

L'homéostasie redox dans la peau et sa modulation par l'environnement

Laurent Marrot est ingénieur et docteur en biophysique moléculaire, senior expert et responsable d'un pôle de recherche sur l'homéostasie redox au sein de la Recherche Avancée de L'Oréal¹.

L'oxygène, indispensable à notre vie, peut aussi devenir, dans certaines conditions, une forme de poison pour notre organisme s'il est en excès. Dans le cas de la peau, nous allons voir qui sont les acteurs de ce déséquilibre, quelles en sont les cibles, pourquoi et comment il est nécessaire de s'en protéger.

1 Le stress oxydant dans la peau : acteurs chimiques et cibles

1.1. Les acteurs chimiques du stress oxydant

Le stress oxydant est une situation dans laquelle la cellule ou l'organe, la peau dans notre cas, n'est plus capable de faire face à toutes les agressions liées aux espèces réactives de l'oxygène. Nous

1. www.loreal.fr

verrons plus loin comment se forment ces espèces, dont les plus dangereuses, du moins quand elles sont en excès, sont l'oxygène singulet² $^1\text{O}_2$, l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, l'eau oxygénée ou peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui produit le radical hydroxyle OH^\bullet en présence d'ions fer... (Figure 1). Cette surproduction d'espèces réactives de l'oxygène dans l'organisme entraîne entre autres la peroxydation lipidique³, donc la production des peroxydes et d'aldéhydes très réactifs qui agressent encore davantage les cellules. Celles-ci peuvent alors se trouver en situation de stress sévère, car un certain nombre d'éléments cellulaires essentiels sont alors endommagés.

1.2. Les facteurs du stress oxydant de la peau

Les facteurs qui, dans la peau, participent à la formation de ces espèces réactives de l'oxygène, sont présentés sur la Figure 2.

2. Oxygène singulet : état excité de la molécule de dioxygène.

3. Peroxydation lipidique : réaction en chaîne qui est un exemple d'oxydation très dangereux pour les cellules provoqué par les dérivés de l'oxygène, en particulier les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) ou peroxydes (ROO^\bullet).

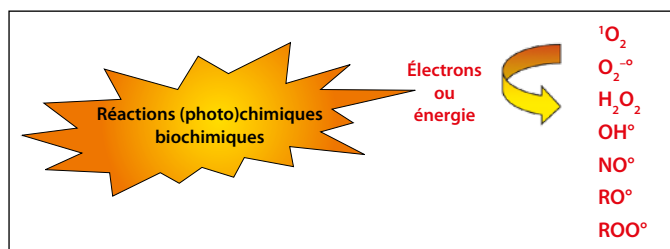
Un facteur bien connu pouvant avoir des effets délétères est le soleil, et nous expliquerons comment les rayons ultra-violetts provoquent ces oxydations destructrices. De plus, il faut savoir qu'il existe des partenariats indésirables entre le soleil et certains produits chimiques ou certains médicaments comme des anti-inflammatoires, des antibactériens, des antidépresseurs, qui réagissent à la lumière et produisent des espèces réactives de l'oxygène quand ils sont exposés au soleil (par exemple, par photosensibilité médicamenteuse).

La pollution est un autre facteur dont on en parle beaucoup, bien que son impact dermatologique soit encore assez mal connu. On sait très bien comment la pollution impacte le poumon, le système cardiovasculaire, même le système nerveux. Les effets sur la peau sont moins clairs mais les pics de pollution sont parfois associés à des intolérances cutanées, d'après les dermatologues. On sait que les molécules de la surface de la peau sont endommagées par l'ozone, par les particules issues de la combustion, par certains métaux, mais on ne sait pas encore comment ces facteurs agissent en profondeur.

L'inflammation est un autre facteur bien décrit car les

Figure 1

Le stress oxydant est la conséquence d'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène que la cellule n'arrive plus à gérer. En conséquence, des réactions d'oxydation vont altérer des molécules essentielles à sa physiologie.



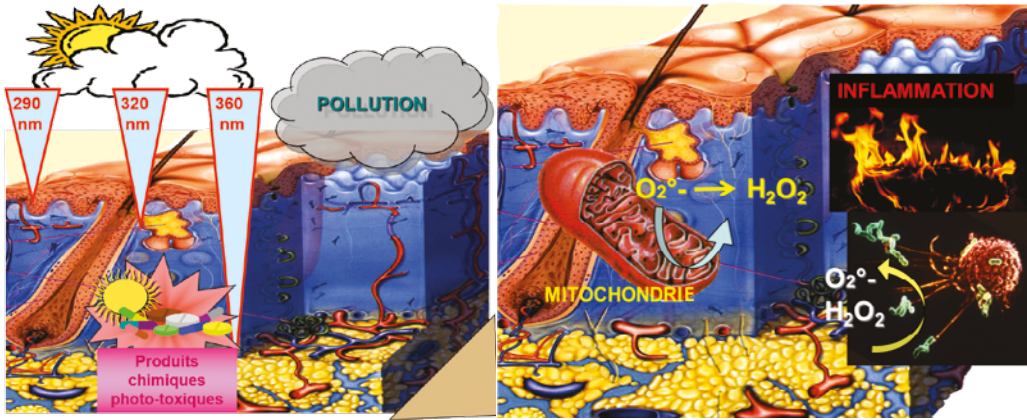


Figure 2

Coupe de la peau. Le stress oxydant dans la peau a des origines variées, essentiellement environnementales : le soleil et en particulier les UV, la pollution, des médicaments qui réagissent au soleil. L'inflammation ou l'activité mitochondriale liée au métabolisme cellulaire y contribue aussi.

cellules qui interviennent dans les processus immunitaires et d'inflammation produisent des espèces réactives de l'oxygène, par exemple, pour tuer les bactéries.

Enfin, l'oxygène est indispensable à la vie, il est utilisé entre autres par la mitochondrie, organelle dont le travail est de nous fournir de l'énergie et aussi de participer au métabolisme. Dans ce cadre, la chaîne respiratoire de la mitochondrie produit aussi des espèces réactives de l'oxygène, que la cellule doit être capable d'éliminer parce que de toute façon, c'est le prix à payer pour vivre en aérobie !

1.3. Cibles biologiques du stress oxydant et mécanismes d'action

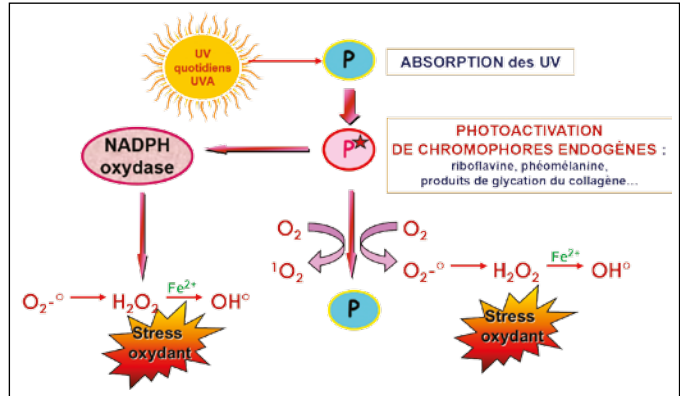
1.3.1. Les chromophores

Ce n'est pas le photon lumineux qui produit directement de l'oxydation, mais il trouve dans la peau des molécules

relais ou *chromophores*. Le chromophore absorbe des photons et utilise leur énergie pour s'activer chimiquement (Figure 3). Les chromophores naturellement présents dans la peau sont par exemple les structures hèmes (famille de l'hémoglobine), des produits d'oxydation du collagène, la riboflavine ou la phéomélanine (pigment roux), qui captent l'énergie des photons UVA et UVB. Ces molécules se désactivent en cédant des électrons à de l'oxygène localement présent, qui se transforme en anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ puis parfois en eau oxygénée H_2O_2 . En présence de traces de fer, H_2O_2 réagit en produisant un véritable missile chimique, le radical hydroxyle OH^{\bullet} , qui attaque la plupart des molécules biologiques. Le transfert d'énergie à l'oxygène peut aussi conduire à la formation de l'état excité singulet de l'oxygène 1O_2 , qui est aussi une espèce assez réactive. En

Figure 3

Le stress oxydant produit par les UV s'explique par des réactions photochimiques impliquant des chromophores, molécules naturellement présentes dans la peau qui s'activent en absorbant le rayonnement (P^*). Le retour à la normale se fait en cédant de l'énergie ou des électrons à l'oxygène. Il se forme alors des espèces réactives oxydantes qui agressent la cellule.



réponse aux UVA, il a aussi été montré que des oxydases cellulaires s'activaient et contribuaient aussi à altérer l'homéostasie redox dans la peau en produisant elles-mêmes le superoxyde.

1.3.2. Les molécules biologiques cibles du stress oxydant dans la peau

Le squalène⁴, qui est un composant du sébum⁵ et constitue un lipide protecteur de la peau, peut être peroxydé très rapidement sous l'action des UV ou de l'ozone. Ce processus entraîne non seulement la perte de cette protection de surface, mais en plus la production des sous-produits de ces oxydations qui sont de petites molécules elles-mêmes très réactives

4. Squalènes : hydrocarbures insaturés, liquides contenus dans de nombreux tissus animaux (foie des requins et squales majoritairement). Le squalène est utilisé dans les cosmétiques et plus récemment comme adjuvant immunologique dans les vaccins.
5. Sébum : sécrétion par les glandes sébacées de la peau, d'un film lipidique qui sert à la protéger et, mélangée à la sueur, la protège du dessèchement.

(Figure 4). Quand on examine le stratum, c'est-à-dire la partie la plus superficielle de l'épiderme, chez des personnes soumises à la pollution (ou la fumée de cigarette) ou aux UV, on observe non seulement l'altération du squalène (Figure 4A), mais aussi l'oxydation des protéines de surface : la fonction barrière de la peau est impactée (Figure 4B). Dans les cellules, les lipides des membranes sont aussi sujets au processus de peroxydation, ce qui conduit parfois à la mort cellulaire où à des réactions inflammatoires.

L'ADN (Figure 4C) est lui aussi endommagé par les radicaux libres, qui sont capables de casser la double hélice soit en simple brin, soit en double brins, entraînant ainsi des perturbations dans l'organisation du matériel génétique. Ces cassures, introduites de façon aléatoire, participent à l'instabilité génétique avec des risques de réparation et de recombinaisons parfois aberrantes, qui peuvent être favorables à l'évolution vers le cancer.

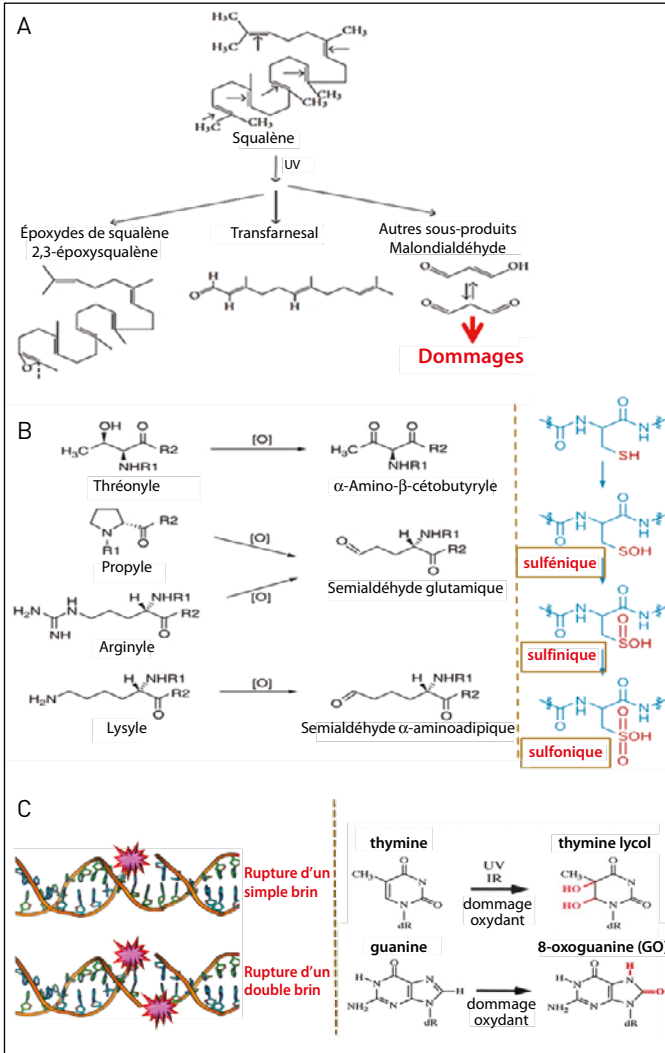


Figure 4

Les cibles biologiques du stress oxydant dans la peau : lipides (ici le squalène) (A), protéines (B) et ADN (C). Les protéines de la couche superficielle de la peau s'oxydent sous l'effet des UV et de la pollution en donnant lieu à des radicaux sulfoniques, sulfiniques et sulféniques.

En plus de cet impact sur la structure des brins de l'ADN, il peut aussi se produire des oxydations des bases qui le composent. Ces bases sont de petites molécules chimiques comme la thymine ou la guanine de la figure et constituent des lettres de notre code génétique. Si elles sont oxydées, ces lettres deviennent aberrantes, et la cellule ne les comprend plus au moment d'exprimer ses gènes ou de répliquer son ADN pour le

transmettre lors de la division cellulaire. Soit elle ne parvient plus à réaliser ces processus, soit elle accepte le risque d'erreurs, ce qui induit des mutations et participe *in fine* à l'évolution vers le cancer. Même si la nature nous a dotés de systèmes de réparation de l'ADN efficaces et fidèles, le risque d'erreurs augmente dans un contexte biologique pro-oxydant susceptible d'endommager l'ADN.

Les protéines cellulaires peuvent aussi être les cibles des oxydations, certains acides aminés y étant particulièrement sensibles, comme le montre la **Figure 4B**. Les structures cellulaires ou certaines activités enzymatiques peuvent s'en trouver irrémédiablement endommagées.

1.4. Les dommages cutanés causés par le stress oxydant

1.4.1. Études in vivo

L'oxydation conduit à des dommages des structures dans la peau visibles au microscope si l'on dispose d'anticorps dirigés contre ces lésions. La **Figure 5A** montre l'image au microscope d'une coupe de peau traitée par un marquage global des oxydations protéiques. Sous la couche de surface constituée par l'épiderme (en bleu plus soutenu), apparaît le derme dans lequel les protéines, quand elles sont oxydées, sont marquées en rouge. Le vieillissement chronologique entraîne une oxydation des protéines (**Figure 5B**), essentiellement localisées dans le derme (collagène et fibres élastiques), cette oxydation est fortement augmentée si la peau a été exposée régulièrement au soleil (**Figure 5C**), ce qui confirme l'effet pro-oxydant des UV.

Le derme, plus que l'épiderme qui se renouvelle en permanence, apparaît ici affecté par l'oxydation car le collagène du derme ne se recycle pas et accumule les dégâts. L'oxydation de l'ADN peut aussi être observée sur coupe de peau au microscope. Des anticorps produits contre les guanines oxydées peuvent être utilisés comme marqueurs pour visualiser l'oxydation du matériel génétique en particulier par les rayons UV. La **Figure 6** montre que cette oxydation se localise plutôt dans l'épiderme où les cellules sont plus nombreuses et plus exposées au stress de l'environnement car plus en surface : la guanine est ici oxydée en 8-oxoguanine (**Figure 6A**). La guanine oxydée peut être aussi détectée dans des prélèvements d'ADN purifié à partir d'épiderme, analysés par chromatographie en phase liquide HPLC⁶ (**Figure 6B**).

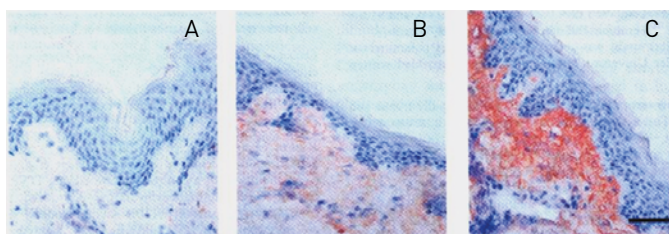
1.4.2. Études in vitro

Les laboratoires de recherche industrielle ne travaillent sur des biopsies de peau *in vivo*

6. HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance, technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophilie sur colonne et sous pression, et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés.

Figure 5

Le derme s'oxyde avec l'âge, et encore plus quand la peau a été souvent exposée au soleil. Les protéines oxydées apparaissent en rouge. A) Peau jeune ; B) peau mature ; C) peau mature exposée au soleil.



Source : adaptée de Sander et coll. [2002]. *J. Invest. Dermatol.*



Figure 6

Oxydation de l'ADN dans l'épiderme exposé au soleil. A) La comparaison entre une peau exposée aux UV et une peau non exposée est frappante : de nombreux sites présentent la base guanine oxydée ; B) l'analyse HPLC d'une biopsie d'un patient dont la peau a été exposée aux UV révèle la présence de la base guanine oxydée.

Source : adapté d'Ahmed et coll., (1999), *British Journal of Dermatology*.

qu'en fin d'investigation. Dans un premier temps, *in vitro* sur des cultures de cellules de peau, il est possible d'obtenir de nombreuses informations pertinentes plus facilement. Une méthode extrêmement rapide appelée test des comètes permet ainsi de visualiser l'oxydation de l'ADN et donc l'endommagement du matériel génétique par le stress environnemental.

Les cellules sont soumises à un stress génotoxique (qui abîme l'ADN) qui peut par exemple être l'attaque pro-oxydante de l'ADN par les UV. Les cellules sont ensuite mises dans un micro-gel d'agarose (taille d'un timbre), puis traitées par des réactifs pour ne garder que les noyaux dans le gel. L'ensemble est ensuite placé dans un champ

électrique (méthode appelée électrophorèse). Comme l'ADN est chargé électriquement, s'il a été cassé par l'oxydation, de petits fragments ont été formés et, sous l'effet du champ électrique, ils sortent du noyau et migrent dans le gel. On voit sous le microscope en rouge les noyaux des cellules et derrière, en traînées (en rouge), les petits morceaux d'ADN cassé (Figure 7). Cette technique permet ainsi de mesurer la quantité d'ADN cassé selon la nature du stress grâce à l'analyse d'image (intensité de fluorescence et longueur des traînées).

La Figure 8 montre les résultats de l'étude des effets génotoxiques de doses d'UVA correspondant à une heure d'exposition au soleil. Les

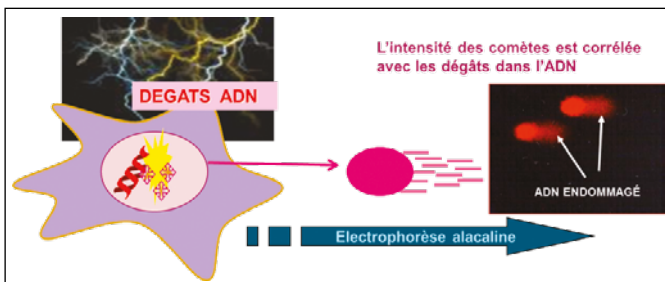


Figure 7

L'action pro-oxydante des UV casse l'ADN. Le test des comètes consiste à isoler le noyau des cellules et à détecter les cassures dans un champ électrique. Cela permet de visualiser facilement les altérations dans l'ADN cellulaire.

cassures dans l'ADN sont déjà clairement visibles (*Figure 8*). *In vivo*, la cellule va généralement réparer ces dommages, mais il est évident qu'elle est perturbée par ce genre de stress qui, dans certaines conditions, peut entraîner des dommages irréversibles dans son matériel génétique.

1.4.3. Les effets à long terme du stress oxydant

À long terme, le stress oxydant peut intervenir dans les processus de cancérisation parce qu'il conduit à des altérations de matériel génétique, comme par exemple :

- des mutations induites par l'oxydation de l'ADN ;
- une instabilité génétique induite par la rupture de la structure de l'ADN ;
- le développement de tumeurs favorisé par de l'inflammation chronique.

Le stress oxydant intervient aussi dans les processus de vieillissement parce qu'il entraîne des dommages dans les structures cellulaires et fait évoluer les cellules vers la senescence cellulaire (voir aussi le *Chapitre de P. Piccerelle* dans cet ouvrage *Chimie, dermo-cosmétique et beauté*, EDP Sciences, 2017). La cellule ne se divise plus, son activité physiologique décroît, elle sécrète des médiateurs spécifiques souvent délétères.

Parmi les causes du vieillissement lié au stress oxydant, on peut souligner :

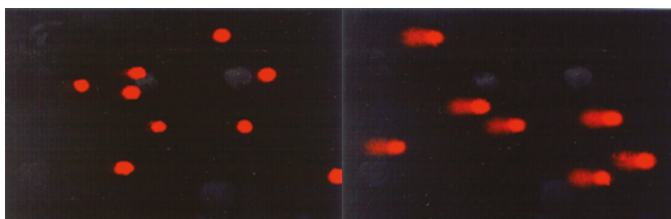
- l'altération des réactions enzymatiques due à l'oxydation des protéines actives ;
- l'altération des mitochondries et donc de la production d'énergie ;
- l'altération des télomères, zone de l'ADN où s'initie la division cellulaire ;
- la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène ;
- des désordres de pigmentation liés à l'inflammation.

2 L'autodéfense de la peau face au stress oxydant

La peau est capable de s'adapter à son environnement, fût-il agressif, en modulant ses systèmes de défenses naturelles. Dans un premier temps, elle utilise les antioxydants naturellement présents dans ses cellules, soit apportés de l'extérieur comme la vitamine C, soit naturellement produits comme le très important *glutathion*. Le glutathion est un petit peptide (trois acides aminés) avec une fonction thiol SH. Ce glutathion est notre antioxydant naturel. Il joue un rôle essentiel car c'est une molécule qui participe à l'élimination de beaucoup de molécules toxiques et du coup, il peut être présent à des

Figure 8

Les UVA à des doses environnementales cassent l'ADN des cellules cutanées. L'échantillon exposé à droite révèle des morceaux d'ADN de différentes tailles au vu de l'allongement de tâche.



teneurs élevées (de l'ordre du millimolaire dans certains organes comme le foie) (Figure 9).

Ce système de défense basal peut cependant se révéler insuffisant en cas d'un stress aigu, ou de longue durée. La cellule met alors en route un second système de protection en stimulant la production d'enzymes (en vert dans la Figure 9), qui catalysent la destruction ou la transformation chimique des radicaux libres ou des molécules pro-oxydantes.

2.1. Exemple d'un contrôle endogène : l'élimination du superperoxyde

L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est généré de façon endogène

dans la cellule, soit par certaines oxydases, soit par l'activité mitochondriale, soit par certains produits chimiques réactifs à la lumière solaire. Il est converti en eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) par des enzymes de la famille des superoxydes dismutases présents dans l'ensemble des organelles cellulaires. (Figure 10). L'eau oxygénée est elle-même convertie en eau et oxygène par des enzymes telles que la GSH-peroxydase ou la catalase. La détoxification est ainsi complète.

Cependant, le niveau de stress peut solliciter encore d'avantage la détoxification naturelle. C'est ce qui se passe sur la plage sous un soleil intense, quand on passe de la campagne à la ville et que

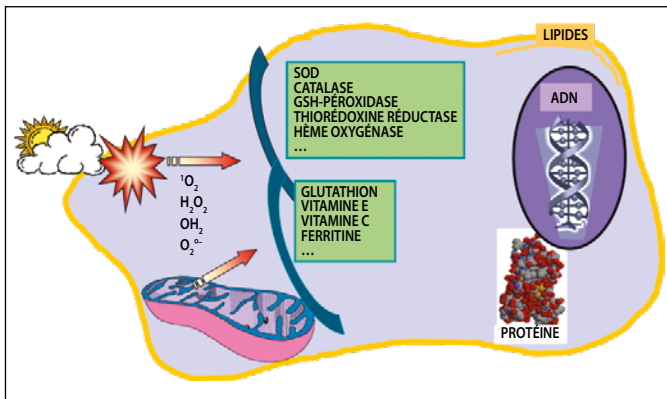


Figure 9

Pour se protéger, la cellule fait appel à des molécules antioxydantes (glutathion, vitamine C...) puis à des enzymes spécialisées contre le stress (SOD, catalase...), qui neutralisent les espèces oxydantes.

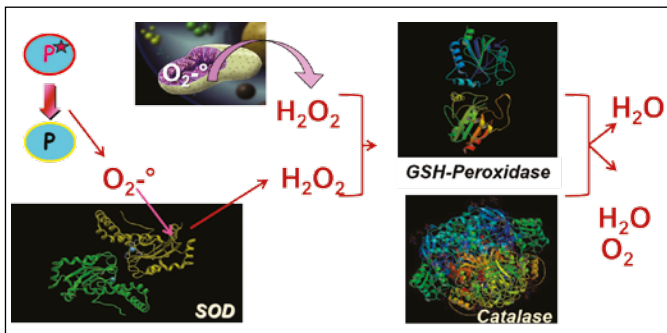


Figure 10

Détoxification par SOD et Catalase/ GSH-peroxydase, ou comment éliminer les espèces oxydantes $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 . La superoxyde dismutase permet de convertir, au sein de la cellule, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ en eau oxygénée H_2O_2 . La GSH-peroxydase permet ensuite la conversion de l'eau oxygénée en eau et en oxygène.

l'on est agressé par la pollution, ou encore quand une activité physique fait fonctionner les mitochondries à plein régime : dans tous ces cas, la quantité d'espèces oxygénées réactives générées dans les cellules devient transitoirement très importante pour la détoxification naturelle, les cellules doivent alors s'adapter et prévenir l'impact de futurs stress aigus.

La cellule possède heureusement un extraordinaire système de détection et d'adaptation face au danger du stress oxydant. La **Figure 11** montre ce système au sein d'une cellule dont le noyau apparaît comme un ovale coloré en bleu clair. Pour s'adapter à un stress oxydant très intense, la cellule utilise un complexe constitué de deux protéines très importantes, Nrf2 et son répresseur Keap1, associées à l'état naturel dans le cytoplasme, dont le mode d'action fait actuellement l'objet de nombreuses études publiées. Quand tout va bien, Nrf2 est maintenue inactive à cause

de son interaction étroite avec Keap1.

Keap1 est en effet un répresseur⁷ spécifique, c'est-à-dire une protéine qui se colle de façon moléculaire très précise à une autre protéine cible (ici Nrf2), rendant ainsi l'ensemble inactif. Mais quand les signaux de stress oxydant sont suffisamment intenses (indiquant que le haut niveau d'espèces oxydantes dépasse les défenses de base), Nrf2 peut être libérée de Keap1.

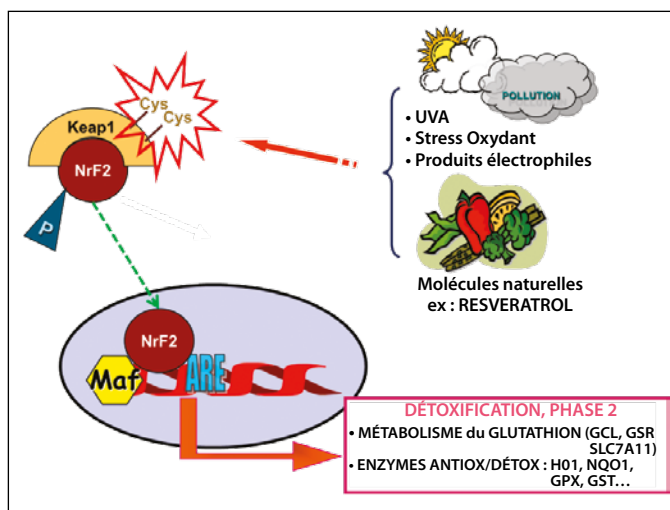
En effet, Keap1 capte les signaux de stress oxydant grâce à des cystéines⁸ de sa structure peptidique qui jouent le rôle de deux antennes pour évaluer le

7. Répresseur : protéine régulant négativement un ou plusieurs gènes en se liant à une séquence spécifique sur l'ADN, appelée opérateur. Cette fixation empêche la transcription de l'ARN messager par l'ARN polymérase et donc l'expression des gènes en aval.

8. Cystéine : acide- α -aminé naturel qui possède un groupement thiol -SH et qui est présent dans la plupart des protéines, bien que seulement en petites quantités.

Figure 11

Nrf2 est une protéine cellulaire qui contrôle les défenses antioxydantes naturelles. Sous l'effet du stress oxydant (mais aussi de molécules naturelles), Nrf2 s'active, se libère de sa protéine « répresseur » Keap1, et passe dans le noyau où elle stimule l'expression des gènes qui contrôlent les défenses antioxydantes en se fixant sur la séquence génétique ARE (« Antioxidant Responsive Element »). La cellule se « renforce » !



niveau d'oxydo-réduction intracellulaire. En situation pro-oxydante, ces cystéines sont modifiées, la structure de Keap1 change et il ne séquestre plus Nrf2. En outre, Nrf2 peut être lui-même modifié par l'addition de groupes phosphate sur sa surface qui lui sont conférés par des enzymes kinases en charge de la réponse générale au stress. Au final, il se libère complètement, migre dans le noyau et réagit alors immédiatement avec l'ADN, à un endroit très précis qui est la séquence appelée « *Antioxydant Responsive Element ARE* ». Celle-ci est une sorte d'interrupteur moléculaire qui déclenche la fabrication de tout un ensemble d'enzymes permettant de résister au stress oxydant, notamment celles qui fabriquent le glutathion dont nous avons parlé précédemment.

2.2. Les enzymes de détoxification

L'*Encart* présente quelques exemples d'enzymes antioxydantes libérées par l'action de Nrf2.

3 Amélioration de la protection cutanée par activation de Nrf2 : l'exemple du resvératrol, une molécule d'origine naturelle.

Il est assez tentant de stimuler les défenses naturelles de la peau en lui apportant des stimuli naturels. On utilise ainsi le savoir-faire des cellules cutanées, et on a ainsi la garantie d'être dans les bonnes conditions de protection. Il existe dans les plantes des molécules qui sont capables d'activer l'action de Nrf2, comme nous allons le voir sur l'exemple du resvératrol (polyphénol présent dans le raisin par exemple). Celles-ci vont donner à la cellule l'impression qu'il y a une alerte d'oxydation (parfois d'ailleurs par l'induction d'un très faible stress sans danger), et la préparer pour des agressions environnementales ultérieures de forte intensité.

3.1. Étude *in vitro* des effets d'un prétraitement au resvératrol

Les études sont conduites *in vitro* sur de la peau prétraitée

DES ENZYMES ANTIOXYDANTES CONTRÔLÉES PAR NRF2.

HO-1 : hème oxygénase 1 : dégradation de l'hème, production de bilirubine (antioxydant) et de CO (effet anti-inflammatoire), stimulation de la synthèse de ferritine (chélation du fer).

NGO1 : NAD(P)H quinone oxydoréductase 1 : réduction de quinones toxiques, régénération de vitamine E oxydée.

GPX : glutathione peroxydase : réduction de peroxydes (H_2O_2 inclus) utilisant GSH comme cofacteur.

TXNRD : thiorédoxine réductase : régénération de thiols oxydés des protéines, régénération de la vitamine C.

GCL : γ -glutamyl-cystéinyl ligase : GCLC et GCLM : sous-unités catalytiques ou modulateurs. Biosynthèse de glutathion.

par le resvératrol RSV, qui se comportera comme un stimulateur de la voie Nrf2. Le stress oxydant est réalisé ensuite avec une molécule qui est un véritable « marteau pro-oxydant » : l'hydroperoxyde de cumène CHP.

Les tests sur les animaux ont cessé depuis longtemps en cosmétique, et on utilise aujourd'hui de la peau humaine artificielle, reconstruite en laboratoire à partir de cellules (voir les *Chapitres de S. Del Bino et J. Leclaire* dans cet ouvrage *Chimie, dermo-cosmétique et beauté*, EDP Sciences, 2017). Des fibroblastes sont introduits à l'intérieur d'un gel de collagène pour former un pseudo-derme, puis des cellules de l'épiderme, les kératinocytes, sontensemencées sur ce gel, et le tout est immergé dans un milieu de culture adapté et incubé à 37 °C. Les kératinocytes se développent et tapissent la surface de la pastille de collagène. Quand les kératinocytes occupent toute la surface de la pastille, on émerge partiellement ce système pour que les kératinocytes se retrouvent à l'air où ils vont se différencier pour constituer un épiderme, comme on le voit sur la *Figure 12*. Cette peau

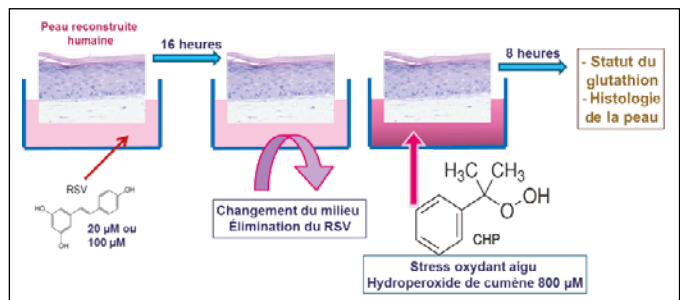
artificielle ne bénéficie pas tout à fait de la même fonction barrière que la peau naturelle, mais ce modèle fonctionne tout de même très bien pour modéliser certains événements dermatologiques.

Le prétraitement de la peau reconstruite est réalisé par l'ajout de resvératrol (RSV) à 20 ou 100 µM (micromolaire) (environ 4 mg ou 20 mg par litre) dans le milieu de culture, dans l'objectif de pousser les cellules à renforcer leur protection naturelle. Puis, on place la peau reconstruite ainsi « activée » dans un milieu de culture sans resvératrol, et l'hydroperoxyde de cumène est ajouté dans le milieu de culture à une concentration de 800 µM (micromolaire) (8 ou 40 fois plus que les 20 ou 100 µM de resvératrol utilisés en prétraitement) (*Figure 12*).

On regarde 8 h après ce traitement oxydant aigu comment est modifiée la structure de l'épiderme et comment a évolué sa teneur en glutathion. En effet, le glutathion, cet antioxydant qui existe à l'état naturel dans la peau, servira de marqueur pour étudier l'action très oxydante du peroxyde de cumène (CHP). Quand la peau n'est pas protégée par un prétraitement au resvératrol, on observe sur

Figure 12

Démonstration qu'une stimulation de Nrf2 (sans stress) dans la peau permet de la renforcer contre l'oxydation (ici par le peroxyde de cumène, CHP). Le resvératrol stimule Nrf2 dans différents types de cellules. Une pré-incubation avec la peau reconstruite in vitro confère-t-elle une résistance accrue à un puissant stress oxydant ?



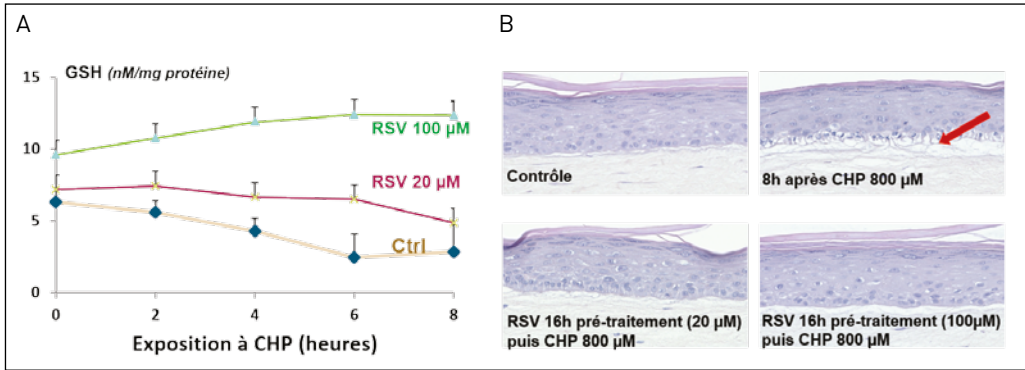


Figure 13

A) Graphe montrant que la peau « préparée » par le resvératrol (RSV) résiste au stress oxydant aigu du peroxyde de cumène (CHP) : son antioxydant naturel, le glutathion (GSH), est préservé, et sa structure dermo-épidermique profonde est protégée. B) Vues au microscope électronique de la peau révélant les effets du stress oxydant sur la peau en comparant les échantillons traités avec l'oxydant uniquement et ceux traités avec l'oxydant et différentes doses de resvératrol.

la **Figure 13A** (courbe marron clair) que la quantité de glutathion présente dans la peau (GSH) diminue pendant les six premières heures à cause de l'oxydation par CHP. Elle diminue moins vite en présence de resvératrol (RSV, courbe rouge), et on observe même une augmentation du glutathion (courbe verte) si on augmente suffisamment la quantité de resvératrol lors du prétraitement de protection. La peau avait donc bien été préparée à résister au stress en augmentant son pool de glutathion, notre antioxydant endogène, grâce au traitement par le resvératrol.

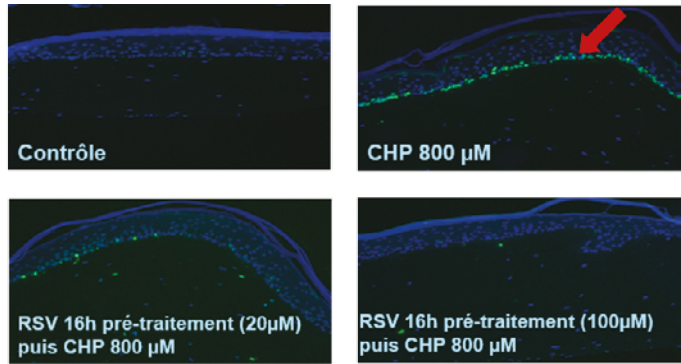
L'effet protecteur du resvératrol est directement visible sur les images des coupes de peau observées au microscope (**Figure 13B**) dans les expériences précédentes. Les kératinocytes de la couche de base profonde de l'épiderme (les plus fragiles, car ce sont eux qui se multiplient) sont très endommagés, comme

indiqué par la flèche rouge, ils sont en effet attaqués après 8 h de traitement par le peroxyde CHP. Par contre, ces cellules basales sont protégées lorsque l'échantillon de peau artificielle a été traité préalablement par le resvératrol : on retrouve presque l'aspect de l'échantillon contrôle qui n'a subi aucun traitement.

Afin d'identifier au niveau cellulaire ce qui se passe dans la partie de l'épiderme la plus touchée par le stress oxydant, l'expérience est refaite, mais cette fois, les cellules qui meurent sont marquées avec une étiquette fluorescente (**Figure 14**). On confirme que lorsque la peau est agressée, ce sont surtout les cellules de la lame basale qui meurent et qui deviennent fluorescentes. On constate clairement qu'un prétraitement suffisant par le resvératrol protège totalement ces cellules. On peut donc penser que le resvératrol a permis à la peau de renforcer

Figure 14

Les cellules qui meurent suite au stress oxydant par le CHP (fluorescentes vertes) sont beaucoup moins nombreuses si la peau a été prétraitée par le resvératrol. L'épiderme est donc bien « renforcé » par la stimulation de Nrf2.



ses défenses antioxydantes en fabriquant ce glutathion, qui est tellement utile comme antioxydant.

3.2. Rôle du glutathion dans la protection des cellules contre l'oxydation

Afin d'identifier le rôle du glutathion dans la protection contre le stress oxydant, l'action du resvératrol est de nouveau étudiée, mais cette fois, après avoir préalablement traité les échantillons de peau artificielle avec un produit (le BSO), qui empêche la peau

de fabriquer son glutathion (GSH) (Figure 15A). Comme précédemment, l'agression par le peroxyde de cumène (CHP) entraîne la destruction des cellules basales de l'épiderme (Figure 15B en haut à droite). Cependant, quand la production de glutathion a été inhibée, le prétraitement par le resvératrol ne protège plus les cellules de la couche basale de l'oxydation. Nrf2 protège donc la peau principalement en stimulant la production de glutathion.

En conclusion, on a pu vérifier que le resvératrol active dans les cellules de la peau

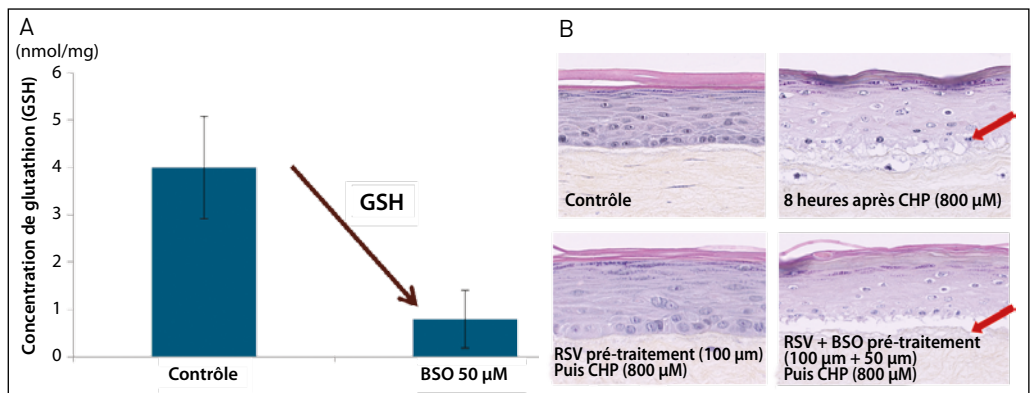


Figure 15

A) L'ajout de BSO inhibe la production de glutathion au sein des cellules de la peau ; B) les photographies à l'échelle microscopique d'une couche de peau montrent que le traitement au resvératrol n'a plus d'effet bénéfique contre l'oxydation des cellules lorsque la production de glutathion est inhibée.

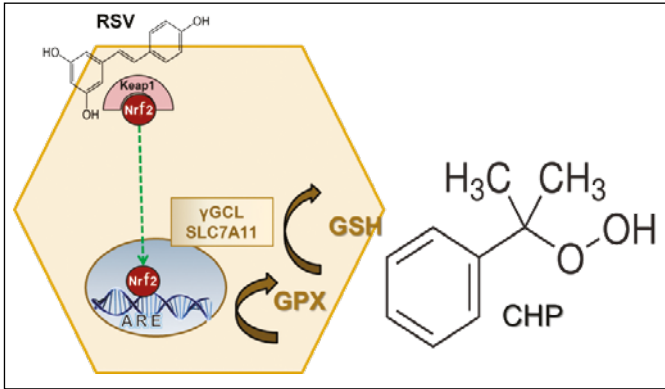


Figure 16

Le resvératrol RSV apporte une protection efficace contre le stress oxydant en mobilisant les défenses antioxydantes naturelles de la cellule par l'activation de Nrf2.

(ici les kératinocytes) le facteur appelé Nrf2, qui active les défenses cellulaires anti-péroxydes, et notamment la synthèse du glutathion (Figure 16). La peau préparée est capable de résister naturellement à des agressions oxydantes extérieures.

4 La pigmentation : une protection à risque pour le mélanocyte face au stress oxydant produit par la lumière solaire

4.1. La mélanine et la protection de la peau aux UV

Si pour certaines personnes ayant des peaux naturellement colorées la pigmentation protège contre les effets néfastes du soleil (coup de soleil et cancer cutané), l'effet bénéfique du bronzage est beaucoup moins évident chez les personnes qui ont une peau claire. De plus, le mélanome (cancer cutané très dangereux) se développe parfois à partir de grains de beauté (névi) initialement pigmentés. Ce sont des cellules spécialisées dans l'épiderme, les mélanocytes, qui sont en charge de la pigmentation. Quelle que soit la

nature ethnique de la peau le nombre de mélanocytes est sensiblement le même (un mélanocyte pour une quarantaine de kératinocytes), c'est donc la nature du pigment qui fait la différence de teint (voir aussi le *Chapitre de S. Del Bino* dans *Chimie, dermo-cosmétique et beauté*).

Les mécanismes moléculaires du bronzage scientifiquement admis sont les suivants : quand les kératinocytes sont agressés par les UV du soleil, ils subissent des dommages dans l'ADN de leur noyau (Figure 17). En réponse à cette agression génotoxique, une protéine de stress (protéine p53) stimule la production d'une hormone (POMC convertie en α MSH), qui va informer les mélanocytes de la nécessité de fabriquer

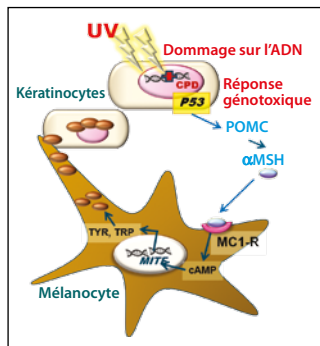


Figure 17

Mécanisme du bronzage, un moyen de défense de la peau contre les UV.

des grains de mélanine pour pigmenter la peau grâce à un récepteur spécifique à la surface du mélanocyte, MC1R. Ces grains sont élaborés par des enzymes particulières (ex : TYR et TRP), puis transférés aux kératinocytes de l'épiderme pour les protéger et globalement former un écran de surface sur la peau (Figure 17). Cependant, le mélanocyte prend un risque dans ce processus, car, comme nous allons le voir, la mélanine qu'il fabrique ne le protège pas et parfois le met en danger.

Le mécanisme de la synthèse de la mélanine est décrit sur la Figure 18. Il part d'un acide aminé, la tyrosine, que l'enzyme Tyrosinase TYR transforme en dopaquinone. Puis de nombreuses réactions enzymatiques d'oxydation conduisent à la formation de la mélanine tout en produisant en parallèle des espèces réactives comme l'eau oxygénée ou différentes quinones. Deux voies sont possibles, l'une incorpore des composés sulfurés et mène à la production de la phéomélanine (pigment rouge), l'autre conduit à l'eumélanine, mélanine noire ou brune. Toutes ces réactions se passent dans une

organelle spécialisée, le mélanosome, qui deviendra un grain de pigment.

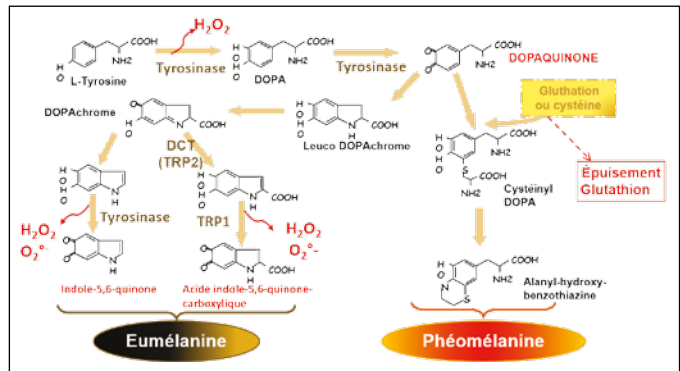
4.2. Les risques associés à la production de mélanine lors de l'exposition au soleil

On vient de voir que la fabrication de mélanine peut produire des espèces oxydantes, mais de plus, sous l'action des UV, la mélanine produite elle-même un surplus de radicaux libres par voie biochimique, comme on peut le voir sur la Figure 19. Cela signifie que si la peau n'est pas génétiquement préparée à ces effets négatifs (comme l'est une peau naturellement mate ou très pigmentée), le bronzage ne protège pas les mélanocytes, bien au contraire, il les soumet à un stress oxydant.

Ce phénomène est mis en évidence dans l'expérience suivante réalisée *in vitro* sur des mélanocytes en culture irradiés aux UVA. La Figure 20 montre à gauche des mélanocytes irradiés sous UVA, et à droite les mêmes mélanocytes irradiés sous UVA, mais après qu'on ait activé la fabrication de la mélanine. On voit une

Figure 18

La mélanine est synthétisée naturellement dans les cellules à partir de la L-tyrosine par deux voies : l'une conduit à l'eumélanine noire, l'autre conduit à la phéomélanine rousse. Dans les deux cas, des espèces oxydantes sont produites.



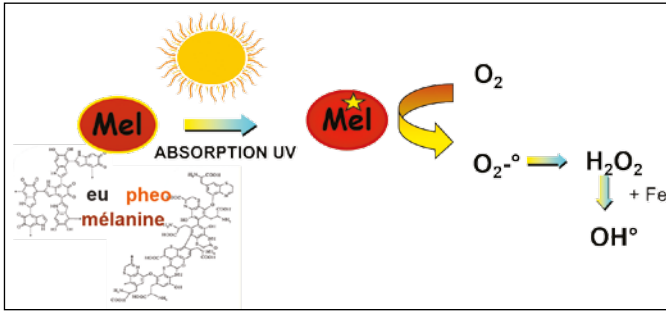


Figure 19

La mélanine s'active sous les rayonnements UV du soleil pouvant donner lieu à la production de radicaux libres.

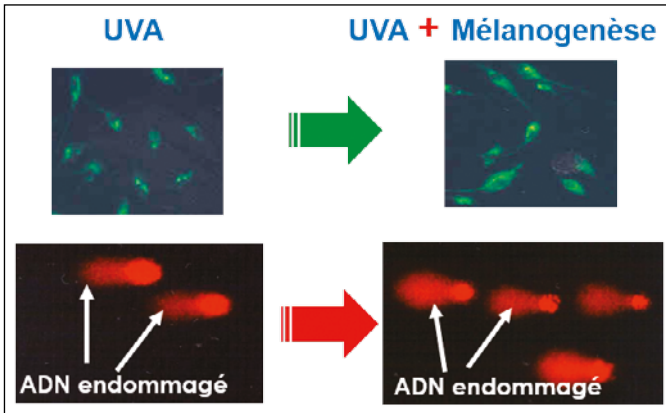


Figure 20

L'effet de la mélanogénèse couplée avec celui de l'irradiation aux UVA entraîne l'induction d'un stress oxydant et des dommages plus importants au sein de l'ADN sous irradiation aux UVA.

augmentation de la fluorescence verte qui traduit la présence d'un stress oxydant. On constate aussi que l'ADN de ces mélanocytes, dont la synthèse de mélanine a été préalablement stimulée, a subi plus de dégâts (test des comètes décrit dans le paragraphe précédent). Cette expérience démontre la vulnérabilité des mélanocytes d'une peau claire en phase de bronzage si elle est exposée aux UVA.

4.3. Les dangers de l'exposition solaire pour les cellules pigmentées de la peau

Des travaux récents publiés par l'équipe du Dr Noonan et du Dr De Fabo dans le prestigieux journal *Nature*

montrent que la mélanine augmente effectivement le risque de mélanome *in vivo*. Les auteurs ont étudié la formation de mélanomes⁹ sur des souris transgéniques à la peau plus ou moins pigmentée. Ils montrent que les souris les plus pigmentées font davantage de mélanomes que les souris moins pigmentées quand elles sont exposées sous les UVA. Il se trouve que dans ce type de souris génétiquement modifiées, le pigment reste globalement localisé dans le mélanocyte et est très peu transféré dans les kératinocytes. Donc, dans les mélanocytes remplis de

9. Mélanome : cancer de la peau qui est initié par des mélanocytes mutés et transformés, souvent par les UV.

mélanine, les UVA induisent un très fort stress oxydant qui va suffisamment endommager les cellules pour les rendre cancéreuses. On trouve en particulier de fortes teneurs de 8-oxo-guanine, une base oxydée dans l'ADN. Ces altérations du matériel génétique conduiront à l'apparition de mutations à l'origine des tumeurs.

Dans un autre journal scientifique aussi très connu, *Science*, des chercheurs ont rapporté des éléments très inattendus sur la mélanine. Après une exposition aux UV, si l'on place des mélanocytes ou des animaux pigmentés, on constate que des dégâts dans l'ADN continuent de se former, comme si l'irradiation se poursuivait. En fait, ce processus fait intervenir plusieurs constituants chimiques qui ont été produits à cause du

stress UV : des espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde) et de l'azote (oxyde nitrique) qui se combinent au sein des cellules pour former le peroxy-nitrite, comme le montre la **Figure 21A**. Ce peroxy-nitrite, en réagissant avec les produits de formation ou de dégradation de la mélanine, génère un radical carbonyle, qui réagit sur l'ADN et conduit à des dimères de pyridine (CPD). Ces lésions, généralement produites au soleil, induisent les mutations des mélanomes, comme le montre la **Figure 21B**. De ce processus un peu complexe, il faut retenir que la mélanine associée avec des espèces réactives issues de l'exposition aux UV contribue à augmenter le taux des lésions à l'ADN, même quand on a fini de s'exposer. Lorsqu'une peau claire commence à bronzer, il

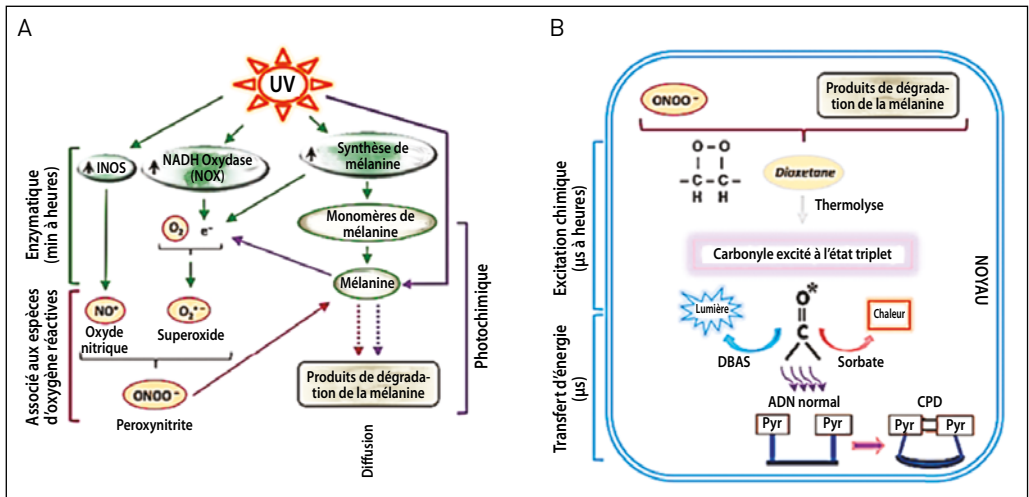


Figure 21

A) L'exposition aux UV conduit à des espèces réactives au sein des cellules (NO° et O₂^{••}), même après l'exposition, ce qui conduit au peroxy-nitrite ; B) action génotoxique de la mélanine : en présence de peroxy-nitrite et de mélanine, il se forme des radicaux carbonyles qui conduisent à une attaque de l'ADN via la formation de dimères de pyridine, précurseurs de mutation de mélanomes, donc de cancer.

Source : adaptée de Premi et coll. (2015), *Science*.

convient donc de la protéger avec encore plus de précautions.

De ce chapitre, il faut donc retenir que la pigmentation de la peau n'est pas une garantie contre les méfaits du soleil et que le bronzage constitue plutôt une alerte pour ne plus s'exposer qu'une protection fiable contre le mélanome, surtout pour les peaux claires.

5 Stratégies de protection contre le stress oxydant cutané et ses effets

Plusieurs stratégies peuvent être combinées afin de se protéger efficacement (Figure 22). La première pour lutter contre les effets du soleil est évidemment d'appliquer des filtres solaires, chimiquement stables, capables de filtrer le plus loin possible dans les UVA de façon à éviter un surplus de ces photons qui activent

des molécules endogènes. Ces écrans peuvent cependant être insuffisants, d'abord parce qu'on en applique souvent trop peu et ensuite car certaines oxydations sont aussi activées par des radiations du visible (lumière bleue) et de l'infrarouge. La seconde stratégie consiste à piéger les radicaux libres en apportant des antioxydants au bon moment et au bon endroit. On peut aussi imaginer apporter de quoi réparer les dommages, mais c'est souvent un peu plus compliqué. Il existe toutefois des formules solaires ou de soin quotidien contenant des enzymes qui vont réparer l'ADN ou les protéines (Figure 22). Cependant, il faut être certain que ces molécules vont pénétrer et agir là où il faut, ce qui n'est pas évident !

Enfin, on peut prévenir le stress oxydant en stimulant les propres défenses de sa peau : à ce niveau, on

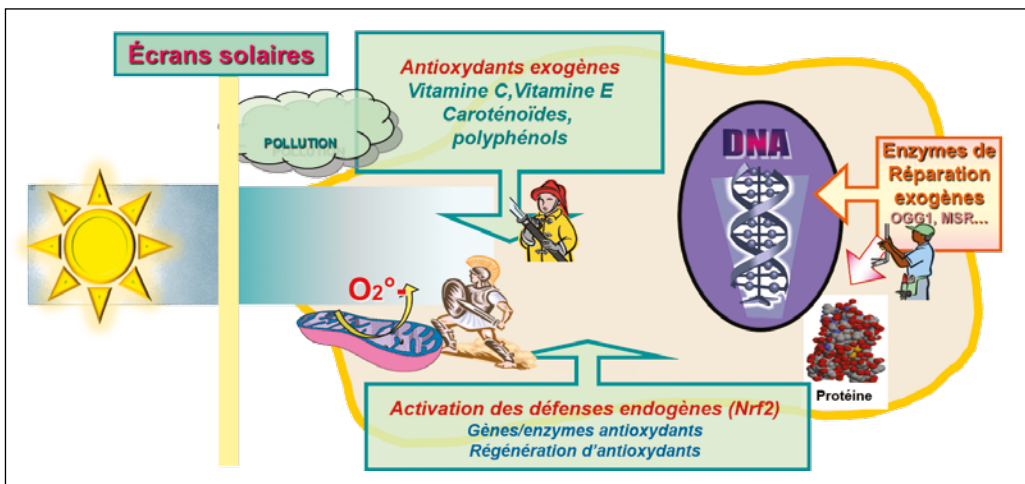


Figure 22

Plusieurs stratégies sont envisageables pour se protéger du stress oxydant causé par les rayonnements du soleil. Il s'agit d'associer des approches complémentaires pour être encore plus efficace.

est certain d'apporter les réponses efficaces et naturelles contre les risques d'oxydations délétères. Mais là encore, il faut être dans le bon timing par rapport à l'induction du stress.

Attention : les antioxydants ne sont pas toujours la panacée ! L'efficacité de l'apport de produits antioxydants nécessite d'avoir une démarche extrêmement raisonnée et raisonnable. Ainsi, certains antioxydants peuvent devenir des pro-oxydants à forte dose. Ensuite, comme les cellules cancéreuses ont une

physiologie complètement différente qui surproduit des espèces oxydantes, leur apporter un surplus d'antioxydants peut favoriser leur développement. La supplémentation par voie orale (compléments alimentaires) a parfois eu des effets négatifs d'après la littérature.

Enfin, certains antioxydants sont réactifs à la lumière même si ils sont protecteurs à l'obscurité.

Les laboratoires doivent donc tenir compte de ces données pour concevoir des produits efficaces et sûrs.

La qualité et la santé de la peau nécessitent la maîtrise du stress oxydant

La peau est soumise à un stress oxydant omniprésent lié à son métabolisme et à ses interactions avec l'environnement (soleil, pollution, produits distribués par la circulation sanguine...). Le rôle de ce stress dans des pathologies telles que les photo-cancers (carcinome, mélanome) ou dans les atteintes dermatologiques inflammatoires est très probable.

La contribution du stress oxydant dans l'altération de la qualité de la peau associée au photovieillissement est aussi vraisemblable.

La peau, comme beaucoup d'autres organes, peut adapter ses capacités de défense et de réparation en réponse à des ruptures de son homéostasie. À cet égard, la voie contrôlée par Nrf2 est considérée comme majeure dans la littérature et permet à la peau de gérer le stress de l'environnement en modulant ses propres défenses naturelles.