

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE VERSAILLES
SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES

Spécialité Biologie et Pharmacologie Cutanées

Présentée par

Muriel ISOIR

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Versailles

Saint-Quentin-en-Yvelines

**Evaluation d'un modèle alternatif de peau dans l'étude de
l'atteinte épidermique après exposition à différents agents de
stress environnementaux:
rayonnements ionisants (RI) et ultra-violets B (UVB)**

Soutenance le 07 juin 2006

Tuteur de thèse : Marc BENDERITTER

Devant le jury composé de :

Monsieur Bernard MIGNOTTE	Président
Monsieur Bernard COULOMB	Rapporteur
Monsieur Michel SIMON	Rapporteur
Madame Claire MAS-CHAMBERLIN	Examineur
Monsieur Elian LATI	Tuteur industriel
Monsieur Philippe VOISIN	Directeur de thèse

« La peau se souvient. Nous sommes des êtres de tissu »

Eric Fottorino, *Un territoire fragile*

« Tout se résume à la peau »

Marc Gendron, *Le noir et le blanc*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Voisin pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de son service, et également pour ses conseils au cours de ma thèse.

Ce travail n'aurait pas pu être envisagé sans le financement CIFRE de l'ANRT.

Je remercie tout particulièrement Marc Benderitter pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de la thèse, pour ses conseils scientifiques, ses critiques constructives et son aide, en particulier sur le domaine du stress oxydatif.

J'exprime toute ma gratitude à l'entreprise Bio-EC, particulièrement à Elian Lati pour m'avoir permis de réaliser ma thèse et Philippe Gasser pour m'avoir guidée en histologie.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Bernard Coulomb et Michel Simon pour avoir accepté de rapporter mon travail. Je suis reconnaissante des encouragements précieux et de la gentillesse de Bernard Coulomb depuis mon DEA.

Je tiens à remercier Claire Mas-Chamberlin et Bernard Mondon de l'entreprise Sederma pour leur intérêt vis-à-vis de mon travail et leurs conseils avisés.

Radia, merci de tout cœur pour ton aide, aussi bien scientifique qu'amicale. Ton implication dans mon travail a été primordiale et tu m'as toujours encouragée dans mes périodes de doutes (manips et autres).

Merci à Fabien pour ta disponibilité, tes conseils en biologie moléculaire et ta bonne humeur.

Merci aux deux plus formidables collègues et amies qui ont partagé mon bureau ; Valérie Buard pour ta gentillesse, ton soutien au quotidien, et nos discussions enjouées ; Valérie Durand pour ton écoute et nos fous rires.

Je remercie chaleureusement mes collègues « thésards » : Sabine et Marie pour les échanges sur l'expérience de la thèse, notre avenir et notre complicité aux Journées des Thèses ; Carine et Moubarak pour leur bonne humeur et leur générosité.

Mes remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes du SRBE pour les bons moments passés ensemble, en particulier Pascale, Eric, Claire, Georges, Valérie, Frédéric et Olivier.

Enfin,

Merci à mes amis proches pour leurs encouragements durant ces années.

A Maximilien, pour sa patience... merci pour ces moments heureux passés ensemble et tous ceux à venir.

Je remercie chaleureusement ma famille, tout particulièrement mes parents, ma petite sœur et ma grand-mère, qui m'ont permis de mener à bien cette thèse afin d'obtenir le titre de « Docteur Es Sciences ». Merci pour leur écoute, leur soutien à tout point de vue et à tout moment, ainsi que leur compréhension. Je n'oublie pas mon grand-père...

Publications

- ❖ **Isoir M**, Buard V, Gasser P, Voisin P, Lati E and Benderitter M. (2006) Human keratinocyte radiosensitivity is linked to redox modulation. **Journal of Dermatological Science**; 41(1): 55-65.
- ❖ **Isoir M**, Tamarat R, Milliat F, Mondon P, Voisin P, Lati L, Mas-Chamberlin C and Benderitter M. (2006) Geranylgeranylacetone treatment accelerates skin reepithelization. Soumis à **Journal of Investigative Dermatology**.
- ❖ Benderitter M, **Isoir M**, Durand V, Buard V, Linard C, Vozenin-Brottons MC, Steffanazi J, Carsin H and Gourmelon P. (2006) Collapse of skin redox status during pathological wound healing after radiation exposure : a case report. Reviewing à **Radiation Research**.
- ❖ Milliat F, Francois A, **Isoir M**, Deutsch E, Tamarat R, Tarlet G, Atfi A, Validire P, Bourhis J, Sabourin JC and Benderitter M. (2006) Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation. Implication in radiation-induced vascular damages. Reviewing à **American Journal of Pathology**.
- ❖ Georges B, Le Borgne F, Galland S, **Isoir M**, Ecosse D, Grand-Jean F and Demarquoy J. (2000) Carnitine transport into muscular cells. Inhibition of transport and cell growth by mildronate. **Biochem Pharmacol**; 59(11): 1357-63.

Communications orales

- ❖ **Entreprise Sederma**, avril 2006 (Le Perray en Yvelines)
- ❖ **Journée des thèses IRSN**, septembre 2005 (Aussois)
- ❖ **Journée des thèses IRSN**, octobre 2004 (Aussois)
- ❖ **Journée des thèses IRSN**, septembre 2003 (Paris)

Abstracts publiés et posters

- ❖ **Congrès European Society for Dermatological Research, septembre 2005 (Allemagne)**: 1^{er} auteur de l'abstract et du POSTER : **Isoir M**, Milliat F, Tamarat R, Mas-Chamberlin C, Mondon P, Lati E and Benderitter M. Geranylgeranylacetone treatment accelerates cutaneous wound healing after ionising exposure. **Journal of Investigative Dermatology Supplement 2005**.
- ❖ **Congrès Radiation Research Society, octobre 2005 (USA)**: Milliat F, François A, **Isoir M**, Sabourin JC and Benderitter M. Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation. **Radiation Research Supplement 2005**.
- ❖ **Congrès European Society for Dermatological Research, septembre 2005 (Allemagne)**: Vereycken-Holler V, Buard V, Baudelin C, **Isoir M**, Gaugler MH and Benderitter M. Pravastatin as a modulator of vascular dysfunction after skin radiation exposure to ionising radiation. **Journal of Investigative Dermatology Supplement 2005**.

Liste des abréviations

6-4PP: Pyrimidine (6-4) Pyrimidone
AAPH: 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dichloride
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AP-1: Activator Protein-1
Apaf-1: Apoptosis Inducing Factor-1
ARN: Acide RiboNucléique
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated kinase
ATR: A-T Related kinase
Bak: Bcl-2 antagonist killer
Bax: Bcl-2 antagonist x
Bcl-2: B cell lymphoma 2
Bcl-x: Bcl-2 homologue x
BER: Base Excision Repair
BMP: Bone Morphogenetic Protein
 β -PE: Porphyridium cruentum β -PhycoErythrin
CASPASE: Cystein ASPartic Acid proteaSE
CDB: Cassure Double-Brin
Cdk: Cycline
Chk: Check point kinase
CPD: Cyclobutane Dimères de Pyrimidine
CSB: Cassure Simple-Brin
Cu/Zn SOD: Copper/Zinc containing SuperOxide Dismutase
 e^-_{aq} : électron aqueux
EBR: Efficacité Biologique Relative
EGF: Epidermal Growth Factor
ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène
FGF: Fibroblastic Growth Factor
GADD45: Growth Arrest and DNA Damage
GGA: GeranylGeranylAcétone
GM-CSF: Granulocyte-Macrophage-CSF
GPx: Glutathion Peroxydase
GR: Glutathion Réductase
GSH: Glutathion réduit
H°: hydrogène atomique

HO₂[°]: radical hydroperoxyde
H₂O₂: peroxyde d'hydrogène
HSF-1: Heat Shock Factor-1
HSP: Heat Shock Protein
IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN- γ : Interferon gamma
IL: Interleukin
JNK: c-Jun NH₂-terminal Kinase
K: Kératine
KGF: Keratinocyte Growth Factor
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MDM2: Mouse Double Minute 2
MEC: Matrice ExtraCellulaire
MMP: Matrix MetalloProteinase
Mn SOD: Manganese containing SuperOxide Dismutase
NER: Nucleotide Excision Repair
NF κ B: Nuclear Factor kappa B
NHEJ: Non Homologous End-Joining
NHEK: Normal Human Epidermal Keratinocyte
NO[°]: Oxyde Nitrique
O₂: oxygène
O₂[°]: anion superoxyde
¹O₂: oxygène singulet
°OH: radical hydroxyle
PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
RI: Rayonnements ionisants
Ser: Sérine
SOD: SuperOxyde Dismutase
TGF: Transforming Growth Factor
Thr: Thréonine
TIMP: Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
TNF: Tumour Necrosis Factor
Trx: Thioredoxine
UV: Ultra-Violet
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction générale	1
Généralités	4
Chapitre I. LA PEAU HUMAINE	4
I. Structure et fonction de la peau	4
I.1. L'épiderme.....	5
I.1.1. Au niveau cellulaire.....	5
a) La couche basale ou germinative.....	7
b) La couche épineuse ou corps muqueux de Malpighi.....	9
c) La couche granuleuse.....	9
d) La couche cornée.....	9
I.1.2. Au niveau biochimique et moléculaire.....	10
a) Les kératines.....	10
b) Les molécules d'adhérence jonctionnelle.....	13
I.1.3. L'homéostasie de l'épiderme.....	14
I.2. La jonction dermo-épidermique.....	18
I.2.1. Au niveau cellulaire.....	18
I.2.2. Au niveau biochimique et moléculaire.....	18
I.3. Le derme.....	18
I.3.1. Au niveau cellulaire.....	18
I.3.2. Au niveau biochimique et moléculaire.....	19
a) Les intégrines.....	19
b) La matrice extracellulaire.....	19
I.4. L'hypoderme.....	20
II. Modèles biologiques d'étude de la peau	20
II.1. Cultures en monocouche et modèles de peau reconstruite.....	21
II.2. Derniers modèles développés par génie tissulaire.....	22
II.3. Modèles <i>ex vivo</i> d'explant de peau humaine.....	24
Chapitre II. LES AGENTS DE STRESS ENVIRONNEMENTAUX	25
I. Interaction des rayonnements ionisants (RI) et non ionisants (UV) avec la matière biologique	26
II. Les dommages cellulaires et moléculaires des RI	28
II.1. Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) après RI dans la peau.....	30
II.2. Effets sur les macromolécules biologiques.....	31
II.3. Dommages induits par les RI sur l'ADN.....	31
III. Les dommages cellulaires et moléculaires des UV	33
III.1. Production d'ERO après UV dans la peau.....	34
III.2. Effets sur les macromolécules biologiques.....	35
III.3. Dommages induits par les UV sur l'ADN.....	35
IV. Les systèmes de défense des kératinocytes après RI et UVB	38
IV.1. Les défenses anti-oxydantes.....	38
IV.1.1. Les systèmes de défense non-enzymatiques.....	40
IV.1.2. Les systèmes de défense enzymatiques.....	41
IV.2. Les systèmes de réparation.....	41
IV.2.1. Mécanismes fidèles de réparation de l'ADN.....	42

Partie II : La radiosensibilité des kératinocytes de peau humaine irradiés aux rayonnements ionisants est liée à la modulation du stress oxydatif cutané (Article 1)94

I. Introduction94

II. Résultats95

II.1. Une corrélation est mise en évidence entre le stress oxydatif radio-induit et la mort par apoptose des kératinocytes de l'explant95

II.2. La capacité des kératinocytes à gérer le stress oxydatif radio-induit contrôle leur radiosensibilité95

III. Conclusion96

Article 1: Human keratinocyte radiosensitivity is linked to redox modulation.....97

Discussion Parties I & II98

Partie III

Objectifs Partie III104

Partie III : Mode d'action du GGA. Etude de son effet sur la phase de réépithélialisation cutanée105

I. Introduction105

II. Etude du mode d'action du GGA sur les kératinocytes au cours de la réépithélialisation105

III. Modèle expérimental.....107

IV. Résultats107

Article 2: Geranylgeranylacetone treatment accelerates skin reepithelialization109

Compléments : Résultats et illustrations du kératinocyte au cours de la phase de réépithélialisation139

Discussion Partie III145

Discussion générale & Perspectives153

Références bibliographiques158

Annexe180

Annexe 1 : Etude du pouvoir anti-oxydant du Polyphénol P180

Annexe 2 : Etude du pouvoir anti-oxydant du geranylgeranylacétone (GGA).....192

Introduction générale

La peau humaine est un organe vital qui joue le rôle de barrière contre des agressions externes multiples, notamment les rayonnements électromagnétiques. Les ultra-violet B (UVB) (280 nm à 315 nm) et les rayonnements ionisants (RI) (longueurs d'ondes inférieures à 100 nm) font partie du spectre des rayonnements électromagnétiques allant des rayons cosmiques aux ondes radios. Les RI sont très pénétrants, ils traversent toutes les couches de la peau tandis que les UVB n'atteignent que l'épiderme où ils sont stoppés.

Les effets biologiques des UVB sur la peau ont fait l'objet de nombreuses études. Les UVB sont responsables d'érythème suivi d'un épaissement de l'épiderme, et du photovieillissement. En revanche, les effets des RI ont été peu étudiés au niveau du tissu cutané. Les RI provoquent un érythème à des doses supérieures à 10 Gy. Pour des doses supérieures à 16 Gy, une desquamation humide apparaît, correspondant à une perte suffisante de cellules de la couche basale de l'épiderme pour conduire à la rupture de la barrière épidermique et à l'exsudation du sérum (associée à une forte réponse inflammatoire du derme). Ces deux types de rayonnements peuvent être à l'origine de cancers cutanés.

L'exposition de la peau à ces agents de stress environnementaux engendre une perturbation de l'homéostasie de l'épiderme, dont l'origine est la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). L'aptitude des cellules à gérer les conséquences du stress oxydatif dépend de leur capacité à mobiliser leurs systèmes de défenses anti-oxydantes et leurs systèmes de réparation. Dans le cas où ces systèmes sont dépassés, les ERO s'attaquent aux macromolécules biologiques dans l'environnement direct de leur production, et provoquent des dommages lipidiques, une oxydation des protéines et des atteintes de l'ADN nucléaire et mitochondrial. Les cellules peuvent alors se bloquer dans le cycle et auto-programmer leur élimination par apoptose.

Si les dommages tissulaires sont plus importants que la capacité de réparation de l'épiderme, l'étape de réépithélialisation pendant la cicatrisation de la zone lésée est également perturbée. En effet, les kératinocytes répondent en « s'activant », c'est-à-dire en acquérant un potentiel migratoire, pro-inflammatoire et hyperprolifératif. La capacité des kératinocytes à réépithélialiser la lésion dépend en partie de leur survie et de leur migration cellulaires.

Ainsi, différentes questions se posent :

- Peut-on caractériser le profil à priori différent des ERO produites par les RI et les UVB dans la peau ?
- Peut-on évaluer les dommages induits par les RI et les UVB au niveau du tissu cutané en terme d'atteinte oxydative et de mort cellulaire radio-induite ?
- Peut-on expliquer une différence de sensibilité individuelle aux RI et UVB par une gestion différente du stress oxydatif au niveau de la peau ?
- Quelles sont les conséquences des RI sur la cicatrisation du tissu cutané et en particulier sur l'activation des kératinocytes au cours de la réépithélialisation ?
- Peut-on moduler pharmacologiquement l'étape de réépithélialisation des kératinocytes ?

Ce travail de thèse se propose d'apporter des réponses à ces questions. Ce mémoire se décompose en trois principaux volets.

➤ **Les généralités** font le point sur les données bibliographiques concernant les principaux acteurs de cette étude. Tout d'abord, nous définirons la structure et la fonction de la peau humaine qui est un organe de protection contre les différents agents de stress environnementaux. Une attention plus particulière sera portée sur les RI et les UVB. Nous décrirons ensuite les systèmes de défense de la peau et enfin, la cicatrisation du tissu cutané.

➤ **Les Parties I & II**

La Partie I décrit d'une part la méthodologie et le développement de modèles biologiques cutanés (explant de peau humaine en survie et culture de kératinocytes) ayant pour objectif d'étudier les pouvoirs anti-apoptotique et anti-oxydant de molécules pharmacologiques. Le détail des rapports de deux molécules pharmacologiques, le Polyphénol P et le geranylgeranylacétone (GGA), est présenté en annexe.

Nous avons approfondi ces travaux par une étude comparative des RI et des UVB sur ces modèles afin d'étudier la survie cellulaire et la mesure du stress oxydatif induits par deux types de rayonnements.

A partir des résultats obtenus précédemment, **la Partie II** porte sur l'étude du lien entre la radiosensibilité des kératinocytes de peau humaine irradiés aux RI et la modulation du stress oxydatif cutané. Cette partie du travail a fait l'objet d'un premier article accepté au Journal of

Dermatological Science (Isoir *et al*, 2006). Les matériels et méthodes utilisés pour réaliser ces travaux de la Partie II sont détaillés dans l'article 1. La discussion des Parties I & II permet d'argumenter l'ensemble des résultats obtenus.

La caractérisation des pouvoirs anti-apoptotique et anti-oxydant du GGA sur la peau dans la Partie I mène à l'étude de son mécanisme d'action dans la Partie III.

➤ **La Partie III** concerne les résultats de l'étude du mode d'action de la molécule pharmacologique GGA sur les kératinocytes, et de son effet sur la phase de réépithélialisation cutanée. Cette partie du travail a fait l'objet d'un second article (soumis au Journal of Investigative Dermatology) que nous complétons par des résultats et des illustrations du kératinocyte au cours de la phase de réépithélialisation, après irradiation RI. Le protocole expérimental est détaillé dans l'article 2, ainsi que les matériels et méthodes utilisés pour réaliser ce travail. Les résultats de la Partie III sont discutés.

Le mémoire se conclue par une **discussion générale** et des **perspectives** sont avancées de manière à élargir les connaissances sur le sujet.

Chapitre I. LA PEAU HUMAINE

I. Structure et fonction de la peau

La peau constitue l'enveloppe corporelle qui assure l'interface physique entre les milieux extérieur et intérieur. Elle joue le rôle de barrière de protection contre les agressions externes multiples et évite la déshydratation de l'organisme. Elle est le siège de nombreux processus métaboliques et assure des fonctions sensorielles, immunitaires et thermorégulatrices. Cet organe vital dont l'épaisseur varie de 1,5 à 4 mm chez l'homme est constitué de trois compartiments distincts d'origine embryologique différente : **l'épiderme** (d'origine ectodermique), **le derme** et **l'hypoderme** (d'origine mésodermique) (Kanitakis, 1995) (Figure 1).

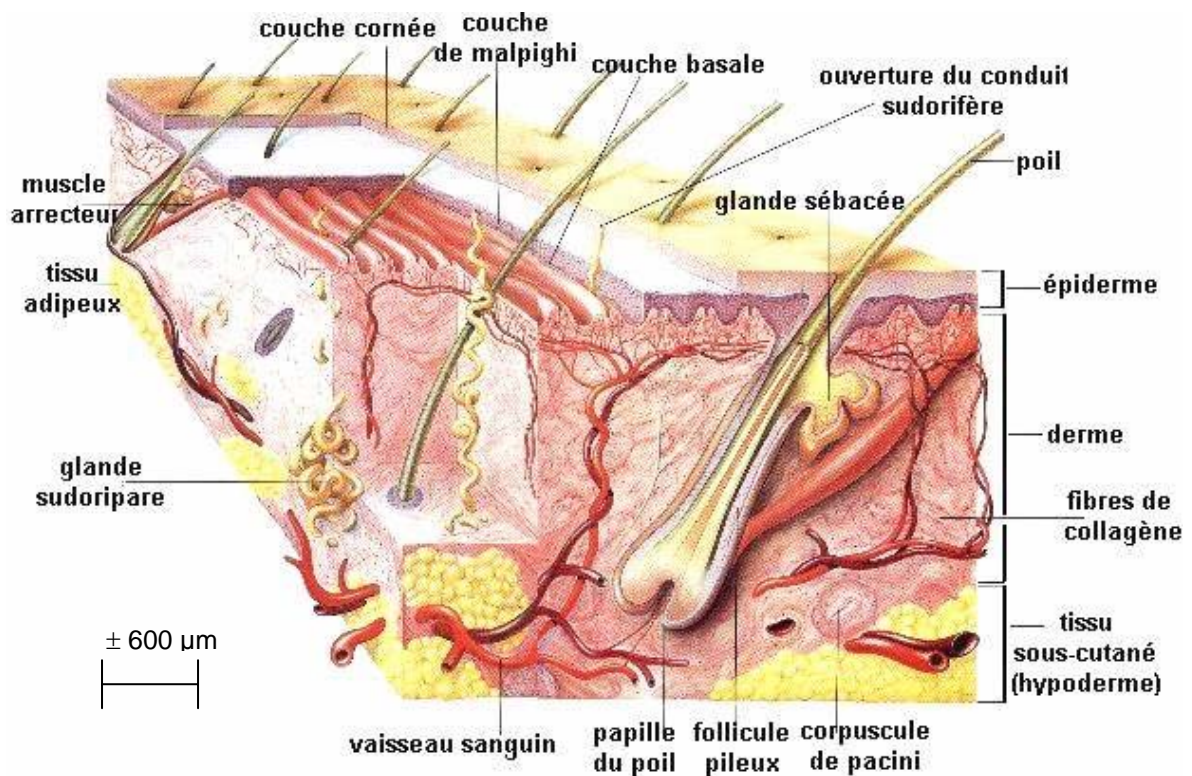


Figure 1 : Structure de la peau humaine : l'hypoderme, le derme et l'épiderme

I.1. L'épiderme

I.1.1. Au niveau cellulaire

L'épiderme constitue la couche la plus superficielle de la peau. C'est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé dont l'épaisseur varie de 0,05 à 1,6 mm en fonction de sa localisation. Il est composé principalement de **kératinocytes** (90%). Ces cellules épithéliales se renouvellent en permanence à partir d'une assise germinative basale. Elles suivent un programme de différenciation (kératinisation) qui aboutit à la formation de la couche cornée, constituée de cellules mortes anucléées et aplaties qui desquament à la surface de la peau, les cornéocytes. Ainsi, au cours de leur maturation cornée, les kératinocytes migrent de la profondeur vers la surface de l'épiderme pendant environ 30 jours chez l'homme, leur morphologie évolue et ils se répartissent en quatre couches : la couche basale ou germinative, la couche épineuse ou corps muqueux de Malpighi, la couche granuleuse et la couche cornée (Figure 2).

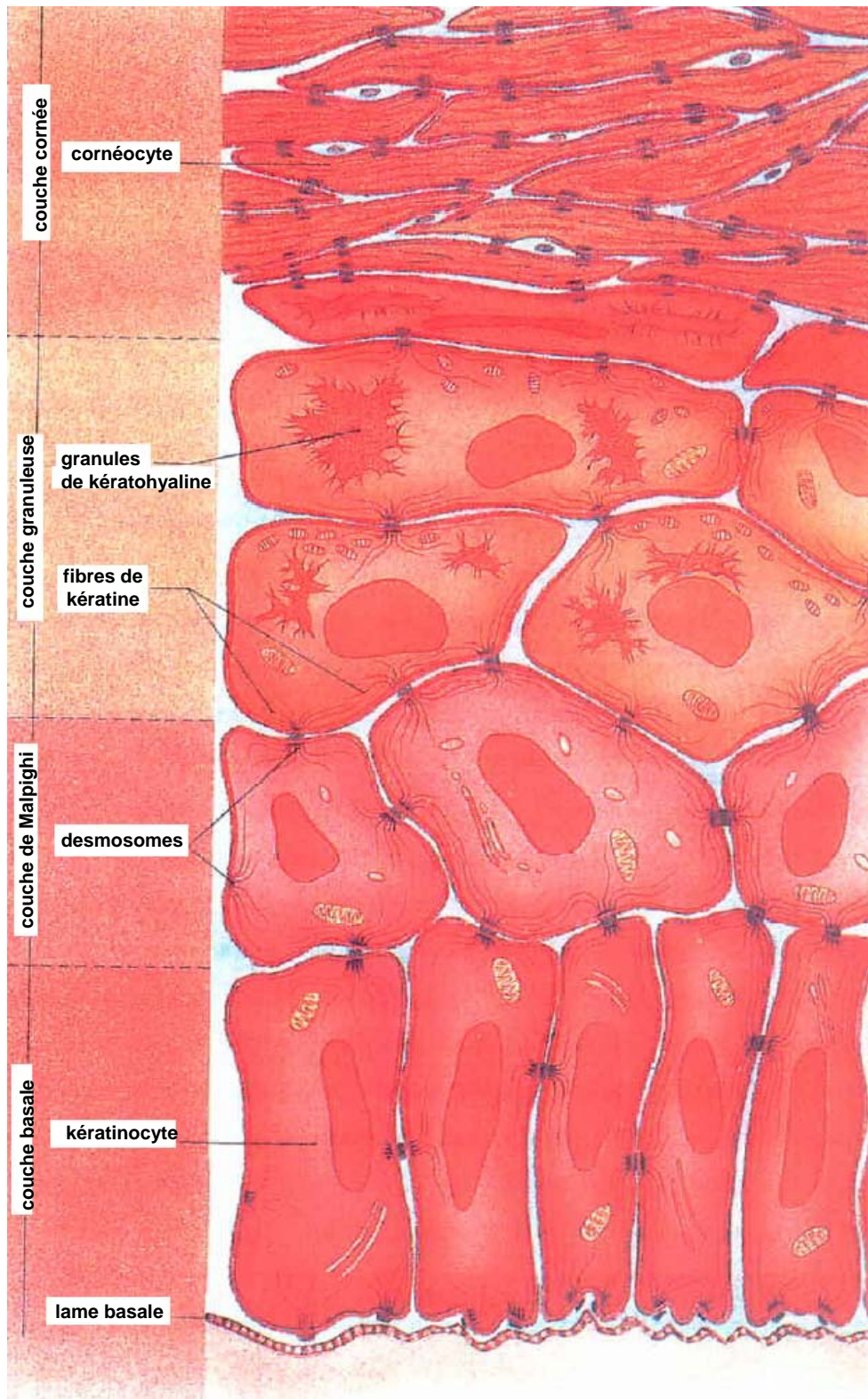


Figure 2 : Stratification de l'épiderme (Dubertret *et al*, 1987) :
couche basale ou germinative, couche de Malpighi ou épineuse, couche granuleuse et
couche cornée

a) La couche basale ou germinative

La couche basale, la plus profonde, est constituée d'une assise unique de kératinocytes cubiques ou prismatiques en division, qui possèdent un noyau volumineux et un cytoplasme basophile. Ils sont ancrés perpendiculairement à la membrane basale sous-jacente par des hémidesmosomes et aux kératinocytes voisins par des desmosomes.

Ces cellules proliférantes jouent un rôle important dans la régénération épidermique : elles expriment l'antigène Ki-67 (marqueur de prolifération) et engendrent, *in vitro*, trois types de populations cellulaires : **les holoclones, les méroclones et les paraclones** (Barrandon and Green, 1987 ; Pellegrini *et al*, 1999). Les holoclones sont principalement constitués de cellules souches, caractérisées par un fort potentiel de prolifération, ils sont représentatifs des cellules souches des kératinocytes *in vivo* (Papini *et al*, 2003). Ils engendrent deux types successifs de cellules à amplification transitoire, les méroclones et les paraclones. Papini *et al* ont montré que dans des cellules isolées d'un système de culture en 3 dimensions (3D), les méroclones, source de kératinocytes immatures, se multiplient au cours de leurs premiers passages au niveau de la couche basale, tandis que les paraclones sont générés à la fin du processus de maturation du kératinocyte (Papini *et al*, 2003).

Les **cellules souches**, pluripotentes, possèdent une **grande capacité de prolifération et d'auto-renouvellement**. La multiplication des kératinocytes provient des **cellules à amplification transitoire** qui subissent quelques cycles de division avant de s'engager dans un processus de différenciation. La localisation des cellules souches au niveau de l'assise basale dépend du site anatomique. Elles sont situées dans des endroits privilégiés ou « **niches** » leur fournissant l'environnement adéquat leur permettant de conserver leur caractère « souche » (Barrandon, 1998). Elles ont été mises en évidence dans l'épiderme le long de la couche basale en profondeur des crêtes épidermiques (Ghazizadeh and Taichman, 2005) (Webb *et al*, 2004), au sommet ou à la base des papilles dermiques selon que la peau est issue de plastron mammaire ou de paume de la main (Jones *et al*, 1995), mais aussi au niveau du follicule pileux (Oshima *et al*, 2001). Plus précisément, l'équipe de Yann Barrandon a localisé les cellules souches, dans la peau de souris adulte, dans une zone renflée de la gaine qui entoure les follicules pileux (Oshima *et al*, 2001). D'après Li and Xie, le bourgeon de cellules souches épidermiques est localisé dans une niche sous la glande sébacée (Figure 3) (Li and Xie, 2005).

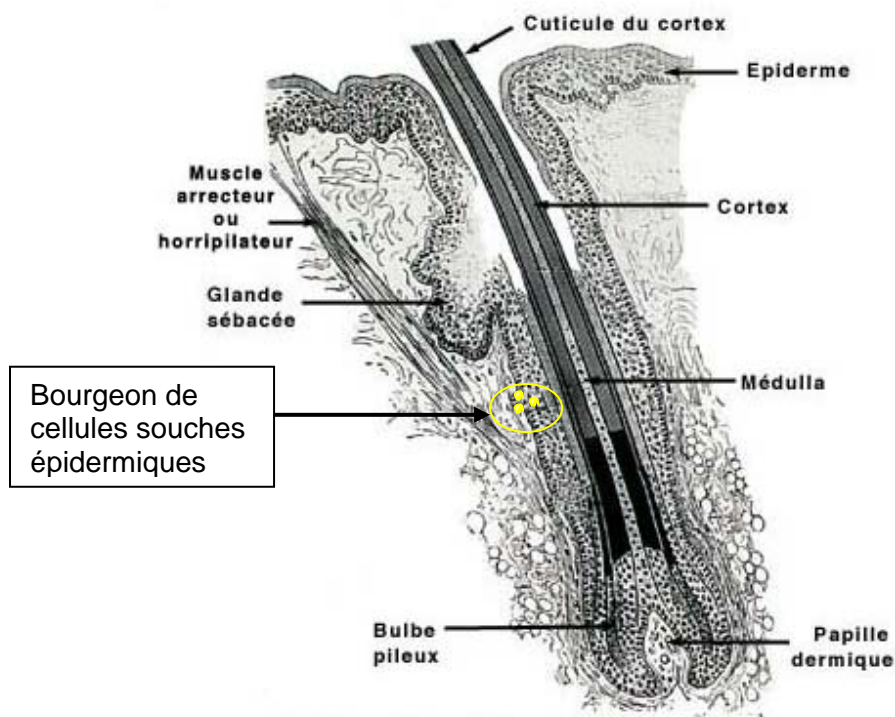


Figure 3 : Localisation des cellules souches épidermiques dans un poil
 (selon Li and Xie, 2005)

Les cellules souches peuvent suivre trois parcours de migration qui s'accompagnent de trois programmes de différenciation. Lorsqu'elles migrent vers le bas (jusqu'au bulbe pileux), elles s'engagent dans une différenciation folliculaire : leurs cellules-filles se mettent alors à fabriquer la tige pileuse (le poil). Lorsqu'à l'inverse, ces cellules souches migrent vers le haut, elles donnent naissance tantôt aux cellules de la glande sébacée (qui débouchent dans la partie supérieure du follicule pileux, juste au-dessus du manchon de cellules souches), tantôt, si elles poursuivent leur parcours, aux cellules de l'épiderme (Oshima *et al*, 2001).

Les derniers travaux de Li and Xie ont montré que deux voies de signalisation sont décrites contrôlant le comportement de la cellule souche et son devenir (Li and Xie, 2005). La première est la **voie Wnt** qui, par la régulation de l'activité de la β -caténine, amène les cellules souches à se différencier en cellules de l'épiderme (Niemann and Watt, 2002). La deuxième est la **voie BMP** « Bone Morphogenetic Proteins », opposée à la voie Wnt, qui favorise aussi l'orientation de ces cellules vers la voie épidermique (Hogan, 1996) (Figure 4).

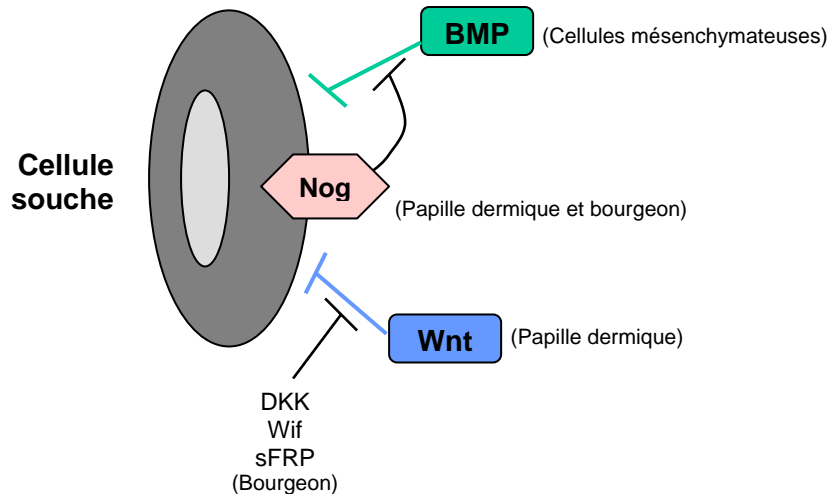


Figure 4 : Régulation de la différenciation des cellules souches épidermiques par les voies Wnt et BMP (d'après Li and Xie, 2005)

La croissance et la différenciation des cellules souches sont restreintes par l'expression des inhibiteurs de Wnt, dont DKK, Wif, sFRP et BMPs.

b) La couche épineuse ou corps muqueux de Malpighi

Elle est composée de 5 à 10 assises de kératinocytes de forme polyédrique à cytoplasme éosinophile liés entre eux par de nombreux desmosomes responsables de l'aspect « épineux » observé en microscopie optique. Ils commencent à s'aplatir au fur et à mesure de leur ascension.

c) La couche granuleuse

Elle est formée de 1 à 3 assises de kératinocytes aplatis, fusiformes et disposés parallèlement à la surface cutanée. Ils contiennent des grains de kératohyaline formés d'une protéine nommée profilaggrine, et des kératinosomes (ou Corps d'Odland) intervenant dans la constitution d'un manteau lipidique péricellulaire.

d) La couche cornée

Cette couche, la plus superficielle, est constituée de 5 à 10 assises superposées de cornéocytes, kératinocytes éosinophiles rigides très aplatis qui desquament à la surface cutanée, assurant le rôle de barrière. Ces cellules hexagonales sont dépourvues de noyaux et d'organites cytoplasmiques, remplacés par une matrice filamenteuse dense. Elles ont une membrane cellulaire épaisse, l'enveloppe cornée, constituée de plusieurs protéines dont l'involucrine, l'envoplakine et la loricrine servant à son assemblage. De plus, la

cornéodesmosine est synthétisée par les kératinocytes des couches épineuse et granuleuse, dans les derniers stades de la différenciation. Elle est détectée à l'intérieur des kératinosomes, sécrétée dans l'espace intercellulaire au niveau de la couche granuleuse et incorporée dans les desmosomes avant le bouleversement architectural qui les transforme en cornéodesmosomes. La protéolyse continue de la cornéodesmosine dans la couche cornée constitue un des phénomènes clés de la desquamation, qui peut correspondre soit à la rupture progressive de liens protéiques inter-cornéocytaires, soit à un démasquage progressif d'autres composants du cornéodesmosome (Simon *et al*, 2000). Les cornéodesmosomes diffèrent des desmosomes par l'aspect dense de leur partie extracellulaire et par la disparition de la plaque desmosomale, vraisemblablement incorporée à l'enveloppe cornée lors de sa formation (Simon *et al*, 1997).

D'autres types cellulaires s'organisent au sein de l'épiderme, qui lui confèrent des propriétés biologiques spécifiques :

- **Les mélanocytes** représentent 5 à 10% des cellules de la couche basale. Ils élaborent la mélanine responsable de la pigmentation de la peau et jouent donc un rôle déterminant dans la photoprotection.

- **Les cellules de Langerhans** sont des cellules dendritiques localisées dans les couches basales et moyennes de l'épiderme, caractérisées par la présence dans leur cytoplasme de granules de Birbeck. Elles sont capables de capturer les antigènes exogènes qui ont pu traverser la barrière cutanée puis de migrer vers les ganglions lymphatiques afin de présenter les antigènes aux cellules T et ainsi de déclencher la réponse immunitaire.

- **Les cellules de Merkel** sont des cellules neuroendocrines. Elles jouent un rôle de mécanorécepteur comme en atteste leur contact fréquent avec des terminaisons nerveuses.

À partir de l'épiderme, se forment aussi des **annexes épidermiques** qui se retrouvent au niveau du derme sous-jacent: les **follicules pileux**, les **glandes sébacées et sudoripares**.

I.1.2. Au niveau biochimique et moléculaire

La maturation des kératinocytes composée des phases de prolifération et de différenciation s'accompagne de différentes modifications de l'expression des kératines mais aussi des molécules d'adhérence.

a) Les kératines

Les kératines, d'une longueur de 10 à 12 nm dans le cytoplasme des kératinocytes, appartiennent à la superfamille des filaments intermédiaires et sont spécifiquement

exprimées dans les cellules épithéliales. Avec l'actine et les microtubules, elles constituent les principales protéines de structure du cytosquelette du kératinocyte. Elles sont également des marqueurs phénotypiques de la maturation de l'épiderme.

Ces polymères filamenteux sont divisés en deux groupes: le groupe de type I comprend les kératines acides K9 à K20 (poids moléculaire compris entre 40 et 56,6 kDa) et celui de type II les kératines basiques ou neutres K1 à K8 (poids moléculaire situé entre 53 et 67 kDa) (Komine *et al*, 2001). Les hétérodimères formés dans la cellule sont constitués d'une molécule de type I associée à une molécule de type II pour former un complexe extrêmement stable (Coulombe, 1993).

Les kératinocytes de la couche basale expriment spécifiquement les kératines K5 et K14, également K15 et K19 mais dans une moindre mesure. Ces dernières sont des marqueurs des cellules souches (Lyle *et al*, 1999) (Michel *et al*, 1996). Lorsque les kératinocytes entrent dans la voie de différenciation au niveau de la couche épineuse, l'expression des kératines épidermiques K1 et K10 spécifiques de la différenciation se substitue à celle des kératines K5, K14, K15 et K19 qui diminue alors considérablement (Fuchs, 1995). K2e est enfin exprimée au cours de la différenciation terminale (Figure 5).

L'expression des kératines K1 et K10 par les kératinocytes en différenciation est remplacée par celle de K6, K16 et K17 dans les kératinocytes activés au cours du processus de cicatrisation cutanée. Les kératines K6 et K16 jouent alors un rôle direct sur le changement du cytosquelette du kératinocyte, qui acquiert alors un phénotype migratoire qui le prépare à la phase de réépithélialisation (Paladini *et al*, 1996 ; Wawersik *et al*, 2001).

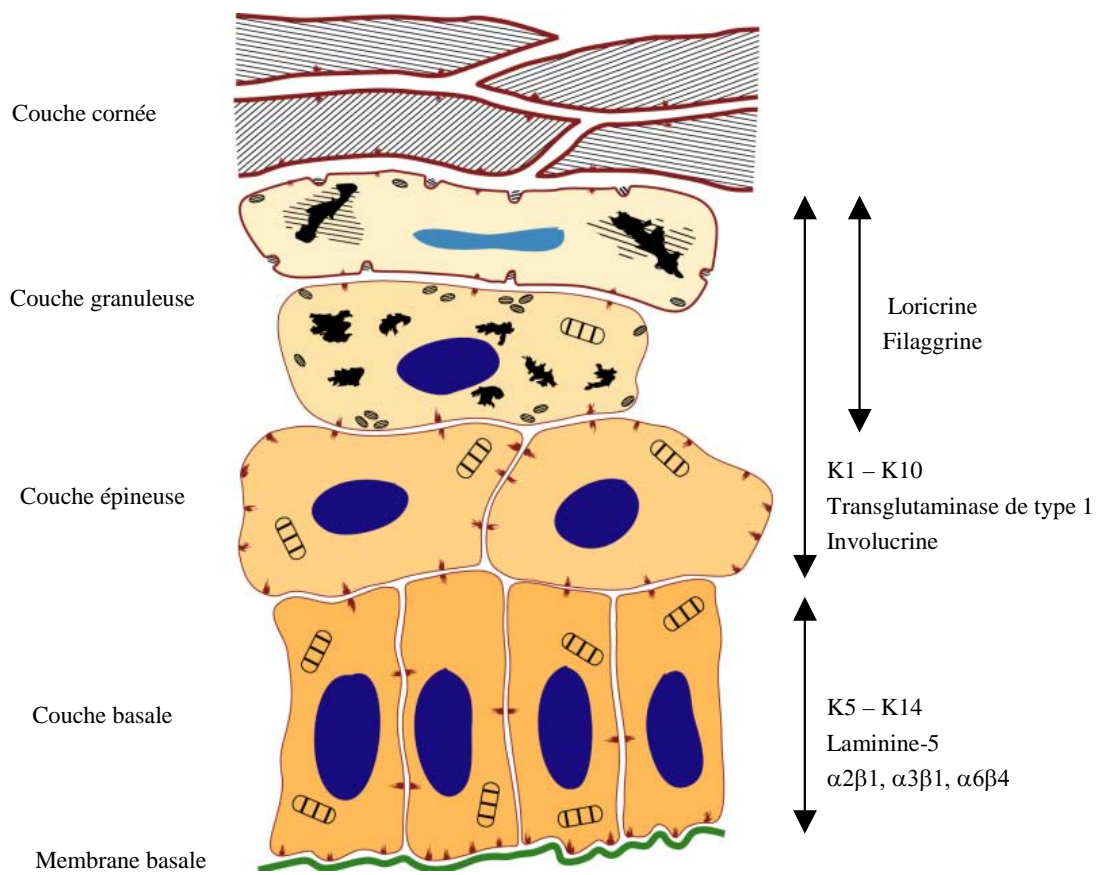


Figure 5 : Expression des protéines de structure du cytosquelette des kératinocytes lors de la différenciation épidermique

Au cours de la différenciation, l'expression des kératines est régulée principalement au niveau transcriptionnel (Fuchs, 1994 ; Coulombe *et al*, 2004). Cet aspect sera développé dans le paragraphe de l'homéostasie de l'épiderme (§ 1.1.3.). Lorsque les kératinocytes atteignent la couche granuleuse, de nouvelles protéines sont synthétisées afin de participer à l'ultime phase de la différenciation, la formation des cornéocytes. La filaggrine intervient dans l'organisation supramoléculaire des filaments de kératine en participant à leur agrégation, alors que l'involucrine et la loricrine participent à la constitution de l'enveloppe des cornéocytes, une remarquable barrière physique contre les agressions extérieures.

Au cours de l'activation, Ma *et al* ont montré que le contrôle de l'expression de la kératine K6 est aussi régulé dans un premier temps au niveau transcriptionnel. Le promoteur de K6 est fortement induit par les protéines « activator protein-1 » (AP-1), spécifiquement les combinaisons c-Fos/ Fra1/ c-Jun, et par la protéine p65 « nuclear factor kappa B » (NF- κ B) (Ma *et al*, 1997).

b) Les molécules d'adhérence jonctionnelle (intégrines, cadhérines, connexines)

Dans l'épiderme normal, deux types d'adhésion peuvent être distingués :

a. l'adhésion de type cellule/matrice extracellulaire, qui permet l'adhérence des kératinocytes à la membrane basale et qui est assurée par les hémidesmosomes et par les plaques focales, structures principalement constituées par des **intégrines**.

b. l'adhésion de type cellule/cellule, qui assure la cohésion entre les kératinocytes et qui est assurée par les desmosomes, les ceintures d'adhérence et les jonctions de type « gap », faisant intervenir des molécules de type **cadhérine** et **connexine**.

Les molécules d'adhérence sont des glycoprotéines transmembranaires et jouent un rôle important dans le processus de différenciation.

- Les **intégrines** $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_3\beta_1$, impliquées dans le contrôle de l'initiation de la différenciation, sont principalement exprimées dans la couche basale et plus faiblement vers la surface ; $\alpha_6\beta_4$, également exprimée dans les cellules basales, fait partie, mais de façon non exclusive des hémidesmosomes et contribue à l'adhésion de ces cellules à la jonction dermo-épidermique (Figures 3 et 6).

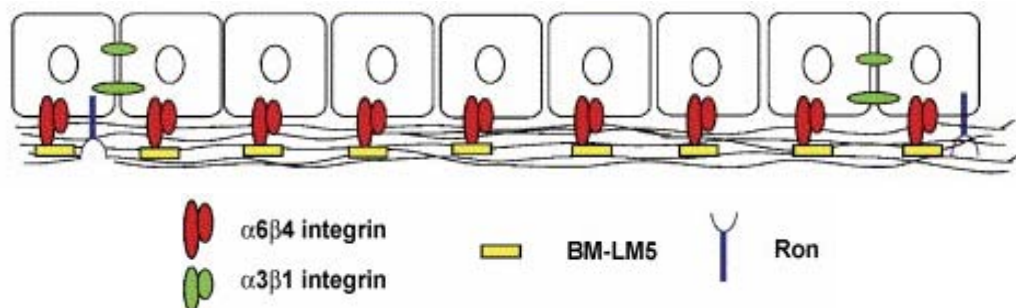


Figure 6 : Localisation des protéines de structure du cytosquelette des kératinocytes contribuant à leur adhésion à la jonction dermo-épidermique (d'après Santoro and Gaudino, 2005)

- Les **cadhérines** sont impliquées dans la structure des ceintures d'adhérence et des desmosomes au niveau des cellules épithéliales. Elles assurent l'adhérence cellulaire dépendante du calcium. Dans la peau humaine normale, la cadhérine E est principalement exprimée dans les couches suprabasales, tout comme les cadhérines spécialisées (desmogléine et desmocolline), alors que la cadhérine P est restreinte à la couche basale (Staquet, 1997).

- Les **connexines** constituent une famille de plus de 20 protéines transmembranaires qui jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie de la peau. Elles sont impliquées dans le contrôle de la maturation de l'épiderme (Brissette *et al*, 1994) car durant la différenciation de kératinocytes primaires de souris, il a été observé une variation de l'expression des connexines accompagnée de changements de perméabilité. Ce rôle est illustré par la distribution particulière des connexines dans la peau humaine : Cx 31, Cx 37 et Cx 43 dans les couches granuleuse et épineuse, Cx 26 dans la couche basale (Richard, 2000).

I.1.3. L'homéostasie de l'épiderme

L'épiderme est continuellement renouvelé pendant les différentes étapes de différenciation des kératinocytes, de leur naissance à leur mort. L'homéostasie de ce tissu est régulée par une balance entre la croissance et la mort cellulaire. En effet, l'épiderme est un tissu dans lequel prolifération et différenciation terminale sont compartimentées et étroitement régulées. Pendant la vie adulte, **la prolifération** est continue dans la couche basale de l'épiderme grâce à deux types de kératinocytes : d'une part les cellules souches qui ont une capacité illimitée de renouvellement et d'autre part, les cellules à amplification transitoire destinées à quitter le cycle cellulaire pour se différencier après quelques divisions (Potten and Morris, 1988 ; Hall and Watt, 1989). Les kératinocytes s'engagent alors dans le processus de **différenciation terminale** lorsqu'ils traversent les couches suprabasales pour se diriger vers la surface de l'épiderme.

Au cours de la cornification, processus particulier de mort cellulaire programmée correspondant aux dernières étapes du programme de différenciation terminale épidermique, les kératinocytes sont transformés en cornéocytes. Ces derniers vont s'empiler pour former la couche cornée responsable de la fonction « barrière » de la peau. Les cornéodesmosomes sont alors dégradés à la surface de la couche cornée pour permettre le détachement des cornéocytes superficiels au cours du processus de **desquamation**.

La différenciation terminale des kératinocytes est un mécanisme biologique original de contrôle de la mort cellulaire.

L'homéostasie de l'épiderme est régulée par divers mécanismes de mort cellulaire :

- **La nécrose**, processus passif de mort cellulaire, dite « accidentelle » lorsqu'elle survient lors d'un dommage tissulaire. Elle est morphologiquement caractérisée d'abord par un gonflement de la cellule, puis la membrane cellulaire éclate déversant son contenu dans le tissu environnant et provoquant une inflammation. Les mitochondries et le noyau restent intacts tout au long de ce processus.

- **L'apoptose**, processus physiologique actif de mort programmée, par lequel les cellules condamnées à mourir sont totalement éliminées en quelques minutes à quelques heures. La cellule en apoptose se caractérise par des modifications morphologiques : une condensation du cytoplasme et du noyau, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique et une perte de l'asymétrie membranaire, la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques et leur phagocytose par les cellules voisines (Peter *et al*, 1997).

- Au cours du processus de **différenciation terminale** des kératinocytes (de quelques jours à quelques semaines), les cellules forment une barrière de cornéocytes à la surface de l'épiderme (cornification) au lieu de s'engager dans un processus de destruction. Un changement de l'expression des gènes de kératine et de la structure de ces protéines a été démontré au cours de cette différenciation. Leur taille diminue de la couche basale à la couche cornée après modification post-transcriptionnelle (Fuchs and Green, 1980 ; Coulombe *et al*, 1989). Cette « autre » mort cellulaire programmée est destinée à maintenir l'homéostasie cutanée, mais les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés.

L'apoptose et la différenciation terminale ont été deux processus longtemps associés d'un point de vue morphologique. Cependant, les mécanismes moléculaires de régulation de ces deux processus sont distincts et des mécanismes particuliers anti-apoptotiques ont été décrits comme étant impliqués dans la différenciation terminale des kératinocytes (Lippens *et al*, 2005 ; Gandarillas *et al*, 1999) (Figure 7).

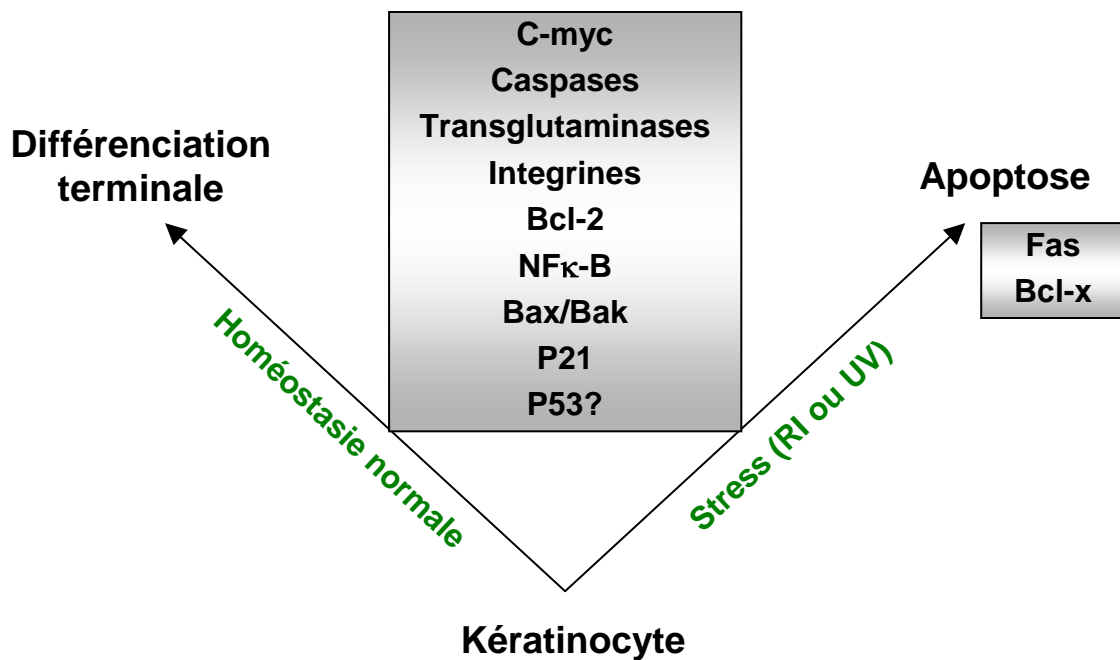


Figure 7 : Les régulateurs communs de la différenciation terminale et de l'apoptose
(d'après Gandarillas, 2000)

Les rôles de la voie Fas et Bcl-x ont été décrits dans l'apoptose des kératinocytes (Weisfelner and Gottlieb, 2003).

D'autres facteurs et voies sont impliqués dans la régulation commune de l'apoptose et de la différenciation terminale des kératinocytes humains :

- **C-myc** coordonne la prolifération et l'initiation de la différenciation terminale. Le niveau d'expression de l'ARNm de C-myc a été montré comme diminuant lorsque les kératinocytes s'engagent dans la voie de différenciation terminale (Gandarillas and Watt, 1995 ; Hurlin *et al*, 1995). Dans les kératinocytes en culture, l'activité constitutive de C-myc provoque la différenciation en engageant l'entrée des cellules souches dans le compartiment cellulaire à amplification transitoire. Ces cellules vont se diviser activement avant de s'engager dans ce processus (Frye *et al*, 2003).

- Il est intéressant de noter une corrélation inverse entre l'activité de C-myc et **l'expression des intégrines** (Gandarillas and Watt, 1997), intervenant dans le mécanisme potentiel par lequel C-myc provoquerait l'apoptose et la différenciation kératinocytaire. Les

cellules souches expriment deux fois plus d'intégrines β_1 à leur surface que les cellules à amplification transitoire (Waikel *et al*, 2001 ; Watt, 1998 ; Jones *et al*, 1995).

- Les régulateurs de l'apoptose, membres de la famille « **B cell lymphoma-2** » (**Bcl-2**) sont différenciellement exprimés dans l'épiderme. L'expression des **pro-apoptotiques** « **Bcl-2 antagonist-x** » (**Bax**) et « **Bcl-2 antagonist killer** » (**Bak**) est induite au cours de la différenciation. L'expression des **anti-apoptotiques** « **Bcl-2 antagonist homolog x** » (**Bcl-x**) et **Bcl-2** est provoquée dans les kératinocytes de la peau normale, les carcinomes basocellulaires et se voit augmentée dans diverses maladies de peau. Bcl-2 a été décrit comme contrôlant la différenciation terminale. L'expression constitutive de Bcl-2 dans l'épiderme de souris transgénique HK1/Bcl-2 et de carcinomes humains a montré qu'elle protège les kératinocytes de l'apoptose et interfère avec le programme de différenciation (Rodriguez-Villanueva *et al*, 1998 ; Harada *et al*, 1998).

- **P53**, protéine pro-apoptotique, contrôle également ces deux voies. Impliqué dans le contrôle de l'intégrité de l'ADN, il déclenche l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules dont l'ADN est endommagé et les engage à mourir. Son rôle dans l'apoptose et l'immortalisation du kératinocyte est bien établi (Ziegler *et al*, 1994) mais sa fonction dans la différenciation reste imprécise (Weinberg *et al*, 1995 ; Woodworth *et al*, 1993). D'autre part, l'inhibiteur du cycle cellulaire **p21** est impliqué non seulement dans la différenciation terminale mais aussi dans l'apoptose induite par les UV (Harvat *et al*, 1998 ; Topley *et al*, 1999). Le rôle de ces deux facteurs sera développé plus loin, dans le paragraphe des arrêts dans le cycle cellulaire (§ IV.3.).

c. La **voie IKK/NF κ -B** jouant un rôle important dans la survie cellulaire a été montrée comme étant impliquée dans le développement normal de l'ectoderme et de l'architecture de la peau (Hu *et al*, 2001; Takeda *et al*, 1999). Elle protège les kératinocytes d'une apoptose prématurée pendant les processus de migration et différenciation (Weinsfelner and Gottlieb, 2003).

d. L'activation des « cystein aspartic acide proteases » (**caspases**) est une étape centrale dans l'apoptose et critique pour la différenciation terminale des kératinocytes. La procaspase-3 est activée par clivage en **caspase-3** pendant la différenciation normale des kératinocytes humains et participe à la perte du noyau des cellules liée à l'apoptose (Weil *et al*, 1999 ; Allombert-Blaise *et al*, 2003). Il a été montré récemment que l'activation de la **caspase-14** coïncide avec la différenciation terminale embryonnaire murine (Fischer *et al*, 2005).

I.2. La jonction dermo-épidermique

I.2.1. Au niveau cellulaire

La jonction dermo-épidermique est une membrane complexe située à l'interface entre l'épiderme et le derme, élaborée à la fois par les kératinocytes basaux et les fibroblastes dermiques (Duplan-Perrat *et al*, 2000). Elle joue un rôle fondamental comme support mécanique de l'épiderme, contrôle les échanges de produits métaboliques entre les deux compartiments et laisse passer divers types cellulaires (cellules de Langerhans, lymphocytes) lors des processus immunologique et inflammatoire.

La jonction dermo-épidermique est constituée de quatre compartiments distincts, de l'épiderme vers le derme :

- **La membrane plasmique** des kératinocytes basaux et leurs hémidesmosomes
- **La lamina lucida** traversée par des filaments d'ancrage
- **La lamina densa** formant la zone d'ancrage des filaments et des fibres issus de l'épiderme et de la zone fibrillaire
- **La zone fibrillaire** constituée essentiellement de fibres d'ancrage reliant la lamina densa de la membrane basale à des plaques d'ancrage dans le derme papillaire (Uitto and Pulkkinen, 1996).

I.2.2. Au niveau biochimique et moléculaire

La jonction dermo-épidermique est composée de nombreuses macromolécules liées les unes aux autres et formant un réseau tridimensionnel avec du collagène de type IV, des glycoprotéines de structure (fibronectines et laminines), des glycoprotéines (nidogènes) et des protéoglycanes.

I.3. Le derme

I.3.1. Au niveau cellulaire

Le derme, d'épaisseur très variable selon les régions du corps, est un tissu conjonctif de soutien compressible et élastique. Il est composé de cellules, essentiellement les fibroblastes, et d'une matrice extracellulaire constituée de molécules fibreuses (collagène et élastine) baignant dans une substance amorphe nommée substance fondamentale (glycoprotéines de structure, protéoglycanes et glycosaminoglycanes). Le derme joue un rôle fondamental dans le développement et la croissance de l'épiderme (Coulomb *et al*, 1989) ainsi que dans sa différenciation (Le Panse *et al*, 1996).

Les fibroblastes sont des cellules fusiformes et mobiles grâce à leur cytosquelette développé, contenant des filaments intermédiaires de vimentine. Ce sont des cellules fondamentales du derme qui assurent sa synthèse en sécrétant les macromolécules citées ci-dessus, mais aussi des enzymes telles que les collagénases et les gélatinases (« matrix metalloproteinases » MMPs) ainsi que les inhibiteurs de ces enzymes, les « Tissue Inhibitor of MetalloProteinases » (TIMPs). Ils assurent alors l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de **la matrice extracellulaire**.

Le derme s'organise en deux couches :

- **Le derme papillaire** ou superficiel est un tissu conjonctif lâche qui s'insinue entre les crêtes de l'épiderme, formant ainsi les papilles dermiques. Il est composé de collagène de type III et VII et de fines fibres élastiques. Cette matrice est relativement riche en cellules (**fibroblastes, mastocytes et dendrocytes**) et sert de support aux fibres nerveuses ainsi qu'aux **capillaires sanguins et lymphatiques** qui constituent un véritable tissu nourricier pour l'épiderme.

- **Le derme réticulaire** ou profond se différencie du derme papillaire par un tissu conjonctif dense, principalement constitué de collagène de type I et de fibres d'élastine. Cette partie du derme contient peu de substance fondamentale et cellules conjonctives.

Le derme héberge aussi les **annexes dermo-épidermiques (follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares)** ainsi que les **cellules endothéliales** qui participent à la formation des vaisseaux. Le derme contient un important **réseau vasculaire** assurant la nutrition de l'épiderme et des **nerfs** permettant les perceptions cutanées.

I.3.2. Au niveau biochimique et moléculaire

a) Les intégrines

Les relations entre le fibroblaste et la matrice extracellulaire sont très importantes dans la régulation du métabolisme de la cellule. Ces interactions sont assurées par les intégrines et en particulier par $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_2$ et $\alpha_3\beta_3$.

b) La matrice extra-cellulaire

Les fibroblastes sont responsables de la sécrétion des composants de la matrice extra-cellulaire (MEC) et de facteurs de croissance. La MEC est un tissu riche composé de :

- **Fibres de collagène** représentant 98% de la masse totale du derme sec. Elles sont agencées en une trame assez lâche dans le derme papillaire et en trousseaux denses et

épais dans le derme réticulaire. Les collagènes I et III, les plus abondants, assurent la résistance mécanique de la peau ; les collagènes XII, XIV, IX non fibrillaires servent de lien entre les fibres, la matrice et les cellules ; le collagène des fibrilles d'ancrage de type VII est impliqué dans l'ancrage de la membrane basale dans la matrice extracellulaire du derme.

- **Fibres élastiques** constituant 2% du poids sec de la matrice et sont responsables de l'élasticité et de la souplesse de la peau. Ces fibres contiennent de l'élastine entourée de microfibrilles périphériques, composées de fibrilline.

- **Glycoprotéines de structure** (fibrilline, fibronectine, laminine), **protéoglycanes et glycosaminoglycanes** représentant 0,1 à 0,3% du poids sec de la matrice. Ils interviennent dans l'hydratation de la peau et lui confèrent une grande souplesse grâce à leurs chaînes glycosylées qui absorbent les molécules d'eau. Il s'agit de macromolécules comblant l'espace entre les fibres et les cellules dermiques.

I.4. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu sous-cutané conjonctif lâche, richement **vascularisé** et **innervé**. Il est constitué de lobules adipeux séparés par des travées conjonctives. Les lobules contiennent des **adipocytes**, riches en triglycérides et en acides gras. On retrouve aussi dans l'hypoderme des **fibroblastes**, des **dendrocytes**, et des **mastocytes** ainsi que la partie profonde des annexes dermo-épidermiques (**glandes sudoripares** et **follicules pileux**).

Ce tissu joue un rôle de réserve énergétique, de protection mécanique et thermique (Kanitakis, 1995). Il a été récemment décrit aussi comme développant des mécanismes immunologiques capables de réguler ses propres fonctions lorsqu'elles sont altérées (Caspar-Bauguil *et al*, 2005) et comme étant un potentiel réservoir de cellules souches (McIntosh *et al*, 2006).

II. Modèles biologiques d'étude de la peau

La peau est un organe accessible, étendu, visible, permettant une étude relativement facile *in vivo*. Cependant pour des raisons éthiques, les investigations *in vivo* chez l'homme sont limitées. C'est pourquoi différents modèles alternatifs ont été mis au point de façon à étudier plus facilement cet organe.

II.1. Cultures en monocouche et modèles de peau reconstruite

Les cellules proviennent de tissus cutanés humains (prélèvement de chirurgie plastique ou biopsie thérapeutique).

- Les fibroblastes sont faciles à multiplier et à conserver en culture.

Ils peuvent être cultivés **en monocouche** sur du plastique, mais cette situation est éloignée de celle qui existe *in vivo*. Il est possible de cultiver les fibroblastes en monocouche mais **sur une matrice extracellulaire** (coating de collagène) qui va favoriser l'attachement, la migration et dans une certaine mesure la différenciation fibroblastique (Ehrmann and Gey, 1956; Kleinman, 1982).

Enfin, les fibroblastes peuvent être aussi incorporés dans une matrice de collagène pour former **un derme équivalent** (Bell *et al*, 1979). Dans ce modèle en 3 dimensions, les fibroblastes retrouvent un état de différenciation proche de celui *in vivo* (Coulomb *et al*, 1983). Les dermes équivalents constituent un bon modèle pour l'étude des interactions cellules-matrice.

- La culture de kératinocytes a été mise au point plus tardivement. Ces cellules sont plus difficiles à cultiver que les fibroblastes car elles se différencient et perdent alors la possibilité de se diviser.

Après dissociation dermo-épidermique, les kératinocytes peuvent être cultivés **en monocouche** soit sur un support plastique avec un taux de prolifération modérée (Prunieras and Delescluse, 1984), soit **sur une couche nourricière** (fibroblastes 3T3 irradiés morts) permettant de cultiver les kératinocytes avec un taux de multiplication important même avec une faible densité d'ensemencement (Rheinwald and Green, 1975). La culture de kératinocytes permet d'étudier, en particulier *in vitro*, la différenciation épidermique, mais aussi les cellules souches épidermiques adultes (Oshima *et al*, 2001).

- Le modèle dermo-épidermique est obtenu à partir d'un derme désépidermisé et acellulaire et de kératinocytes isolés ensemencés à la surface de ce derme où persiste la membrane basale. Les interactions dermo-épidermiques peuvent être étudiées *in vitro*.

La différenciation de l'épiderme peut être améliorée en réalisant **une culture en interface air-liquide** (Asselineau *et al*, 1985). Ce modèle a l'avantage de présenter d'excellentes différenciation et stratification épidermiques; en revanche, seules les interactions dermo-épidermiques de type matricielles peuvent être matérialisées.

Le modèle de type E. Bell utilise le **derme équivalent** qui représente un bon support pour la culture des kératinocytes. L'épiderme peut être obtenu après **ensemencement de kératinocytes** dissociés (Bell *et al*, 1983) ou à partir de biopsies cutanées dermo-épidermiques ou épidermiques (Coulomb *et al*, 1986). L'épidermisation se fait alors par migration et prolifération des kératinocytes sur le derme équivalent. Ce modèle permet d'étudier les interactions cellules/matrice mais aussi les interactions cellules/cellules (kératinocytes/fibroblastes) (Figure 8).

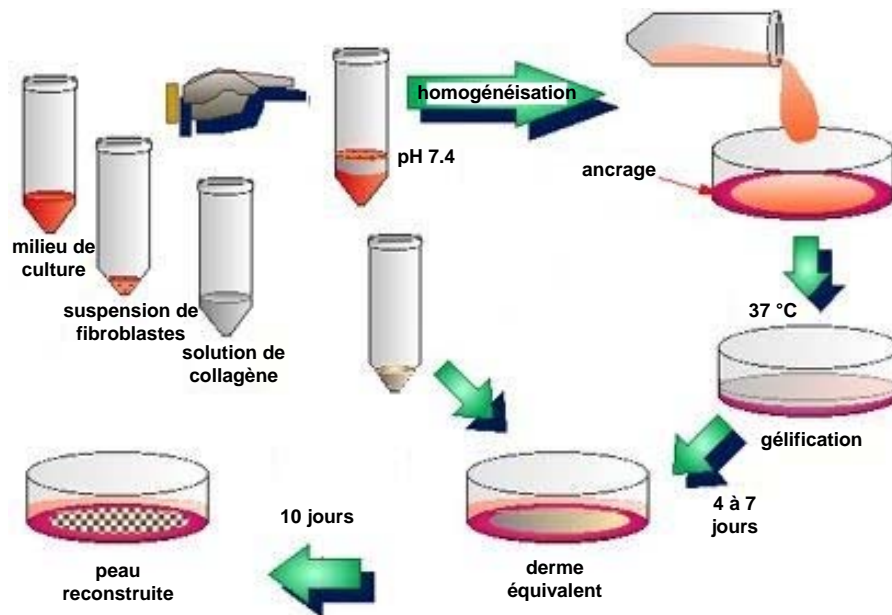


Figure 8 : Modèle de peau reconstruite : le derme équivalent épidermisé
(selon Coulomb *et al*, 1983)

II.2. Derniers modèles développés par génie tissulaire

Les modèles de peau reconstruite proposés peuvent être de structure plus ou moins complexe.

i. Par exemple, **des mélanocytes, des cellules de Langerhans** peuvent venir compléter la présence de fibroblastes et de kératinocytes (Bessou-Touya *et al*, 1998; Regnier *et al*, 1997).

ii. L'équipe de Berthod *et al* a ajouté **des cellules endothéliales** humaines dans le modèle de peau reconstruite afin d'obtenir un modèle *in vitro* contenant un réseau vasculaire préétabli (Berthod *et al*, 2001 ; Tremblay *et al*, 2005).

Ces modèles permettent d'appréhender *in vitro*, les effets d'agents pharmacologiques (Sanquer *et al*, 1990), des physiopathologies cutanées (Saiag *et al*, 1985) mais aussi peuvent servir de substituts vivants pour la greffe des grands brûlés (Coulomb *et al*, 1998; Gallico *et al*, 1984).

Enfin, le génie tissulaire a permis de confirmer l'importance de la membrane basale, structure permettant l'attachement de l'épiderme au derme afin d'assurer la conservation des **cellules souches** dans la couche basale (Figure 9). A partir d'une simple biopsie, les cellules souches marquées K19 peuvent être extraites et mises en culture (photo **A**), produire des feuillets épidermiques greffables (photo **B**) et être utilisées pour la genèse de peaux reconstruites (photo **C**) contenant une jonction dermo-épidermique ou membrane basale bien structurée (photo **D**).

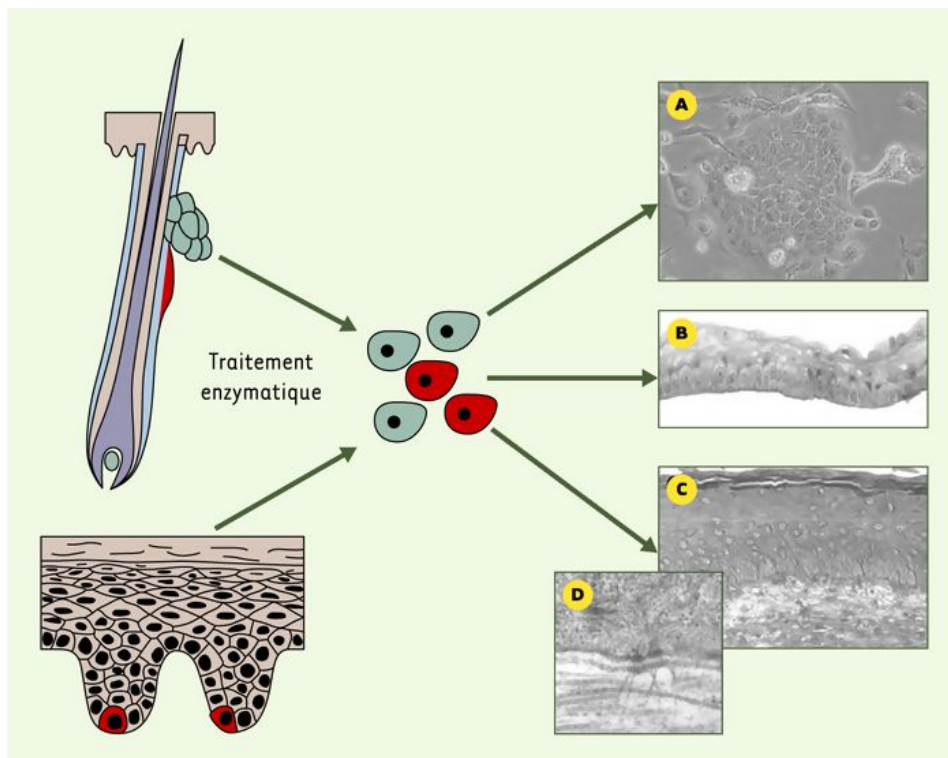


Figure 9 : Cellules souches cutanées et peau reconstruite

(données personnelles Danièle Larouche)

En rouge, cellules souches cutanées marquées K19 dans le follicule pileux ou la peau glabre

II.3. Modèles *ex vivo* d'explant de peau humaine

Un modèle *ex vivo* est facilement utilisable. L'explant de peau humaine maintenu en survie a commencé à être développé il y a une vingtaine d'années. Des études morphologiques et biochimiques montraient déjà une capacité de différenciation épidermique de l'explant identique à celle de la peau (Holbrook and Hennings, 1983).

L'utilisation de l'explant comme un modèle *ex vivo* a été optimisée et son domaine d'application élargi par l'entreprise BIO-EC. La peau obtenue à partir de plasties mammaires ou abdominales, est découpée en explants de 2 cm². Ces explants peuvent être maintenus en survie durant 12 jours sur des grilles baignant dans un milieu de culture spécifique (technique détaillée Partie I §1.2.2). En effet, ce modèle a été montré par BIO-EC comme étant proche des conditions réelles d'utilisation de produits dermatologiques et cosmétiques en terme de morphologie, structure et métabolisme normal pendant 12 jours après exérèse. L'explant a été également testé par BIO-EC comme permettant tous les types d'extraction, de séparation et de dosage réalisables (facteurs de croissance, cytokines, lipides de l'épiderme) mettant en évidence l'évaluation et la toxicité des produits. De nombreux marquages et immunomarquages histologiques peuvent être réalisés pour mettre en évidence: (i) la structure cutanée tels que les hémidesmosomes (intégrine β 4), les desmosomes (desmogléine) et les protéines de structure du cytosquelette des kératinocytes lors de la différenciation (laminine, K14, K1/K10), (ii) les cellules immunitaires (cellules de Langerhans) et (iii) les protéines de stress (HSP70/HSP72). Il permet aussi une reproduction des interactions extérieures telles que les agressions chimiques et l'exposition solaire.

L'utilisation de ce modèle biologique de type « explant cutané *ex vivo* » permet donc de se rapprocher des conditions *in vivo* et d'étudier la réponse de la peau dans son ensemble à différents agents de stress ou traitements pharmacologiques.

Chapitre II. LES AGENTS DE STRESS ENVIRONNEMENTAUX ET SYSTEMES DE DEFENSE DE LA PEAU

D'un point de vue physique, le **rayonnement électromagnétique** est composé d'une multitude d'**ondes électromagnétiques**. Les rayonnements électromagnétiques se décomposent en un **spectre continu** allant des rayons cosmiques aux ondes radios. Ce spectre intègre les rayons gamma et X (longueurs d'ondes inférieures à 100 nm), les UVB (280 à 315 nm) et UVA de basse énergie (315 à 400 nm), la lumière visible (400 à 760-780 nm) et les infrarouges (760-780 à 3000 nm) (Figure 10).

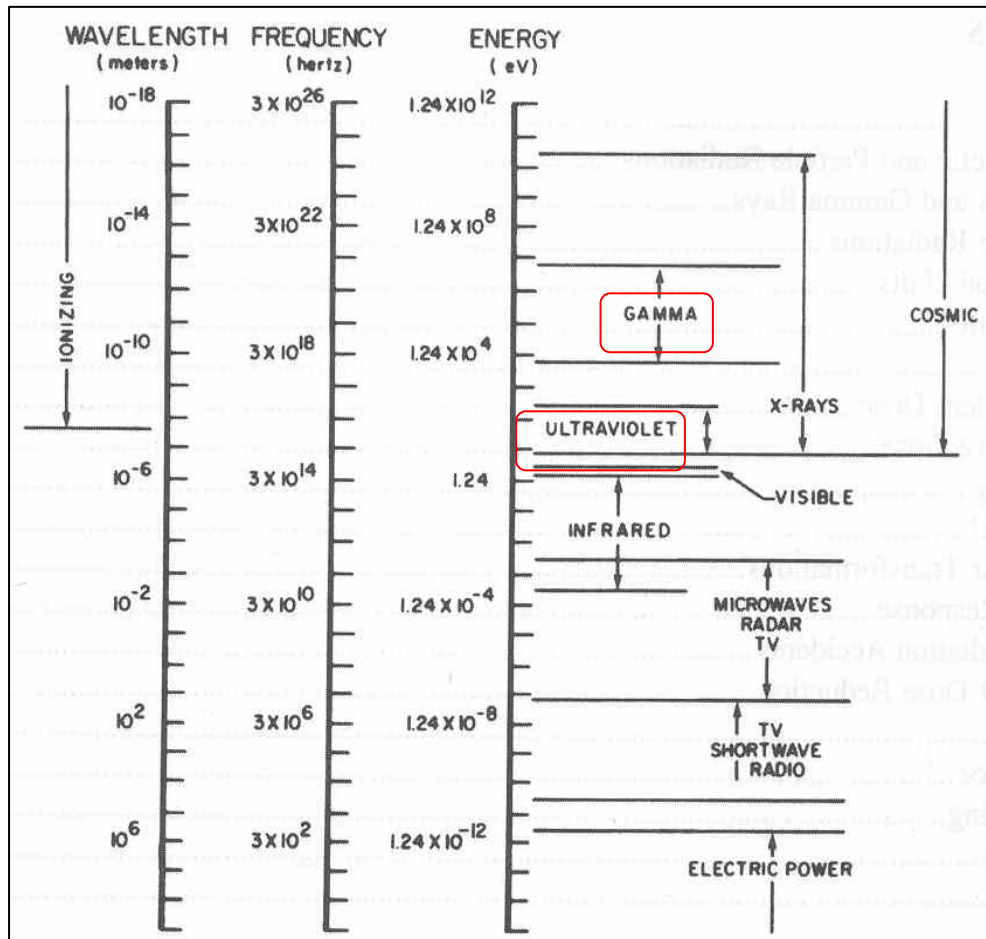


Figure 10 : Spectre des rayonnements électromagnétiques (d'après Gusev et al, 2001)

I. Interaction des rayonnements ionisants (RI) et non ionisants (UV) avec la matière biologique

En fonction de l'énergie du rayonnement électromagnétique, son interaction avec la matière biologique sera différente. On définit classiquement les **rayonnements ionisants** (rayons gamma γ et X) comme suffisamment énergétiques pour ioniser les atomes du matériau biologique traversé en leur arrachant des électrons, et les **rayonnements non ionisants** (rayons UV). L'énergie photonique de ces derniers est absorbée par des chromophores présents dans la matière biologique, ce qui les amène à un état activé ou excité.

Dans le domaine de la radiobiologie, **les différents types de rayonnements ont pu être comparés** en calculant leur **Efficacité Biologique Relative (EBR)**. Un rayonnement A sera x fois plus efficace qu'un autre B si l'énergie du rayonnement nécessaire pour obtenir le même effet biologique (par exemple la mort de 50% des cellules d'une population) est x fois plus faible ($D_B = x \cdot D_A$). L'EBR de A par rapport à B est défini par le rapport $D_B / D_A = x$. L'EBR dépend de plusieurs facteurs : la **qualité du rayonnement** ; la **dose absorbée** définie comme la quantité d'énergie absorbée par unité de masse du milieu (exprimée en Gray, Gy ; 1 Gy = 1 J / kg) ; les **conditions d'irradiation** (débit de dose qui correspond à la dose délivrée par unité de temps Gy/min), **d'environnement** (oxygénation) et le **type de cellules ou de tissus** étudiés. Classiquement en radiobiologie, l'effet biologique mesuré est le **taux de survie S**. La survie cellulaire peut être modélisée par l'équation suivante de type linéaire quadratique: $S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$, où les coefficients α et β se rapportent à la mort cellulaire des deux lignées. Le calcul des pentes α/β est spécifique d'un type de rayonnement et peut donc servir à comparer les effets de différents types de rayonnements (ici, les RI ou UVB) sur une même population de cellules (Vanmarcke *et al*, 1997).

L'étude de Corinne Petit-Frère *et al* a permis de calculer une valeur moyenne de **D_0** de 2,8 Gy pour les kératinocytes de peau humaine, dose pour laquelle 37% des kératinocytes sont encore capables de se diviser après RI (Petit-Frère *et al*, 2000). Les doses érythémateuses moyenne (DEM) après UVB sont de 100 à 200 J/m², et après UVA de 5 à 7J/m² (Pernet, 2000).

La topographie de la peau (couche la plus superficielle anatomiquement) et sa **forte radiosensibilité** (l'épiderme est un tissu à renouvellement très rapide) font de ce tissu un **organe cible des expositions aux RI et UVB**. **La distribution de dose** en fonction de la profondeur est un paramètre qui conditionnera la réaction du tissu cutané aux radiations.

Les RI γ du $^{137}\text{Césium}$ sont très pénétrants, ils traversent toutes les couches de la peau (Figure 11). La pénétration des rayonnements UV dans la peau est dépendante de leur longueur d'onde. En effet, ils pénètrent d'autant plus profondément dans la peau que leur longueur d'onde est élevée. Les UVA atteignent le derme tandis que les UVB sont stoppés dans l'épiderme.

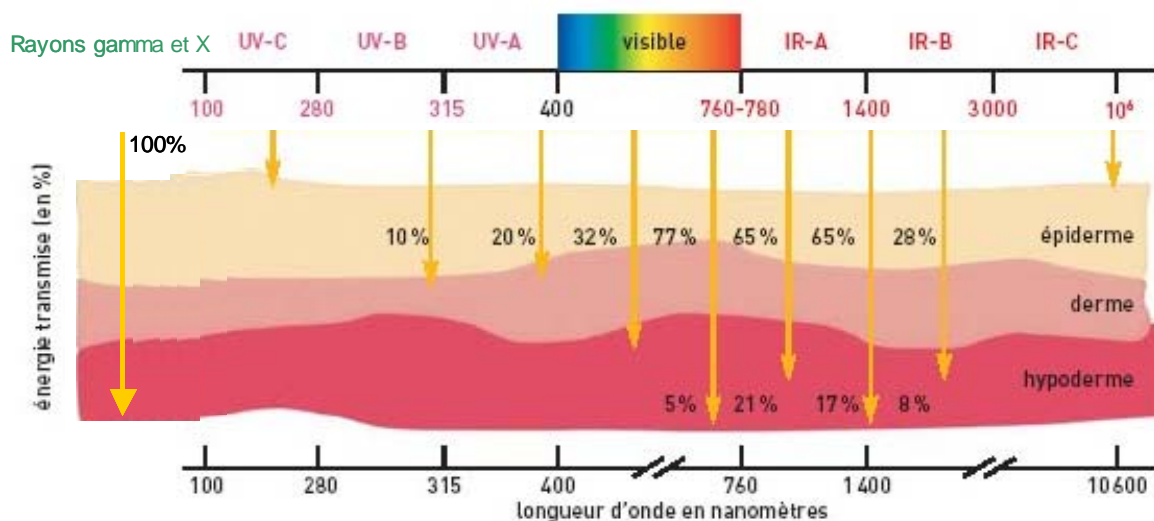


Figure 11 : Effets des rayonnements électromagnétiques sur les différentes couches de la peau humaine en fonction des différentes régions spectrales

Le spectre UV est divisé en 4 régions: Vacuum UV (100 à 200nm), UVC (200 à 280 nm), UVB (280 à 315 nm) et UVA (315 à 400 nm). L'énergie des rayonnements est exprimée en Joules/cm² (J/cm²) et est inversement proportionnelle à leur longueur d'onde.

Ainsi, les UVC sont par leur énergie les plus nocifs. Toutefois, ils n'atteignent jamais la surface terrestre car l'atmosphère, en particulier la couche d'ozone, les absorbe. Les UVB représentent seulement 5% des UV solaires qui arrivent à la surface de la terre mais ils sont 1000 fois plus efficaces pour provoquer un coup de soleil que les UVA (95% des UV solaires). La lumière solaire qui atteint la surface de la terre n'est composée que d'UVB (0,3%), d'UVA (5,1%), de lumière visible (62,7%) et d'infrarouges (31,9%) (Sage, 1993).

II. Les dommages cellulaires et moléculaires des RI

Les effets des RI sur un organisme résultent des dépôts d'énergie importants au sein des systèmes cellulaires. Au niveau microscopique, ce dépôt d'énergie se fait de façon hétérogène par « quantité discrète ». Une première approximation consiste à considérer que ce dépôt se fait de façon homogène dans une masse donnée. On distingue des **effets directs** tels que l'absorption directe de l'énergie par des biomolécules et des ionisations et des **effets indirects** résultant de l'action des espèces réactives formées lors de la radiolyse de l'eau (Figure 12).

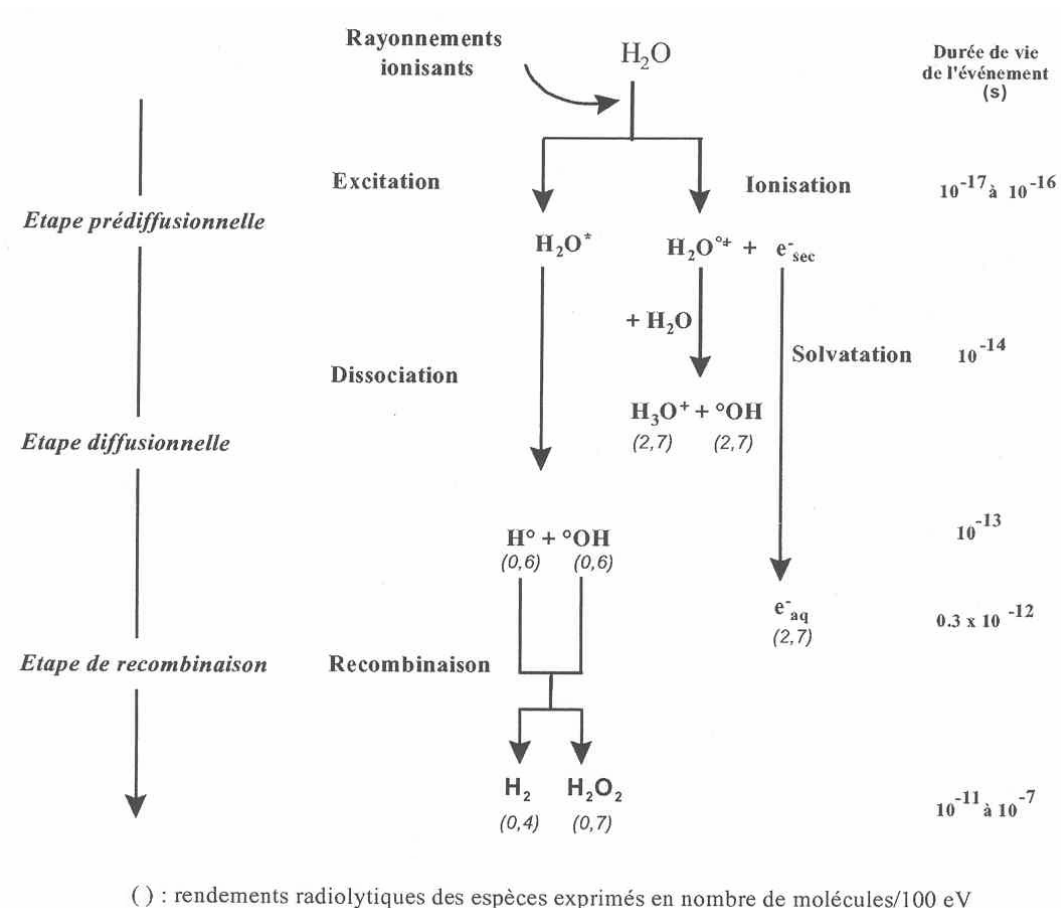


Figure 12 : Radiolyse de l'eau (Bensasson *et al*, 1993)

L'eau est ionisée et excitée générant des espèces hautement réactives telles que le radical hydroxyle °OH qui est un agent oxydant, l'électron aqueux e^-_{aq} et l'hydrogène atomique H^\bullet selon les processus décrits ci-dessus. Les radicaux produits peuvent se recombinaer et produire des espèces moléculaires (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et H_2) ou diffuser dans le milieu. En présence d'oxygène, la formation de nouvelles espèces radicalaires plus stables ayant un potentiel de diffusion plus important est favorisée. Peuvent être ainsi formés l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle HO_2^\bullet et H_2O_2 .

Les organismes vivants étant composés d'environ 80% d'eau, l'effet indirect contribue pour une large part aux dommages cellulaires radio-induits et à l'action létale des RI (Ward, 1988; Riley, 1994) (Figure 13).

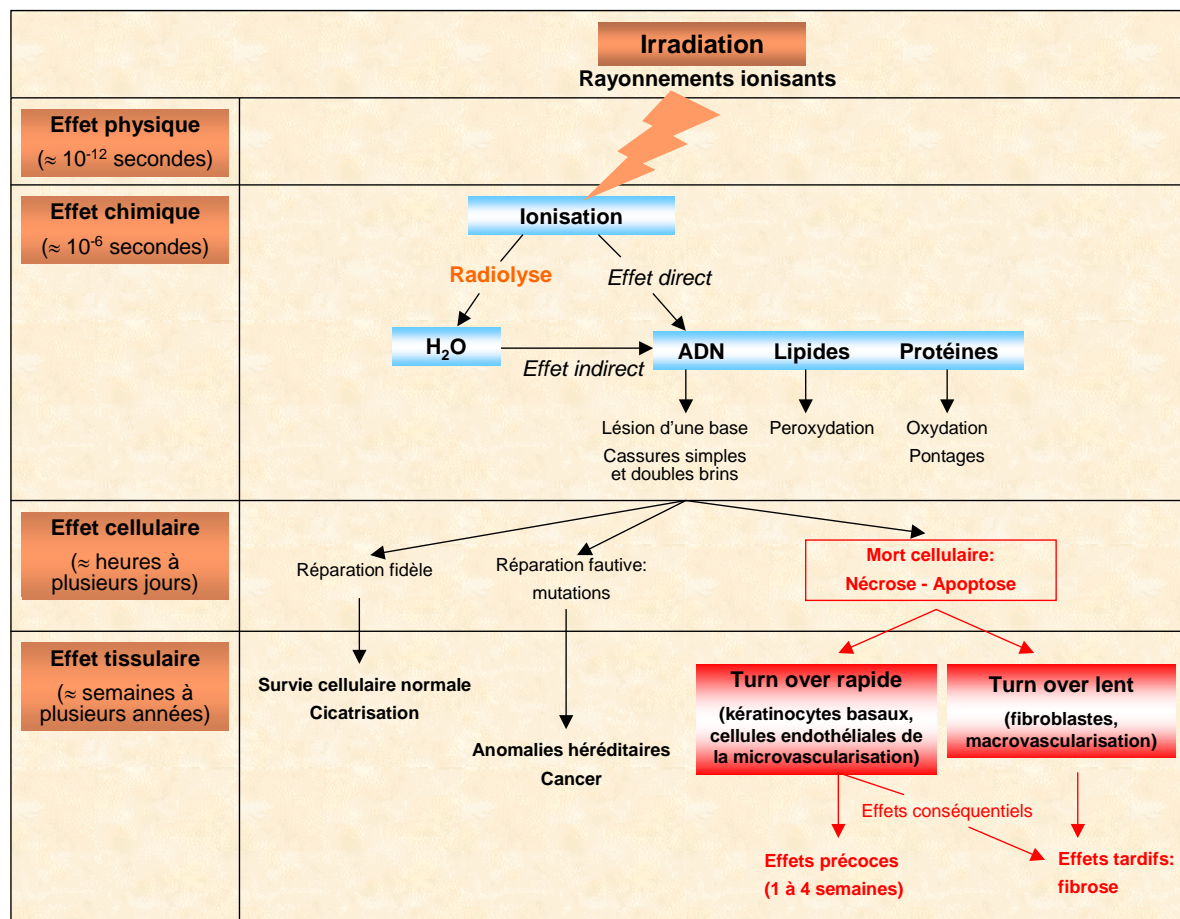


Figure 13 : Chronologie des événements déclenchés par l'exposition aux RI

II.1. Production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) après RI dans la peau

Le « **paradoxe de l'oxygène** » implique que l'oxygène peut avoir un rôle bénéfique ou néfaste sur les fonctions vitales des organismes, suivant la production ERO (Davies, 2000). A de faibles concentrations, les ERO sont impliquées dans la modulation de fonctions cellulaires (différenciation, prolifération) et régulent de nombreuses voies de transduction et l'expression de plusieurs gènes (Morel and Barouki, 1999 ; Rhee, 1999). Elles jouent aussi un rôle dans les réactions inflammatoires et dans la signalisation en tant que seconds messagers (Murrell *et al*, 1990 ; Allen, 1991). A des concentrations plus élevées, les ERO sont délétères.

Durant le processus de cicatrisation, les ERO ont un rôle très important, bénéfique et nécessaire à la réparation de la peau. Au cours de ce processus, des ERO spécifiques sont produits sur le site lésé en grande quantité par les cellules phagocytaires, et en quantité moindre par les enzymes de la famille Nox/Duox présentes dans les kératinocytes, fibroblastes et cellules endothéliales (Roy *et al*, 2006). La production de NADPH par les cellules de la zone lésée entraîne la production du radical O_2° par celles-ci. Turner *et al* ont suggéré que O_2° est capable de traverser les membranes et d'agir comme une molécule signal pendant la croissance cellulaire, induisant soit l'apoptose soit la prolifération des cellules environnantes (Turner *et al*, 1998 ; Saran and Bors, 1994). L'oxygène est un facteur limitant pour l'activation de la NADPH oxydase qui va générer des ERO à partir d' O_2 dans la peau, un processus engendré par les cellules phagocytes (cellules polymorphonucléaires PMN, neutrophiles, macrophages). L'anion superoxyde O_2° est rapidement converti par la superoxyde dismutase (SOD) en H_2O_2 , une forme perméable pour les membranes (Sen *et al*, 2002). Des concentrations micromoléculaires de H_2O_2 vont alors entraîner le relargage par les kératinocytes et macrophages de « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF), régulateur de l'angiogenèse (Khanna *et al*, 2001) et aussi la formation d'autres oxydants plus stables tels que l'acide hypochloreux, les chloramines et aldéhydes. L'induction du relargage de VEGF est également induite par l'oxyde nitrique (NO°).

Paradoxalement, les ERO peuvent aussi avoir un rôle délétère sur le processus de cicatrisation. Les ERO sont fortement impliquées dans la réponse à l'irradiation (Riley, 1994 ; Mikkelsen and Wardman, 2003). Elles sont produites par l'irradiation elle-même et par les phénomènes inflammatoires. Un lien est établi entre le stress oxydatif chronique et les dommages tardifs radio-induits (Robbins and Zhao, 2004). *In vitro*, les RI entraînent une rapide augmentation des ERO par ionisation directe des molécules d'eau et des e^-_{aq} , H° , $^{\circ}OH$, O_2° et H_2O_2 sont produits. Dus à leur instabilité et leur réactivité, e^-_{aq} et $^{\circ}OH$ réagissent

avec les molécules cibles tandis que O_2° et H_2O_2 sont relativement stables dans l'eau. Plusieurs minutes à plusieurs jours post-irradiation, les cellules génèrent des ERO et des ERO nitrées ou « reactive nitrated oxygen species » (RNOS) de façon continue dans les mitochondries, en particulier l'oxyde nitrique (NO°) important dans les mécanismes précoces de signalisation radio-induits (Mikkelsen and Wardman, 2003).

II.2. Effets sur les macromolécules biologiques

Dans le cas où les systèmes de défense sont dépassés, les radicaux s'attaquent aux macromolécules biologiques dans l'environnement direct de leur production. Les radicaux étant très réactifs et ayant une durée de vie courte, toutes les molécules biologiques possédant des doubles liaisons sont susceptibles d'être touchées et des produits de dégradation sont engendrés :

- **Dommages lipidiques** : les radicaux libres sont susceptibles d'interagir chimiquement au niveau des doubles liaisons ($-C=C-$) des chaînes d'acides gras polyinsaturés constituant les membranes (Bonfont-Rousselot *et al*, 1994). On parle de lipoperoxydation (Gutteridge and Halliwell, 1990), provoquant une désorganisation membranaire pouvant aboutir à la lyse cellulaire. Les hydroperoxydes lipidiques ainsi formés sont dégradés principalement en malonedialdéhyde (MDA) (Chaudhary *et al*, 1996) et 4-hydroxynonéol (4-HNE) (Chen and Chung, 1996) qui peuvent réagir de manière covalente avec les protéines et les inactiver. Ces produits sont très toxiques puisqu'ils peuvent également modifier l'ADN et sont impliqués dans les mécanismes apoptotiques (Ramakrishnan *et al*, 1993) et cancérigènes.

- **Oxydation des protéines** : les acides aminés peuvent être oxydés, nitrosylés (notamment les résidus tyrosine) ou carbonylés (Bonfont-Rousselot, 2004 ; Davies *et al*, 1991), ce qui provoque l'altération des voies de signalisation et entraîne une perturbation du fonctionnement cellulaire.

- Atteintes de l'ADN nucléaire et mitochondrial (§ II.3.)

II.3. Dommages induits par les RI sur l'ADN

Après exposition aux RI, le spectre des lésions de l'ADN est large (Von Sonntag, 1994 ; Cadet *et al*, 1997 ; Cadet *et al*, 2003). Sont observés des modifications des bases puriques et pyrimidiques, des pertes de bases (formation de sites « abasiques »), des cassures

simple- ou double-brins, des altérations de sucres (2-desoxyriboses) et aussi des pontages ADN-protéines et ADN-ADN (Figure 14).

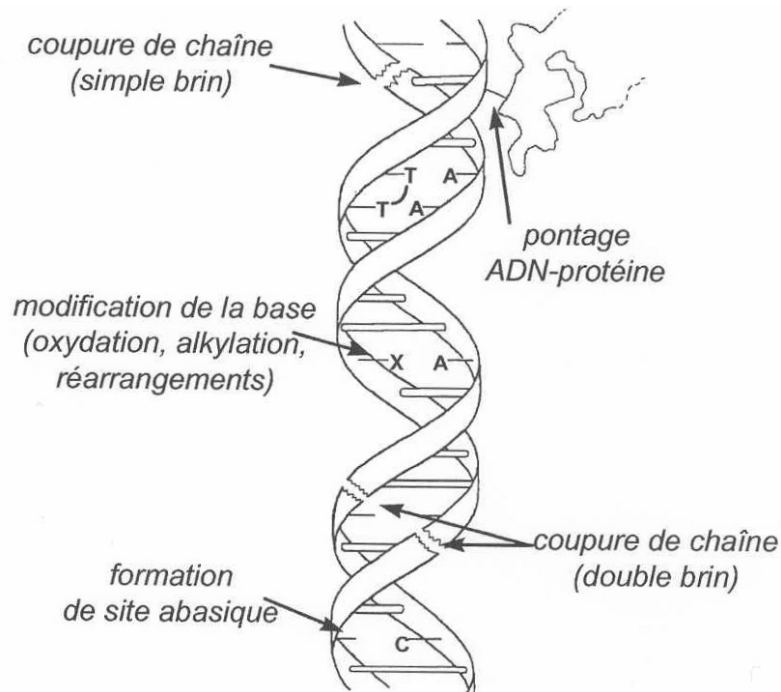


Figure 14 : Lésions radio-induites de l'ADN

- **Les cassures simple-brins (CSB)** proviennent de l'arrachement d'un atome d'hydrogène du sucre par le radical $^{\circ}\text{OH}$ conduisant à la rupture des liaisons phosphate-sucre (Tubiana *et al*, 1986 ; Von Sonntag, 1987). La formation de CSB est importante pour un rayonnement de faible TEL et augmente avec la dose d'irradiation.

- **Les cassures double-brins (CDB)** sont plus délétères. Elles se produisent à la suite de rupture des deux chaînes en des sites assez proches l'un de l'autre : un radical $^{\circ}\text{OH}$ agit sur le 2-desoxyribose (Siddiqui and Bothe, 1987) puis est transféré au deuxième brin, ou plusieurs radicaux $^{\circ}\text{OH}$ agissent sur la molécule d'ADN en des sites proches (Ward, 1985). La réparation de ces cassures peut être lente expliquant la radiosensibilité (Radford, 1986 ; Frankenberg-Schwager and Frankenberg, 1990 ; Iliakis, 1991 ; Ross *et al*, 1995).

- **Les bases modifiées** résultent principalement de l'attaque des radicaux hydroxyles sur le cycle aromatique mais sont également produites par ionisation directe. On distingue les bases pyrimidiques et les bases puriques modifiées.

- **Les pontages ADN-protéines**, dans lesquels le radical °OH peut être impliqué, peuvent se produire entre l'ADN et les protéines environnantes (Oleinick *et al*, 1987).
- **Les pontages ADN-ADN** entre les deux brins ou à l'intérieur d'un même brin (Barker *et al*, 2005).
- **Les altérations des sucres** : les radicaux °OH peuvent conduire, via l'arrachement d'un atome d'hydrogène, à la formation d'une coupure de brin par libération du 2-désoxyribose ou par l'altération du sucre qui reste relié à l'extrémité 3' ou 5' du squelette phosphodiester, ou à la formation d'un site abasique, c'est à dire un sucre altéré mais relié par l'extrémité 3' et 5' au squelette phosphodiester. Différents sucres altérés ont été identifiés (Beesk *et al*, 1979).

L'atteinte de l'ADN par les RI peut avoir de graves conséquences somatiques ou héréditaires en altérant la synthèse de protéines fondamentales au fonctionnement de la cellule. L'ADN mitochondrial est plus facilement touché de par sa localisation dans la cellule, et ses dommages sont très inefficacement corrigés. Ils peuvent provoquer des mutations induisant l'altération de la chaîne respiratoire engendrant une **production accrue d'ERO**.

Les molécules d'ADN endommagées sont souvent impliquées dans des voies de signalisation conduisant à l'apoptose. Elles sont à l'origine, au niveau physiologique, de modifications de la croissance cellulaire et de phénomènes liés à l'inflammation (Davies, 2000 ; Remacle *et al*, 1995).

III. Les dommages cellulaires et moléculaires des UV

Les altérations tissulaires, séquelles d'expositions aux rayons UV, résultent d'une vaste gamme de réponses photobiologiques cellulaires. Le point de départ de ces réactions est l'absorption d'énergie photonique par des molécules appelées chromophores. En absorbant de l'énergie, ces molécules se transforment en un état activé ou excité. L'énergie absorbée est très rapidement utilisée pour l'induction de réactions photochimiques ou elle est dissipée par fluorescence ou chaleur (Applegate and Frenk, 2001) (Figure 15).

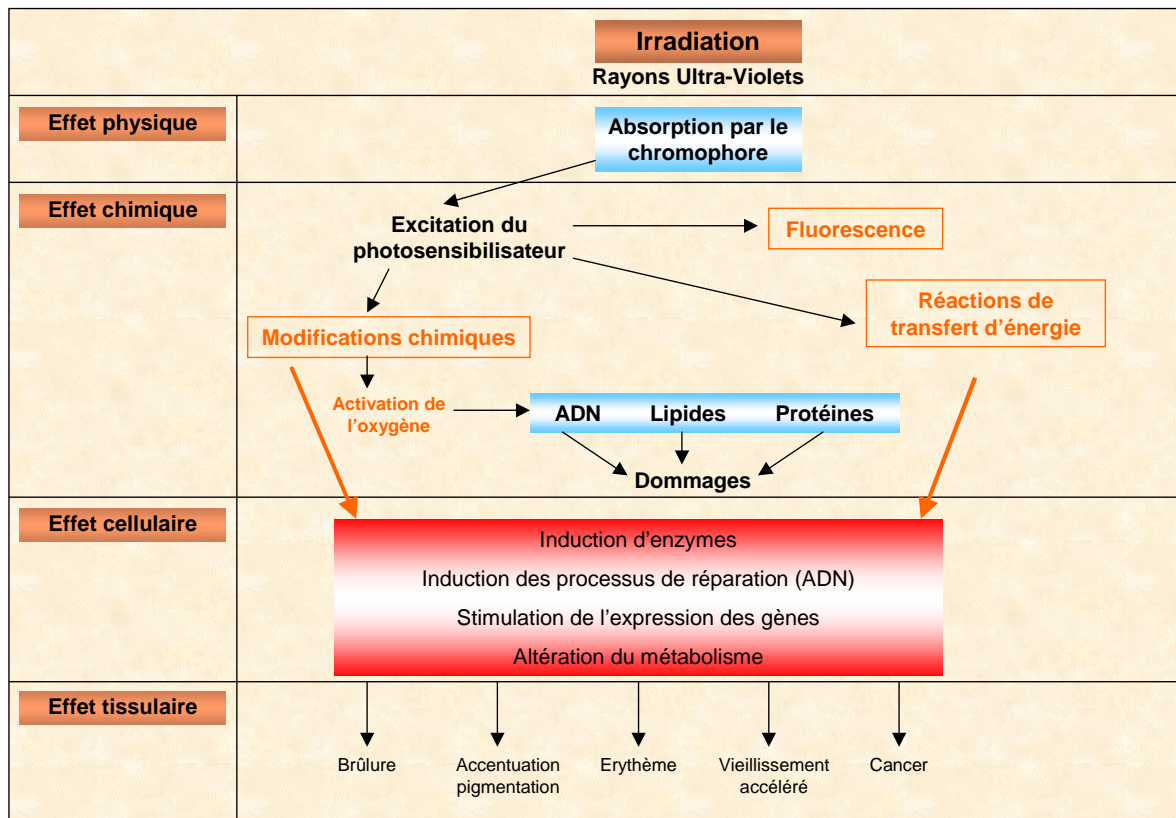


Figure 15 : Séquences d'évènements résultant de l'absorption de rayons UV

A l'issue des processus photophysiques, le photosensibilisateur dans un état excité dit triplet est susceptible de participer à des réactions de transfert de charge (type I) ou de transfert d'énergie (type II) pouvant ainsi conduire à l'activation de l'oxygène (Morlière, 2001).

Nous nous focaliserons principalement sur l'effet des rayons UVB, source d'irradiation de notre synthèse bibliographique.

III.1. Production d'ERO après UV dans la peau

Parmi les ERO susceptibles d'être formées dans les premières étapes des processus de photosensibilisation, on rencontre l'oxygène singulet 1O_2 , premier état excité de l'oxygène et assez réactif, et $O_2^{\bullet-}$ premier état de réduction mono-électronique de l'oxygène, beaucoup moins réactif vis-à-vis des substrats biologiques. En revanche, le radical HO_2^{\bullet} l'est beaucoup plus et peut jouer un rôle spécifique dans des compartiments acides de la cellule. H_2O_2 est lui aussi peu réactif, alors qu'avec $O_2^{\bullet-}$, ils sont reconnus comme jouant un rôle majeur dans

le stress oxydant, en participant à des réactions impliquant des ions métalliques telle que la réaction de Fenton dans laquelle l'ion ferreux réduit H_2O_2 en $^{\circ}OH$, très réactif.

Les UV stimulent l'induction des NO-synthases inductibles et la production de NO° par les kératinocytes contribue à l'érythème, par ses propriétés vasodilatatrices (Deliconstantinos *et al*, 1995) et à la stimulation de la mélanogénèse (Romero-Graillet *et al*, 1997).

III.2. Effets sur les macromolécules biologiques

Les différentes longueurs d'onde d'UV induisent différents effets biologiques et physiques. La différence fondamentale entre les UVB et les UVA réside essentiellement au niveau de la nature de leur chromophore.

- L'absorption des UVB par les acides nucléiques et certains acides aminés entraîne des dommages chimiques directs dans les macromolécules qu'ils composent: l'ADN, l'ARN, les protéines. Les UVB jouent un rôle majeur dans la mutagenèse, la carcinogénèse mais aussi dans la pigmentation et l'érythème cutanés (Tornaletti and Pfeifer, 1996; Mitchell and Nairn, 1989; Parrish *et al*, 1982).

- Les UVA sont à l'origine de réactions de photo-oxydation qui, de façon indirecte, peuvent endommager l'ADN, les protéines et les lipides insaturés des membranes cellulaires, par la production d'ERO (Tyrrell, 1996). Ils sont responsables du photo-vieillessement (Kligman, 1989) et comme les UVB, ils sont impliqués dans la photocarcinogénèse (Agar *et al*, 2004).

Les radiations solaires produisent directement ou par l'intermédiaire des ERO des lésions dans l'ADN. En l'absence de réparation, ces lésions peuvent provoquer des altérations dans les gènes clés du contrôle de la prolifération cellulaire comme les gènes suppresseurs de tumeurs et les oncogènes, entraînant le développement de cancers.

Les trois principaux types de cancers de la peau ont pour origine: les kératinocytes, pour les carcinomes basocellulaires et les carcinomes spinocellulaires et les mélanocytes, pour les mélanomes.

III.3. Dommages induits par les UV sur l'ADN

Parmi les macromolécules biologiques, les dommages induits par les UV ont été particulièrement mis en évidence dans l'ADN.

- Les modifications oxydatives au niveau de l'ADN après UV sont des cassures simple-brin, des pontages ADN-protéines, des modifications de base comme la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (Peak *et al*, 1987 ; Cadet *et al*, 2005) (Figure 16).

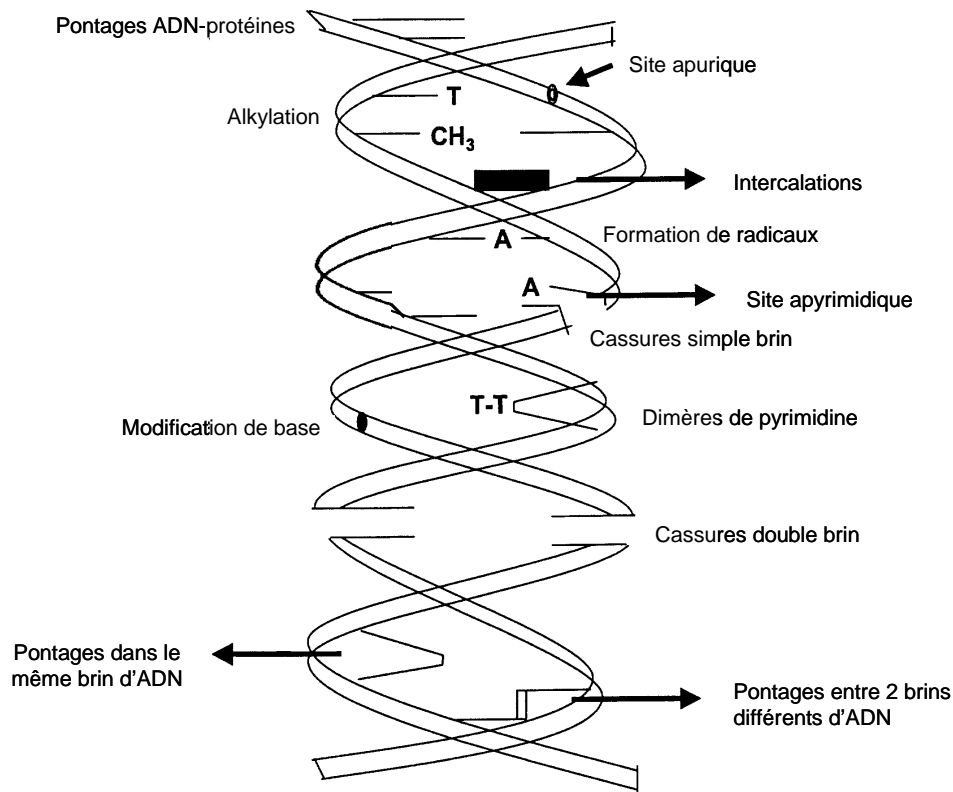


Figure 16: Schéma représentant les différents types de lésions induites par les agents génotoxiques (Balajee and Bohr, 2000)

Les dommages produits par les UV sont essentiellement la formation de **photoproduits dimériques entre deux bases pyrimidiques adjacentes** (Cadet *et al*, 2005). Il s'agit des dimères de type cyclobutanes (CPD) et des photoproduits (6-4) pyrimidone, dont le taux dépend de la dose d'UV.

- **Les cyclobutanes dimères de pyrimidines (CPD)** : créés en plus grand nombre, ils sont produits par les UVC, UVB et UVA. Les UVB produisent 1000 fois plus de CPD que les UVA et 100 fois moins que les UVC (Perdiz *et al*, 2000; Kuluncsics *et al*, 1999). Les CPD sont formés par deux liaisons covalentes entre les atomes C5 et C6 de deux pyrimidines adjacentes sur le même brin d'ADN. Plusieurs diastéréo-isomères peuvent se former selon la position des deux noyaux pyrimidiques par rapport au cyclobutane (isomérisie cis ou trans)

et selon l'orientation relative des deux liaisons C5-C6 (isomérisie syn- ou anti-). Pour des raisons stériques, seuls les dérivés syn sont formés dans l'ADN et l'isomère cis est largement majoritaire (Taylor and Brockie, 1988). Le taux de CPD dans l'ADN dépend de la longueur d'onde et de la dose d'UV. Les CPD les plus observés sont les TT>TC>CT>CC avec une fréquence en pourcentage de 53:21:19:7 après irradiation aux UVB (Mitchell *et al*, 1992).

Les photoproduits comportant une cytosine sont plus difficilement isolables puisqu'ils subissent une réaction rapide de désamination qui introduit une base uracile à la place d'un résidu cytosine (Figure 17).

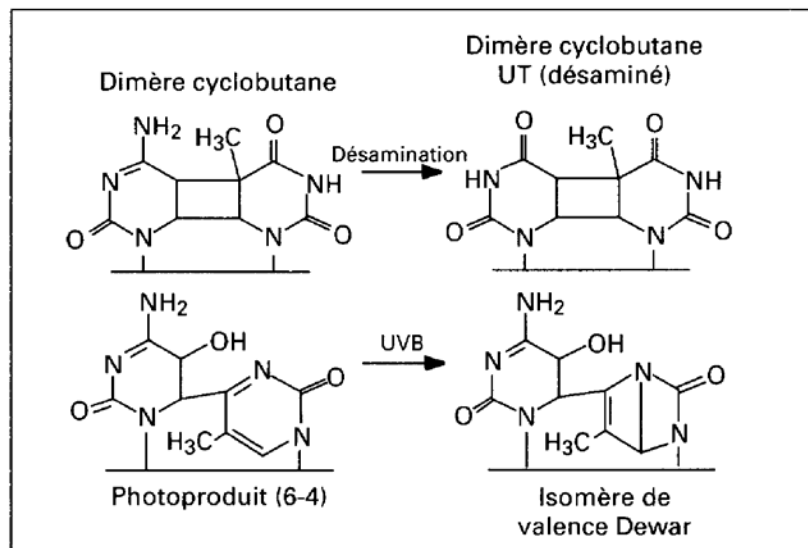


Figure 17: Structures chimiques et réactions secondaires des photoproduits dimériques de pyrimidines (Douki and Cadet, 2001)

- **Les photoproduits pyrimidines (6-4) pyrimidone (6-4PP)** : ils sont formés par une liaison covalente entre les carbones C6 et C4 de deux pyrimidines adjacentes situées sur le même brin d'ADN (Figure 17). Ils sont générés par les UVC, UVB mais pas par les UVA (Courdavault *et al*, 2005). Leur distribution après une irradiation aux UVC est la suivante: TC>CC>TT>CT avec une fréquence de 76: 20: 4: 0 % (Kotturi *et al*, 1998). La formation des 6-4PP est proportionnelle à la dose d'UV (Pfeifer *et al*, 1991).

- **L'isomère de valence Dewar** : sa formation résulte de la conversion du noyau pyrimidone d'un 6-4PP après exposition aux UVB (Mitchell and Rosenstein, 1987) (Figure

17). Les UVB induisent directement cet isomère avec une fréquence de 7% (Clingen *et al*, 1995).

Il est intéressant de noter qu'après une irradiation à des doses biologiques de cellules de mammifères, le taux de formation des CPD, 6-4PP et isomère de Dewar sont respectivement 1 ; 0.12 ; 0.014 pour les UVB (Perdiz *et al*, 2000).

Autres lésions : modifications de purines (dimérisation de l'adénine, réaction de l'adénine avec une thymine adjacente) (Kumar *et al*, 1987; Zhao and Taylor, 1996), les **hydrates de pyrimidines** et les **thymines glycols** (Bourre *et al*, 1987; Gasparro and Fresco, 1986). Néanmoins la fréquence de ces lésions par rapport aux CPD est très faible et le rôle de ces lésions dans la mutagénèse photo-induite reste encore mal connu.

IV. Les systèmes de défense des kératinocytes après RI et UVB

Face aux effets délétères des ERO produites après RI et UVB, les cellules ont la capacité à s'adapter et se défendre contre ce stress (Barton *et al*, 1985 ; Kehrer, 1993).

L'aptitude des cellules à gérer les conséquences du stress oxydatif, suite à l'exposition aux RI et aux UVB, dépend en partie de leur capacité à mobiliser leurs systèmes de défenses anti-oxydantes et leurs systèmes de réparation. Si ces deux systèmes sont dépassés, les cellules peuvent se bloquer dans le cycle et auto-programmer leur élimination par apoptose.

L'efficacité de ce réseau de défenses anti-oxydantes est basée sur une cascade de réactions en chaîne, et dépend de la localisation de ces systèmes dans la cellule. En effet, compte-tenu de la distance de diffusion des ERO et du fait de leur grande réactivité, les systèmes de défense ne sont efficaces que s'ils sont présents sur le site de production des ERO.

IV.1. Les défenses anti-oxydantes

L'état redox de la peau se définit par une balance entre le taux d'oxydants et d'anti-oxydants. Ainsi, l'augmentation de la formation d'ERO ou la déplétion d'anti-oxydants (enzymatiques et non-enzymatiques) peuvent perturber cet équilibre et le déplacer vers un état oxydé. Une augmentation du niveau d'anti-oxydants, comme la superoxyde dismutase (SOD) et la

catalase, peut également perturber cet équilibre et faire pencher la balance vers état réducteur du tissu.

Il faut noter que l'essentiel des travaux de la littérature sur le rôle des défenses anti-oxydantes des fibroblastes et des kératinocytes a été réalisé avec des irradiations UVA. Cependant, la contribution des UVB, même si elle est négligeable dans le déclenchement du stress oxydant, est importante dans l'expression des conséquences de ce stress. Les UVB agissent en aval de ce déclenchement notamment et modifient les systèmes de défense ou de régulation (Morlière, 2001). Les kératinocytes ont une meilleure résistance comparée à celle des fibroblastes en terme de photocytotoxicité (Moysan *et al*, 1996). Cette différence est la résultante d'un système de défenses anti-oxydantes plus importantes chez le kératinocyte (Applegate and Frenken, 2001).

Les systèmes de défense agissent à différents niveaux de la cascade d'activation de l'oxygène (Figure 18) et sont de plusieurs natures.

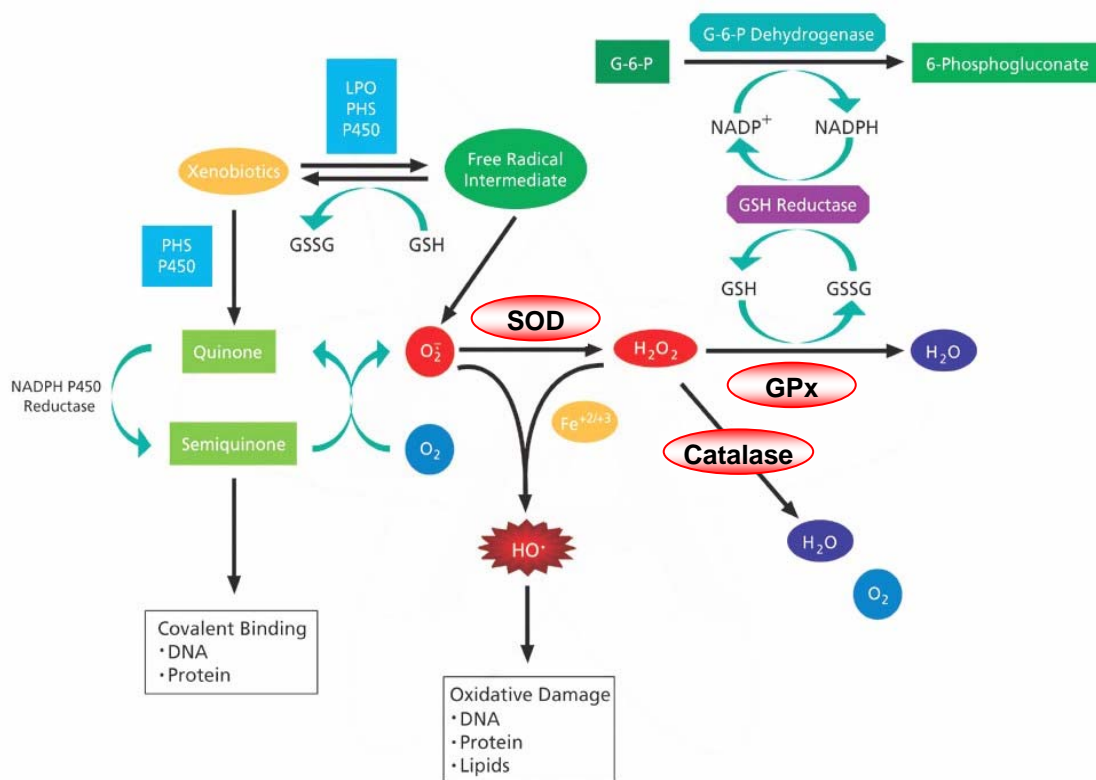


Figure 18 : Systèmes biologiques de défenses anti-oxydantes

LPO : Lipoxgénase, PHS : Prostaglandine H Synthase, P450 : Cytochrome P450

GSH : Glutathion réduit, GSSG : Glutathion disulfide

IV.1.1. Les systèmes de défenses non-enzymatiques

Les systèmes de défenses non-enzymatiques sont représentés par des petites molécules comme la vitamine E, la vitamine C et les caroténoïdes.

La vitamine E, apportée par l'alimentation et trouvée dans l'organisme sous la forme α -tocophérol, est lipophile et située dans toutes les membranes cellulaires (Valk and Hornstra, 2000). Elle est un puissant anti-oxydant, elle s'oxyde en piégeant O_2 , O_2° , OH° ou un radical peroxyde lipidique produit dans les membranes biologiques ou peut donner H° qui va neutraliser les radicaux libres. Elle peut ensuite être réduite par GSH ou par **la vitamine C**, aussi apportée par l'alimentation. Des taux importants de vitamine E ont été observés au niveau du sébum de la couche cornée, 3 fois plus que dans le derme et l'épiderme humain. La régulation de la Vitamine E joue un rôle dans les processus de renouvellement de l'épiderme et de sa différenciation, par son gradient de transport à travers les membranes épidermiques lipidiques (Thiele *et al*, 2001).

Le glutathion et **la thioredoxine** (Trx) sont des piègeurs de radicaux hydroxyles et d'oxygène singulet, ils permettent de générer des espèces réduites pour les enzymes anti-oxydantes. On peut également citer l'ubiquitine, l'acide urique, la transferrine, l'apotransferrine, la métallothionéine et certains acides gras monoinsaturés tels que l'acide oléique.

IV.1.2. Les systèmes de défenses enzymatiques

Les systèmes de défense enzymatiques sont représentés par les enzymes anti-oxydantes (Pugliese, 1998) : les SOD, catalase et glutathion peroxydases (GPx).

- **Les SOD** dismutent les radicaux O_2° en H_2O_2 selon la réaction suivante (Deby, 1991) : $2 O_2^{\circ} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. On distingue trois types de SOD selon le métal agissant comme cofacteur métallique et leur localisation subcellulaire, catalysant toutes la même réaction : la « copper/zinc containing superoxide dismutase » Cu/Zn SOD (cytoplasmique constitutive et extracellulaire), la « manganese containing superoxide dismutase » Mn SOD (mitochondriale et inductible) et la « iron containing superoxide dismutase » Fe SOD (exclusivement chez les procaryotes).

- **La catalase** catalyse la décomposition de H_2O_2 en H_2O et O_2 selon la réaction suivante : $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. Elle se situe dans les peroxysomes où les réactions d'oxydations produisent H_2O_2 : la catalase le détruit au fur et à mesure de sa formation.

- **Les GPx** peroxydent H_2O_2 en eau, en utilisant le GSH comme donneur d'hydrogène ($H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$). Ces enzymes sont sélénium-dépendantes et essentiellement cytosoliques. Le rapport GSH sur glutathion oxydé, généralement élevé, est

maintenu constant grâce à l'action de la **glutathion réductase (GR)** qui réduit le glutathion oxydé. Les GPx peuvent aussi réduire les hydroperoxydes provenant en particulier de la peroxydation des acides gras polyinsaturés en alcool.

Dans l'épiderme, de faibles concentrations de SOD sont présentes. Les produits du glutathion sont localisés dans l'épiderme et le derme, particulièrement dans les fibroblastes, tout comme les produits de la thioredoxine réductase en grande quantité dans l'épiderme. La GPx agit en même temps que la catalase en détoxifiant le peroxyde d'hydrogène dans les peroxysomes des cellules cutanées (Pugliese, 1998 ; Shindo *et al*, 1994 ; Rhie *et al*, 2001).

IV.2. Les systèmes de réparation

Les systèmes de réparation des biomolécules sont plus ou moins complexes et peuvent se décliner en trois étapes :

- La reconnaissance des lésions
- L'excision des lésions
- La restitution de biomolécules intègres

Nous avons choisi de décrire uniquement les mécanismes de réparation les plus impliqués après exposition aux RI et aux UVB.

- La réparation des **peroxydes lipidiques** portés par les triglycérides s'effectue après reconnaissance par les phospholipases A₂ et C, qui éliminent sélectivement les acides gras oxydés. La GPx réduit alors les hydroperoxydes libérés. La réparation est complète après réacylation par l'acide gras coenzyme A à longue chaîne (Van Kuijk *et al*, 1985).

- La réparation des **protéines** oxydées se produit après reconnaissance des protéines aberrantes (présence d'un résidu oxydé chargé négativement à la surface des protéines) et dégradation de celles-ci grâce à la macroxyoprotéinase (MOP) avant une nouvelle synthèse à partir des acides aminés libérés.

- Dans la suite du paragraphe suivant (§ IV.2), nous ne détaillerons que les systèmes de réparation des dommages induits à l'ADN par les RI et/ou les UV: la photoréactivation enzymatique, la réparation par excision de bases, par excision de nucléotides et par religation non-homologue.

IV.2.1. Mécanismes fidèles de réparation de l'ADN

- **Après UV, la photoréactivation enzymatique** est le mécanisme par lequel l'enzyme photolyase induit la cassure des liaisons C5-C6 et C6-C6 pour les CPD et des liaisons C4-C6 pour les 6-4PP (Todo *et al*, 1997), en utilisant l'énergie de la lumière visible pour restaurer la base dans sa forme native par transfert d'électron (Sancar *et al*, 1984).

- **Après RI et UV, la réparation par excision de bases (BER)** est une voie très importante qui s'applique aux petites modifications de bases de l'ADN (Seeberg *et al*, 1995). Elle est capable de réparer la plupart des dommages spontanés de l'ADN causés par le métabolisme interne de la cellule ainsi qu'une multitude de dommages oxydatifs tels que la 8-oxoguanine (Cadet *et al*, 2000). Il existe deux mécanismes : la voie courte qui est majoritaire et la voie longue.

Le mécanisme court de la BER est le suivant (Memisoglu and Samson, 2000): une ADN glycosylase enlève la base endommagée par hydrolyse de la liaison N-glycosylique située entre la base et le désoxyribose, créant ainsi un site abasique (AP). Une AP endonucléase clive l'ADN en 5' du site abasique ou une AP lyase coupe en 3' du site abasique. Le résidu pentose phosphate est enlevé par une phosphodiesterase. La brèche créée est refermée par polymérisation (à l'aide de l'ADN polymérase β) puis ligation par l'ADN ligase III.

D'autres protéines, telles que les ADN polymérases δ et ϵ , et « proliferating cell nuclear antigen » (PCNA) permettent d'augmenter l'activité de la réparation et font partie du processus long de réparation de la BER (Memisoglu and Samson, 2000).

- **Après UV principalement et RI minoritairement, la réparation par excision de nucléotides (NER)** agit sur des lésions volumineuses qui distordent de façon conséquente la double hélice d'ADN, comme les dimères de pyrimidines générés par les UV. Ce type de réparation est ubiquitaire.

Les différentes étapes de la NER sont les suivantes: reconnaissance du dommage de l'ADN par un complexe protéique, ouverture de la double hélice d'ADN au niveau de la lésion, double incision de part et d'autre de la lésion qui conduit à l'excision d'un oligonucléotide de 24 à 32 nucléotides, resynthèse et ligation.

Ce système de réparation est divisé en deux voies qui se recouvrent partiellement (Tornaletti and Hanawalt, 1999) : la réparation couplée à la transcription (TCR) qui concerne la réparation rapide et efficace des lésions localisées sur le brin transcrit par l'ARN polymérase II des gènes actifs ; la réparation globale du génome (GGR) qui concerne la réparation plus lente de l'ADN non transcrit.

Il est intéressant de noter que la réparation par NER des 6-4PP est rapide et complète 24h après l'exposition aux UV alors que ce n'est pas le cas pour les CPD et l'isomère de valence Dewar (Perdiz *et al*, 2000).

IV.2.2. Mécanismes non fidèles de réparation de l'ADN

Après RI et UV, la religation non-homologue (NHEJ) : les dimères non excisés peuvent alors bloquer les fourches de réplication et donner lieu à la formation de cassures double-brins qui peuvent être réparées par les systèmes de recombinaison homologue en phase G2 ou par le système de religation non homologue ou « Non Homologous End-Joining » (NHEJ). Cependant, la réparation des cassures double-brins par NHEJ fonctionne mal en hyperthermie. De plus, le système translésionnel des polymérases moins fidèles peut permettre une synthèse translésionnelle en face de dimères.

Si les lésions dans l'ADN provoquées par les RI et les UVB ne sont pas éliminées par les systèmes de réparation de l'ADN, ces photolésions engendrent des **mutations** qui sont transmises aux cellules filles. Ces mutations peuvent, lorsqu'elles affectent les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, participer au processus de **genèse des cancers**.

Dans certaines maladies humaines héréditaires provoquant une grande sensibilité au rayonnement solaire, des mutations inactivant des protéines impliquées dans le système NER sont systématiquement rencontrées. Trois pathologies principales sont liées à des défauts dans les gènes du système : le **xeroderma pigmentosum (XP)**, le **syndrome de Cockayne** et la **trichothiodystrophie (TTD)**. Tous les malades présentent une déficience dans la réparation de l'ADN et, dans le cas particulier du syndrome XP, l'hypersensibilité au soleil accompagnée d'une incidence des cancers de la peau chez ces malades est 1000 fois supérieure à celle des individus normaux.

IV.3. Les arrêts dans le cycle cellulaire

Nous venons de montrer que les RI et les UVB engendrent une grande diversité de lésions moléculaires dans tous les compartiments sub-cellulaires. Après un dommage à l'ADN, les cellules s'arrêtent dans le cycle cellulaire et/ou rentrent en apoptose. Ces processus impliquent un nombre important de facteurs dont la protéine p53.

Le niveau protéique du **gène suppresseur de tumeur p53** est induit rapidement en réponse aux dommages de l'ADN par les RI et les UV. La protéine p53 est un régulateur clef de

nombreux gènes à la fois impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (induit l'expression de Bax et de p21^{Waf-1/Cip1} et réprime Bcl-2) (Moll and Zaika, 2001 ; El-Deiry, 1998 ; Levine, 1997 ; Kuerbitz *et al*, 1992), deux voies dans lesquelles la cellule va choisir de s'orienter. L'arrêt du cycle cellulaire permet aux cellules d'identifier et de réparer les dommages de l'ADN. Le processus d'apoptose va empêcher la multiplication des cellules endommagées et non réparées.

Chez l'homme, l'induction par différents stress de **modifications post-traductionnelles de p53** impliquent 18 sites. Des sites de phosphorylation ont été identifiés sur l'extrémité N-terminale de p53 alors que l'extrémité C-terminale contient des sites de phosphorylation, d'acétylation et de sumoylation (Apella and Anderson, 2001). Ces sites sont impliqués dans les modifications post-traductionnelles de p53 après exposition aux RI et UVB (Figure 19).

- Dans l'**extrémité N-terminale**, sept sérines (Ser) (6, 9, 15, 20, 33, 37 et 46) et trois thréonines (Thr) (18, 55 et 88) peuvent être phosphorylées.
- Dans l'**extrémité C-terminale**, les Ser 315 et 392 sont phosphorylées, les lysines 320, 373 et 382 sont acétylées, enfin la lysine 386 est sumoylée suite à différents stress. En revanche, les Ser 376 et 378 sont phosphorylées de manière constitutive.

Les RI entraînent rapidement la phosphorylation des Ser 6, 9, 15, 20, 33 et Thr-18 (Dumaz and Meek, 1999 ; Shieh *et al*, 1999 ; Unger *et al*, 1999 ; Siliciano *et al*, 1997) et la déphosphorylation de Ser 376, tandis que les UV entraînent la phosphorylation de presque tous les sites Ser : Ser 6, 9, 15, 20, 33, 37, 46, 315, 392 (Bulavin *et al*, 1999 ; Sakaguchi *et al*, 1998 ; Siliciano *et al*, 1997) mais aussi la Thr 81 (Buschmann *et al*, 2001) et l'acétylation de la lysine 320 de manière importante. La phosphorylation induite par les UV apparaît plus tardivement mais persiste plus longtemps (Saito *et al*, 2003).

L'acétylation de la lysine 382 a été démontrée après exposition aux deux rayonnements (Sakaguchi *et al*, 1998).

La kinase **ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated kinase)** est impliquée dans la phosphorylation de la Ser 15 de p53 en réponse aux RI (Banin *et al*, 1998 ; Canman *et al*, 1998) et la kinase **ATR (A-T Related kinase)** est capable de phosphoryler les Ser 15 et 37 de p53 en réponse aux UV (Tibbets *et al*, 1999).

La stabilisation de p53 résulte essentiellement de l'inhibition de l'interaction entre p53 et « **Mouse Double Minute 2** » (**MDM2**), qui va entraîner sa dégradation par ubiquitination (Prives *et al*, 1999).

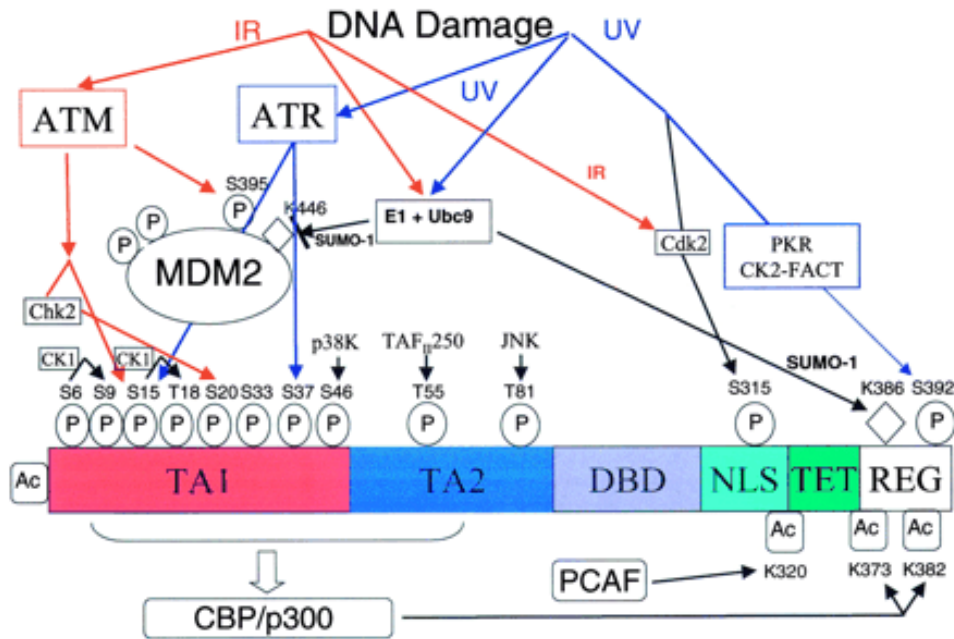


Figure 19 : Modifications post-traductionnelles de la protéine p53 induites après dommages à l'ADN (d'après Appella and Anderson, 2001)

Le polypeptide p53 de 393 acides aminés est décomposé en différentes régions associées avec : TA (« transactivation »), DBD (« sequence-specific DNA binding »), NLS (« nuclear localization »), TET (« tetramerization »), et REG (« DNA-mediated negative regulation of specific DNA binding »). En réponse aux RI, ATM va phosphoryler p53 directement et indirectement par l'activation d'autres kinases (Chk1 et Chk2) et MDM2.

Après exposition aux UV, ATR, p38 MAPK et le complexe CK2-FACT sont activés et phosphorylent des résidus spécifiques. P53 et MDM2 sont alors modifiés après liaison avec SUMO-1, par un mécanisme médié par E1/Ubc9. Les dommages à l'ADN vont empêcher la liaison de MDM2 avec SUMO-1 en inhibant son ubiquitination, ce qui stabilise MDM2 et augmente le taux de dégradation de p53.

IV.3.1. Les arrêts du cycle cellulaire aux points de transition (*checkpoints*)

Les arrêts dans le cycle cellulaire sont provoqués soit par une voie indépendante de l'ADN (voie des céramides), ou dépendante de l'ADN. Nous nous intéresserons exclusivement à cette dernière. Les arrêts du cycle cellulaire sont liés à l'activation d'un signal cellulaire induit par la reconnaissance des lésions de l'ADN dues aux deux rayonnements (Hartwell and Weinert, 1989). Ils permettent aux mécanismes de réparation de prévenir les anomalies de réplication (transition G1-S) ou les aberrations chromosomiques pendant la mitose (transition G2-M). On notera que l'arrêt transitoire en G1 marque fréquemment l'entrée en apoptose.

L'exposition des cellules aux RI ainsi qu'aux UVB peut conduire à :

- un arrêt en fin de phase G1 (Figure 20) dans les lignées exprimant une protéine p53 normale, du à la transactivation et l'élévation du niveau d'expression de **p21^{Waf-1/Cip1}**.

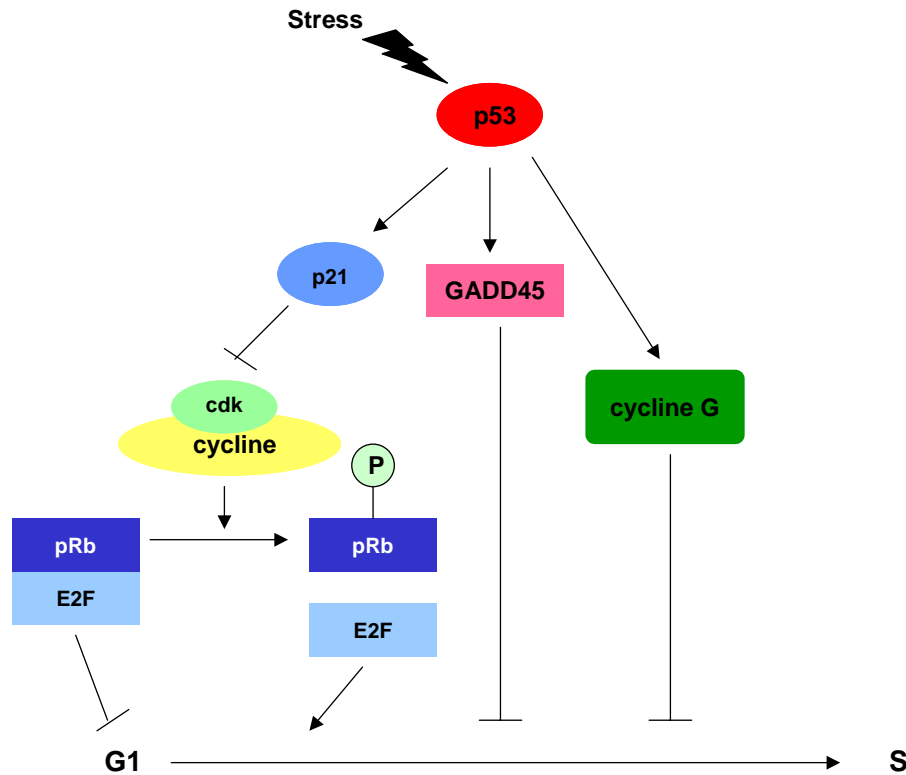


Figure 20 : Les différentes protéines impliquées dans l'arrêt en G1 dépendant de p53

Cette protéine **p21^{Waf-1/Cip1}** a été identifiée comme un inhibiteur important de nombreuses kinases dépendantes des **cyclines (cdk)** (El-Deiry *et al*, 1993 ; Harper *et al*, 1993 ; Xiong *et al*, 1993). L'inactivation de ces complexes passe par la formation du complexe quaternaire **cycline/cdk/PCNA/p21** (Cayrol *et al*, 1998). **PRb (protéine du rétinoblastome)** alors hypophosphorylée séquestre le facteur **E2F** nécessaire à l'activation de la transcription de gènes requis pour la progression en phase S (Giacca and Kastan, 1998 ; Weinberg, 1995). L'expression du gène **GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage)** est induite par p53 en réponse à des dommages dans l'ADN produits par les RI et entraîne un arrêt en G1 (Kastan *et al*, 1992). Bien que ce mécanisme soit actuellement inconnu, GADD45 interagit avec **p21** d'après Kearsey *et al* (Kearsey *et al*, 1995), et la protéine **PCNA** intervenant dans la réplication et la réparation (Smith *et al*, 1994).

- **un arrêt en fin de phase G2** dans toutes les lignées (Favaudon, 2000 ; Boulay and Perdiz, 2005 ; Dasika *et al*, 1999).

Les cellules dépourvues de p53 fonctionnelle paraissent conserver cet arrêt. P53 joue de manière indépendante sur ce blocage (Kastan *et al*, 1991) et le prolonge (Passalaris *et al*, 1999). Cet arrêt provient de l'inhibition de l'activation de **cdc2** (Hwang and Muschel, 1998 ; Azzam *et al*, 1997) se liant à la **cycline b1** (Innocente *et al*, 1999), complexe devant être déphosphorylé par la phosphatase **cdc25c** pour être actif. Ce complexe est aussi régulé par **chk1 et chk2 (Check Point Kinase)** elles-même activées par les kinases **ATM et ATR** (Furnari *et al*, 1999 ; Matsuoka *et al*, 1998). Cdc25 phosphorylé ne peut donc plus activer le complexe **cdc2/cycline b1** nécessaire à l'entrée en mitose (Samuel *et al*, 2001).

D'autres études ont montré une implication directe de p53 (Agarwal *et al*, 1995 ; Stewart *et al*, 1995). L'arrêt en G2 dépendant de p53 est principalement régulé par les cibles transcriptionnelles de p53 : **GADD45, 14-3-3 σ** et **p21** qui sont capables d'inhiber **cdc2**. Bien que la fonction de GADD45 reste mal définie, cette protéine est responsable de l'arrêt en G2 provoqué par les UV, mais pas de celui après exposition aux RI (Wang *et al*, 1999 ; Zhan *et al*, 1999) qui est médié par p21 tout comme les cellules déficientes en p53 (Bunz *et al*, 1998).

IV.4. La mort cellulaire

Lorsque tous les systèmes de défenses, d'arrêts du cycle et de réparations n'ont pas permis de restaurer le contenu cellulaire, la dernière alternative possible est l'élimination des cellules endommagées par un processus de mort cellulaire.

Ces mécanismes de mort cellulaire ont été décrits précédemment dans le paragraphe de l'homéostasie de l'épiderme (§ 1.1.3) : la **nécrose** et l'**apoptose** déclenchée entre autre par p53, les deux voies principales empruntées après exposition aux RI comme aux UVB.

La **sénescence répllicative** après RI et UVB est un autre mécanisme correspondant à un arrêt irréversible de la croissance cellulaire par réduction des télomères, entraînant une perte des télomérases endogènes pour les futures générations de cellules (Shay and Wright, 2000). Les cellules normales ont alors une durée de vie proliférative limitée, après laquelle elles s'arrêtent de proliférer et perdent leur capacité à se diviser.

Des expositions répétées aux UVB (10 de 250 mJ/cm²) entraînent une sénescence prématurée des fibroblastes, qui serait médiée par la voie du « transforming growth factor beta » (TGFβ1), entraînant le vieillissement cutané. Une surexpression de p53, p21^{Waf-1} et p16^{INK-4A} est décrite (Debacq-Chainiaux *et al*, 2005).

La sénescence des kératinocytes est encore mal définie par rapport à leur apoptose et à leur différenciation terminale (Gandarillas, 2000). Elle est pourtant décrite comme contrôlée chez les kératinocytes par p21^{Waf-1} (Weinberg and Denning, 2002) et la kinase Chk2 (Aliouat-Denis *et al*, 2005), et observée après RI (Dimri *et al*, 1995) et après UVB (Dazard *et al*, 2003). Toussaint *et al* ont décrit que l'inflammation chronique qui s'installe à long terme après RI résulte en une série de réactions liées au stress oxydatif, ce qui conduit à une sénescence prématurée ou à la mort des cellules par nécrose ou apoptose (Toussaint *et al*, 2002).

Il existe deux voies apoptotiques : la **voie extrinsèque** qui est initiée dans la membrane plasmique par des « récepteurs à domaine de mort », membres de la famille du « tumour necrosis factor receptor » (TNFR) ; la **voie intrinsèque** qui est déclenchée par les protéines relarguées par les mitochondries.

Mon travail de thèse ne portant essentiellement que sur l'apoptose induite par des agents de stress, nous ne détaillerons que la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale des kératinocytes dans le prochain paragraphe.

IV.5. La voie apoptotique intrinsèque mitochondriale

La voie mitochondriale de l'apoptose implique la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie. La perméabilisation est contrôlée par les membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et est souvent accompagnée de la chute du potentiel membranaire mitochondrial. Elle se traduit par un relargage de molécules de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol. Ces molécules sont capables d'activer les caspases ou d'entraîner la mort cellulaire de façon indépendante des caspases (Gross *et al*, 1999).

Les protéines qui entraînent l'apoptose de **façon dépendante des caspases** sont le **cytochrome c** (Li *et al*, 1997), **Smac/Diablo** (Du *et al*, 2000) et **HtrA2/Omi** (Hegde *et al*, 2002). Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1 et la pro-caspase-9, formant ainsi en présence d'ATP un complexe multiprotéique appelé apoptosome, à l'origine du clivage de la pro-caspase-9 en la forme active caspase-9. Cette

dernière active à son tour d'autres caspases effectrices comme les caspases -3 et -7 (Li *et al*, 1997). Quant aux protéines Smac/Diablo et HtrA2/Omi, elles activent les caspases de manière indirecte en se liant aux « inhibiteurs of apoptosis proteins » (IAP) et en bloquant leur activité inhibitrice.

La mitochondrie possède aussi des protéines qui entraînent la mort cellulaire de **façon indépendante des caspases** comme « apoptosis inducing factor » (**AIF**) et « Endonuclease G » (**Endo G**). Durant l'apoptose, AIF et Endo G sont transloqués dans le noyau où ils induisent la condensation de la chromatine et la fragmentation internucléosomale de l'ADN (Susin *et al*, 1999).

IV.5.1. Les protéines de stress Hsp

Les Hsp sont des « protéines de stress » synthétisées dans tous les organismes et largement conservées au cours de l'évolution. En réponse à divers agents de stress causant une dénaturation des protéines, elles sont induites et agissent comme des chaperonnes. Elles vont lier les peptides, les protéines en cours de synthèse ou à fort risque d'agrégation et vont ainsi permettre leur repliement correct et leur redistribution dans des compartiments subcellulaires appropriés. Elles sont également capables de lier des protéines dénaturées afin de rétablir leurs fonctions (Parsell and Lindquist, 1993). Les Hsp majeures sont classifiées en différentes familles suivant leur poids moléculaire, dont la famille des Hsp70 (66 - 78 kDa). **Les Hsp70 inhibent l'apoptose induite par de nombreux stimuli** comme des agents apoptotiques (Jaattela *et al*, 1998 ; Samali and Cotter, 1996), l'oxyde nitrique (Bellmann *et al*, 1996), les UV (Simon *et al*, 1995), la déprivation de sérum (Mailhos *et al*, 1993), les chocs thermiques (Mosser *et al*, 1997) et le TNF (Jaattela *et al*, 1992). La localisation des Hsp dans les cellules de mammifères est intracellulaire, dans le cytoplasme et le noyau en condition normale, et elles vont s'accumuler dans le noyau et le nucléole suite à un stress (Laplante *et al*, 1998).

Les Hsp70 de la peau sont localisées principalement dans l'épiderme. Elles ont été décrites comme exprimées dans le cytoplasme et le noyau des kératinocytes (Edwards *et al*, 1991) sous la forme inductible Hsp70 (Charveron *et al*, 1995 ; Boehncke *et al*, 1994 ; Trautinger *et al*, 1993). Les agents de stress induisant l'expression spécifique des Hsp70 dans les kératinocytes *in vitro* et *in situ* sont la chaleur, le froid, des agents chimiques et les UV (Muramatsu *et al*, 1992 ; Holland *et al*, 1993 ; Maytin *et al*, 1990).

Les Hsp70 confèrent aux cellules une protection importante contre l'apoptose en empêchant l'activation de la caspase-3 (Li *et al*, 2000).

IV.5.2. Les caspases

L'activité des caspases est régulée au niveau post-transcriptionnel. Une surexpression des caspases va engager les cellules dans un mécanisme apoptotique. Il existe **deux types de caspases pro-apoptotiques : les caspases initiatrices et effectrices**. Les caspases initiatrices (caspase-8, -9, -10) vont cliver les formes pro-actives des caspases effectrices (caspase-3, -6, -7), qui à leur tour vont cliver d'autres substrats protéiques, durant le processus apoptotique. L'initiation de ce mécanisme est dirigée par les régulateurs directs des caspases, les IAP (Salvesen and Duckett, 2002). Leur fonction première est de se lier aux caspases et d'inhiber leur activation.

Il existe dans les cellules une **balance entre l'activation de la caspase-3 et son inhibition** immédiate par dégradation de la protéine et son remplacement. Cette balance peut être perturbée par des stimuli pro-apoptotiques forts, éventuellement inhibés par Bcl-2, qui vont engendrer le relargage de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c et des antagonistes des IAP par les mitochondries. La cascade des caspases est alors activée et la cellule s'engage dans un processus apoptotique (Stucki and Simon, 2005) (Figure 21).

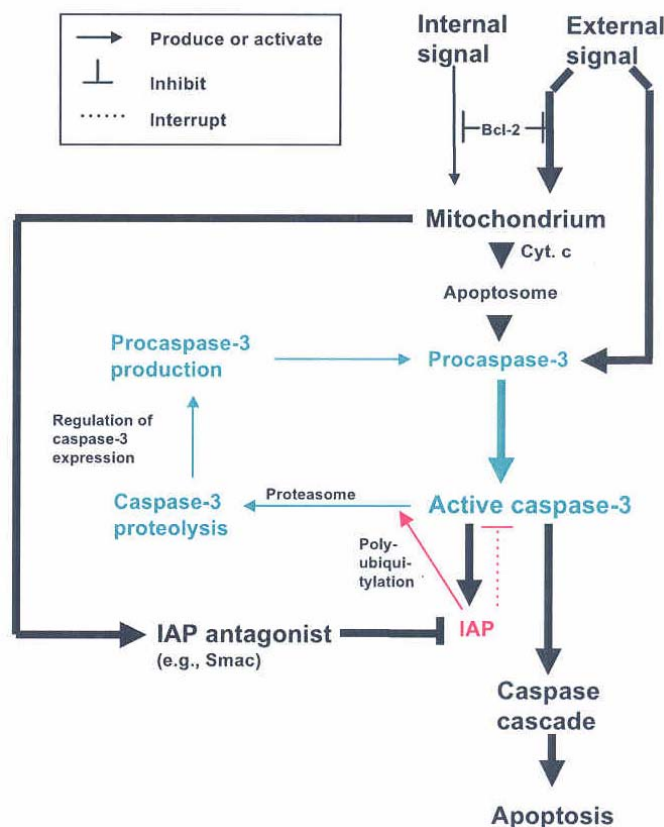


Figure 21 : Schéma de contrôle de l'activation de la caspase-3 durant le processus apoptotique (d'après Stucki and Simon, 2005)

Dans les kératinocytes humains, il a été montré que la caspase-3 est activée après UV (Sitailo *et al*, 2002), après traitement avec de l'acide rétinoïque (Mrass *et al*, 2004) et H₂O₂ (Zuliani *et al*, 2005) et est impliquée dans leur processus de différenciation terminale (Chaturvedi *et al*, 2006 ; Weil *et al*, 1999).

V. Les effets tissulaires des RI et UVB sur la peau

V.1. Les effets des RI sur la peau dépendent :

- de la grande diversité des types cellulaires constituant ce tissu et de leur radiosensibilité (kératinocytes, fibroblastes, cellules endothéliales). L'effet direct sera fonction de la dose délivrée à la peau et du nombre de cellules détruites. L'organisation structurale du tissu exposé et les caractéristiques radiobiologiques des cellules lésées telles que leur radiosensibilité, leur taux de prolifération et leurs capacités de réparation (ADN, protéines, lipides) vont conditionner cette réponse directe.

- de l'effet indirect de l'irradiation qui met en avant l'importance des processus de communication intercellulaire (Mothersill and Seymour, 2001). Les cellules vont alors produire et relarguer des cytokines et des facteurs de croissance à effet autocrine et paracrine afin de signaler aux cellules environnantes que le tissu est endommagé et conditionner une réponse supracellulaire (Barcellos-Hoff and Costes, 2006).

- des processus visant à rétablir l'homéostasie du tissu cutané tels que la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes, l'activation des kératinocytes ou des cellules endothéliales et l'orientation des cellules vers le processus de sénescence.

L'intégration de ces trois processus conditionne la réponse des tissus aux RI dans le temps (effets précoce / tardif) et dans l'espace (effet dans / hors champs d'irradiation).

Il est ainsi possible de classifier les signes cliniques résultant de l'exposition du tissu cutané aux RI (Figure 22).

Dose unique (Gy)	Dose fractionnée (2 Gy/j)	Lésion majeure	Délai d'apparition des lésions	Lésion fonctionnelle	Lésion histologique
5-7	≤ 20	Dépilation	≈18 j		Follicule vide
10-20	20-40	Erythème	12-17 j	Hyperémie	Aucune
20-30		-	2-6 j	-	-
10-20	≈ 45	Pigmentation		Aucune	Augmentation de la mélanine
10-20	≈ 45	Desquamation sèche	30-70 j		Hyperplasie
20-24	45-50	Desquamation humide avec guérison	30-50 j	Exsudation de sérum	Diminution de la densité cellulaire
> 24	> 50 > 60	Desquamation humide sans guérison		Restauration de la barrière fonctionnelle	Régénération cellulaire
17-24	45-50	Télangiectasie	6 mois - 1 an	Aucune	Perte de cellules et de vaisseaux, dilatation vasc.
> 27	> 60	Nécrose sans guérison	Quelques mois ou années	Perte de la barrière protectrice	Nécrose

Figure 22 : Effet des RI à fortes doses sur le tissu cutané
(d'après Archambeau *et al.*, 1995)

- Effets précoces

Des lésions précoces, considérées comme provenant de l'atteinte de la couche basale proliférante de l'épiderme, et tardives, liées aux atteintes du derme et des tissus sous-jacents vont se manifester après exposition à de fortes doses.

Le premier symptôme observable est la **radiodermite**, définie comme une réaction inflammatoire de la peau, équivalente à une brûlure du premier degré (Archambeau *et al.*, 1995), puis **la dépilation**.

- **L'érythème aigu** survient dans les 24 heures suivant une irradiation supérieure à 10 Gy. Il est dû à la dilatation des capillaires dans le derme.

- **La desquamation sèche** peut apparaître quelques jours après irradiation de 10 à 20 Gy et se caractérise d'une part, par une dégénérescence des kératinocytes au niveau de l'épiderme conduisant à son amincissement et à l'aplatissement des papilles dermiques et d'autre part, par le gonflement et la prolifération de l'endothélium vasculaire. Cependant, les kératinocytes présentent une capacité de régénération suffisamment importante pour compenser la perte cellulaire dans le modèle murin (Shirazi *et al.*, 1995 ; Trott *et al.*, 1999).

Après une exposition à 20 Gy, il ne reste qu'une seule cellule par cm², la réépithélialisation est encore possible (Daburon, 1997).

- **La desquamation humide** a lieu 3 à 4 semaines après irradiation supérieure à 16 Gy. Elle correspond à une perte suffisante de cellules de la couche basale de l'épiderme pour conduire à la rupture de la barrière épidermique et à l'exsudation du sérum. Elle est associée à une forte réponse inflammatoire du derme.

- **La nécrose dermique** apparaît environ 70 jours après irradiation aux doses supérieures à 27 Gy lorsque la desquamation humide est durable et intense.

- Effets tardifs

Les effets cutanés radio-induits peuvent se développer des semaines, des mois voire des années après irradiation.

- **L'atrophie, la télangiectasie et la pigmentation.** L'atrophie est caractérisée par un amincissement, un assèchement et une dépilation de l'épiderme. En parallèle, les petits vaisseaux du derme se dilatent, on les appelle alors capillaires télangiectasiques. Selon la dose reçue (faible ou forte), on observe également une hypo- ou hyperpigmentation, liées à la destruction des mélanocytes ou à la synthèse de mélanine respectivement.

- **L'ischémie** proviendrait de l'hyperprolifération des cellules endothéliales survivantes provoquant l'occlusion localisée ou partielle des artérioles (Hopewell *et al*, 1986). La séquence de reperfusion d'un tissu ischémié est très toxique pour les cellules car elle est liée à la formation excessive d'ERO par les polynucléaires neutrophiles et par la xanthine déshydrogénase.

- **La fibrose** (Lefaix *et al*, 1997) correspond à une formation pathologique de tissu fibreux essentiellement composé de fibres de collagène. Elle se développe le plus souvent comme un processus cicatriciel en remplacement d'un parenchyme détruit. Elle apparaît de manière progressive sur plusieurs années et est constituée de trois phases : **la phase de constitution** asymptomatique ou liée à une inflammation aiguë ou chronique ; **la phase de séquelle** organisée avec disparition des signes inflammatoires, épaissement du derme et des tissus sous-cutanés, élargissement des capillaires dermiques et amincissement ou hypertrophie de l'épiderme ; **la phase très tardive** avec une atrophie sous-cutanée associée à une rétractation des tissus (sclérose) qui reste soumise à des poussées inflammatoires en cas de traumatismes.

- **La nécrose** constitue le stade ultime de la réponse tissulaire à l'irradiation. Elle peut se développer en quelques semaines ou s'étendre sur plusieurs années par des poussées successives, suite à l'apparition de lésions vasculaires (Gongora and Magdelenat, 1986).

- **Les cancers cutanés** : des lésions cancéreuses peuvent apparaître avec un temps moyen de latence de 24,5 années après l'irradiation (Daburon, 1997). Peu d'informations

sont disponibles à propos de ces cancers. On sait que deux types prédominent : les **carcinomes basocellulaires** qui sont peu agressifs, assez fréquents, se développant à partir de la couche basale de l'épiderme et qui prédominent sur les **carcinomes spinocellulaires** qui sont des tumeurs invasives des couches supérieures de l'épiderme.

V.2. L'aspect d'un épiderme humain exposé aux UV dépend de la dose d'irradiation.

L'un des principaux chromophores de la peau absorbant les UVB et UVA (rayons supérieurs à 290 nm) est l'acide urocanique. Il est localisé dans la couche cornée et est impliqué dans des réponses photobiologiques importantes de la peau. L'acide urocanique est l'un des produits de dégradation de la filaggrine qui est riche en histidine : il est formé par désamination de la L-histidine via l'action catalytique de l'enzyme histidase (Applegate and Frenk, 2001 ; De Fabo *et al*, 1997). La photo-activation par les UVB transforme sa structure *trans*, habituellement prédominante, en son isomère *cis*, plus riche en énergie et impliqué dans l'immunosuppression induite par les UVB. Des études ont démontré la capacité de l'isomère *cis* - acide urocanique à inhiber l'induction des réactions d'hypersensibilité de contact et d'hypersensibilité retardée à des alloantigènes. De plus, il a été décrit comme inhibant les cellules de Langerhans dans leur capacité à présenter des antigènes tumoraux (Lappin and Simon, 1998).

- Les UVB sont majoritairement arrêtés par la couche cornée (acide urocanique) et 10% seulement atteignent le derme. Ils causent le brunissement de la peau, des brûlures et de l'érythème suivi d'un épaissement de l'épiderme par une augmentation du nombre et de l'épaisseur des différentes couches de kératinocytes jusqu'au processus de kératinisation de la couche cornée.

L'irradiation UVB induit l'apparition de cellules photodyskératosiques ou cellules « sunburn » qui correspondent à des kératinocytes en apoptose (Young AR, 1987 ; Van Laethem *et al*, 2005). Ces cellules « sunburn » sont caractérisées par une forme ronde due à une perte des connexions avec les kératinocytes voisins, un cytoplasme typiquement éosinophile et un noyau dense et contracté (Weedon *et al*, 1979). Elles apparaissent dès 24h dans les couches profondes de l'épiderme irradié à 50-60mJ/cm² et disparaissent trois jours après. Au niveau du noyau, les UVB induisent la formation de dimères de pyrimidine qui persistent dans les couches supérieures pendant 3 jours.

Considérés comme des processus de photoprotection endogènes induits par l'irradiation UVB, l'épaississement de l'épiderme, la kératinisation de la couche cornée et l'apparition de cellules « sunburn » peuvent être liés respectivement à une augmentation de la prolifération des kératinocytes, à un retard dans leur programme de différenciation et à l'induction d'un processus d'apoptose (Morlière, 2001). Des expositions prolongées augmentent le risque de cancer cutané.

- Quant aux UVA, la majorité traversent la couche cornée et 20 à 30% pénètrent dans le derme réticulaire et papillaire, où se localisent principalement les dommages générés : modification du collagène et accumulation d'un tissu dégénératif constitué essentiellement de fibres élastiques. Excepté une hyperpigmentation immédiate et persistante liée à une augmentation des mélanosomes, les altérations de l'épiderme sont plus faibles que celles induites par l'action des UVB : épaississement de la couche cornée associé à une augmentation du nombre de couches, aucune ou peu de cellules « sunburn » détectées et une formation de dimères de pyrimidine négligeable (Morlière, 2001).

Chapitre III. LA CICATRISATION DU TISSU CUTANE

I. Les étapes de la cicatrisation

Le processus de cicatrisation est un phénomène dynamique, complexe et coordonné qui restaure rapidement et efficacement l'intégrité de la peau, après lésion cutanée. Il implique des médiateurs solubles et l'interaction des cellules sanguines, des composants de la matrice extracellulaire (MEC) et des cellules du parenchyme. La cicatrisation se décompose en trois principales phases : l'inflammation, la formation du tissu de granulation et le remodelage (Figure 23).

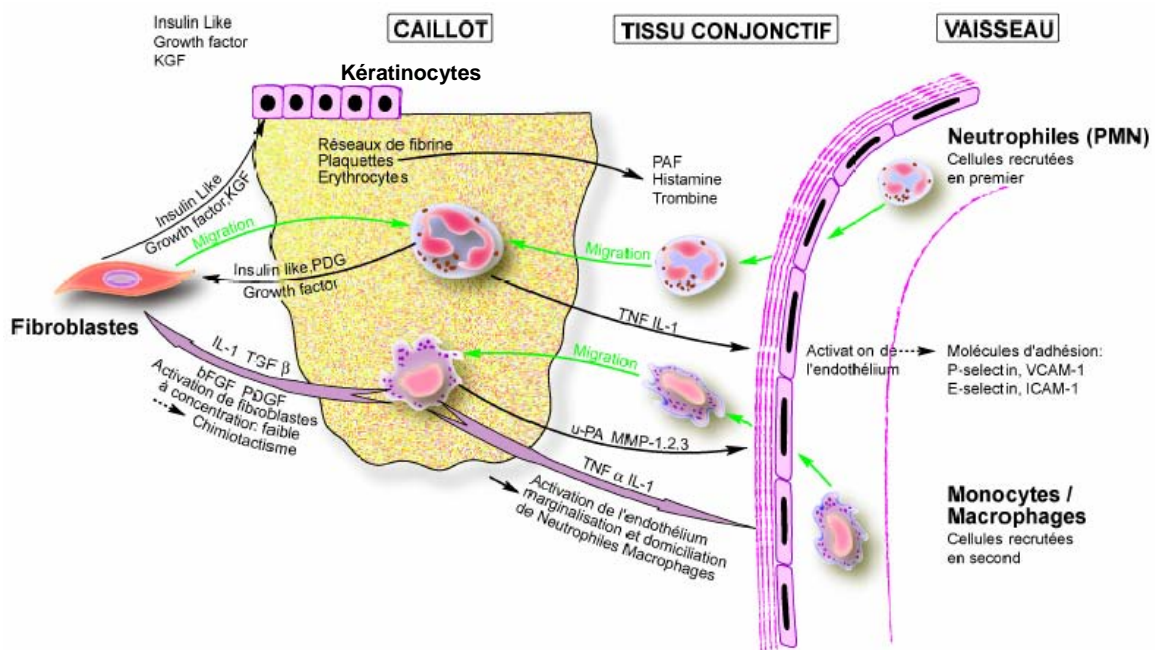


Figure 23 (a) : Les phases d'inflammation et de formation du tissu de granulation

Après lésion cutanée, un caillot sanguin se forme et va servir de matrice provisoire pour la migration des cellules. Les cytokines jouent un rôle important dans la formation du tissu de granulation par le recrutement de leukocytes inflammatoires et la stimulation des fibroblastes et des kératinocytes.

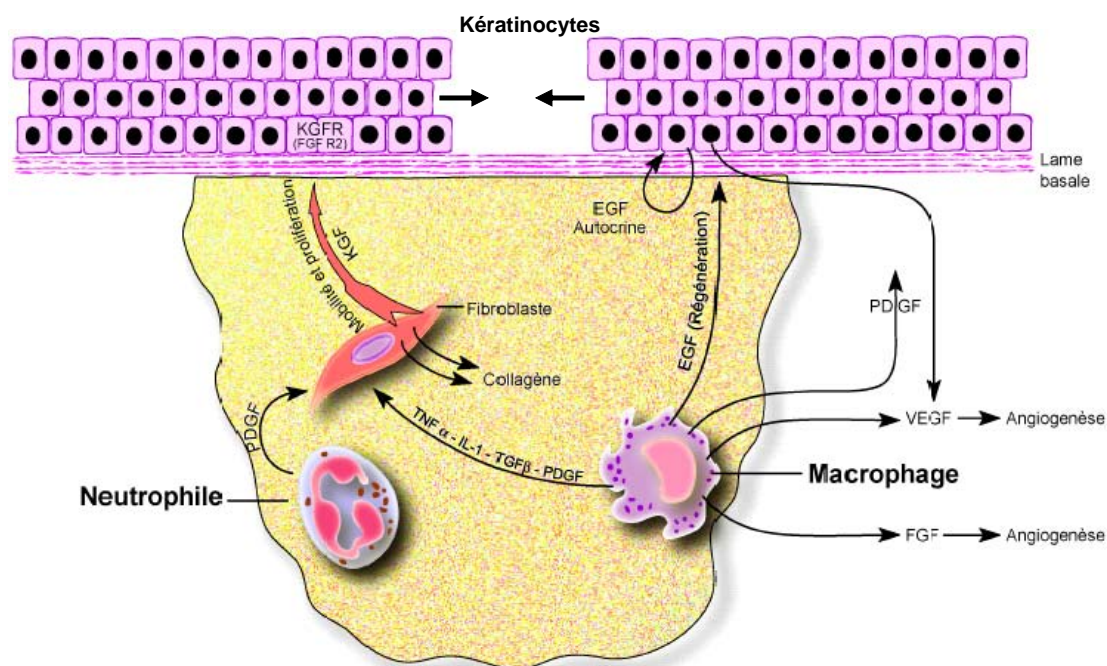


Figure 23 (b) : La phase de remodelage (réépithélialisation et néovascularisation)

Durant la phase de remodelage, la réépithélialisation et la néovascularisation sont aussi sous contrôle des cytokines, le collagène et les protéines de la MEC sont dégradés par les sérines protéases et les MMP. Les kératinocytes vont migrer et reepithéliser le tissu de granulation composé de cellules inflammatoires, de fibroblastes et de nouveaux vaisseaux formés.

I.1. La phase inflammatoire

La phase inflammatoire commence immédiatement après blessure tissulaire par un relargage des constituants des vaisseaux sanguins telles que les plaquettes, provoquant la formation d'un caillot qui va jouer le rôle de MEC provisoire (formée de fibrine et fibronectine) pour la migration des cellules inflammatoires, des fibroblastes et des kératinocytes sur le site lésé. Les plaquettes relarguent et activent plusieurs médiateurs de la vasoconstriction et des facteurs chimiotactiques comme le VEGF, « epidermal growth factor » (EGF), « platelet-derived growth factor » (PDGF) et $TGF\beta$. Ces facteurs vont recruter des cellules inflammatoires comme les neutrophiles et les macrophages, en plus des fibroblastes et des cellules endothéliales sur la plaie.

En effet, les neutrophiles infiltrants vont éliminer les particules étrangères à cette zone puis vont être phagocytés par des macrophages. Les monocytes vont également s'infiltrer en réponse à des chémoattractants spécifiques comme les fragments de MEC, TGF β et « monocyte chemoattractant protein 1 » (MCP1) et vont devenir des macrophages activés sécrétant PDGF et VEGF. Suite à leur adhésion à la MEC, ils relarguent aussi le « colony-stimulating factor 1 » (CSF1) pour leur survie, le « tumour necrosis factor alpha » (TNF α) comme cytokine inflammatoire et PDGF chémoattractant et mitogène pour les fibroblastes (Werner and Grose, 2003 ; Singer and Clark, 1999). La formation du tissu de granulation, une MEC de remplacement en cours de remodelage, est alors initiée.

I.2. La phase proliférative

I.2.1. La réépithélialisation

La réépithélialisation commence quelques heures après la lésion. Les cellules épithéliales migrent des bords du tissu sain ou des appendices cutanés (follicules pileux) sur le site endommagé. Les kératinocytes subissent des modifications de leur phénotype permettant leur locomotion: perte de leur polarité apicale-basale, rétraction des tonofilaments intracellulaires, dissolution d'un grand nombre d'hémidesmosomes / desmosomes intercellulaires et formation de filaments d'actine cytoplasmiques. Leur migration à l'aide de pseudopodes et leur prolifération sont stimulées par l'absence de cellules avoisinantes et par le relargage de facteurs de croissance (EGF, TGF α et « keratinocyte growth factor » KGF) concomitant à l'augmentation de leurs récepteurs (Henry and Garner, 2003). L'expression des récepteurs aux intégrines leur permet d'interagir avec la MEC provisoire (composée surtout de fibrine et de fibronectine) dans un stroma de collagène de type I, comme substrat de migration. La dégradation de la MEC dépend de la production de collagénase par ces cellules, du « plasminogen activator » à activer la collagénase MMP-1, néosynthétisée par les kératinoctes et requise pour leur migration. La réépithélialisation complète se caractérise par la restauration fonctionnelle de la barrière cutanée : les protéines d'attache membranaire sont reformées à nouveau au cours de la réversion des cellules épidermiques à leur phénotype normal (Singer and Clark, 1999).

L'acquisition d'un phénotype activé du kératinocyte sera développé dans le paragraphe suivant (§ II).

I.2.2. La formation du tissu de granulation

Un nouveau stroma appelé tissu de granulation va se former sur la zone cicatricielle. Au cours de cette phase, les fibroblastes vont acquérir des propriétés morphologiques et biochimiques de cellules musculaires lisses : ils acquièrent un phénotype myofibroblastique. Les myofibroblastes sont caractérisés par une morphologie hypertrophique associée au développement d'un réseau cytoplasmique complexe de microfilaments d'actine (appelés fibres de stress), en contact étroit avec les composants de la MEC grâce à des complexes transmembranaires. Ils secrètent alors des marqueurs des cellules musculaires lisses comme l' « α -Smooth Muscle Actin » (α -SMA), qui est utilisé comme marqueur commun aux myofibroblastes, mais aussi la desmine et la vimentine. Ils présentent des propriétés contractiles et sécrétoires caractéristiques qui leur confèrent un rôle clé dans la cicatrisation où ils assurent à la fois la synthèse, la réorganisation et la contraction de la MEC.

Les facteurs de croissance relargués, impliqués dans la modulation de la différenciation myofibroblastique, sont le TGF β 1, le « Granulocyte-Macrophage-CSF » (GM-CSF), les « fibroblastic growth factors » (FGFs), le TNF α 1 et l'interféron gamma IFN- γ ; les composants de la MEC comme l'héparine et la fibronectine y participent aussi. La MEC a un rôle fondamental, elle permet la croissance et la différenciation myofibroblastiques en parallèle avec le relargage du TGF β 1 (Amadeou *et al*, 2003).

I.2.3. La néovascularisation

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est nécessaire à la cicatrisation complète. L'angiogenèse est un processus complexe qui dépend de la MEC aussi bien que de la migration et de la stimulation mitogène des cellules endothéliales. Son induction est initialement attribuée aux FGFs (acides ou basiques) et VEGF secrétés par les cellules endothéliales et les macrophages, mais aussi par l'activité angiogénique du TGF β , angiogénine, angiotropine, angiopoïétine 1 et thrombospondine. Les cellules épidermiques activées secrètent aussi de grandes quantités de VEGF.

En plus de ces facteurs, une MEC appropriée et l'expression de récepteurs endothéliaux à la fibronectine pour la MEC provisoire sont nécessaires : les cellules endothéliales proliférantes déposent d'importantes quantités de fibronectine dans la paroi des vaisseaux, et cette fibronectine périvasculaire peut servir de tunnel pour le mouvement de ces cellules dans la zone lésée. L'expression et l'activité des protéases est également nécessaire.

Les facteurs angiogéniques tels que FGFs (acides ou basiques) stimulent les cellules endothéliales à relarguer l'activateur du plasminogène, qui va cliver le plasminogène en plasmine et la pro-collagénase en collagénase active. Ces deux protéases vont digérer les

membranes basales, ce qui permet aux cellules endothéliales stimulées par les facteurs angiogéniques de migrer et former de nouveaux vaisseaux sanguins sur le site lésé.

Une fois que cette zone est comblée avec un nouveau tissu de granulation, l'angiogenèse cesse et de nombreux vaisseaux se désintègrent par apoptose. Cette mort programmée est probablement régulée par des molécules matricielles, comme les thrombospondines 1 et 2, des facteurs anti-angiogéniques comme l'angiostatine, l'endostatine et l'angiopoïétine 2 (Tonnesen *et al*, 2000 ; Singer and Clark, 1999).

I.3. La contraction et le remodelage de la matrice extracellulaire

La contraction requiert la stimulation de TGF β 1 et β 2, PDGF, l'attachement des fibroblastes à la matrice de collagène grâce aux récepteurs des intégrines, et des liaisons entre les amas de collagène. Le remodelage du collagène durant le remplacement du tissu de granulation par une cicatrice dépend d'une synthèse continue et peu élevée du collagène et de sa dégradation contrôlée par des MMP secrétées par les macrophages, les cellules épidermiques, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Les différentes phases de réparation du tissu dépendent de l'équilibre entre les MMPs qui dégradent la MEC (MMP-2 est alors activée par MT1-MMP) et leurs inhibiteurs, les TIMPs ; mais aussi du réarrangement cellulaire, c'est à dire la diminution des vaisseaux, et la disparition des myofibroblastes par apoptose ou leur dédifférenciation en fibroblaste (Desmoulière, 1995). Le collagène fibrillaire va s'accumuler jusqu'à complète cicatrisation (Tomasek *et al*, 2002).

II. L'étape de réépithélialisation

En situation physiologique normale, les kératinocytes prolifèrent dans la couche basale et se différencient dans les couches suprabasales de l'épiderme.

En réponse à un stress (par exemple, RI ou UVB) ou une lésion épidermique, les kératinocytes répondent rapidement en s'activant afin de rétablir l'intégrité de la barrière épidermique. Ils acquièrent un **phénotype « activé »** (Coulombe, 1997 ; Freedberg *et al*, 2001).

Ce processus nommé « **cycle d'activation du kératinocyte** » est dirigé par des signaux extracellulaires (Figure 24). Ainsi, les kératinocytes acquièrent un potentiel migratoire associé à des changements morphologiques, à la réorganisation des kératines et à

l'expression des composants de la MEC: d'une part, la synthèse et le relargage des cytokines et des facteurs de croissance du kératinocyte sont modulés, et d'autre part la cellule élabore de nouveaux constituants. Enfin, les kératinocytes acquièrent un potentiel hyperprolifératif nécessaire à la reconstitution de l'épiderme.

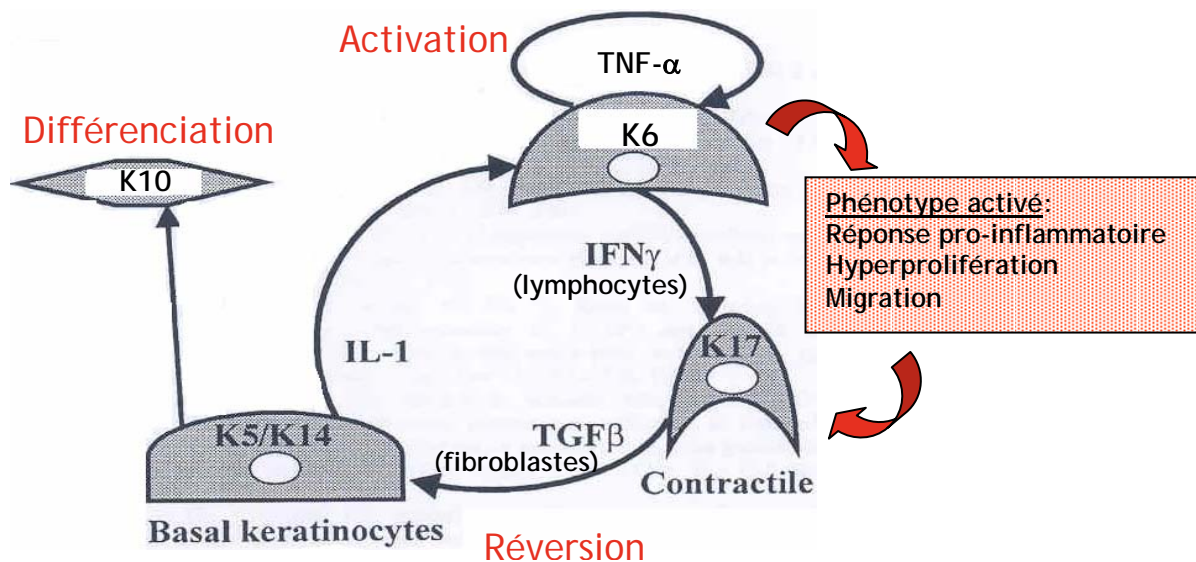


Figure 24 : Le cycle d'activation du kératinocyte (d'après Freedberg *et al.*, 2001)

II.1. L'activation du kératinocyte

- L'initiateur majeur de cette activation du kératinocyte est l'interleukine-1 (IL-1) (Corsini *et al.*, 1998 ; Murphy *et al.*, 2000), un **signal autocrine** pour les kératinocytes mais aussi **paracrine** pour les cellules endothéliales du derme qui vont s'activer à leur tour, exprimant des sélectines et recrutant les lymphocytes circulants, qui vont se diriger vers la zone lésée. L'IL-1 est aussi un activateur des fibroblastes, entraînant leur migration, leur prolifération et leur production de composants de la MEC.

Il est un **signal autocrine** pour les kératinocytes qui expriment des récepteurs à l'IL-1 (de type I/II/antagonist). Une fois activés, les kératinocytes prolifèrent, acquièrent un potentiel migratoire associé à la réorganisation des kératines K6 et K16 et expriment un panel de gènes spécifiques de l'activation.

La transduction du signal en réponse à l'IL-1 commence par l'interaction de l'IL-1 avec son récepteur de surface de type I lié à la protéine « TNF α receptor associated factor 6 » TRAF6 (Figure 25).

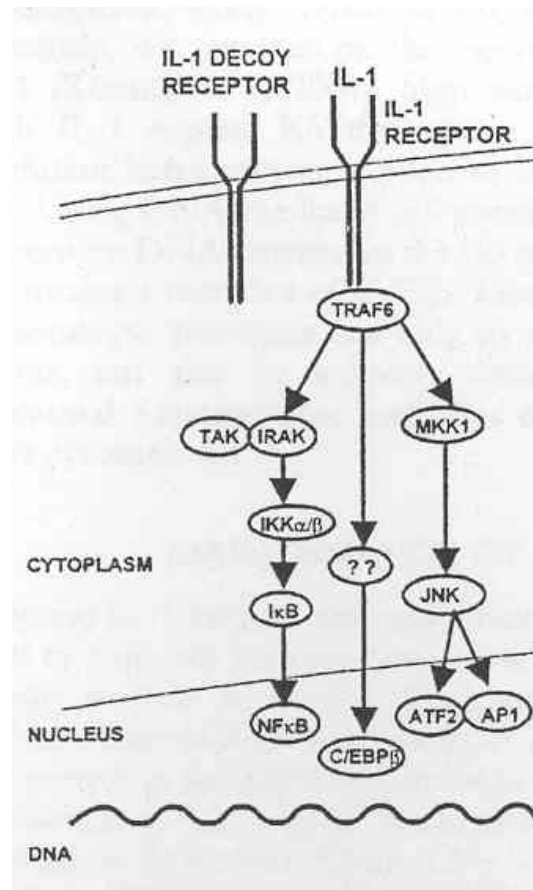


Figure 25 : La voie de transduction du signal IL-1 du kératinocyte
(d'après Freedberg *et al*, 2001)

Cette dernière recrute des protéines kinases comme l' « IL-1 receptor associated kinase » (**IRAK**) et « TRAF associated kinase » (**TAK**) et « MAP kinase kinase 1 » (**MKK1**). Le signal est alors transmis par trois voies de facteurs de transcription : **NF κ B**, **C/EBP β** , **ATF2** et **AP-1** liant **c-fos** et **c-jun** (Baud *et al*, 1999 ; Ninomiya-Tsuji *et al*, 1999 ; Ling and Goeddel, 2000) qui vont exprimer des protéines spécifiques de l'activation.

Les gènes induits par IL-1 sont :

- des **facteurs de croissance** et des **cytokines** qui transmettent le signal aux cellules environnantes (GM-CSF, TNF- α , TGF- α , amphiréguline)
- des **marqueurs de surface cellulaire** comme ICAM-1
- des **intégrines** et de la **fibronectine**, un composé de la membrane basale important dans la migration des kératinocytes (Middleton and Norris, 1995)
- des **gènes des kératines K6 et K16**, et directement la synthèse de **K6** dans les kératinocytes (Komine *et al*, 2001) ce qui change la composition de leur cytosquelette.

- Le TNF- α permet le maintien de cette activation du kératinocyte (Nickoloff and Turka, 1993). Cette cytokine pro-inflammatoire est produite par une grande variété de cellules comme les macrophages et monocytes, ainsi que les cellules épithéliales incluant les kératinocytes. Son niveau d'expression est très augmenté après UVB (Barker *et al*, 1991). Le TNF- α active la réponse immunitaire en induisant la production de facteurs de croissance, de cytokines, de leurs récepteurs et des protéines d'adhésion (amphiréguline, TGF- α , IL-1 α , « IL-1 receptor antagonist », « EGF receptor » et ICAM-1) (Griffiths *et al*, 1995).

Le TNF- α va induire trois voies de signalisation: (1) la **voie apoptotique** par activation des caspases ; (2) la **voie des céramides** activant la synthèse d'acide arachidonique et les protéines kinases de la voie des « Mitogen-Activated Protein Kinase » (**MAPK**); et (3) la **voie TRAF2** activant des facteurs de transcription tels que **NF κ B**, **C/EBP β** et **AP-1** par les protéines « TNF- α receptor associated death domain » (TRADD), TRAF-2 et « NF κ B inducing kinase » (NIK) (Figure 26).

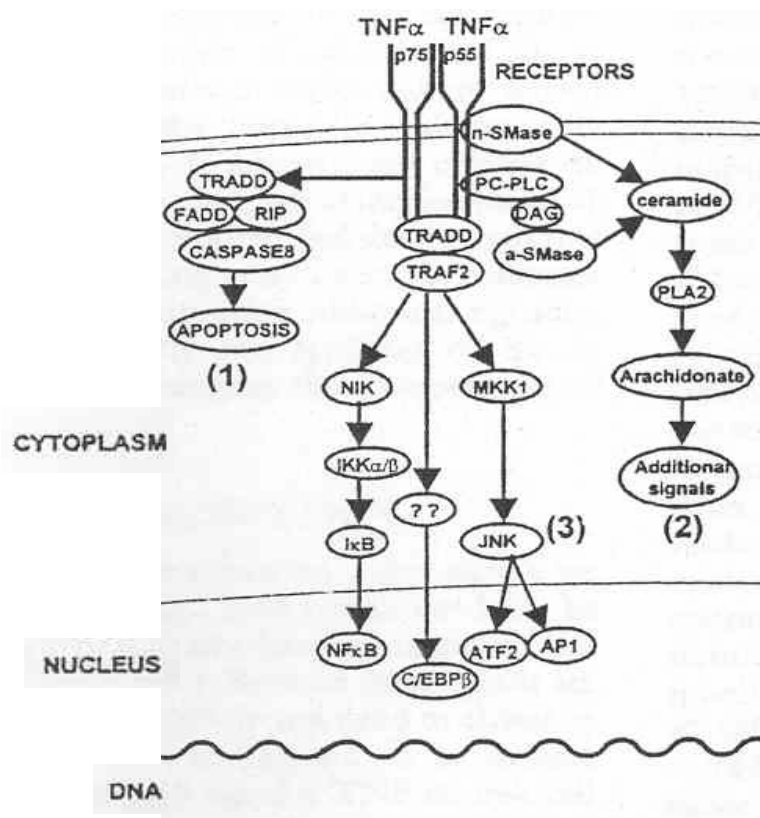


Figure 26 : La voie de transduction du signal TNF- α du kératinocyte
(d'après Freedberg et al., 2001)

Les signaux inflammatoires du **TNF- α** , et prolifératifs du **TGF- α** régulent l'expression du gène K6 l'un après l'autre (Komine *et al*, 2000). La synthèse de K6 est alors induite.

En réponse aux **récepteurs à l'EGF** (et aux membres de la famille EGF), les kératinocytes prolifèrent, dégradent les composants de la MEC et deviennent migratoires (Nickoloff *et al*, 1990) ; les ligands des récepteurs à l'EGF induisent fortement et spécifiquement l'expression de K6 et K16 et les sites AP-1 sont fonctionnels pour de nombreux gènes codant les kératines (Ma *et al*, 1997).

- La synthèse des cytokines et facteurs de croissance lors du phénotype activé du kératinocyte

Les kératinocytes activés secrètent des cytokines et facteurs de croissance qui vont recruter les cellules de l'inflammation sur le site lésé. Elles sont un signal paracrine pour les lymphocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Elles sont aussi un signal

autocrine pour les kératinocytes jouant un rôle important dans le maintien de leur activation (Figure 27).

Production des kc activés	Définition	Fonctions principales dans la peau au niveau du site lésé
Interleukines IL-1 α et β IL-1Ra IL-6	Epidermal-cell derived Thymocyte Activating Factor (ETAF) IL-1 Receptor antagonist Epidermal cell Natural Killer cell Augmenting Factor (ENKAF)	Initie l'activation du kc et des réactions immunes Compétitif de l'inhibiteur de l'IL-1 Induit la prolifération des kc
Chemokines IL-8 GRO α	Neutrophil Activating Protein(NAP) Growth-Related Oncogene- α	Chémotactiques des neutrophiles via leur récepteur CXCR2
Colony stimulating factors GM-CSF G-CSF M-CSF IL-3	Granulocyte-macrophage CSF Granulocyte CSF Macrophage CSF Multi-CSF	Module les fonctions / maturation cellules de Langherans Active granulocytes matures / éosinophiles / lymphocytes T à promouvoir différenciation des granulocytes et macrophages
Facteurs de croissance TNF- α ICAM-1	Tumor Necrosis Factor α Intercellular adhesion molecule-1	Maintient l'activation des kc et inhibe leur croissance, induit molécules d'adhésion ICAM-1/VCAM-1 Recrute neutrophiles et lymphocytes
{ <i>Famille EGF</i> Amphiréguline et HB-EGF TGF- α TGF- β 1 VEGF	{ <i>Epidermal Growth Factor - family</i> 2 homologues (amphiregulin and heparin-binding EGF-like Growth Factor) Transforming Growth Factor α Transforming Growth Factor β Vascular Endothelial Growth Factor	{ <i>Induit la prolifération et la migration des kc et se lie aux récepteurs à EGF</i> Induisent la prolifération des kc Induit la division des kc et stimule leur migration Inhibe la croissance des kc Induit l'angiogenèse pendant la néovascularisation
{ <i>Famille FGFs</i> bFGF KGF / FGF-7	{ <i>Fibroblast Growth Factors</i> basic Fibroblast Growth Factor Keratinocyte Growth Factor	{ <i>Induit l'activité mitogène et la croissance des kc</i> Accélère la cicatrisation cutanée (régénération) Induit la croissance des follicules pileux

Figure 27 : Cytokines et facteurs de croissance produits par les kératinocytes activés
 Synthèse bibliographique (Uchi *et al*, 2000 ; Mckay and Leigh, 1991 ; Gillitzer and Goebeler, 2001 ; Tomic-Canic *et al*, 1998 ; Gröne, 2002 ; Coulombe, 1997 ; Sugawara *et al*, 2001)

- L'interféron γ (IFN- γ) relargué par les lymphocytes donne le signal aux kératinocytes de se contracter lors de la contraction du tissu de granulation par les fibroblastes. L'activation des récepteurs de l'IFN- γ déclenche une cascade de phosphorylation de protéines : ces récepteurs interagissent avec les « Janus activated kinases » (JAK) qui

phosphorylent alors des tyrosines au niveau de ces récepteurs et de la famille de facteurs de transcription « signal transducing activator of transcription » (STAT), en particulier STAT-1 dans le noyau des kératinocytes (Schindler and Darnell, 1995).

L'IFN- γ induit fortement et spécifiquement le promoteur du gène de la kératine K17 (Jiang *et al*, 1994). La fonction de K17 dans l'épiderme est de provoquer la contraction des kératinocytes (Freedberg *et al*, 2001).

- Le TGF- β permet la réversion du phénotype activé du kératinocyte à un phénotype basal lorsque le tissu est réparé. Le signal est transmis par les fibroblastes qui relarguent le TGF- β : les kératinocytes vont alors se différencier à nouveau. Ce facteur est un important régulateur des fonctions du kératinocyte puisqu'il empêche leur prolifération et induit la synthèse de protéines spécifiques de la membrane basale et de la MEC comme la fibronectine, laminine, collagène IV et VII (Vollberg *et al*, 1991 ; König and Bruckner-Tuderman, 1992), et des protéines des récepteurs de surface comme les intégrines $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 4$ et $\beta 5$ et les « bullous pemphigoid antigens » BPAG1 et BPAG2 (Gailit *et al*, 1994).

Le TGF- β induit spécifiquement la synthèse des kératines spécifiques du phénotype basal du kératinocyte : K5 et K14 (Jiang *et al*, 1995) ce qui l'engage dans une voie de différenciation normale.

II.2. Le rôle des Rho GTPases dans la migration du kératinocyte

Les voies RhoA et P38 MAPK participent à la réépithélialisation des zones cutanées endommagées. Au cours de la cicatrisation, les membres de la famille Rho régulent les modifications du cytosquelette indispensables pour l'adhésion et la migration des cellules épithéliales (Ehenreiter *et al*, 2005 ; Desai *et al*, 2004). La balance entre la prolifération et la différenciation des kératinocytes humains est liée à l'activation de RhoA, par ses médiateurs ROCK sérine/thréonine kinases (Santoro *et al*, 2005). La cicatrisation cutanée active P38 MAPK qui va réguler la migration des kératinocytes (Harper *et al*, 2005 ; Jaakkola *et al*, 1998) alors que ERK1/2 va induire la prolifération (Sharma *et al*, 2003).

Les Rho GTPases font partie du sous-groupe de la superfamille des protéines Ras, elles ont un poids moléculaire compris entre 20 et 30 kDa et ont été montrées comme régulant un large spectre de fonctions cellulaires, dont la migration. Elles sont exprimées de façon ubiquitaire chez toutes les espèces. **La famille de protéines Rho est subdivisée en 3**

classes majeures: **Rho**, constituée de RhoA, RhoB, RhoC ; **Rac**, constituée de Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG ; et **Cdc42**, constituée de Cdc42, TC10, TCL, Wrch1 et Chp/Wrch2. Les GTPases de la famille Rho sont impliquées, en réponse à l'IL-1 β , dans la **régulation de l'organisation du cytosquelette** (Bagrodia *et al*, 1995 ; Zhang *et al*, 1995 ; Whitmarsh *et al*, 1997).

- RhoA est une protéine membre de la famille de protéines Rho. Elle régule la formation et l'assemblage des fibres de stress d'actine (Miura *et al*, 1993 ; Ridley and Hall, 1992) tandis que Rac et Cdc42 régulent la polymérisation de l'actine afin de former des structures spécifiques : les lamellipodes pour Rac (Ridley *et al*, 1992) et les filopodes pour Cdc42 (Kozma *et al*, 1995 ; Nobes and Hall, 1995) (Figure 28).

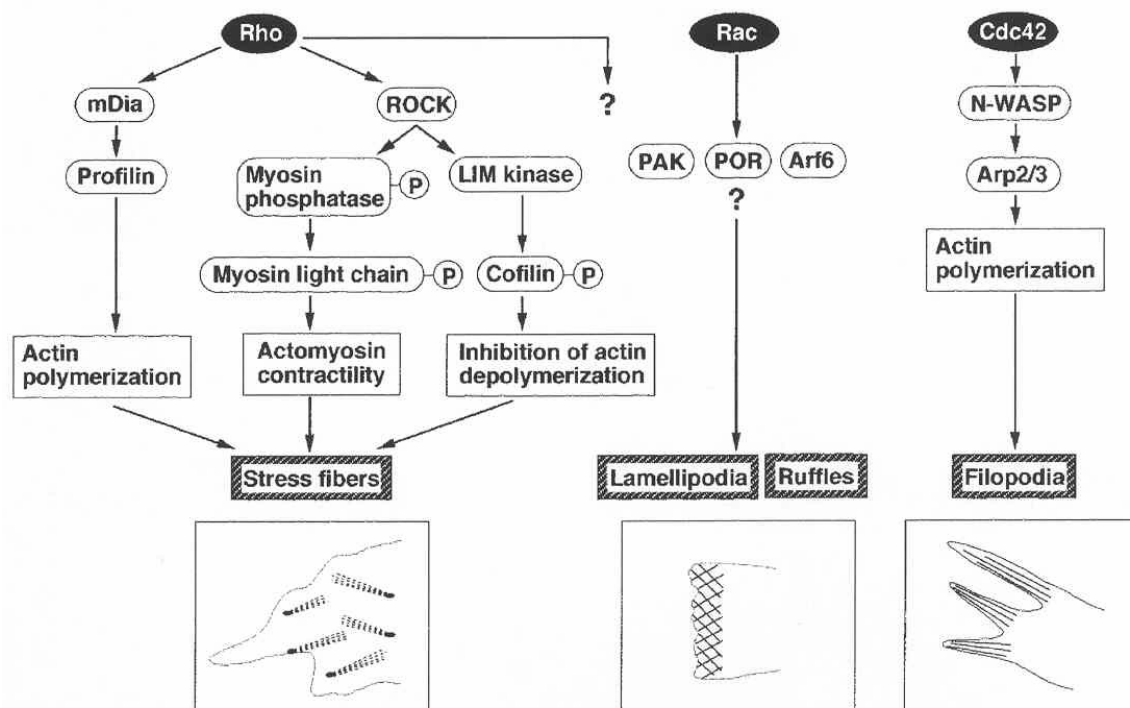


Figure 28 : Le rôle des GTPases Rho, Rac et Cdc42 dans l'organisation du cytosquelette (d'après Takai *et al*, 2001)

Les protéines RhoA, Rac et Cdc42 sont aussi impliquées dans l'assemblage des complexes d'adhésion matricielle par les intégrines comme les adhésions focales.

Les protéines Rho jouent également un rôle crucial dans le transport membranaire en régulant la contraction, la motilité, l'adhésion et la polarité des cellules ; la régulation transcriptionnelle des gènes ; le contrôle de la croissance cellulaire et le développement (Etienne-Manneville and Hall, 2002 ; Aelst and D'Souza-Schorey, 1997).

RhoA subit des changements moléculaires cyclant d'une forme active liée au GTP à une forme inactive liée au GDP. La protéine RhoA sous forme inactive GDP est enfermée dans le cytosol de la cellule par les « guanine dissociation inhibitors » (GDIs). Les « guanine nucleotide exchange factors » (GEFs) catalysent l'échange du GDP en GTP afin d'activer RhoA. RhoA-GTP est alors inactivée par des « GTPase-activating proteins » (GAPs) qui augmentent l'activité GTPase intrinsèque de RhoA, entraînant l'hydrolyse du GTP en GDP. Toutes les protéines Rho sont prénylées sur leur extrémité C-terminale, permettant la translocation des Rho-GTP à la membrane. Alors activées, elles interagissent avec la protéine effectrice Rho kinase pour réguler les fonctions décrites précédemment (Figure 29).

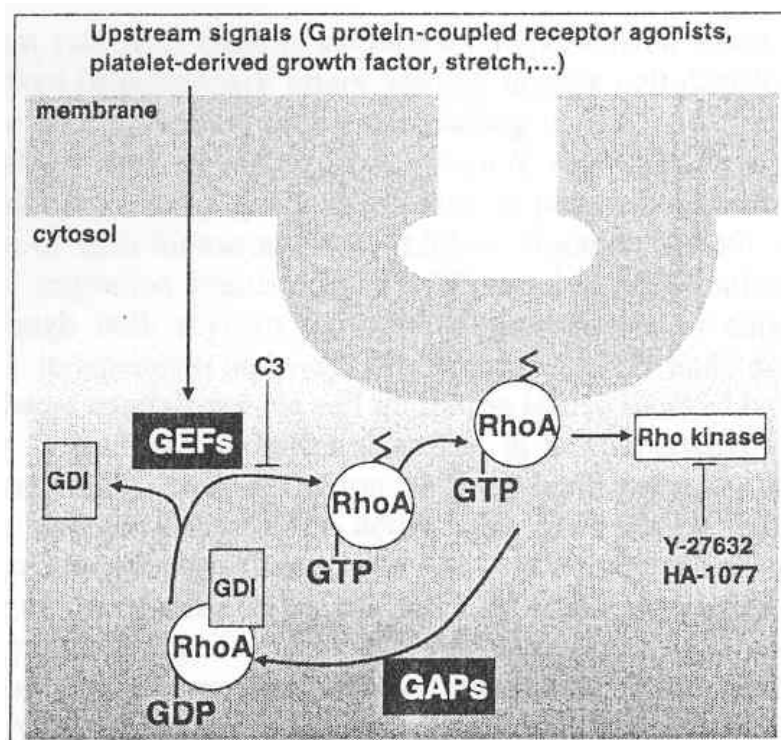


Figure 29 : Le cycle d'activation de la protéine RhoA (d'après Loirand *et al*, 2005)

- P38 est une protéine membre de la famille des MAPK, de poids moléculaire 38 kDa. Elle est couplée à la voie « c-jun NH₂-terminal kinase » (JNK). Ces voies de signalisation sont fortement induites par les UV (Derijard *et al*, 1994 ; Han *et al*, 1994), agents oxydants (Osborn *et al*, 1996), lipopolysaccharide (Nick *et al*, 1996), stress osmotique (Shapiro *et al*, 1995), Hsp (Rouse *et al*, 1994), TNF- α et IL-1 (Cuenda *et al*, 1997 ; Raingeaud *et al*, 1995). L'activation de ces voies entraîne des altérations de la croissance cellulaire, de la survie et de l'apoptose (Xia *et al*, 1995).

Les petites protéines de la famille Rho, Rac et Cdc42, vont réguler l'activation de la voie JNK, et dans une moindre mesure, celle de P38 MAPK (Coso *et al*, 1995 ; Minden *et al*, 1995).

L'identité des molécules qui lient Rac/Cdc42 à P38 est encore mal connue. Les activateurs directs de P38 sont soit « MAP kinase kinase 4 » (MKK4) ou « c-jun NH₂-terminal protein kinase - activating kinase » (JNKK) qui induisent aussi JNK, soit MKK3 et MKK6 qui activent P38 de façon spécifique (Han *et al*, 1996 ; Jiang *et al*, 1996). De plus, certaines formes constitutives activées de « p21-activated kinase » (PAK) peuvent stimuler l'activité de ces 2 voies (Bagrodia *et al*, 1995 ; Zhang *et al*, 1995) (Figure 30).

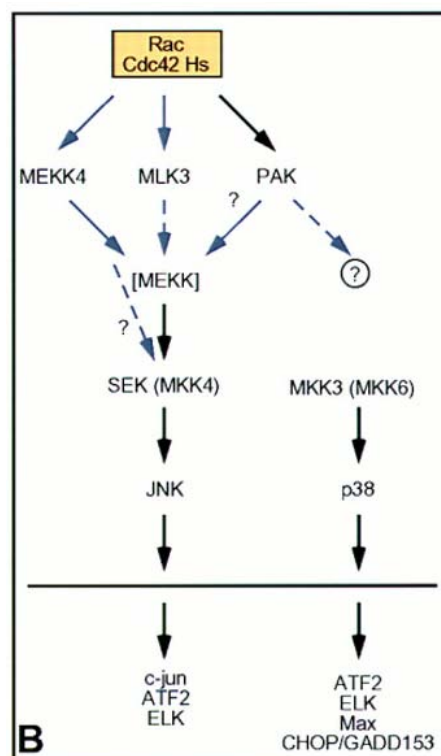


Figure 30 : Les cascades de signalisation de JNK et P38
(d'après Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997)

Objectifs Parties I & II

La peau est particulièrement sensible aux effets des RI et des UVB. Sa topographie (couche la plus superficielle anatomiquement) et sa forte radiosensibilité (l'épiderme est un tissu à renouvellement très rapide) font de ce tissu un organe cible des expositions aux RI et UVB. Notre hypothèse de travail est basée sur le fait qu'une partie de ces effets est due à l'atteinte intrinsèque des kératinocytes par l'irradiation et notamment à la production d'ERO. Les RI exercent leur action délétère par une forte production d'ERO responsables d'une induction du stress oxydatif.

Dans un premier volet de la Partie I, **ce travail répond au cahier des charges défini en commun avec l'entreprise Bio-EC**. Le but de ce travail a été le développement de modèles biologiques ayant pour objectif d'étudier les pouvoirs anti-apoptotique et anti-oxydant de molécules pharmacologiques fournies par notre partenaire industriel Bio-EC. Les modèles expérimentaux choisis sont d'une part les kératinocytes primaires « Normal Human Epidermal keratinocytes » (NHEK) et la lignée spontanée et non-tumorale HaCaT, et d'autre part l'explant de peau humaine alternatif aux expériences *in vivo* sur animal développé par Bio-EC. Cette démarche, une fois validée, a permis de tester deux molécules proposées par notre partenaire : le Polyphénol P et le geranylgeranylacétone (GGA).

Dans un second volet de la Partie I, nous avons approfondi ces travaux par une étude comparative des RI et des UVB sur ces modèles afin d'étudier la survie cellulaire et la mesure du stress oxydatif induits par deux types de rayonnements.

A partir des résultats obtenus sur le délai d'observation post-irradiation, les conditions d'irradiation RI et l'étude portée sur le stress oxydatif, l'objectif de la Partie II a été de caractériser d'une part les dommages induits par les RI au niveau de la peau en terme d'atteinte oxydative et d'autre part en terme de mort cellulaire radio-induite (nécrose et apoptose). Enfin, nous avons observé la radiosensibilité différentielle des kératinocytes NHEK et des HaCaT après exposition aux RI, et nous avons essayé d'expliquer cette différence (article n°1 JDS).

Partie I : Méthodologie & Evaluation du pouvoir anti-oxydant de molécules pharmacologiques sur la peau

Cette première partie a eu pour objectif de mettre au point un modèle d'explant de peau humaine en survie et d'évaluer le pouvoir anti-oxydant de molécules pharmacologiques sur ce modèle et sur des cultures cellulaires de kératinocytes. Deux systèmes inducteurs de stress oxydatif ont été étudiés : les RI et les UVB.

I. Mise au point des modèles biologiques cutanés

Afin d'apprécier le pouvoir anti-oxydant d'une dizaine de molécules pharmacologiques, nous avons procédé par étapes : la première étape a consisté à tester le pouvoir anti-oxydant des molécules. Si la molécule testée mettait en évidence une capacité anti-oxydante notable par le test ORAC, nous avons envisagé d'évaluer ses capacités anti-oxydantes sur différents systèmes biologiques représentatifs de la peau :

- a) les kératinocytes primaires NHEK et la lignée HaCaT issus de l'épiderme humain
- b) le modèle alternatif d'explant de peau humaine développé par Bio-EC

I.1. Evaluation du pouvoir anti-oxydant de molécules par le test ORAC

La mesure de l'ORAC (Oxygen-Radical Absorbance Capacity) développée par Cao (Cao *et al*, 1993) est une méthode simple et reproductible permettant d'évaluer la capacité anti-oxydante de différentes molécules (Benderitter *et al*, 2003). La β -PE (« Porphyrinium cruentum β -Phycoerythrin » ou β -Phycoérythrine) est une protéine fluorescente extrêmement sensible au stress oxydatif. En présence d'AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropane)dichloride], un donneur de radicaux peroxy, la structure tétramérique de la β -PE est modifiée, elle se dimérise. Cette dimérisation dépendante de la concentration en radicaux peroxy du milieu réactionnel peut être suivie en mesurant la décroissance de la fluorescence de la β -PE en fonction du temps. Cette cinétique de décroissance de la

fluorescence est directement reliée à la concentration de radicaux libres présents dans le volume réactionnel dans des conditions définies de temps et de concentrations de β -PE et d'AAPH (Figure 31).

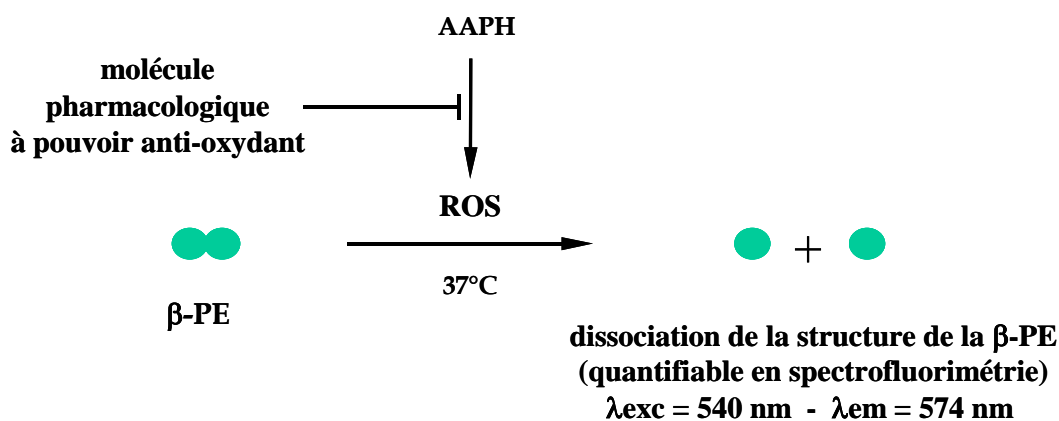


Figure 31 : Principe du test ORAC

Si à ce système, on ajoute une molécule anti-oxydante à une concentration donnée, celle-ci piègera, en fonction de sa capacité anti-oxydante une quantité définie des espèces radicalaires produite par l'AAPH et retardera d'autant la diminution de la fluorescence de la β -PE.

Ceci est le cas du Trolox (« 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid ») par exemple qui servira de molécule de référence au cours de nos expériences. Plus la concentration de Trolox sera élevée dans le milieu réactionnel et plus sa capacité anti-oxydante sera importante (Figure 32).

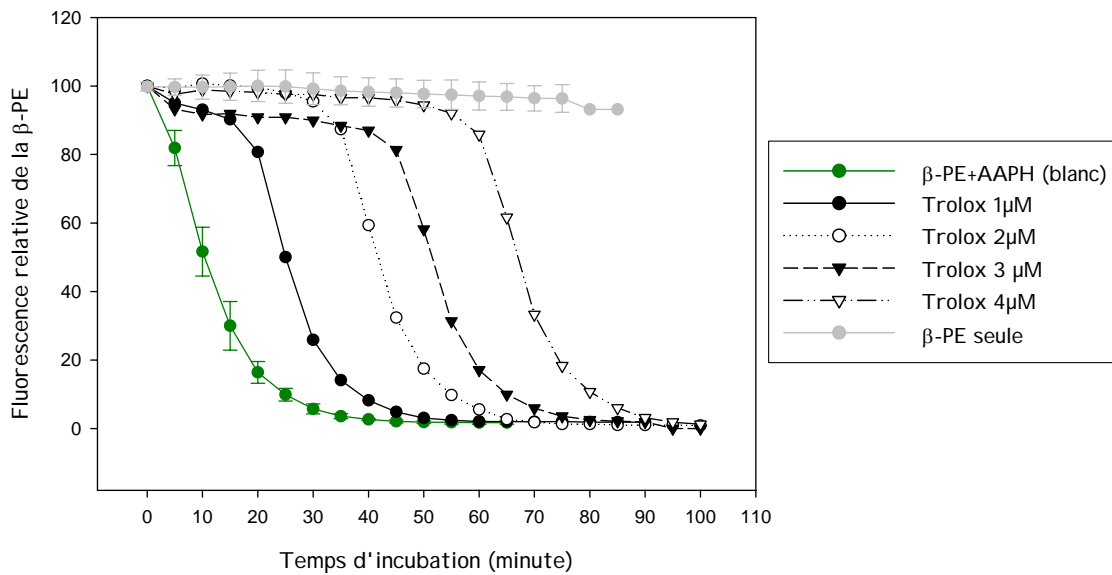


Figure 32 : Cinétique de piégeage des espèces radicalaires (produites par l'AAPH) par la β -phycoérythrine en présence de Trolox

Par convention, l'activité anti-oxydante **ORAC** de toute molécule est mesurée par rapport à une référence : le **Trolox**. La capacité anti-oxydante d'1 μM de Trolox correspond à 1 ORAC (Cao *et al*, 1993).

$$\text{ORAC (U/ml)} = k \frac{(S_{\text{molécule testée}} - S_{\text{blanc}})}{(S_{\text{trolox } 1\mu\text{M}} - S_{\text{blanc}})}$$

k = facteur de dilution

S = aire sous la courbe

Blanc = β -PE + AAPH

Nous avons alors établi la relation dose-effet de la valeur ORAC en fonction de la concentration du Trolox (Figure 33).

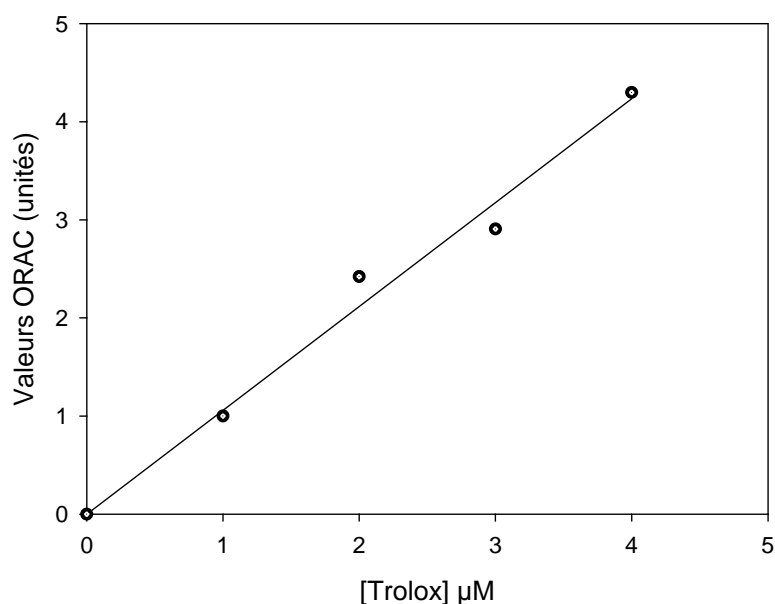


Figure 33 : Valeur de l'ORAC en fonction de la concentration du Trolox

Après évaluation par la méthode du test ORAC d'une dizaine de molécules proposées par Bio-EC, nous avons retenu deux molécules pharmacologiques d'intérêt possédant un pouvoir anti-oxydant significatif : un polyphénol P et le geranygeranylacétone (GGA). Ces deux molécules ont fait l'objet d'une étude sur nos deux types cellulaires de kératinocytes et sur le modèle d'explant de peau humaine de la société Bio-Ec. Les effets de ces molécules seront développés dans le paragraphe II.

1.2. Choix des modèles d'étude *in vitro* et *ex vivo* et protocole d'irradiation

1.2.1. Modèles cellulaires

Nous avons choisi deux types cellulaires issus de l'épiderme, que sont les kératinocytes primaires NHEK et la lignée de kératinocytes HaCaT immortelle, spontanée, possédant un phénotype transformé *in vitro* mais non-tumorale. Celle-ci possède une capacité de différenciation épidermique complète et identique à celle des NHEK, exprimant normalement les kératines 1 et 10 et des marqueurs tels que l'involucrine et la filaggrine (Boukamp *et al*, 1988). La radiosensibilité des NHEK et des HaCaT après RI et UVB a été montrée comme différente, les HaCaT étant plus radorésistantes que les NHEK (Petit-Frere *et al*, 2000 ; Mendonca *et al*, 1991). Cette lignée est un outil intéressant pour étudier la différence de radiosensibilité après irradiation.

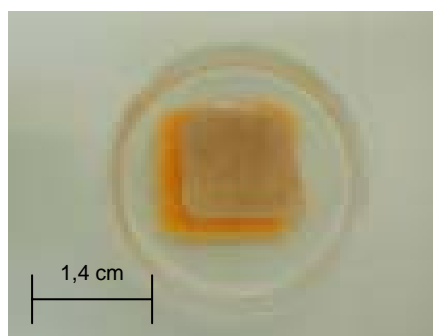


Figure 35 : Photo de l'explant de peau humaine

La qualité des explants de chaque biopsie a été normalisée par mesure de la lactate déshydrogénase (LDH) relarguée par les cellules de l'explant dans le milieu de culture. Ce dosage permet la quantification de la viabilité cellulaire de l'explant. Il est basé sur la mesure par spectrophotométrie du formazan relargué dont la quantité est directement proportionnelle à celle de LDH. En effet, la LDH réduit NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$ par oxydation du lactate en pyruvate, puis un catalyseur transfère $\text{H} + \text{H}^+$ du $\text{NADH} + \text{H}^+$ au sel de tétrazolium qui est alors réduit en formazan. Plus la quantité de LDH est importante et plus la mort cellulaire est élevée.

Des tests d'intra-répétabilité (plusieurs mesures répétées d'une même biopsie) et d'inter-répétabilité (une mesure de différentes biopsies) ont été réalisés sur les explants.

1.2.3. Protocole d'irradiation RI et UVB

Les kératinocytes NHEK et HaCaT en monocouche sont irradiés à 70-80% de confluence dans des puits de $9,6 \text{ cm}^2$ (plaques 6-puits) et les explants sont irradiés 24 heures après leur excision à partir de plasties de peau humaine dans ces mêmes puits.

Les cellules et les explants sont irradiés aux RI dans 2 ml de leur milieu respectif, par une source de Césium 137 (IBL 637, CIS Bio International, France) à un débit de dose de $1 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ pour toutes les expériences excepté les tests de clonogénicité (débit de dose de $2 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$).

Les cellules et les explants sont irradiés aux UVB sous une table d'irradiation (Automate UV, RMX 3W, VILBER LOURMAT, France), après avoir pris la précaution de retirer le

milieu et les couvercles des plaques 6-puits. La dose d'UVB est calculée en fonction de deux paramètres : le temps (minutes) et l'énergie (J/cm²).

Après les irradiations, le milieu des cellules et des explants est changé immédiatement, avant incubation dans l'étuve, et remplacé tous les 2 jours.

I.3. Optimisation des modèles cutanés pour l'étude de la survie cellulaire

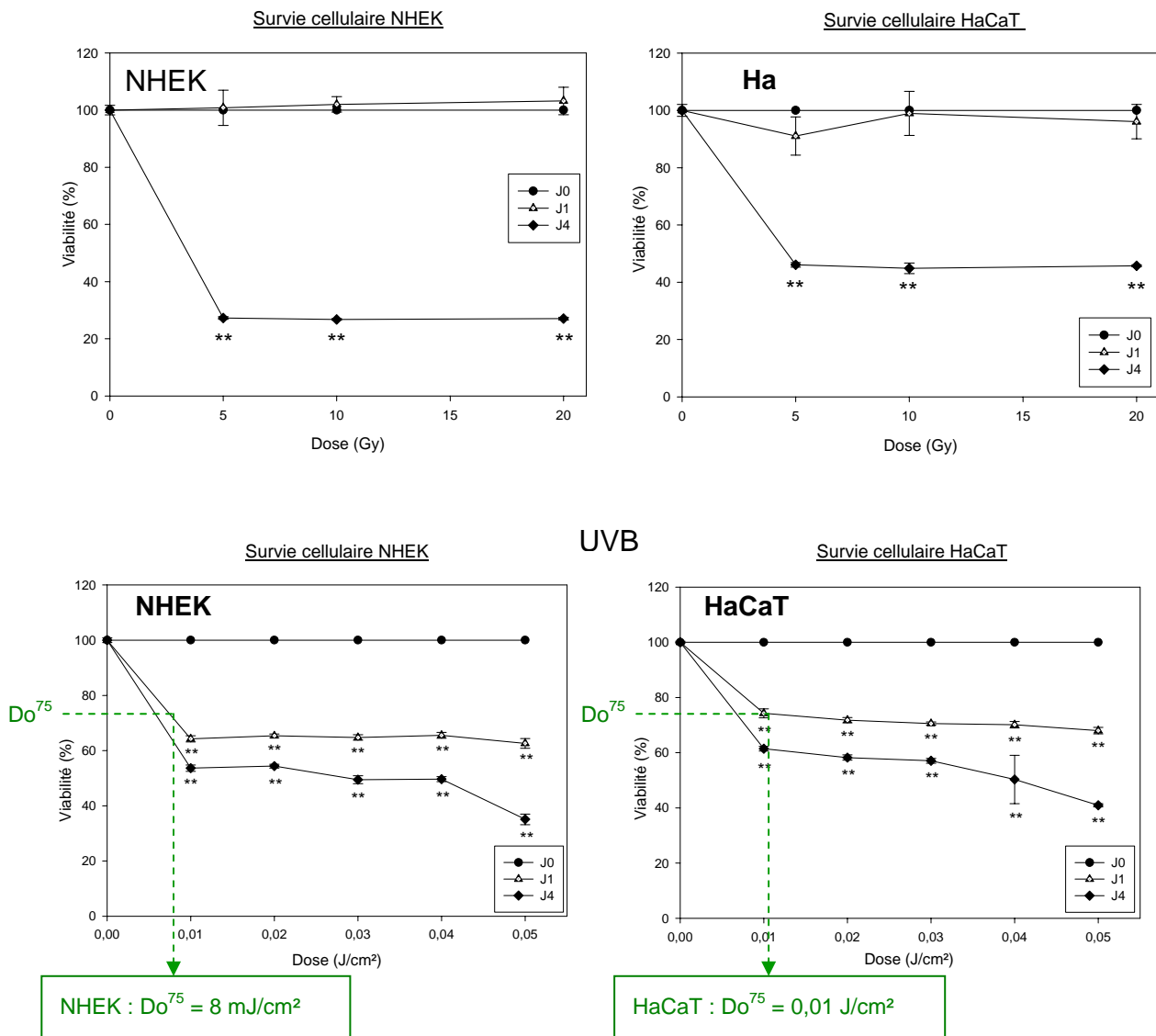
Dans un premier temps, nous avons déterminé le délai d'observation post-irradiation et les conditions d'irradiation RI et UVB à appliquer sur les cellules NHEK et HaCaT ainsi que sur les explants de peau humaine, afin d'étudier l'induction des enzymes du stress oxydatif par ces deux types de rayonnements sur ces différents modèles. Ces travaux ont permis de réaliser l'ensemble des études expérimentales de la Partie I.

Les protocoles expérimentaux et l'analyse détaillée des résultats obtenus après irradiation aux RI des cellules et de l'explant ont été approfondis dans l'article n°1 figurant à la suite de cette partie (Isoir *et al*, 2006).

I.3.1. Détermination du délai d'observation post-irradiation

Des cinétiques de viabilité des deux types cellulaires (Figure 36) et des explants de peau humaine maintenus en survie (Figure 37) ont été réalisées jusqu'à 4 jours après irradiation, en utilisant la technique du **test MTS** (Promega, France). Ce test permet l'évaluation de la viabilité, par incubation des cellules ou des explants pendant 2 heures dans une solution de MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] et de PMS (Phenazine MethoSulfate). Le MTS est réduit par les cellules en formazan, dont la quantité est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. On mesure l'absorbance à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

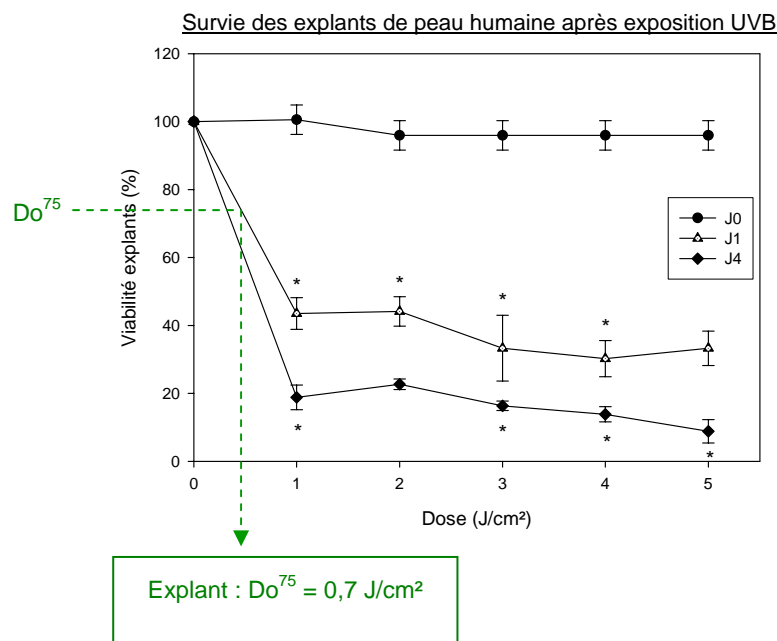
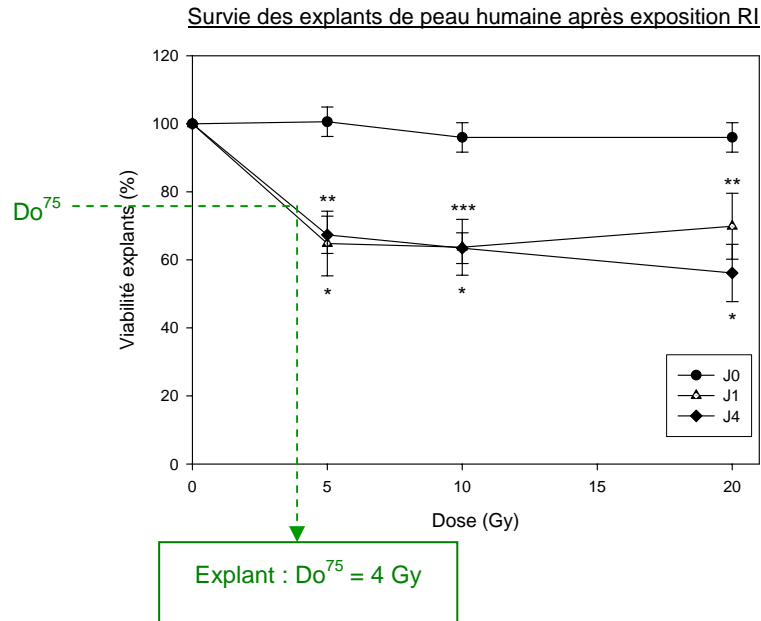
Ces cinétiques nous ont permis de sélectionner les temps d'observation post-irradiation les plus pertinents du point de vue de la survie cellulaire. La dose pour laquelle 75% des cellules sont vivantes (Do^{75}) a été déterminée 24 heures post-irradiation.



****p<0.01 par rapport au contrôle J0, n = 3**

Figure 36 : Evaluation de la survie des cellules NHEK et HaCaT après irradiation RI ou UVB par la technique du test MTS

Des cinétiques de survie des cellules NHEK et HaCaT sont réalisées aux temps J0, J1 et J4, après irradiation aux RI (de 5 à 20 Gy) ou aux UVB (de 0,01 à 0,05 J/cm²). La viabilité des cellules est exprimée en pourcentage et les valeurs à J1 et J4 sont comparées à celles obtenues à J0. La dose d'irradiation UVB correspondant à une viabilité cellulaire de 75% (Do⁷⁵) est alors calculée à J1 post-exposition pour les deux types cellulaires. La Do⁷⁵ après RI n'a pas pu être mesurée en raison du fort taux de survie à J1 post-irradiation.



*** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ par rapport au contrôle J0, n = 3

Figure 37 : Evaluation de la survie des explants de peau humaine après irradiation RI ou UVB par la technique du test MTS

Des cinétiques de survie des explants de peau humaine sont réalisées aux temps J0, J1 et J4, après irradiation aux RI (de 5 à 20 Gy) ou aux UVB (de 1 à 5 J/cm²). La viabilité des explants est exprimée en pourcentage et les valeurs à J1 et J4 sont comparées à celles obtenues à J0. Les doses d'irradiation RI et UVB correspondant à une viabilité de l'explant de 75% (Do^{75}) sont alors calculées à J1 post-exposition.

D'après les courbes de survie MTS après RI (Figure 36), on observe que les NHEK sont viables à 100% 24 heures après irradiation de 0 à 20 Gy. Une chute brutale de leur survie est constatée 4 jours post-irradiation, 20% des cellules restent vivantes. On observe le même profil de courbe de survie pour les HaCaT après irradiation de 5 à 20 Gy, excepté qu'à J4, 40% des cellules sont encore vivantes (2 fois plus que pour les NHEK).

La survie des NHEK et HaCaT diminue fortement dès 24 heures après une exposition aux UVB de 0,01 à 0,05 J/cm². La viabilité est de 65% pour les NHEK et de 70-75% pour les HaCaT à J1. Quatre jours après irradiation de 0,01 J/cm² à 0,05 J/cm², la survie des NHEK décroît de 55% à 35%, tandis que celle des HaCaT diminue de 60% à 40%.

Nous avons alors calculé les doses pour lesquelles la viabilité des cellules est de 75%, 24 heures post-exposition aux UVB (Do^{75}) : 8 mJ/cm² pour les NHEK et 0,01 J/cm² pour les HaCaT. Ces résultats suggèrent que les NHEK seraient plus radiosensibles que les HaCaT après une exposition aux RI et aux UVB. L'observation des cinétiques de survie des cellules NHEK et HaCaT en fonction du temps post-irradiation nous a permis de sélectionner le temps J1.

La survie de l'explant de peau humaine (Figure 37) est de 65%, 24 heures et 4 jours post-irradiation RI de 5 à 20 Gy. Après exposition UVB de 1 à 5 J/cm², la survie décroît de 45% à 30% à J1 et elle atteint la valeur de 10% 4 jours post-radiation. La Do^{75} est de 4 Gy après RI et de 0,7 J/cm² après UVB pour l'explant.

Nous pouvons difficilement conclure sur l'efficacité biologique des UVB par rapport aux RI car leur dépôt d'énergie est différent. Pour les RI, il est exprimé en quantité d'énergie absorbée par unité de masse (J / kg) et pour les UVB, en quantité d'énergie absorbée par unité de surface (J / m²). Les quantités physiques des deux types de rayonnement sont donc peu comparables.

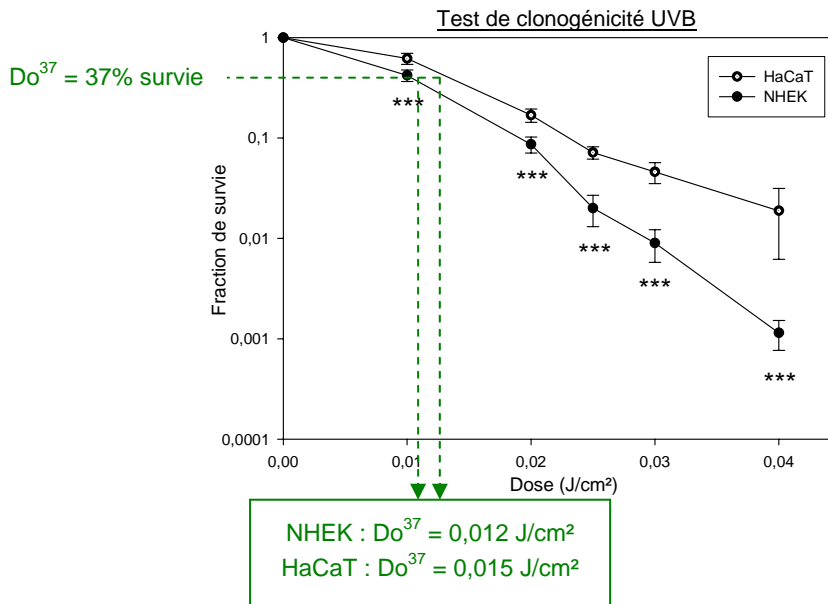
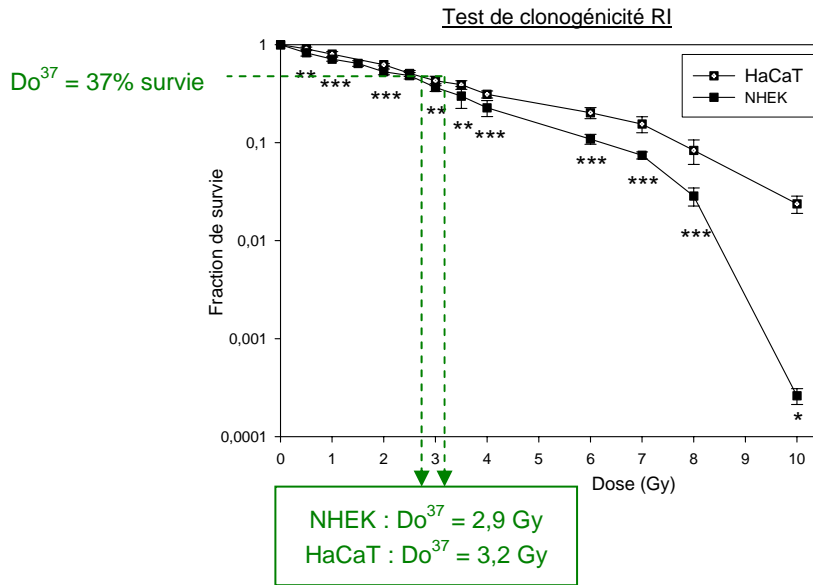
Quelque soit le modèle considéré, toutes ces données nous ont permis de sélectionner le temps J1 après irradiation RI et UVB pour les deux types cellulaires et l'explant de peau humaine. En effet, à J1 post-irradiation, les pourcentages de survie des cellules restent élevés.

I.3.2. Détermination des conditions d'irradiation RI et UVB

Le choix des doses appliquées au modèle de l'explant est basé d'une part sur les résultats des tests de survie MTS et d'autre part, sur les marquages TUNEL des coupes congelées. Concernant les cellules, ce choix est basé sur les résultats des tests de clonogénicité.

a) Cellules NHEK et HaCaT

Le test de clonogénicité permet de déterminer le nombre de cellules capables de se diviser et de former des colonies de 50 cellules au moins, 7 à 12 jours après ensemencement et irradiation à différentes doses de RI ou d'UVB (Vanmarcke *et al*, 1997; Ramsay and Birrell, 1995). Après comptage des colonies de NHEK et HaCaT, la fraction de survie est calculée par rapport au contrôle non irradié (Figure 38). Le paramètre Do^{37} de la courbe de survie est alors calculé : il correspond à une survie cellulaire de 37%.



*** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ par rapport au contrôle, n = 6

Figure 38 : Evaluation de la survie des cellules NHEK et HaCaT après irradiation RI ou UVB par le test de clonogénicité

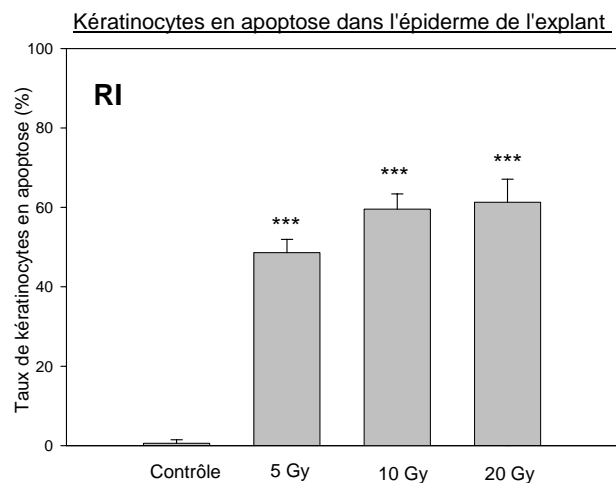
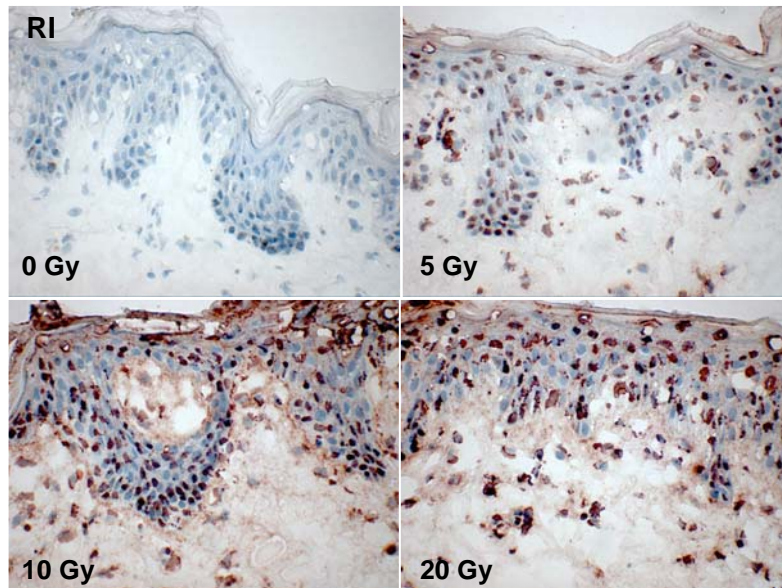
Les doses pour lesquelles la survie des cellules est de 37% sont de 2,9 Gy et 0,012 J/cm² pour les NHEK, et de 3,2 Gy et 0,015 J/cm² pour les HaCaT, après irradiation RI et UVB respectivement.

Ces résultats confirment que les NHEK sont plus radiosensibles que les HaCaT en se basant sur les tests de survie MTS et de clonogénicité après exposition aux RI et aux UVB.

b) Explant de peau humaine

Le marquage TUNEL permet de révéler sur coupes de peau congelées de 7 µm les cellules apoptotiques, ici les kératinocytes de l'épiderme. Ce test est basé sur la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN, caractéristique des cellules en apoptose. L'ADN des cellules est marqué *in situ* par la méthode appelée TUNEL « TdT-mediated dUTP Nick End Labelling » (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche, France).

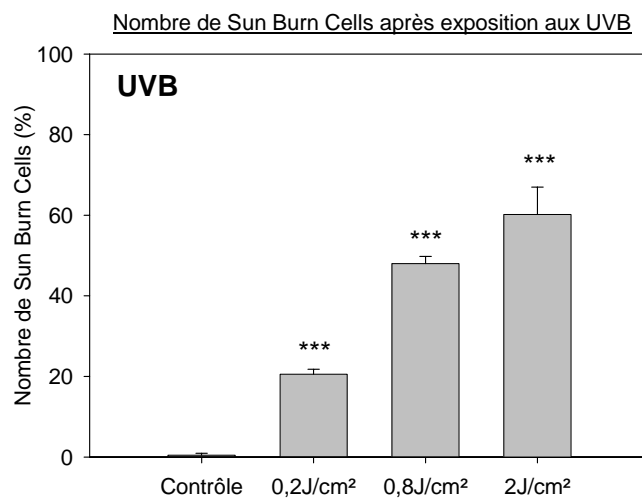
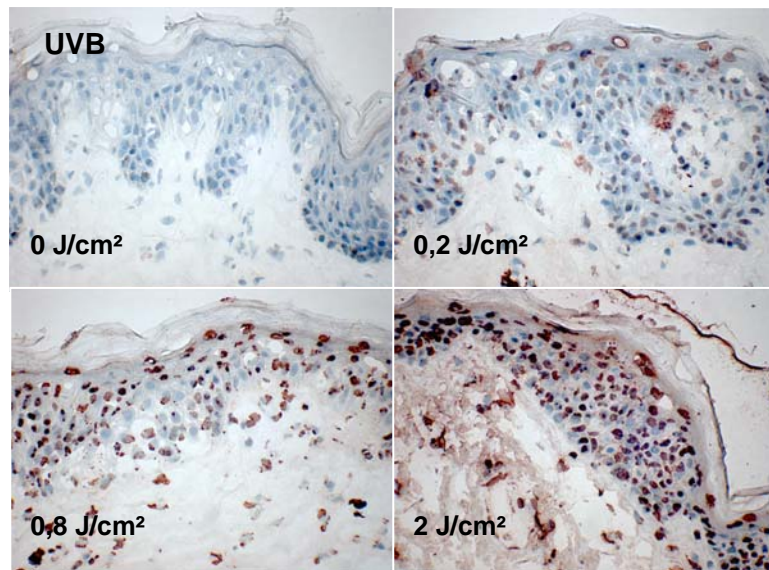
Nous avons mesuré le pourcentage de kératinocytes apoptotiques par unité de surface après une exposition à différentes doses de RI : 5, 10 et 20 Gy (Figure 39).



*** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ par rapport au contrôle, n = 3

Figure 39 : Détection des kératinocytes apoptotiques de l'explant de peau humaine 24h après irradiation RI par le marquage TUNEL

Le marquage TUNEL permet aussi le comptage des cellules « coup de soleil » (« Sun Burn Cells ») qui sont des kératinocytes entrant en apoptose après une exposition aux UVB (Figure 40).



***p<0.001 par rapport au contrôle, n = 3

Figure 40 : Détection des « Sun Burn Cells » de l'explant de peau humaine
24h après irradiation UVB par le marquage TUNEL

Après observation des coupes d'explant marquées par la méthode TUNEL et comptage des kératinocytes apoptotiques, une augmentation importante du nombre de kératinocytes en apoptose a été montrée 24h après exposition à différentes doses de RI (de 5 à 20 Gy) et d'UVB (de 0,2 à 2 J/cm²), ceux-ci entraînant l'apparition de « Sun Burn Cells » dans l'épiderme.

Ces différents résultats nous ont permis de sélectionner des doses d'irradiation appliquées à nos modèles expérimentaux. Ces doses sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Modèle biologique	Doses RI	Doses UVB	Doses RI sélectionnées	Doses UVB sélectionnées
NHEK et HaCaT	$Do^{37} =$ 2,9 Gy	$Do^{37} =$ 0,012 J/cm ²	1 Gy	0,01 J/cm²
	3,2 Gy	0,015 J/cm ²	2 Gy 3 Gy 3,5 Gy 4 Gy 5 Gy 10 Gy	0,02 J/cm² 0,04 J/cm² 0,06 J/cm²
Explants de peau humaine	$Do^{75} =$ 4 Gy	$Do^{75} =$ 0,7 J/cm ²	5 Gy 10 Gy 20 Gy	0,2 J/cm² 2 J/cm² 5 J/cm²

Cette étude nous a permis de choisir plusieurs doses d'irradiation d'après la valeur des Do^{37} et Do^{75} calculées. Nous avons alors sélectionné des faibles et fortes doses de RI : de 1 à 10 Gy pour les deux types cellulaires et de 5 à 20 Gy pour les explants ; d'UVB : de 0,01 à 0,06 J/cm² pour les cellules et de 0,2 à 5 J/cm² pour les explants.

Ces doses permettent une étude du stress oxydatif induit par les RI et les UVB tout en préservant une survie cellulaire acceptable.

I.4. Etude du stress oxydatif

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production ERO et la capacité anti-oxydante de la cellule. Le suivi des activités de la catalase, GPx et de la SOD permet d'apprécier le niveau d'induction des systèmes de défenses anti-oxydantes de nos systèmes biologiques. La quantité d'ERO produites par les cellules NHEK et HaCaT irradiées est appréciée après incubation avec du 2',7'-DiChloroFluorescein DiAcetate (DCFH-DA). Le DCFH-DA est hydrolysé en DCFH qui diffuse dans les cellules. Le DCFH est ensuite oxydé par les ERO produites en DCF hautement fluorescent. La quantité d'ERO est proportionnelle

à la fluorescence du DCF. L'analyse en cytométrie de flux permet de suivre leur production d'ERO à un temps choisi.

I.4.1. Mesure du stress oxydatif induit par l'irradiation aux rayons γ

a) Cellules NHEK et HaCaT

Nous avons réalisé des courbes effet-dose des activités de la catalase et de la GPx après irradiation aux RI, pour les cellules NHEK (Figure 41) et HaCaT (Figure 42). Nous avons également évalué le pourcentage d'ERO produites 30 minutes et 24 heures après irradiation des cellules aux RI (5 et 10 Gy). Ces différents tests nous ont permis d'apprécier le niveau de stress oxydatif induit dans ces cellules.

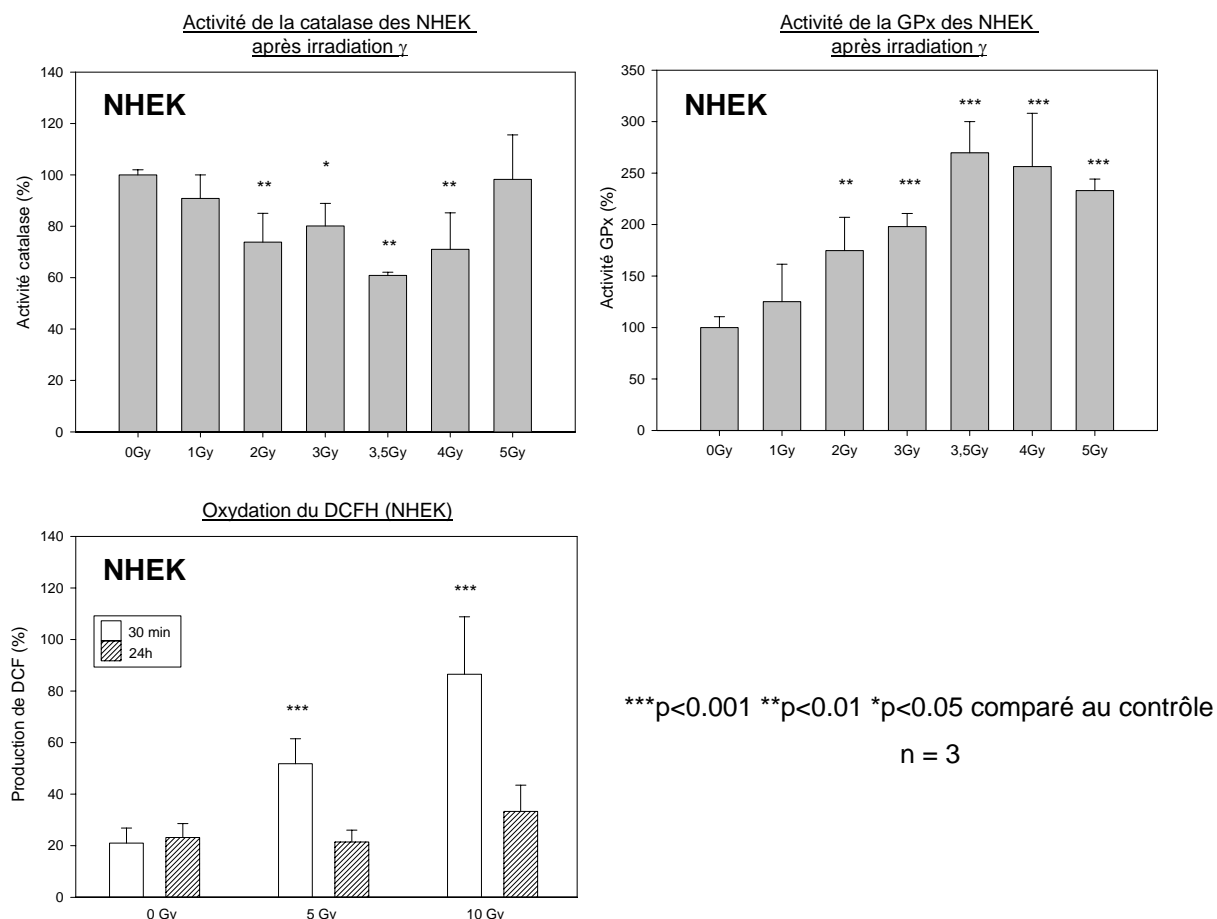


Figure 41 : Mesure des activités de la catalase, de la GPx et des taux de ERO produits par les cellules NHEK 24h après irradiation RI

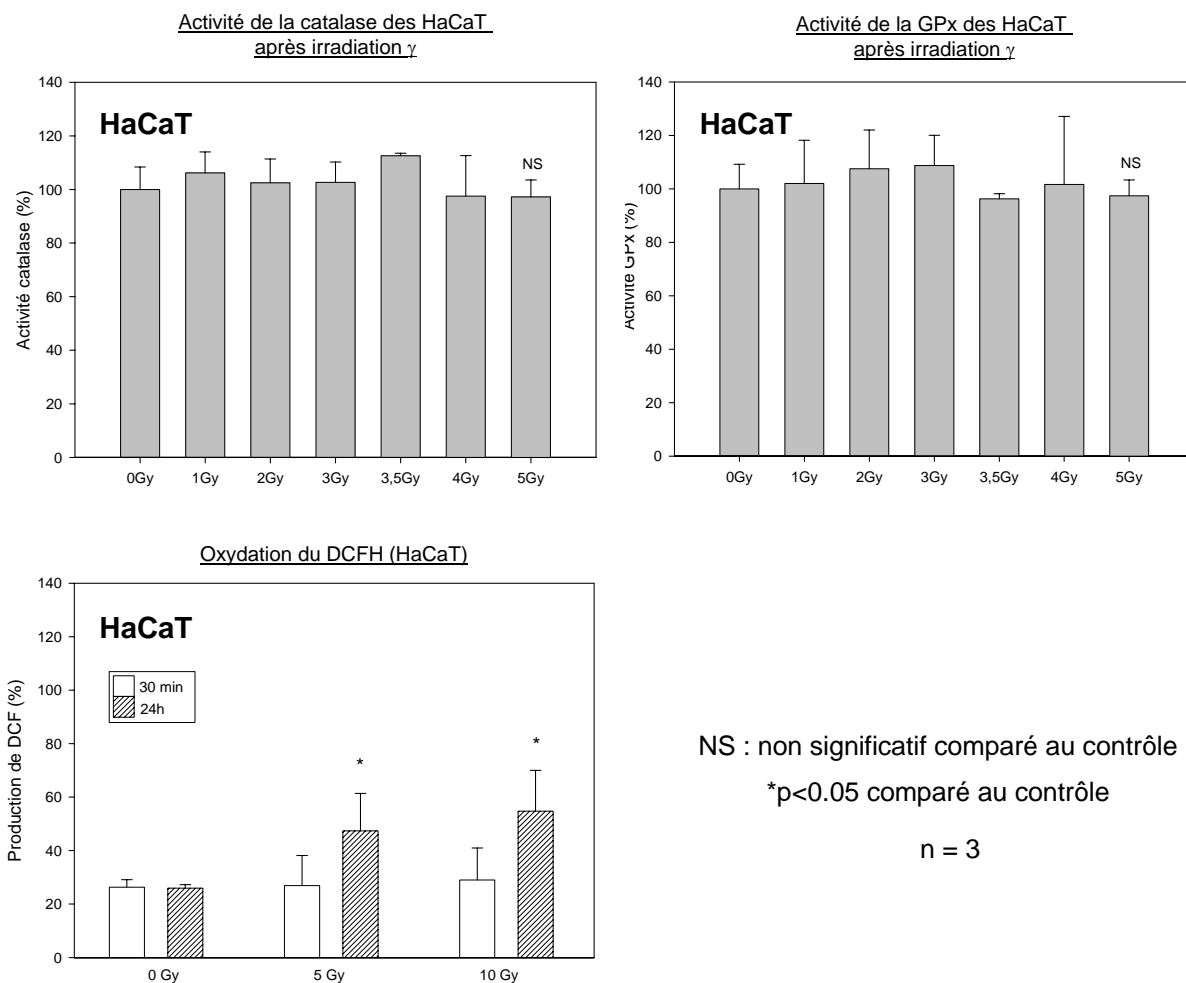


Figure 42 : Mesure des activités de la catalase, de la GPx et des taux d'ERO produits par les cellules HaCaT 24h après irradiation RI

Nous avons observé que le niveau de base des activités enzymatiques de la catalase et de la GPx est plus élevé pour les NHEK que les HaCaT. Après irradiation RI, nous avons montré que les cinétiques de production d'ERO sont dépendantes du type cellulaire.

Pour les NHEK, la production d'ERO est importante et très rapide puisqu'elle a lieu dès 30 minutes après irradiation et se stabilise à 24 heures, tandis que celle des HaCaT est moins importante et plus tardive (24h).

Nous avons noté des cinétiques d'activités enzymatiques anti-oxydantes différentes pour les 2 types cellulaires. Une diminution de l'activité de la catalase et une augmentation de celle de la GPx sont significatives pour les NHEK 24 heures après irradiation RI, alors qu'elles ne varient pas pour les HaCaT.

b) Explant de peau humaine

Les activités enzymatiques de 3 enzymes, la catalase, la GPx et la SOD ont été mesurées dans l'explant de peau humaine après exposition aux RI (Figure 43).

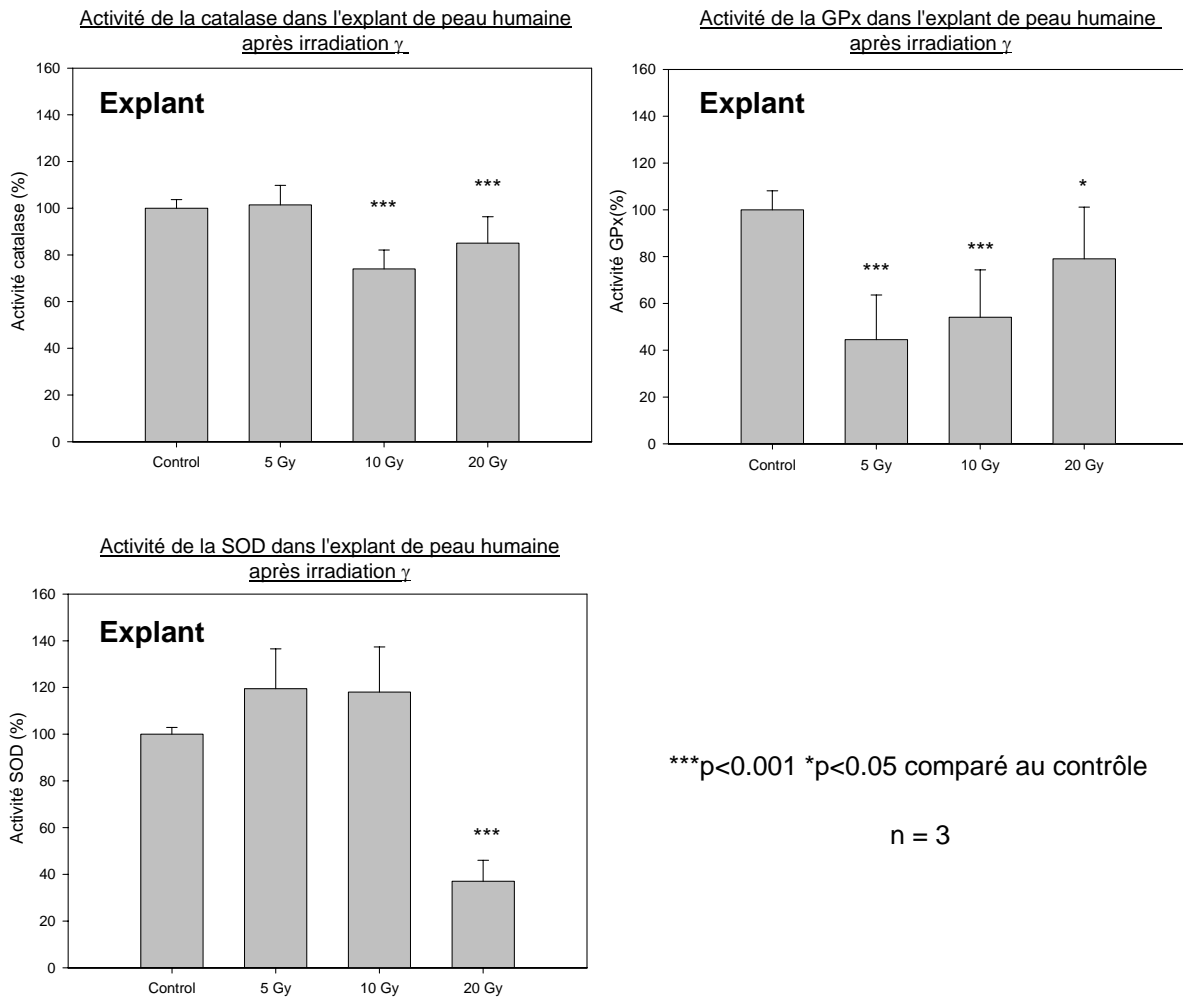


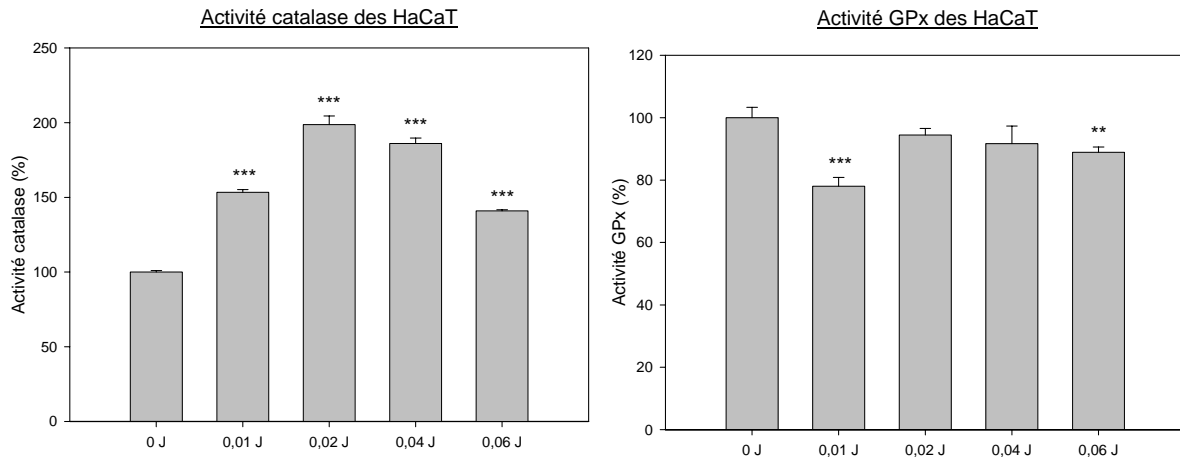
Figure 43 : Mesure des activités de la catalase, de la GPx et de la SOD dans l'explant de peau humaine 24h après irradiation RI

Les activités de ces trois enzymes diminuent fortement après irradiation par rapport aux contrôles non irradiés ; celle de la GPx dès 5 Gy et celle de la catalase à partir de 10 Gy. En revanche, une dose minimale de 20 Gy est nécessaire à faire baisser de plus de la moitié l'activité de la SOD.

I.4.2. Mesure du stress oxydatif après exposition aux UVB

a) Cellules HaCaT

L'induction des systèmes de défenses anti-oxydantes (catalase et GPx) a été observée sur des HaCaT après exposition aux UVB (Figure 44).



*** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ par rapport au contrôle, n = 3

Figure 44 : Mesure des activités de la catalase et de la GPx des cellules HaCaT
24h après irradiation UVB

Après exposition des cellules HaCaT aux UVB, les taux d'activité de la catalase augmentent de façon significative par rapport au contrôle non irradié. Les doses de 0,01 à 0,06 J/cm² induisent de 140 à 200% d'augmentation de l'activité enzymatique de la catalase. Les taux de GPx tendent à diminuer après exposition à ces doses d'UVB.

b) Explant de peau humaine

L'activité des enzymes anti-oxydantes telles que la catalase, GPx et SOD a été mesurée dans l'explant de peau humaine après exposition aux UVB (Figure 45).

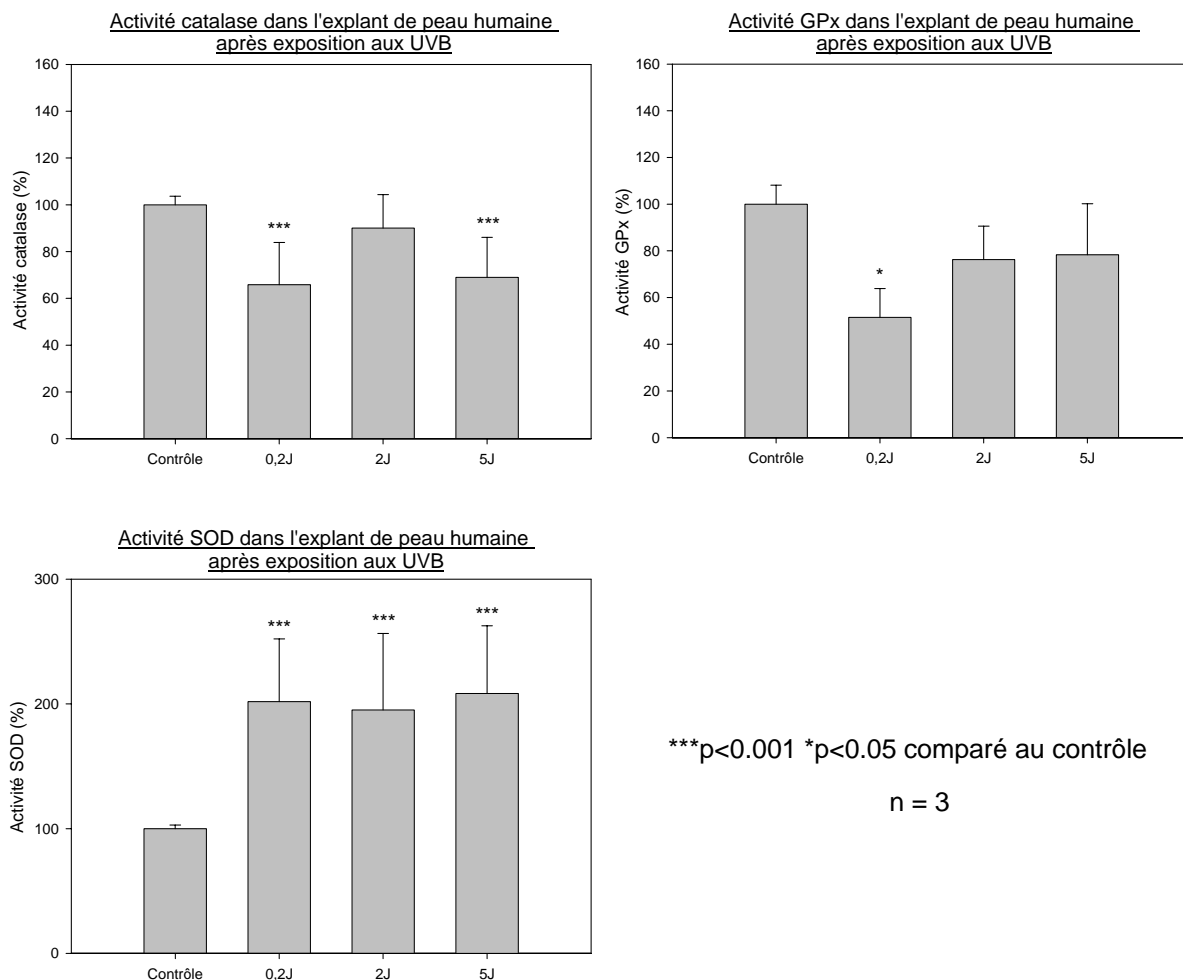


Figure 45: Mesure des activités de la catalase, de la GPx et de la SOD dans l'explant de peau humaine 24h après irradiation UVB

Dans l'explant de peau humaine exposé depuis 24h aux UVB, les activités de la catalase et de la GPx diminuent de façon significative à la dose de 0,2 J/cm², tandis que celle de la SOD est doublée significativement aux doses de 0,2 à 5 J/cm² par rapport au contrôle non irradié.

II. Evaluation des capacités anti-oxydantes de deux molécules sur l'explant de peau humaine

Après avoir optimisé nos modèles d'étude, nous avons évalué le pouvoir anti-oxydant d'une dizaine de molécules proposées par Bio-EC.

Deux molécules pharmacologiques d'intérêt ont été retenues. Elles sont de puissants anti-oxydants : un polyphénol P, plus précisément une catéchine, prévenant des atteintes cardiovasculaires, et le geranylgeranylacétone (GGA) possédant un effet protecteur vis à vis de l'atteinte de la muqueuse gastrique (Figure 46).

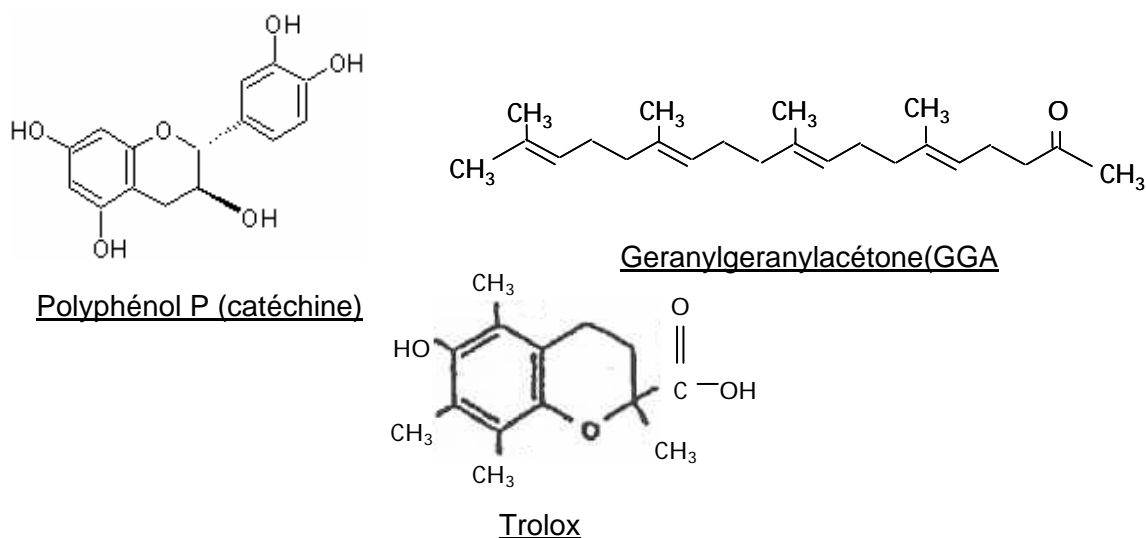


Figure 46 : Formules chimiques du Polyphénol P, du GGA et du Trolox

Le détail des résultats de cette étude est présenté dans deux rapports placés en annexe. Nous nous proposons de résumer brièvement les conclusions de ces rapports ci-après.

II.1. Etude du pouvoir anti-apoptotique et anti-oxydant du polyphénol P

Dans nos conditions expérimentales, à poids équivalents, nous avons démontré tout d'abord qu'après exposition de l'explant de peau humaine aux UVB,

- Le polyphénol P possède une **capacité anti-oxydante** équivalente au Trolox par mesure du test ORAC.
- Il n'a **pas d'effet cytotoxique** sur la survie des kératinocytes après 24h de traitement.
- Il possède également un **pouvoir anti-apoptotique** significatif après observation des cellules « Sun Burn Cells » et des kératinocytes en apoptose marqués au TUNEL.
- Enfin, le **pouvoir anti-oxydant** du polyphénol P est significatif, notamment en augmentant l'activité anti-oxydante de la SOD.

II.2. Etude du pouvoir anti-apoptotique et anti-oxydant du geranylgeranylacétone (GGA)

Dans nos conditions expérimentales, à concentrations équivalentes, nous avons démontré tout d'abord qu'après exposition de l'explant de peau humaine aux UVB,

- Le GGA possède une **capacité anti-oxydante** significative mais inférieure au Trolox par mesure du test ORAC.
- Il n'a **pas d'effet cytotoxique** sur la survie des kératinocytes HaCaT après 24h de traitement.
- Il possède un **pouvoir anti-apoptotique** significatif après observation des cellules « Sun Burn Cells » et des kératinocytes en apoptose marqués au TUNEL.
- Il possède un **pouvoir anti-oxydant** significatif, notamment en améliorant l'activité anti-oxydante de la catalase.
- Le GGA semble **réduire le nombre d'HSP27 et HSP70**, ce qui peut laisser supposer que ce traitement a permis aux kératinocytes de lutter rapidement et efficacement contre l'atteinte de la peau par les UVB.

En conclusion, le GGA s'est révélé être la molécule caractérisée par le plus important pouvoir anti-oxydant et son étude est originale. En effet, le GGA n'a jamais été testé sur la peau. Son étude sera développée dans la Partie III.

Partie II : La radiosensibilité des kératinocytes de peau humaine irradiés aux rayonnements ionisants est liée à la modulation du stress oxydatif cutané (Article 1)

I. Introduction

Il est admis qu'une exposition prolongée des kératinocytes à une production d'ERO peut perturber l'homéostasie de l'épiderme (Van Remmen *et al*, 2004). Les mécanismes de protection de la peau face aux dommages oxydatifs sont contrôlés par un système de défense enzymatique complexe (Morlière *et al*, 1992 ; Béani, 2001). Plusieurs systèmes enzymatiques sont identifiés dans la peau, notamment la SOD dans l'épiderme, le système du glutathion et de la thioredoxine réductase, la GPx et la catalase dans l'épiderme et le derme (Pugliese, 1998 ; Shindo *et al*, 1994 ; Rhie *et al*, 2001).

Les RI induisent de façon directe ou indirecte la formation de différents types d'ERO dans la peau : e^-_{aq} , H° , $^\circ OH$, O_2° , H_2O_2 et NO° , tous induits de façon très précoce. Une production trop élevée d'ERO induite par une exposition aux RI peut provoquer l'apoptose des kératinocytes (Zuliani *et al*, 2005 ; Chandra *et al*, 2000). Pour une concentration d'ERO plus faible, un lien a été établi entre un stress oxydatif chronique et une atteinte du tissu cutané induite par les RI (Robbins and Zhao, 2004).

Nous nous sommes demandés d'une part si la production d'ERO par les RI dans les kératinocytes de l'épiderme humain peut conduire à leur mort par apoptose ; d'autre part si la capacité des kératinocytes à gérer le stress oxydatif radio-induit peut contrôler leur radiosensibilité. Pour répondre à ces questions, nous avons tout d'abord analysé la réponse oxydative cellulaire induite par les RI et l'induction de l'apoptose dans un modèle d'explant de peau humaine. Puis, nous avons observé l'influence de la réponse oxydative radio-induite sur deux types de kératinocytes humains de radiosensibilités différentes NHEK et HaCaT, en considérant la production de ERO comme une source majeure d'atteinte des kératinocytes.

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans le Journal of Dermatological Science (Isoir *et al*, 2006).

II. Résultats

II.1. Un lien est mis en évidence entre le stress oxydatif radio-induit et la mort par apoptose des kératinocytes de l'explant

La viabilité des explants de peau humaine décroît 24 heures après une irradiation de 5 à 20 Gy. Une diminution des activités de la GPx et de la catalase est observée 24h après des irradiations respectives de 5 et 10 Gy. Les activités de ces enzymes ainsi que celle de la SOD sont réduites après une irradiation de l'explant à 20 Gy. L'analyse des macro-arrays d'explants de peau humaine irradiés au préalable (24h) à 20 Gy a permis de révéler plusieurs gènes impliqués dans le contrôle du stress oxydatif et de l'apoptose. L'expression de la thioredoxine réductase, de la thioredoxine peroxydase et de « Heat Shock Protein 70 » (HSP70) est augmentée dans la peau irradiée alors que celle de la glutathion réductase, des glutathions S-transférases M1 et 2 et de la GPx1 est réduite. Des gènes tels que la NADPH quinone réductase et l'hème oxygénase 1 sont également réprimés.

Un déséquilibre entre l'expression des gènes anti- et pro-apoptotiques a été mis en évidence. La réponse des gènes de l'apoptose, 24h après une irradiation de 20 Gy, est caractérisée par une diminution de l'expression de ceux impliqués dans la voie anti-apoptotique comparé au contrôle : « inhibitors of apoptosis protein » 3 et 4 (IAP3 et 4), « ionising radiation resistance-conferring protein », « death associated protein » 3 (DAP3) et le régulateur de l'apoptose Bcl-2. Paradoxalement, l'expression des gènes pro-apoptotiques de l'ubiquitine C et de la caspase 10 se voit augmentée après irradiation. L'expression des gènes anti- et pro-apoptotiques est corrélée à une augmentation dose-dépendante du nombre de kératinocytes en apoptose dans l'épiderme de l'explant, par marquage TUNEL. En effet, 24h après une irradiation de 20 Gy, le nombre de kératinocytes marqués atteint les 60% par rapport au contrôle non irradié.

II.2. La capacité des kératinocytes à gérer le stress oxydatif radio-induit contrôle leur radiosensibilité

Les courbes de survie cellulaire des kératinocytes primaires NHEK et de la lignée spontanée non tumorale HaCaT obtenues par le test de clonogénicité ont permis de calculer leur Do^{37} correspondant aux doses pour lesquelles 37% des cellules se divisent après irradiation aux rayons γ . La valeur de la Do^{37} chez les NHEK s'est révélée plus faible que celle des HaCaT. Ceci a pu être confirmé par une valeur de pente de la courbe linéaire

quadratique plus élevée. On en conclue que les NHEK sont plus radiosensibles que les HaCaT. Nous avons ensuite observé le stress oxydatif radio-induit. Après irradiation des NHEK de 1 à 5 Gy, l'activité de la catalase est diminuée et celle de la GPx est augmentée, alors qu'aucune modulation significative de ces activités n'est mesurée pour les HaCaT. De plus, nous avons observé que les NHEK irradiées produisent des ERO en quantité plus importante comparé aux HaCaT et de façon précoce, dès 30 minutes après exposition à 5 et 10 Gy. Ces résultats ont été obtenus après marquage des cellules au DCFH-DA et comptage par cytométrie en flux. La capacité différente des deux types de kératinocytes à moduler le stress oxydatif peut expliquer leur différence de radiosensibilité. En effet, la mesure des activités enzymatiques chez les deux types cellulaires a permis de mettre en évidence un lien entre la production d'ERO tardive (24h) chez HaCaT et la faible induction de leur système anti-oxydant, en opposition avec les NHEK, plus radiosensibles que les HaCaT. En conclusion, la radiosensibilité propre à ces deux types de kératinocytes serait liée à l'induction différentielle des défenses anti-oxydantes après irradiation.

D'autre part, nous avons observé, après marquage TUNEL de l'explant de peau humaine, que le pourcentage de kératinocytes morts par apoptose est important 24h après des irradiations de 5 et 10 Gy: 48,6% et 59,5% respectivement. De plus, nous avons démontré une élévation de 20% du niveau de mort cellulaire comprenant la mort par nécrose et apoptose, 24h après irradiation de 5 et 10 Gy des deux types cellulaires. Enfin, l'augmentation des taux de mort cellulaire des cellules radiosensibles NHEK irradiées par rapport aux contrôles s'est révélée comme significative, contrairement à celle des HaCaT.

III. Conclusion

Nous avons démontré dans un premier temps que l'apoptose des kératinocytes de peau humaine serait en partie dépendante de la production d'ERO après une exposition aux RI. Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence la radiosensibilité différente des kératinocytes NHEK et HaCaT irradiés aux rayons γ . Enfin, nous avons montré que cette différence peut être corrélée à la réponse oxydante différentielle des deux types de kératinocytes.



Human keratinocyte radiosensitivity is linked to redox modulation

Muriel Isoir^{a,b}, Valérie Buard^a, Philippe Gasser^b,
Philippe Voisin^a, Elian Lati^b, Marc Benderitter^{a,*}

^a *Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire IRSN, Service de Radiobiologie d'Epidémiologie, Direction de la Radioprotection de l'Homme, Laboratoire de RadioPathologie, IRSN, B.P. no. 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France*

^b *Laboratoire BIO-EC, Centre de Recherches et d'Expérimentations Cutanées, Clamart, France*

Received 21 July 2005; received in revised form 2 November 2005; accepted 24 November 2005

KEYWORDS

Skin;
Keratinocyte;
Oxidative stress;
Apoptosis;
Radiosensitivity;
Ionising radiation

Summary

Background: Ionising radiation-induced reactive oxygen species (ROS) overproduction induces keratinocyte alterations and constitutes one of the most common effects after therapeutic γ -irradiation. ROS production is controlled by a complex enzymatic system.

Objective: The aim of our study is to analyse the role of radiation-induced oxidative stress in keratinocytes death by apoptosis. We hypothesized that keratinocyte capacity to hamper radiation-induced ROS generation may control their radiosensitivity.

Methods: For this purpose, an original human skin explant model was developed and two types of human epidermal cells were used: primary keratinocytes NHEK and spontaneous non-tumourigenic cell line HaCaT.

Results: cDNA-arrays analysis was performed 24 h after a 20 Gy γ -radiation and revealed down-regulation of genes involved in oxidative stress control and the apoptosis process. This was confirmed by alterations in catalase, GPx and SOD enzymatic activities. This redox modulation was concomitant to the down-regulation of anti-apoptotic genes and up-regulation of some pro-apoptotic genes (caspase 10, ubiquitin C). Interestingly TUNEL labelling revealed an increase in the number of apoptotic cells. We also demonstrated a differential inducibility of the cell antioxidant network in two keratinocyte lines, which results in a differential cellular level of ROS, explaining their different radiosensitivities.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 58 35 91 36; fax: +33 1 58 35 84 67.
E-mail address: marc.benderitter@irsn.fr (M. Benderitter).

Conclusion: Keratinocytes apoptosis is partly dependent on ROS production after exposure to γ -rays. In addition, the differential radiosensitivity of keratinocytes is linked to different oxidative stress responses.

© 2005 Japanese Society for Investigative Dermatology. Published by Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Skin reactions are one of the most common side effects of therapeutic irradiation. Therefore, skin dose tolerance is a limiting parameter during radiotherapy protocols.

The epidermis is a dynamic organ, which actively renews itself, and the balance between proliferation and cell death must be closely controlled. Several lines of evidence suggest that continuous exposure of cells to endogenous production of reactive oxygen species (ROS) may affect epidermis homeostasis [1,2]. The skin's protective mechanisms against oxidative damage are carried out by a complex defence [3,4] and several major enzymatic antioxidant systems have been identified in the skin. Low levels of superoxide dismutase (SOD), known to detoxify superoxide anion are found in the epidermis. The glutathione system is found in both the epidermis and dermis particularly within fibroblasts. The glutathione peroxidase enzyme acts simultaneously with catalase to detoxify hydrogen peroxide in the peroxisomes from subcutis. The thioredoxin reductase system is similar to the glutathione system, and is distributed with a particularly high level in epithelial tissue [5–7]. ROS are characterized by a dual effect. On the one hand, ROS function as specific second messengers in signalling cascades involved in cell proliferation and differentiation [8], on the other hand, overwhelming skin inflammation can swamp the antioxidant defence system of the skin and lead to tissue destruction.

Ionising radiation induces the formation of ROS in the skin [9]. Early skin reactions occur within the first 6 weeks after radiotherapy and are characterized by depilation and erythema, followed in some extreme cases by dry and moist desquamation of the epidermis [10]. It is characterized by concomitant dose-dependent loss of dermal microvasculature, including endothelial cells, epidermal basal cells and keratinocytes. Following a large single dose fraction (22.3 Gy), a linear loss of basal cells reaching a nadir at about 21 days has been described in a swine model. Moreover, stem cells are killed, basal cells become quiescent and late DNA repair is triggered [11].

A causal link between chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury remains yet to be established [9]. In vitro, irradiation

leads to a rapid burst of ROS through the direct ionisation of target and water molecules. The radicals and ROS generated include aqueous electrons (e_{aq}^-), H^\bullet , hydroxyl radical ($^\bullet OH$), superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Due to their instability/reactivity, e_{aq}^- and $^\bullet OH$ react with target molecules. In contrast, $O_2^{\bullet -}$ and H_2O_2 are relatively stable in water. Recent data indicate that cells can exhibit more persistent and prolonged increases in ROS/reactive nitrated oxygen species (RNOS) over time frames ranging from several minutes to several days post-irradiation, mitochondria being their first site of generation. A role for RNOS, particularly nitric oxide $^\bullet NO$, is supported by literature in early radiation-induced signalling mechanisms [12].

External stress generating ROS, in addition to endogenous oxygen radicals, lead to keratinocyte apoptosis. Hence, H_2O_2 induces an up-regulation of the Fas/FasL system, leading to caspase-8 and downstream caspase activation, and mitochondrial disruption [13,14].

Interestingly, several apoptosis-related genes were found to be up-regulated in NHEK cells after a 20 Gy exposure to γ -rays [15]. Similarly, reduction in antioxidants defences, i.e. catalase, glutathione peroxidase (GPx) and SOD has been demonstrated after UVA radiation [16,17] or γ -rays exposure [18].

We therefore hypothesized that irradiation-induced oxidative stress may lead to keratinocyte death by apoptosis. To test this hypothesis, we analysed the effect of ionising radiation on the oxidative stress response and apoptosis process in a human skin explant model. To further characterize the ROS production as a major source of keratinocyte damage, we investigated the influence of redox response to irradiation on two cell types, with two different radiosensitivities.

2. Materials and methods

2.1. Explant culture

Human skin explants (2 cm², thickness 5 mm) were precisely excised from skin biopsies obtained from healthy abdominal plastic surgeries among 3 donors (30-, 34-, 40-year-old Caucasian women), experiments were performed in triplicate. Patients provided written informed consent, which was

approved by the Ethics Committee. Human skin explants were maintained on grids, in 6-well plates containing 2 ml special BIO-EC Medium BEM, which maintain explants in survival for several days (BIO-EC Laboratory, France).

2.2. Cell culture

Normal human epidermal keratinocytes NHEK (Clonetics) were cultured in Keratinocyte Growth Medium KGM-2 (Clonetics, USA).

Human HaCaT keratinocytes were kindly provided by Dr. Lefaix (Commissariat à l'Énergie Atomique, France). This spontaneously immortalized non-tumorigenic cell line was grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 4.5 g/l glucose DMEM (In Vitrogen Life Technologies, France) and supplemented with 10% foetal calf serum, 25 U/ml penicillin, 25 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 10 mM HEPES.

Subconfluent cells (80% confluence) were sham-irradiated or exposed to a γ -irradiation source.

2.3. Irradiation source

Subconfluent cells or explants in culture medium were irradiated with γ -rays by using a ^{137}Cs source IBL 637 (CIS Bio International, France). Dose rate was 1 Gy min⁻¹ (except for clonogenic assays at 2 Gy min⁻¹). The medium was immediately replaced post-irradiation.

2.4. Survival determination

2.4.1. MTS assay

The MTS assay (Promega, France) is based on the evaluation of the metabolic viability and is composed of solutions of a tetrazolium compound MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] and an electron coupling reagent Phenazine MethoSulfate (PMS). MTS is bioreduced by cells into a formazan product and absorbance was measured at 490 nm.

2.4.2. Clonogenic assays

Appropriate numbers of cells (NHEK and HaCaT cells) were plated into 25 cm² flasks containing 5 ml of growth medium, allowed to adhere for 24 h, and were shown to still be in the single cell state. After γ -irradiation (2 Gy min⁻¹), the cells were incubated for 7–12 days of colony growth. Colonies were fixed and stained in a 3% Methanol–crystal violet solution. Only colonies with more than 50 cells were counted, and the surviving fraction was calculated and compared to the control. Survival curve para-

meters D_0 , α and β for the linear-quadratic model were calculated.

2.5. Preparation of human skin extract

Human skin explants were cut into little pieces and homogenized for 20 min with an ultra-turrax (T25, IKA Labortechnik, USA) in phosphate buffer pH 7.5 (10 mM KH₂PO₄, 40 mM Na₂HPO₄, 0.01 mM EDTA and protease inhibitors). Extracts were spun to remove insoluble material. Supernatants were used for enzymatic assays.

2.6. Preparation of cell lysate

Both confluent NHEK and HaCaT cells were irradiated and harvested 24 h later by trypsinisation with trypsin 0.5%/EDTA 0.02% (Clonetics, USA). Cells were washed with PBS 1x, counted and treated with a volume of lysis buffer (10 mM Tris–HCl pH 7.5, 0.1% Triton X-100 and 200 mM sucrose) proportional to cell number. Cells were then carefully frozen in liquid nitrogen and heated at 37 °C for 2 min, 3 times. Clear-cell lysates were prepared by centrifugation (20,000 × g, 30 min, 4 °C) and used for enzymatic assays.

2.7. Antioxidant enzymes assays

Data were expressed as international units per milligram of proteins in the skin.

2.7.1. Measurement of catalase, glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activities

The decomposition of hydrogen peroxide by catalase contained in skin extracts and cell lysates was followed spectrophotometrically at 240 nm (Uvikon 930, Biotek-Kontron, France). One hundred microliters of fresh extract were added to 900 µl of 30% H₂O₂ solution and the absorbance at 240 nm was measured for 1 min. Activity was calculated using the rate of change per minute and the extinction coefficient ($\epsilon^{240} = 1$) of H₂O₂.

GPx activity was measured by a coupled assay procedure. The reaction mixture consisted of phosphate buffer pH 7 (0.5 M Na₂HPO₄, 0.5 M NaH₂PO₄), 0.1 M EDTA, 0.4 M KCN, 0.1 mM glutathione, 10 mM NADPH, H⁺ and 167 IU mg protein⁻¹ glutathione reductase. Skin extracts or cell lysates were added to the above mixture and incubated for 15 min at 30 °C before initiating the reaction by adding 100 µl of *tert*-butyl hydroperoxide. The absorption at 340 nm was recorded for 10 min (Uvikon 930, Biotek-Kontron, France). The activity was calculated

from the slope as micromoles of NADPH oxidized per minute ($\varepsilon = 6.22 \times 10^3$ l/mol/cm).

Total SOD was quantified in skin extracts and cell lysates. The activity of SOD was evaluated by its capacity to inhibit the reduction of nitro blue tetrazolium (0.8 mM) by superoxide, which was produced by a xanthine (57 mM)/xanthine oxidase (0.1775 IU/ml) system at 30 °C. The appearance of reduced NBT was monitored at 560 nm on a Uvikon 930 (Biotek-Kontron, France). SOD prevents the reduction of NBT by dismuting superoxide and decreases the slope of reduced NBT proportionally. The percentage inhibition (%) was calculated as follows:

$$\%I = \frac{\text{slope of reference OD} - \text{slope of the sample OD}}{\text{slope of reference OD}}$$

Skin extracts were diluted 1/20 to ensure a linear decrease in the slope of NBT reduction of 20–30%.

2.7.2. Reactive oxygen species (ROS) assays

DCFH-DA was prepared at a concentration of 1 μ M in KGM-2 and added to the adherent NHEK cells before irradiation, while 10 μ M in PBS 1x were added to the HaCaT cells in suspension. The incubation time was 15 min at 37 °C, in the dark. Cells were irradiated immediately to measure fluorescence at 30 min and 24 h after irradiation. Cell analysis was performed using a FACS flow cytometer (Becton-Dickinson, France).

2.8. Skin RNA extraction

Entire frozen skin samples (epidermis and dermis) were crushed into powder under liquid nitrogen. Samples were then homogenized in 4 M guanidium thiocyanate using 1.2 gauss syringes (pass through needle 20 times). Total RNAs were purified according to the technique of Chomczynski and Sacchi after phenol/chloroform extraction. RNA was treated with RNase-free DNase (0.5 U/ μ l) to remove contaminating genomic DNA. The quantity and quality of the RNAs were checked using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, France).

2.9. mRNA expression analysis using cDNA arrays

Gene expression analysis was performed through hybrid selection of radio-labelled cDNA on high density arrays of membrane-bound cDNAs. The Atlas Human 1.2 (1176 genes + 9 house keeping genes) cDNA expression arrays (Clontech, USA) was used for this experiment. PolyA+ RNA enrichment was obtained after column chromatography by using

streptavidin magnetic bead preparation according to the techniques of Atlas Pure total RNA labelling system (Clontech, USA). cDNA were synthesized as described in the Atlas cDNA Expression Array kit and [α - 32 P]dATP (10 μ Ci/ μ l) was incorporated into synthesized cDNA. To purify the labelled cDNA from labelled 32 P-nucleotides and small cDNA fragments, each sample was purified using column chromatography. Radioactivity of the probe was checked by scintillation counting (ready gel, Beckman, USA). cDNA probes were hybridised overnight (20 h) to Atlas Array (Human Atlas 1.2) with continuous agitation at 68 °C. After washing hybridised membrane according to Atlas cDNA expression arrays protocol, Atlas array was removed from the container and wrapped in plastic film. Atlas array was in contact with phosphoimaging screen for 20 h at room temperature and revealed by using a phosphoimager (Typhon 9400, Amersham-Biosciences, France). The different samples were compared using BD Atlas-image 2.7 software (Clontech, USA). Four house-keeping genes were selected (phospholipase A2, glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, ribosomal protein L13A and tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5 monooxygenase activation protein) and only irradiated versus control ratios greater than 2 and lower than 0.5 were taken into account.

2.10. Evaluation of apoptosis

2.10.1. TUNEL assay

From 7- μ m thickness cryopreserved skin sections, apoptotic cells were detected by in situ DNA labelling TdT-mediated dUTP Nick End Labelling (TUNEL method) using the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, France) according to the manufacturer's recommendations.

2.10.2. DiOC₆ assay

The disruption of mitochondrial inner transmembrane potential was revealed using DiOC₆(3) 3,3-dihexyloxycarbocyanine (Molecular Probes, USA), a potential-sensitive cationic dye. DiOC₆(3) accumulates in polarized membranes and is translocated into the lipid bilayer. Cells were incubated for 15 min with 10 μ M DiOC₆(3) at 37 °C in the dark, 50 μ g/ml Propidium Iodide (PI) was added to exclude dead cells and analysis was performed immediately on a FACS flow cytometer (Becton-Dickinson, France).

2.11. Statistical analysis

Differences between groups were calculated using an ANOVA associated with a Dunn's or Tukey's test. All data are expressed as means \pm the standard

error of the mean (S.E.M.) for triplicate samples from 3 different donors ($n = 3$) in each experiment. Intra- and inter-repeatability (variation of the same biopsy assayed several times and variation of different biopsies assayed once, respectively) were calculated for each assay in the irradiated and the non-irradiated samples. Statistically significant differences from controls are indicated as $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$; and NS, when values are not significant compared to controls.

3. Results

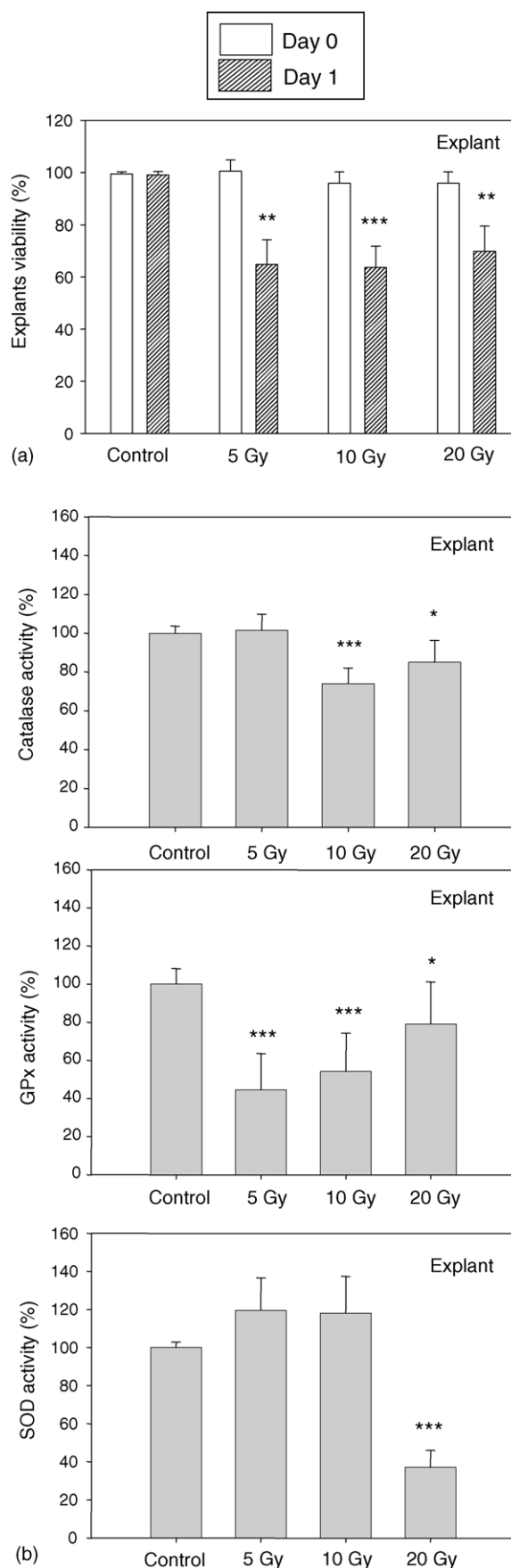
3.1. Radiation sensitivity of skin explants

The viability of human skin explants exposed to ionising radiation (Fig. 1a) remained similar to the controls during the first 24 h ($99.5 \pm 0.34\%$ at day 0 and $99.17 \pm 0.54\%$ at day 1, respectively) and started to decrease at day 1 ($34.36 \pm 1.5\%$ decrease ($p < 0.01$), $35.49 \pm 1.15\%$ ($p < 0.001$) and $29.31 \pm 1.71\%$ ($p < 0.01$) after 5, 10 and 20 Gy-radiation, respectively).

Basal human skin explant catalase, GPx and SOD activities were: 306.63 ± 3.67 IU mg protein $^{-1}$, 122.45 ± 8.15 IU mg protein $^{-1}$ and 254.83 ± 2.89 IU mg protein $^{-1}$, respectively.

Catalase and SOD activities (Fig. 1b) remained unchanged for skin explants exposed to 5 Gy (separately, increases of $1.47 \pm 3.4\%$ (N.S.) and $19.46 \pm 6.05\%$ (N.S.) by comparison with control), whereas GPx activity dropped rapidly ($55.46 \pm 7.78\%$ decrease ($p < 0.001$) for 5 Gy).

Fig. 1 (a) Cytotoxic effects of γ -irradiation on human skin explants. The metabolic viability was evaluated by measuring the reduction of a tetrazolium compound MTS into a formazan product, at 490 nm, at the time of irradiation day 0 (open bars) and day 1 (shaded bars) after exposure to 5, 10 and 20 Gy of γ -radiation (1 Gy min $^{-1}$). Data represent the mean values \pm S.E.M., $n = 3$ ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$ compared to control). (b) Antioxidant enzyme activity of human skin explants exposed to γ -radiation. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities were measured on skin extracts 24 h after exposure to different doses of irradiation (5, 10 and 20 Gy). Enzymatic activities are expressed as percent of units per milligram of proteins. Data are expressed as the mean \pm S.E.M., $n = 3$ ($*p < 0.05$, $***p < 0.001$ compared to control). (c) Apoptotic cells detection on human skin explants, 24 h after γ -exposure (A, control; B, 5 Gy; C, 10 Gy; D, 20 Gy). Cryo-preserved sections were cut and immunostained according to TUNEL method. Apoptotic keratinocytes number in epidermis of explants are expressed as percent versus control. Data represent the mean values \pm S.E.M., $n = 3$ ($***p < 0.001$ compared to control).



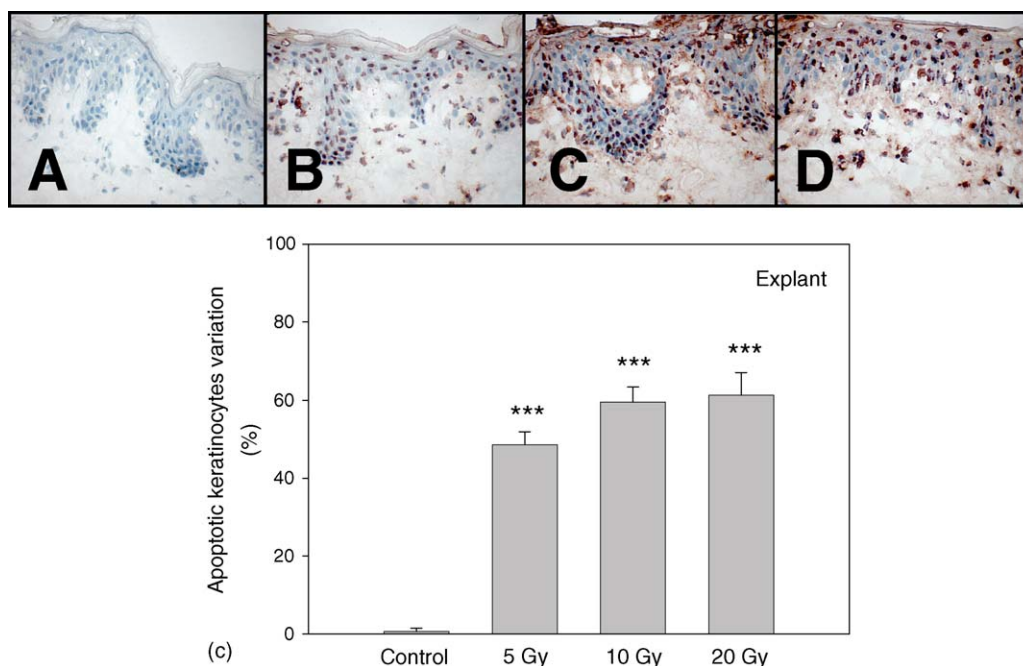


Figure 1. (Continued).

After a 10 Gy-irradiation, activity of catalase significantly decreased compared to the control ($26.01 \pm 1.98\%$ decrease ($p < 0.001$)).

Activities of these three enzymes were lower in 20 Gy-irradiated explants versus control skin explants, especially for SOD ($62.94 \pm 3.66\%$ decrease ($p < 0.001$)).

A dose-dependent increase in apoptotic keratinocytes was observed 24 h after exposure of skin explants to 5 and 10 Gy as shown in pictures A, B, C, D (Fig. 1c). Apoptotic epidermis cells count 24 h after 5, 10 and 20 Gy-radiation compared to control showed increases of $48.6 \pm 1.34\%$ ($p < 0.001$), $59.53 \pm 1.55\%$ ($p < 0.001$) and $61.29 \pm 2.33\%$ ($p < 0.001$), respectively.

3.2. Skin gene arrays analysis

The intensity of the arrays from normal skin was averaged and compared with the intensity of 20 Gy-irradiated skin, 24 h after exposure to γ -rays. The differentially expressed genes are listed in Table 1.

3.2.1. Redox and apoptosis modulation

The expression of 588 genes is significant compared to the expression of 1176 genes in human skin 24 h post-radiation, 14 genes involved in redox status and 12 genes implicated in cell apoptosis modulation were found to be specifically modulated in 20 Gy-irradiated skin. The expression of genes classically involved in the control of the cellular redox status including thioredoxin reductase ($\times 4.9$) and

thioredoxine peroxidase 2 ($\times 2.2$) were up-regulated in the irradiated skin in comparison with normal skin, whereas glutathione reductase ($/6.8$), glutathiones S-transferase M1 and 2 ($/4.5$ and $/3.9$, respectively) and glutathione peroxidase 1 ($/2.4$) expression were down-regulated. Apoptosis genes response in the irradiated skin was also characterized by a down-regulation in the expression of genes implicated in the anti-apoptotic pathway. Pro-apoptotic genes encoding for caspase 2 ripK1 adaptator with dead domain CRADD ($/4.8$) and caspase-2 ($/4.3$), TNF ($/3.7$) were down-regulated in irradiated skin, whereas caspase 10 ($\times 4.4$) and ubiquitin C ($\times 2$) expressions were up-regulated. Concerning the bcl-2 genes family expression, the anti-apoptotic bcl-2 regulator and the pro-apoptotic bcl-2 antagonist/killer 1 (BAK) expressions were both down-regulated ($/2.4$ and $/3.7$, respectively).

3.3. Radiation sensitivity of normal human epidermal keratinocytes and HaCaT cells

Clonogenic survival assays (Fig. 2) allowed characterisation of D_0 value (37% cell viability) for both cell lines: $D_0 = 2.94 \pm 0.01$ Gy for NHEK cells and $D_0 = 3.05 \pm 0.02$ Gy for HaCaT cells ($p < 0.001$).

$S_{37} = 0.9757 - 0.245D + 0.0138D^2$ for NHEK cells and $S_{37} = 1.0312 - 0.2627D + 0.0167D^2$ for HaCaT cells.

The slope ($\alpha/\beta = 17.75$) of the NHEK linear-quadratic model was higher than HaCaTone ($\alpha/\beta = 15.73$).

Table 1 Differential gene expression of cell redox status and cell apoptosis after human skin explants exposure to ionising radiation (cDNA-arrays analysis)

Gene bank	Gene name	20 Gy-irradiated skin versus normal skin
Redox control 24 h after γ -rays		
X15722	Glutathione reductase	/6.8
X08020	Glutathione S-transferase M1	/4.5
U77604	Microsomal glutathione S-transferase 2	/3.9
Y00433	Glutathione peroxidase 1	/2.4
X06985	Heme oxygenase 1	/2.4
L13278	NADPH quinone oxidoreductase	/2.4
X51757	Heat shock 70 kD protein 6	/2.2
Y00371	Heat shock 70 kD protein 8	x2
L19185	Thioredoxine peroxidase 2	x2.2
L26318	c-jun N-terminal kinase 1 (JNK1)	x2.5
X91247	Thioredoxin reductase 1	x4.9
X57346	Tyrosin 3-monooxygenase/ tryptophan 5-monooxygenase activation protein	x16.2
Cell apoptosis 24 h after γ -rays		
Pro-apoptotic factors		
M92357	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	/3.7
U57059	TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)	/1.8
U84388	Caspase 2 & ripK1 adaptator with dead domain(CRADD)	/4.8
U13021	Caspase 2, apoptosis related cysteine protease	/4.3
U60519	Caspase 10, apoptosis related cysteine protease	x4.4
X04366	Calpain 1 large (catalytic) subunit	/2
U23765	bcl2-Antagonist/killer 1 (BAK)	/3.7
M26880	Ubiquitin C	x2
Anti-apoptotic factors		
U45880	Inhibitor of apoptosis protein 4 (IAP4)	/4.8
U18321	Ionising radiation resistance-conferring protein, death associated protein 3 (DAP3)	/3.7
M14745	Apoptosis regulator bcl-2	/2.4
U45878	Inhibitor of apoptosis protein 3 (IAP3)	/2

Data are expressed versus normal skin. Normal skin corresponds to three different sham-irradiated biopsies and irradiated skin corresponds to three different biopsies exposed to 20 Gy-radiation. Results were corrected by taking into account four different house keeping genes (phospholipase A2, glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, ribosomal protein L13A and tyrosine 3 monooxygenase/tryptophan 5 monooxygenase activation protein). Gene expression was significantly up-regulated when the ratio was above 2 and significantly down-regulated when the ratio was lower than 0.5.

ROS basal rate for both NHEK and HaCaT cells was almost similar (respectively $21.04 \pm 2.62\%$ and $26.35 \pm 1.18\%$ at day 0, and $23.2 \pm 2.41\%$ and $25.93 \pm 0.57\%$ at day 1) (Fig. 3a).

The NHEK cells produced generated higher level of ROS than HaCaT cells after γ -rays exposure. ROS production in response to γ -radiation was dose-dependent from 0 to 10 Gy for NHEK cells when measured 30 min after exposure ($30.78 \pm 2.06\%$ increase ($p < 0.001$) and $65.49 \pm 4.59\%$ increase ($p < 0.001$), respectively, after 5 and 10 Gy). ROS radio-induced production returned to control value, 24 h post-radiation for NHEK cells.

A time shift was noted for the kinetics of ROS production in HaCaT cells. A small increase in ROS production was observed only 24 h after HaCaT cells

were exposed to radiation ($21.44 \pm 3.15\%$ increase ($p < 0.05$) and $28.83 \pm 3.42\%$ increase ($p < 0.05$) for 5 and 10 Gy, respectively).

Basal level of catalase activity in NHEK cells (33.33 ± 9.59 IU mg protein⁻¹) was lower than HaCaT cells (138.92 ± 6.15 IU mg protein⁻¹) (Fig. 3b). Basal level of GPx activity in NHEK and HaCaT cells were similar (one by one, 81.57 ± 10.46 IU mg protein⁻¹ and 69.32 ± 8.14 IU mg protein⁻¹).

Dose-dependent catalase activity decrease was noted for NHEK cells ($26.16 \pm 2.65\%$ ($p < 0.01$) decrease for 2 Gy and $28.94 \pm 2.89\%$ ($p < 0.01$) for 4 Gy) while an increase of GPx activity was observed ($133.03 \pm 5.23\%$ ($p < 0.001$) increase for 5 Gy).

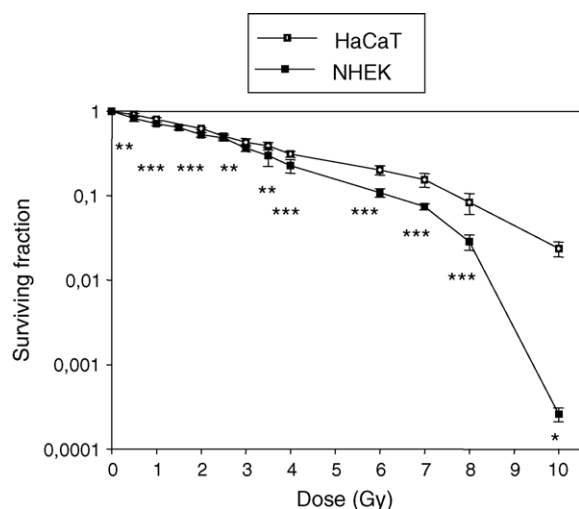


Fig. 2 Differential radiosensitivity of NHEK (solid squares) and HaCaT cells (open squares). The surviving fraction represents the ratio between the number of surviving colonies 7–12 days after exposure to 0.5–10 Gy of γ -radiation (2 Gy min^{-1}). Data represent the mean values \pm S.E.M., $n = 6$.

No significant differences for catalase and GPx activities were observed in HaCaT cells after exposure to γ -rays.

The percentages of dead cells, i.e. necrotic and apoptotic cells, were measured using a flow cytometric DiOC₆ assay (Fig. 4). The dead cell population slightly increased for both NHEK and HaCaT cells 24 h after γ -rays exposure compared to controls. The proportions of dead cells were only significant for NHEK (one by one, $16.37 \pm 5.79\%$ ($p < 0.05$) for 5 Gy and $18.49 \pm 6.54\%$ ($p < 0.001$) for 10 Gy), and percentages of apoptotic cells were negligible ($2.05 \pm 0.43\%$ for 0 Gy, 3.13 ± 0.58 for 5 Gy and 4.22 ± 0.22 for 10 Gy, respectively). Both irradiated cell types entered into a necrotic process at 1 day after irradiation.

4. Discussion

The main result of our study is that γ -rays exposure induces an imbalance of oxidative stress response, which participates to the apoptotic process. For this purpose, we developed a human skin explant model allowing cutaneous biology investigations during the first 24 h after irradiation from 5 to 20 Gy.

An overview of a hundred of genes was shown to be modulated from γ -irradiated skin explants compared to normal tissue samples, using our cDNA-arrays analysis. Our results showed an original set of genes expressed after radiation exposure including heme oxygenase-1 and NADPH quinone oxidoreductase, in addition to a down-regulation of the classi-

cal genes controlling oxidative stress (glutathione reductase, glutathione S-transferase M1 and 2, glutathione peroxidase 1, Heat Shock Protein HSP70). Heme oxygenase-1 is an enzyme with potent anti-inflammatory, antioxidant, and anti-proliferative effects in skin [19]. This factor is important for cell survival in case of oxidative stress [20]. In addition, studies showed that NADPH quinone oxidoreductase is a flavoprotein that catalyses the reduction of quinines thus protecting cells from ROS [21]. This one is a detoxication enzyme, like glutathione S-transferase and heme oxygenase-1, whose inducible expressions are regulated by nrf2, a redox-responsive transcriptional factor, via antioxidant response elements (ARE) [22,23]. Our cDNA arrays analysis was confirmed by enzymatic activities measurement on skin explants. After a 20 Gy γ -irradiation, a decrease in catalase, GPx and SOD activities was observed. Similarly, a decrease in the activity of these enzymes was observed 24 h post-20 Gy radiation in a murine skin model [24]. We can speculate that a high concentration of ROS in the explant may induce a down-regulation of catalase, GPx and SOD activities. In addition, enzyme inactivation, resulting from protein oxidation or direct protein conformational changes, has been demonstrated after oxidative stress [25,26]. The decrease of SOD activity may be due either to inactivation of the enzyme by the hydrogen peroxide formed, or to the direct action of ionising radiation [27].

Oxidative stress is a common mediator of apoptosis [16,28]. We observed an imbalance between pro- and anti-apoptotic gene expression in our cDNA arrays analysis. The expressions of anti-apoptotic genes such as the inhibitors of apoptosis protein 3 and 4 (IAP3, IAP4), ionising radiation resistance-conferring protein, death associated protein 3 (DAP3) and apoptosis regulator bcl-2 were down-regulated, 24 h after a 20 Gy-exposure of skin explant. In contrast, pro-apoptotic genes expressions of ubiquitin C and caspase 10 were up-regulated. Several studies showed that keratinocyte apoptosis response was characterized by caspase 10 gene up-regulation, a trigger of the death receptor apoptotic signalling Fas- and of the tumour necrosis factor signalling [29–31]. Changes in pro- and anti-apoptotic genes expression were associated with an 60% up-regulation of apoptosis. Similarly, a correlation between ionising radiation-induced ROS production and apoptosis has been previously demonstrated in keratinocytes [18] and in swine skin culture [11].

As a conclusion of this first set of experiments, a direct relationship between skin radio-induced oxidative stress and keratinocyte death was clearly established ex vivo.

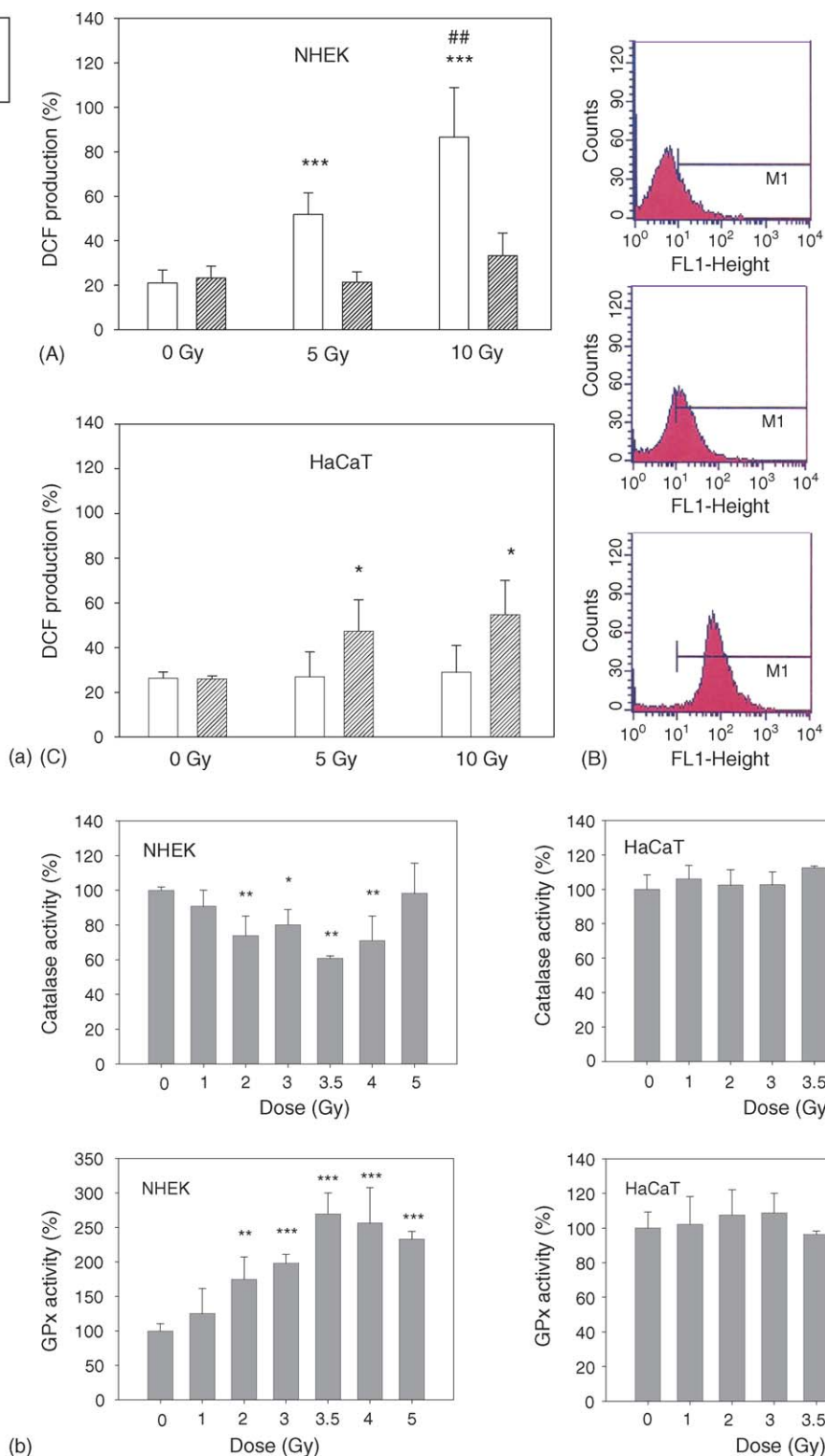


Fig. 3 (a) Antioxidant enzyme activities of NHEK and HaCaT cells exposed to γ -radiation. Induction of reactive oxygen species (ROS) production after irradiation was determined by DCFH-DA fluorescence, by measuring DCFH oxidation 30 min (open bars) and 24 h (shaded bars) after 5 and 10 Gy irradiation, expressed as percent versus control (A, NHEK; B, Representative dot plots of DCFH-DA labelled NHEK 30 min after 0, 5 and 10 Gy γ -exposure; C, HaCaT) ($*p < 0.05$, $***p < 0.001$ compared to control; $##p < 0.01$ compared to NHEK cells 5 Gy-irradiated, 30 min after γ -exposure). (b) Catalase and glutathione peroxidase activities were measured on clear-cell lysates 24 h after exposure to γ -rays (from 1 to 5 Gy, 1 Gy min^{-1}). Enzymatic activities are expressed as percent of units per milligram of proteins versus control. Data are expressed as the mean \pm S.E.M., $n = 3$ ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; and NS, non-significant compared to control).

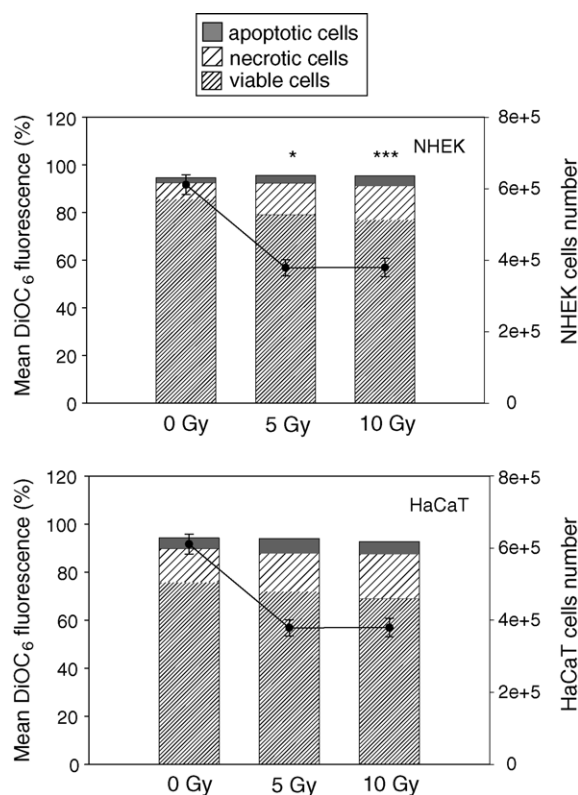


Fig. 4 Differential cellular modulation of NHEK and HaCaT cells, 24 h after γ -radiation exposure to 5 and 10 Gy (1 Gy min^{-1}). Results are expressed in percent of the mean DiOC₆ fluorescence measured in cells (left Y-axis), showing the relative distribution of apoptotic cells (gray area) in comparison with necrotic cells (coarse shaded area) and viable cells (fine shaded area). Lines represent cells number (right Y-axis) (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ for dead cells (necrotic + apoptotic cells) compared to control dead cells).

Differential radiosensitivities of keratinocytes were investigated next, using two different radiosensitive cell types, namely primary keratinocytes NHEK and spontaneous non-tumourigenic cell line HaCaT. Our results suggested that differential radiosensitivity of keratinocytes was also linked to their capacity to modulate radio-induced oxidative stress. ROS detoxication, as measured by flow cytometry, was inducible in NHEK faster than in HaCaT. This modulation may be due to a different involvement of the cellular antioxidant network. We measured the activity of two characteristic antioxidant enzymes (catalase and GPx) after irradiation. Our experiments suggest that these enzymes are inducible more quickly (30 min) and in a more significant manner in NHEK compared to HaCaT. This may explain the delayed ROS production in HaCaT cells after γ -irradiation and confirm that NHEK cells are more radiosensitive than HaCaT cells.

Unfortunately, we were unable to demonstrate changes in apoptosis rate in both cell types. Indeed,

ionising radiation is known to induce negligible rates of apoptosis in both primary keratinocytes and immortalized HaCaT cell line at a dose range of 5–10 Gy, 24 h post-irradiation; moreover, the sensitive NHEK cells proved to be refractory to the induction of apoptosis [28,32]. A 20% increase in necrotic and apoptotic cells has been observed in the two cell types of keratinocytes cultured in monolayers 24 h after a 10 Gy exposure, but apoptotic rates have only been about 4%, as cited by Petit-Frere et al. [32].

Nevertheless, in our study, we demonstrated for the first time the link between differential keratinocyte sensitivity to γ -radiation and oxidative stress, NHEK cells being the most radiosensitive and HaCaT cells the most radioresistant. Classically, radiosensitivity is attributed to abnormal DNA repair mechanisms [33–35]. Following γ -rays exposure, Petit-Frere et al. [32] suggested that this delayed apoptosis imply a cell cycle dependence and that different biological responses of the 2 cell lines may correspond to the ability, or lack of, to activate cell cycle points.

However, the link between radio-induced oxidative stress and keratinocytes apoptosis in the explant may not exclude the importance of the radio-induced modification of the keratinocytes microenvironment, i.e. extracellular matrix [10], i.e. soluble factors [36] which are known to control cell apoptosis.

In conclusion, ionising radiation induces a decrease in the expression of antioxidant enzymes as catalase, GPx and SOD in an explant model, associated with keratinocyte cell death by apoptosis. We speculate that keratinocyte apoptosis is partly dependent on ROS production. In addition, we demonstrated that radiosensitivity of keratinocytes is linked to their oxidative response after γ -irradiation.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT, Paris, France). The authors want to thank Dr. J.L. Lefaix and Dr. N. Gault (Commissariat à l'Énergie Atomique, Fontenay-aux-Roses, France) for providing the HaCaT cell line.

References

- [1] Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13884–8.
- [2] Van Remmen H, Qi W, Sabia M, Freeman G, Estlack L, Yang H, et al. Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1625–34.
- [3] Morliere P, Moysan A, Gaboriau F, Santus R, Maziere JC, Dubertret L. Ultraviolet A radiation and the skin. Implica-

- tions of activated forms of oxygen. Current trends and newest results. *Pathol Biol* 1992;40:160–8.
- [4] Beani JC. Enhancement of endogenous antioxidant defences: a promising strategy for prevention of skin cancers. *Bull Acad Natl Med* 2001;185:1507–25.
- [5] Pugliese PT. The skin's antioxidant systems. *Dermatol Nurs* 1998;10:401–16.
- [6] Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol* 1994;102:122–4.
- [7] Rhee G, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH, et al. Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2001;117:1212–7.
- [8] Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001;11:173–86.
- [9] Robbins ME, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol* 2004;80:251–9.
- [10] Sivan V, Vozenin-Brotans MC, Tricaud Y, Lefaix JL, Cosset JM, Dubray B, et al. Altered proliferation and differentiation of human epidermis in cases of skin fibrosis after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:385–93.
- [11] Archambeau JO, Pezner R, Wasserman T. Pathophysiology of irradiated skin and breast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:1171–85.
- [12] Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003;22:5734–54.
- [13] Zuliani T, Denis V, Noblesse E, Schnebert S, Andre P, Dumas M, et al. Hydrogen peroxide-induced cell death in normal human keratinocytes is differentiation dependent. *Free Radic Biol Med* 2005;38:307–16.
- [14] Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000;29:323–33.
- [15] Koike M, Shiomi T, Koike A. Identification of skin injury-related genes induced by ionizing radiation in human keratinocytes using cDNA microarray. *J Radiat Res* 2005;46:173–84.
- [16] Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15:7–10.
- [17] Phillipson RP, Tobi SE, Morris JA, McMillan TJ. UV-A induces persistent genomic instability in human keratinocytes through an oxidative stress mechanism. *Free Radic Biol Med* 2002;32:474–80.
- [18] Lyng FM, Seymour CB, Mothersill C. Oxidative stress in cells exposed to low levels of ionizing radiation. *Biochem Soc Trans* 2001;29:350–3.
- [19] Pi J, Qu W, Reece JM, Kumagai Y, Waalkes MP. Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. *Exp Cell Res* 2003;290:234–45.
- [20] Allanson M, Reeve VE. Immunoprotective UVA (320–400 nm) irradiation upregulates heme oxygenase-1 in the dermis and epidermis of hairless mouse skin. *J Invest Dermatol* 2004;122:1030–6.
- [21] Clairmont A, Sies H, Ramachandran S, Lear JT, Smith AG, Bowers B, et al. Association of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) null with numbers of basal cell carcinomas: use of a multivariate model to rank the relative importance of this polymorphism and those at other relevant loci. *Carcinogenesis* 1999;20:1235–40.
- [22] Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, et al. Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol* 2002;22:5492–505.
- [23] Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:385–94.
- [24] Chandra Jagetia G, Rajanikant GK, Rao SK, Shrinath Baliga M. Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated gamma radiation. *Clin Chim Acta* 2003;332:111–21.
- [25] Sander CS, Chang H, Salzmann S, Muller CS, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, et al. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2002;118:618–25.
- [26] Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defences, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 2000;50:279–89.
- [27] Punnonen K, Autio P, Kiistala U, Ahotupa M. In-vivo effects of solar-simulated ultraviolet irradiation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in human epidermis. *Br J Dermatol* 1991;125:18–20.
- [28] Morel Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 1999;342(Pt 3):481–96.
- [29] Marconi A, Atzei P, Panza C, Fila C, Tiberio R, Truzzi F, et al. FLICE/caspase-8 activation triggers anoikis induced by beta1-integrin blockade in human keratinocytes. *J Cell Sci* 2004;117:5815–23.
- [30] Wang X, Bregegere F, Soroka Y, Kayat A, Redziniak G, Milner Y. Enhancement of Fas-mediated apoptosis in ageing human keratinocytes. *Mech Ageing Dev* 2004;125:237–49.
- [31] Murakami T, Fujimoto M, Ohtsuki M, Nakagawa H. Expression profiling of cancer-related genes in human keratinocytes following non-lethal ultraviolet B irradiation. *J Dermatol Sci* 2001;27:121–9.
- [32] Petit-Frere C, Capulas E, Lyon DA, Norbury CJ, Lowe JE, Clingen PH, et al. Apoptosis and cytokine release induced by ionizing or ultraviolet B radiation in primary and immortalized human keratinocytes. *Carcinogenesis* 2000;21:1087–95.
- [33] Kiltie AE, Barber JB, Swindell R, Ryan AJ, West CM, Hendry JH, et al. Lack of correlation between residual radiation-induced DNA damage, in keratinocytes assayed directly from skin, and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999;43:481–7.
- [34] Chenal C, Legue F, Nourgalieva K, Brouazin-Jousseau V, Durel S, Guitton N. Exposition of humans to low doses and low dose rate irradiation: an urgent need for new markers and new models. *Radiat Biol Radioecol* 2000;40:627–9.
- [35] Prithivirajasingh S, Story MD, Bergh SA, Geara FB, Ang KK, Ismail SM, et al. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Lett* 2004;571:227–32.
- [36] Remacle J, Raes M, Toussaint O, Renard P, Rao G. Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat Res* 1995;316:103–22.

Discussion Parties I & II

L'épiderme est un tissu cible majeur des rayonnements ionisants (RI) et rayons ultra-violet B (UVB) en raison de sa localisation anatomique superficielle. Son fort taux de renouvellement cellulaire sensibilise ce tissu à ces rayonnements. Il est clairement établi dans la littérature que les RI et les UV sont responsables de la production d'ERO dans le tissu cutané. Ces ERO sont capables de moduler l'expression de gènes pendant la croissance et l'activation cellulaires tels que NF- κ B et AP-1 (Valko *et al*, 2006 ; Remacle *et al*, 1995). Le stress oxydatif peut être induit soit par l'irradiation elle-même, soit généré au cours des processus inflammatoires chroniques. Ces phénomènes conduisent à l'apparition de la nécrose dans le cas des RI (Denham and Hauer-Jensen, 2002) tandis qu'ils provoquent des dommages photooxydatifs ou la photocarcinogenèse après UVB (Sander *et al*, 2004 ; Darr and Fridovich, 1994). Le rôle du stress oxydatif semble être prépondérant dans l'atteinte tissulaire au niveau de nombreux organes (Robbins and Zhao, 2004) mais il reste cependant peu décrit au niveau de la peau irradiée aux RI à fortes doses, contrairement aux UVB.

Nous avons démontré que le profil des ERO générées après irradiation RI et UVB est différent en terme de quantité et de qualité dans la peau comme décrit dans la littérature.

Les effets biologiques de l'irradiation aux RI résultent pour une large part de la production d'espèces radicalaires par la radiolyse de l'eau (Bensasson *et al*, 1993). Le radical $^{\circ}\text{OH}$ ou $^{\circ}\text{H}$ formés vont se transformer en ERO plus stables et réactives en présence d'oxygène, telles que $\text{O}_2^{\circ-}$ et HO_2° , ainsi que H_2 et H_2O_2 . Les cellules génèrent aussi NO° dans les mitochondries au cours des mécanismes précoces de signalisation radio-induits (Mikkelsen and Wardman, 2003).

L'absorption des UVB par un chromophore endogène, au cours du processus de photosensibilisation, se traduit par la production d'ERO tels que $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\circ-}$, H_2O_2 et $^{\circ}\text{OH}$ très réactif. La production de NO° par les kératinocytes résultant de l'induction de NO-synthases par les UVB va contribuer à l'érythème (Deliconstantinos *et al*, 1995).

L'homéostasie tissulaire dépend de l'équilibre entre la quantité d'ERO produits et la capacité de détoxification des systèmes anti-oxydants. Un stress oxydatif est induit si la quantité d'ERO générée par ces deux types de rayonnements dépasse la capacité anti-oxydante de la peau. Dans la peau humaine, les produits du « système du glutathion » sont localisés principalement dans le derme, particulièrement dans les fibroblastes, mais aussi dans

l'épiderme en quantité plus faible, contrairement aux produits de la thioredoxine réductase (en grande quantité dans l'épiderme) (Pugliese, 1998). Dans l'épiderme humain, de faibles taux de SOD ont été décrits (Pugliese, 1998). Sander *et al* ont montré que la catalase et la SOD sont les enzymes anti-oxydantes majeures dans l'épiderme humain (Sander *et al*, 2002). La catalase détoxifie H₂O₂ dans les peroxysomes des cellules (Shindo *et al*, 1994 ; Rhie *et al*, 2001). Dans la peau de souris, la catalase, la GPx et la GR sont présentes en quantités plus importantes dans l'épiderme que dans le derme : 49%, 86%, et 74% respectivement, contrairement au glutathion oxydé et à la SOD principalement localisés dans le derme. Les anti-oxydants lipophiles et hydrophiles sont également plus nombreux dans l'épiderme que dans le derme : 24% et 95% respectivement (Shindo *et al*, 1993).

L'irradiation aux RI ou UVB de la peau peut provoquer une modulation de l'induction de ses enzymes de défenses anti-oxydantes. Pour aborder cette question, nous avons opté pour une approche large spectre en utilisant la technique des macro-arrays. Elle nous a permis d'analyser et de comparer un panel de gènes spécifiquement impliqués d'une part dans le contrôle de l'état redox de la peau, et d'autre part dans le processus apoptotique.

Dans notre étude, nous avons tout d'abord observé la modulation de l'expression de différents gènes du stress oxydatif par analyse des macro-arrays réalisés sur des explants de peau humaine irradiés aux RI ou non. Parmi les gènes dont l'expression est diminuée après exposition aux RI, nous avons pu mettre en évidence l'hème oxygénase 1, la NADPH quinone oxydoréductase et la glutathion S-transférase. Elles sont toutes trois des enzymes de détoxification dont l'expression est régulée par nrf2, un facteur transcriptionnel dirigé par les « antioxydant response elements » (ARE) (Braun *et al*, 2002 ; Kobayashi *et al*, 2005). L'hème oxygénase 1 est une enzyme caractérisée par ses propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-prolifératives dans la peau (Pi *et al*, 2003). Elle est importante pour la survie cellulaire en cas de stress oxydatif (Allanson and Reeve, 2004). La NADPH quinone oxydoréductase est une flavoprotéine qui catalyse la réduction des quinines et donc protège les cellules des ERO (Clairmont *et al*, 1999). La diminution de l'expression de ces gènes a pu être confirmée par la réduction des activités enzymatiques de la catalase, de la GPx et de la SOD dans les mêmes conditions expérimentales (24 heures après irradiation de 20 Gy). Une telle diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes a été également décrite dans un modèle murin (Chandra Jagetia *et al*, 2003). De plus, l'expression du gène de la GPx a été montrée récemment comme diminuée de 3h à 48 heures après exposition à une faible dose de RI de 1 cGy, après analyse de macro-arrays (Franco *et al*, 2005). Cette diminution s'expliquerait selon ces auteurs par l'inactivation de ces enzymes résultant d'une forte production d'ERO localement au niveau de ces protéines. L'oxydation et/ou les changements

de conformation induiraient une perte d'activité de ces enzymes (Sander *et al*, 2002 ; Davies, 2000).

Concernant l'étude de la capacité des UVB à induire les systèmes de défenses anti-oxydantes, nous avons observé une diminution des activités de la catalase et de la GPx dans l'explant de peau humaine, en accord avec les résultats obtenus dans la peau de souris (Shindo *et al*, 1994, Shindo *et al*, 1993). L'activité importante de SOD que nous avons obtenu dès la dose de 0,2 J/cm² dans la peau humaine est en accord avec l'augmentation immédiate de son activité relatée après exposition des kératinocytes humains aux UVB (Sasaki *et al*, 1997). Sasaki *et al* ont décrit que cette augmentation de l'activité de la SOD est suivie d'un retour à la normale progressif 24h post-irradiation. L'activité de la Mn-SOD diminue contrairement à celle de la Cu-Zn SOD qui augmente immédiatement, elles reviennent à leur taux basal 24h post-irradiation. Après exposition UVB, la Cu-Zn participe au mécanisme de défense précoce, tandis que la Mn-SOD agit tardivement (Sasaki *et al*, 1997). Nous supposons que ce délai d'induction de la Mn-SOD pourrait s'expliquer par sa localisation mitochondriale, la Cu-Zn SOD étant cytoplasmique.

Nous avons ensuite observé les activités des enzymes anti-oxydantes dans les kératinocytes humains. L'augmentation de l'activité de la catalase que nous avons montré dans les kératinocytes a été décrite récemment : elle inhibe la production de H₂O₂ dose-dépendante induite par les UVB (Wang and Kochevar, 2005 ; Pelle *et al*, 2003). De plus, un nouveau rôle de la catalase a été prouvé par Heck *et al* après exposition aux UVB. En effet, son expression, dépendante de l'état redox intracellulaire, peut avoir vis-à-vis du kératinocyte soit un effet protecteur par ses fonctions anti-oxydantes soit cytotoxique. L'effet cytotoxique de la catalase s'expliquerait par l'énergie générée par les UVB, absorbée par l'enzyme et convertie en intermédiaires chimiques très réactifs (Heck *et al*, 2003), entraînant des dommages à l'ADN et contribuant au développement de cancers cutanés. Enfin, l'observation de la diminution de l'activité de la GPx est en accord avec une étude de cette enzyme sur les kératinocytes transformés avec SV40 (cellules SVHK) (Takahashi *et al*, 2004).

L'ensemble de nos travaux ont montré que la peau possède une capacité différente et modulable d'éliminer les ERO produites en fonction du stress. Elle active de façon différentielle ses systèmes de défenses anti-oxydantes après exposition aux RI et aux UVB.

Le stress oxydatif est reconnu comme étant un médiateur de l'apoptose (Buttke and Sandstrom, 1994 ; Morel and Barouki, 1999). Les ERO sont décrits comme des seconds messagers pouvant interférer avec les canaux calcium Ca²⁺ de la mitochondrie afin de

réguler la prolifération et la différenciation des kératinocytes, ainsi que leur apoptose (Chinopoulos and Adam-Vizi, 2006 ; Sauer *et al*, 2001 ; Goldman *et al*, 1997).

Nous nous sommes intéressés à la corrélation entre le stress oxydatif induit par l'exposition aux RI et UVB, et l'apoptose des kératinocytes de peau humaine. Nos résultats des macro-arrays sur la peau irradiée aux RI ont montré non seulement une modulation des gènes du stress oxydatif, mais aussi un déséquilibre entre la régulation des gènes pro- et anti-apoptotiques par rapport au contrôle. De plus, le marquage TUNEL a permis d'observer une importante augmentation du nombre de kératinocytes apoptotiques dans l'explant de peau humaine après irradiation aux RI. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle l'induction du stress oxydatif après RI induirait l'apoptose des kératinocytes. Nous avons observé une augmentation de l'expression du gène de la caspase-10, ce gène étant décrit comme initiant les voies de signalisation apoptotiques Fas et TNF dans les kératinocytes (Wang *et al*, 2001 ; Marconi *et al*, 2004 ; Wang *et al*, 2004). Un lien a été mis en évidence entre la production de ERO induite par les RI et l'apoptose dans des kératinocytes (Lyng *et al*, 2001) et chez le porc (Archambeau *et al*, 1995).

Après exposition aux UVB, nous avons montré qu'une modulation des activités des enzymes anti-oxydantes a été mesurée dans l'explant parallèlement à une forte augmentation des « Sun Burn Cells » ou kératinocytes apoptotiques. Nos résultats ont révélé une tendance à la diminution de la GPx, contrairement aux observations de Mu *et al* qui ont démontré qu'une forte activité de la GPx protège les kératinocytes exposés aux UVB de l'apoptose (Mu *et al*, 2003). Nous avons également observé une diminution de l'activité de la catalase et une forte augmentation de celle de la SOD. L'induction de l'apoptose des kératinocytes après exposition aux UVB est aussi la conséquence d'une production excessive de ERO (Takahashi *et al*, 2004 ; Mu *et al*, 2003) et de manière générale entraîne l'arrêt de croissance et la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Valko *et al*, 2006).

Nous avons pu établir un lien entre la modulation différentielle des défenses anti-oxydantes et la réponse apoptotique des kératinocytes en fonction du stress (RI et UVB).

Nous nous sommes alors intéressés à l'influence de la réponse oxydative cutanée radio-induite sur la radiosensibilité de deux types de kératinocytes, les NHEK et les HaCaT. Nous avons choisi ces deux types de kératinocytes car ils réagissent différemment à l'apoptose suite à une exposition aux UVB. En effet, il a été décrit que la protection contre l'apoptose des NHEK induite par l'exposition UVB dépend de la stabilisation du gène P53 et de sa localisation cytoplasmique, médiée par l'activation de P38 « mitogen-activated protein kinase » (MAPK). Au contraire, pour les HaCaT qui expriment une forme mutée du gène P53 après exposition UVB sur 2 allèles (une sur le codon 179 et l'autre sur les codons 281 et

282) (Lehman *et al*, 1993), P53 reste confinée dans le noyau et la survie cellulaire des HaCaT n'est pas affectée par l'inhibition de P38 (Chouinard *et al*, 2002).

Dans notre étude, nous avons montré que l'activité de la GPx est très importante et induite de façon précoce pour les cellules NHEK après irradiation RI par rapport aux HaCaT, cependant leur taux basal d'activité GPx est similaire. Les expressions différentes de la catalase et de la GPx nous ont permis de démontrer que les NHEK sont plus radiosensibles que les HaCaT, en plus des données du test de clonogénicité. Tulard *et al* ont montré que la radiosensibilité des cellules SW620 et SW620IR1 est liée à leur capacité à gérer l'induction des ERO radio-induites via l'action de détoxification par les enzymes anti-oxydantes, en particulier la GPx (Tulard *et al*, 2003). La corrélation entre l'activité basale de la GPx et la radiorésistance a été montrée dans plusieurs lignées cellulaires suggérant un rôle protecteur de la GPx contre les RI (Bravard *et al*, 2002 ; Marklund *et al*, 1984). En revanche, ce rôle de la GPx reste controversé. La surexpression de la GPx a été montrée comme ayant un effet protecteur contre les RI dans certaines cellules CHO (Sun *et al*, 1998) mais pas dans les cellules MCF7 (Liebmann *et al*, 1995) ni dans les fibroblastes sup-T1 et les cellules CHO AA8 (Mansur *et al*, 2001). Durant le processus de cicatrisation de la peau, l'activité de la GPx induite par le relargage de KGF protégerait les kératinocytes contre un fort stress oxydatif, particulièrement pendant la phase inflammatoire (Munz *et al*, 1997). La surexpression de la Mn-SOD a également été montrée comme étant protectrice contre les RI dans les cellules en culture et comme réduisant la cancérogenèse radio-induite (Motoori *et al*, 2001 ; Sun *et al*, 1998 ; Suresh *et al*, 1994 ; St Clair *et al*, 1992). La radiorésistance des cellules a aussi été caractérisée par une activation forte et coordonnée des enzymes anti-oxydantes en plus d'un arrêt G2/M retardé dans le cycle cellulaire dans une lignée humaine de glioblastomes (Lee *et al*, 2004).

Les résultats obtenus ont suggéré premièrement que les ERO jouent un rôle important dans la réponse cellulaire aux RI et que la capacité des kératinocytes à gérer le stress oxydatif radio-induit pouvait contrôler leur radiosensibilité.

Nous avons pu vérifier par des tests de clonogénicité que les NHEK sont plus sensibles à l'exposition RI et UVB que les HaCaT. Nous pouvons suggérer que les effets de ces deux types de rayonnements sur la survie des kératinocytes sont comparables. En effet, pour une survie de 37% des NHEK, une irradiation aux RI de 2,9 Gy pourrait être corrélée à une exposition aux UVB de 0,012 J/cm². Cette corrélation peut être faite pour les HaCaT, pour les doses de 3,2 Gy et 0,015 J/cm². Ceci confirme les travaux préliminaires de Petit-Frere *et al* sur l'étude comparative de l'effet des RI et UVB sur la fraction survivante de ces 2 types cellulaires (Petit-Frere *et al*, 2000).

Les rayons gamma ou UVB sont connus pour interagir soit directement avec l'ADN nucléaire soit pour provoquer la formation de radicaux °OH, ce qui entraîne alors des dommages supplémentaires à l'ADN (Prithivirajsingh *et al*, 2004). Après exposition aux RI, le stress oxydatif est persistant dans les mitochondries et le cytoplasme, entraînant des niveaux élevés de dommages génétiques, jusqu'à ce que les cellules induisent leurs défenses anti-oxydantes tardivement. Le niveau d'ERO est alors normalisé et la reprise de la prolifération cellulaire avec un fort taux d'aberrations chromosomiques reprend (Tulard *et al*, 2003). Le stress oxydatif entraîne des mutations et des délétions de l'ADN mitochondrial qui résultent en la désintégration de la chaîne respiratoire suivie d'un pic de production d'ERO (Yoneda *et al*, 1995).

Il a été montré que les mécanismes de réparation de l'ADN se mettent rapidement en place en réponse à ces dommages et que l'intégrité de ces mécanismes influence la radiosensibilité cellulaire (Kiltie *et al*, 1999 ; Chenal *et al*, 2000).

Un lien a été établi entre la radiosensibilité cellulaire et la sensibilité aux dommages à l'ADN mitochondrial radio-induite (Kubota *et al*, 1997). Au contraire, Prithivirajsingh *et al* ont montré que les RI induisent une augmentation des délétions dans l'ADN mitochondrial qui est dose indépendante et sans corrélation avec la radiosensibilité des cellules (Prithivirajsingh *et al*, 2004). Par ailleurs, les cassures double-brins de l'ADN nucléaire radio-induites et l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN se sont révélés de modestes marqueurs de la radiosensibilité de cellules cancéreuses de poumon (Hellman *et al*, 2005).

L'hypersensibilité des cellules humaines aux RI a été décrite comme basée sur les paramètres de survie cellulaire et de cassures chromosomiques. Afin de mieux comprendre le lien entre radiosensibilité cellulaire et clinique, des cas de jeunes patients ayant une radiosensibilité aiguë pendant une radiothérapie ont été recensés (Rogers *et al*, 2000). Deux syndromes ont permis d'étudier ce lien : l'ataxia-télangiectasia (A-T) et xeroderma pigmentosum (XP). L'A-T est caractérisé par un niveau de radiosensibilité clinique dramatiquement élevé couplé à une hypersensibilité cellulaire. L'étude de la radiobiologie des cellules A-T a montré un défaut de réparation premièrement des dommages potentiellement létaux (Debenham *et al*, 1987) et deuxièmement des cassures double-brins de l'ADN (Foray *et al*, 1997). La protéine ATM pourrait être impliquée dans la transduction du signal cellulaire, dans la réponse aux dommages à l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire. Le syndrome XP est caractérisé par une sensibilité anormale à la lumière du soleil et un problème de réparation de l'ADN dans les cellules exposées aux UV. La radiosensibilité cellulaire a été mise en évidence après des radiations gamma et UV dans une des souches XP (XP3BR) (Arlett *et al*, 1980).

Objectifs Partie III

La cicatrisation cutanée est un processus physiologique coordonné dans lequel la phase de réépithélialisation est une étape cruciale. Cette dernière met en jeu la migration et la prolifération des kératinocytes dans le but de recouvrir le derme au niveau du tissu lésé.

Dans une situation physiologique normale, les kératinocytes prolifèrent dans la couche basale et se différencient dans les couches suprabasales de l'épiderme.

Après lésion tissulaire, les kératinocytes répondent rapidement en s'activant : ils acquièrent un phénotype pro-inflammatoire, hyperprolifératif et migratoire (Coulombe, 1997 ; Freedberg *et al*, 2001) décrit précédemment (Généralités, Chapitre III. § II.). Cette réponse des kératinocytes va permettre de reconstituer un nouvel épiderme.

Après exposition de la peau aux RI à des doses comprises entre 10 à 20 Gy, il a été montré qu'une desquamation sèche peut apparaître dans les jours qui suivent, caractérisée par une dégénérescence des kératinocytes au niveau de l'épiderme conduisant à son amincissement et à l'aplatissement des papilles dermiques. A ces doses, dans un modèle murin, les kératinocytes présentent une capacité de régénération suffisamment importante pour compenser la perte cellulaire due à l'irradiation (Shirazi *et al*, 1995 ; Trott *et al*, 1999). Après une exposition de 20 Gy, on estime qu'il ne reste qu'une seule cellule par cm². La réépithélialisation est encore possible (Daburon, 1997). Pour des doses supérieures à 20 Gy, il a été montré que la desquamation humide peut apparaître en 3 à 4 semaines et correspond à une perte suffisante de cellules de la couche basale de l'épiderme pour conduire à la rupture de la barrière épidermique et à l'exsudation du sérum.

Il a été montré plus récemment que l'organisation des kératines des cellules épidermiques irradiées est fortement perturbée. En effet, une augmentation de l'expression des kératines K6 et K16 couplée à une anomalie de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes sont observées, causant une hyperplasie de l'épiderme (Sivan *et al*, 2002). Les mécanismes impliqués dans le processus de réépithélialisation après RI restent cependant très peu décrits dans la littérature.

Nous nous sommes alors intéressés (i) aux conséquences de l'irradiation sur l'activation des kératinocytes au cours de la réépithélialisation ; (ii) au bénéfice d'un traitement par une molécule pharmacologique (GGA) sur cette activation ; (iii) au mode d'action du GGA durant ce processus.

Partie III : Mode d'action du GGA. Etude de son effet sur la phase de réépithélialisation cutanée

I. Introduction

Dans cette introduction, nous proposons notre plan d'étude du mode d'action du GGA par différentes voies : la voie apoptotique (« Heat shock proteins » Hsp70, caspase-3) et les voies régulant la migration cellulaire, P38 MAPK et RhoA.

Ce travail a fait l'objet d'un second article soumis dans le Journal of Investigative Dermatology.

II. Etude du mode d'action du GGA sur les kératinocytes au cours de la réépithélialisation

Le GGA est un composé polyisoprénoïde acyclique utilisé en clinique au Japon en traitement oral préventif et curatif de l'ulcère gastrique (Murakami *et al*, 1981). Nous avons montré son pouvoir anti-oxydant et anti-apoptotique après UVB (Chapitre II § II. et Annexe 2). Nous nous sommes intéressés à démontrer son effet anti-apoptotique après RI.

Suite à une lésion cutanée, la capacité des kératinocytes à reépithélialiser la zone abîmée dépend en partie de leur survie et de leur migration cellulaires.

Nous avons choisi de caractériser le mode d'action du GGA par différentes voies de signalisation. Notre but a été d'évaluer son effet sur la réépithélialisation cutanée, tout d'abord dans un contexte physiologique et ensuite dans un contexte d'irradiation RI, à différents niveaux: **la survie des kératinocytes** par étude de la voie apoptotique (Hsp70, caspase-3) et **leur migration** par étude des voies P38 MAPK et RhoA (Figure 47).

La synthèse de la bibliographie permet à ce jour d'expliquer l'efficacité thérapeutique du GGA par son **effet anti-apoptotique cellulaire reconnu** dans des organes tels que l'estomac (muqueuse gastrique), l'intestin, le foie (hépatocytes), le cœur et le cerveau (neurones) (Mikuriya *et al*, 2005; Masuda *et al*, 2003; Fujiki *et al*, 2003; Hirota *et al*, 2000; Ishii *et al*, 2003; Oda *et al*, 2002; Kikuchi *et al*, 2002; Ooie *et al*, 2001; Tsuruma *et al*, 2000).

L'effet anti-apoptotique du GGA est du en partie à :

- l'induction des Hsp, en particulier Hsp70, dans de nombreux organes (cités ci-dessus)
- l'inhibition de l'activation de la caspase-3 dans des hépatocytes de rat en culture

(Ikeyama *et al*, 2001)

Le GGA a été démontré comme agissant sur l'apoptose principalement des cellules gastriques et hépatiques, mais n'a jamais été décrit comme induisant la migration cellulaire. Nous avons émis l'hypothèse qu'il favorise la migration des kératinocytes pendant le processus de réépithélialisation.

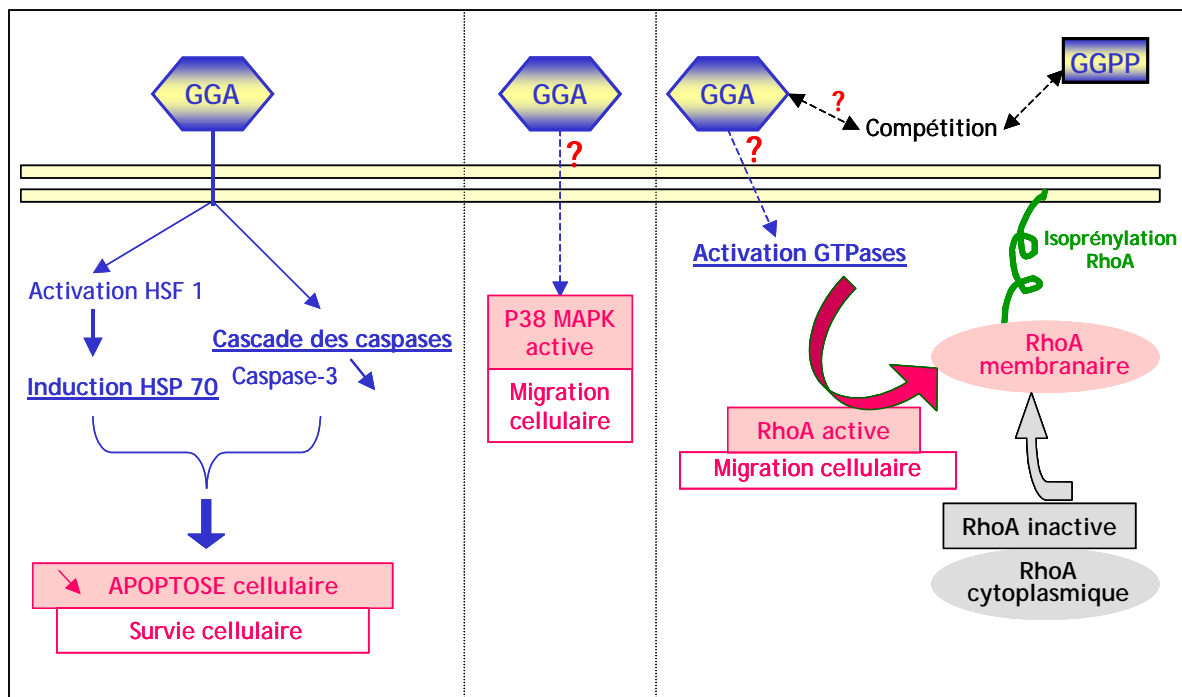


Figure 47 : Le mode d'action du GGA

Le mode d'action du GGA n'a jamais été mis en évidence dans la peau. Le GGA est décrit comme favorisant la **survie cellulaire** : il est décrit comme ayant un effet anti-apoptotique sur les cellules de nombreux organes. Il active directement le facteur de transcription « Heat Shock Factor-1 » (HSF-1) ce qui induit l'expression des ARNm Hsp70 et l'accumulation des protéines Hsp70 dans les cellules. Enfin, il inhibe l'activité de la caspase-3 dans les hépatocytes de rat. Son effet sur la **migration cellulaire** reste inconnu. Notre hypothèse est qu'il activerait directement les voies P38 MAPK et Rho en induisant les protéines P38 et RhoA. Le GGA, en compétition avec le geranylgeranylpyrophosphate (GGPP), activerait les GTPases en induisant l'isoprénylation de RhoA, et ainsi son ancrage à la membrane plasmique nécessaire à son activation. En effet, l'isoprénylation est une modification post-traductionnelle essentielle pour la localisation membranaire et l'activité biologique des protéines.

III. Modèle expérimental

Afin de d'évaluer le potentiel de migration et d'activation des kératinocytes après irradiation et de caractériser l'effet bénéfique du GGA sur la réépithélialisation cutanée radio-induite, nous avons défini un protocole expérimental sur un modèle original et simple.

Nous avons mis au point un modèle cicatriciel de kératinocytes *in vitro* (Figure 48).

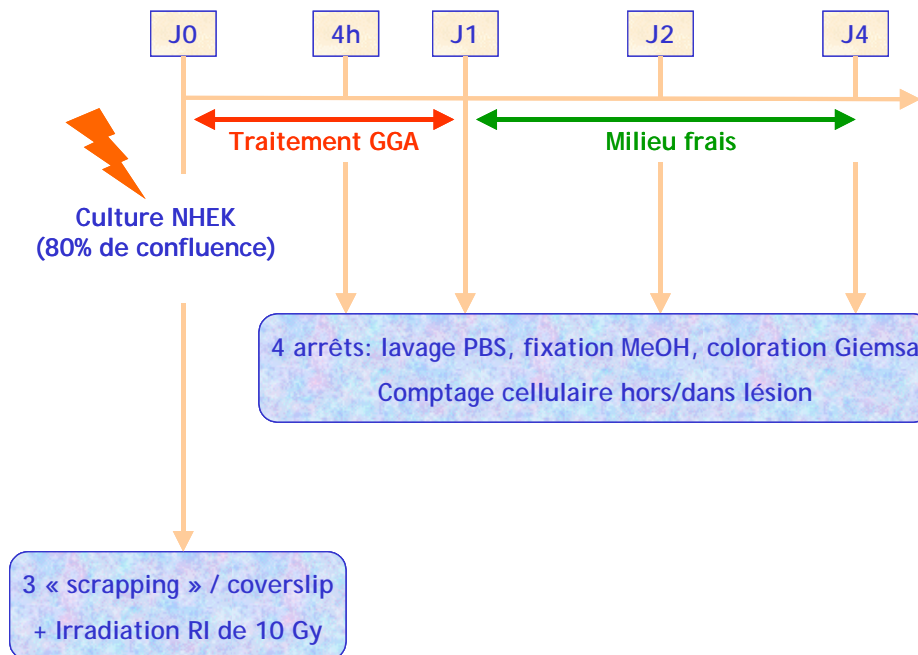


Figure 48 : Protocole expérimental du traitement GGA sur une culture en monocouche de NHEK scrapées et irradiées

Sur une culture en monocouche de kératinocytes primaires NHEK confluente à 80%, nous avons mécaniquement créé une lésion ou « scapping » à l'aide d'un cône d'une largeur de 0,8 mm. Trois « entailles » ont été faites sur chaque culture,ensemencée sur une lamelle en verre ou « coverslip » déposée au fond d'un puit de plaques 6-puits.

Ces cultures ont été immédiatement irradiées aux RI, après « scapping », à la dose de 10 Gy (1 Gy.min⁻¹).

Après irradiation, le milieu KGM-2 a été remplacé par du milieu frais pour les échantillons contrôles irradiés ou non, et par la solution de GGA à 1 µM pour les échantillons traités au

GGA irradiés ou non. La solution de GGA préparée est soluble à 6% dans de l'éthanol, et peut être diluée ensuite dans du KGM-2 pour une concentration finale de 1 μ M.

Les cultures en monocouche sont traitées pendant 24 heures après « scrapping » et irradiation, avec le KGM-2 ou la solution de GGA. Le milieu est alors remplacé par du KGM-2 pour tous les échantillons à partir de J1 jusqu'à J4 post-irradiation.

A chaque arrêt, les cultures sont lavées au PBS, fixées dans du méthanol et colorées dans du Giemsa. L'index de migration et la densité cellulaire sont alors calculés par observation et comptage cellulaire de 9 champs de vision (aire de 1 mm²) par lamelle, sur 3 lamelles par condition.

Afin d'intégrer la mort cellulaire radio-induite dans nos comptages, l'index de migration a été défini comme le ratio de la densité des cellules migrant au centre de la zone lésée versus la densité de cellules vivantes dans la partie non « scrappée ».

Geranylgeranylacetone treatment accelerates skin reepithelialization

Muriel Isoir ¹, Radia Tamarat ¹, Fabien Milliat ¹, Philippe Mondon ², Philippe Voisin ¹, Elian Lati ³, Claire Mas-Chamberlin ² and Marc Benderitter ¹

¹ IRSN, Laboratoire de Radiopathologie, BP 17, 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France

² SEDERMA, 29 rue du Chemin Vert, 78612 Le Perray en Yvelines Cedex, France

³ Bio-EC, 10 Avenue Reaumur, 92140 Clamart, France

Corresponding author : Dr Muriel ISOIR

Dr Muriel ISOIR/ Dr Marc BENDERITTER

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire IRSN

DRPH /SRBE /LRPAT

BP 17

92262 Fontenay-aux-Roses Cedex

FRANCE

Phone : 33 1 58 35 91 36

Fax : 33 1 58 35 84 67

E-mail : muriel.isoir@hotmail.fr

Running title: Acceleration of reepithelialization by GGA

Abbreviations: GGA, geranylgeranylacetone; NHEK, Normal human epidermal keratinocyte; IR, ionising radiation; K, keratin; Hsp, heat shock protein; MAPK, mitogen-activated protein kinase

Key words: keratinocyte, reepithelialization, geranylgeranylacetone, Hsp70, caspase-3, RhoA, P38 MAPK

Abstract

During human cutaneous wound healing, reepithelialization is characterized by the lateral migration and proliferation of keratinocytes at the wound edge to resurface the injured area. The aim of our study is to delineate the effect of ionising radiation (IR) delivered immediately after mechanical injury on keratinocytes activation, and the beneficial effects of a pharmacological treatment with geranylgeranylacetone (GGA) on wound reepithelialization in non-irradiated conditions and after IR. We demonstrated that after IR, activated keratinocytes NHEK express K6, release pro-inflammatory cytokines and proliferate, without modification of their differentiation. Treatment of NHEK with GGA has a beneficial effect on their radio-induced activation by increasing IL-1 release, their migration in scrapped area and their survival. This work underscores for the first time that, in non-irradiated conditions, GGA has anti-apoptotic ability by inducing Hsp70 – caspase-3 pathway, and migratory properties by activating P38 MAPK and RhoA pathways on NHEK. Moreover, after IR, Hsp70, P38 MAPK and RhoA pathways are not involved by GGA but caspase-3 pathway is induced. This work thus contributes to evaluate the beneficial effect of GGA pharmacological treatment on reepithelialization and its mechanism of action on wound healing.

Introduction

Skin wound healing represents a dynamic and well-ordered biological process. During cutaneous wound repair, reepithelialization is characterized by the lateral migration and proliferation of human keratinocytes at the wound edge to resurface the injured area. Keratinocytes were previously in a quiescent stationary state (Henry *et al*, 2003), they stop differentiating and become in an "activated state" to cover the wounded tissue and restore the functional integrity of the skin. They start migrating by acquisition of the ability to move over provisional extracellular matrix molecules, in part resulting from the synergistic action of the matrix metalloproteinase (MMP-1) and plasmin both up-regulated by epidermal growth factor (EGF) (Ronfard and Barrandon, 2001).

The keratinocytes' cycle of activation was described by Freedberg *et al* (Freedberg *et al*, 2001). The first signal is the release of interleukin-1 (IL-1) that activates keratinocytes turning into hyperproliferative cells that respond to growth factors and cytokines released (Kupper, 1990). Keratinocytes also produce cell surface markers like intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and express a specific set of keratin proteins distinct from the keratins in the healthy epidermis. However, in suprabasal keratinocytes of activated epidermis, the expression of keratins K1 and K10 by differentiating keratinocytes is suppressed and replaced by K6 and K16 (Coulombe, 1997; Tomic-Canic *et al*, 1998). They synthesize additional signalling growth factors and cytokines including IL-3, IL-6, IL-8, transforming growth factor alpha (TGF- α) and granulocyte/macrophage colony stimulating factors. However, when dermis is repaired, a "de-activation" signal expressed by transforming growth factor beta (TGF- β) reverts keratinocytes to the normal differentiation pathway.

Geranylgeranylacetone GGA, an acyclic polyisoprenoid, is clinically used in Japan as an oral anti-ulcer drug protecting gastric mucosa damage. GGA was reported to have a protective anti-apoptotic effect due to an up-regulation of heat shock proteins, principally Hsp70 in several organs including gastric mucosa, liver and brain (Mikuriya *et al*, 2005; Masuda *et al*,

2003; Fujiki *et al*, 2003; Hirota *et al*, 2000; Ishii *et al*, 2003; Oda *et al*, 2002; Kikuchi *et al*, 2002; Ooie *et al*, 2001; Tsuruma *et al*, 2000). Furthermore, Hsp70 conferred significant protection against apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation (Li *et al*, 2000).

P38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Rho family GTPases pathways participate and govern the keratinocyte reepithelialization at wound sites.

Wounding activates P38 MAPK that regulates keratinocyte migration (Harper *et al*, 2005; Jaakola *et al*, 1998) while ERK1/2 activation induces proliferation (Sharma *et al*, 2003).

The Rho family proteins are central regulators of cell protrusions and polarity, they regulate distinct actin cytoskeleton changes required for adhesion and migration of epithelial cells required for wound healing (Ehrenreiter *et al*, 2005; Desai *et al*, 2004). For instance, the balance between proliferation and differentiation in human keratinocytes has been related to the activity of the GTP-binding protein RhoA, through its signal mediators ROCK (Santoro *et al*, 2005).

For the first time, we tested GGA efficiency to accelerate human keratinocytes' reepithelialization after injury, by studying its mechanism of action through three different intracellular pathways: Hsp70 - caspase-3, P38 MAPK and RhoA pathways, known to control cell survival and migration. Our experiments were also performed after ionising radiation (IR) both to enhance an inflammatory process and to activate keratinocytes.

The aim of our study is to delineate the effect of IR delivered immediately after mechanical injury on keratinocyte activation, and the beneficial effects of a pharmacological treatment with GGA on wound reepithelialization. This *in vitro* study demonstrates first that epidermis reepithelialization is altered after IR and second that it is stimulated after GGA treatment. We point out a crucial role of Hsp70 and caspase-3, p38 MAPK, and RhoA pathways in GGA beneficial effect.

Results

GGA activates pro-inflammatory cytokines released by irradiated NHEK To check that ionising radiation (IR) induces an inflammatory phenotype in NHEK modulating the release of pro-inflammatory cytokines and growth factors, they were quantified in the supernatants of keratinocytes. Data were expressed in ratios of irradiated sample versus control. Release was increased by 7 to 8-fold for IL-1 β and IL-6, and by 2 to 3-fold for TNF- α and IL-8, at day 4 after IR. Expression of ICAM-1 was induced by 8-fold at day 8 after IR. Three- and 4-fold increases of pro-angiogenic factor VEGF and MMP-1 for matrix degradation respectively were observed at day 4. GGA activated IL-1 β secretion by 2- and 1,3-fold increases 1 and 4 days post-IR respectively compared to non-GGA treated sample. VEGF production was not modulated by GGA treatment.

GGA accelerates irradiated NHEK migration into the wounded area To calculate cell density values and the migration index of NHEK in the scrapped area, cell counting was done on 3 slides, on 9 fields by slide. A 10 Gy-IR reduces NHEK migratory capacity into the lesion by 3,7-fold at day 1 compared to non-irradiated control, whereas a curative treatment with GGA accelerated the NHEK repopulating capacity by 5-fold compared to irradiated sample.

GGA do not modulate irradiated NHEK hyperproliferation Our previous data showing that NHEK migration was stimulated by GGA were confirmed by controlling that GGA did not induce proliferation simultaneously. Ki-67 positive NHEK counting in nine different fields of the scrapped area, after a 10 Gy-IR, revealed a cell hyperproliferation of 70% compared to control at day 2, with or without GGA treatment. A return to basal level of proliferation was observed at day 4. Whatever the presence of GGA in the culture medium, NHEK proliferation rate was not modified.

IR induces NHEK activation with or without GGA Activation of keratinocytes may be characterized by a specific marker that is keratin 6 (K6). Relative mRNA K6 expression was

investigated by RT-PCR. We observed that activation was significantly enhanced in irradiated samples at days 2 and 4 post-IR compared to control, independently of GGA treatment showing that NHEK were activated after IR.

GGA and IR do not affect NHEK differentiation To complete our study, we evaluated the implication of irradiated NHEK in the differentiation process with a specific marker keratin 10 (K10). The increase of K10 mRNA expression was time-dependent after scrapping but any significant difference was measured between irradiated sample compared to control from 4 hours to 4 days after IR, whatever the treatment.

GGA improves irradiated NHEK survival We determined the keratinocytes capacity of dividing and their viability after a dose-response of IR ranged from 0 to 10 Gy by clonogenic survival assays. These measures showed an increase of surviving fraction for NHEK treated with GGA compared to GGA non-treated cells.

The mechanism of action of GGA investigated during reepithelialization process To evaluate GGA efficacy during keratinocyte activation, three important pathways were analyzed.

GGA treatment influences apoptotic pathway To identify the mechanism of action of GGA involving the apoptotic pathway, activation of Hsp70 and caspase-3 was studied.

In non-irradiated keratinocytes treated with GGA, Hsp70 expression was significantly increased 4 hours post-IR and returned to basal level from day 1 to day 4 (data not shown). In 10 Gy-irradiated cells, Hsp70 expression was elevated. When irradiated-NHEK were treated with GGA, a 1,6-fold decrease of Hsp70 expression was observed at 4 hours compared to irradiated samples. Furthermore, any significant variation was examined from day 1 to day 4 (data not shown).

Four hours after IR, GGA treatment induces a decrease of the expression of caspase-3 pro-active form, overlapping with the absence of caspase-3 active form expression for each condition. Caspase-3 expression was determined as from day 1 post-IR, with increases of 2,5-fold and 4,5 fold respectively for day 1 and 2. GGA tended to reduce caspase-3 expression with significant difference at day 2 by 2-fold and stability at day 4 after IR.

GGA treatment induces P38 MAP kinase pathway The mechanism of action of GGA involving the P38 MAPK pathway through activation of P38 was investigated. Irradiated cells were pre-treated with a P38 MAPK inhibitor (LY333351) in presence of GGA or not.

Any significant change of P38 expression was observed in NHEK 4 hours after exposure to IR.

In non-irradiated keratinocytes, LY333351 attenuated P38 expression at day 1 and day 4 compared to control. Moreover, it was restored when NHEK were treated with LY333351 and GGA simultaneously.

A 10 Gy-IR did not modulate P38 expression at day 1 and 4. Furthermore, treatment of NHEK exposed to IR with LY333351, mixed with GGA or not, gave rise to the decrease of P38 expression at day 1 post-IR, which tended to persist at day 4.

GGA treatment induces RhoA pathway The expression of RhoA was determined by western blot. Cytosolic and membrane fractions were separated, membrane fraction representing activation of RhoA by its translocation from the cytosol to the plasma membrane. Data showed that in non-irradiated NHEK at day 1, GGA tended to decrease RhoA cytosolic expression whereas this treatment elevated by 4-fold RhoA membrane expression. Moreover, one day after NHEK γ -rays exposure, we observed that GGA treatment induced a 3 to 4-fold decrease RhoA cytosolic expression, but unfortunately did not affect RhoA membrane expression.

Whatever the conditions, RhoA expression was not changed at day 4 in cytosolic and membrane fractions.

Discussion

In the present study, we demonstrated first that GGA accelerates skin reepithelialization in non-irradiated conditions, and then, that GGA may overcome toxic effects of ionising radiation (IR) during wound healing. For this purpose, we developed a scratch injury model on 10Gy-irradiated NHEK monolayer.

Our experiments showed that a wound healing process is characterized by an overview of cytokines released by NHEK as TNF- α , IL-6, IL-8 and ICAM-1 until 8 days after IR. We may suggest that GGA did not participate to the angiogenic process after IR whereas it enhanced keratinocytes activation by increasing IL-1 β production inducing K6 expression. Thus, the mechanism of induction of the specific marker of activation and hyperproliferation K6 by IL-1 was reported in confluent keratinocytes (Komine *et al*, 2001). The K6 expression and NHEK migration revealed an activated phenotype of irradiated keratinocytes, the alteration of differentiation process was studied by K10 mRNA expression and no difference was observed between irradiated samples and controls, independently of GGA treatment. Interestingly, K10 expression was reported to remain normal after IR, on the contrary of altered K14 and involucrin expressions (Sivan *et al*, 2002). Indeed, we observed an increase of keratinocyte activation at days 2 and 4 post-IR compared to control, whatever the treatment. Activated NHEK were defined as hyperproliferative and migratory (Freedberg *et al*, 2001). We showed that the migration of irradiated-NHEK in the scrapped area was stimulated by GGA without modulation of the hyperproliferative effect. Migration in the wound closure was described as an involvement of basal and suprabasal keratinocytes located at the proximal wound margins, while enhanced proliferation occurred more distally (Coulombe, 1997).

Our data from clonogenic assays suggested that GGA restored the survival of irradiated NHEK after an exposure to γ -rays from 0 to 10 Gy. Cell death was noted to be reduced by GGA in a human neuroblastoma cell line (Katsuno *et al*, 2005). Furthermore, guinea pig gastric mucosal cells were protected from necrosis after a pre-treatment with GGA (Tomisato

et al, 2001) and their apoptotic DNA fragmentation caused by gastric stressors was suppressed (Takano *et al*, 2002).

As the conclusion of this first set of experiments, we demonstrated that keratinocytes acquired an activated phenotype after IR, becoming hyperproliferative and migratory to cover the wounded area. Moreover, reepithelialization and protection against cell death were stimulated after GGA pharmacological treatment.

Thus, we focused on GGA mechanism of action involved in the reepithelialization process. In this aim, we analyzed GGA effect on anti-apoptotic Hsp70 and pro-apoptotic caspase-3 expressions in non-irradiated and irradiated conditions. In the mitochondrial-dependent apoptotic pathway, the up-regulation of Hsp70 does not inhibit cytochrome c release, but prevents both Bax translocation and caspase-3 activation (Stankiewicz *et al*, 2005). Interestingly, GGA was defined as exerting anti-apoptotic actions by priming hepatocytes for enhanced Hsp70 induction caused by hydrogen peroxide and ethanol, coinciding with the suppression of caspase-3 like activities (Ikeyama *et al*, 2001).

We observed that in non-irradiated conditions, 4 hours after NHEK scrapping, GGA protected keratinocytes from apoptosis by drastically enhancing Hsp70 expression. Our analyze was in agreement with several studies confirming that GGA was a non-toxic Hsp70 inducer in various cells types. Pre-treatment with GGA enhanced nuclear translocation and phosphorylation of heat shock factor 1 (HSF1) for DNA-binding, inducing Hsp70 mRNA expression and protein accumulation was increased in cells (Rokutan, 2000 ; Kawai *et al*, 2000; Hirakawa *et al*, 1996).

Furthermore, 4 hours post-IR, Hsp70 expression was decreased in GGA-treated NHEK. In addition, this decrease in GGA treated-NHEK was associated with a suppression of pro-apoptotic caspase-3 active form. The diminution of pro-apoptotic caspase-3 expression by 2-fold was observed as more elevated than anti-apoptotic Hsp70 expression by 1,6-fold. We speculated that the low level of Hsp70 expression radio-induced may be the consequence of a differential balance between anti-apoptotic genes and pro-apoptotic genes. Our results

showed a decrease of anti-apoptotic Hsp70 expression in GGA-treated NHEK after IR, but the expression of additional anti-apoptotic factors may be increased in parallel, as the thioredoxin. Expression of thioredoxin, an endogenous-redox-acting molecule, was enhanced after hepatocytes' treatment with GGA by modulating gene expressions downstream of AP-1 and NF- κ B (Hirota *et al*, 2000). Moreover, it was reported that thioredoxin had chaperon-like activity similar to Hsp (Mitsui *et al*, 1992).

Two mechanisms for keratinocyte migration have been identified as P38 MAPK and RhoA pathways (Harper *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2005). Both are involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 essential in cell migration and extracellular matrix remodelling following keratinocytes injury (Turchi *et al*, 2003). To our knowledge, involvement of these two distinct pathways remains poorly documented after IR, so we were interested in studying GGA beneficial effect after NHEK-mechanical injury, in non-irradiated and irradiated conditions.

Firstly, our results showed for the first time that in non-irradiated conditions, GGA restored P38 expression which was previously inhibited by LY333351, day 1 and day 4 after scrapping. Actually, the release of pro-inflammatory cytokines (including TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and MMP-1) activated MAPK signal transduction pathway which induced the recruitment of leukocytes to sites of inflammation, resulting in the activation of P38 MAPK for cell adhesion and migration (Kaminska, 2005; Herlaar and Brown, 1999). In addition, co-expression of both constitutively activated P38 and ERK1/2, coordinating migration and proliferation respectively, could mimic the pro-motility effects of collagen and growth factors (Li *et al*, 2004; Sharma *et al*, 2003), P38 acting primarily during the migration phase of reepithelialisation (Stoll *et al*, 2003).

After IR, we observed no activation of P38 expression after GGA treatment. We supposed that phosphorylated form of P38 MAPK (P-P38) may be specifically induced after IR, as noted by Choi *et al* (Choi *et al*, 2006). Indeed, this team demonstrated that after IR, any modification of P38 protein was shown, but a P-P38 activation was observed. In addition, P-

P38 was reported to be induced during wound healing for migration of keratinocytes (Harper *et al*, 2005) and corneal epithelial cells (Sharma *et al*, 2003). P38 MAPK is known to be activated by dual phosphorylation on Thr180 and Tyr182 by upstream activated MAPK as MKK3, 4, and 6 (Pearson *et al*, 2001; Raingeaud *et al*, 1996).

Secondly, we demonstrated that in non-irradiated conditions, GGA had a beneficial effect on migration after NHEK scrapping. We showed that GGA may activate RhoA by its translocation from the cytosol to the plasma membrane. The implication of Rho protein in wound healing and the GGA mechanism of action through Rho pathway were unknown. Activated intracellular Rho-family GTPases and extracellular matrix were noted to be required for the assembly of integrin adhesion complexes in 3T3 fibroblasts (Hotchin and Hall, 1995).

In our experimental conditions, after IR, GGA did not activate RhoA despite the important decrease of cytosolic RhoA. We shown that after IR, in our experimental conditions, GGA loosed its beneficial effect on RhoA translocation to the membrane and its activation. Actually, GGA may interfere deleteriously with gamma rays, and this association may affect the mechanisms of RhoA translocation to the membrane. Nevertheless, Rho/Rho kinase pathway was recently noted to be involved in radiation fibrosis (Bourgier *et al*, 2005; Haydont *et al*, 2005) and described as a major determinant of cell resistance to IR by preventing cell death (Milia *et al*, 2005; Ader *et al*, 2002).

In conclusion, this work underscores for the first time that, in non-irradiated conditions, GGA has protective effects on keratinocytes reepithelialization during wound healing and a beneficial action on apoptotic pathway, P38 and RhoA activation. In irradiated conditions, our results demonstrate that GGA mechanism of action do not investigate Hsp70, P38 and RhoA pathways, but GGA responds to IR injury by activating caspase-3 pathway.

Materials and methods

Cell culture Normal human epidermal keratinocytes NHEK were cultured in Keratinocyte Growth Medium KGM-2 (Clonetics, USA) changed every 48 hours. Experiments were performed on keratinocyte cultures between passages 2 and 3. Cells were seeded at a density of 3500 cells per cm² in Falcon six-well tissue culture plates (Becton Dickinson, France). Subconfluent cells cultures (80% confluence) were sham-irradiated or exposed to a γ -irradiation source.

Irradiation source In all experiments, NHEK were 10 Gy-irradiated in 2 ml culture medium with γ -rays by using a ¹³⁷Cs source IBL 637 (CIS Bio International, France). Dose rate was 1 Gy.min⁻¹ (except for clonogenic assays at 2 Gy.min⁻¹).

***In vitro* wounding assay** To determine the ability of irradiated NHEK to migrate in a wounding area and to respond to exposure with γ -rays, we used a scratch injury model. Three parallel 0.8 mm linear wounds were mechanically made per well on subconfluent NHEK cultures. Cells were immediately irradiated and the medium replaced. Cultures were washed with PBS, fixed in methanol and colored with Giemsa stain from 4 hours to four days after irradiation. Migration index and cell density values represent examination of 3 slides with nine different fields for each slide (area of each field was 1 mm²). To integrate cell death in the evaluation of the NHEK migration post-irradiation, the quantitative analysis of the migration index in percentage was defined as the ratio of the density of migrating cells in the center of the scratch zone versus the density of surviving cells of unwounded region, calculated by counting. Cell survival was measured simultaneously in the same conditions by counting viable cells (cells excluding Trypan blue) from 4 hours to four days after irradiation.

Geranylgeranylacetone treatment The geranylgeranylacetone (GGA) solution was prepared. GGA was diluted at 6% in ethanol and then in KGM-2 medium culture to a final

concentration of 1 μM . We treated mechanically-injured NHEK cultures with KGM-2 medium or GGA solution for 24 hours immediately after irradiation. Fresh medium was replaced until four days post-radiation.

ELISA assays NHEK culture supernatants of the scratch injury model were collected from 4 hours to eight days after irradiation, and growth factors or cytokines releases were quantified by using enzyme-linked immunoabsorbant assay (ELISA) kits according to the manufacturer's instructions (R&D Systems Inc., France). Data were expressed in $\text{pg} \cdot 10^5 \text{ cells}^{-1}$, by differential expressions of irradiated samples versus non-irradiated controls. Ratios higher than 1 showed increases of cytokines and ratios lower than 1 showed decreases of them.

I.

Measurement of ICAM-1 expression and Ki-67 positive NHEK by flow cytometry

Trypsinized cells were fixed and permeabilized using Intrastain (Dako, France), and stained with a monoclonal mouse anti-human CD54-FITC / ICAM-1 (IM0726, Immunotech, Beckman Coulter, France) or/and Ki67-RPE antibodies (R0840, Dako, France) at 37°C in the dark. A polyclonal goat anti-mouse IgG-RPE (R0480, Dako, France) was used as secondary antibody. Flow cytometry was carried out on a FACSort flow cytometer (Becton Dickinson, France).

Immunocytochemistry NHEK were grown on glass coverslips and fixed for 30 minutes with 0.5% paraformaldehyde. After permeabilization (PBS - 0.1% Triton X100) and saturation (PBS - 1% BSA), cells were incubated overnight with primary antibody. The following monoclonal mouse anti-human antibodies were used: anti-K6 (M7237, Dako, France), anti-Ki-67 (M7240, Dako, France) and anti-K10 (M7002, Dako, France). Cells were then incubated with a goat anti-mouse tagged with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen Life Technologies, France), rinsed and incubated in RNase A / propidium iodide solution.

Images were acquired with a BIO-RAD MRC 1024 laser scanning confocal microscope (BIO-RAD, France).

RNA isolation and RT real time quantitative PCR Total RNAs were isolated from NHEK cultures using RNeasy Mini Kit (Qiagen, France), according to the manufacturer's recommendations. Total RNAs quantity and integrity were checked using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, France) and for each sample, 1 µg of total RNA was used for RT with SuperScript II (Invitrogen Life Technologies, France). cDNAs were synthesized from total RNAs using random hexamers, and PCR amplification was performed by using Taqman PCR master Mix (Applied Biosystems, USA). TaqMan Gene Expression Assays were used as follows: K6B (Hs00749101_s1, Applied Biosystems, USA), K10 (Hs00166289_m, Applied Biosystems, USA). Fluorescence data were analyzed after PCR completion, with an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System instrument (Applied Biosystems, USA). Significant PCR fluorescent signals were normalized to those of the housekeeping gene GADPH (Pre-developed Taqman Assay, Applied Biosystems, USA). Relative mRNA quantitation was calculated using the comparative $\Delta\Delta C_T$ method.

Survival determination by clonogenic assay Appropriate numbers of NHEK treated or not with 1µM GGA solution were plated into six-well tissue culture plates and allowed to adhere for 24 hours, and were shown to still be in the single cell state. After γ -irradiation, the cells were incubated for 7-12 days of colony growth. Colonies were fixed and stained in a 3% methanol - crystal violet solution. Only colonies with more than 50 cells were counted, and the surviving fraction was calculated and compared to the control.

Western blot analysis for apoptotic pathway (HSP70 and Caspase-3) Total proteins of NHEK lysates were extracted and equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE electrophoresis before transfer onto nitrocellulose membranes. The following primary antibodies were used: a monoclonal mouse anti-HSP70 (SPA-810, StressGen, TEBU,

France) and a polyclonal rabbit anti-caspase3 (AAS-103, StressGen, TEBU, France). Membranes were blotted with primary antibodies followed by incubation with either anti-rabbit or anti-mouse antibodies HRP-conjugated (Amersham Biosciences, USA). Blots were developed using the enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences, USA) and bands intensity was quantified. As control loading, membranes were then colored with Ponceau Red stain and developed to check that equal quantity of proteins were deposited.

Inhibition of p38 MAP kinase and proliferation characterization A p38 MAPK-inhibitor, LY-333351, was kindly provided by Teni Ebrahimian (INSERM U689, Paris, France). It was added in the medium of NHEK cultures at the concentration of 10 μ M, for 24 hours after irradiation, completed or not with the GGA solution. Cells proteins were extracted and separated by western blot as described previously, using a polyclonal rabbit anti-P38 as primary antibody (sc-728, Santa Cruz Biotechnology, TEBU, France).

Cell fractionation and RhoA characterization NHEK were pelleted by centrifugation at 27,000 x g for 30 minutes in an ultracentrifuge (Optima TM TLX equipped with a TLA-100 rotor, Beckman Coulter, France) after incubation in an ice-cold homogenization buffer of the following composition: 3% CHAPS, 1M NaCl, 20mM Tris pH 7.4, 1mM DTT and protease inhibitors (Sigma-Aldrich, France). The supernatants were collected as the cytosolic fractions and pellets were resuspended, and the membrane proteins were extracted by incubation in homogenization buffer [(1% SDS, 1mM Na Orthovanadate, 10mM Tris-HCl pH 7.4 and protease inhibitors (Sigma-Aldrich, France)], and spun at 10,000 x g for 10 minutes at 4°C. The supernatants were collected as the membrane fractions. The proteins of these cytosolic and membrane fractions were separated by immunoblotting as described previously, using a monoclonal mouse anti-RhoA as primary antibody (sc-418, Santa Cruz Biotechnology, TEBU, France).

Statistical analysis The significance of the different treatments was determined by ANOVA associated with a Dunn's or Tukey test. All data are expressed as means \pm the standard error of the mean (SEM) for triplicate samples from 3 different experiments (n=3). Statistically significant differences from controls are indicated as *p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001 and differences from irradiated samples as #p < 0.05, ##p < 0.01 ###p < 0.001.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT, Paris, France).

Figure legends

Figure 1: Ionising radiation (IR) increases pro-inflammatory response (a), pro-angiogenic response (b) and matrix degradation (c) in NHEK cells

These growth factors and interleukins contents were determined by ELISA assays or flow cytometry in supernatants of NHEK at 4 hours, days 1, 4 and 8 after a 10 Gy-IR. Data are expressed by differential expressions that are ratios of irradiated samples versus non-irradiated controls. Ratios higher than 1 show increases of interleukins, and at the contrary, ratios lower than 1 show decreases of them. *** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ irradiated sample versus control.

Figure 2a): Keratinocyte migration

A) Representative images of NHEK migration into the wounded area (width of $8\mu\text{m}$) mechanically-injured in a scratch injury model, 4 hours, days 1, 2 and 4 after a 10 Gy-IR. B) Cells were counted and migration index was measured for each condition one day post-IR. *** $p < 0.001$ irradiated sample versus control, ### $p < 0.001$ irradiated GGA sample and irradiated sample versus GGA control, \$\$\$ $p < 0.001$ irradiated GGA sample versus irradiated sample.

Figure 2b): Keratinocyte proliferation

A) Ki-67 positive NHEK were counted into wounded area of scratch injury model at 4 hours, days 1, 2 and 4 after a 10Gy-IR. B) Ki-67 labelling and confocal microscopy analyses: representative images obtained at day 2 in control and 10 Gy-irradiated samples are shown (objective x20): Ki-67+ NHEK are colored in green and nuclei in red. *** $p < 0.001$ irradiated sample versus control, ### $p < 0.001$ irradiated GGA sample versus GGA control.

Figure 2c): Keratinocyte activation

Relative K6 mRNA expressions of NHEK were investigated by real time PCR at 4 hours, days 1, 2 and 4 after a 10Gy-IR. ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ irradiated sample versus control, NS irradiated GGA sample versus GGA control.

Figure 3: Keratinocyte differentiation

Relative K10 mRNA expressions of NHEK were investigated by real time PCR at 4 hours, days 1, 2 and 4 after a 10Gy-IR. ## p<0.01 # p<0.05 irradiated GGA sample versus GGA control, NS irradiated GGA sample versus irradiated sample.

Figure 4: Keratinocyte death

The surviving fraction represents the ratio between the number of surviving colonies 7-12 days after IR from 0.5 to 10 Gy (2 Gy.min⁻¹). *** p<0.001 ** p<0.01 * p<0.05 versus irradiated sample.

Figure 5: Involvement of NHEK treated with GGA in the apoptotic pathway

A) GGA effect on the induction of Hsp70 expression in NHEK after IR for 4 hours. B) GGA effect on the induction of caspase 3 pro- and active forms expressions in NHEK from 4 hours to day 4 post-IR. ** p<0.01 GGA control versus control, ### p<0.001 ## p<0.01 irradiated GGA sample versus GGA control, \$\$ p<0.01 \$ p<0.05 irradiated GGA sample versus irradiated sample.

Figure 6: Involvement of NHEK treated with GGA in the P38 MAP kinase pathway

Effect of P38 MAP kinase inhibitor LY333351 and GGA on the induction of P38 MAPK expression in NHEK after IR from 4 hours to day 4. * p<0.05 LY control versus control, \$ p<0.05 GGA+LY control versus LY control, # p<0.05 irradiated GGA+LY / irradiated LY samples versus irradiated GGA sample.

Figure 7: Involvement of NHEK treated with GGA in the RhoA pathway

GGA effect on the induction of RhoA expression in NHEK from day 1 to day 4 post-IR. Cytosolic (C) and membrane (M) fractions were separated before western blot migration so that the translocation of RhoA to the membrane could be visualized as a change in the ratio of the cytosolic to the membrane fraction. M represents activation of RhoA by its

translocation to plasma membrane. ** $p < 0.01$ GGA control versus control, ### $p < 0.001$ ## $p < 0.01$ irradiated GGA sample versus GGA control, \$\$ $p < 0.01$ irradiated GGA sample versus irradiated sample.

Figure 1a)

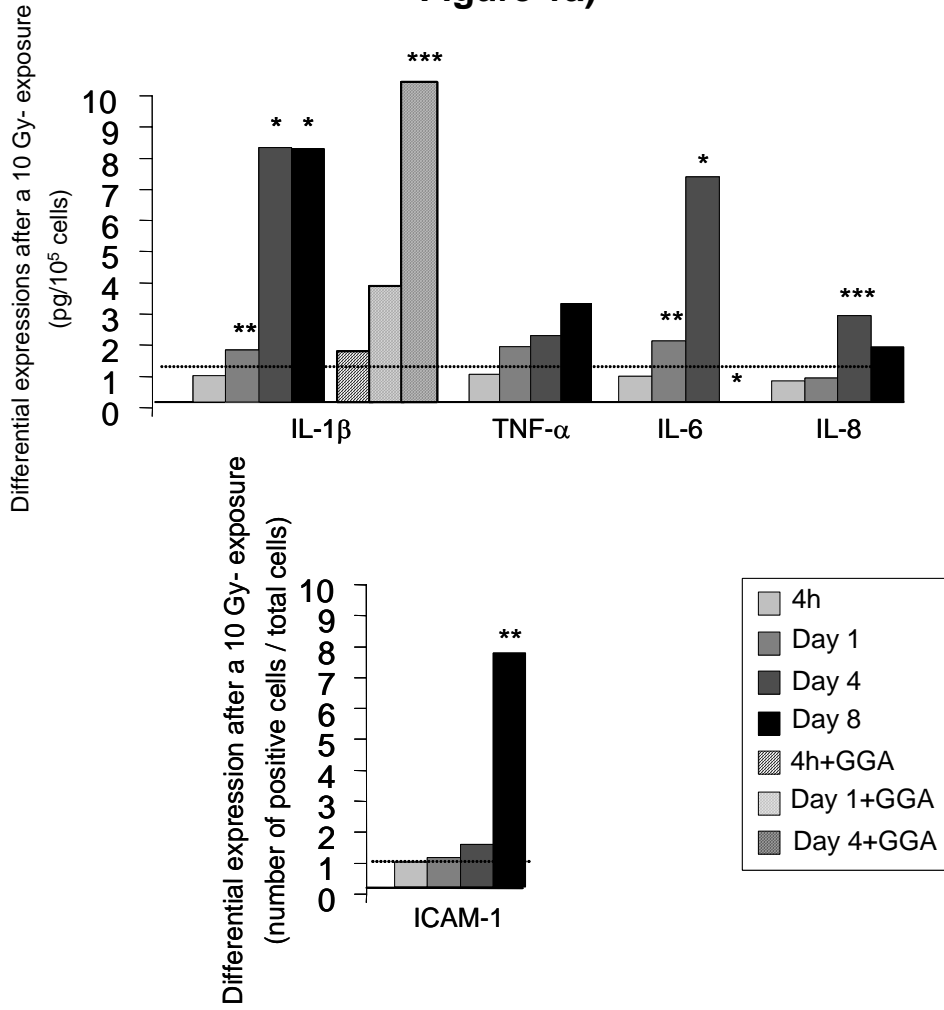


Figure 1b)

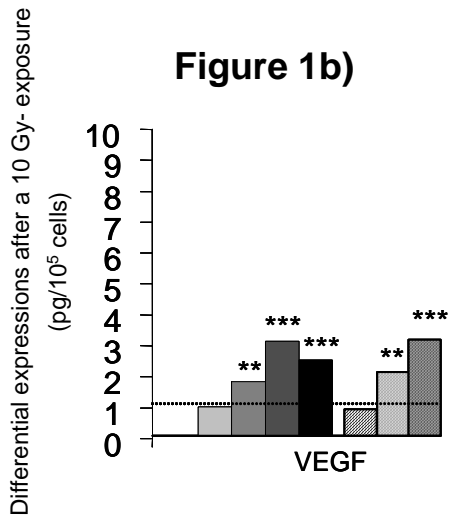


Figure 1c)

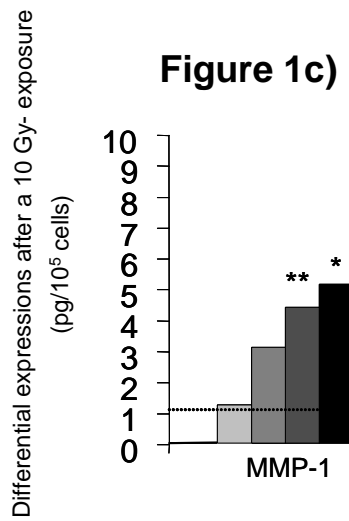


Figure 2a)

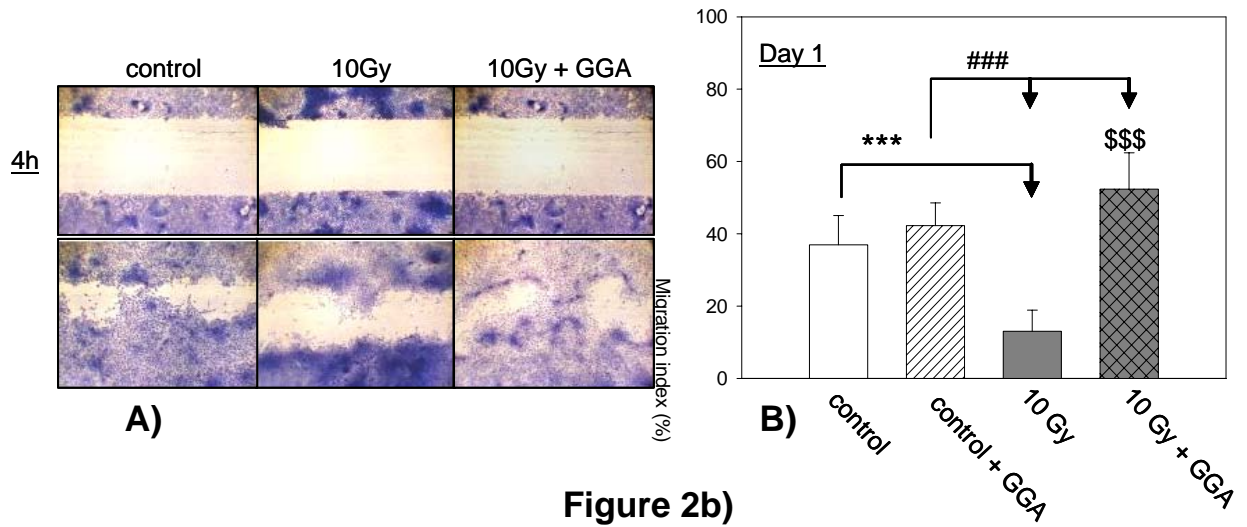


Figure 2b)

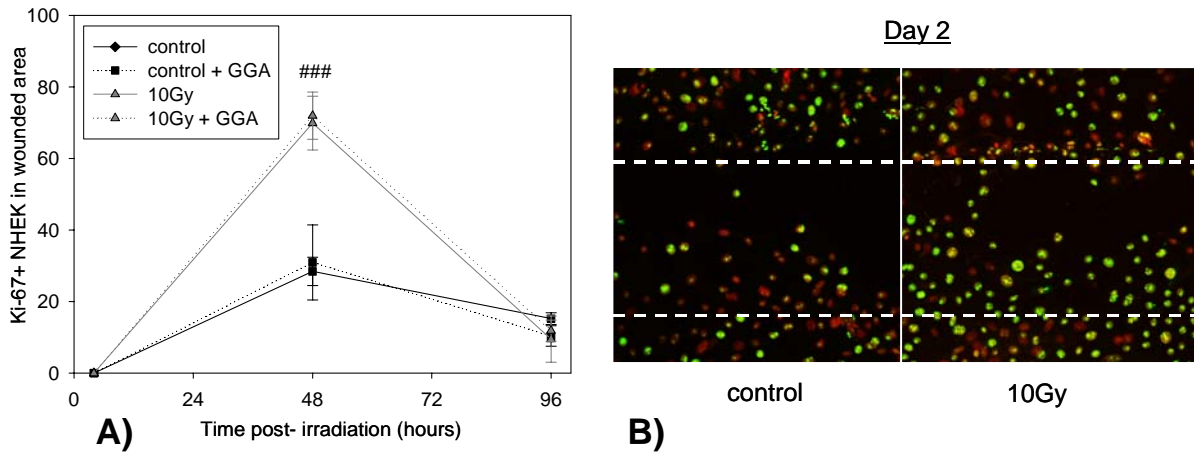


Figure 2c)

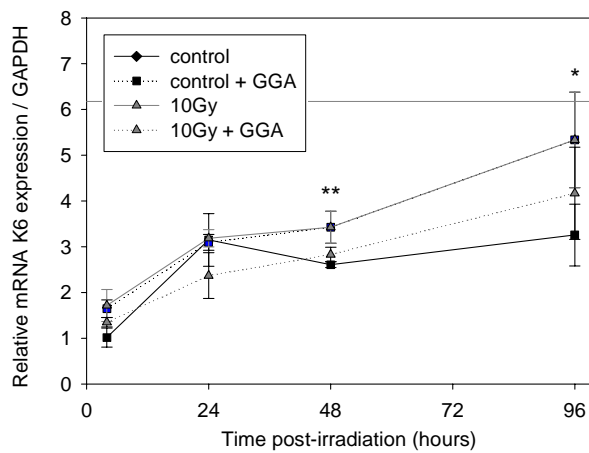


Figure 3

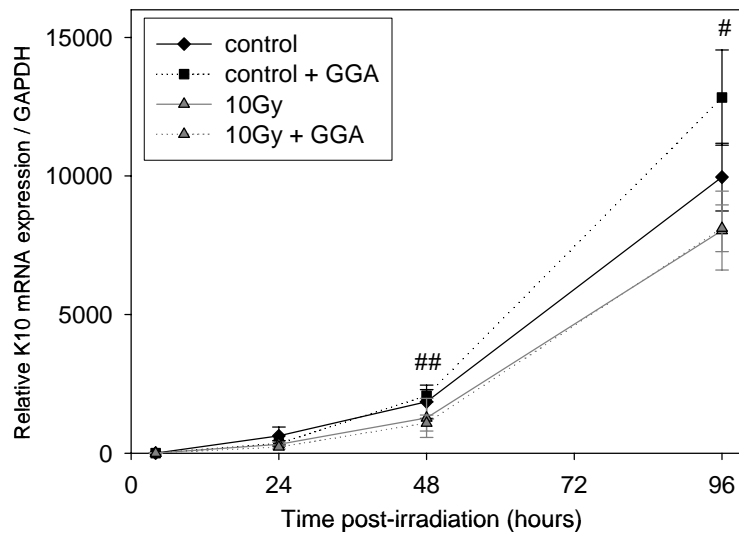


Figure 4

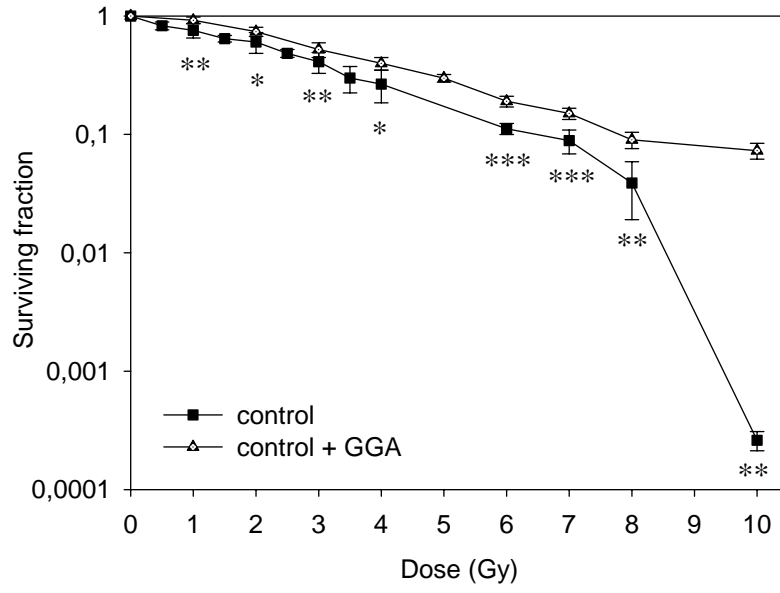


Figure 5a)

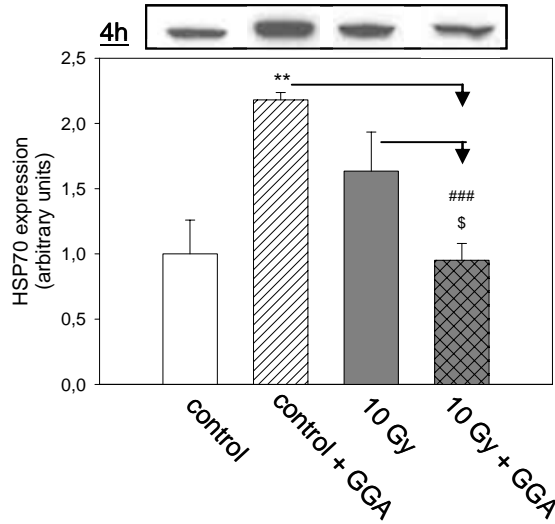


Figure 5b)

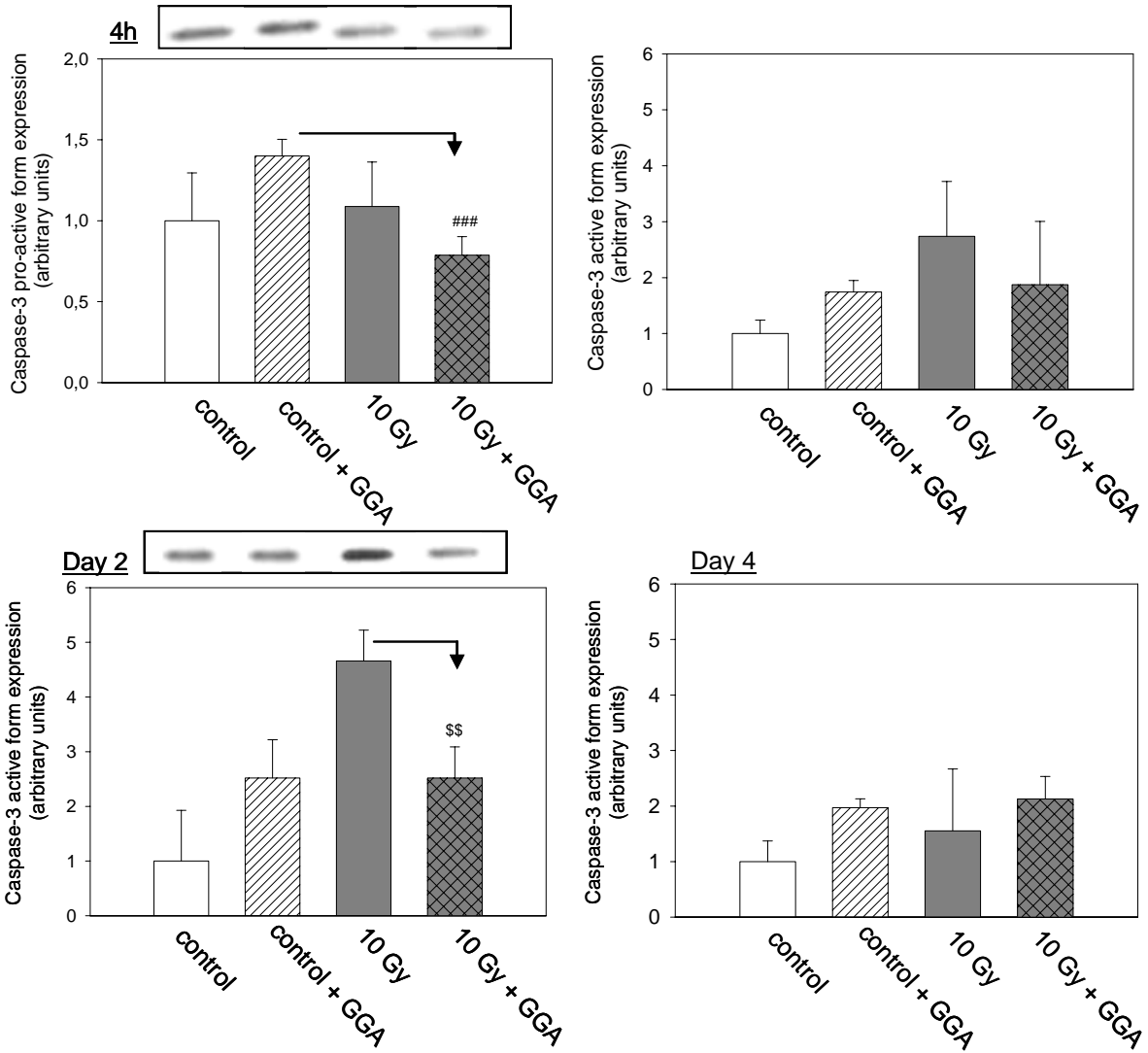


Figure 6

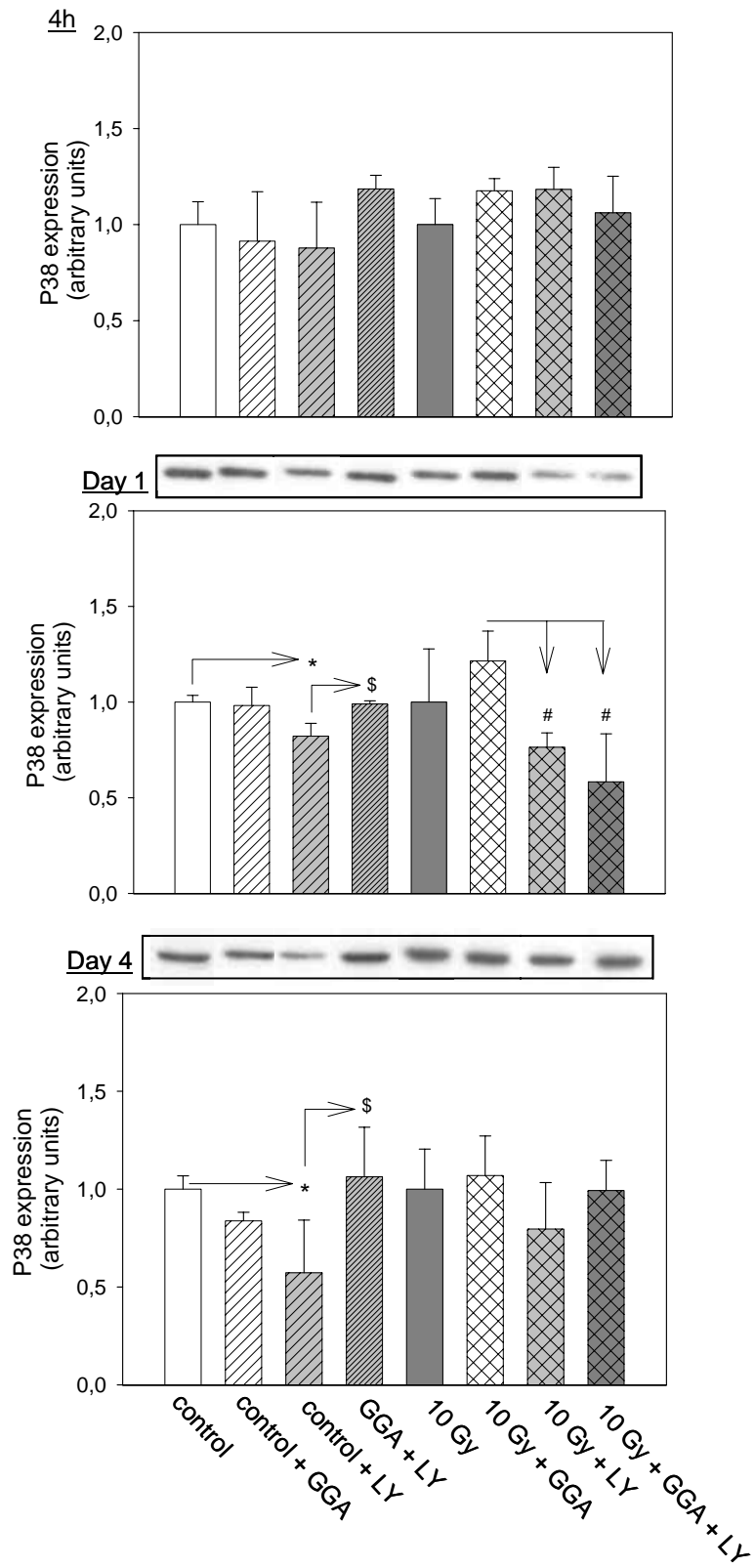
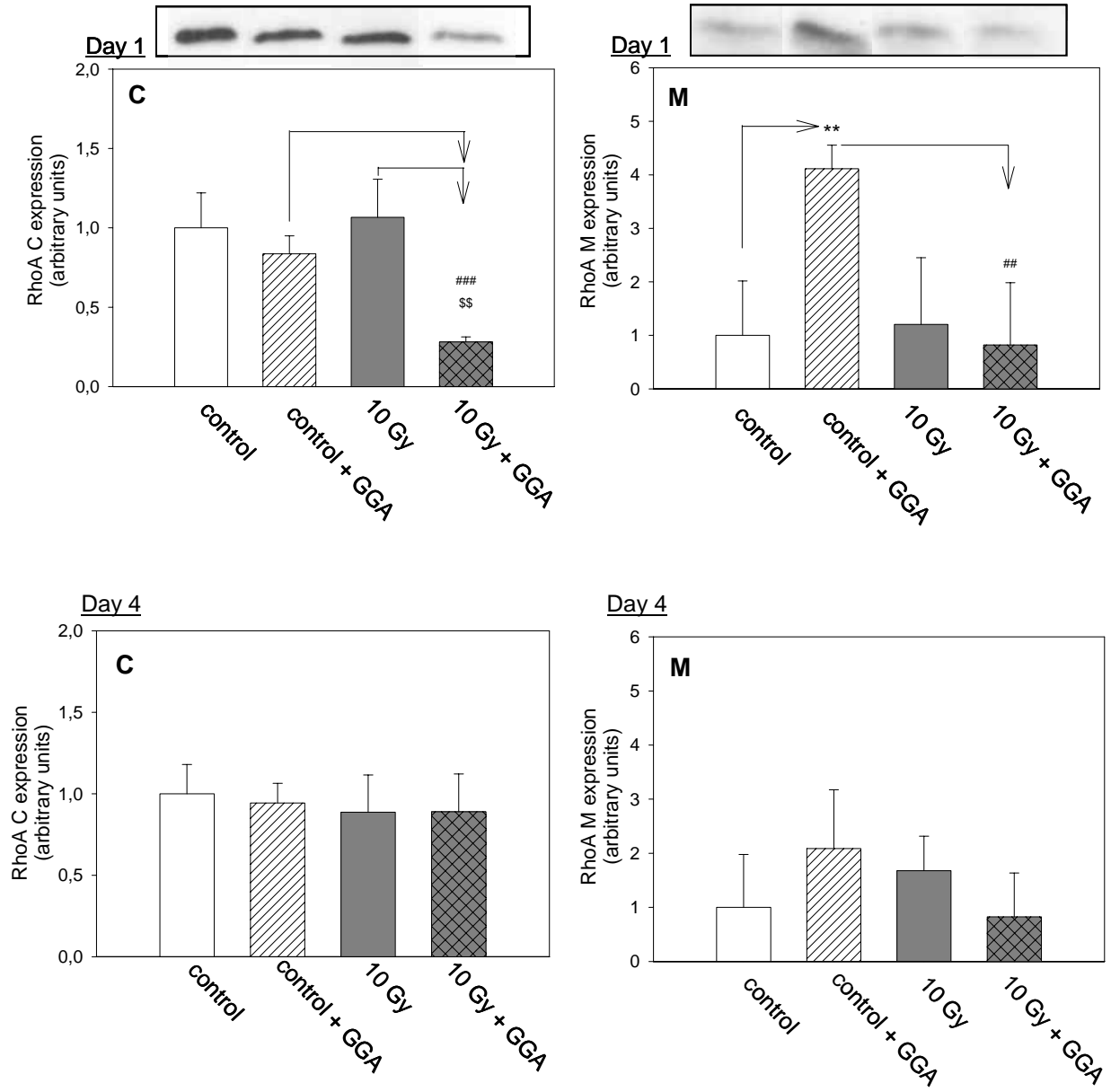


Figure 7



References

- Ader I, Toulas C, Dalenc F, Delmas C, Bonnet J, Cohen-Jonathan E, *et al* (2002). RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* **21**:5998-6006.
- Behrends U, Peter RU, Hintermeier-Knabe R, Eissner G, Holler E, Bornkamm GW, *et al* (1994). Ionizing radiation induces human intercellular adhesion molecule-1 in vitro. *J Invest Dermatol* **103**:726-730.
- Bourgier C, Haydont V, Milliat F, Francois A, Holler V, Lasser P, *et al* (2005). Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* **54**:336-343.
- Choi SY, Kim MJ, Kang CM, Bae S, Cho CK, Soh JW, *et al* (2006). Activation of Bak and Bax through c-abl-protein kinase Cdelta-p38 MAPK signaling in response to ionizing radiation in human non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* **281**:7049-59.
- Coulombe PA (1997). Towards a molecular definition of keratinocyte activation after acute injury to stratified epithelia. *Biochem Biophys Res Commun* **236**:231-238.
- Desai LP, Aryal AM, Ceacareanu B, Hassid A, Waters CM (2004). RhoA and Rac1 are both required for efficient wound closure of airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**:L1134-1144.
- Ehrenreiter K, Piazzolla D, Velamoor V, Sobczak I, Small JV, Takeda J, *et al* (2005). Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol* **168**:955-964.
- Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M (2001). Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol* **116**:633-640.
- Fujiki M, Kobayashi H, Abe T, Ishii K (2003). Astroglial activation accompanies heat shock protein upregulation in rat brain following single oral dose of geranylgeranylacetone. *Brain Res* **991**:254-257.
- Harper EG, Alvares SM, Carter WG (2005). Wounding activates p38 map kinase and activation transcription factor 3 in leading keratinocytes. *J Cell Sci* **118**:3471-3485.
- Haydont V, Mathe D, Bourgier C, Abdelali J, Aigueperse J, Bourhis J, *et al* (2005). Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* **76**:219-225.
- Henry G, Li W, Garner W, Woodley DT (2003). Migration of human keratinocytes in plasma and serum and wound re-epithelialisation. *Lancet* **361**:574-576.
- Herlaar E, Brown Z (1999). p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* **5**:439-447.

- Hirakawa T, Rokutan K, Nikawa T, Kishi K (1996). Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* **111**:345-357.
- Hirota K, Nakamura H, Arai T, Ishii H, Bai J, Itoh T, *et al* (2000). Geranylgeranylacetone enhances expression of thioredoxin and suppresses ethanol-induced cytotoxicity in cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **275**:825-830.
- Hotchin NA, Hall A (1995). The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol* **131**:1857-1865.
- Ikeyama S, Kusumoto K, Miyake H, Rokutan K, Tashiro S (2001). A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranylgeranylacetone, suppresses apoptosis of cultured rat hepatocytes caused by hydrogen peroxide and ethanol. *J Hepatol* **35**:53-61.
- Ishii Y, Kwong JM, Caprioli J (2003). Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:1982-1992.
- Jaakkola P, Kontusaari S, Kauppi T, Maata A, Jalkanen M (1998). Wound reepithelialization activates a growth factor-responsive enhancer in migrating keratinocytes. *Faseb J* **12**:959-969.
- Kaminska B (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* **1754**:253-262.
- Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, *et al* (2005). Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:16801-16806.
- Kawai T, Teshima S, Kusumoto K, Kawahara T, Kondo K, Kishi K, *et al* (2000). A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranyl-geranyl-acetone, restores the heat shock response in gastric mucosa of protein-malnourished rats. *J Lab Clin Med* **136**:138-148.
- Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Tsuji S, Yabe I, Niino M, *et al* (2002). Effect of geranylgeranylacetone on cellular damage induced by proteasome inhibition in cultured spinal neurons. *J Neurosci Res* **69**:373-381.
- Komine M, Rao LS, Freedberg IM, Simon M, Milisavljevic V, Blumenberg M (2001). Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **116**:330-338.
- Kupper TS (1990). The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *J Invest Dermatol* **94**:146S-150S.

- Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* **275**:25665-25671.
- Li W, Henry G, Fan J, Bandyopadhyay B, Pang K, Garner W, *et al* (2004). Signals that initiate, augment, and provide directionality for human keratinocyte motility. *J Invest Dermatol* **123**:622-633.
- Li W, Nadelman C, Henry G, Fan J, Muellenhoff M, Medina E, *et al* (2001). The p38-MAPK/SAPK pathway is required for human keratinocyte migration on dermal collagen. *J Invest Dermatol* **117**:1601-1611.
- Masuda Y, Sumita S, Fujimura N, Namiki A (2003). Geranylgeranylacetone attenuates septic diaphragm dysfunction by induction of heat shock protein 70. *Crit Care Med* **31**:2585-2591.
- Mikuriya T, Sugahara K, Takemoto T, Tanaka K, Takeno K, Shimogori H, *et al* (2005). Geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, prevents acoustic injury in the guinea pig. *Brain Res* **1065**:107-114.
- Milia J, Teyssier F, Dalenc F, Ader I, Delmas C, Pradines A, *et al* (2005). Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ* **12**:492-501.
- Mitsui A, Hirakawa T, Yodoi J (1992). Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **186**:1220-1226.
- Oda H, Miyake H, Iwata T, Kusumoto K, Rokutan K, Tashiro S (2002). Geranylgeranylacetone suppresses inflammatory responses and improves survival after massive hepatectomy in rats. *J Gastrointest Surg* **6**:464-472; discussion 473.
- Ooie T, Takahashi N, Saikawa T, Nawata T, Arikawa M, Yamanaka K, *et al* (2001). Single oral dose of geranylgeranylacetone induces heat-shock protein 72 and renders protection against ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Circulation* **104**:1837-1843.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, *et al* (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**:153-183.
- Rokutan K (2000). Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol* **15** Suppl:D12-19.
- Ronfard V, Barrandon Y (2001). Migration of keratinocytes through tunnels of digested fibrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4504-4509.
- Santoro MM, Gaudino G (2005). Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res* **304**:274-286.

- Sharma GD, He J, Bazan HE (2003). p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem* **278**:21989-21997.
- Sivan V, Vozenin-Brotans MC, Tricaud Y, Lefaix JL, Cosset JM, Dubray B, *et al* (2002). Altered proliferation and differentiation of human epidermis in cases of skin fibrosis after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **53**:385-393.
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* **280**:38729-38739.
- Takano T, Tsutsumi S, Tomisato W, Hoshino T, Tsuchiya T, Mizushima T (2002). Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced apoptosis. *Dig Dis Sci* **47**:1546-1553.
- Tomic-Canic M, Komine M, Freedberg IM, Blumenberg M (1998). Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J Dermatol Sci* **17**:167-181.
- Tomisato W, Tsutsumi S, Tsuchiya T, Mizushima T (2001). Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced necrosis by induction of heat-shock proteins. *Biol Pharm Bull* **24**:887-891.
- Tsuruma T, Yagihashi A, Hirata K, Araya J, Katsuramaki T, Tarumi K, *et al* (2000). Induction of heat shock protein-70 (hsp-70) by intraarterial administration of geranylgeranylacetone. *Transplant Proc* **32**:1631-1633.
- Turchi L, Chassot AA, Bourget I, Baldescchi C, Ortonne JP, Meneguzzi G, *et al* (2003). Cross-talk between RhoGTPases and stress activated kinases for matrix metalloproteinase-9 induction in response to keratinocytes injury. *J Invest Dermatol* **121**:1291-1300.
- Zhang L, Deng M, Parthasarathy R, Wang L, Mongan M, Molkenin JD, *et al* (2005). MEKK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. *Mol Cell Biol* **25**:60-65.

Compléments

Résultats et illustrations du kératinocyte au cours de la phase de réépithélialisation, après irradiation aux RI

Dans une première partie, nous avons complété les résultats de l'article par une étude effet-dose de l'expression différentielle des cytokines (ratio de l'échantillon irradié versus contrôle), après exposition de 3, 5 et 10 Gy aux rayonnements ionisants (RI). Nous avons observé l'effet des RI sur leur relargage 4 heures, J1, J4 et J8 après exposition.

Nous avons évalué (i) la réponse pro-inflammatoire des NHEK par dosage des TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et de l'expression du marqueur de surface ICAM-1 ; (ii) la réponse pro-angiogénique par dosage du VEGF ; (iii) la dégradation matricielle par dosage de la MMP-1.

Dans une seconde partie, nous avons illustré le kératinocyte différencié, proliférant et activé par des marquages *in vitro* spécifiques (marqueurs K10, Ki-67 et K6 respectivement).

Les marquages immunofluorescents ont été réalisés sur monocouche de kératinocytes primaires NHEK 4 heures ou 4 jours après RI, et analysés en microscopie confocale.

Les marquages immunohistologiques de l'épiderme ont été réalisés sur des coupes de peau humaine congelées issues du tissu cutané d'un patient irradié 3 mois auparavant. Les doses de RI ont été estimées par analyse biodosimétrique des fibroblastes par la technique du PCC-FISH (Pouget *et al*, 2004).

I. Effet-dose *in vitro* du relargage de cytokines

Réponse pro-inflammatoire des NHEK post-irradiation

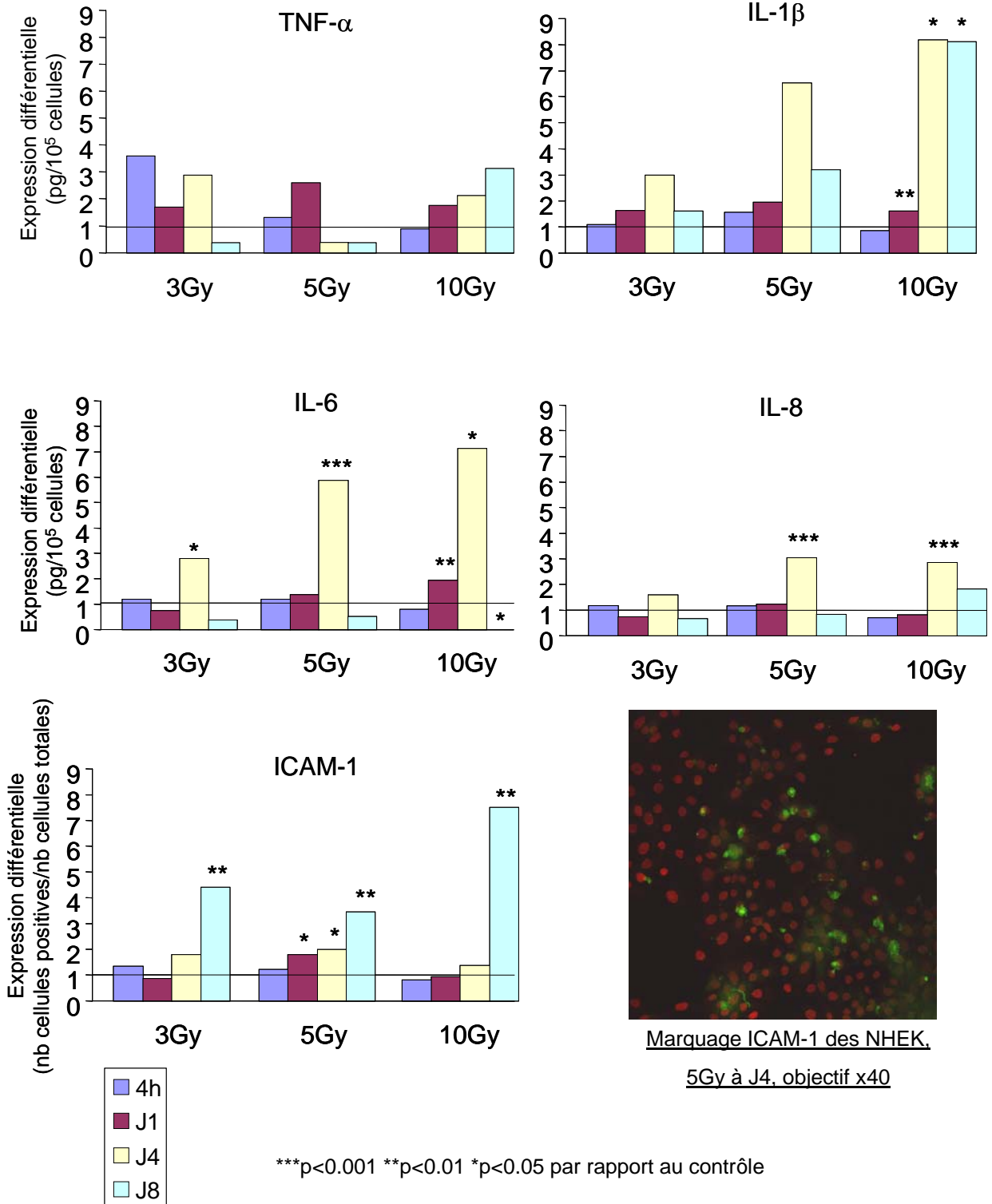


Figure 49

Réponse pro-angiogénique des NHEK post-irradiation

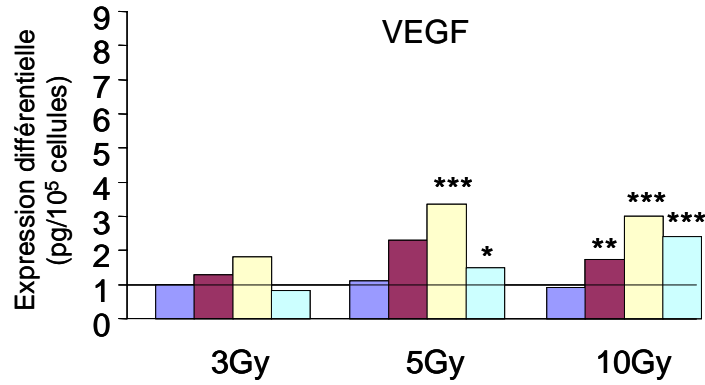
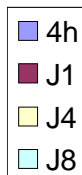
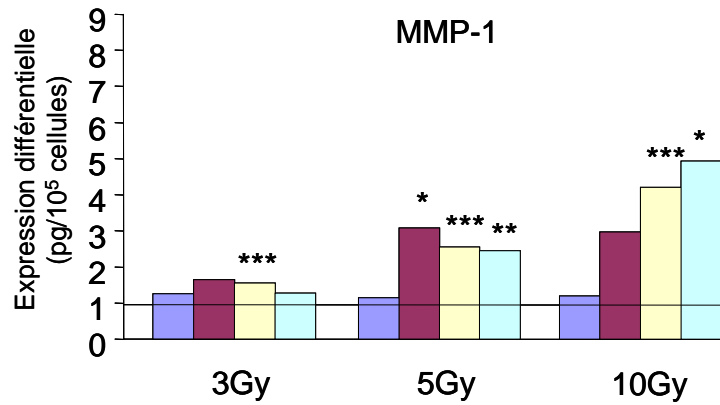


Figure 50

Dégradation matricielle des NHEK post-irradiation

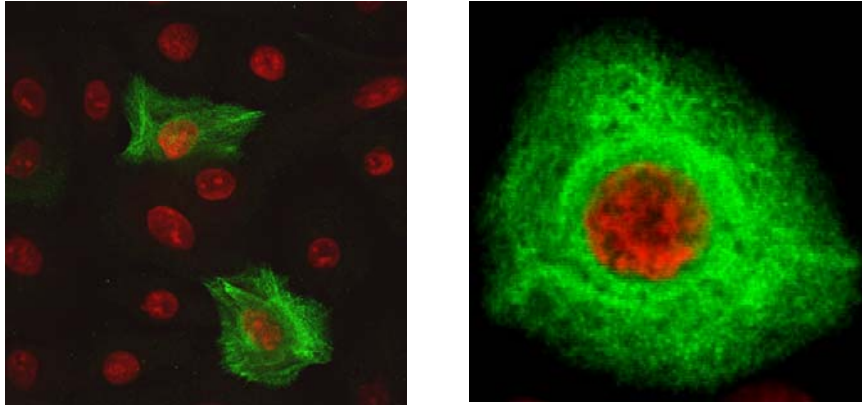


***p<0.001 **p<0.01 *p<0.05 par rapport au contrôle

Figure 51

II. Marquages *in vitro*

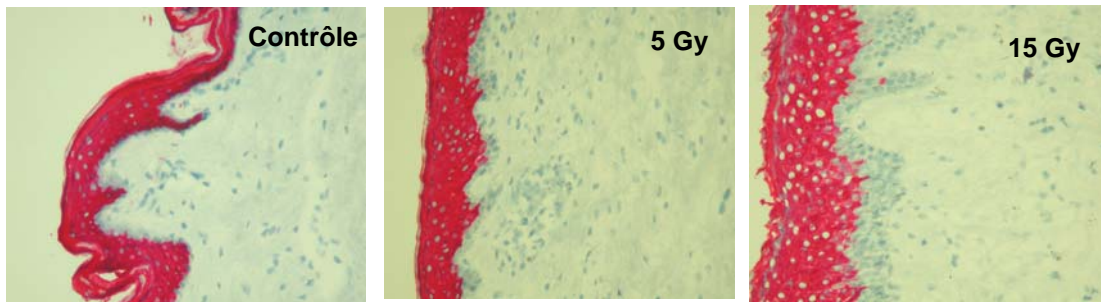
II.1. Marqueur spécifique de la différenciation des kératinocytes : kératine K10



Marquage K10 des NHEK

5Gy à J4, objectif x60

10Gy à 4h, objectif x60, zoom x3

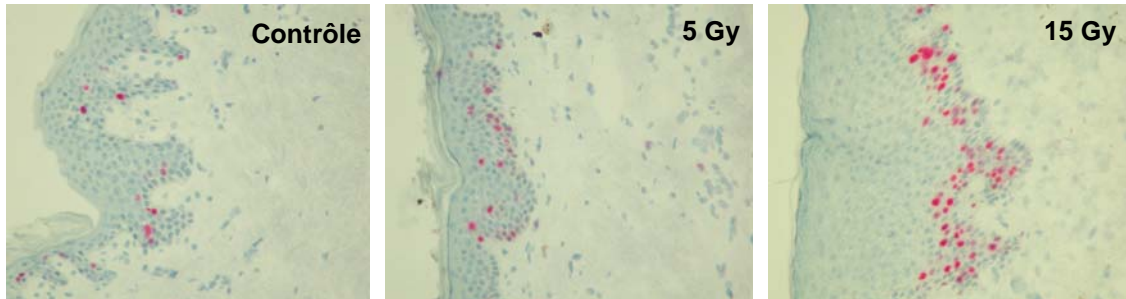


Marquage K10 des kératinocytes de l'épiderme humain

5 et 15Gy 3 mois post-irradiation, objectif x10

Figure 52

II.2. Marqueur spécifique de la prolifération des kératinocytes : Ki-67



Marquage Ki-67 des kératinocytes de l'épiderme humain
5 et 15Gy 3 mois post-irradiation, objectif x10

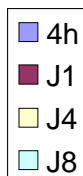
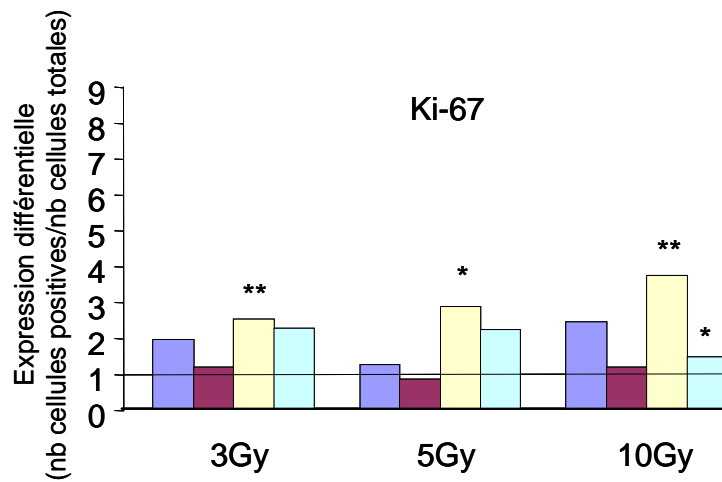
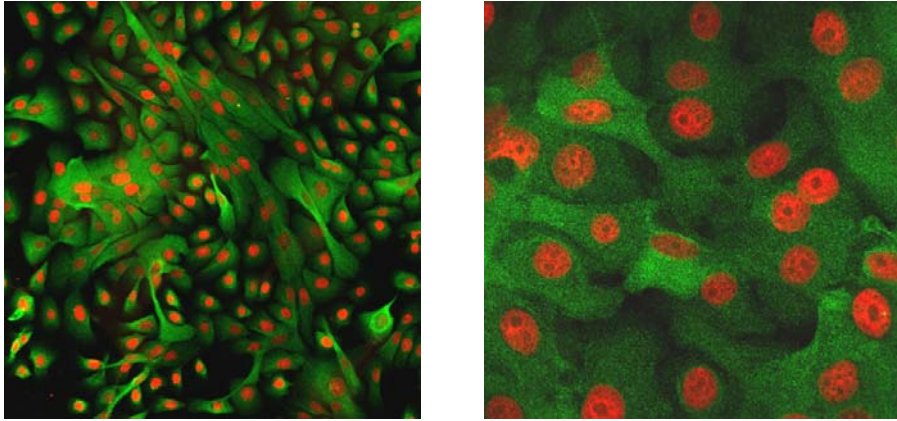


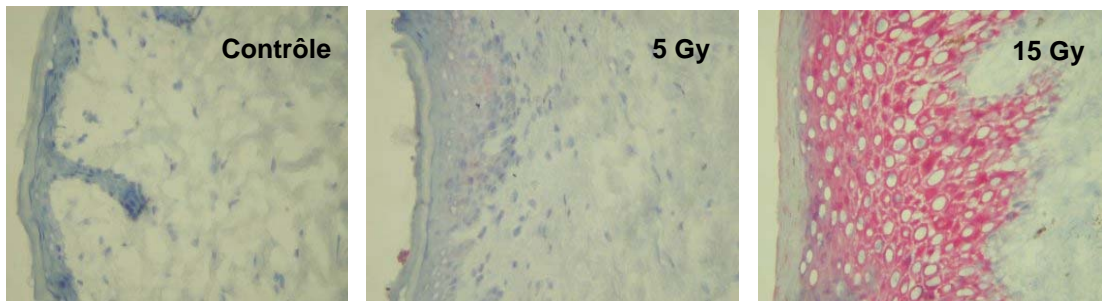
Figure 53

***p<0.001 **p<0.01 *p<0.05 par rapport au contrôle

II.3. Marqueur spécifique de l'activation des kératinocytes : kératine K6



Marquage K6 des NHEK
10Gy à 4h, objectifs x20, x60



Marquage K6 des kératinocytes de l'épiderme humain
5 et 15Gy 3 mois post-irradiation, objectif x10

Figure 54

Discussion Partie III

L'organisation et la composition des couches de l'épiderme permettent le maintien de son intégrité lorsqu'il est exposé à un stress. Sa fonction de barrière est principalement due à la couche cornée située à l'interface entre l'épiderme et l'environnement extérieur. Lorsque l'épiderme est endommagé, la réponse des kératinocytes se caractérise par leur activation au cours de la phase de réépithélialisation. Les kératinocytes basaux et suprabasaux situés au bord de la lésion migrent et prolifèrent, ils répondent aux cytokines pro-inflammatoires relarguées et expriment les kératines K6 et K16, afin de reconstituer l'épiderme (Coulombe, 1997). L'observation des dommages de l'épiderme après irradiation a révélé une hyperplasie de ce tissu due à une hyperprolifération et une différenciation anormales des kératinocytes, ainsi qu'une expression des kératines K6 et K16 (Sivan *et al*, 2002). L'étape de réépithélialisation radio-induite des kératinocytes reste cependant peu étudiée.

I. L'effet de l'irradiation sur la phase de réépithélialisation

Nous avons caractérisé l'activation des kératinocytes après irradiation aux RI par l'étude des facteurs pro-inflammatoires relargués, des kératines exprimées et de leur état de prolifération, dans un modèle de kératinocytes en monocouche « scrappés ». Nos résultats ont montré que différents types de cytokines sont relargués par ces kératinocytes jusqu'à 8 jours post-irradiation aux doses de 3, 5 et 10 Gy, tels que IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8 et ICAM-1. Seul ICAM-1 a été décrit comme induit après RI par les kératinocytes (Behrends *et al*, 1994). D'une part, une activation et une prolifération élevées des NHEK après irradiation a été montrée par rapport aux contrôles : l'expression de l'ARNm de K6 est augmentée jusqu'à 4 jours après RI de 10 Gy et celle de Ki-67 culmine 2 jours post-RI. Ceci a été confirmé par nos marquages K6 et Ki-67 des kératinocytes de peau humaine irradiée. Une forte augmentation de l'épaisseur de l'épiderme est observée ainsi qu'un important marquage des kératinocytes au K6 (toute la surface de l'épiderme) et Ki-67 (kératinocytes basaux). D'autre part, après RI, nous n'avons montré aucune différence d'expression de l'ARNm de K10, marqueur de la différenciation, comme décrit par l'équipe de Sivan *et al* après marquage immunohistologique de K10 (Sivan *et al*, 2002). Après avoir observé la différenciation, nous avons caractérisé les effets de l'irradiation sur la survie des kératinocytes en réalisant des tests de clonogénicité. Les données obtenues ont montré une augmentation dose-dépendante et importante de la mort cellulaire radio-induite jusqu'à la dose de 10 Gy.

II. L'effet bénéfique du GGA sur la phase de réépithélialisation dans des conditions d'irradiation et de non-irradiation

Après avoir mis en évidence l'action délétère des RI sur l'activation des kératinocytes durant le processus de réépithélialisation dans notre modèle expérimental, nous avons observé l'effet bénéfique d'un traitement au GGA sur cette étape. Nous avons montré précédemment que ce traitement avait des propriétés anti-oxydantes sur la peau. Dans des conditions de non-irradiation, le GGA a été décrit récemment comme inhibant l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires (Nakada *et al*, 2005) comme le TNF- α après dommages au cerveau ou inflammation du colon (Fujiki *et al*, 2005 ; Ohkawara *et al*, 2005) et l'IL-6 après atteinte du foie (Oda *et al*, 2002). Nos expériences ont montré qu'après irradiation, le GGA provoque une augmentation du niveau d'IL-1 β produit par les NHEK irradiés. L'IL-1 étant décrit comme l'initiateur principal du processus d'activation caractérisé par l'augmentation des kératinocytes marqués au K6 (Komine *et al*, 2001), le GGA accentuerait ce processus indispensable à la réépithélialisation. Les kératinocytes activés sont définis comme migratoires et prolifératifs (Freedberg *et al*, 2001). Nous nous sommes intéressés à l'effet du GGA sur ces propriétés. Nous avons observé que la migration des NHEK irradiés dans la zone « scarpée » est accélérée par le traitement au GGA dès 24 heures, sans modulation de leur prolifération. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Watanabe *et al* démontrant que le GGA accélère la migration des cellules épithéliales gastriques de lapin en culture après lésion (Watanabe *et al*, 1998). Nous avons également évalué l'action du GGA sur la mort radio-induite des NHEK par calcul de la fraction de survie. Le GGA a montré une augmentation significative de cette fraction après RI. Cette protection contre la mort cellulaire a été décrite dans une lignée de cellules issues de neuroblastome humain (Katsuno *et al*, 2005) et dans des cellules de muqueuse gastrique de porc (Tomisato *et al*, 2001 ; Takano *et al*, 2002).

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, nous avons mis en évidence les propriétés bénéfiques d'un traitement au GGA sur l'augmentation (i) du relargage de l'IL-1 initiant l'activation des kératinocytes, (ii) de la migration des kératinocytes dans la zone lésée (iii) de la survie des kératinocytes au cours de l'étape de réépithélialisation après RI. Ces propriétés intéressantes font du GGA une molécule pro-cicatrisante au cours de la phase de réépithélialisation.

III. Le mécanisme d'action du GGA au cours de la réépithélialisation

Le GGA ayant montré des propriétés pro-cicatrisantes, nous avons étudié son mode d'action par analyse de son pouvoir anti-apoptotique et migratoire au cours de la phase de réépithélialisation des kératinocytes.

III.1. L'effet anti-apoptotique du GGA sur les kératinocytes

Dans le but de comprendre le mécanisme d'action du GGA, nous avons évalué son pouvoir anti-apoptotique sur notre modèle par l'observation de l'expression des facteurs anti-apoptotiques Hsp70 et pro-apoptotiques caspase-3 dans les kératinocytes. Le couple des protéines Hsp70/caspase-3 est connu pour réguler l'entrée en apoptose des cellules. L'induction d'Hsp70, dans le processus apoptotique dépendant de la mitochondrie, est décrite comme bloquant la translocation de Bax et l'activation de la caspase-3, sans inhiber la libération de cytochrome C (Stankiewicz *et al*, 2005 ; Li *et al*, 2000). Le GGA a été décrit comme un inhibiteur de l'activité de la caspase-3 après induction de l'Hsp70 dans des hépatocytes de rat (Ikeyama *et al*, 2001). Le GGA pourrait inhiber l'apoptose induite par H₂O₂ et l'éthanol dans les hépatocytes à de nombreux niveaux : (i) activation de HSF1 et accumulation d'Hsp70 ; (ii) inhibition par Hsp70 de l'activation de JNK et P38 diminuant l'efflux de cytochrome c de la mitochondrie et inhibant la cascade de caspases -9 et -3 (Gabai *et al*, 1997; Mosser *et al*, 1997) ; (iii) induction de l'association d'Hsp70 avec « apoptosis protease activating factor-1 » Apaf-1. Hsp70 interférerait alors au niveau de la liaison d'Apaf-1 et de la procaspase-9, empêchant la formation du complexe apoptosome (Apaf-1 – procaspase-9) crucial pour activer la caspase-3 (Beere *et al*, 2000; Saleh *et al*, 2000).

Nous avons observé une forte induction d'Hsp70 dans des conditions de non-irradiation, 4 heures après « scrapping ». De nombreuses études ont décrit le GGA comme un fort inducteur d'Hsp70 dans plusieurs organes (Mikuriya *et al*, 2005; Masuda *et al*, 2003; Fujiki *et al*, 2003; Hirota *et al*, 2000; Ishii *et al*, 2003; Oda *et al*, 2002; Kikuchi *et al*, 2002; Ooie *et al*, 2001; Tsuruma *et al*, 2000). En effet, ce traitement induirait la translocation nucléaire et la phosphorylation des facteurs de transcription HSF1 (Rokutan, 2000 ; Kawai *et al*, 2000) qui se lie de manière transitoire aux « heat shock element » (HSE) (Jolly *et al*, 1997 ; Wu, 1995). Les HSE sont des éléments de réponse du promoteur, essentiels pour l'induction de l'Hsp après un stress et HSF1 a été identifié comme le régulateur principal de l'induction à court terme des Hsp (Snoeckx *et al*, 2001; Baler *et al*, 1993; Abravaya *et al*, 1992).

L'expression des ARNm Hsp70 et l'accumulation de la protéine est alors augmentée dans les cellules après traitement au GGA (Hirakawa *et al*, 1996).

En revanche, 4 heures post-RI, nous avons observé une diminution de l'activité d'Hsp70 ainsi que de celle de caspase-3. Il a pourtant été décrit que Hsp70 est une protéine fortement induite après exposition aux RI, en partie suite à la production importante d'ERO (Santoro, 2000). L'induction d'Hsp70 est impliquée dans la réponse radio-adaptative (Park *et al*, 2000) en protégeant les cellules de la mort radio-induite (Lee *et al*, 2001). Hsp70 se lie alors à p53 afin de réguler le cycle cellulaire, les processus de réparation de l'ADN et d'apoptose (Calini *et al*, 2003 ; Matsumoto *et al*, 1995). La caspase-3 est aussi une enzyme clé de l'apoptose. Elle est rapidement activée après RI (Michelin *et al*, 2004 ; Shinomiya, 2001). « Second mitochondrial activator of caspase » (Smac), un inhibiteur des IAPs, induirait l'activation de la caspase-3 et la libération de cytochrome c après RI (Giagkousiklidis *et al*, 2005).

Nous pouvons interpréter que le faible niveau d'Hsp70 radio-induit que nous avons observé est la conséquence d'une balance entre les gènes pro- et anti-apoptotiques. L'expression de la thioredoxine (Trx), facteur anti-apoptotique, pourrait être augmentée en parallèle. En effet, l'expression de la Trx et de son ARNm a été décrite comme augmentée après traitement d'hépatocytes avec du GGA par modulation des gènes AP-1 et NF- κ B (Hirota *et al*, 2000). De plus, l'activité chaperonne de la Trx est apparentée à celle des Hsp (Mitsui *et al*, 1992).

➤ Il serait alors intéressant, dans la suite de notre travail, d'étudier l'effet du GGA sur l'expression de la Trx au niveau des kératinocytes. En effet, le GGA a été décrit comme ayant un effet anti-apoptotique mais aussi régulateur de l'état redox cellulaire par induction de la Trx. Ces propriétés ont été démontrées au niveau de la rétine de souris, des hépatocytes et de la muqueuse gastrique de rat (Tanito *et al*, 2005 ; Bai *et al*, 2002 ; Dekigai *et al*, 2001 ; Hirota *et al*, 2000). La Trx est une petite protéine ubiquitaire qui contient un site catalytique composé d'un motif actif avec deux cystéines pour la régulation de l'état redox. Elle possède différentes fonctions cellulaires telles que l'élimination des ERO, l'activation de facteurs de transcription et la régulation de la voie apoptotique intracellulaire (Hirota *et al*, 1999 ; Saitoh *et al*, 1998). Son expression est augmentée en réponse au stress oxydatif, aux cytokines inflammatoires, et après irradiation aux rayons UV et gamma (Takagi *et al*, 1999 ; Nakamura *et al*, 1997). Les taux de Trx dans le cytosol ont été décrits comme augmentés suite à la forte production de H₂O₂ après exposition des kératinocytes aux UVB. De forts taux de Trx migrent alors du cytosol dans le noyau afin que la peau soit détoxifiée contre ces dommages peroxydatifs (Schallreuter and Wood, 2001).

De ce fait, l'effet du GGA sur l'induction du stress oxydatif, après irradiation des kératinocytes, pourrait être une voie à explorer.

➤ Cette étude pourrait être également approfondie par l'évaluation de l'effet anti-apoptotique du GGA sur les kératinocytes à plusieurs niveaux. Tout d'abord, nous pourrions envisager l'étude de l'action du GGA sur l'inhibition de la phosphorylation de JNK et de la formation de l'apoptosome (Apaf-1 – procaspase-9), empêchant ainsi l'activation de la caspase-3.

Le GGA a été décrit comme ayant un effet pro-apoptotique controversé sur les cellules cancéreuses. En effet, le traitement au GGA a été expérimenté sur des cellules cancéreuses et son mode d'action diffère de celui des cellules saines. En effet, contrairement à son effet sur les cellules saines, le GGA a été décrit comme provoquant l'apoptose des cellules humaines leucémiques HL-60 en fonction de la dose et du temps de traitement, dans le but de prévenir une invasion de cellules tumorales. Le GGA activerait fortement l'activité de la caspase-3 dans ces cellules, et modifierait la maturation et la localisation de Rap1 et Ras, membres des petites protéines liées au GTP (Okada *et al*, 1999). De plus, dans ces cellules, le GGA entrerait en compétition avec le geranylgeranylpyrophosphate (GGPP) et induirait la dépolarisation des membranes mitochondriales sans relargage de cytochrome c (Kanno *et al*, 2002).

III.2. L'effet pro-migratoire du GGA sur les kératinocytes

Deux voies de signalisation ont été mises en évidence lors de la migration des kératinocytes au cours de la réépithélisation après lésion cutanée : P38 MAPK et RhoA. Elles sont toutes deux impliquées dans la migration des kératinocytes et le remodelage matriciel en régulant l'induction de MMP-9 ou gélatinase B. Rac1 et Cdc42 contrôlent l'activation de P38 MAPK tandis que l'activation de RhoA stimule JNK (Turchi *et al*, 2003). De plus, l'activation des voies RhoA-MEKK1-JNK et MEKK1-P38 par TGF- β /activines est cruciale pour la formation des fibres de stress et la migration des kératinocytes primaires de souris (Zhang *et al*, 2005). Ces deux voies restent cependant très peu étudiées après RI. Nous nous sommes donc intéressés à déterminer les bienfaits d'un traitement au GGA sur la migration des NHEK irradiés ou non après « scrapping ».

III.2.1. L'implication de la voie P38 MAPK

Nos résultats ont montré pour la première fois que dans des conditions de non-irradiation, J1 et J4 après « scrapping », le GGA a restauré l'expression de P38 que nous avons précédemment inhibée avec le LY333351, un inhibiteur spécifique de P38 MAPK. Nous

montrons que le GGA lève l'inhibition de P38 afin de favoriser la migration des kératinocytes dans la zone lésée. Il a été démontré que le relargage de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et MMP-1 active la voie des MAPK afin d'attirer les leucocytes sur le site endommagé. La stimulation des leucocytes va alors activer P38 favorisant l'adhésion et la migration des cellules (Kaminska, 2005; Herlaar and Brown, 1999). De plus, l'inhibition de P38 altère la migration des kératinocytes dans un modèle cicatriciel *in vitro* montrant que P38 est essentiel durant la réépithélialisation (Stoll *et al*, 2003).

En revanche, après RI, nous n'avons pas observé d'effet du GGA sur l'expression de la protéine P38, malgré l'inhibition induite par le LY333351 à J1 et J4. Nos résultats n'ayant pas permis de vérifier l'induction de P38 après RI, nous supposons que la forme phosphorylée P-P38 spécifique pourrait être particulièrement activée, comme l'a décrit Choi *et al* (Choi *et al*, 2006). En effet, cette équipe a montré qu'après RI, aucune modification de l'expression de la protéine P38 n'a été déterminée, en revanche, une activation de la forme phosphorylée P-P38 a été observée. De plus, P-P38 a été décrit comme un inducteur de la migration des kératinocytes au cours de la cicatrisation (Harper *et al*, 2005) et des cellules épithéliales de la cornée (Sharma *et al*, 2003). Son activation est diphasique : une induction immédiate puis une deuxième prolongée. P38 est activé par une double phosphorylation de la Thr180 et de la Tyr182 avec un motif Thr-Gly-Tyr, par la protéine kinase C (PKC) et le récepteur de la tyrosine kinase (Raingeaud *et al*, 1995) après RI. Les MAPK MKK3, MKK4 et 6 phosphorylent et activent également P38 après relargage de cytokines pro-inflammatoires et stress environnementaux (Pearson *et al*, 2001 ; Raingeaud *et al*, 1996).

➤ Il serait donc intéressant de compléter ce travail par l'analyse de l'expression de la forme phosphorylée P-P38 après RI dans nos conditions.

➤ Nous avons montré que non seulement P38 MAPK est impliquée dans l'induction de la migration des kératinocytes, mais cette protéine a été décrite comme pouvant aussi réguler la différenciation cellulaire. En effet, les trois isoformes de P38 α , β et majoritairement δ , exprimés dans les kératinocytes, jouent le rôle de régulateurs de leur différenciation (Efimova *et al*, 2003 ; Sayama *et al*, 2001). Ces résultats ont été confirmés par l'augmentation de l'activation de la cascade P38 δ -ERK suite à des traitements avec divers agents provoquant la différenciation du kératinocyte (Eckert *et al*, 2004). Il pourrait être envisagé d'étudier le rôle de cette voie de signalisation sur la différenciation des kératinocytes durant l'étape de réépithélialisation.

III.2.2. L'implication de la voie RhoA

Le rôle des protéines Rho dans la cicatrisation est mal connu et le mode d'action du GGA impliquant cette voie n'a jamais été étudié au niveau des kératinocytes.

Nous avons démontré que le GGA peut agir dans des conditions de non-irradiation sur l'activation de la voie RhoA, elle aussi impliquée dans la migration des kératinocytes. Dans nos conditions expérimentales sans irradiation, nous avons observé que le GGA active RhoA 24 heures après « scrapping ». En effet, le GGA provoque une diminution de l'expression de RhoA cytosolique tout en augmentant de 4 fois celle de la fraction membranaire par rapport au contrôle. Cette activation se caractérise par la translocation de RhoA-GDP du cytosol vers la membrane plasmique sous forme RhoA-GTP, après isoprénylation. Nous avons observé un effet bénéfique du GGA sur l'activation de RhoA dans des conditions de non-irradiation.

En revanche, dans des conditions d'irradiation, 24 heures après RI, le traitement au GGA provoque une forte diminution de l'expression de RhoA cytosolique (3 à 4 fois par rapport au contrôle irradié) sans modification de celle de la fraction membranaire. Enfin, l'expression de RhoA n'est pas modulée à J4 quelque soit le traitement et les conditions d'irradiation. Nous avons donc constaté qu'après RI, dans nos conditions expérimentales, le GGA a perdu son effet bénéfique sur la translocation de RhoA à la membrane et donc son activation. Le GGA pourrait en effet interagir avec les rayons γ de manière délétère, et plus précisément cette association pourrait affecter les mécanismes d'ancrage de RhoA à la membrane.

Cependant, la voie Rho a été récemment décrite comme impliquée dans les processus de fibrose et de différenciation radio-induits au niveau des cellules musculaires lisses de l'intestin. L'inhibition de l'activité de la Rho kinase serait proposée comme un nouveau traitement des complications radio-induites (Bourgier *et al*, 2005 ; Haydont *et al*, 2005). De plus, la protéine RhoB est définie comme un médiateur de la résistance cellulaire aux RI en empêchant la mort cellulaire des lignées de fibroblastes NIH3T3 et kératinocytes HeLa (Milia *et al*, 2005 ; Ader *et al*, 2002).

➤ Afin d'élargir notre étude, il serait intéressant d'étudier l'effet du GGA sur les différents membres de la famille Rho (RhoB, RhoC, Rac1).

Le GGA a été décrit également comme ayant un potentiel anti-invasif sur les cellules cancéreuses de carcinome ovarien. Le traitement de ces cellules avec du GGA résulte en une inactivation de Rho par suppression de la geranylgeranylation (Hashimoto *et al*, 2005).

IV. Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons démontré que les RI perturbent la phase de réépithélialisation au cours de la cicatrisation. Après RI, les kératinocytes deviennent activés et hyperproliférants, et l'épiderme se trouve épaissi et inflammé comparés aux contrôles.

Le GGA a montré un effet bénéfique sur cette activation. En effet, ce traitement augmente le relargage de l'IL-1 qui initie le processus d'activation du kératinocyte, qui devient alors migratoire par réorganisation de ses kératines afin de recoloniser la zone lésée. De plus, le GGA augmente la survie des kératinocytes après irradiation.

Par ailleurs, nos résultats ont mis en évidence pour la première fois que le GGA accélère la réépithélialisation des kératinocytes au niveau de la zone « scrapée ». Notre travail a permis d'analyser certains mécanismes d'action du GGA sur les kératinocytes, permettant d'expliquer son effet bénéfique sur la réépithélialisation.

Dans des conditions de non-irradiation, le GGA a montré qu'il peut avoir un effet anti-apoptotique sur les NHEK, par induction de la voie Hsp70 – caspase-3, mais aussi un pouvoir migratoire par activation des protéines GTPases P38 MAPK et RhoA. En revanche, dans des conditions d'irradiation, le mécanisme d'action du GGA ne passe ni par la voie Hsp70 ni par les voies P38 MAPK et RhoA. Nous avons montré son effet anti-apoptotique via l'activation de la caspase-3.

Discussion générale & Perspectives

Conclusion générale

Il existe actuellement peu de données sur le stress oxydatif radio-induit et ses dommages sur la peau exposée aux RI. Les effets des RI sur le processus de cicatrisation cutanée sont également peu connus.

Ce travail contribue à apporter un nouvel éclairage sur les conséquences des RI sur la peau, principalement sur l'épiderme. Il permet une meilleure compréhension des dommages cutanés radio-induits, en terme d'atteinte oxydative et tissulaire, et propose une modulation pharmacologique efficace sur la réépithélialisation des kératinocytes par le GGA. Son mode d'action sur la peau, inconnu jusqu'à maintenant, a été observé dans un contexte physiologique et « pathologique » (après RI) de cicatrisation, par étude des voies de l'apoptose et de la migration des kératinocytes.

Ce travail est synthétisé dans le schéma suivant (Figure 55) :

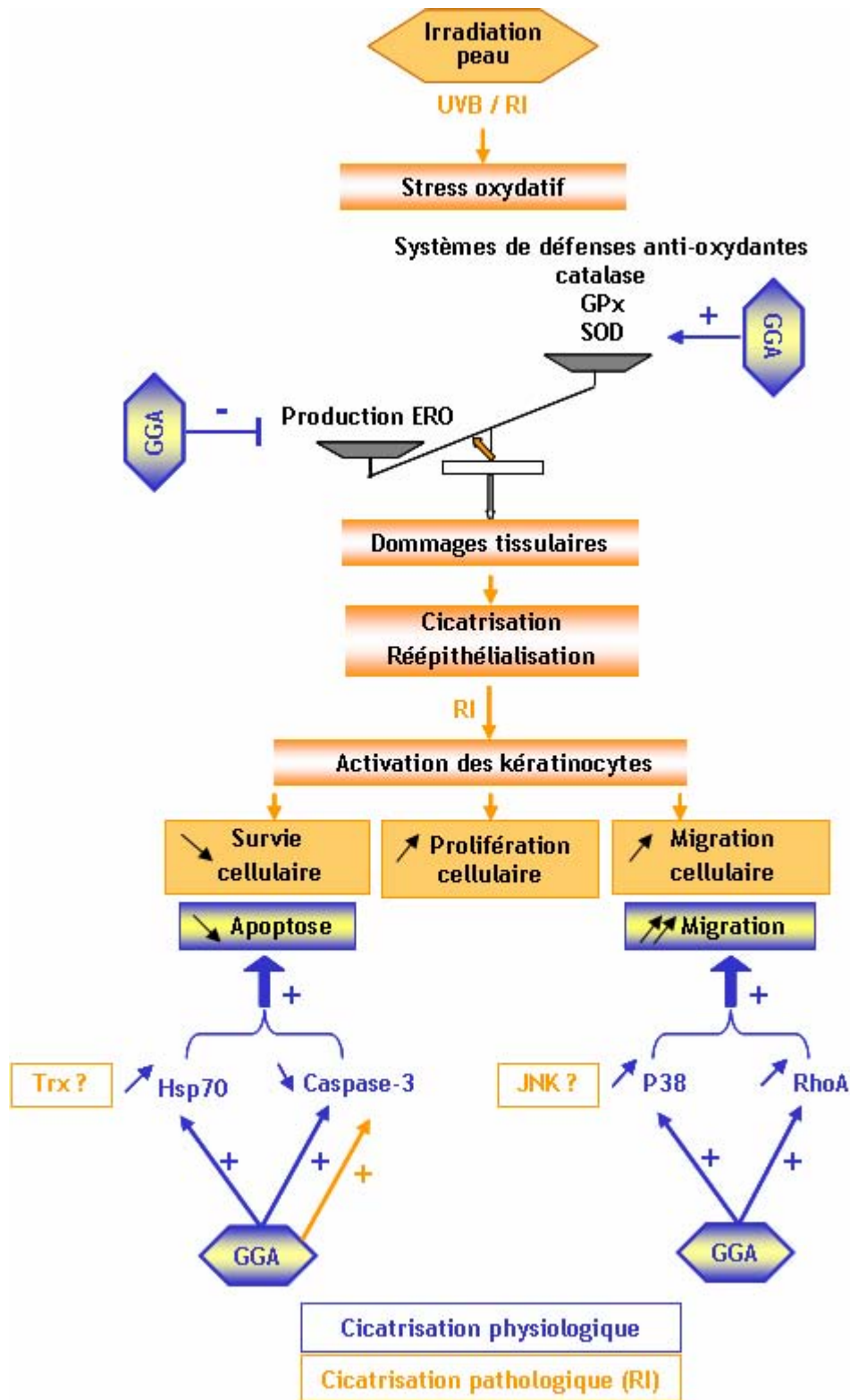


Figure 55 : Le stress oxydatif et les dommages tissulaires après RI sur la peau et l'effet bénéfique du GGA sur la réépithélialisation dans un contexte de cicatrisation physiologique et pathologique

Les dommages des RI sur la peau et la voie empruntée par le GGA dans des conditions de cicatrisation « pathologique » sont illustrés en orange. Les voies empruntées par le GGA dans des conditions de cicatrisation physiologique sont illustrées en bleu.

Nous avons vérifié dans un premier temps qu'après RI et UVB le profil des ERO générées dans la peau est différent, aussi bien en terme de quantité que de qualité. Une exposition de la peau à ces deux types de rayonnements provoque une importante production d'ERO et une modulation de l'induction des enzymes anti-oxydantes telles que la catalase, la GPx et la SOD, ce qui perturbe l'homéostasie cutanée. En effet, l'homéostasie tissulaire dépend de l'équilibre entre la quantité d'ERO générés et la capacité de détoxification des systèmes de défenses anti-oxydantes. Si la quantité d'ERO produite dépasse la capacité anti-oxydante de la peau, un stress oxydatif est alors induit. Nous avons montré que le GGA possède un pouvoir anti-oxydant significatif et un effet protecteur vis-à-vis du stress oxydatif : il diminue cette forte production d'ERO et améliore l'activité anti-oxydante de la catalase.

Nous avons ensuite mis en évidence l'existence d'un lien entre le stress oxydatif radio-induit et la mort par apoptose des kératinocytes de l'explant de peau humaine après RI. En effet, dans notre étude, l'apoptose est en partie dépendante de la production d'ERO, qui varie en fonction du type de kératinocyte NHEK ou HaCaT. Enfin, la différence de radiosensibilité que nous avons observée entre les NHEK et les HaCaT pourrait s'expliquer par leur réponse anti-oxydante différentielle.

Nous avons montré dans un deuxième temps que les RI interfèrent avec le processus de réépithélialisation des kératinocytes au cours de la cicatrisation. On peut parler de cicatrisation « pathologique » du tissu cutané irradié. Dans nos conditions expérimentales, les RI induisent l'activation des kératinocytes qui acquièrent un potentiel pro-inflammatoire, hyperprolifératif et migratoire. En effet, le relargage de cytokines pro-inflammatoires est augmenté, particulièrement celui de l'IL-1 β , initiateur de l'état activé du kératinocyte, la prolifération et la migration des kératinocytes sont induites. De plus, la survie cellulaire est diminuée. Nous avons prouvé que le traitement pharmacologique avec le GGA est bénéfique sur la réépithélialisation après RI: il active le relargage de l'IL-1 β , il stimule et accélère la migration des kératinocytes et améliore leur survie.

Le GGA ayant montré des propriétés pro-cicatrisantes, nous avons étudié par la suite son mécanisme d'action dans un contexte de cicatrisation physiologique et « pathologique ». Pour cela, nous avons analysé son pouvoir anti-apoptotique et pro-migratoire au cours de la réépithélialisation cutanée. Dans un contexte physiologique, le GGA possède un effet anti-apoptotique par induction de la voie Hsp70 – caspase-3, mais aussi pro-migratoire par activation des GTPases P38 et RhoA. La modulation pharmacologique du GGA suggère que la cicatrisation « pathologique » du tissu cutané après RI pourrait s'expliquer par un défaut d'implication des voies Hsp70, P38 et RhoA. La voie de la caspase-3 est cependant activée.

Enfin, il est fondamental d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'action du GGA, en suggérant que d'autres voies sont impliquées dans des conditions pathologiques d'irradiation du tissu cutané. Le GGA pourrait servir de moyen thérapeutique favorisant la cicatrisation de l'épiderme cutané.

Perspectives

Pour mener à bien ce travail, il serait particulièrement intéressant d'explorer d'autres voies de signalisation après un traitement au GGA au niveau des kératinocytes, aussi bien dans des conditions de cicatrisation physiologiques que pathologiques.

Comme nous l'avons précédemment évoqué, il serait intéressant tout d'abord d'étudier l'effet du GGA sur l'expression de la Trx au niveau des kératinocytes. La Trx participe à l'élimination des ERO et régule la voie apoptotique intracellulaire, et son activité chaperonne est apparentée à celle des Hsp. De ce fait, l'effet du GGA sur l'induction du stress oxydatif et l'étude de son mode d'action par la voie anti-apoptotique après RI pourrait être approfondi. De plus, nous pourrions envisager l'étude de l'action anti-apoptotique du GGA sur la formation de l'apoptosome (Apaf-1 – procaspase-9), empêchant ainsi l'activation de la caspase-3.

Concernant l'effet pro-migratoire du GGA après RI, la voie JNK mériterait d'être explorée, tout comme l'activation des différents membres de la famille des protéines Rho : RhoB, RhoC, Rac1.

Afin de compléter ce travail réalisé *in vitro* sur la réépithélialisation cutanée après irradiation, nous pourrions évaluer l'effet des RI sur un modèle *in vivo* d'expérimentations animales. Dans le but d'approfondir les mécanismes de la cicatrisation cutanée « pathologique » après RI, nous pourrions utiliser des souris knock-out JunB *-/-*. En effet, ces souris ont été décrites comme ayant une cicatrisation retardée et une hyperprolifération épidermique (Florin *et al*, 2006). Les RI ont été montrés comme induisant le blocage de la voie JNK dans des fibroblastes humains. L'étude de la modulation de JunB pourrait alors être envisagée (Cho *et al*, 2005).

D'autre part, dans le but de déterminer les mécanismes de stimulation de la migration et de la prolifération des kératinocytes, il serait intéressant d'utiliser un modèle de co-cultures

kératinocytes/fibroblastes irradiés. Cette approche expérimentale nous permettrait de mettre en évidence si les fibroblastes irradiés modulent de façon directe la capacité de migration et de prolifération des kératinocytes « scrappés ».

Ces études pourraient nous permettre de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le but d'améliorer la régénération d'un épiderme lésé dans des conditions physiopathologiques.

Références bibliographiques

- Abravaya K, Myers MP, Murphy SP, Morimoto RI (1992) The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev* 6:1153-1164.
- Ader I, Toulas C, Dalenc F, Delmas C, Bonnet J, Cohen-Jonathan E, Favre G (2002) RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* 21:5998-6006.
- Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM (2004) The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4954-4959.
- Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR (1995) p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8493-8497.
- Aliouat-Denis CM, Dendouga N, Van den Wyngaert I, Goehlmann H, Steller U, van de Weyer I, Van Slycken N, Andries L, Kass S, Luyten W, Janicot M, Vialard JE (2005) p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol Cancer Res* 3:627-634.
- Allanson M, Reeve VE (2004) Immunoprotective UVA (320-400 nm) irradiation upregulates heme oxygenase-1 in the dermis and epidermis of hairless mouse skin. *J Invest Dermatol* 122:1030-1036.
- Allen RG (1991) Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation. *Proc Soc Exp Biol Med* 196:117-129.
- Allombert-Blaise C, Tamiji S, Mortier L, Fauvel H, Tual M, Delaporte E, Piette F, DeLassale EM, Formstecher P, Marchetti P, Polakowska R (2003) Terminal differentiation of human epidermal keratinocytes involves mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway. *Cell Death Differ* 10:850-852.
- Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A, Costa AM (2003) Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds* 2:60-68.
- Appella E, Anderson CW (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268:2764-2772.
- Applegate LA, Frenk E (2001) Action des rayons UV sur les constituants cellulaires autres que l'ADN. *Dans: Rayonnement ultraviolet et peau: John Libbey Eurotext* 9-16.
- Archambeau JO, Pezner R, Wasserman T (1995) Pathophysiology of irradiated skin and breast. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31:1171-1185.
- Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Ferguson-Smith MA, Morley WN (1980) Studies on a new case of xeroderma pigmentosum (XP3BR) from complementation group G with cellular sensitivity to ionizing radiation. *Carcinogenesis* 1:745-751.
- Asselineau D, Bernhard B, Bailly C, Darmon M (1985) Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kD keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. *Exp Cell Res* 159:536-539.
- Azzam EI, de Toledo SM, Pykett MJ, Nagasawa H, Little JB (1997) CDC2 is down-regulated by ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Cell Growth Differ* 8:1161-1169.
- Bagrodia S, Derijard B, Davis RJ, Cerione RA (1995) Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 270:27995-27998.
- Bai J, Nakamura H, Hattori I, Tanito M, Yodoi J (2002) Thioredoxin suppresses 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity in rat PC12 cells. *Neurosci Lett* 321:81-84.
- Balajee AS, Bohr VA (2000) Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene* 250:15-30.

- Baler R, Dahl G, Voellmy R (1993) Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol* 13:2486-2496.
- Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281:1674-1677.
- Barcellos-Hoff MH, Costes SV (2006) A systems biology approach to multicellular and multi-generational radiation responses. *Mutat Res*.
- Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ (1991) Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 337:211-214.
- Barker S, Weinfeld M, Zheng J, Li L, Murray D (2005) Identification of mammalian proteins cross-linked to DNA by ionizing radiation. *J Biol Chem* 280: 33826-33838.
- Barrandon Y, Green H (1987) Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2302-2306.
- Barrandon Y (1998) [The biology of epidermal stem cells]. *Ann Dermatol Venereol* 125 Suppl 2:S5-6.
- Barton SP, Black DR, Gaskell SA, Marks R, Sathyanarayana JR, Paterson I (1985) Detection of the effects of low dose ionising irradiation on epidermal function. *Br J Radiol* 58:73-76.
- Basu-Modak S, Gordon MJ, Dobson LH, Spencer JP, Rice-Evans C, Tyrrell RM (2003) Epicatechin and its methylated metabolite attenuate UVA-induced oxidative damage to human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 35:910-921.
- Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M (1999) Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* 13:1297-1308.
- Beani JC (2001) [Enhancement of endogenous antioxidant defenses: a promising strategy for prevention of skin cancers]. *Bull Acad Natl Med* 185:1507-1525; discussion 1526-1507.
- Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2:469-475.
- Beesk F, Dizdaroglu M, Schulte-Frohlinde D, von Sonntag C (1979) Radiation-induced DNA strand breaks in deoxygenated aqueous solutions. The formation of altered sugars as end groups. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 36:565-576.
- Behrends U, Peter RU, Hintermeier-Knabe R, Eissner G, Holler E, Bornkamm GW, Caughman SW, Degitz K (1994) Ionizing radiation induces human intercellular adhesion molecule-1 in vitro. *J Invest Dermatol* 103:726-730.
- Bell E, Ivarsson B, Merrill C (1979) Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1274-1278.
- Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Chamson A, Asselineau D, Dubertret L, Coulomb B, Lapiere C, Nusgens B, Neveux Y (1983) The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol* 81:2s-10s.
- Bellmann K, Jaattela M, Wissing D, Burkart V, Kolb H (1996) Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett* 391:185-188.
- Benderitter M, Vincent-Genod L, Pouget JP, Voisin P (2003) The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation. *Radiat Res* 159:471-483.
- Bensasson RV, Land EJ, Truscott TG (1993) Light and ionizing radiation: generation of excited states and radicals, *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, New York, Oxford University Press, 249-289 Edition.
- Berthod F, Germain L, Li H, Xu W, Damour O, Auger FA (2001) Collagen fibril network and elastic system remodeling in a reconstructed skin transplanted on nude mice. *Matrix Biol* 20:463-473.

- Bessou-Touya S, Picardo M, Maresca V, Surleve-Bazeille JE, Pain C, Taieb A (1998) Chimeric human epidermal reconstructs to study the role of melanocytes and keratinocytes in pigmentation and photoprotection. *J Invest Dermatol* 111:1103-1108.
- Boehncke WH, Dahlke A, Zollner TM, Sterry W (1994) Differential expression of heat shock protein 70 (HSP70) and heat shock cognate protein 70 (HSC70) in human epidermis. *Arch Dermatol Res* 287:68-71.
- Bonnefont-Rousselot D, Gardes-Albert M, Delattre J, Ferradini C (1994) Quantitative low-density lipoprotein oxidation by gamma radiolysis. *Methods Enzymol* 233:441-452.
- Bonnefont-Rousselot D (2004) Gamma radiolysis as a tool to study lipoprotein oxidation mechanisms. *Biochimie* 86:903-911.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761-771.
- Boulay F, Perdiz D (2005) 17beta-estradiol modulates UVB-induced cellular responses in estrogen receptors positive human breast cancer cells. *J Photochem Photobiol B* 81:143-153.
- Bourgier C, Haydont V, Milliat F, Francois A, Holler V, Lasser P, Bourhis J, Mathe D, Vozenin-Brotans MC (2005) Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 54:336-343.
- Bourre F, Renault G, Sarasin A (1987) Sequence effect on alkali-sensitive sites in UV-irradiated SV40 DNA. *Nucleic Acids Res* 15:8861-8875.
- Braun S, Hanselmann C, Gassmann MG, auf dem Keller U, Born-Berclaz C, Chan K, Kan YW, Werner S (2002) Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound. *Mol Cell Biol* 22:5492-5505.
- Bravard A, Ageron-Blanc A, Alvarez S, Drane P, Le Rhun Y, Paris F, Luccioni C, May E (2002) Correlation between antioxidant status, tumorigenicity and radiosensitivity in sister rat cell lines. *Carcinogenesis* 23:705-711.
- Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, Hall JE, Dotto GP (1994) Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6453-6457.
- Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ, Jr. (1999) Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo J* 18:6845-6854.
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282:1497-1501.
- Buttke TM, Sandstrom PA (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15:7-10.
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131:1-87.
- Cadet J, Bourdat AG, D'Ham C, Duarte V, Gasparutto D, Romieu A, Ravanat JL (2000) Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res* 462:121-128.
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 531:5-23.
- Cadet J, Sage E, Douki T (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571:3-17.
- Calini V, Urani C, Camatini M (2003) Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol In Vitro* 17:561-566.
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281:1677-1679.

- Cao G, Alessio HM, Cutler RG (1993) Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 14:303-311.
- Caspar-Bauguil S, Cousin B, Galinier A, Segafredo C, Nibbelink M, Andre M, Casteilla L, Penicaud L (2005) Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett* 579:3487-3492.
- Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B (1998) p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16:311-320.
- Chandra J, Samali A, Orrenius S (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29:323-333.
- Chandra Jagetia G, Rajanikant GK, Rao SK, Shrinath Baliga M (2003) Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated gamma radiation. *Clin Chim Acta* 332:111-121.
- Charveron M, Calvo M, Gall Y (1995) Cell stress and implications of the heat-shock response in skin. *Cell Biol Toxicol* 11:161-165.
- Chaturvedi V, Sitailo LA, Bodner B, Denning MF, Nickoloff BJ (2006) Defining the caspase-containing apoptotic machinery contributing to cornification in human epidermal equivalents. *Exp Dermatol* 15:14-22.
- Chaudhary AK, Reddy GR, Blair IA, Marnett LJ (1996) Characterization of an N6-oxopropenyl-2'-deoxyadenosine adduct in malondialdehyde-modified DNA using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis* 17:1167-1170.
- Chen HJ, Chung FL (1996) Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol* 9:306-312.
- Chenal C, Legue F, Nourgalieva K, Brouazin-Jousseume V, Durel S, Guitton N (2000) Exposition of humans to low doses and low dose rate irradiation: an urgent need for new markers and new models. *Radiats Biol Radioecol* 40:627-629.
- Chinopoulos C, Adam-Vizi V (2006) Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *Febs J* 273:433-450.
- Cho ES, Lee SB, Bae IH, Lee YS, Lee SJ, Um HD (2005) Ionizing radiation induces blockade of c-Jun N-terminal kinase-dependent cell death pathway in a manner correlated with p21(Cip/WAF1) induction in primary cultured normal human fibroblasts. *Exp Mol Med* 37:282-9.
- Choi SY, Kim MJ, Kang CM, Bae S, Cho CK, Soh JW, Kim JH, Kang S, Chung HY, Lee YS, Lee SJ (2006) Activation of Bak and Bax through c-abl-protein kinase Cdelta-p38 MAPK signaling in response to ionizing radiation in human non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 281:7049-7059.
- Chouinard N, Valerie K, Rouabhia M, Huot J (2002) UVB-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase enhances resistance of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53. *Biochem J* 365:133-145.
- Clairmont A, Sies H, Ramachandran S, Lear JT, Smith AG, Bowers B, Jones PW, Fryer AA, Strange RC (1999) Association of NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) null with numbers of basal cell carcinomas: use of a multivariate model to rank the relative importance of this polymorphism and those at other relevant loci. *Carcinogenesis* 20:1235-1240.
- Clingen PH, Arlett CF, Cole J, Waugh AP, Lowe JE, Harcourt SA, Hermanova N, Roza L, Mori T, Nikaido O, et al. (1995) Correlation of UVC and UVB cytotoxicity with the induction of specific photoproducts in T-lymphocytes and fibroblasts from normal human donors. *Photochem Photobiol* 61:163-170.
- Corsini E, Galli CL (1998) Cytokines and irritant contact dermatitis. *Toxicol Lett* 102-103:277-282.
- Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81:1137-1146.

- Coulomb B, Dubertret L, Bell E, Merrill C, Fosse M, Breton-Gorius J, Prost C, Touraine R (1983) Endogenous peroxidases in normal human dermis: a marker of fibroblast differentiation. *J Invest Dermatol* 81:75-78.
- Coulomb B, Saiag P, Bell E, Breitburd F, Lebreton C, Heslan M, Dubertret L (1986) A new method for studying epidermalization in vitro. *Br J Dermatol* 114:91-101.
- Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L (1989) Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol* 92:122-125.
- Coulomb B, Friteau L, Baruch J, Guilbaud J, Chretien-Marquet B, Glicenstein J, Lebreton-Decoster C, Bell E, Dubertret L (1998) Advantage of the presence of living dermal fibroblasts within in vitro reconstructed skin for grafting in humans. *Plast Reconstr Surg* 101:1891-1903.
- Coulombe PA, Kopan R, Fuchs E (1989) Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation. *J Cell Biol* 109:2295-2312.
- Coulombe PA (1993) The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. *Curr Opin Cell Biol* 5:17-29.
- Coulombe PA (1997) Towards a molecular definition of keratinocyte activation after acute injury to stratified epithelia. *Biochem Biophys Res Commun* 236:231-238.
- Coulombe PA, Tong X, Mazzalupo S, Wang Z, Wong P (2004) Great promises yet to be fulfilled: defining keratin intermediate filament function in vivo. *Eur J Cell Biol* 83:735-746.
- Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Canguilhem B, Favier A, Cadet J, Douki T (2005) Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)* 4:836-844.
- Cuenda A, Cohen P, Buee-Scherrer V, Goedert M (1997) Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *Embo J* 16:295-305.
- Daburon F (1997) Irradiations aigües localisées.
- Darr D, Fridovich I (1994) Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 102:671-675.
- Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18:7883-7899.
- Davies KJ (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50:279-289.
- Davies MJ, Gilbert BC, Haywood RM (1991) Radical-induced damage to proteins: e.s.r. spin-trapping studies. *Free Radic Res Commun* 15:111-127.
- Dazard JE, Gal H, Amariglio N, Rechavi G, Domany E, Givol D (2003) Genome-wide comparison of human keratinocyte and squamous cell carcinoma responses to UVB irradiation: implications for skin and epithelial cancer. *Oncogene* 22:2993-3006.
- Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, Carrard G, Friguet B, de Longueville F, Boffe S, Remacle J, Toussaint O (2005) Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci* 118:743-758.
- Debenham PG, Webb MB, Jones NJ, Cox R (1987) Molecular studies on the nature of the repair defect in ataxia-telangiectasia and their implications for cellular radiobiology. *J Cell Sci Suppl* 6:177-189.
- De Fabo E, Webber LJ, Ulman EA, Broemeling LD (1997) Dietary L-histidine regulates murine skin levels of *trans*-urocanic acid, an immune-regulating photoreceptor, with an unanticipated modulation: potential relevance to skin cancer. *J Nut* 127:2158-2164.
- Dekigai H, Nakamura H, Bai J, Tanito M, Masutani H, Hirota K, Matsui H, Murakami M, Yodoi J (2001) Geranylgeranylacetone promotes induction and secretion of thioredoxin in gastric mucosal cells and peripheral blood lymphocytes. *Free Radic Res* 35:23-30.

- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stravrides JC (1995) Release by ultraviolet B (u.v.B) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production. *Br J Pharmacol* 114:1257-1265.
- Denham JW, Hauer-Jensen M (2002) The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol* 63:129-145.
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76:1025-1037.
- Desai LP, Aryal AM, Ceacareanu B, Hassid A, Waters CM (2004) RhoA and Rac1 are both required for efficient wound closure of airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L1134-1144.
- Desmouliere A (1995) Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int* 19:471-476.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9363-9367.
- Douki T, Cadet J (2001) Effets des rayonnements UV sur l'ADN. *Dans: Rayonnement ultraviolet et peau: John Libbey Eurotext* 9-16.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102 :33-42.
- Dubertret L, Coulomb B, Saiag P, Touraine R (1987) Les peaux artificielles vivantes, La Recherche vol.185 n°18: 150-9 Edition.
- Dumaz N, Meek DW (1999) Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J* 18:7002-7010.
- Duplan-Perrat F, Damour O, Montrocher C, Peyrol S, Grenier G, Jacob MP, Braye F (2000) Keratinocytes influence the maturation and organization of the elastin network in a skin equivalent. *J Invest Dermatol* 114:365-370.
- Eckert RL, Crish JF, Efimova T, Balasubramanian S (2004) Antioxidants regulate normal human keratinocyte differentiation. *Biochem Pharmacol* 68:1125-1131.
- Edwards MJ, Marks R, Dykes PJ, Merrett VR, Morgan HE, O'Donovan MR (1991) Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 96:392-396.
- Efimova T, Broome AM, Eckert RL (2003) A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J Biol Chem* 278:34277-34285.
- Ehrenreiter K, Piazzolla D, Velamoor V, Sobczak I, Small JV, Takeda J, Leung T, Baccarini M (2005) Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol* 168:955-964.
- Ehrmann RL, Gey GO (1956) The growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat-tail collagen. *J Natl Cancer Inst* 16:1375-1403.
- EI-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.
- EI-Deiry WS (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8:345-357.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.
- Favaudon V (2000) [Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. *Cancer Radiother* 4:355-368.
- Fischer H, Rossiter H, Ghannadan M, Jaeger K, Barresi C, Declercq W, Tschachler E, Eckhart L (2005) Caspase-14 but not caspase-3 is processed during the development of fetal mouse epidermis. *Differentiation* 73:406-413.
- Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, Malaise EP (1997) Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol* 72:271-283.

- Franco N, Lamartine J, Frouin V, Le Minter P, Petat C, Leplat JJ, Libert F, Gidrol X, Martin MT (2005) Low-dose exposure to gamma rays induces specific gene regulations in normal human keratinocytes. *Radiat Res* 163:623-635.
- Frankenberg-Schwager M, Frankenberg D (1990) DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast. *Int J Radiat Biol* 58:569-575.
- Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M (2001) Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol* 116:633-640.
- Frye M, Gardner C, Li ER, Arnold I, Watt FM (2003) Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* 130:2793-2808.
- Fuchs E, Green H (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19:1033-1042.
- Fuchs E (1994) Epidermal differentiation and keratin gene expression. *Princess Takamatsu Symp* 24:290-302.
- Fuchs E (1995) Keratins and the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:123-153.
- Fujiki M, Kobayashi H, Abe T, Ishii K (2003) Astroglial activation accompanies heat shock protein upregulation in rat brain following single oral dose of geranylgeranylacetone. *Brain Res* 991:254-257.
- Fujiki M, Furukawa Y, Kobayashi H, Abe T, Ishii K, Uchida S, Kamida T (2005) Geranylgeranylacetone limits secondary injury, neuronal death, and progressive necrosis and cavitation after spinal cord injury. *Brain Res* 1053:175-184.
- Furnari B, Blasina A, Boddy MN, McGowan CH, Russell P (1999) Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol Biol Cell* 10:833-845.
- Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY (1997) Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272:18033-18037.
- Gailit J, Welch MP, Clark RA (1994) TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 103:221-227.
- Gallico GG, 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H (1984) Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 311:448-451.
- Gandarillas A, Watt FM (1995) Changes in expression of members of the fos and jun families and myc network during terminal differentiation of human keratinocytes. *Oncogene* 11:1403-1407.
- Gandarillas A, Watt FM (1997) c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev* 11:2869-2882.
- Gandarillas A, Goldsmith LA, Gschmeissner S, Leigh IM, Watt FM (1999) Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Exp Dermatol* 8:71-79.
- Gandarillas A (2000) Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Exp Gerontol* 35:53-62.
- Gasparro FP, Fresco JR (1986) Ultraviolet-induced 8,8-adenine dehydrodimers in oligo- and polynucleotides. *Nucleic Acids Res* 14:4239-4251.
- Ghazizadeh S, Taichman LB (2005) Organization of stem cells and their progeny in human epidermis. *J Invest Dermatol* 124:367-372.
- Giaccia AJ, Kastan MB (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12:2973-2983.
- Giagkousiklidis S, Vogler M, Westhoff MA, Kasperczyk H, Debatin KM, Fulda S (2005) Sensitization for gamma-irradiation-induced apoptosis by second mitochondria-derived activator of caspase. *Cancer Res* 65:10502-10513.
- Gillitzer R, Goebeler M (2001) Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 69:513-521.

- Goldman R, Moshonov S, Chen X, Berchansky A, Furstenberger G, Zor U (1997) Crosstalk between elevation of $[Ca^{2+}]_i$, reactive oxygen species generation and phospholipase A2 stimulation in a human keratinocyte cell line. *Adv Exp Med Biol* 433:41-45.
- Gongora R, Magdelenat H (1986) Accidental acute local irradiations in France and their pathology. *Br J Radiol Suppl* 19:12-15.
- Griffiths TW, Griffiths CE, Voorhees JJ (1995) Immunopathogenesis and immunotherapy of psoriasis. *Dermatol Clin* 13:739-749.
- Grone A (2002) Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 88:1-12.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ (1999) Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-911.
- Gusev IA, Guskova AK, Mettler FA (2001) *Medical Management of Radiation Accidents*: CRC Press.
- Gutteridge JM, Halliwell B (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15:129-135.
- Hall PA, Watt FM (1989) Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106:619-633.
- Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265:808-811.
- Han J, Lee JD, Jiang Y, Li Z, Feng L, Ulevitch RJ (1996) Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem* 271:2886-2891.
- Harada H, Mitsuyasu T, Seta Y, Maruoka Y, Toyoshima K, Yasumoto S (1998) Overexpression of bcl-2 protein inhibits terminal differentiation of oral keratinocytes in vitro. *J Oral Pathol Med* 27:11-17.
- Harper EG, Alvares SM, Carter WG (2005) Wounding activates p38 map kinase and activation transcription factor 3 in leading keratinocytes. *J Cell Sci* 118:3471-3485.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816.
- Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-634.
- Harvat BL, Wang A, Seth P, Jetten AM (1998) Up-regulation of p27Kip1, p21WAF1/Cip1 and p16Ink4a is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation. *J Cell Sci* 111 (Pt 9):1185-1196.
- Hashimoto K, Morishige K, Sawada K, Tahara M, Shimizu S, Sakata M, Tasaka K, Murata Y (2005) Geranylgeranylacetone inhibits lysophosphatidic acid-induced invasion of human ovarian carcinoma cells in vitro. *Cancer* 103:1529-1536.
- Haydont V, Mathe D, Bourgier C, Abdelali J, Aigueperse J, Bourhis J, Vozenin-Brotans MC (2005) Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 76:219-225.
- He G, Kutala VK, Kuppusamy P, Zweier JL (2004) In vivo measurement and mapping of skin redox stress induced by ultraviolet light exposure. *Free Radic Biol Med* 36:665-672.
- Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, Laskin JD (2003) UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. *J Biol Chem* 278:22432-22436.
- Hedge R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2002) Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277:432-8.
- Hellman B, Brodin D, Andersson M, Dahlman-Wright K, Isacson U, Brattstrom D, Bergqvist M (2005) Radiation-induced DNA-damage and gene expression profiles in human lung cancer cells with different radiosensitivity. *Exp Oncol* 27:102-107.
- Henry G, Garner WL (2003) Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin North Am* 83:483-507.
- Herlaar E, Brown Z (1999) p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today* 5:439-447.

- Hirakawa T, Rokutan K, Nikawa T, Kishi K (1996) Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 111:345-357.
- Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* 274:27891-27897.
- Hirota K, Nakamura H, Arai T, Ishii H, Bai J, Itoh T, Fukuda K, Yodoi J (2000) Geranylgeranylacetone enhances expression of thioredoxin and suppresses ethanol-induced cytotoxicity in cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 275:825-830.
- Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6:432-438.
- Holbrook KA and Hennings H (1983) Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review. *J Invest Dermatol* 81:11-24.
- Holland DB, Roberts SG, Wood EJ, Cunliffe WJ (1993) Cold shock induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 101:196-199.
- Hopewell JW, Campling D, Calvo W, Reinhold HS, Wilkinson JH, Yeung TK (1986) Vascular irradiation damage: its cellular basis and likely consequences. *Br J Cancer Suppl* 7:181-191.
- Hu Y, Baud V, Oga T, Kim KI, Yoshida K, Karin M (2001) IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. *Nature* 410:710-714.
- Hurlin PJ, Foley KP, Ayer DE, Eisenman RN, Hanahan D, Arbeit JM (1995) Regulation of Myc and Mad during epidermal differentiation and HPV-associated tumorigenesis. *Oncogene* 11:2487-2501.
- Hwang A, Muschel RJ (1998) Radiation and the G2 phase of the cell cycle. *Radiat Res* 150:S52-59.
- Ikeyama S, Kusumoto K, Miyake H, Rokutan K, Tashiro S (2001) A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranylgeranylacetone, suppresses apoptosis of cultured rat hepatocytes caused by hydrogen peroxide and ethanol. *J Hepatol* 35:53-61.
- Iliakis G (1991) The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 13:641-648.
- Ishii Y, Kwong JM, Caprioli J (2003) Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1982-1992.
- Jaakkola P, Kontusaari S, Kauppi T, Maata A, Jalkanen M (1998) Wound reepithelialization activates a growth factor-responsive enhancer in migrating keratinocytes. *Faseb J* 12:959-969.
- Jaattela M, Wissing D, Bauer PA, Li GC (1992) Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *Embo J* 11:3507-3512.
- Jaattela M, Wissing D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M (1998) Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J* 17:6124-6134.
- Jiang CK, Flanagan S, Ohtsuki M, Shuai K, Freedberg IM, Blumenberg M (1994) Disease-activated transcription factor: allergic reactions in human skin cause nuclear translocation of STAT-91 and induce synthesis of keratin K17. *Mol Cell Biol* 14:4759-4769.
- Jiang CK, Tomic-Canic M, Lucas DJ, Simon M, Blumenberg M (1995) TGF beta promotes the basal phenotype of epidermal keratinocytes: transcriptional induction of K#5 and K#14 keratin genes. *Growth Factors* 12:87-97.
- Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271:17920-17926.
- Jolly C, Morimoto R, Robert-Nicoud M, Vourc'h C (1997) HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: relationship with transcription sites. *J Cell Sci* 110 (Pt 23):2935-2941.

- Jones PH, Harper S, Watt FM (1995) Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 80:83-93.
- Kaminska B (2005) MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta* 1754:253-262.
- Kanitakis J (1995) Structure histologique de la peau humaine. *Dans: Biologie de la peau humaine: Schmidt D. Les éditions INSERM* 1-20.
- Kanno T, Kobuchi H, Kajitani N, Utsumi T, Yano H, Horton AA, Yasuda T, Utsumi K (2002) Mevastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, induces apoptosis, differentiation and Rap1 expression in HL-60 cells. *Physiol Chem Phys Med NMR* 34:1-15.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51:6304-6311.
- Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ, Jr. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71:587-597.
- Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M, Waza M, Tanaka F, Doyu M, Sobue G (2005) Pharmacological induction of heat-shock proteins alleviates polyglutamine-mediated motor neuron disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16801-16806.
- Kawai T, Teshima S, Kusumoto K, Kawahara T, Kondo K, Kishi K, Rokutan K (2000) A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranyl-geranyl-acetone, restores the heat shock response in gastric mucosa of protein-malnourished rats. *J Lab Clin Med* 136:138-148.
- Kearsey JM, Coates PJ, Prescott AR, Warbrick E, Hall PA (1995) Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene* 11:1675-1683.
- Kehrer JP (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23:21-48.
- Khanna S, Roy S, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK (2001) Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radic Biol Med* 31:38-42.
- Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Tsuji S, Yabe I, Niino M, Tashiro K (2002) Effect of geranylgeranylacetone on cellular damage induced by proteasome inhibition in cultured spinal neurons. *J Neurosci Res* 69:373-381.
- Kiltie AE, Barber JB, Swindell R, Ryan AJ, West CM, Hendry JH, Magee B (1999) Lack of correlation between residual radiation-induced DNA damage, in keratinocytes assayed directly from skin, and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43:481-487.
- Kleinman HK (1982) Fibroblast adhesion to collagen substrates. *Methods Enzymol* 82 Pt A:503-508.
- Kligman LH (1989) Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment. *Clin Geriatr Med* 5:235-251.
- Kobayashi M, Yamamoto M (2005) Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 7:385-394.
- Komine M, Rao LS, Kaneko T, Tomic-Canic M, Tamaki K, Freedberg IM, Blumenberg M (2000) Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NFkappa B and C/EBPbeta. *J Biol Chem* 275:32077-32088.
- Komine M, Rao LS, Freedberg IM, Simon M, Milisavljevic V, Blumenberg M (2001) Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 116:330-338.
- Konig A, Bruckner-Tuderman L (1992) Transforming growth factor-beta stimulates collagen VII expression by cutaneous cells in vitro. *J Cell Biol* 117:679-685.
- Kotturi G, de Boer JG, Koop BF, Glickman BW (1998) Correlation of UV-induced mutational spectra and the in vitro damage distribution at the human hprt gene. *Mutat Res* 403:237-248.

- Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15:1942-1952.
- Kubota N, Hayashi J, Inada T, Iwamura Y (1997) Induction of a particular deletion in mitochondrial DNA by X rays depends on the inherent radiosensitivity of the cells. *Radiat Res* 148:395-398.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7491-7495.
- Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B, Sage E (1999) Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J Photochem Photobiol B* 49:71-80.
- Kumar S, Sharma ND, Davies RJ, Phillipson DW, McCloskey JA (1987) The isolation and characterisation of a new type of dimeric adenine photoproduct in UV-irradiated deoxyadenylates. *Nucleic Acids Res* 15:1199-1216.
- Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, Tanguay RM, Germain L (1998) Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem* 46:1291-1301.
- Lappin MB, Simon JC (1998) Urocanic acid and cutaneous antigen presentation. *Photochem Photobiol* 44: 112-116.
- Le Panse R, Bouchard B, Lebreton C, Coulomb B (1996) Modulation of keratinocyte growth factor (KGF) mRNA expression in human dermal fibroblasts grown in monolayer or within a collagen matrix. *Exp Dermatol* 5:108-114.
- Lee HC, Kim DW, Jung KY, Park IC, Park MJ, Kim MS, Woo SH, Rhee CH, Yoo H, Lee SH, Hong SI (2004) Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line. *Int J Mol Med* 13:883-887.
- Lee SJ, Choi SA, Lee KH, Chung HY, Kim TH, Cho CK, Lee YS (2001) Role of inducible heat shock protein 70 in radiation-induced cell death. *Cell Stress Chaperones* 6:273-281.
- Lefaix JL, Delanian S, Dubray B (1997) [Physiopathology of human superficial radiation-induced fibrosis]. *C R Seances Soc Biol Fil* 191:777-795.
- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, Metcalf RA, Stampfer MR, Fusenig N, Rogan EM, et al. (1993) p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14:833-839.
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331.
- Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS (2000) Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 275:25665-25671.
- Li L, Xie T (2005) Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:605-631.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-89.
- Liebmann J, Fisher J, Lipschultz C, Kuno R, Kaufman DC (1995) Enhanced glutathione peroxidase expression protects cells from hydroperoxides but not from radiation or doxorubicin. *Cancer Res* 55:4465-4470.
- Ling L, Goeddel DV (2000) T6BP, a TRAF6-interacting protein involved in IL-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9567-9572.
- Lippens S, Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W (2005) Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2:1497-1508.
- Loirand G, Rolli-Derkinderen M, Pacaud P (2005) RhoA and resistance artery remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1051-1056.
- Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder DE, Albelda S, Cotsarelis G (1999) Human hair follicle bulge cells are biochemically distinct and possess an epithelial stem cell phenotype. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4:296-301.

- Lyng FM, Seymour CB, Mothersill C (2001) Oxidative stress in cells exposed to low levels of ionizing radiation. *Biochem Soc Trans* 29:350-353.
- Ma S, Rao L, Freedberg IM, Blumenberg M (1997) Transcriptional control of K5, K6, K14, and K17 keratin genes by AP-1 and NF-kappaB family members. *Gene Expr* 6:361-370.
- Mailhos C, Howard MK, Latchman DS (1993) Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. *Neuroscience* 55:621-627.
- Mansur DB, Kataoka Y, Grdina DJ, Diamond AM (2001) Radiosensitivity of mammalian cell lines engineered to overexpress cytosolic glutathione peroxidase. *Radiat Res* 155:536-542.
- Marconi A, Atzei P, Panza C, Fila C, Tiberio R, Truzzi F, Wachter T, Leverkus M, Pincelli C (2004) FLICE/caspase-8 activation triggers anoikis induced by beta1-integrin blockade in human keratinocytes. *J Cell Sci* 117:5815-5823.
- Marklund SL, Westman NG, Roos G, Carlsson J (1984) Radiation resistance and the CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities of seven human cell lines. *Radiat Res* 100:115-123.
- Masuda Y, Sumita S, Fujimura N, Namiki A (2003) Geranylgeranylacetone attenuates septic diaphragm dysfunction by induction of heat shock protein 70. *Crit Care Med* 31:2585-2591.
- Matsumoto H, Wang X, Ohnishi T (1995) Binding between wild-type p53 and hsp72 accumulated after UV and gamma-ray irradiation. *Cancer Lett* 92:127-133.
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282:1893-1897.
- Maytin EV, Wimberly JM, Anderson RR (1990) Thermotolerance and the heat shock response in normal human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 95:635-642.
- McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Halvorsen YD, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM (2006) The immunogenicity of human adipose derived cells: Temporal changes in vitro. *Stem Cells*.
- McKay IA, Leigh IM (1991) Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. *Br J Dermatol* 124:513-518.
- Memisoglu A, Samson L (2000) Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res* 451:39-51.
- Mendonca MS, Boukamp P, Stanbridge EJ, Redpath JL (1991) The radiosensitivity of human keratinocytes: influence of activated c-H-ras oncogene expression and tumorigenicity. *Int J Radiat Biol* 59:1195-1206.
- Michel M, Torok N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A, Germain L (1996) Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 109 (Pt 5):1017-1028.
- Michelin S, del Rosario Perez M, Dubner D, Gisone P (2004) Increased activity and involvement of caspase-3 in radiation-induced apoptosis in neural cells precursors from developing rat brain. *Neurotoxicology* 25:387-398.
- Middleton MH, Norris DA (1995) Cytokine-induced ICAM-1 expression in human keratinocytes is highly variable in keratinocyte strains from different donors. *J Invest Dermatol* 104:489-496.
- Mikkelsen RB, Wardman P (2003) Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22:5734-5754.
- Mikuriya T, Sugahara K, Takemoto T, Tanaka K, Takeno K, Shimogori H, Nakai A, Yamashita H (2005) Geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, prevents acoustic injury in the guinea pig. *Brain Res* 1065:107-114.
- Milia J, Teyssier F, Dalenc F, Ader I, Delmas C, Pradines A, Lajoie-Mazenc I, Baron R, Bonnet J, Cohen-Jonathan E, Favre G, Toulas C (2005) Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ* 12:492-501.

- Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81:1147-1157.
- Mitchell DL, Rosenstein BS (1987) The use of specific radioimmunoassay to determine action spectra for the photolysis of (6-4) photoproducts. *Photochem Photobiol* 45:781-786.
- Mitchell DL, Nairn RS (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 49:805-819.
- Mitchell DL, Jen J, Cleaver JE (1992) Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucleic Acids Res* 20:225-229.
- Mitsui A, Hirakawa T, Yodoi J (1992) Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 186:1220-1226.
- Miura Y, Kikuchi A, Musha T, Kuroda S, Yaku H, Sasaki T, Takai Y (1993) Regulation of morphology by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 268:510-515.
- Moll UM, Zaika A (2001) Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett* 493:65-69.
- Morel Y, Barouki R (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 342 Pt 3:481-496.
- Morliere P, Moysan A, Gaboriau F, Santus R, Maziere JC, Dubertret L (1992) [Ultraviolet A radiation and the skin. Implications of activated forms of oxygen. Current trends and newest results]. *Pathol Biol (Paris)* 40:160-168.
- Morliere P (2001) Rayonnement UVA, stress oxydant et défenses anti-oxydantes. *Dans: Rayonnement ultraviolet et peau: John Libbey Eurotext* 9-16.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B (1997) Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17:5317-5327.
- Mothersill C, Seymour C (2001) Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat Res* 155:759-767.
- Motoori S, Majima HJ, Ebara M, Kato H, Hirai F, Kakinuma S, Yamaguchi C, Ozawa T, Nagano T, Tsujii H, Saisho H (2001) Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE. *Cancer Res* 61:5382-5388.
- Moysan A, Clement-Lacroix P, Michel L, Dubertret L, Morliere P (1996) Effects of ultraviolet A and antioxidant defense in cultured fibroblasts and keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 11:192-197.
- Mrass P, Rendl M, Mildner M, Gruber F, Lengauer B, Ballaun C, Eckhart L, Tschachler E (2004) Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. *Cancer Res* 64:6542-6548.
- Mu Y, Lv S, Ren X, Jin G, Liu J, Yan G, Li W, Shen J, Luo G (2003) UV-B induced keratinocyte apoptosis is blocked by 2-selenium-bridged beta-cyclodextrin, a GPX mimic. *J Photochem Photobiol B* 69:7-12.
- Munz B, Frank S, Hubner G, Olsen E, Werner S (1997) A novel type of glutathione peroxidase: expression and regulation during wound repair. *Biochem J* 326 (Pt 2):579-585.
- Murakami M, Oketani K, Fujisaki H, Wakabayashi T, Ohgo T (1981) Antiulcer effect of geranylgeranylacetone, a new acyclic polyisoprenoid on experimentally induced gastric and duodenal ulcers in rats. *Arzneimittelforschung* 31:799-804.
- Muramatsu T, Tada H, Kobayashi N, Yamaji M, Shirai T, Ohnishi T (1992) Induction of the 72-kD heat shock protein in organ-cultured normal human skin. *J Invest Dermatol* 98:786-790.
- Murphy JE, Robert C, Kupper TS (2000) Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. *J Invest Dermatol* 114:602-608.

- Murrell GA, Francis MJ, Bromley L (1990) Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 265:659-665.
- Nakada J, Matura T, Okazaki N, Nishida T, Togawa A, Minami Y, Inagaki Y, Ito H, Yamada K, Ishibe Y (2005) Oral administration of geranylgeranylacetone improves survival rate in a rat endotoxin shock model: administration timing and heat shock protein 70 induction. *Shock* 24:482-487.
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 15:351-369.
- Nick JA, Avdi NJ, Gerwins P, Johnson GL, Worthen GS (1996) Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J Immunol* 156:4867-4875.
- Nickoloff BJ, Griffiths CE, Barker JN (1990) The role of adhesion molecules, chemotactic factors, and cytokines in inflammatory and neoplastic skin disease--1990 update. *J Invest Dermatol* 94:151S-157S.
- Nickoloff BJ, Turka LA (1993) Keratinocytes: key immunocytes of the integument. *Am J Pathol* 143:325-331.
- Niemann C, Watt FM (2002) Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol* 12:185-192.
- Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398:252-256.
- Nobes CD, Hall A (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81:53-62.
- Oda H, Miyake H, Iwata T, Kusumoto K, Rokutan K, Tashiro S (2002) Geranylgeranylacetone suppresses inflammatory responses and improves survival after massive hepatectomy in rats. *J Gastrointest Surg* 6:464-472; discussion 473.
- Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Miyashita K, Kato K, Kato M, Sugiyama T, Asaka M (2005) Geranylgeranylacetone protects mice from dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scand J Gastroenterol* 40:1049-1057.
- Okada S, Yabuki M, Kanno T, Hamazaki K, Yoshioka T, Yasuda T, Horton AA, Utsumi K (1999) Geranylgeranylacetone induces apoptosis in HL-60 cells. *Cell Struct Funct* 24:161-168.
- Oleinick NL, Chiu SM, Ramakrishnan N, Xue LY (1987) The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br J Cancer Suppl* 8:135-140.
- Ooie T, Takahashi N, Saikawa T, Nawata T, Arikawa M, Yamanaka K, Hara M, Shimada T, Sakata T (2001) Single oral dose of geranylgeranylacetone induces heat-shock protein 72 and renders protection against ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Circulation* 104:1837-1843.
- Osborn MT, Chambers TC (1996) Role of the stress-activated/c-Jun NH2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs. *J Biol Chem* 271:30950-30955.
- Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y (2001) Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* 104:233-245.
- Paladini RD, Takahashi K, Bravo NS, Coulombe PA (1996) Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *J Cell Biol* 132:381-397.
- Papini S, Cecchetti D, Campani D, Fitzgerald W, Grivel JC, Chen S, Margolis L, Revoltella RP (2003) Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. *Stem Cells* 21:481-494.
- Park SH, Lee SJ, Chung HY, Kim TH, Cho CK, Yoo SY, Lee YS (2000) Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response. *Radiat Res* 153:318-326.
- Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR (1982) Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem Photobiol* 36:187-191.

- Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27:437-496.
- Passalaris TM, Benanti JA, Gewin L, Kiyono T, Galloway DA (1999) The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways. *Mol Cell Biol* 19:5872-5881.
- Peak MJ, Peak JG, Carnes BA (1987) Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. *Photochem Photobiol* 45:381-387.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-183.
- Pelle E, Huang X, Mammone T, Marenus K, Maes D, Frenkel K (2003) Ultraviolet-B-induced oxidative DNA base damage in primary normal human epidermal keratinocytes and inhibition by a hydroxyl radical scavenger. *J Invest Dermatol* 121:177-183.
- Pellegrini G, Ranno R, Stracuzzi G, Bondanza S, Guerra L, Zambruno G, Micali G, De Luca M (1999) The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. In: *Transplantation*, pp 868-879.
- Perdiz D, Grof P, Mezzina M, Nikaido O, Moustacchi E, Sage E (2000) Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem* 275:26732-26742.
- Pernet I (2000) Structure histologique de la peau humaine. *Dans: Biologie de la peau humaine*: Schmidt D. Les éditions INSERM 63-75.
- Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO (1997) Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12736-12737.
- Petit-Frere C, Capulas E, Lyon DA, Norbury CJ, Lowe JE, Clingen PH, Riballo E, Green MH, Arlett CF (2000) Apoptosis and cytokine release induced by ionizing or ultraviolet B radiation in primary and immortalized human keratinocytes. *Carcinogenesis* 21:1087-1095.
- Pfeifer GP, Drouin R, Riggs AD, Holmquist GP (1991) In vivo mapping of a DNA adduct at nucleotide resolution: detection of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1374-1378.
- Pi J, Qu W, Reece JM, Kumagai Y, Waalkes MP (2003) Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. *Exp Cell Res* 290:234-245.
- Potten CS, Morris RJ (1988) Epithelial stem cells in vivo. *J Cell Sci Suppl* 10:45-62.
- Pouget JP, Laurent C, Delbos M, Benderitter M, Clairand I, Trompier F, Stephanazzi J, Carsin H, Lambert F, Voisin P, Gourmelon P (2004) PCC-FISH in skin fibroblasts for local dose assessment: biodosimetric analysis of a victim of the Georgian radiological accident. *Radiat Res* 162:365-376.
- Prithivirajasingh S, Story MD, Bergh SA, Geara FB, Ang KK, Ismail SM, Stevens CW, Buchholz TA, Brock WA (2004) Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Lett* 571:227-232.
- Prives C, Hall PA (1999) The p53 pathway. *J Pathol* 187:112-126.
- Prunieras M, Delescluse C (1984) Epidermal cell culture systems in skin pharmacology. *Br J Dermatol* 111 Suppl 27:43-57.
- Pugliese PT (1998) The skin's antioxidant systems. *Dermatol Nurs* 10:401-416; quiz 417-408.
- Radford IR (1986) Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 49:611-620.
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270:7420-7426.

- Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1996) MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16:1247-1255.
- Ramakrishnan N, McClain DE, Catravas GN (1993) Membranes as sensitive targets in thymocyte apoptosis. *Int J Radiat Biol* 63:693-701.
- Regnier M, Staquet MJ, Schmitt D, Schmidt R (1997) Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J Invest Dermatol* 109:510-512.
- Remacle J, Raes M, Toussaint O, Renard P, Rao G (1995) Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat Res* 316:103-122.
- Rhee SG (1999) Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 31:53-59.
- Rheinwald JG, Green H (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-343.
- Rhie G, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC, Chung JH (2001) Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117:1212-1217.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20:933-956.
- Richard G (2000) Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol* 9:77-96.
- Ridley AJ, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-399.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401-410.
- Riley PA (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65:27-33.
- Robbins ME, Zhao W (2004) Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol* 80:251-259.
- Rodriguez-Villanueva J, Greenhalgh D, Wang XJ, Bundman D, Cho S, Delehedde M, Roop D, McDonnell TJ (1998) Human keratin-1.bcl-2 transgenic mice aberrantly express keratin 6, exhibit reduced sensitivity to keratinocyte cell death induction, and are susceptible to skin tumor formation. *Oncogene* 16:853-863.
- Rogers PB, Plowman PN, Harris SJ, Arlett CF (2000) Four radiation hypersensitivity cases and their implications for clinical radiotherapy. *Radiother Oncol* 57:143-154.
- Rokutan K (2000) Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol* 15 Suppl:D12-19.
- Romero-Graillet C, Aberdam E, Clement M, Ortonne JP, Ballotti R (1997) Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest* 99:635-642.
- Ross GM, Eady JJ, Mithal NP, Bush C, Steel GG, Jeggo PA, McMillan TJ (1995) DNA strand break rejoining defect in xrs-6 is complemented by transfection with the human Ku80 gene. *Cancer Res* 55:1235-1238.
- Ross JA, Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22:19-34.
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78:1027-1037.
- Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK (2006) Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther* 13:211-220.
- Sage E (1993) Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem Photobiol* 57:163-174.
- Saiag P, Coulomb B, Lebreton C, Bell E, Dubertret L (1985) Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro. *Science* 230:669-672.

- Saito S, Yamaguchi H, Higashimoto Y, Chao C, Xu Y, Fornace AJ, Jr., Appella E, Anderson CW (2003) Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress. *J Biol Chem* 278:37536-37544.
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J* 17:2596-2606.
- Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A, Anderson CW, Appella E (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12:2831-2841.
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES (2000) Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2:476-483.
- Salvesen GS, Duckett CS (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:401-410.
- Samali A, Cotter TG (1996) Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 223:163-170.
- Samuel T, Weber HO, Rauch P, Verdoodt B, Eppel JT, McShea A, Hermeking H, Funk JO (2001) The G2/M regulator 14-3-3sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax. *J Biol Chem* 276:45201-45206.
- Sancar GB, Smith FW, Lorence MC, Rupert CS, Sancar A (1984) Sequences of the *Escherichia coli* photolyase gene and protein. *J Biol Chem* 259:6033-6038.
- Sander CS, Chang H, Salzmann S, Muller CS, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, Thiele JJ (2002) Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 118:618-625.
- Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ (2004) Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* 43:326-335.
- Sanquer S, Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L (1990) Human dermal fibroblasts modulate the effects of retinoids on epidermal growth. *J Invest Dermatol* 95:700-704.
- Santoro MG (2000) Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* 59:55-63.
- Santoro MM, Gaudino G (2005) Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res* 304:274-286.
- Saran M, Bors W (1994) Signalling by O₂⁻ and NO[•]: how far can either radical, or any specific reaction product, transmit a message under in vivo conditions? *Chem Biol Interact* 90:35-45.
- Sasaki H, Akamatsu H, Horio T (1997) Effects of a single exposure to UVB radiation on the activities and protein levels of copper-zinc and manganese superoxide dismutase in cultured human keratinocytes. *Photochem Photobiol* 65:707-713.
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11:173-186.
- Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, Sun L, Yamanishi K, Ichijo H, Hashimoto K (2001) Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 276:999-1004.
- Schallreuter KU, Wood JM (2001) Thioredoxin reductase - its role in epidermal redox status. *J Photochem Photobiol B* 64:179-184.
- Schindler C, Darnell JE, Jr. (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64:621-651.
- Seeberg E, Eide L, Bjoras M (1995) The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 20:391-397.
- Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S (2002) Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Ann N Y Acad Sci* 957:239-249.
- Shapiro L, Dinarello CA (1995) Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12230-12234.

- Sharma GD, He J, Bazan HE (2003) p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem* 278:21989-21997.
- Shay JW, Wright WE (2001) Telomeres and telomerase: implications for cancer and aging. *Radiat Res* 155:188-193.
- Shieh SY, Taya Y, Prives C (1999) DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *Embo J* 18:1815-1823.
- Shimizu T, Kato T, Jr., Tachibana A, Sasaki MS (1999) Coordinated regulation of radioadaptive response by protein kinase C and p38 mitogen-activated protein kinase. *Exp Cell Res* 251:424-432.
- Shindo Y, Witt E, Packer L (1993) Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 100:260-265.
- Shindo Y, Witt E, Han D, Epstein W, Packer L (1994) Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol* 102:122-124.
- Shinomiya N (2001) New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *J Cell Mol Med* 5:240-253.
- Shirazi A, Liu K, Trott KR (1995) Epidermal morphology, cell proliferation and repopulation in mouse skin during daily fractionated irradiation. *Int J Radiat Biol* 68:215-221.
- Siddiqi MA, Bothe E (1987) Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. *Radiat Res* 112:449-463.
- Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB (1997) DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* 11:3471-3481.
- Simon M, Montezin M, Guerrin M, Durieux JJ, Serre G (1997) Characterization and purification of human corneodesmosin, an epidermal basic glycoprotein associated with corneocyte-specific modified desmosomes. *J Biol Chem* 272:31770-31776.
- Simon M, Guerrin M, Serre G (2000) Structure histologique de la peau humaine. *Dans: Biologie de la peau humaine: Schmidt D. Les éditions INSERM* 63-75.
- Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jaattela M, Schwarz T (1995) Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest* 95:926-933.
- Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341:738-746.
- Sitailo LA, Tibudan SS, Denning MF (2002) Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem* 277:19346-19352.
- Sivan V, Vozenin-Brotans MC, Tricaud Y, Lefaix JL, Cosset JM, Dubray B, Martin MT (2002) Altered proliferation and differentiation of human epidermis in cases of skin fibrosis after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 53:385-393.
- Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ, Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266:1376-1380.
- Snoeckx LH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ (2001) Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 81:1461-1497.
- St Clair DK, Wan XS, Oberley TD, Muse KE, St Clair WH (1992) Suppression of radiation-induced neoplastic transformation by overexpression of mitochondrial superoxide dismutase. *Mol Carcinog* 6:238-242.
- Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD (2005) Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem* 280:38729-38739.
- Staquet MJ (1997) Molécules de l'adhérence cellulaire et 3?piderme. *Dans: Biologie de la peau humaine.*
- Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M (1995) Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 10:109-115.

- Stoll SW, Kansra S, Elder JT (2003) Keratinocyte outgrowth from human skin explant cultures is dependent upon p38 signaling. *Wound Repair Regen* 11:346-353.
- Stucki JW, Simon HU (2005) Mathematical modeling of the regulation of caspase-3 activation and degradation. *J Theor Biol* 234:123-131.
- Sugawara T, Gallucci RM, Simeonova PP, Luster MI (2001) Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes. *Cytokine* 15:328-336.
- Sun J, Chen Y, Li M, Ge Z (1998) Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance. *Free Radic Biol Med* 24:586-593.
- Suresh A, Tung F, Moreb J, Zucali JR (1994) Role of manganese superoxide dismutase in radioprotection using gene transfer studies. *Cancer Gene Ther* 1:85-90.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-6.
- Takagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, Hashimoto N, Yodoi J (1999) Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4131-4136.
- Takahashi H, Suzuki Y, Miyauchi Y, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H (2004) Roxithromycin decreases ultraviolet B irradiation-induced reactive oxygen intermediates production and apoptosis of keratinocytes. *J Dermatol Sci* 34:25-33.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208.
- Takano T, Tsutsumi S, Tomisato W, Hoshino T, Tsuchiya T, Mizushima T (2002) Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced apoptosis. *Dig Dis Sci* 47:1546-1553.
- Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T, Itami S, Adachi O, Kawai T, Sanjo H, Yoshikawa K, Terada N, Akira S (1999) Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science* 284:313-316.
- Tanito M, Kwon YW, Kondo N, Bai J, Masutani H, Nakamura H, Fujii J, Ohira A, Yodoi J (2005) Cytoprotective effects of geranylgeranylacetone against retinal photooxidative damage. *J Neurosci* 25:2396-2404.
- Taylor JS, Brockie IR (1988) Synthesis of a trans-syn thymine dimer building block. Solid phase synthesis of CGTAT[t,s]TATGC. *Nucleic Acids Res* 16:5123-5136.
- Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M, Packer L (2001) The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol* 29:26-42.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* 13:152-157.
- Todo T, Tsuji H, Otoshi E, Hitomi K, Kim ST, Ikenaga M (1997) Characterization of a human homolog of (6-4) photolyase. *Mutat Res* 384:195-204.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:349-363.
- Tomic-Canic M, Komine M, Freedberg IM, Blumenberg M (1998) Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J Dermatol Sci* 17:167-181.
- Tomisato W, Tsutsumi S, Tsuchiya T, Mizushima T (2001) Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced necrosis by induction of heat-shock proteins. *Biol Pharm Bull* 24:887-891.
- Tonnesen MG, Feng X, Clark RA (2000) Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5:40-46.
- Topley GI, Okuyama R, Gonzales JG, Conti C, Dotto GP (1999) p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9089-9094.
- Tornaletti S, Pfeifer GP (1996) UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays* 18:221-228.

- Tornaletti S, Hanawalt PC (1999) Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* 81:139-146.
- Toussaint O, Royer V, Salmon M, Remacle J (2002) Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochem Pharmacol* 64:1007-1009.
- Trautinger F, Trautinger I, Kindas-Mugge I, Metze D, Luger TA (1993) Human keratinocytes in vivo and in vitro constitutively express the 72-kD heat shock protein. *J Invest Dermatol* 101:334-338.
- Tremblay PL, Hudon V, Berthod F, Germain L, Auger FA (2005) Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am J Transplant* 5:1002-1010.
- Trott KR, Shirazi A, Heasman F (1999) Modulation of accelerated repopulation in mouse skin during daily irradiation. *Radiother Oncol* 50:261-266.
- Tsuruma T, Yagihashi A, Hirata K, Araya J, Katsuramaki T, Tarumi K, Yanai Y, Watanabe N (2000) Induction of heat shock protein-70 (hsp-70) by intraarterial administration of geranylgeranylacetone. *Transplant Proc* 32:1631-1633.
- Tubiana M, Dutreix M, Wambersie A (1986) Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et les chromosomes, *Radiobiologie Edition: P. Hermann* 33-71.
- Tulard A, Hoffschir F, de Boisferon FH, Luccioni C, Bravard A (2003) Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Radic Biol Med* 35:68-77.
- Turchi L, Chassot AA, Bourget I, Baldescchi C, Ortonne JP, Meneguzzi G, Lemichez E, Ponzio G (2003) Cross-talk between RhoGTPases and stress activated kinases for matrix metalloproteinase-9 induction in response to keratinocytes injury. *J Invest Dermatol* 121:1291-1300.
- Turner CP, Toye AM, Jones OT (1998) Keratinocyte superoxide generation. *Free Radic Biol Med* 24:401-407.
- Tyrrell RM (1996) Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight--from models to reality. *Bioessays* 18:139-148.
- Uchi H, Terao H, Koga T, Furue M (2000) Cytokines and chemokines in the epidermis. *J Dermatol Sci* 24 Suppl 1:S29-38.
- Uitto J, Pulkkinen L (1996) Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. *Mol Biol Rep* 23:35-46.
- Unger T, Juven-Gershon T, Moallem E, Berger M, Vogt Sionov R, Lozano G, Oren M, Haupt Y (1999) Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *Embo J* 18:1805-1814.
- Valk EE, Hornstra G (2000) Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. *Int J Vitam Nutr Res* 70:31-42.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1-40.
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 11:2295-2322.
- Van Kuijk FJ, Handelman GJ, Dratz EA (1985) Consecutive action of phospholipase A2 and glutathione peroxidase is required for reduction of phospholipid hydroperoxides and provides a convenient method to determine peroxide values in membranes. *J Free Radic Biol Med* 1:421-427.
- Van Laethem A, Claerhout S, Garmyn M, Agostinis P (2005) The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1547-1553.
- Van Remmen H, Qi W, Sabia M, Freeman G, Estlack L, Yang H, Mao Guo Z, Huang TT, Strong R, Lee S, Epstein CJ, Richardson A (2004) Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 36:1625-1634.
- Vanmarcke H, Bagniet-Mahieu L, Culot JP, Govaerts P, Holmstock L (1996) Rayonnements ionisants - Effets de faibles doses, J.P. Minon Edition: NIROND 96-03.

- Vollberg TM, Sr., George MD, Jetten AM (1991) Induction of extracellular matrix gene expression in normal human keratinocytes by transforming growth factor beta is altered by cellular differentiation. *Exp Cell Res* 193:93-100.
- Von Sonntag C (1987) New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases. *Free Radic Res Commun* 2:217-224.
- Von Sonntag C (1994) Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research. *Int J Radiat Biol* 65:19-26.
- Waikel RL, Kawachi Y, Waikel PA, Wang XJ, Roop DR (2001) Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat Genet* 28:165-168.
- Wang H, Kochevar IE (2005) Involvement of UVB-induced reactive oxygen species in TGF-beta biosynthesis and activation in keratinocytes. *Free Radic Biol Med* 38:890-897.
- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ (2001) Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13884-13888.
- Wang X, Breggeregere F, Soroka Y, Kayat A, Redziniak G, Milner Y (2004) Enhancement of Fas-mediated apoptosis in ageing human keratinocytes. *Mech Ageing Dev* 125:237-249.
- Wang XW, Zhan Q, Coursen JD, Khan MA, Kontny HU, Yu L, Hollander MC, O'Connor PM, Fornace AJ, Jr., Harris CC (1999) GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3706-3711.
- Ward JF (1985) Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl* 8:S103-111.
- Ward JF (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35:95-125.
- Watanabe S, Wang XE, Hirose M, Oide H, Kitamura T, Miwa H, Miyazaki A, Sato N (1998) Effects of teprenone on gastric epithelial restoration in a rabbit cultured cell model. *J Gastroenterol* 33:153-159.
- Watt FM (1998) Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:831-837.
- Wawersik MJ, Mazzalupo S, Nguyen D, Coulombe PA (2001) Increased levels of keratin 16 alter epithelialization potential of mouse skin keratinocytes in vivo and ex vivo. *Mol Biol Cell* 12:3439-3450.
- Webb A, Li A, Kaur P (2004) Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation* 72:387-395.
- Weedon D, Searle J, Kerr JF (1979) Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. *Am J Dermatopathol* 1:133-144.
- Weil M, Raff MC, Braga VM (1999) Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol* 9:361-364.
- Weinberg WC, Azzoli CG, Chapman K, Levine AJ, Yuspa SH (1995) p53-mediated transcriptional activity increases in differentiating epidermal keratinocytes in association with decreased p53 protein. *Oncogene* 10:2271-2279.
- Weinberg WC, Denning MF (2002) P21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:453-464.
- Weisfelner ME, Gottlieb AB (2003) The role of apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J Drugs Dermatol* 2:385-391.
- Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83:835-870.
- Whitmarsh AJ, Yang SH, Su MS, Sharrocks AD, Davis RJ (1997) Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol* 17:2360-2371.
- Woodworth CD, Wang H, Simpson S, Alvarez-Salas LM, Notario V (1993) Overexpression of wild-type p53 alters growth and differentiation of normal human keratinocytes but not human papillomavirus-expressing cell lines. *Cell Growth Differ* 4:367-376.
- Wu C (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:441-469.
- Xia Z, Dickens M, Raugeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.

- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-704.
- Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Ozawa T (1995) Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun* 209:723-729.
- Young AR (1987) The sunburn cell. *Photodermatol* 4:127-134.
- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ, Jr. (1999) Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18:2892-2900.
- Zhang L, Deng M, Parthasarathy R, Wang L, Mongan M, Molkentin JD, Zheng Y, Xia Y (2005) MEKK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. *Mol Cell Biol* 25:60-65.
- Zhang S, Han J, Sells MA, Chernoff J, Knaus UG, Ulevitch RJ, Bokoch GM (1995) Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* 270:23934-23936.
- Zhao X, Taylor JS (1996) Mutation spectra of TA*, the major photoproduct of thymidyl-(3'5')-deoxyadenosine, in *Escherichia coli* under SOS conditions. *Nucleic Acids Res* 24:1561-1565.
- Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T, Brash DE (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372:773-776.
- Zuliani T, Denis V, Noblesse E, Schnebert S, Andre P, Dumas M, Ratinaud MH (2005) Hydrogen peroxide-induced cell death in normal human keratinocytes is differentiation dependent. *Free Radic Biol Med* 38:307-316.



Etude du pouvoir anti-oxydant du Polyphénol P

Muriel ISOIR

Juillet 2004

177

INTRODUCTION

Le **Polyphénol P** est une catéchine de la famille des flavonoïdes. Ils ont des propriétés anti-oxydantes et anti-thrombotiques (Basu-Modak *et al*, 2003), ils sont des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et désactiveurs de l'oxygène singulet (Ross and Kasum, 2002 ; Rice-Evans *et al*, 1996).

L'objectif de cette étude est :

- 1/ d'évaluer la capacité anti-oxydante de la molécule Polyphénol P
- 2/ de mesurer le pouvoir anti-oxydant du Polyphénol P sur les kératinocytes
- 3/ de mesurer les propriétés anti-oxydantes du Polyphénol P sur l'explant de peau humaine en survie

Cette dernière étape va permettre de mettre en évidence l'effet protecteur du Polyphénol P sur l'explant de peau humaine exposé aux UVB. Seront alors caractérisés, après exposition aux UVB, l'effet anti-apoptotique du Polyphénol P et ses propriétés anti-oxydantes par mesure de l'induction des enzymes de défense dans l'explant.

1/ Evaluation de la capacité anti-oxydante de la molécule par le test ORAC

Résultats du test ORAC sur diverses molécules dont le Polyphénol P

L'activité anti-oxydante d'une dizaine de molécules seront mesurées par rapport à notre référence : le Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) dilué dans le méthanol (MeOH).

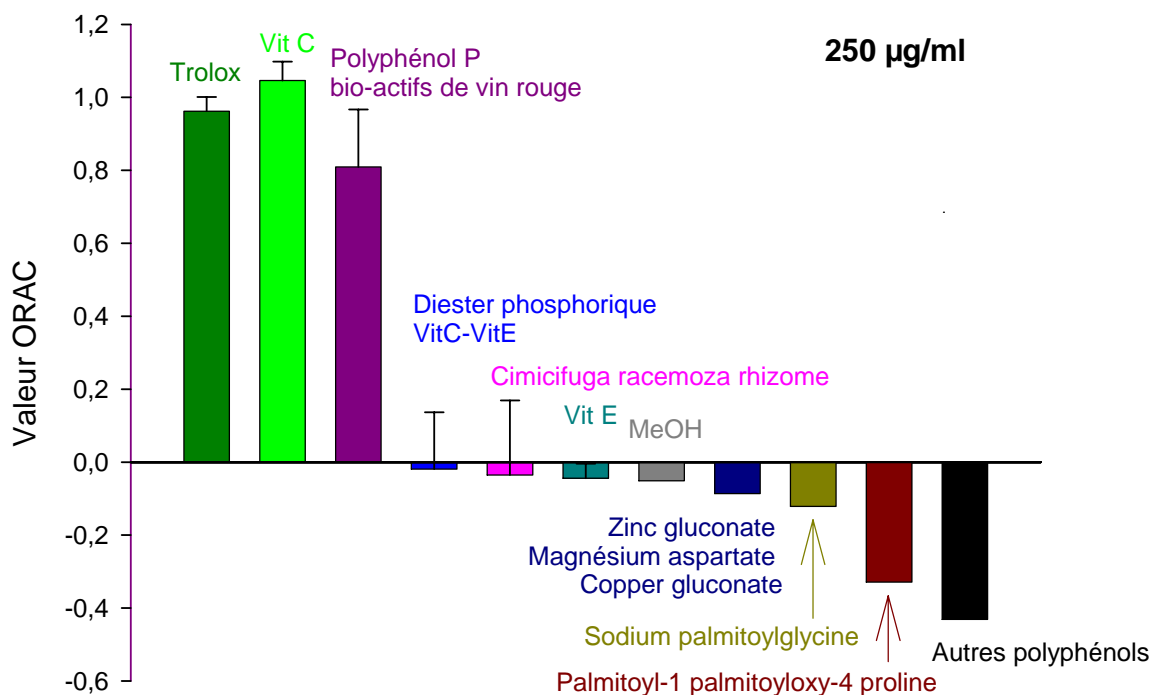


Figure 1 : Résultats du test ORAC sur diverses molécules

D'après les résultats du test ORAC, le choix de la molécule à étudier se porte sur la molécule Polyphénol P.

Les concentrations de la molécule seront exprimées en µg/ml, comme spécifié dans le cahier des charges.

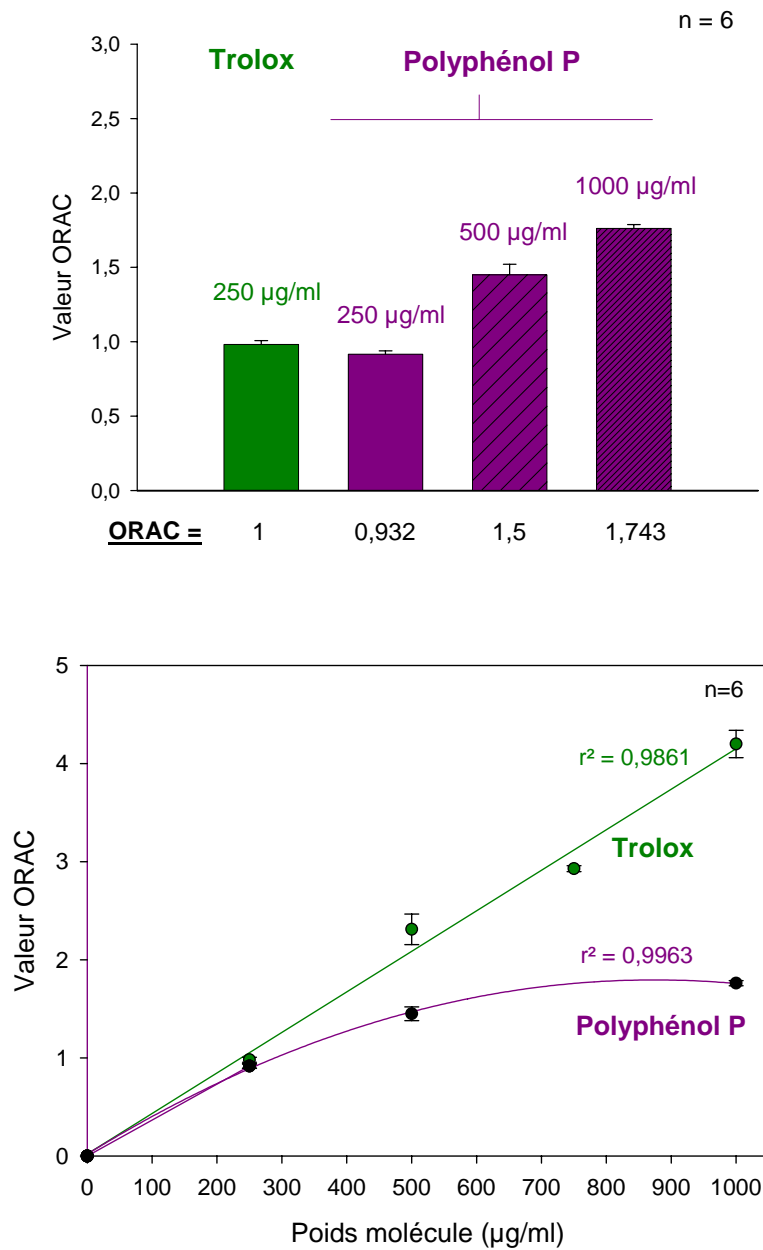


Figure 2 : Résultats du test ORAC sur le Polyphénol P

En conclusion, à poids équivalent, le Polyphénol P possède un pouvoir anti-oxydant comparable au Trolox. Cependant, on notera une saturation de la capacité anti-oxydante de la molécule testée pour les concentrations > 500 µg/ml.

2/ Mesure du pouvoir anti-oxydant du Polyphénol P sur le modèle de kératinocytes de la lignée HaCaT

Principe du test de cytotoxicité au rouge neutre

Après traitement des kératinocytes HaCaT pendant 24 heures au Trolox dilué dans le méthanol (MeOH) et au Polyphénol P à différentes concentrations, on incube les cellules dans une solution de rouge neutre 0,036% à 37°C. Après aspiration de cette solution, on incube les kératinocytes dans un tampon de lyse afin de solubiliser le rouge neutre contenu dans les lysosomes. On lit la DO à 540-550 nm.

Plus la quantité de rouge neutre absorbée sera élevée, plus la molécule sera caractérisée comme toxique pour les cellules.

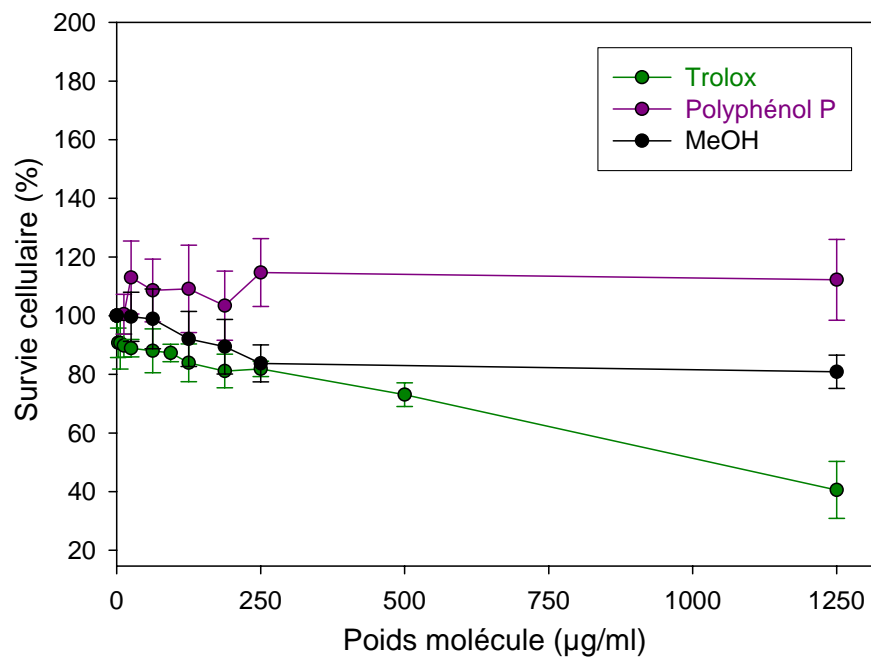
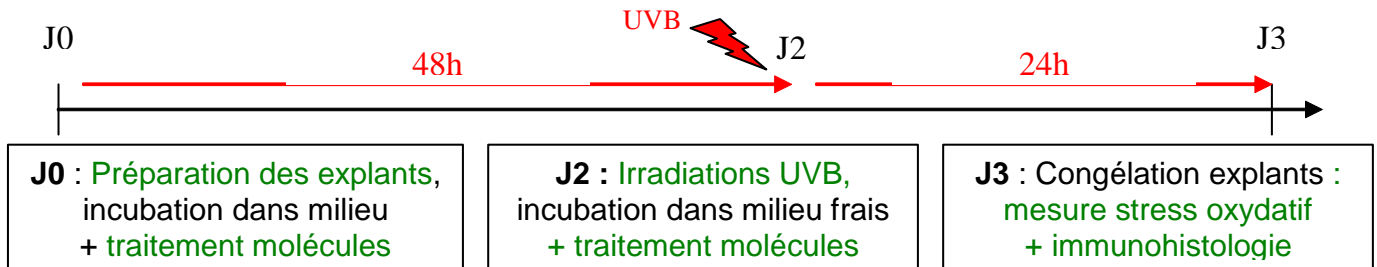


Figure 3 : Cytotoxicité du Trolox et du Polyphénol P sur la survie des kératinocytes HaCaT

En conclusion, le Polyphénol P n'a pas d'effet cytotoxique sur la survie des cellules HaCaT après 24h de traitement par unité de poids, contrairement au Trolox à de fortes concentrations (>500 µg/ml).

3/ Mesure du pouvoir anti-oxydant du Polyphénol P sur le modèle d'explant de peau humaine BIO-EC

Protocole expérimental :



- 48h de traitement pharmacologique préventif des explants (Trolox ou Polyphénol P dilués dans le surnageant à une dose finale de 250 µg/ml) .
- Irradiation UVB à 2J/cm² des explants préalablement traités.
- 24h de traitement pharmacologique curatif des explants (Trolox ou Polyphénol P dilués dans le surnageant à une dose finale de 250 µg/ml) après exposition aux UVB.

Mesure de différents paramètres :

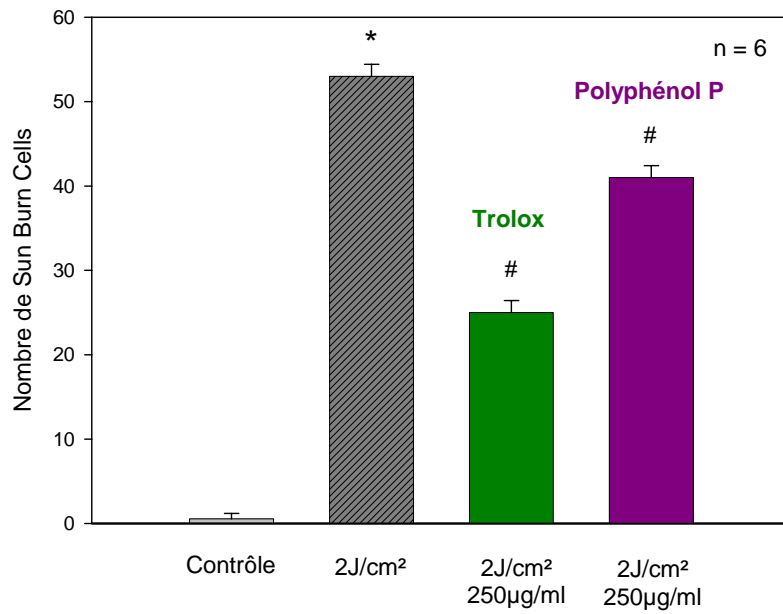
a/ Histologie des cellules en apoptose (comptage des Sun Burn Cells et technique TUNEL)

b/ Activités enzymatiques anti-oxydantes : catalase, glutathion peroxydase (GPx) et superoxyde dismutase (SOD)

a/ Résultats histologiques : mesure des cellules en apoptose

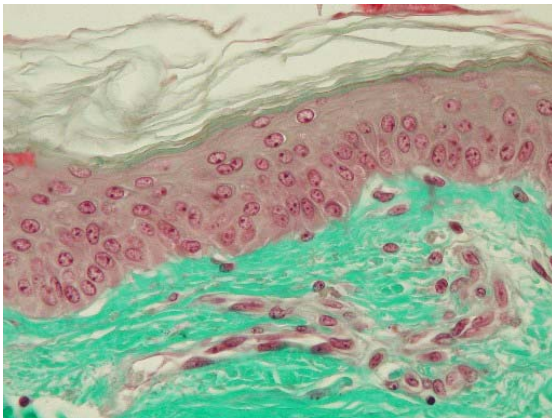
Comptage des Sun Burn Cells, après une coloration au Trichrome de Masson

La SBC, ou « cellule coup de soleil » avec son noyau picnotique et son cytoplasme éosinophile, est caractéristique de l'épiderme des mammifères exposé aux UVB. Elle possède toutes les caractéristiques d'un kératinocyte en apoptose.

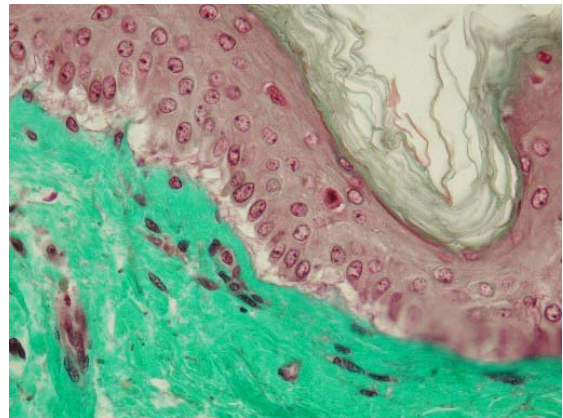


* $p \leq 0,05$ par rapport au contrôle

$p \leq 0,05$ par rapport à l'irradié 2J/cm²



Contrôle



Irradié 2J/cm²

Figure 4: Comptage des Sun Burn Cells

Conclusion :

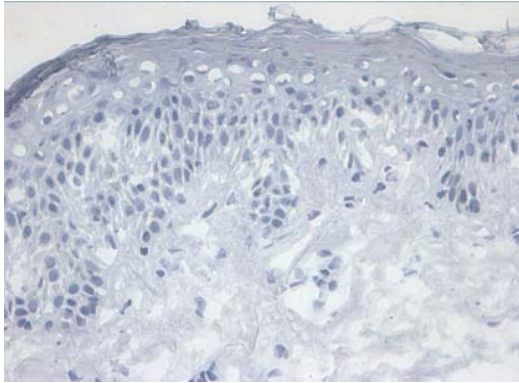
1- Après irradiation UVB de 2J/cm², 52% des kératinocytes entrent en apoptose (Sun Burn Cells).

2- On note un effet protecteur du Trolox (cf. Figure 4 : 26% de kératinocytes en apoptose).

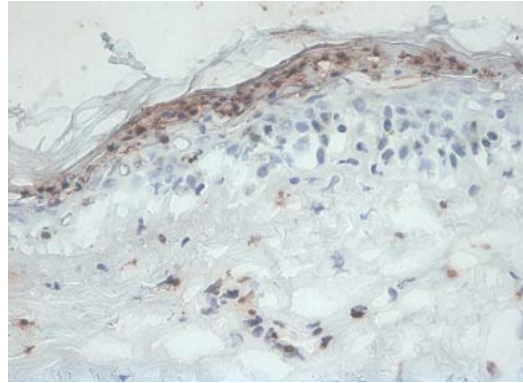
3- On notera une protection moins efficace du Polyphénol P, à poids équivalent (cf. figure 4 : 40 % de kératinocytes en apoptose).

Technique TUNEL

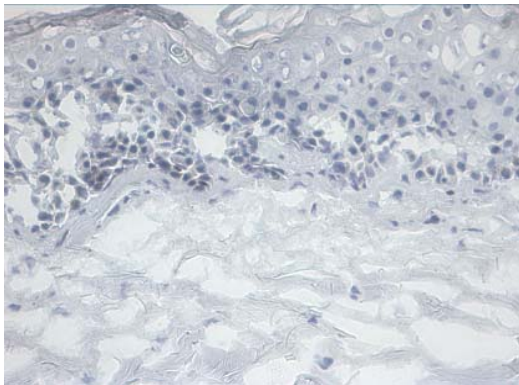
Le test TUNEL permet de révéler sur coupe histologique les cellules apoptotiques. Ce test est basé sur la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN, caractéristique des cellules en apoptose. Ce test est un complément du comptage des SBC ci-dessus.



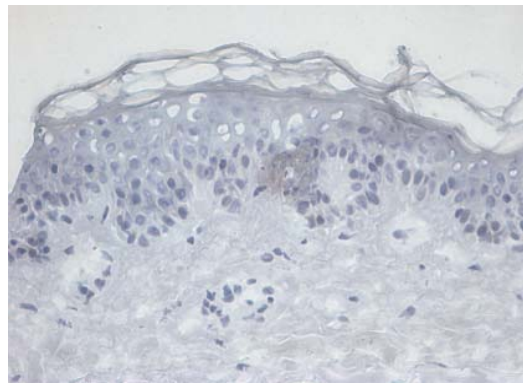
Contrôle



Irradié 2J/cm²



2J/cm²
250 µg/ml Trolox



2J/cm²
250 µg/ml Polyphénol P

n apoptose (Tl

Conclusion :

Après observation de toutes les lames :

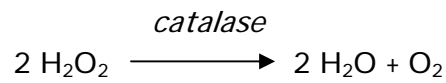
- 1- Augmentation du nombre de kératinocytes en apoptose après irradiation UVB de 2J/cm².
- 2- Le traitement préventif au Trolox (hydrosoluble) présente un fort effet anti-apoptotique.
- 3- Dans nos conditions expérimentales, le Polyphénol P présente également cet effet anti-apoptotique.

b/ Résultats des dosages enzymatiques

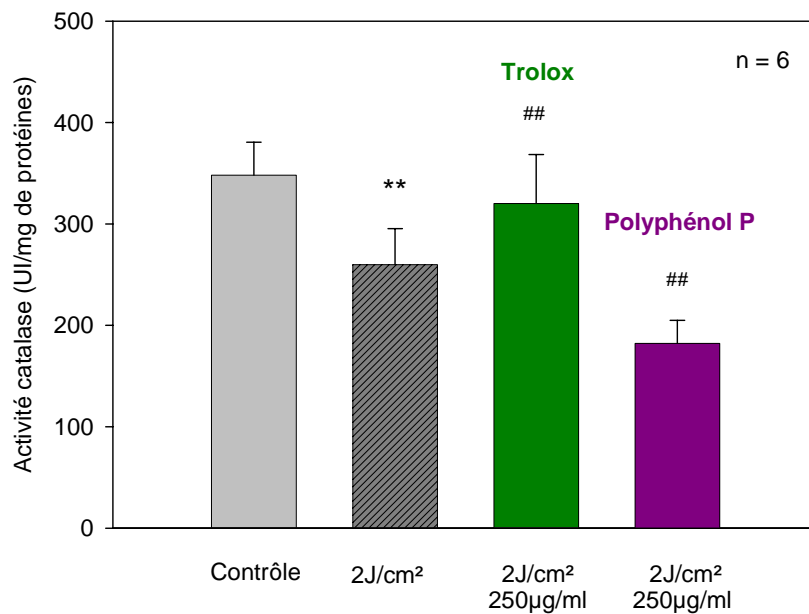
Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les défenses anti-oxydantes, ce qui va entraîner une production massive de ROS, provoquant un stress oxydatif.

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité des 3 enzymes anti-oxydantes majeures : catalase, glutathion peroxydase (GPx) et superoxyde dismutase (SOD).

Principe du dosage de la catalase (méthode de Clairborne et Aebi)



La consommation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est directement proportionnelle à l'activité de la catalase : mesure au spectrophotomètre à 240 nm.



** $p \leq 0,01$ par rapport au contrôle

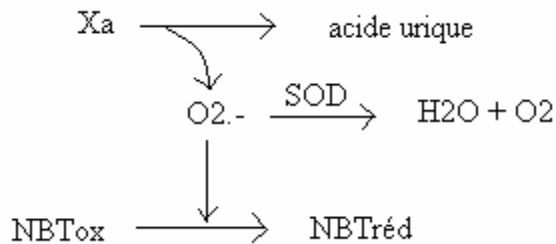
$p \leq 0,01$ par rapport à l'irradié 2J/cm²

Figure 6 : Dosage enzymatique de la catalase

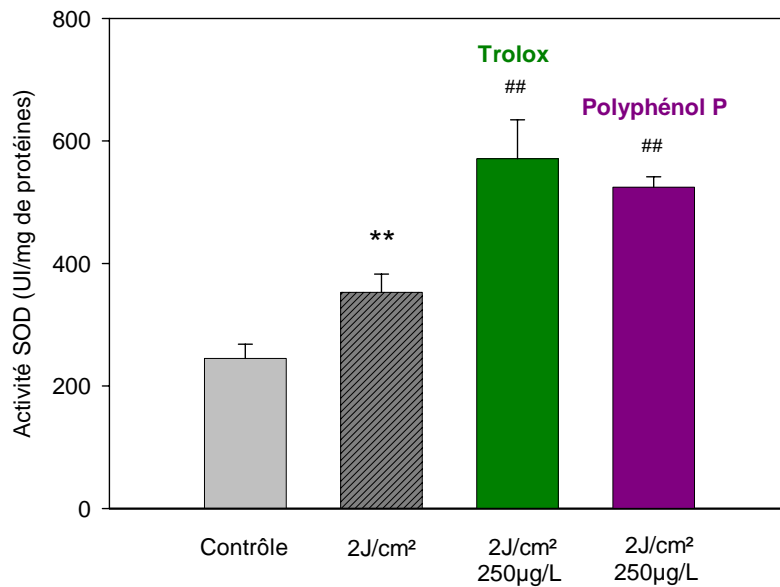
Conclusion :

- 1- Augmentation significative de l'activité de la GPx après irradiation UVB de 2J/cm².
- 2- Le traitement préventif au Trolox permet de maintenir une activité enzymatique de la GPx après irradiation.
- 3- Dans nos conditions expérimentales, le Polyphénol P ne présente pas d'effet protecteur en terme d'activité de la GPx.

Principe du dosage de la SOD (méthode de Mac Cord et Fridovitch)



On suit au spectrophotomètre l'apparition de NBT réduit.



** p ≤ 0,01 par rapport au contrôle
 ## p ≤ 0,01 par rapport à l'irradié 2J/cm²

Figure 8 : Dosage enzymatique de la SOD

Conclusion :

- 1- Augmentation significative de l'activité de la SOD après irradiation UVB de 2J/cm².
- 2- Le traitement préventif au Trolox permet d'augmenter de façon significative cette activité enzymatique de la SOD après irradiation.
- 3- Dans nos conditions expérimentales, le Polyphénol P présente un effet protecteur en terme d'activité de la SOD quasi équivalent au Trolox (à poids équivalent).

CONCLUSIONS GENERALES

Dans nos conditions expérimentales, à poids équivalents :

1. Le Polyphénol P possède une **capacité anti-oxydante** équivalente au Trolox.
2. Le Polyphénol P n'a **pas d'effet cytotoxique sur la survie** des kératinocytes HaCaT après 24h de traitement contrairement au Trolox.
3. Le Polyphénol P possède un **pouvoir anti-apoptotique** significatif mais inférieur à celui du Trolox.
4. Le Polyphénol P possède un **pouvoir anti-oxydant** significatif, notamment en améliorant l'activité anti-oxydante de la **SOD**, mais inférieur à celui du Trolox.



Etude du pouvoir anti-oxydant du geranylgeranylacétone (GGA)

Muriel ISOIR

Septembre 2004

189

INTRODUCTION

Le **geranylgeranylacétone GGA** est un composé polyisoprénoïde très utilisé en clinique pour lutter contre l'ulcère gastrique au Japon. Il est reconnu pour son effet anti-apoptotique; en effet, il est un fort inducteur des « Heat Shock Protein » Hsp, principalement Hsp70 dans de nombreux organes : muqueuse gastrique, intestin, nerf rachidien, hépatocytes, coeur, cerveau, rétine de l'œil et récemment la cochlée de l'oreille (Mikuriya *et al*, 2005; Masuda *et al*, 2003; Fujiki *et al*, 2003; Hirota *et al*, 2000; Ishii *et al*, 2003; Oda *et al*, 2002; Kikuchi *et al*, 2002; Ooie *et al*, 2001; Tsuruma *et al*, 2000).

L'objectif de cette étude est :

1/ d'évaluer la capacité anti-oxydante de la molécule geranylgeranylacétone (GGA)

2/ de mesurer le pouvoir anti-oxydant du GGA sur les kératinocytes

3/ de mesurer les propriétés anti-oxydantes du GGA sur l'explant de peau humaine en survie

Cette dernière étape va permettre de mettre en évidence l'effet protecteur du GGA sur l'explant de peau humaine exposé aux UVB. Seront alors caractérisés, après exposition aux UVB, l'effet anti-apoptotique du GGA ; ses propriétés anti-oxydantes par mesure de l'induction des enzymes de défense dans l'explant ; sa capacité à protéger les cellules suite à une exposition aux UVB par l'expression des Hsp.

1/ Evaluation de la capacité anti-oxydante de la molécule par le test ORAC

Résultats du test ORAC sur le produit final S et la molécule GGA

Les activités anti-oxydantes de ce Produit final et de cette molécule GGA seront mesurées par rapport à notre référence : le Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) dilué dans le méthanol (MeOH).

Produit final = GGA + Crémophore + eau

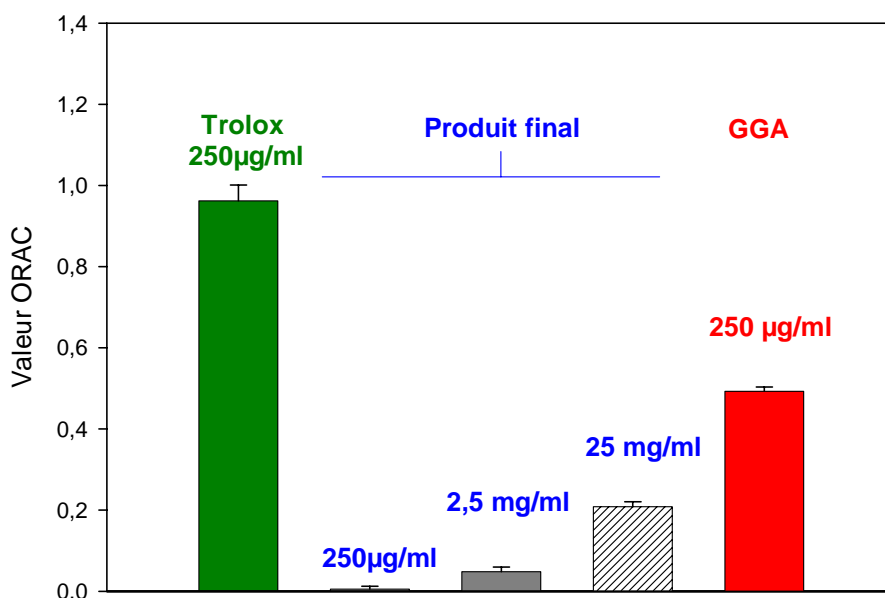


Figure 1 : Valeurs ORAC du Produit final et du GGA

D'après les résultats du test ORAC, le choix de la molécule à étudier se porte sur la molécule geranylgeranylacétone GGA.

Les concentrations du GGA seront exprimées en µM et mM, comme spécifié dans le cahier des charges.

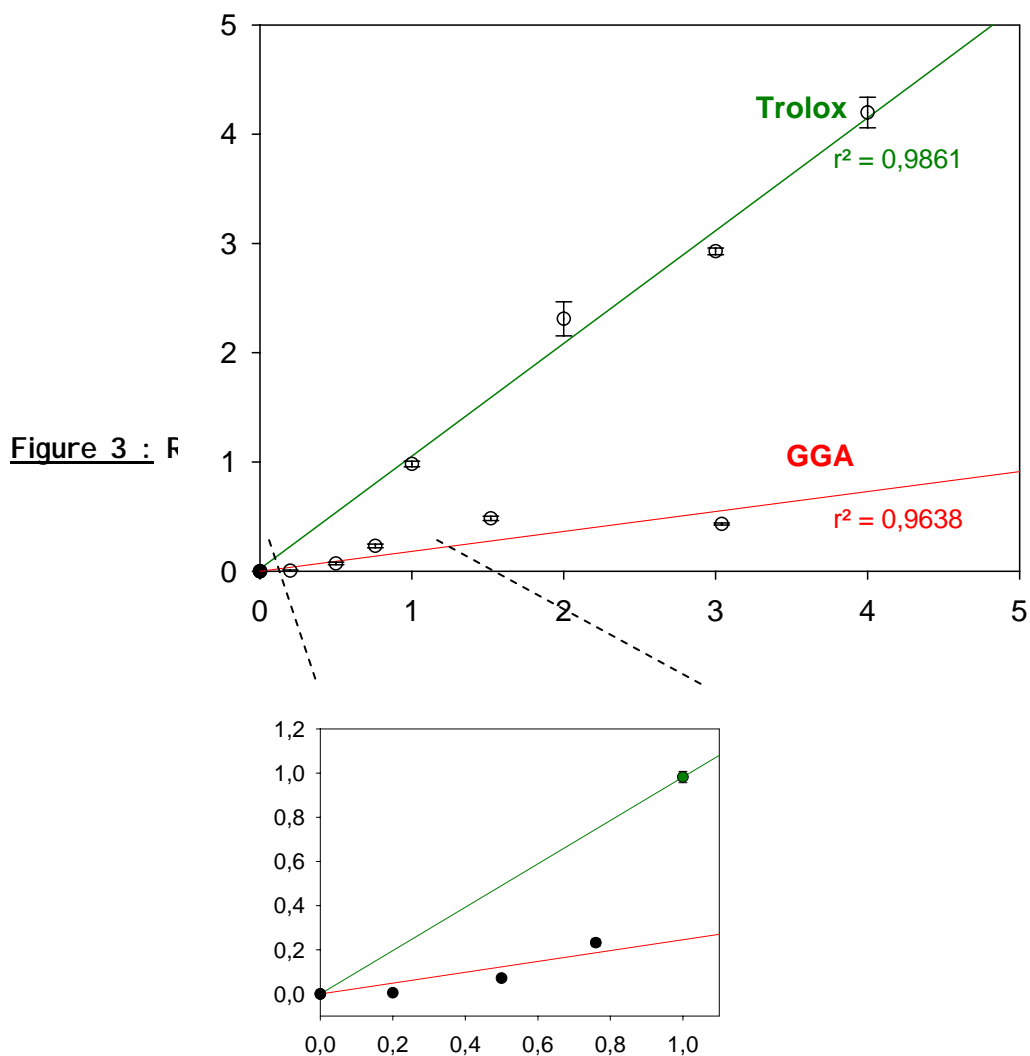


Figure 2 : Résultats du test ORAC sur le GGA

En conclusion, à concentration équivalente, le GGA possède un pouvoir anti-oxydant significatif mais inférieur au Trolox.

2/ Mesure du pouvoir anti-oxydant du GGA sur le modèle de kératinocytes de la lignée de HaCaT

Principe du test de cytotoxicité au rouge neutre

Après traitement des kératinocytes HaCaT pendant 24 heures au Trolox dilué dans le méthanol (MeOH) et au GGA à différentes concentrations, on incube les cellules dans une solution de rouge neutre 0,036% à 37°C. Après aspiration de cette solution, on incube les kératinocytes dans un tampon de lyse afin de solubiliser le rouge neutre contenu dans les lysosomes. On lit la DO à 540-550 nm.

Plus la quantité de rouge neutre absorbée sera élevée, plus la molécule sera caractérisée comme toxique pour les cellules.

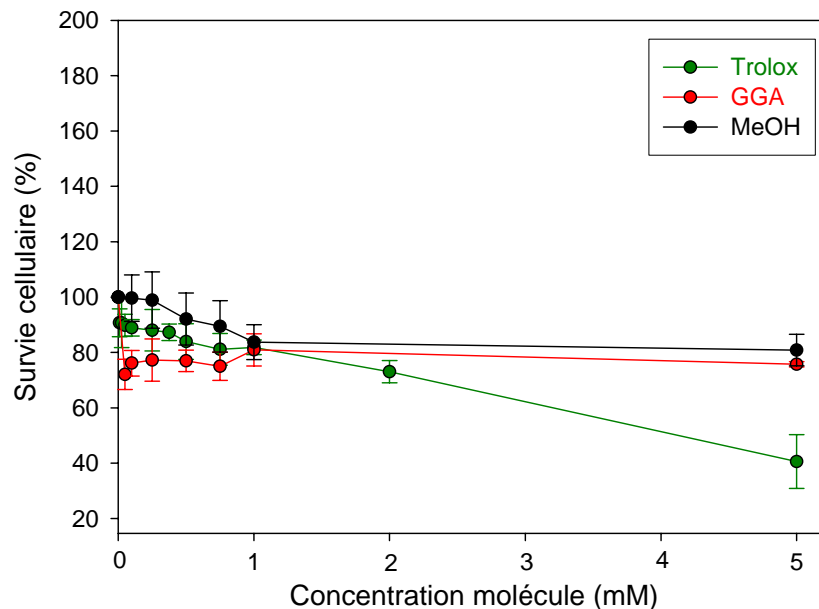
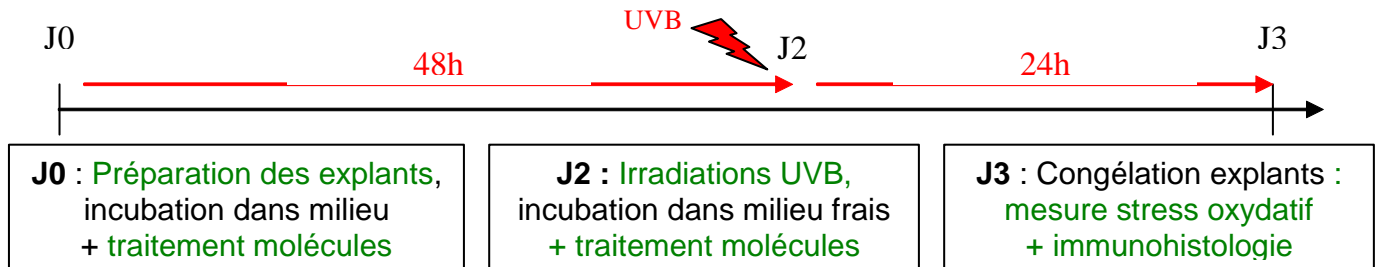


Figure 3 : Cytotoxicité du Trolox et du GGA sur la survie des kératinocytes HaCaT

En conclusion, le GGA n'a pas d'effet cytotoxique sur la survie des cellules HaCaT après 24h de traitement par unité de poids, contrairement au Trolox à de fortes concentrations (>500 µg/L).

3/ Mesure du pouvoir anti-oxydant du GGA sur le modèle d'explant de peau humaine BIO-EC

Protocole expérimental :



- 48h de traitement pharmacologique préventif des explants (Trolox ou GGA dilués dans le surnageant à une dose finale de 250 µg/L) .
- Irradiation UVB à 2J/cm² des explants préalablement traités.
- 24h de traitement pharmacologique curatif des explants (Trolox ou GGA dilués dans le surnageant à une dose finale de 250 µg/L) après exposition aux UVB.

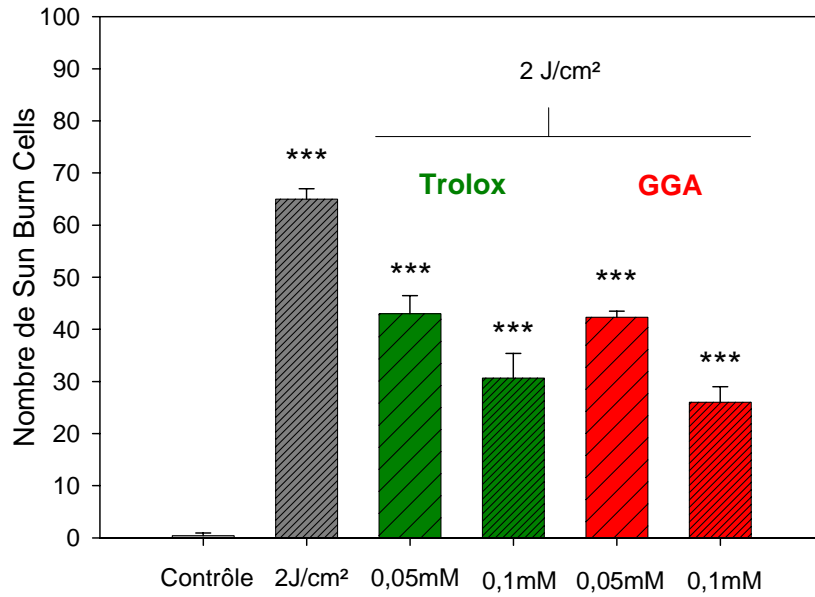
Mesure de différents paramètres :

- a/ Histologie des cellules en apoptose (comptage des Sun Burn Cells et technique TUNEL)
- b/ Activités enzymatiques anti-oxydantes : catalase, glutathion peroxydase (GPx)
- c/ Immunomarquage des Heat Shock Proteins HSP 27 et 70

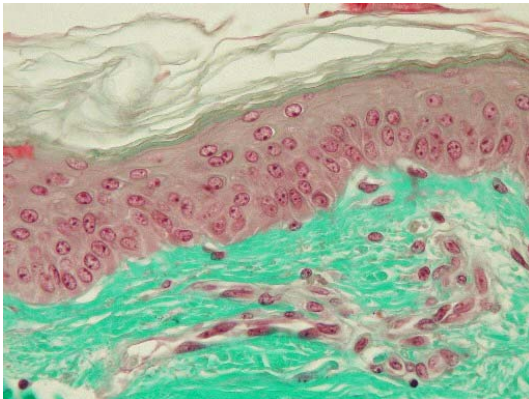
a/ Résultats histologiques : mesure des cellules en apoptose

Comptage des Sun Burn Cells, après une coloration au Trichrome de Masson

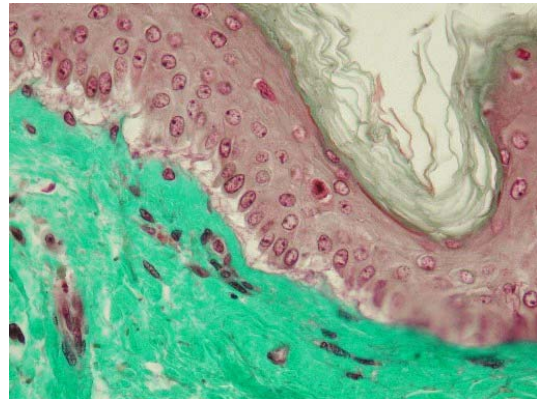
La SBC, ou « cellule coup de soleil » avec son noyau picnotique et son cytoplasme éosinophile, est caractéristique de l'épiderme des mammifères exposé aux UVB. Elle possède toutes les caractéristiques d'un kératinocyte en apoptose.



*** $p \leq 0,001$ par rapport au contrôle



Contrôle



Irradié 2J/cm²

Figure 4: Comptage des Sun Burn Cells

Conclusion :

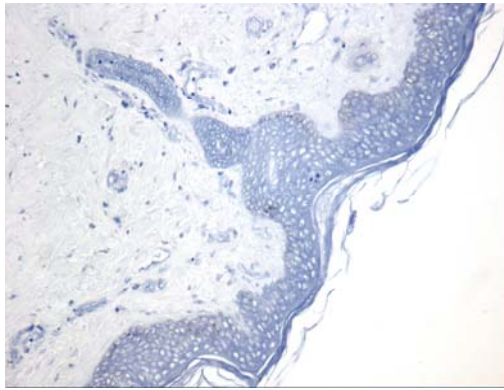
4- Après irradiation UVB de 2J/cm², 65% des kératinocytes entrent en apoptose (Sun Burn Cells).

5- On note un effet protecteur du Trolox.

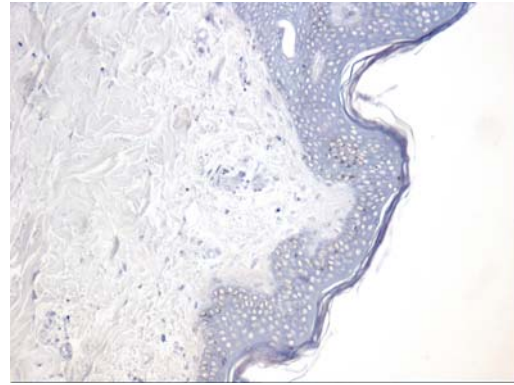
6- On note une protection efficace du GGA, supérieure au Trolox.

Technique TUNEL

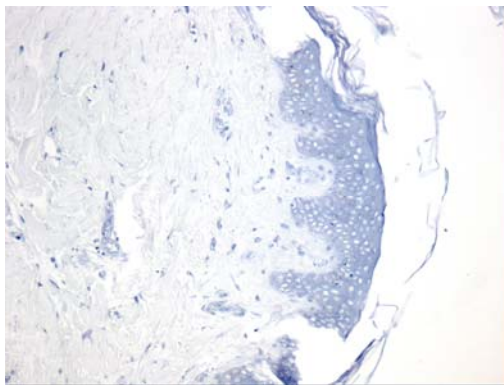
Le test TUNEL permet de révéler sur coupe histologique les cellules apoptotiques. Ce test est basé sur la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN, caractéristique des cellules en apoptose. Ce test est un complément du comptage des SBC ci-dessus.



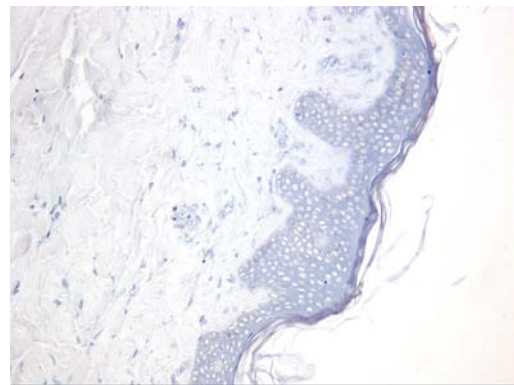
Contrôle



Irradié 2J/cm²



2J/cm²
0,1mM Trolox



2J/cm²
0,1mM GGA

Figure 5 : Cellules en apoptose (TUNEL Objectif x10)

Conclusion :

Après observation de toutes les lames :

4- Augmentation du nombre de kératinocytes en apoptose après irradiation UVB de 2J/cm².

5- Le traitement préventif au Trolox (hydrosoluble) présente un effet anti-apoptotique.

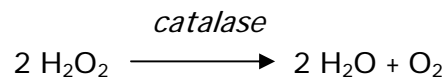
6- Dans nos conditions expérimentales, le GGA présente également cet effet anti-apoptotique.

b/ Résultats des dosages enzymatiques

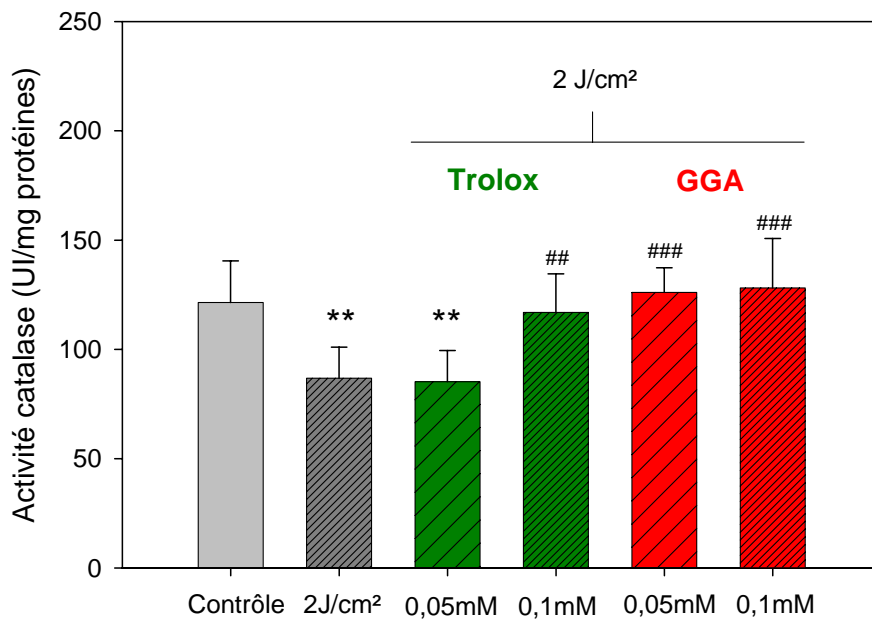
Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les défenses anti-oxydantes, ce qui va entraîner une production massive de ROS, provoquant un stress oxydatif.

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité de 2 enzymes anti-oxydantes majeures : catalase et glutathion peroxydase (GPx).

Principe du dosage de la catalase (méthode de Clairborne et Aebi)



La consommation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est directement proportionnelle à l'activité de la catalase : mesure au spectrophotomètre à 240 nm.



** $p \leq 0,01$ par rapport au contrôle

$p \leq 0,01$ par rapport à l'irradié $2\text{J}/\text{cm}^2$

$p \leq 0,001$ par rapport à l'irradié $2\text{J}/\text{cm}^2$

Figure 6 : Dosage enzymatique de la catalase

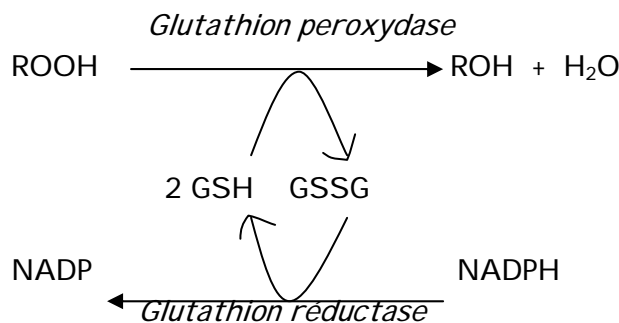
Conclusion :

4- Diminution significative de l'activité enzymatique de la catalase après irradiation UVB de 2J/cm².

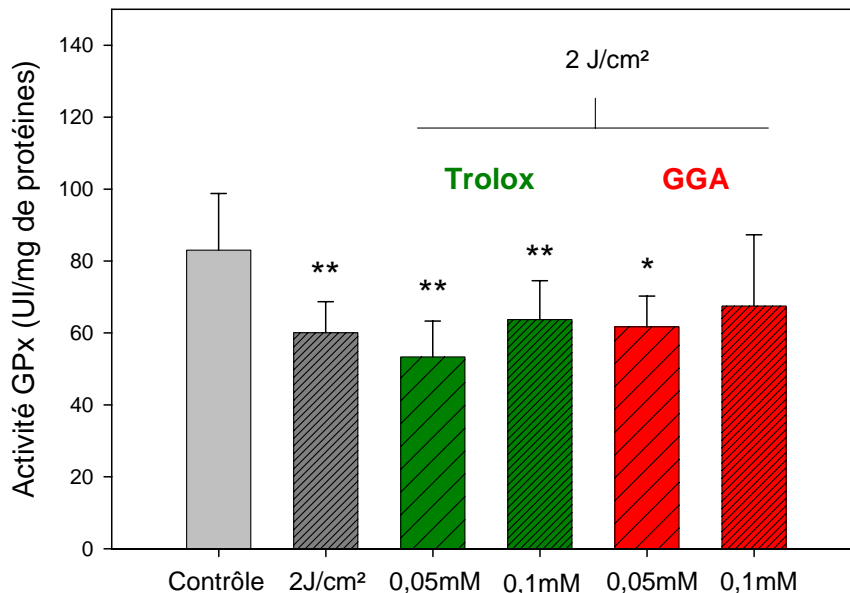
5- Le traitement préventif au Trolox permet de rétablir une activité enzymatique de la catalase proche de son niveau de référence.

6- Dans nos conditions expérimentales, le GGA présente un effet protecteur en terme d'activité de la catalase.

Principe du dosage de la GPx (méthode de Lawrence et Burck)



On mesure l'oxydation du NADPH, c'est à dire la disparition de NADPH réduit introduit dans le volume réactionnel : mesure au spectrophotomètre à 340 nm.



** p < 0,01 * p ≤ 0,05 par rapport au contrôle

Figure 7 : Dosage enzymatique de la GPx

Conclusion :

4- Diminution significative de l'activité de la GPx après irradiation UVB de 2J/cm².

5- Les traitements préventifs au Trolox et au GGA ne présentent pas d'effet protecteur en terme d'activité de la GPx, dans nos conditions expérimentales.

c/ Immunomarquage des Heat Shock Proteins HSP 27 et 70

Les protéines de stress ou « Heat Shock Proteins » (Hsp) exercent des fonctions essentielles à la vie cellulaire mais aussi à la survie lors de stress d'origine chimique, physique ou métabolique.

Certaines Hsp, comme Hsp27 et Hsp70, jouent le rôle de molécules chaperonnes, en régulant l'organisation du cytosquelette d'actine et en modulant l'état redox des cellules. Leur surexpression protège efficacement les cellules contre différents stress comme l'hyperthermie, le stress oxydatif et plusieurs drogues cytotoxiques.

HSP27 est exprimée de manière constitutive tandis que HSP70 est quasi absente et hautement inductible face à un stress. Elles subissent alors une translocation dans le noyau.

HSP 27

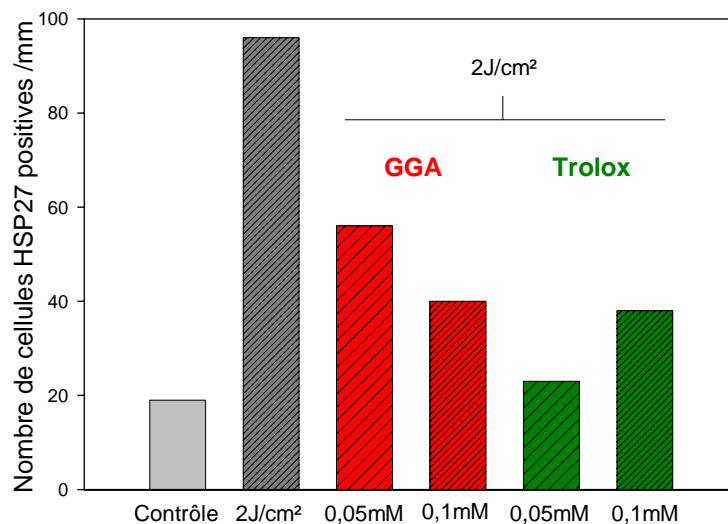
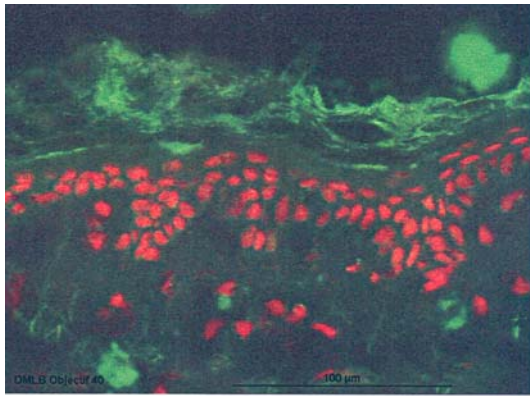
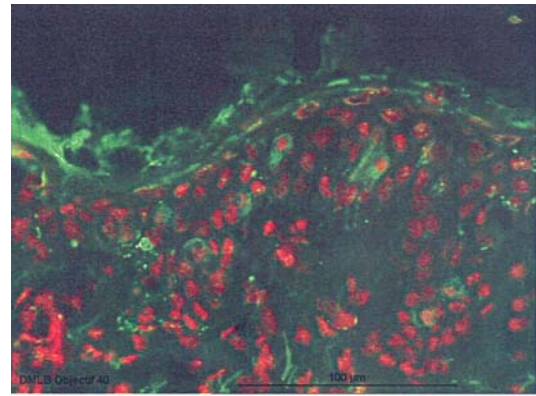


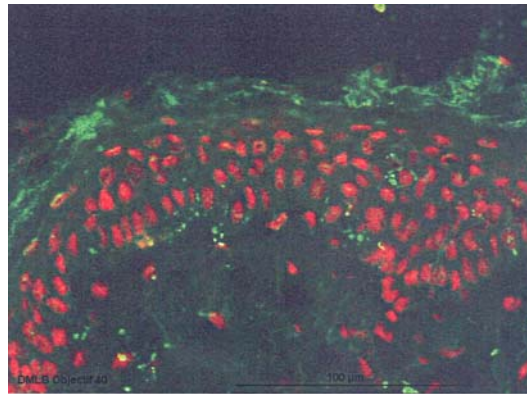
Figure 8 : Comptage des cellules HSP 27 positives



Contrôle



Irradié 2J/cm²



2J/cm²
0,1mM GGA

Figure 9 : Immunomarquage des cellules HSP 27 positives

Après observation de toutes les lames :

- 1- On observe une forte induction des HSP27 après exposition de 2J/cm².
- 2- Les traitements au GGA et Trolox semblent réduire le nombre d'HSP27 activées.

HSP 70

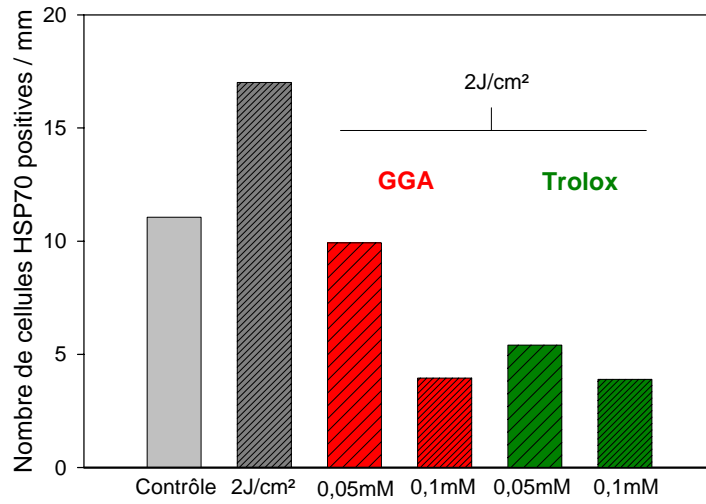


Figure 10 : Comptage des cellules HSP 70 positives

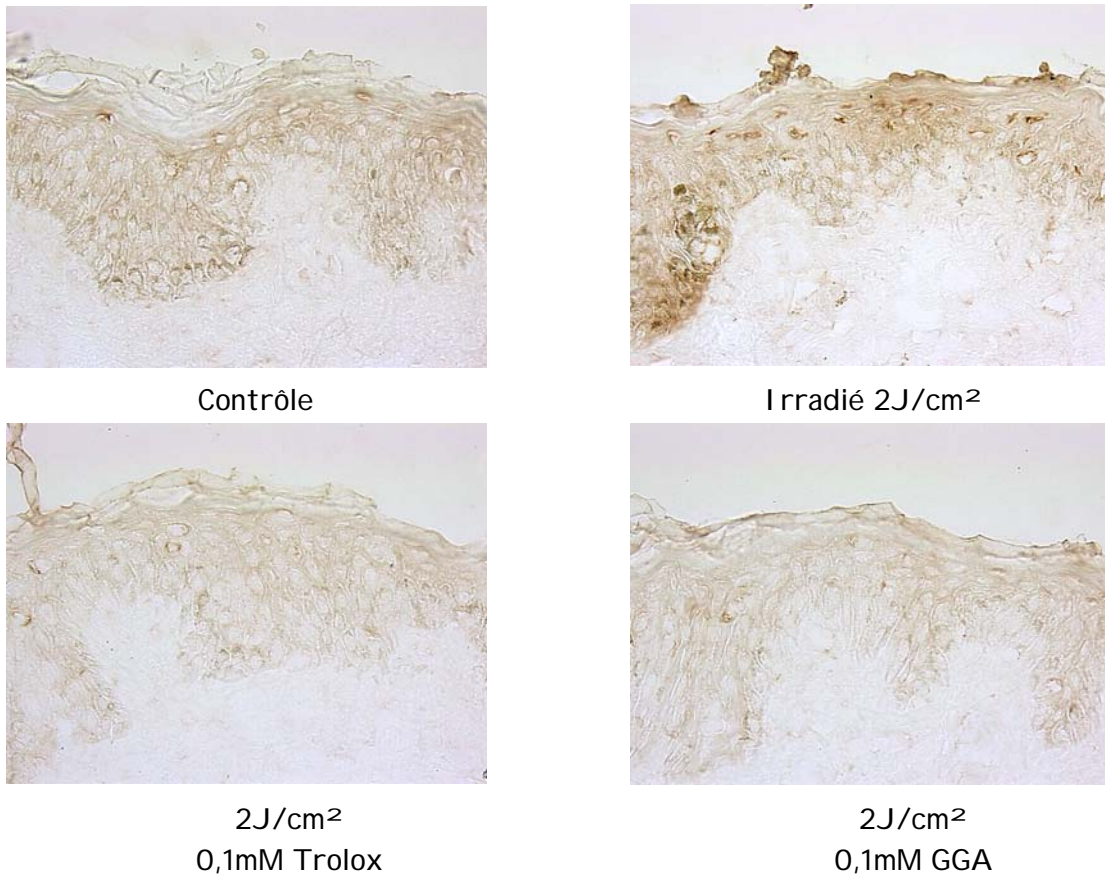


Figure 11 : Immunomarquage des cellules HSP 70 positives

Après observation de toutes les lames :

- 1- On observe une forte induction des HSP70 après exposition de 2J/cm².
- 2- Les traitements au GGA et Trolox semblent réduire le nombre d'HSP70 activées.

CONCLUSIONS GENERALES

Dans nos conditions expérimentales, à concentrations équivalentes :

5. Le GGA possède une **capacité anti-oxydante** significative mais inférieure au Trolox.

6. Le GGA n'a **pas d'effet cytotoxique sur la survie** des kératinocytes HaCaT après 24h de traitement contrairement au Trolox.

7. Le GGA possède un **pouvoir anti-apoptotique** significatif supérieur à celui du Trolox.

8. Le GGA possède un **pouvoir anti-oxydant** significatif, notamment en améliorant l'activité anti-oxydante de la **catalase**, équivalent au Trolox.

9. Le GGA semble **réduire le nombre d'HSP27 et HSP70 activées**, ce qui peut laisser supposer que ce traitement a permis aux kératinocytes de lutter rapidement et efficacement contre l'atteinte de la peau par les UVB.

RESUME Thèse

La peau humaine est un tissu cible majeur des rayonnements ionisants (RI) et UVB. Nous avons mis au point un modèle d'explant de peau et choisi 2 types de kératinocytes NHEK et HaCaT pour étudier la survie et le stress oxydatif induits par ces rayons. Nous avons évalué l'atteinte oxydative par mesure des ERO produites et des défenses anti-oxydantes cellulaires induites. Nous avons observé dans la peau irradiée aux RI une modulation de l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du stress oxydatif, en accord avec la diminution des activités enzymatiques de la catalase, glutathion peroxydase et superoxyde dismutase. Le déséquilibre observé entre l'expression des gènes anti- et pro-apoptotiques montre que l'apoptose des kératinocytes serait en partie dépendante de la production d'ERO radio-induite. Nous avons mis en évidence la différence de radiosensibilité des NHEK et HaCaT qui serait liée à leur réponse oxydante différentielle. De plus, nous avons montré qu'au cours de la réépithélialisation cutanée, les NHEK activés après RI expriment la kératine 6, relarguent des cytokines pro-inflammatoires et prolifèrent, sans modification de leur différenciation. Le traitement des NHEK avec le geranylgeranylacétone (GGA) a un effet bénéfique sur leur activation radio-induite en augmentant le relargage d'IL-1, leur migration dans la zone "scrappée" et leur survie. Le GGA a un effet anti-apoptotique (induction d'Hsp70-caspase3) et migratoire (activation de P38/RhoA) sur les NHEK, mais après RI, seule la voie caspase-3 est induite. Ce travail contribue à une meilleure compréhension des dommages cutanés après RI et du mode d'action du GGA accélérant la réépithélialisation.

ABSTRACT

Human skin is a major target tissue for ionising radiation (IR) and UVB. We developed a skin explant model and used 2 types of keratinocytes to study survival and oxidative stress induced by these radiations. We examined oxidative damages by measuring ROS produced and cellular anti-oxidant defences induced. We observed into skin exposed to IR a modulation of genes expression implied in the control of oxidative stress, confirmed by the decrease of catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase enzymatic activities. The imbalance observed between anti- and pro-apoptotic genes expression shows that keratinocytes apoptosis may be partly dependent on radio-induced ROS production. We showed the difference of radiosensitivity between NHEK and HaCaT, which may be linked to their differential oxidative responses. In addition, during reepithelialization, we demonstrated that activated NHEK after IR express keratin 6, release pro-inflammatory cytokines and proliferate, without modification of their differentiation. Treatment of NHEK with geranylgeranylacetone (GGA) has a beneficial effect on their radio-induced activation by increasing IL-1 release, their migration in scrapped area and their survival. GGA has an anti-apoptotic ability (induction of Hsp70-caspase3 pathway) and migratory properties (P38/RhoA activation) on NHEK, but after IR, only caspase-3 pathway is induced. This work thus contributes to the understanding of cutaneous damages after IR and GGA mechanism of action which accelerates reepithelialization.