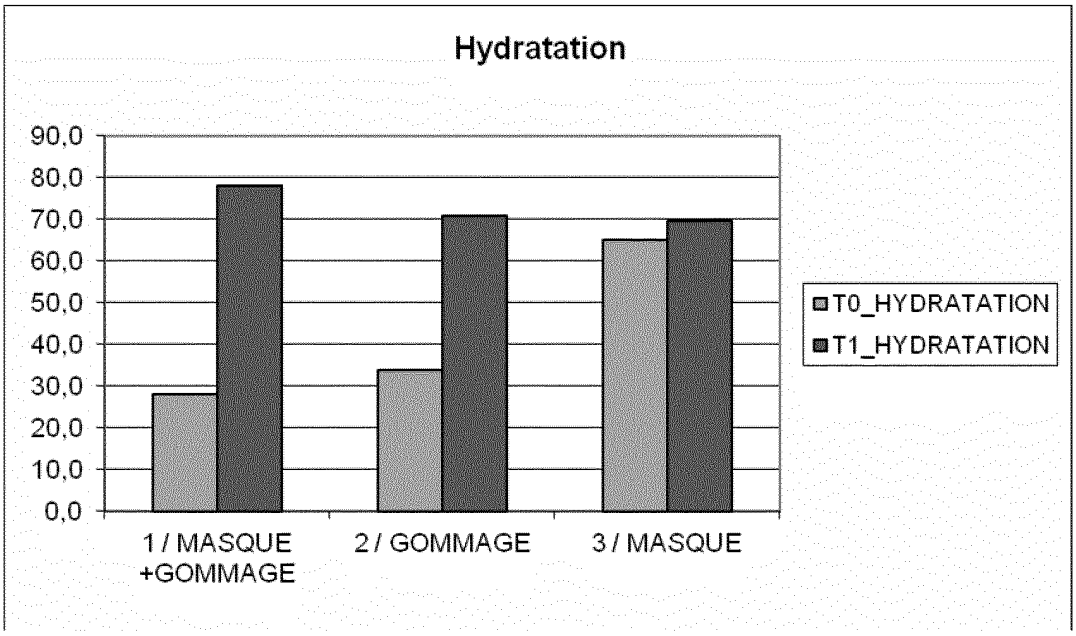

Hydratation
90,0
80,0
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
1 / MASQUE +GOMMAGE
2 / GOMMAGE
3 / MASQUE
T0_HYDRATATION
T1_HYDRATATION

FIG. 4

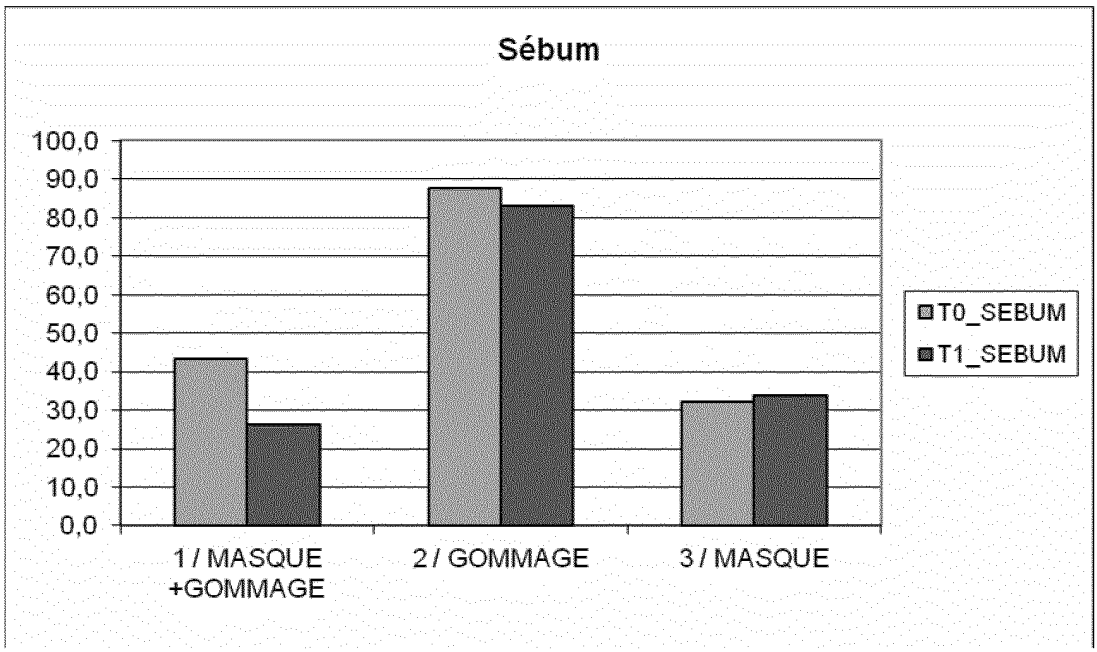

Sébum
100,0
90,0
80,0
70,0
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
1 / MASQUE +GOMMAGE
2 / GOMMAGE
3 / MASQUE
T0_SEBUM
T1_SEBUM

FIG. 5

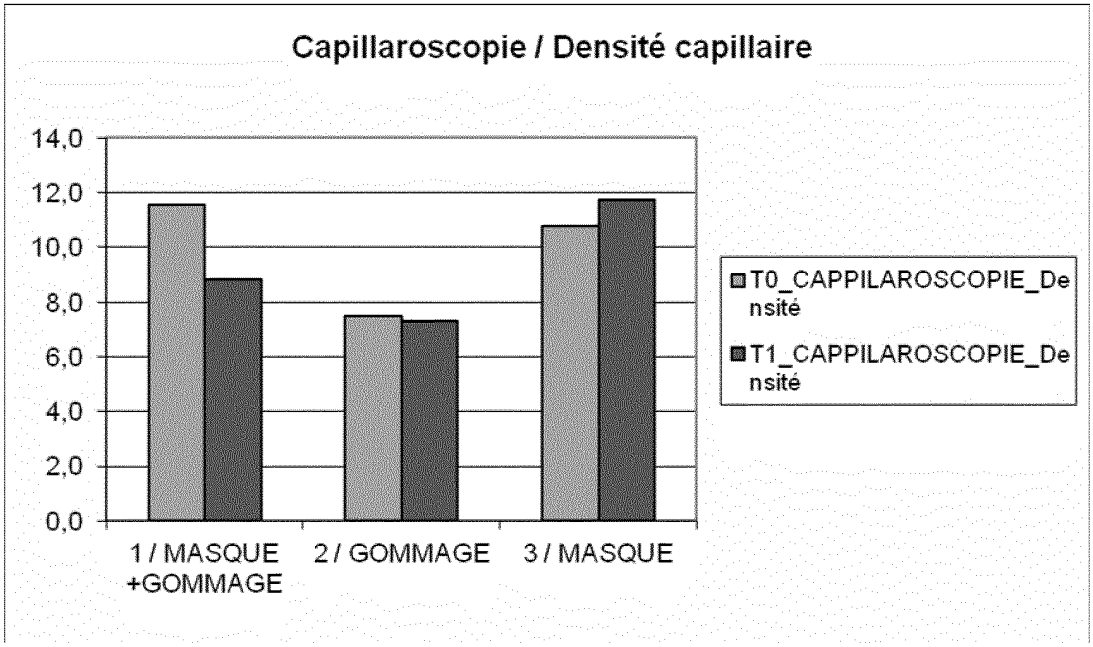

Capillaroscopie / Densité capillaire
14,0
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
1 / MASQUE +GOMMAGE
2 / GOMMAGE
3 / MASQUE
T0_CAPPILAROSCOPIE_Densité
T1_CAPPILAROSCOPIE_Densité

FIG. 6

N° d'enregistrement national : 1162565 N° de publication : 2985183

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveauté) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- [x] Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- [ ] Le demandeur a maintenu les revendications.
- [x] Le demandeur a modifié les revendications.
- [ ] Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- [ ] Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- [ ] Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- [x] Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- [ ] Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- [ ] Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- [ ] Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

N° d'enregistrement national : 1162565 N° de publication : 2985183

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; novembre 2008 (2008-11), "Meso Peel 3 Treatments Peeling Kit", XP002682145,
Database accession no. 996744

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; novembre 2007 (2007-11), "Jet Set Travel Kit", XP002682146,
Database accession no. 799915

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; décembre 2011 (2011-12), "New Zealand Kiwi Acnes All Out Set", XP002682147,
Database accession no. 1684373

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; février 2007 (2007-02), "Red Wine Mask Kit", XP002682148,
Database accession no. 664787

WO 01/66066 A1 (AUSTRALIAN IMP ERS LTD [US])
13 septembre 2001 (2001-09-13)

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; juillet 2012 (2012-07), "30 Day Thermal Transformation", XP002682149,
Database accession no. 1846324

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT

N° d'enregistrement national : 1162565 N° de publication : 2985183

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

ANNEXE 2 : Composition cosmétique et/ou dermatologique comprenant un extrait végétal et un activateur de gènes

La présente invention concerne une composition cosmétique et/ou dermatologique comprenant l’association d'un extrait d'Albizia et d’un activateur des gènes CLOCK utilisable pour prévenir et traiter les signes de fatigue et de vieillissement cutané.

La peau comprend plusieurs couches intégrées, allant de la couche superficielle, l'épiderme, jusqu'aux couches plus profondes, le derme et l'hypoderme, et chacune de ces couches remplit des fonctions permettant à l'ensemble de réagir et de s'adapter à son environnement.

L'épiderme est principalement composé de kératinocytes (90% des cellules épidermiques), de mélanocytes et des cellules de Langerhans. Il constitue la couche externe de la peau, d'épaisseur variable selon les différentes parties du corps, et assure la protection du corps vis-à-vis de son environnement extérieur. Le derme est la couche la plus épaisse, traversée par des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins, se composant principalement de collagène, d'élastine, de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes, principalement synthétisés par les fibroblastes dermiques. Les fibres de collagène assurent la résistance mécanique et la texture de la peau, l'élastine est responsable de son élasticité, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes jouent un rôle majeur de structure et d'hydratation de la peau. L'hypoderme, contenant les adipocytes qui produisent des lipides assurant la formation d'une couche grasse protégeant les muscles, les os et les organes internes contre les chocs, est la couche la plus profonde de la peau.

La dégradation de la peau avec le temps peut être intrinsèque, c'est-à-dire chrono-biologique, ou extrinsèque c'est-à-dire provoquée par l'environnement, notamment la pollution, le tabagisme, l'exposition au soleil et les variations de températures, qui peuvent contribuer à accélérer la dégradation du collagène et de l'élastine du derme. Le vieillissement de la peau se traduit généralement par l'apparition de rides et ridules, qui peuvent aussi résulter du stress et de changements biologiques et physiologiques, accélérés par les modes de vie ou par l'environnement. L'apparition de marques pigmentaires, la diminution de l'épaisseur de la peau, sa perte d'élasticité et son affaissement sont également des changements observés au cours du vieillissement.

Outre son vieillissement continu, la peau évolue en permanence en fonction de l'état de fatigue de la personne, qui se traduit par des signes tels que poches et cernes sous les yeux, traits tirés et teint terne.

Des études récentes ont montré l'implication de certains gènes circadiens au niveau des cellules cutanées humaines, notamment kératinocytes, mélanocytes et fibroblastes, qui exprimeraient des protéines issues de gènes circadiens. Avec l'âge, on observe une perte de rythmicité et par exemple l'exposition de la peau aux rayons UVB intervient dans ce dysfonctionnement rythmique induit par la suppression de l'expression de certains gènes circadiens CLOCK, PERL1 et BAML1, comme indiqué par JA Desotelle et al., Photochemistry and Photobiology, 88(5):1037-47 (Sept. 2012). L'expression des gènes circadiens varie aussi en fonction des conditions environnementales (saison, décalage horaire), induisant une perte de synchronisation cellulaire.

On sait aussi que la lumière joue un rôle important dans la régulation des rythmes circadiens via les noyaux supra-chiasmatiques et la régulation de la mélatonine. La mélatonine est une hormone secrétée par la glande pinéale, et aussi par la peau, essentiellement en l'absence de lumière, sa concentration dans le sang étant plus élevée la nuit.

De nombreuses compositions cosmétiques et dermatologiques ont été proposées pour lutter contre les signes du vieillissement cutané. Cependant, malgré les diverses substances et compositions disponibles, il existe toujours un besoin de pouvoir disposer de nouvelles compositions alternatives présentant une efficacité améliorée. A ce titre, une nouvelle composition a été découverte par la Demanderesse.

La présente invention a pour objet une composition cosmétique et/ou dermatologique comprenant en association :

- un extrait d'Albizia, et
- un activateur des gènes CLOCK,

dans un support physiologiquement acceptable.

L'invention concerne également un procédé cosmétique non thérapeutique destiné à prévenir et/ou à traiter les signes de fatigue et de vieillissement de la peau, consistant à appliquer sur les zones exposées de la

peau une composition comprenant en combinaison un extrait d'Albizia et un activateur des gènes CLOCK.

Suivant la présente invention, l'extrait d'Albizia est de préférence un extrait d'Albizia julibrissin, et plus préférentiellement un extrait glycériné.

L'activateur de gène CLOCK utilisé dans l'invention peut être choisi parmi les peptides connus pour activer les gènes CLOCK et parmi les substances végétales procurant ce même effet.

L'activateur de gène CLOCK a pour effet de lutter contre la désynchronisation de l'horloge circadienne des fibroblastes humains, et ainsi de procurer un effet anti-terne et d'améliorer la tonicité de la peau. L'extrait d'Albizia a pour effet de stimuler la production de mélatonine par les fibroblastes, favorisant l'activité nocturne de régénération cellulaire.

Les expérimentations effectuées par la Demanderesse ont montré que la combinaison de l'extrait d'Albizia et de l'activateur de gènes CLOCK de l'invention procure un effet de synergie, se traduisant par une meilleure activation des systèmes de régénération et réparation cellulaires provenant de l'activation des gènes CLOCK.

L'extrait d'Albizia :

L'extrait d'Albizia utilisé dans la composition de l'invention peut être plus particulièrement un extrait d'Albizia julibrissin, ou arbre de soie, ou Mimosa de Constantinople, une espèce d'Albizia se développant sans difficulté dans des régions tempérées.

L'extrait d'Albizia est connu pour ses propriétés anti-oxydantes et ses effets favorables contre l'anxiété et le stress. Il est également connu pour limiter le phénomène de glycation. Les expérimentations effectuées par la Demanderesse ont montré que l'extrait d'Albizia julibrissin a pour effet d'activer la production de mélatonine par les cellules cutanées. On utilise de préférence un extrait d'écorce, notamment un extrait glycériné, mais on peut utiliser aussi un extrait de fleur ou de feuille.

L'extrait peut être obtenu par macération dans l'eau d'écorces d'Albizia julibrissin, puis filtration. L'extrait est ensuite dilué dans de la glycérine.

Il est utilisé dans la composition de l'invention en une quantité représentant entre 0,08 et 5%, de préférence entre 1 et 4%, en poids par rapport au poids total de la composition.

L'activateur du gène CLOCK :

L'activateur utilisé dans la composition de la présente invention est susceptible d'activer les gènes horloge, notamment les gènes CLOCK, dans les fibroblastes humains dermiques, et on utilise par exemple un peptide activateur ou un extrait de substance végétale présentant les mêmes effets,

Suivant l'invention on utilise de préférence un peptide tel que le Tétrapeptide-26, disponible dans le commerce sous la marque Chronogen® (Vincience), qui possède une séquence d'amino-acides Ser-Pro-Leu-Gln-NH_2, le Tripeptide-32, correspondant à la séquence Ser-Thr-Pro-NH_2 et disponible dans le commerce sous la marque Chronolux® (Vincience), et le chronopeptide (glutamylamidoéthyl imidazole) vendu sous la marque Chronocyclin® (Exsymol), mais on peut aussi utiliser un extrait de racines de Lindera strychnifolia, disponible dans le commerce sous la marque Circagenyl® (Silab).

Il est utilisé dans la composition de l'invention en une quantité représentant de préférence entre 0,5 et 2%, en poids par rapport au poids total de la composition.

La composition de l'invention est formulée de préférence pour une application topique, directement sur la peau. Elle peut être utilisée en cosmétique et en dermatologie humaine pour lutter contre les signes du vieillissement cutané, et plus particulièrement contre les signes de fatigue tels que poches et cernes sous les yeux, traits tirés et teint terne.

Elle est appliquée une fois par jour, de préférence le soir, pendant une durée minimale d'un ou deux mois, qui peut être prolongée si nécessaire, les meilleurs résultats étant généralement observés au bout de 5 à 6 semaines.

Les essais cliniques effectués sur 20 femmes âgées entre 50 et 70 ans, sélectionnées avec des signes de fatigue (cernes, traits tirés, teint terne) sous constance hormonale durant les 3 mois précédant le test et pendant le test, ont permis d'observer, après 1 mois de traitement consistant à appliquer tous les soirs un sérum conforme à l'Exemple 1 ci-après, une diminution des signes de vieillissement et de fatigue cutanée suivant :

- 20% de la taille des poches
- 12% des cernes
- 2% des traits tirés
- 10% du teint terne,

et après 2 mois du même traitement :

- 37% de la taille des poches
- 40% des cernes
- 51% des traits tirés
- 27% du teint terne,

Les compositions conformes à la présente invention peuvent être présentées sous les formes classiquement utilisées pour une application topique, c'est-à-dire sous forme de sérum , gel, lotion, émulsion (en particulier crème ou lait), masque ou pommade, contenant des excipients et supports usuels compatibles et pharmaceutiquement acceptables. Elles peuvent aussi se présenter sous forme de patches, tulles ou pansements à libération contrôlée.

Ces formes d'administration par voie topique sont préparées par des techniques bien connues de l'homme du métier, et par exemple, dans le cas d'une crème, par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse pour obtenir une émulsion huile dans eau, ou inversement pour préparer une émulsion eau dans huile.

La composition selon l'invention peut comprendre un ou plusieurs excipients usuels, adaptés notamment à une administration topique externe, en particulier des excipients acceptables sur le plan dermatologique et cosmétologique.

Ces excipients appropriés pour la formulation sont bien connus de l'homme du métier, et peuvent être choisis par exemple parmi un ou plusieurs des composés listés ci-dessous:

i. des vecteurs de principes actifs, tels que des cyclodextrines ; des liposomes, par exemple de la lécithine ;

ii. des huiles végétales telles que par exemple de l'huile Kukui, de l'huile de Calophyllum Inophyllum, ou de l'huile de Helichrysum, de coton, de tournesol, de coco, ou de macadamia ;

iii. des gélifiants et/ou épaississants, tels que des gommes naturelles comme la gomme xanthane ; des polymères de synthèse, par exemple des polyacrylamides du type Carbopol, des acrylates réticulés et des dérivés de cellulose tels que l'hydroxyéthyl cellulose ;

iv. des émulsionnants et co-émulsionnants, tels que arachidyl glucoside ; cétéaryl glucoside ; cétéaryl alcohol ; cétostéarylique alcohol ; cetyl alcohol ; un stéarate de glycérol ou de propylène glycol, isostéarate d'isostearyle ; le steareth-2 ; steareth-21 ; le pentaerythrityl distearate ; le myristate d'isopropyle, un Polysorbate et un ester de sorbitan tel que le laurate et le stéarate de sorbitan ;

v. des émollients et des tensioactifs, tels que octyl dodecanol ; isononyl isononanoate ; capric/caprylic triglycérides ; l'octanoate de cétéaryle ; le myristate et le palmitate d'isopropyle ; l'isononanoate de cétéaryle ; le 3-di-isostéarate de polyglycéryle ; le polyisobutène hydrogéné ; le palmitate cétylique ; le phosphate cétylique ; l'octyldodécanol et le beurre de Karité qui présente aussi des propriétés calmantes et adoucissantes ;

vi. des agents hydratants, tels que la glycérine ; le sel de sodium de l'acide pyrrolidone carboxylique (sodium PCA) ; des associations de dérivés glucosiques à effet hydratant et restructurant comme le produit Aquaxyl® (xylityl glucoside et anhydroxylytol et xylitol) ;

vii. des conservateurs, tels que le phénoxyéthanol, l'acide déhydro-acétique ; l'acide sorbique ; le sorbate de potassium ; l'acide benzoïque ; le benzoate de sodium ; des parahydroxybenzoates de méthyle ou d'éthyle ;

viii. des agents de protection contre les rayons ultraviolets, tels que des filtres solaires UV-A et UV-B hydrophiles ou lipophiles, choisis parmi la benzophénone ou un dérivé de benzophénone tel que la 2-hydroxy-4-méthoxy-benzophénone ; un ester d'acide cinnamique, et plus particulièrement le méthoxycinnamate d'octyle, le méthoxycinnamate d'éthyl-2-hexyle, ou encore un cyano-β, β-diphénylacrylate tel que l'octocrylène, le 4-méthylbenzylidène camphre, et des dérivés du dibenzoylméthane tels que le 4-isopropyl dibenzoylméthane, le t-butyl-méthoxy dibenzoylméthane, et le 4-méthoxy-dibenzoylméthane ; ou tels que des pigments formant un écran UV ;

ix. des poudres exfoliantes ; des poudres de fruits ; ou des poudres matifiantes telles que le copolymère de méthacrylate de méthyle ;

x. des parfums.

La composition selon l'invention peut en outre comprendre un ou plusieurs actifs complémentaires usuels, adaptés notamment à une administration topique externe, en particulier des actifs acceptables sur le plan dermatologique et cosmétologique.

Ces actifs complémentaires appropriés pour la formulation sont bien connus de l'homme du métier, et peuvent être par exemple des actifs anti-âges, des actifs apaisants, des actifs purifiants, des actifs hydratants, etc. On peut en particulier incorporer dans la composition de l'invention de la Vitamine E (acétate de tocophérol), de la Vitamine C (acide ascorbique ou un dérivé) ou un extrait de graines de lin (Linum usitatissimum) qui contribue à restaurer la barrière lipidique et diminue la perte en eau, assurant ainsi une meilleure hydratation de la peau.

D’autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre, lesdits exemples étant donnés à titre illustratif et nullement limitatif.

Exemple de formulation d’un sérum

Suivant les techniques classiques, on prépare un sérum selon l'invention ayant la composition pondérale suivante :

Tocophérol	0,03
EDTA disodique	0,10
Conservateur	0,24
Emulsionnant	0,30
Parfum	0,50
Tetrapeptide-26	1,00
Extrait de graines de lin	1,50
Glycérine	2,00
Albizia julibrissin (extrait d'écorce)	2,00
Epaississant	4,00
Eau	q.s.p. 100,00

L'épaississant utilisé est usuel et comprend de l'hydroxyéthyl cellulose, du Polysorbate 60 et l'isostéarate de sorbitan. Le conservateur comprend de l'acide salicylique, de l'acide sorbique, de l'alcool benzylique et de la chlorphénésine.

Ce sérum peut être facilement appliqué sur toutes les parties exposées de la peau notamment au niveau du visage et de l'encolure. Elle peut être appliquée une à trois fois par jour, pendant quelques semaines tant que l'effet recherché s'avère nécessaire. Une durée d'application plus longue ne présente pas d'inconvénient.

Exemple de formulation d'une crème nuit

Suivant les techniques classiques, on prépare une crème selon l'invention ayant la composition pondérale suivante :

Acide citrique	0,001
Conservateur	0,250
Acétate de tocophérol	0,300
Parfum	0,400
Tetrapeptide-26	1,000
Albizia julibrissin (extrait d'écorce)	3,000
Glycérine	3,000
Beurre de Karité	3,000
Huile de coco	3,000
Huile de coton	4,000
Emulsionnant	5,410
Epaississant	6,700
Eau	q.s.p. 100,000

L'émulsionnant utilisé dans cette formule est le cetearyl glucoside et le sorbitan isostéarate. L'épaississant et le conservateur sont comme ci-dessus.

Exemple de formulation d'un gel

Suivant les techniques classiques, on prépare un gel selon l'invention ayant la composition pondérale suivante :

Tocophérol	0,04
EDTA disodique	0,10
Conservateur	0,34

Parfum	0,40
Huile d'amande douce	1,00
Tetrapeptide-26	1,00
Extrait de graines de lin	1,50
Albizia julibrissin (extrait d'écorce)	2,50
Glycérine	3,50
Epaississant	4,30
Eau	q.s.p. 100,00

Exemple de formulation d'une crème fluide

Suivant les techniques classiques, on prépare une crème fluide selon l'invention ayant la composition pondérale suivante :

EDTA disodique	0,10
Parfum	0,20
Acétate de tocophérol	0,25
Conservateur	0,50
Huile d'amande douce	1,00
Beurre de Karité	1,00
Albizia julibrissin (extrait d'écorce)	1,50
Tetrapeptide-26	2,00
Glycérine	3,00
Epaississant	3,50
Emulsionnant	5,20
Eau	q.s.p. 100,00

L'émulsionnant utilisé est le polymethyl methacrylate, le Steareth-21 et le Laureth-3.

Exemple de formulation d'une crème riche

Suivant les techniques classiques, on prépare une crème riche selon l'invention ayant la composition pondérale suivante :

Acide citrique	0,001
Acétate de tocophérol	0,200
Conservateur	0,260
Parfum	0,400

Extrait de graines de lin	1,500
Tetrapeptide-26	1,500
Albizia julibrissin (extrait d'écorce)	1,500
Huile de coton	2,000
Beurre de Karité	2,500
Glycérine	3,000
Huile de coco	3,000
Epaississant	7,700
Emulsionnant	9,000
Eau	q.s.p. 100,000

L'émulsionnant utilisé dans cette formule est le cetearyl glucoside, le Polysorbate 80 et le pentaerythrityl distearate.

REVENDICATIONS

1. Composition cosmétique et/ou dermatologique caractérisée en ce qu'elle comprend en combinaison

- un extrait d'Albizia, et
- un activateur des gènes CLOCK,

dans un support physiologiquement acceptable.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrait d'Albizia est un extrait d'Albizia julibrissin.

3. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisée en ce qu'elle comprend un extrait glycériné d'Albizia.

4. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'activateur des gènes CLOCK est un peptide ou un extrait végétal.

5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'activateur de gènes CLOCK est choisi parmi le Tétrapeptide-26, ayant la séquence d'amino-acides Ser-Pro-Leu-Gln-NH_2, le Tripeptide-32, ayant la séquence Ser-Thr-Pro-NH_2 et le chronopeptide (glutamylamidoéthyl imidazole).

6. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'activateur de gènes CLOCK est un extrait de racines de Lindera strychnifolia.

7. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend entre 1 % et 4 % d'extrait d'Albizia et entre 0,5 % et 2 % d'activateur des gènes CLOCK.

8. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est formulée pour application topique

9. Procédé cosmétique non thérapeutique pour prévenir et traiter les signes de fatigue et de vieillissement de la peau, caractérisé en ce qu'on applique une composition suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8 sur les zones exposées de la peau à traiter.

ABREGE

La présente invention concerne une composition cosmétique et/ou dermatologique comprenant un extrait d'Albizia, et un activateur des gènes CLOCK, dans un support physiologiquement acceptable.

Application comme composition pour prévenir et traiter les signes de la fatigue et du vieillissement cutané.

Figure à publier : Aucune.

ANNEXE 3: Biological process in solar lentigo: a look on experimental models

DOI: 10.1111/exd.12937
www.wileyonlinelibrary.com/journal/EXD

Viewpoint

Biological processes in solar lentigo: insights brought by experimental models

Ranesha Goorochurn[1,2,3,4,5], Cécline Viennet[1], Corinne Granger[5], Ferial Fanian[4], Nadine Varin-Blank[2,3], Christine Le Roy[2,3]* and Philippe Humbert[1,4]*

[1]LIBC, Engineering and Cutaneous Biology Laboratory, UMR 1098 INSERM, University of Franche-Comte, SFR FED 4234, Besançon, France; [2]UMR 978 INSERM, Bobigny Cedex, France; [3]ASIH, Signaling Adaptors in Hematology, UFR-SMBH, Labex INFLAMEX, University SPC, Paris 13, Bobigny Cedex, France; [4]Department of Dermatology, Research and Studies Center on the Integument (CERT), Clinical Investigation Center (CIC 1431), Besançon University Hospital, Besançon, France; [5]Dermance Laboratoire, Dermo-cosmetic and Mature Skin Expertise Paris, France
Correspondence: Christine Le Roy, UMR U978 INSERM - Université Paris 13, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France, Tel.: +33 1 48 38 73 90, Fax: +33 1 48 38 73 69, e-mail: christine.le-roy@inserm.fr and Philippe Humbert, CHRU Besançon – Département de dermatologie, 3 boulevard Alexandre Fleming, 25000 Besançon, France, Tel.: +33 3 81 21 90 72, Fax: +33 3 81 21 82 79, e-mail: philippe.humbert@univ-fcomte.fr

Abstract: Common in ageing patient, the solar lentigo is a macular hyperpigmented skin lesion that results from chronic exposure to ultraviolet irradiations. Despite sharing numerous features with other pigmented spots, the diagnostic of this benign lesion is well characterized at the tissue level. Recent studies shed lights on several factors and their pathogenic mechanisms involved in the development of the solar lentigo. This review summarizes how diverse experimental approaches allowed the identification of several biomarkers, which contribute to a better understanding on the initiation and the maintenance of this pigmentary disorder.

Key words: biomarkers – experimental models – hyperpigmentation disorders – solar lentigo

Accepted for publication 17 December 2015

Macroscopic context of the solar lentigo

Numerous hyperpigmented lesions are observed on human skin and are clinically and pathologically classified. Among them, we have chosen to describe the solar lentigo, ephelide (also known as freckle), seborrhoeic keratosis, pigmented actinic keratosis and lentigo maligna melanoma in their macroscopic contexts.

Considered as an ageing cutaneous change, the solar lentigo (SL) may develop on the sun-exposed skin and is usually flat with a well-defined border (1). Besides chronic sun exposure, other environmental factors, such as constituents of the ambient air pollution, may contribute to the SL development (2). In spite of its benign traits, the potential negative social impact of the SL should not be disregarded in view with the fact that these lesions appear on the face and the limbs. The ephelides are characterized by small flat spots with higher pigmentation than the surrounding skin. These benign lesions can be distinguished from the SL macula by their lighter appearance (1). Also present in older adult, the seborrhoeic keratosis typically appears as a round, slightly elevated lesion with a spectrum of colours from light to dark brown. In contrast with these three benign hyperpigmentation, the pigmented actinic keratosis appears as a precursor of epidermoid carcinoma that develops as rough small pink, red or brown patches upon long-term exposure to the sun. Finally, defined as malignant spot, the lentigo maligna melanoma (LMM) expands after long-term solar exposure with an asymmetric aspect based on irregular boundary and uneven colouring (3).

Besides their clinical specificities and own pathological mechanisms, these lesions share some mechanisms of the pigmentation process that is regulated by cellular interactions between melanocytes and keratinocytes in the epidermis, as well as with fibroblasts in the dermis. Various approaches at the tissue and cellular levels are used to uncover the cellular and molecular mechanisms involved in SL disorders. Those include biological models such as human skin biopsies, ultraviolet (UV)-irradiated primary cell cultures and skin organ cultures developed *in vitro* as well as *in vivo*. In this review, we will describe the biological models currently used for SL analysis as compared to their inter-individual and/or intra-individual counterparts and we will give lights on biomarkers involved in the pathogenic mechanisms of SL disorder.

SL structure at the histological level

Several reports using SL biopsies have described their histological features (Fig. 1). Lin C.B et al. (4) proposed a classification of human SL progressive stages, based on the degree of melanin deposition and the depth and complexity of the rete ridges. Early stages of SL present with lower melanin levels as well as shorter and simpler rete ridges, whereas later stages show an accumulation of melanin and intricated rete ridges protruding in the thinning dermis and epidermis (4–6).

Qualitative and quantitative biomarkers for SL biopsies

Qualitative approaches

Numerous immunohistochemistry-based studies using SL biopsies have qualitatively evaluated the presence of biomarkers specifically associated with different skin layers and involved in the pigmentation process (4–16).

Using an antibody targeting the Ki-67 protein, a cell proliferation marker present in all the active phases of the cell cycle (G1, S, G2 and M) but absent in resting cells (G0) (17), differential cellular proliferation was observed. Ki-67 intensity levels were lower within the SL lesion as compared to sun-exposed

© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

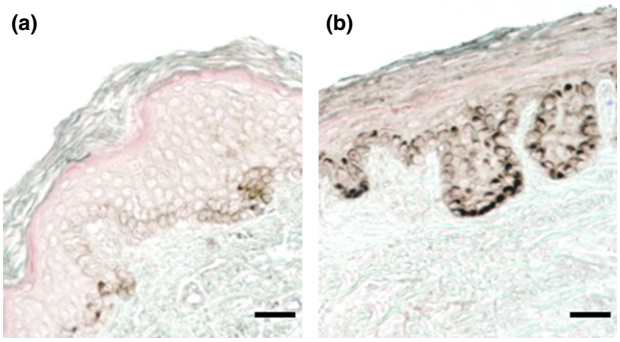


Figure 1. Differential detection of the melanin between perilesional (a) and solar lentigo (SL) (b) skins. Biopsies were stained following Fontana–Masson procedure. SL section shows higher melanin staining and elongated patterns of rete ridges that collapse into the dermis. According to Lin's SL classification, the lesional skin section (panel b) presented may correspond to a late stage. Bars equal to 50 μm.

perilesional skin (6,7). Interestingly, Ki-67 staining decreased between early and later stages of the Lin's SL classification, indicative of a lack of skin cell proliferation at later stages of the SL (4). Using two antibodies that recognize epidermal keratinocyte differentiation markers, such as filaggrin and involucrin, histological studies revealed less staining in SL epidermis as compared to adjacent perilesional skin, suggesting an altered cornification process in SL (6). Recent findings demonstrated that the thicker epidermis observed in SL on the facial skin was explained by a hyperplasia of the keratinocytes that are probably senescent, as suggested by the stronger labelling with the p16 antibody (13).

Besides altered cellular proliferation and cornification, recent mechanistic studies shed lights on the involvement of UV irradiations in SL formation through various biological processes, such as pigmentation and inflammation.

Indeed, UV stress contributes to modify the expression of a various set of cytokines, evoking altered cellular crosstalks in the lesional skin. Within the epidermis, analysis of cytokine expression levels revealed higher TNF-α (tumor necrosis factor-alpha) and lower IL-1-α (interleukin-1-alpha) in SL as compared to perilesional skin biopsies (9). As keratinocytes secrete both inflammatory cytokines in response to UV irradiation, these data implicate TNF-α and IL-1-α in SL development (18,19).

Moreover, keratinocytes are known to regulate the growth and the activity of melanocytes through paracrine mechanisms by producing growth factors such as endothelin-1 (ET-1), granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), basic fibroblast growth factor (bFGF) or stem cell factor (SCF) (20). Notably, hyperpigmentation that occurs in UV-induced SL is associated with increased ET-1 or SCF labelling in SL epidermis as compared to perilesional tissue (8,9). Given that the production of these melanogenic cytokines is stimulated by keratinocytes-derived TNF-α or IL-1-α, these studies suggest that SL development involves altered dialogue between melanocytes and keratinocytes. At the basal membrane level, the main role of melanocytes consists on the protection of keratinocytes from UV irradiations. In response to the stress, melanocytes produce melanin pigments stocked in specific organelles (melanosomes) and transferred to neighbouring keratinocytes through the melanocyte dendrites (21). Hyperpigmentation process could pinpoint an increase of melanocytes in the SL lesion. Using a melanocyte membrane marker, some authors demonstrated that Melan-A/MART-1 is highly detected in SL lesion as compared to the perilesional or normal counterparts (5,22). However, the number of melanocytes was not modified in rete ridges (5). In contrast, using an antibody directed against the transcription factor MIFT (microphthalmia-associated transcription factor), which is involved in the regulation of melanin synthesis, Shin et al. (13) demonstrated its higher expression in SL lesion as compared to the perilesional skin, strongly suggesting an increased number of melanocytes in SL. Tyrosinase (TYR) and TRP-1 (tyrosinase-related protein 1) proteins, which are additional melanocyte markers, were present in higher proportion in SL biopsies as compared to perilesional skin or to non-lesional skin from healthy controls (4,6,14,22). Nevertheless, histological approaches do not discriminate melanocytes from melanosomes that also contain enzymes involved in melanin synthesis (23). By focusing on the canonical Wnt/β-catenin-signalling pathway, Yamada et al. (24) also showed that its activation is linked to an accelerated differentiation process of the stem cells towards melanocytes and in the formation of hyperpigmented macula. Interestingly, a recent study demonstrated that the expression level of secreted frizzled protein (sFRP2), a Wnt modulator, was enhanced in the SL epidermis and dermis, arguing for its involvement in the development of hyperpigmented disorders (16).

Within the dermis, fibroblasts indirectly interact with melanocytes through the secretion of various cytokines such as SCF, hepatocyte growth factor (HGF) and keratinocyte growth factor (KGF). This cytokine network not only influences the growth and the pigmentation of the melanocytes but also their morphology (25). Upper dermis of SL lesion expresses HGF and KGF (10). Expression levels of KGF and its cognate receptor (KGF receptor), which promotes melanosome transfer, are enhanced in the epidermis basal layer of SL lesions compared to perilesional or normal skin (4,10,14,26). HGF, another fibroblast-derived growth factor and a pro-angiogenic factor (27), is also increased in SL lesion when compared to non-lesional skin from healthy controls (10). Interestingly, this cytokine network seems linked to the presence of melanophages with melanin granular structures in large melanosomal complexes. Using electron microscopy associated with immunohistochemistry approaches, Unver et al. (7) observed higher number of the dermal dendrocytes, probably involved in a massive melanin uptake, that should contribute to the hyperpigmentation observed in SL biopsies compared to unaffected skin.

At the dermo-epidermal junction (DEJ), heparan sulphate chains (HS) act as a reservoir of heparin-binding growth factors, such as bFGF, HGF, GM-CSF and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and, control the dissemination of the secreted proteins between the epidermis and the dermis. Interestingly, upon UV exposure, the enzymatic activation of heparanase allows HS degradation at the DEJ and promotes hyperpigmentation process in SL lesion (15).

Altogether, different reports highlight an indirect crosstalk, through secreted factors, between melanocytes, keratinocytes and fibroblasts at various scales of the skin and their alteration upon UV irradiation leading to SL (Table 1). Moreover, differential expression analysis of various proteins expressed in the epidermis

© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

and dermis between early and later stages of the SL reveals that some of them may constitute suitable biomarkers of the SL evolution (Fig. 2).

Quantitative approach

Despite the characterization of 125 genes involved in the modulation of the pigmentation (6), few studies attempted to quantitatively identify biomarkers responsible for SL development. In the absence of specific cellular markers, studies have primarily focused on a qualitative phenotyping of skin biopsies. Interestingly, gene-profiling approaches identified several biomarkers specific for SL lesion as compared to either adjacent perilesional skin or normal non-exposed skin. This technical approach confirmed higher gene expressions in SL lesions of several cytokines involved in the melanocyte–keratinocyte crosstalk such as ET-1 (6,8,9) and SCF (6,8). Moreover, membrane receptors of both ET-1 and SCF are transcriptionally upregulated in SL (6,8,9). Similarly, the MC1-R (melanocortin 1 receptor)/α MSH (α-melanocyte-stimulating hormone) complex, another ligand/receptor couple involved in the modulation of melanin synthesis (28), is upregulated in SL lesion compared to perilesional and non-exposed skin counterparts (6). Transcripts for enzymes engaged in the production of black-brown eumelanin and yellow-reddish pheomelanin (29), such as TYR, TRP-1 and TRP-2 (Tyrosinase-related protein 2)/DCT (dopachrome tautomerase), are upregulated in SL lesion (6,11). Also, mRNA levels of PMEL 17, which is translated into a melanosomal matrix protein involved in the biogenesis of premelanosomes, are enhanced in SL lesion compared to either perilesional or normal non-exposed skin (6,11). Furthermore, messenger RNA levels of the melanocyte-specific transcriptional factor, MIFT-M, a crucial regulator of melanocyte development, and differentiation in response to extracellular signals (30), are increased in SL lesion when opposed to perilesional and non-exposed normal skin areas (6,11).

In vitro and *in vivo* models reproducing hyperpigmented SL lesion

Quantitative and qualitative approaches using skin biopsies highlighted various proteins and genes as potential biomarkers. However, functional studies require at present the isolation of the various cutaneous cellular types with notably cellular extraction from the dermal compartment. Recently, *in vitro* and *in vivo* cellular models were developed that allow a better understanding of the impact of chronic UV exposure on photoageing and on SL pathogeny.

Table 1. Keratinocytes (K) and fibroblasts (F) secrete melanogenic factors that are increased in SL lesions. The table recapitulates the secreted cytokines and their cellular origin in SL lesion

Cytokine	Secreting cells	References
TNF-α	K	Kadono et al. (9)
IL1-α	K	Kadono et al. (9)
ET-1	K	Hattori et al. (8) Kadono et al. (9)
SCF	K/F	Hattori et al. (8) Kovacs et al. (10)
HGF	K/F	Kovacs et al. (10)
KGF	F	Kovacs et al. (10) Chen et al. (14)
sFRP2	K/F	Kim et al. (16)

TNF-α, tumor necrosis factor-alpha; IL1-α, interleukin-1-alpha; ET-1, endothelin-1; SCF, stem cell factor; HGF, hepatocyte growth factor; KGF, keratinocyte growth factor; sFRP2, secreted frizzled protein.

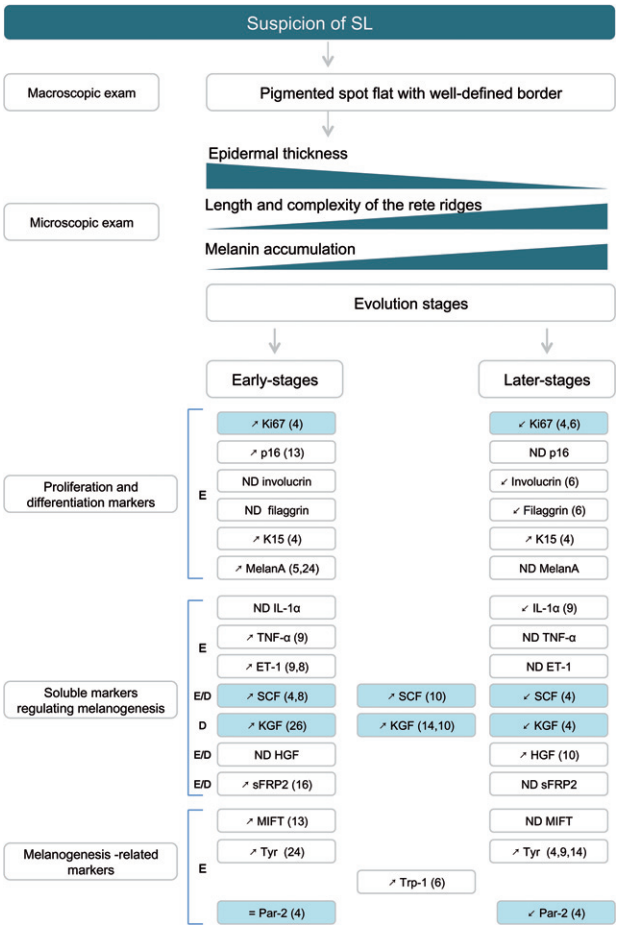


Figure 2. Schematic representation of a decision tree in SL evolution. Based on a suspicion of solar lentigo (SL) at the macroscopic and microscopic levels, the SL evolution stage is determined by relative measurement of expression levels of different proteins (proliferation and differentiation markers, soluble markers regulating melanogenesis and melanogenesis-related markers) by immunohistochemistry staining. E and D designate the epidermal and dermal compartments, respectively. The arrows ↗, ↙ or = indicate increase, decrease or equal protein expression as compared to non-lesional skin, respectively. ND means non-determined. Number specifies the reference as indicated in the text. The differential biomarkers between the early and later stages are highlighted in blue colour.

In vitro photoageing models and cytokine networks

Kovacs et al. (10) proposed an *in vitro* model of photoageing-induced fibroblasts that is based on repeated UVA exposure. In this 1D model, transcript levels of HGF, KGF and SCF are increased following UV irradiations, explaining how these cytokines might act directly and indirectly through keratinocytes to enhance pigmentation in SL. Imokawa et al. (31) developed a 2D-like cell system by incubating melanocytes with various types of fibroblast-conditioned media. This study demonstrated that SCF and HGF secretions are increased in the presence of old-fibroblast- compared to young-fibroblast-conditioned medium; both cytokines being part of the modulation of cutaneous pigmentation. Additionally, Salducci et al. (32) generated a '3D cellular model' with the coculture of keratinocytes and melanocytes with conditioned UV-stressed old fibroblast media. Despite its

© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

intrinsic complexity with several not only determined but also undefined growth factors, conditioned media produced by UVA-treated aged fibroblasts reproduce major characteristics of SL biopsies. Finally, Duval et al. (33) designed a 3D model by coculturing keratinocytes and melanocytes in the presence or not of foetal, adult and photoaged fibroblasts. At the macroscopic level, their results showed that fibroblasts play an important role on the pigmented reconstituted skin but also that photoaged fibroblasts contribute to hyperpigmentation. Interestingly, Yang et al. (34) performed a conversion of fibroblasts to functional normal melanocytes (iMels) by combining the three factors SOX10, MITF and PAX3. This work proposed that some iMels might be derived from multipotent cells in the dermis, thus reinforcing the role of the dermal compartment in the pigmentation process.

In vivo models for hyperpigmented lesions

Insights on the molecular mechanisms involved in the initiation and the maintenance of SL have also gained from an *in vivo* mouse model in which pigmented swine and human skins were grafted onto SCID mice. In response to local treatments of the mice with KGF and/or IL-1α, Chen et al. (14) observed an *in vivo* formation of hyperpigmentary lesions. Histological features of the skin (enhanced pigment deposition and elongated rete ridges) recapitulated those observed in human SL. These results strongly reinforced the crucial role played by KGF at early stages of this human pigmentary disorder.

Perspectives

Despite growing evidence published on SL, further studies are required to reinforce the crucial role of the dermis in SL lesions. Analysis of the specific biological implication of SL fibroblasts using *in vitro* models should quantitatively identify relevant functional cytokines network on neighbouring skin cells. Moreover, deciphering the fibroblastic molecular effectors that participate in the lesional and perilesional skin of the SL should improve our understanding in the pathogenic process of SL. Ultimately, it should help discovering efficient compounds targeting this hyperpigmentary disorder.

Acknowledgements

RG was the recipient of CIFRE (1722/2011) fellowship. This manuscript was supported by INSERM, University of Franche-Comte, University SPC Paris 13 and DERMANCE.

Author contributions

RG designed the concept of the manuscript and wrote the manuscript with the help of CV, GC and FF, and NVB contributed to the critical revision. CLR and PH wrote the final manuscript. CLR and PH are co-corresponding authors.

Conflict of interests

The authors have declared no conflicting of interest.

References

1 Praetorius C, Sturm R A, Steingrimsson E. Pigment Cell Melanoma Res 2014: **27**: 339–350.
2 Nakamura M, Morita A, Seite S *et al.* Exp Dermatol 2015: **24**: 407–411.
3 Kallini J R, Jain S K, Khachemoune A. Am J Clin Dermatol 2013: **14**: 473–480.
4 Lin C B, Hu Y, Rossetti D *et al.* J Dermatol Sci 2010: **59**: 91–97.
5 Cario-Andre M, Lepreux S, Pain C *et al.* J Cutan Pathol 2004: **31**: 441–447.
6 Aoki H, Moro O, Tagami H *et al.* Br J Dermatol 2007: **156**: 1214–1223.
7 Unver N, Freyschmidt-Paul P, Horster S *et al.* Br J Dermatol 2006: **155**: 119–128.
8 Hattori H, Kawashima M, Ichikawa Y *et al.* J Invest Dermatol 2004: **122**: 1256–1265.
9 Kadono S, Manaka I, Kawashima M *et al.* J Invest Dermatol 2001: **116**: 571–577.
10 Kovacs D, Cardinali G, Aspite N *et al.* Br J Dermatol 2010: **163**: 1020–1027.
11 Motokawa T, Kato T, Katagiri T *et al.* J Dermatol Sci 2005: **37**: 120–123.
12 Watanabe T, Tahira M, Morino S *et al.* The Journal of dermatology 2013: **40**: 528–532.
13 Shin J, Park J Y, Kim S J *et al.* Clin Exp Dermatol 2015: **40**: 489–494.
14 Chen N, Hu Y, Li W H *et al.* Exp Dermatol 2010: **19**: 865–872.
15 Iriyama S, Ono T, Aoki H *et al.* J Dermatol Sci 2011: **64**: 223–228.
16 Kim M, Han J H, Kim J H, et al. J Invest Dermatol 2016: **136**: 236–244.
17 Scholzen T, Gerdes J. J Cell Physiol 2000: **182**: 311–322.
18 Hachiya A, Kobayashi A, Yoshida Y *et al.* Am J Pathol 2004: **165**: 2099–2109.
19 Yaar M, Gilchrest B A. Br J Dermatol 2007: **157**: 874–887.
20 Yamaguchi Y, Hearing V J. BioFactors 2009: **35**: 193–199.
21 Videira I F, Moura D F, Magina S. An Bras Dermatol 2013: **88**: 76–83.
22 Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y *et al.* J Dermatol Sci 2014: **73**: 251–257.
23 Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A *et al.* Postepy Dermatol Alergol 2013: **30**: 30–41.
24 Yamada T, Hasegawa S, Inoue Y *et al.* Exp Dermatol 2014: **23**: 652–658.
25 Cardinali G, Kovacs D, Picardo M. Ann Dermatol Venereol 2012: **139**(Suppl 3): S96–S101.
26 Hasegawa K, Fujiwara R, Sato K *et al.* Ann Dermatol 2015: **27**: 626–629.
27 Shamis Y, Silva E A, Hewitt K J *et al.* PLoS One 2013: **8**: e83755.
28 Thody A J, Graham A. Pigment Cell Res 1998: **11**: 265–274.
29 Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing V J. J Biol Chem 2007: **282**: 27557–27561.
30 Shibahara S, Takeda K, Yasumoto K, et al. J Investig Dermatol Symp Proc 2001: **6**: 99–104.
31 Imokawa G, Yada Y, Morisaki N *et al.* Biochem J 1998: **330**: 1235–1239.
32 Salducci M, Andre N, Guere C *et al.* Pigment Cell Melanoma Res 2014: **27**: 502–504.
33 Duval C, Cohen C, Chagnoleau C *et al.* PLoS ONE 2014: **9**: e114182.
34 Yang R, Zheng Y, Li L *et al.* Nat Commun 2014: **5**: 5807.

© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd