RECEPTEURS CUTANES A LA MELANOCORTINE DE TYPE 1 (MC1R) ET REPONSES OXYDATIVES AUX UVA DANS DES KERATINOCYTES HUMAINS HaCaT

Pauline Henri

▶ **To cite this version:**

Pauline Henri. RECEPTEURS CUTANES A LA MELANOCORTINE DE TYPE 1 (MC1R) ET REPONSES OXYDATIVES AUX UVA DANS DES KERATINOCYTES HUMAINS HaCaT. Médicaments. Université Montpellier I, 2010. Français. NNT : . tel-00560959

HAL Id: tel-00560959

https://theses.hal.science/tel-00560959

Submitted on 31 Jan 2011

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

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

UNIVERSITE MONTPELLIER I

UNITES DE FORMATION ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES

Thèse présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

ECOLE DOCTORALE :	Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé
FORMATION DOCTORALE :	Interface Chimie-Biologie, systèmes moléculaires à visée thérapeutique
N° DISCIPLINE :	50
N° DE SECTION CNU :	40
SPECIALITE :	Sciences du Médicament

RECEPTEURS CUTANES A LA MELANOCORTINE DE TYPE 1 (MC1R) ET REPONSES OXYDATIVES AUX UVA DANS DES KERATINOCYTES HUMAINS HaCaT

par

Pauline HENRI

Soutenue le jeudi 16 décembre 2010

JURY :

Pr. Marie-Dominique GALIBERT	Université Rennes I	Rapporteur
Pr. Jean-Claude BEANI	CHU de Grenoble	Rapporteur
Pr. Jean-Louis BANERES	Université Montpellier I	Examinateur
Pr. Jean MARTINEZ	Université Montpellier I	Président du jury
Pr. Laurent MEUNIER	Université Montpellier I	Directeur de thèse

UNIVERSITE MONTPELLIER I

UNITES DE FORMATION ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES

Thèse présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

ECOLE DOCTORALE :	Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé
FORMATION DOCTORALE :	Interface Chimie-Biologie, systèmes moléculaires à visée thérapeutique
N° DISCIPLINE :	50
N° DE SECTION CNU :	40
SPECIALITE :	Sciences du Médicament

RECEPTEURS CUTANES A LA MELANOCORTINE DE TYPE 1 (MC1R) ET REPONSES OXYDATIVES AUX UVA DANS DES KERATINOCYTES HUMAINS HaCaT

par

Pauline HENRI

Soutenue le jeudi 16 décembre 2010

JURY :

Pr. Marie-Dominique GALIBERT	Université Rennes I	Rapporteur
Pr. Jean-Claude BEANI	CHU de Grenoble	Rapporteur
Pr. Jean-Louis BANERES	Université Montpellier I	Examinateur
Pr. Jean MARTINEZ	Université Montpellier I	Président du jury
Pr. Laurent MEUNIER	Université Montpellier I	Directeur de thèse

RESUME

Les ultraviolets A (UVA) sont carcinogènes et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le récepteur à la mélanocortine de type 1 (MC1R) est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) qui est impliqué dans la mélanogénèse et dans l'inflammation cutanée. Certains variants du gène sont associés à un risque accru de mélanomes et de carcinomes cutanés. Le MC1R est exprimé surtout dans les mélanocytes mais son expression peut être induite par les UV *in vitro* dans les kératinocytes et *in vivo* dans la peau. Le récepteur MC1R est activé par l'α-MSH.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les effets du récepteur MC1R sur le stress oxydatif induit par les UVA dans des lignées kératinocytaires humaines HaCaT exprimant le récepteur MC1R ou son variant non fonctionnel $Arg_{151}Cys$. Nous avons montré que la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA est fortement inhibée dans les cellules HaCaT-MC1R et que cette inhibition est renforcée en présence d'α-MSH. L'inhibition du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules transfectées par le MC1R est en partie dépendante de la phosphorylation de la sous-unité activatrice, NoxA1 de la NADPH oxydase. Le traitement des cellules HaCaT-MC1R par un inhibiteur du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) restaure l'habilité de ces cellules à induire un stress oxydatif après irradiation UVA.

Ces résultats montrent que l'activité constitutive du récepteur MC1R dans des kératinocytes pourrait inhiber le stress oxydatif induit par les UVA via des mécanismes dépendants de l'AMPc et de l'EGFR.

MOTS CLES : α-MSH ; EGFR ; ERO ; kératinocytes ; MC1R ; Nox1 ; UVA.

REMERCIEMENTS

L'écriture de ces quelques lignes de remerciements annonce la fin de la thèse qui approche. Toute la difficulté de cet exercice d'écriture réside dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre.

La première personne que je souhaiterais remercier est mon directeur de thèse, M. Laurent Meunier. Merci de m'avoir donné la chance de poursuivre mes études par un doctorat. Ces quatre années m'ont apporté énormément sur le plan professionnel mais également sur le plan personnel. J'ai réellement apprécié la liberté d'action dont j'ai pu faire preuve pour mener à bien ce projet de recherche ; tout en gardant un œil critique et constructif.

Ce projet n'aurait pas pu aboutir sans l'aide du Département Recherche & Développement de L'Oréal. Je tiens donc à remercier tout particulièrement Mme Joëlle Guesnet, Mme Anne Guezennec et Mme Carine Poumès-Ballihaut pour leurs conseils, leur gentillesse, leur disponibilité et leur aide précieuse dans le déroulement de cette thèse.

Je souhaiterais également remercier le Pr Jean Martinez, directeur de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de Montpellier, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour sa grande disponibilité.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Marie-Dominique Galibert de l'Université Rennes I, M. Jean-Claude Beani du CHU de Grenoble et M. Jean-Louis Banères de l'Université Montpellier I qui ont accepté faire partie de mon jury de thèse. Je vous remercie vivement pour le temps consacré à la lecture de mon manuscript et pour vos corrections et vos suggestions afin d'améliorer ce travail.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui ont participé à ce projet. Mes sincères remerciements à M. Christophe Duperray de la plateforme de cytométrie en flux de l'IRB de Montpellier pour son aide précieuse dans le fonctionnement d'un FACS, pour ses conseils sur le traitement des « data » et surtout pour sa gentillesse et son sens de l'humour.

Je voudrais également remercier Mme Marie-José Stasia et M. Sylvain Beaumel du CHU de Grenoble pour leur collaboration sur le projet NADPH oxydase. J'ai été ravi de faire votre connaissance et je vous remercie sincèrement pour les « manips » que vous avez pu réaliser pour ce projet. Enfin, mes remerciements viennent aux personnes du laboratoire pour leur disponibilité, leurs conseils et leur gentillesse : M. Jean-Claude Galleyrand, Mme Muriel Amblard, M. Pierre-Emmanuel Stoebner, Mme Geneviève Garcin ainsi qu'à l'ensemble des personnes de l'IBMM.

Un grand merci à Sabrina, dont j'ai fait la connaissance pendant ma thèse, et doctorante au CPID. Je te souhaite que ta thèse soit rapidement derrière toi… Merci pour tes conseils scientifiques au moment de la rédaction, ton aide pour mes expériences de Western-Blot et pour nos discussions non scientifiques autour d'un café. Et comme il n'y a pas que le travail dans la vie, je tiens également à remercier tous mes amis qui ont su me changer les idées et me transmettre leur bonne humeur constante.

Je tiens à exprimer tout mon amour à ma famille qui, malgré les 762 km qui nous séparent, a toujours su être à mes côtés. Toute mon affection vient à ma mère, à mon père, à mon frère Lionel, à ma belle-sœur Delphine, à ma sœur Virginie, à ma nièce Sasha et à ma cousine Claire, la québécoise. Je tiens également à remercier mes beaux-parents Thérèse et Francis pour leur gentillesse et leur énorme soutien ainsi que mon beau-frère Thierry. Une énorme pensée pour ma grand-mère « Mamoune » qui aurait été très fière de moi.

Je dédicace cette thèse à Louis, mon fils, ma merveille, mon amour, ma bouffée d'oxygène,… Aucun mot n'est assez fort pour qualifier l'amour inconditionnel que je ressends pour toi. Tu fêteras tes 1 an quelques jours après cette soutenance et tes rires, tes sourires, tes colères,… m'émerveille chaque jour. Je t'aime mon Loulou.

Enfin, je terminerais ces remerciements par toi, Jérôme… Cette thèse est aussi la tienne… Merci pour ton soutien, ton amour et la fierté que je lis chaque jour dans tes yeux. Merci d'avoir supporté ma mauvaise humeur et ma mauvaise foi durant cette dernière ligne droite.

SOMMAIRES

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES 1

SOMMAIRE DES FIGURES 10

SOMMAIRE DES TABLEAUX 13

ABREVIATIONS 15

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 18

PARTIE 1 : LES REPONSES DE LA PEAU AUX ULTRAVIOLETS 18

I. INTRODUCTION GENERALE SUR LES ULTRAVIOLETS 18

II. LA PEAU 19
II.1. L'EPIDERME 20
II.1.1. Les kératinocytes 20
II.1.2. Les mélanocytes 21
II.1.2.1. La mélanine 21
II.1.2.2. Les mélanosomes 21
II.1.3. Les cellules de Langerhans 22
II.1.4. Les cellules de Merkel 22
II.2. LA JONCTION DERMO-EPIDERMIQUE 22
II.3. LE DERME ET L'HYPODERME 22

III. LES REPONSES IMMEDIATES AUX UV 23
III.1. L'ERYTHEME ACTINIQUE 23
III.2. L'EPAISSISSEMENT DE L'EPIDERME 23
III.3. LA PIGMENTATION 24
III.4. LE PHOTOVIEILLISSEMENT CUTANE OU HELIODERMIE 24
III.5. LA PRODUCTION DE VITAMINE D_3 24

IV. LES DOMMAGES DE L'ADN 25
IV.1. LES DOMMAGES INDUITS PAR LES UVA 25
IV.2. LES DOMMAGES INDUITS PAR LES UVB 27

V. L'APOPTOSE 28
V.1. GENERALITES 28
V.1.1. La voie intrinsèque 28
V.1.2. La voie extrinsèque 29

V.2. LES MECANISMES DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LES UV 30
V.2.1. Le rôle des caspases et des facteurs Bcl-2 30
V.2.2. Le rôle du suppresseur de tumeurs p53 31
V.2.3. Le rôle des lysosomes 31

VI. L'IMMUNOSUPPRESSION 32
VI.1. LES MECANISMES DE LA PIS 33
VI.2. ROLE DE L'ADN AU COURS DE LA PIS 34
VI.3. ROLE DE L'ACIDE UROCANIQUE 34

VII. L'INFLAMMATION 34

VIII. LE STRESS OXYDATIF 35

IX. LES CANCERS CUTANES 35
IX.1. LES CARCINOMES 36
IX.2. LES MELANOMES 37

PARTIE 2 : RECEPTEURS AUX MELANOCORTINES DE TYPE 1 (MC1R) ET A-MSH 38

I. GENERALITES SUR LES RCPG 38
I.1. LA STRUCTURE DES RCPG ET DES PROTEINES G 38
I.1.1. La structure des RCPG 38
I.1.2. La structure des protéines G 39
I.2. LES MECANISMES D'ACTIVATION DES RCPG 40
I.2.1. L'activation des protéines G 40
I.2.2. La transduction du signal 40
I.3. LA DESENSIBILISATION DES RCPG 41

II. LE RECEPTEUR AUX MELANOCORTINES DE TYPE 1 42
II.1. GENERALITES SUR LES RECEPTEURS AUX MELANOCORTINES 42
II.1.1. Le récepteur MC1R 43
II.1.2. Le récepteur MC2R 44
II.1.3. Le récepteur MC3R 44
II.1.4. Le récepteur MC4R 44
II.1.5. Le récepteur MC5R 44
II.2. LA STRUCTURE DU RECEPTEUR MC1R 45
II.2.1. Le domaine N-terminal 46
II.2.2. Les boucles extracellulaires 46
II.2.3. Les boucles intracellulaires 47
II.2.4. Les domaines transmembranaires 47
II.2.5. Le domaine C-terminal 48
II.3. LES LIGANDS DU MC1R 48
II.3.1. Le précurseur pro-opiomélanocortine (POMC) 49
II.3.2. L'α-MSH 50

II.3.3. L'ASIP et l'AGRP 51

III. REGULATIONS DU RECEPTEUR MC1R 52
III.1. LES VARIANTS NON FONCTIONNELS DU MC1R 52
III.2. REGULATIONS DE L'ACTIVITE DU RECEPTEUR MC1R 54
III.2.1. Dimérisation du récepteur MC1R 54
III.2.2. Désensibilisation et internalisation du récepteur MC1R 55
III.2.3. Activité constitutive du récepteur MC1R 57
III.3. REGULATION DE L'EXPRESSION DU RECEPTEUR MC1R 57
III.3.1. Régulation par les UV 57
III.3.2. Régulation par les mélanocortines 58
III.3.3. Régulation par MITF 58
III.3.4. Régulation par USF-1 59

IV. ACTIVITES BIOLOGIQUES ASSOCIEES A L'α-MSH ET AU MC1R 60
IV.1. LA MELANOGENESE 61
IV.1.1. La synthèse des mélanines 61
IV.1.2. Régulations de la mélanogenèse 64
IV.1.2.1. Les ultraviolets 64
IV.1.2.2. La tyrosinase 64
IV.1.2.3. Le système mélanocortine, l'AMPc et MITF 64
IV.1.2.4. Le calcium 66
IV.1.2.5. Le facteur suppresseur de tumeur p53 67
IV.1.2.6. Le péroxyde d'hydrogène H_2O_2 67
IV.1.2.7. Le monoxyde d'azote (•NO) 68
IV.2. L'INFLAMMATION 68
IV.2.1. Les mécanismes anti-inflammatoires associés à l'α-MSH 69
IV.2.1.1. La production des cytokines pro-inflammatoires 69
IV.2.1.2. La synthèse d'IL-10 69
IV.2.1.3. L'expression des molécules d'adhésion 70
IV.2.1.4. Les médiateurs pro-inflammatoires 71
IV.2.1.5. Le facteur nucléaire NF-κB 71
IV.2.2. Les mécanismes anti-inflammatoires associés au KPV 72

PARTIE 3 : LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LA CELLULE 73

I. LE STRESS OXYDATIF 74
I.1. CHIMIE ET BIOCHIMIE DU STRESS OXYDATIF 74
I.1.1. Les espèces réactives de l'oxygène 75
I.1.2. Les espèces réactives de l'azote 76
I.2. LES CONSEQUENCES DU STRESS OXYDATIF 77
I.2.1. Les dommages de l'ADN 77
I.2.2. Les dommages des lipides 78
I.2.3. Les dommages des protéines 79
I.2.4. Les dommages des glucides 81

I.3. LES MECANISMES DE DEFENSE ANTIOXYDANT 81
I.3.1. Les enzymes antioxydantes 81
I.3.1.1. La superoxyde dismutase (SOD) 81
I.3.1.2. La catalase 81
I.3.1.3. La glutathione péroxydase (GPx) 82
I.3.2. Les antioxydants non enzymatiques 82
I.3.2.1. La vitamine C 82
I.3.2.2. La vitamine E 83
I.3.2.3. Les antioxydants des fonctions thiols 83
I.3.2.3.1. Le glutathion (GSH) 83
I.3.2.3.2. Le système thiorédoxine 84
I.3.2.4. Les oligoéléments 84
I.3.2.5. Les polyphénols 85

II. SOURCES CELLULAIRES ET REGULATIONS DES ERO 85
II.1. LE PEROXYSOME 85
II.1.1. Le stress oxydatif péroxysomal 85
II.1.2. Les enzymes péroxysomales 86
II.1.2.1. Les enzymes péroxysomales de génération d'ERO 86
II.1.2.2. Les enzymes péroxysomales d'élimination des ERO 87
II.1.3. Les régulations du stress oxydatif dans les péroxysomes 88
II.1.3.1. Les régulations enzymatiques 88
II.1.3.2. Les régulations morphologiques 89
II.1.3.3. Péroxysomes et inflammation 89
II.2. LA MITOCHONDRIE 89
II.2.1. Généralités sur les mitochondries 89
II.2.2. Le métabolisme des ERO dans la mitochondrie 91
II.2.2.1. Le stress oxydatif mitochondrial 91
II.2.2.2. Le système antioxydant mitochondrial 93
II.2.3. Les conséquences du stress oxydatif mitochondrial sur l'apoptose 94
II.2.3.1. Oxydation de la cardiolipine et libération du cytochrome c 94
II.2.3.2. Les modulateurs pro-oxydants des ERO 95
II.3. LE SYSTEME NADPH OXYDASE 95
II.3.1. Les enzymes Nox 96
II.3.1.1. Nox2 : prototype Nox 97
II.3.1.2. Nox1 99
II.3.1.3. Nox3 100
II.3.1.4. Nox4 100
II.3.1.5. Nox5 101
II.3.1.6. Duox1/2 101
II.3.2. Sous-unités Nox et protéines régulatrices 102
II.3.2.1. $p22^{phox}$ 102
II.3.2.2. Sous-unités organisatrices : NoxO1 et $p47^{phox}$ 103
II.3.2.3. Sous-unités activatrices : NoxA1 et $p67^{phox}$ 103
II.3.2.4. $p40^{phox}$ 104

II.3.2.5. La petite GTPase Rac 104

III. LES ROLES DES ERO DANS LA PEAU 104
III.1. ERO ET UV 105
III.2. ERO ET PIGMENTATION 105
III.3. ERO ET PHOTOVIEILLISSEMENT CUTANE 106
III.4. ERO ET SIGNALISATION CELLULAIRE 106
III.4.1. Phosphorylation et déphosphorylation 107
III.4.1.1. Les sérine/thréonine kinases 108
III.4.1.2. Les phosphatases 109
III.4.2. Cytokines et facteurs de croissance 109
III.4.3. Les facteurs de transcription nucléaire 109
III.5. ERO ET INFLAMMATION 110

OBJECTIFS DU TRAVAIL 112

RESULTATS 113

PARTIE 1 : ELABORATION D'UN MODELE CELLULAIRE DE SUR-EXPRESSION DU MC1R 113

I. CHOIX DU MODELE CELLULAIRE 114

II. ETUDE DE L'EXPRESSION DU MC1R 115

III. PROPRIETES DE LIAISON DE L'α-MSH POUR LE RECEPTEUR MC1R 116

IV. PRODUCTION D'AMPC INTRACELLULAIRE DANS LES CELLULES HACAT 118
IV.1. COUPLAGE FONCTIONNEL 118
IV.2. ACTIVITE CONSTITUTIVE DU MC1R 119

PARTIE 2: LE RECEPTEUR MC1R: UNE ACTION ANTIOXYDANTE CONTRE LES UV ? 121

I. ROLE DU RECEPTEUR MC1R SUR LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UV 122
I.1. LES UVB INDUISENT UN STRESS OXYDATIF QUI EST PARTIELLEMENT INHIBE PAR LE RECEPTEUR MC1R 122
I.2. LES UVA INDUISENT UN STRESS OXYDATIF QUI EST PARTIELLEMENT INHIBE PAR LE RECEPTEUR MC1R 124

II. ROLES DE QUELQUES ANTIOXYDANTS POTENTIELS SUR LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA 126
II.1. L'α-MSH 126

II.1.1. L'α-MSH inhibe le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT-MC1R 127
II.1.2. L'α-MSH inhibe le stress nitrique induit par les UVA dans les cellules HaCaT-MC1R 129
II.2. LE KPV 130
II.2.1. Mesure de la cytotoxicité du KPV dans les cellules HaCaT 130
II.2.2. Etude des propriétés de liaison du KPV pour le récepteur MC1R 131
II.2.3. Le KPV inhibe le stress oxydatif induit par les UVA 132
II.3. L'ACIDE CAFEIQUE 134
II.3.1. Mesure de la cytotoxicité de l'acide caféique dans les cellules HaCaT 135
II.3.2. L'acide caféique inhibe le stress oxydatif induit par les UVA 136
II.4. LA BETULINE 138
II.4.1. Synthèse bibliographique sur la bétuline 138
II.4.1.1. Activités anti-tumorales 139
II.4.1.2. Activités anti-inflammatoires 139
II.4.1.3. Activités antioxydantes 139
II.4.1.4. Activités sur le récepteur MC1R 140
II.4.2. Mesure de la cytotoxicité de la bétuline dans les cellules HaCaT 140
II.4.3. La bétuline inhibe le stress oxydatif induit par les UVA 141
II.5. LE MEDIACALM 142
II.5.1. Mesure de la cytotoxicité du Médiacalm dans les cellules HaCaT 143
II.5.2. Le Médiacalm inhibe le stress oxydatif induit par les UVA 143

PARTIE 3 : LE RECEPTEUR MC1R INHIBE LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA PAR DES MECANISMES DEPENDANTS DE L'AMPc ET DE L'EGFR 146

I. ROLE DE LA MITOCHONDRIE SUR LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA 146
I.1. L'ANTIMYCINE A INDUIT UN STRESS OXYDATIF MITOCHONDRIAL DANS LES CELLULES HACAT 147
I.2. LE STRESS OXYDATIF MITOCHONDRIAL N'EST PAS AFFECTE PAR L'EXPRESSION D'UN RECEPTEUR MC1R FONCTIONNEL DANS LES CELLULES HACAT 149

II. ROLE DE LA NADPH OXYDASE SUR LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA 150
II.1. L'APOCYNINE INHIBE LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA DANS LES CELLULES HACAT QUI NE SUREXPRIMENT PAS UN RECEPTEUR MC1R FONCTIONNEL 151
II.2. LE RECEPTEUR MC1R INHIBE LE STRESS OXYDATIF VIA UN MECANISME DEPENDANT DE L'AMPc 154
II.2.1. L'H-89 lève l'inhibition du MC1R sur le stress oxydatif induit par les UVA 154
II.2.1.1. Mesure de la cytotoxicité de l'H-89 dans les cellules HaCaT 155
II.2.1.2. Mesure du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par l'H-89 156
II.2.2. L'activation de l'AMPc inhibe le stress oxydatif induit par les UVA dans le mutant non fonctionnel $R_{151}C$ 159
II.2.2.1. Mesure de la cytotoxicité de la forskoline dans les cellules HaCaT 159
II.2.2.2. Mesure du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par la forskoline 160

II.3. LA PHOSPHORYLATION DE NOXA1 EST AUGMENTEE DANS LES CELLULES HACAT-MC1R 162

III. ROLE DE L'EGFR SUR LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA 166
III.1. L'INHIBITION DE L'EGFR ET DE ERK AUGMENTE LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA DANS LES CELLULES HACAT-MC1R 167
III.1.1. Mesure de la cytotoxicité du PD153035 dans les cellules HaCaT sauvages 168
III.1.2. Mesure du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le PD153035 169
III.1.3. Mesure du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le PD98059 171
III.2. L'INHIBITION DE L'EGFR ET DE ERK DIMINUE LA PRODUCTION D'AMPC INDUITE PAR L'α-MSH DANS LES CELLULES HACAT-MC1R 173

DISCUSSION & PERSPECTIVES 176

I. DISCUSSION 176
I.1. MC1R & MODELE D'ETUDE 176
I.2. MC1R & STRESS OXYDATIF 177
I.3. MC1R ET PHOTOPROTECTION 179

II. PERSPECTIVES 179

MATERIELS & METHODES 181

I. CULTURE CELLULAIRE 181
I.1. CELLULES HACAT 181
I.2. CELLULES HACAT-MC1R 181
I.3. CELLULES HACAT-R_{151}C 182

II. ETUDES PHARMACOLOGIQUES 183
II.1. ETUDE DES PROPRIETES DE LIAISON 183
II.1.1. Marquage de la NDP-MSH à l'iode 125 183
II.1.2. Test de liaison par compétition 184
II.1.2.1. Principe de la technique 184
II.1.2.2. Protocole 185
II.1.3. Mesure de la production d'AMPc intracellulaire par radio-immunologie 186
II.1.3.1. Principe de la technique 186
II.1.3.2. Protocole 186
II.1.4. Mesure de la production d'AMPc intracellulaire par immunofluorescence 187
II.1.4.1. Principe de la technique 187
II.1.4.2. Préparation des échantillons 188
II.1.4.3. Dosage de la production d'AMPc 189

III. ETUDE DE L'EXPRESSION DU MC1R PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL 190
III.1. EXTRACTION DE L'ARNM PAR LE TRIZOL® 190

III.2. TRANSCRIPTION INVERSE 190
III.3. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL 191
III.3.1. Principe de la qPCR 191
III.3.2. Etude de l'expression du MC1R 192

IV. METHODOLOGIE GENERALE D'IRRADIATION DES CELLULES 193

V. MESURE DU STRESS NITRIQUE 195
V.1. INDUCTION PAR LES UVA 195
V.2. MESURE EN PRESENCE D'α-MSH 196

VI. MESURE DU STRESS OXYDATIF 196
VI.1. MESURE DES ERO INTRACELLULAIRES 196
VI.1.1. Protocole général 197
VI.1.2. Mesure en présence d'α-MSH 197
VI.1.3. Mesure en présence de KPV 198
VI.1.4. Mesure en présence d'acide caféique 198
VI.1.5. Mesure en présence de bétuline 198
VI.1.6. Mesure en présence de Médiacalm 198
VI.1.7. Mesure en présence d'apocynine 198
VI.1.8. Mesure en présence d'H-89 199
VI.1.9. Mesure en présence de forskoline 199
VI.1.10. Mesure en présence de PD153035 199
VI.1.11. Mesure en présence de PD98059 199
VI.2. MESURE DES ERO MITOCHONDRIALES 200
VI.2.1. Induction par les UVA 200
VI.2.2. Induction par l'antimycine A 200

VII. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE 201
VII.1. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE 201
VII.2. PROTOCOLE 201

VIII. DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD 202
VIII.1. PRINCIPE DU DOSAGE 202
VIII.2. PROTOCOLE 202

IX. PROTOCOLE DE CO-IMMUNOPRECIPITATION 203
IX.1. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE 203
IX.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS CELLULAIRES 203
IX.3. PROTOCOLE 204

X. ANALYSE DES PROTEINES D'INTERET PAR WESTERN-BLOT 204
X.1. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE 204
X.2. SEPARATION ET TRANSFERT DES PROTEINES 205
X.3. DETECTION DES PROTEINES D'INTERET 205

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 207

ANNEXE 1: COMPOSITION DES TAMPONS 262

ANNEXE 2: LISTE DES PUBLICATIONS & DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 266

ANNEXE 3: ARTICLE SOUMIS A *JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY* 268

SOMMAIRE DES FIGURES

Figure 1: Les UV dans le spectre électromagnétique 18
Figure 2: Action des UV au niveau cellulaire 19
Figure 3: Coupe schématique de peau humaine 19
Figure 4: Structure de l'épiderme 20
Figure 5: Structure de la vitamine D3 25
Figure 6: Dommages induits par les UVA et formation des ERO 26
Figure 7: Formation de la 8-oxoGua 26
Figure 8: Structure des dimères formés entre deux bases pyrimidiques adjacentes après irradiation par les UVB 27
Figure 9: La voie intrinsèque apoptotique 29
Figure 10: Voie extrinsèque apoptotique et récepteurs de mort cellulaire 30
Figure 11: Les mécanismes de l'immunosuppression induite par les UV 32
Figure 12: Photocarcinogenèse et mécanismes de protection intrinsèques contre les cancers cutanés induits par les UV 36
Figure 13: Structure des RCPG 39
Figure 14: Internalisation et désensibilisation des RCPG 41
Figure 15: Structure du récepteur à la mélanocortine de type 1 45
Figure 16: Représentation schématique du peptide POMC et de ses fragments 49
Figure 17: Structure de l'hormone de stimulation des mélanocytes ou α-MSH 50
Figure 18: Positions des mutations non fonctionnelles dans la structure primaire du récepteur MC1R 53
Figure 19: Régulations de l'expression et de la signalisation du récepteur MC1R 56
Figure 20: Expression du récepteur mc1r après traitement par l'α-MSH ou l'ASP dans des mélanocytes murins melan-a 58
Figure 21: Régulation de la pigmentation photo-induite par USF-1 60
Figure 22: Différences entre eumélanines et phéomélanines 62
Figure 23: Voie de synthèse des mélanines 63
Figure 24: Régulation de la mélanogenèse par l'AMPc 66
Figure 25: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène 75
Figure 26: Les dommages oxydatifs de l'ADN par les espèces réactives de l'oxygène 77

Figure 27: Mécanismes en chaîne de la péroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés 79

Figure 28: Modifications des chaînes latérales des acides aminés après attaque radicalaire 80

Figure 29: Rôle du GSH dans l'oxydation des groupements thiols des protéines 84

Figure 30: Représentation schématique des enzymes péroxysomales qui produisent et dégradent les ERO 86

Figure 31: Coupe schématique d'une mitochondrie 90

Figure 32: Représentation schématique de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale 91

Figure 33: Production et inactivation des ERO dans la mitochondrie 92

Figure 34: Rôle des ERO dans le contrôle de la mort cellulaire au sein de la mitochondrie 94

Figure 35: Structure de l'isoforme Nox2 de la NADPH oxydase 97

Figure 36: Assemblage et activation de l'isoforme Nox2 ou gp91^{phox} de la NADPH oxydase 98

Figure 37: Représentation structurale de l'isoforme Nox1 de la NADPH oxydase 99

Figure 38: Représentation structurale de l'isoforme Nox5 de la NADPH oxydase 101

Figure 39: Représentation structurale des isoformes Duox de la NADPH oxydase 102

Figure 40: Régulations des voies de signalisation cellulaire par les ERO dans la peau. 107

Figure 41: Expression stable du récepteur MC1R et du variant non fonctionnel $R_{151}C$ dans les cellules HaCaT 115

Figure 42: Déplacement de la [^{125}I]-NDP-MSH par l'α-MSH sur cellules entières de la lignée HaCaT 117

Figure 43: Couplage fonctionnel des récepteurs MC1R et $R_{151}C$ dans les cellules HaCaT 118

Figure 44: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVB dans les cellules HaCaT 123

Figure 45: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT 125

Figure 46: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par l'α-MSH 127

Figure 47: Production d'oxyde nitrique induite par les UVA dans les cellules HaCaT-MC1R traitées par l'α-MSH 129

Figure 48: Déplacement de la [^{125}I]-NDP-MSH par le KPV sur cellules entières de la lignée HaCaT 132
Figure 49: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le KPV 133
Figure 50: Structure de l'acide caféique 135
Figure 51: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par l'acide caféique 137
Figure 52: Structure de la bétuline 138
Figure 53: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par la bétuline 141
Figure 54: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le Médiacalm 144
Figure 55: Mesure de la production d'ERO mitochondriale induite par l'antimycine A dans les cellules HaCaT 148
Figure 56: Mesure de la production d'ERO mitochondriale induite par les UVA dans les cellules HaCaT 149
Figure 57: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par l'apocynine 152
Figure 58: Structure de l'H-89 dihydrochloride 154
Figure 59: Mesure de la cytotoxicité de l'H-89 dans les cellules HaCaT 155
Figure 60: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par l'H-89 156
Figure 61: Mécanisme d'action hypothétique du récepteur MC1R sur le système NADPH oxydase 158
Figure 62: Structure de la forskoline 159
Figure 63: Mesure de la cytotoxicité de la forskoline dans les cellules HaCaT 160
Figure 64: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par la forskoline 161
Figure 65: Analyse par Western-Blot de la phosphorylation de NoxA1 par la PKA dans les cellules HaCaT 163
Figure 66: Mécanisme d'action hypothétique de la voie AMPc sur le système NADPH oxydase 165
Figure 67: Voie des MAP kinases 167
Figure 68: Mesure de la cytotoxicité du PD153035 dans les cellules HaCaT sauvages. 168

Figure 69: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le PD153035 170
Figure 70: Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le PD98059 172
Figure 71: Mesure de la production d'AMPc intracellulaire induite par l'α-MSH dans les cellules HaCaT traitées par le PD153035 et par le PD98059 174
Figure 72: Mesure de la production d'AMPc intracellulaire induite par la forskoline dans les cellules HaCaT traitées par le PD153035 et par le PD98059 175
Figure 73: Test de liaison par compétition 184
Figure 74: Principe du test AMPc LANCE 188
Figure 75: Structure du SYBR Green I 191
Figure 76: Schéma réactionnel de la détection de l'oxyde nitrique par le DAF-FM diacétate 195
Figure 77: Structure du carboxy-H_2DCF-DA 197
Figure 78: Principe de l'immunoprécipitation 203

SOMMAIRE DES TABLEAUX

Tableau 1: La famille des récepteurs aux mélanocortines 43
Tableau 2: Enzymes péroxysomales de génération d'ERO 87
Tableau 3: Enzymes de dégradation des ERO dans les péroxysomes 88
Tableau 4: Distribution tissulaire des enzymes Nox 96
Tableau 5: Inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVB dans les cellules HaCaT transfectées par le récepteur MC1R 124
Tableau 6: Inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT transfectées par le récepteur MC1R et le variant non fonctionnel $R_{151}C$ 126
Tableau 7: Inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par l'α-MSH dans les cellules HaCaT transfectées par le récepteur MC1R et le variant non fonctionnel $R_{151}C$ 128
Tableau 8: Cytotoxicité du KPV dans les cellules HaCaT sauvages 131
Tableau 9: Cytotoxicité de l'acide caféique dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53 136
Tableau 10: Cytotoxicité de la bétuline dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53 140

Tableau 11: Cytotoxicité du Médiacalm dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53 143

Tableau 12: Inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par l'apocynine dans les cellules HaCaT.....153

Tableau 13: Activation de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par l'H-89 dans les cellules HaCaT-MC1R.....157

Tableau 14: Inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par la forskoline dans les cellules HaCaT sauvages et dans le variant non fonctionnel $R_{151}C$.....162

Tableau 15: Phosphorylation de NoxA1 par la PKA dans les cellules HaCaT 164

Tableau 16: Activation de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par le PD153035 dans les cellules HaCaT-MC1R.....171

Tableau 17: Activation de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par le PD98059 dans les cellules HaCaT-MC1R.....173

Tableau 18: Dilutions des composés à tester pour le dosage de l'AMPc.....189

Tableau 19: Amorces utilisées pour l'étude du MC1R par qPCR 192

Tableau 20: Temps d'exposition des cellules HaCaT aux UVA dans les différentes expériences.....194

Tableau 21: Temps d'exposition des cellules HaCaT aux UVB dans les différentes expériences.....194

ABREVIATIONS

AC	Adénylate cyclase
ACTH	Hormone adrénocorticotropique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AGRP	Agouti related protein
AKAP	A-kinase anchoring protein
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein-1
Apaf	Apoptotic protease activating factor
ARN	Acide ribonucléique
ASIP	Agouti signaling protein
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovin serum albumin
Carboxy-H_2DCF-DA	5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
CBC	Carcinome basocellulaire
CE	Carcinome épidermoïde
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX-2	Cyclooxygénase-2
cpm	Coups par minutes
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate
DAG	Diacylglycérol
DCT	DOPAchrome tautomérase
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DHI	5,6-dihydroxyindole
DHICA	5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamide
DO	Densité optique
DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
DTT	Dithiothréitol
ECL	Enhanced chemiluminescent
EGCG	Epigallocatéchine gallate
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermique
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERA	Espèce reactive de l'azote
ERO	Espèce réactive de l'oxygène

FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADD	Fas-associated death domain
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GDP	Guanosine diphosphate
GPx	Glutathione péroxydase
GRK	G-protein receptor kinase
Grx	Glutarédoxine
GSH	Glutathion
GST	Glutathione S transférase
HBSS	Hank's buffered salt solution
HNE	4-hydroxy-2-nonénal
HNF-1α	Hepatocyte Nuclear Factor 1α
HRP	Horseradish péroxydase
HSC	Réaction d'hypersensibilité de contact
HSR	Réaction d'hypersensibilité retardée
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IFN-γ	Interféron-γ
IL	Interleukine
IP	Iodure de propidium
IP_3	Inositol triphosphate
JAK	Janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LC	Cellules de Langerhans
LDL	Lipoprotéine de densité légère
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC1R	Récepteur à la mélanocortine de type 1
MCs	Mélanocortines
MDA	Malonaldialdéhyde
MITF	Microphtalmia associated factor
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MSH	Melanocyte stimulating hormone
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAC	N-acétylcystéine
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NDP-MSH	[Nle^4,D-Phe^7]-melanocyte stimulating hormone
NF-κB	Nuclear transcription factor κB
NK	Cellules natural killer
NOS	Nitric oxide synthase
NoxA1	Nox activatrice 1
NoxO1	Nox organisatrice 1
PAH	Phénylalanine hydroxylase épidermique
PBS	Phosphate buffer saline
PC	Pro-hormone convertase

PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiestérase
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGE_2	Prostaglandine E_2
PIS	Photo-immunosuppression
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA_2	Phospholipase A_2
PLC	Phospholipase C
PMP	Protéine membranaire péroxysomale
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
POMC	Pro-opiomélanocortine
Prx	Péroxyrédoxine
qPCR	PCR quantitative en temps réel
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RGS	Regulator G-protein signaling
RHC	Red hair color
RIA	Radioimmuneassay
RIPA	Radioimmuneprecipitation buffer
RTK	Récepteur à tyrosine kinase
SALT	Skin-associated lymphoid tissue
SAPK	Stress-activated protein kinase
SC	Sunburn cells
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
SOD	Superoxyde dismutase
TBS	Tris buffer saline
TFA	Trifluoroacetic acid
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TPA	Agent promoteur de tumeurs
TRP	Tyrosinase-related protein
TRx	Thiorédoxine
TTBS	Tween tris buffer saline
UCA	Acide urocanique
USF	Upstream stimulating factor
UV	Ultraviolet
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
wt	Wild type

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1 : LES REPONSES DE LA PEAU AUX ULTRAVIOLETS

I. INTRODUCTION GENERALE SUR LES ULTRAVIOLETS

Près de 5% de l'énergie solaire est émise sous forme de rayonnement ultraviolet (UV). Les 95% restants sont représentés par la lumière visible (50%) et les infrarouges (45%) (Svobodova *et al.*, 2006). Les UV occupent la portion allant de 400 à 100 nm (**Figure 1**) et peuvent être classés en trois catégories (Diffey, 2002):

- Les UVA (400-320 nm);
- Les UVB (320-290 nm);
- Les UVC (290-200 nm).

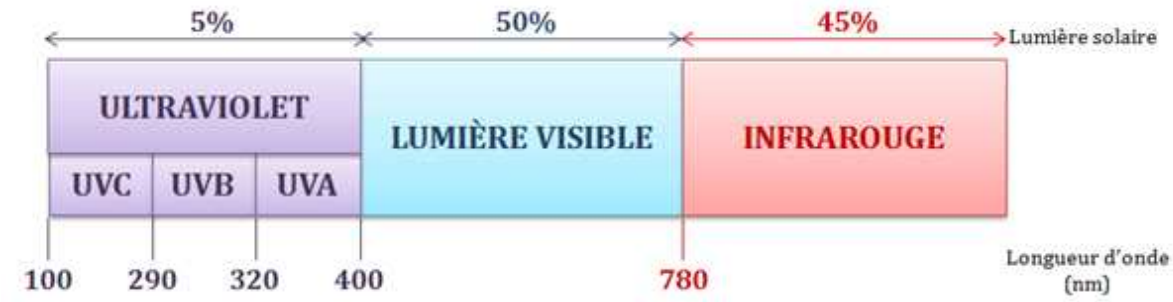


Figure 1: Les UV dans le spectre électromagnétique (Svobodova *et al.*, 2006).

Les UVB et les UVA représentent respectivement 5% et 95% des UV terrestres (Madronich *et al.*, 1998). Les UVB n'atteignent que l'épiderme et le derme superficiel. En revanche, les UVA pénètrent plus profondément dans la peau en atteignant le derme profond.

Les UV ont des effets bénéfiques pour la santé car ils participent à la synthèse de la vitamine D et sont utilisés dans le traitement de certaines maladies de la peau comme le psoriasis, le vitiligo ou l'eczéma. Néanmoins, lors d'expositions solaires prolongées et/ou répétées, ils peuvent être impliqués dans la survenue des cancers cutanés (mélanomes et carcinomes) et du vieillissement prématuré de la peau (**Figure 2**).

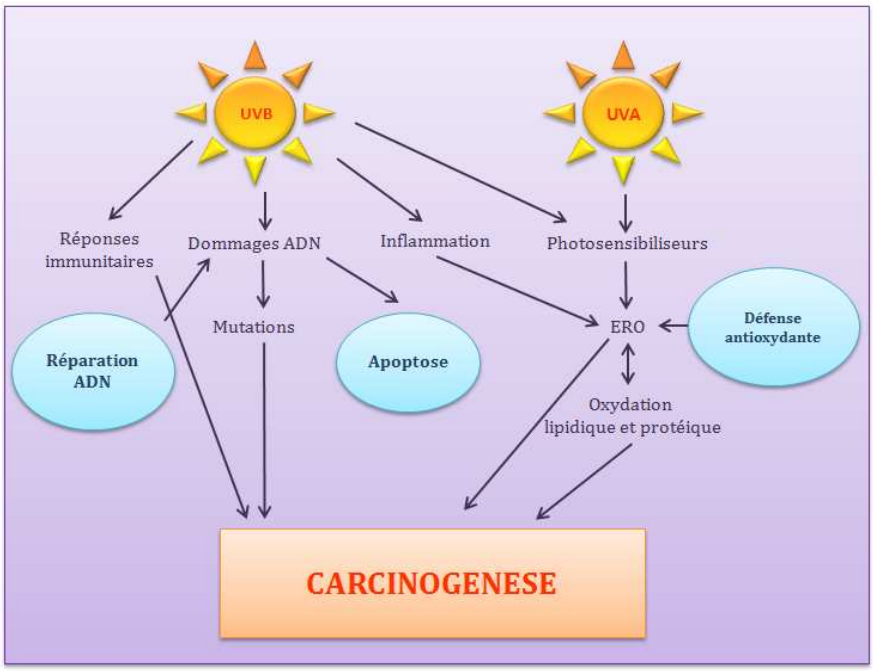


Figure 2: Action des UV au niveau cellulaire (Svobodova *et al.*, 2006).

II. LA PEAU

La peau constitue une barrière contre les effets délétères des UV et des molécules chimiques exogènes. Elle est constituée de quatre couches qui sont, de la surface vers l'intérieur : l'épiderme, la jonction dermo-épidermique (JDE), le derme et l'hypoderme (**Figure 3**).

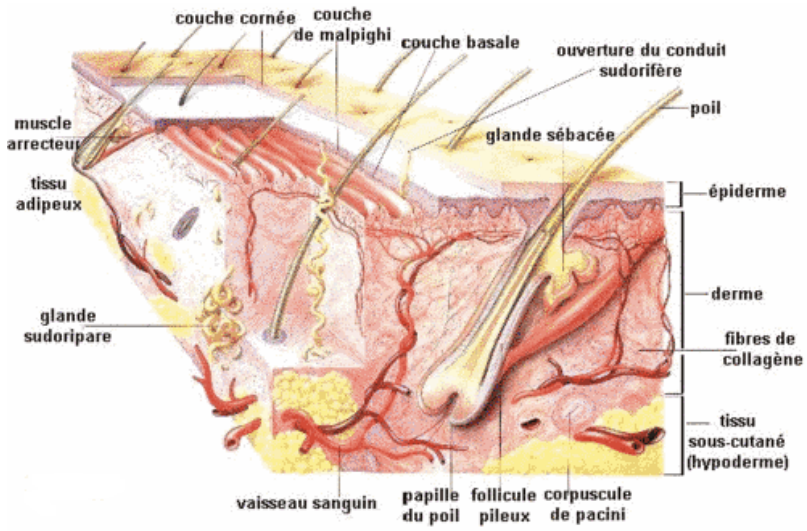


Figure 3: Coupe schématique de peau humaine. On distingue les trois couches principales : épiderme, derme et hypoderme. Illustration extraite de http://www.epitact.com.

II.1. L'épiderme

L'épiderme, partie la plus superficielle de la peau, est constitué de quatre types cellulaires : les kératinocytes d'origine ectoblastique, les mélanocytes provenant des crêtes neurales, les cellules de Langerhans issues de la moelle hématopoïétique et les cellules de Merkel dérivant des cellules souches de l'épiderme embryonnaire (**Figure 4**).

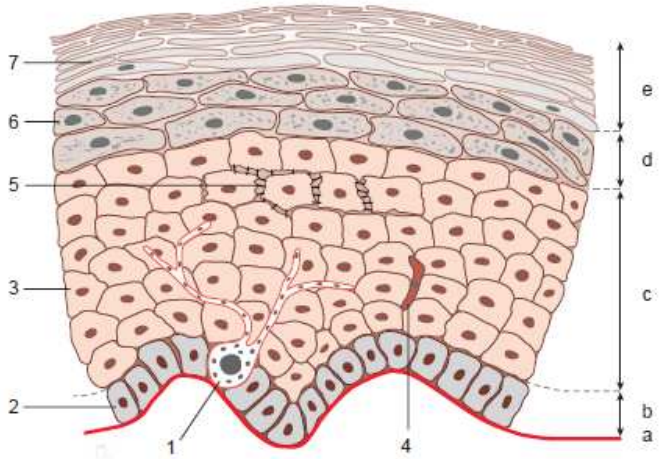


Figure 4: Structure de l'épiderme. 1: mélanocyte. **2**: kératinocyte de la couche basale. **3**: kératinocyte de la couche spineuse. **4**: cellule de Langerhans. **5**: desmosomes. **6**: kératinocyte de la couche granuleuse contenant des grains de kératohyaline. **7**: cornéocytes. **a**: membrane basale. **b**: couche basale. **c**: couche spineuse. **d**: couche granuleuse. **e**: couche cornée (Dubus and Vergier, 2000).

II.1.1. Les kératinocytes

Les kératinocytes représentent 90% des cellules de l'épiderme. Ces cellules assurent trois grandes fonctions : la cohésion de l'épiderme, la fonction de barrière et la protection contre les radiations lumineuses grâce aux mélanosomes qu'ils ont phagocytés. Les kératinocytes subissent en permanence une évolution morphologique ce qui permet de distinguer sur une coupe d'épiderme, la couche basale, la couche spineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (**Figure 4**).

II.1.2. Les mélanocytes

La fonction principale des mélanocytes est la synthèse des mélanines. Dans l'épiderme, les mélanocytes sont situés principalement dans la couche basale. Ils ont un aspect étoilé et leurs prolongements cytoplasmiques s'insinuent entre les kératinocytes. Ils sont dépourvus de systèmes de jonctions intercellulaires avec les cellules voisines. Le nombre de mélanocytes est sensiblement identique dans toutes les populations humaines, la différence de couleur s'expliquant par la qualité et la quantité de pigments que ces cellules produisent.

II.1.2.1. La mélanine

La mélanine est le pigment produit par les mélanocytes au niveau d'organites cytoplasmiques appelés mélanosomes. On décrit deux types de pigments mélaniques : l'eumélanine qui est noire-marron et la phéomélanine qui est jaune-orangée ; pigments produits à partir de la $_{L}$-tyrosine. L'eumélanine, contrairement à la phéomélanine, a un rôle photoprotecteur. La synthèse de la mélanine est régulée par des hormones et par des cytokines telles que l'α-MSH, le FGF basique, l'HGF et l'insuline.

La mélanogenèse sera étudiée plus en détail dans la partie 2 de la synthèse bibliographique.

II.1.2.2. Les mélanosomes

On distingue quatre stades de différenciation des mélanosomes. Les stades I et II correspondent à des organites non mélanisés appelés pré-mélanosomes. Dans les mélanosomes de type III, la mélanine commence à s'accumuler. Enfin, dans les mélanosomes de type IV, l'accumulation de pigments est telle que la structure interne n'est plus visible.

L'exposition solaire entraîne une stimulation de la mélanogenèse et une augmentation du nombre de mélanocytes soit par différenciation des mélanoblastes quiescents soit par divisions cellulaires des cellules matures (Gilchrest and Eller, 1999; Miyamura *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009a).

II.1.3. Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans représentent 3 à 8% des cellules épidermiques. Ce sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigène situées au niveau de la couche spineuse de l'épiderme (**Figure 4**).

II.1.4. Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel constituent la population cellulaire minoritaire de l'épiderme. Situées de façon dispersée dans la couche germinative (**Figure 4**), les cellules de Merkel sont des cellules neuro-endocrines qui expriment certains marqueurs neuronaux (chromogranine ou synaptophysine) et des marqueurs épithéliaux comme la kératine.

II.2. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique (JDE) joue un rôle fondamental dans l'adhésion dermo-épidermique et a une fonction de barrière entre l'épiderme et le derme.

II.3. Le derme et l'hypoderme

Le derme et l'hypoderme sont des tissus conjonctifs richement vascularisés et innervés. Ils ont pour origine le mésoblaste intra-embryonnaire.

Le derme comprend lui-même deux zones: une zone superficielle appelée derme papillaire et une zone profonde appelée derme réticulaire. L'hypoderme est constitué de lobules graisseux servant de passage aux vaisseaux et nerfs destinés au derme.

III. LES REPONSES IMMEDIATES AUX UV

L'exposition de la peau aux UV va entraîner le développement d'un grand nombre de réactions cutanées immédiates et à court terme.

III.1. L'érythème actinique

L'érythème actinique ou coup de soleil est produit par une exposition excessive aux UV qui sont alors absorbés par l'ADN des cellules. La rougeur de la peau qui en résulte est due à la libération de substances inflammatoires qui diffusent dans l'épiderme et parviennent aux capillaires sanguins qui se dilatent. L'intensité et la durée de l'érythème sont proportionnelles à la dose d'UV reçue par les différentes couches de kératinocytes (Saunders and Diffey, 1995). Ce sont les UVB qui sont les principaux responsables de ce phénomène.

III.2. L'épaississement de l'épiderme

Suite à l'agression des UVB, les kératinocytes de la couche basale (**Figure 4**) se divisent activement et contribuent ainsi à un épaississement global de l'épiderme. Une certaine photoprotection est donc ainsi procurée dont l'importance dépend également des nouvelles mélanines synthétisées.

III.3. La pigmentation

La pigmentation dite immédiate est une pigmentation transitoire de la peau exposée qui peut être induite par une dose suffisante d'UVA (10 J/cm^2) et/ou par la lumière visible (Rosen *et al.*, 1990). La pigmentation immédiate est due à la photo-oxydation de la mélanine pré-existante.

La pigmentation dite adaptative ou bronzage est induite par les UVA et les UVB. Elle implique une augmentation du nombre de mélanocytes fonctionnels, la stimulation de la mélanogenèse, une augmentation de la dendricité des mélanocytes et une augmentation de la synthèse et du transfert des mélanosomes. La réponse pigmentaire de la peau aux UV est déterminée en majeure partie par la pigmentation constitutive (Kadekaro *et al.*, 2003).

III.4. Le photovieillissement cutané ou héliodermie

Le photovieillissement cutané est essentiellement lié à un effet cumulatif des radiations UVA entraînant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) toxiques pour les cellules.

III.5. La production de vitamine D_3

Un des principaux effets bénéfiques des UV sur la peau est la synthèse de la vitamine D_3 (Holick, 1994, 2002). Les UVB convertissent le 7-déhydrocholestérol dans l'épiderme en prévitamine D_3 qui est immédiatement isomérisée en vitamine D_3. La prévitamine D_3 est photolabile et une exposition excessive aux UV entraîne sa photolyse en photoproduits biologiquement inertes, le lumistérol et le tachystérol. Par conséquent, seules de faibles expositions au soleil sont nécessaires à la synthèse de la vitamine D_3. Une fois la vitamine D_3 produite dans la peau, elle est métabolisée dans le foie en 1,25-$(OH)_2$ vitamine D_3 (**Figure 5**), la forme active de l'hormone nécessaire à l'absorption du calcium (Webb and Holick, 1988).

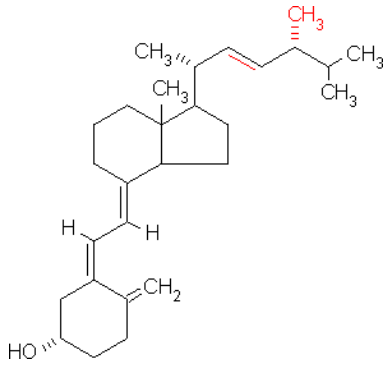


Figure 5: Structure de la vitamine D3.

IV. LES DOMMAGES DE L'ADN

Les UVB agissent sur l'ADN via des processus d'excitation des bases nucléiques, indépendamment de l'oxygène, et induisent des empreintes mutationnelles caractéristiques au niveau des sites bipyrimidiques incluant les séquences TC et CC (van Kranen *et al.*, 1997). A l'inverse, les UVA sont principalement à l'origine des réactions de photosensibilisation et de photo-oxydation (Cadet *et al.*, 2005).

IV.1. Les dommages induits par les UVA

Les UVA activent des chromophores endogènes comme la riboflavine, les porphyrines, les quinones ou la phéomélanine. Cette activation conduit à la génération d'ERO induisant des dommages de l'ADN, des protéines, des lipides et des saccharides (Cadet *et al.*, 2001). Les réactions de photosensibilisation aux UVA font intervenir deux mécanismes principaux dépendants des propriétés du photosensibilisateur.

Le mécanisme de type I implique une réaction de transfert d'électrons ou d'atome d'hydrogène entre le photosensibilisateur excité et le substrat (**Figure 6**). Ce mécanisme ne requiert pas la présence d'oxygène. Cette réaction, qui a pour cible préférentielle la base guanine, est appelée photosensibilisation (de Gruijl, 2000; Pouget *et al.*, 2000; Ravanat *et al.*, 2000). Les guanines sont converties en leur cation radical par une réaction d'oxydation. Le radical peut ensuite réagir avec l'eau ou perdre un proton.

Une réaction secondaire de ce mécanisme est la formation du radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) par réaction de l'oxygène moléculaire avec le radical anion du photosensibilisateur. L'$O_2^{\bullet-}$ peut engendrer, par dismutation, du péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui, en présence d'un métal de transition sous forme réduite comme l'ion ferreux, est à l'origine du radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$) très réactif (**Figure 6**).

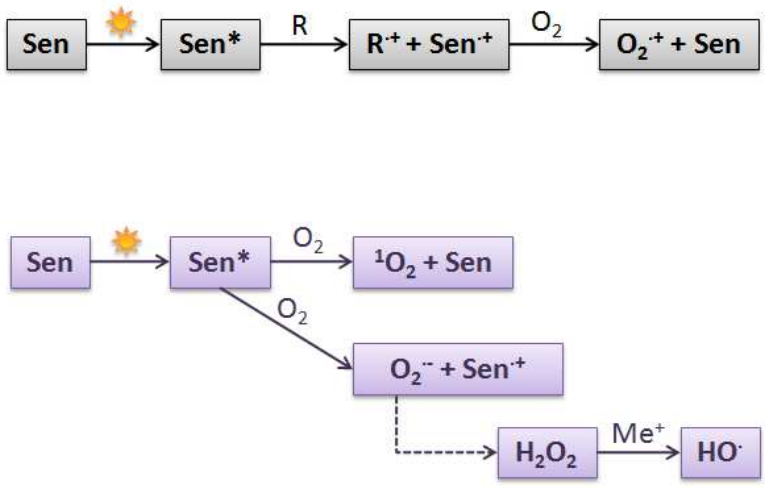


Figure 6 : Dommages induits par les UVA et formation des ERO. Sen : photosensibilisateur ; Sen* : photosensibilisateur excité ; R : chromophore ; Me^+ : cation métallique (Svobodova *et al.*, 2006).

Le mécanisme de type II implique une absorption d'énergie par le photosensibilisateur et un transfert sur l'oxygène. Cette molécule se trouve alors dans un état excité dit singulet lui permettant de réagir ensuite avec la base guanine pour former spécifiquement la 8-oxo-7,8-dihydroguanine ou 8-oxoGua (Douki *et al.*, 1999). Le rayonnement UVA induit ainsi un stress dit oxydant (**Figure 7**).

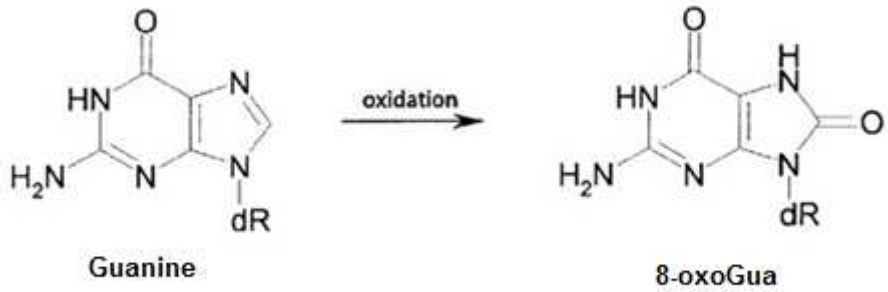


Figure 7: Formation de la 8-oxoGua. La 8-oxoGua est générée à partir de l'oxydation du résidu guanine (Vaisman and Woodgate, 2001).

Cependant, des travaux récents ont montré que l'induction de dimères de pyrimidine était plus importante que celle de 8-oxoGua après irradiation de la peau par les UVA (Mouret *et al.*, 2006). Cette formation, dont le mécanisme reste à élucider complètement, ne révèle probablement pas d'un mécanisme de photosensibilisation mais d'un mécanisme d'action direct des UVA sur l'ADN (Mouret *et al.*, 2010).

IV.2. Les dommages induits par les UVB

Le rayonnement UVB, dont l'énergie lumineuse est directement absorbée par l'ADN, induit principalement des modifications des bases pyrimidiques (Cadet *et al.*, 1990; Douki and Cadet, 2001).

Les principaux photoproduits générés sont des dimères de type cyclobutane, des adduits pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4 PP), des isomères de valence Dewar et des mutations tandem CC → TT, appelées signatures spécifiques de l'irradiation UVB (**Figure 8**).

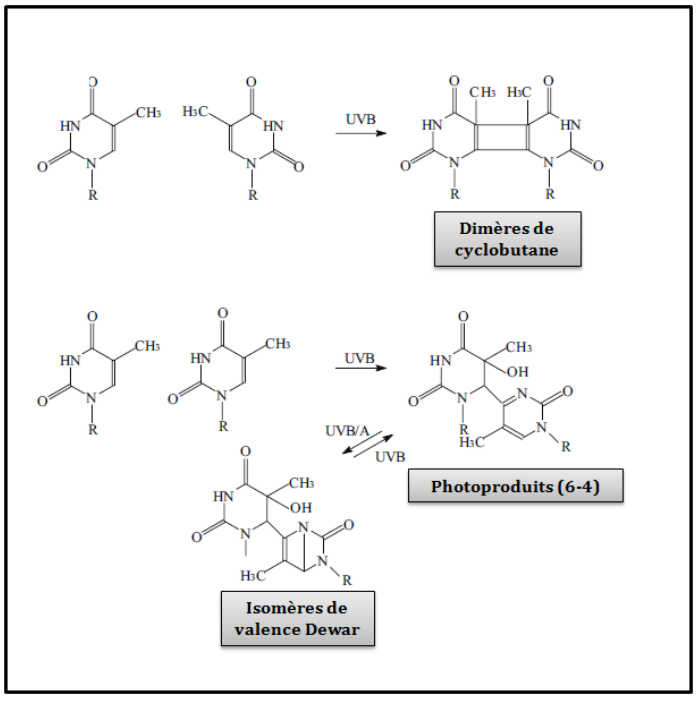


Figure 8: Structure des dimères formés entre deux bases pyrimidiques adjacentes après irradiation par les UVB. (Pattison and Davies, 2006; Svobodova *et al.*, 2006).

V. L'APOPTOSE

V.1. Généralités

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire hautement régulé et conservé qui permet l'élimination, sans processus inflammatoire, des cellules dont la présence n'est plus indispensable (Danial and Korsmeyer, 2004; Hotchkiss *et al.*, 2009; Leach, 1998; Raskin, 1997). Elle répond à deux grands types de situations. Dans le premier cas, il s'agit de la « mort cellulaire programmée » telle qu'on peut l'observer au cours de la maturation embryonnaire, du renouvellement tissulaire ou lors de la réponse immunitaire. Dans le second cas, l'apoptose permet de protéger l'organisme contre un agent viral ou contre des cellules génétiquement lésées, en sacrifiant les cellules infectées.

Il existe deux voies apoptotiques principales activées toutes les deux par les caspases (Danial and Korsmeyer, 2004; Thornberry and Lazebnik, 1998) mais qui dépendent de l'origine du stimulus de mort :

- La **voie intrinsèque** dépendante de la mitochondrie (**Figure 9**) ;
- La **voie extrinsèque** dépendante des récepteurs de mort cellulaire (**Figure 10**).

V.1.1. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque apopotique est sous le contrôle de Bcl-2 (pour B-cell lymphoma 2) et a lieu au niveau de la mitochondrie. Elle est initiée par des signaux intrinsèques entraînant l'activation des caspases (**Figure 9**). Les protéines Bcl-2 peuvent être classées en trois catégories (Borner, 2003) :

- Les facteurs de survie anti-apoptotiques **Bcl-2-like** (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1) ;
- Les facteurs de mort pro-apoptotiques **BH3-only** (Bad, Bid, Noxa, PUMA) ;
- Les facteurs de mort pro-apoptotiques **Bax-like** (Bax, Bak).

Les protéines Bcl-2 vont initier la voie apoptotique intrinsèque en formant des pores au niveau de la membrane mitochondriale. Une fois ces pores formés, les molécules pro-apoptotiques AIF, Smac, DIABLO et le cytochrome c sont libérées de la mitochondrie. Le cytochrome c interagit alors avec une protéine appelée Apaf (Apoptotic Protease Activating Factor) qui, à son tour active la caspase-9 puis la caspase-3. Un complexe multiprotéique (apoptosome) se forme alors contenant le cytochrome c, Apaf-1, la procaspase-9 et de l'ATP (**Figure 9**).

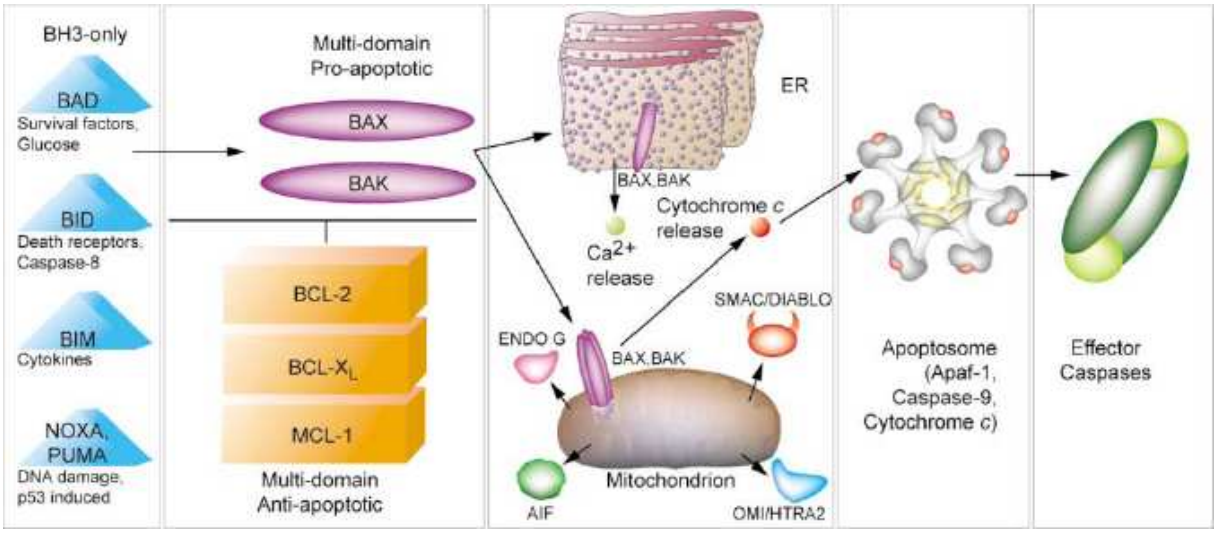


Figure 9 : La voie intrinsèque apoptotique (Hotchkiss *et al.*, 2009)**.**

V.1.2. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque apoptotique ou voie des récepteurs de mort est initiée par des ligands extracellulaires comme le TNF-α, FasL (Fas ligand)/CD95L, TWEAK et TRAIL. Ces ligands se lient à leurs récepteurs respectifs qui sont TNF-R, Fas/CD95, DR3, DR4/DR5 (**Figure 10**). Après la liaison du ligand sur le récepteur, on observe un changement conformationnel dans le domaine intracellulaire qui révèle la présence d'un domaine spécifique appelé domaine de mort (DD) (**Figure 10**). Après activation, les récepteurs recrutent sur leur face cytoplasmique des protéines adaptatrices comme FADD (Fas-Associated Death Domain protein) et TRADD (TNF-R-Associated Death Domain protein). La caspase-8 initiatrice se lie alors à la protéine adaptatrice, au niveau du domaine effecteur de mort (DED pour Death Effector Domain) ce qui résulte en la formation d'un casposome ou DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Borner, 2003; Cohen *et al.*, 2007).

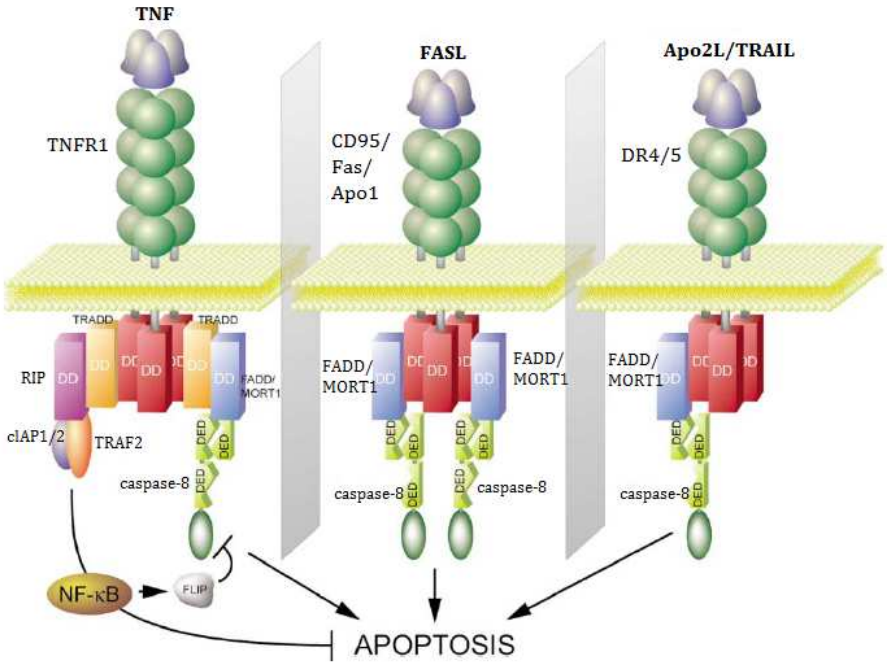


Figure 10 : Voie extrinsèque apoptotique et récepteurs de mort cellulaire. (Hotchkiss *et al.*, 2009).

V.2. Les mécanismes de l'apoptose induite par les UV

L'apoptose induite par les UV implique la contribution indépendante des photoproduits de l'ADN, des récepteurs de mort cellulaire et des ERO.

V.2.1. Le rôle des caspases et des facteurs Bcl-2

De nombreuses études ont montré que l'activation des caspases dans les kératinocytes humains exposés aux UVB se déroulait via la voie intrinsèque mitochondriale (Assefa *et al.*, 2003a; Assefa *et al.*, 2003b; Sitailo *et al.*, 2002). Les travaux de Sitailo *et al.* (Sitailo *et al.*, 2002) ont mis en évidence, dans des kératinocytes humains, que la caspase-9 était la caspase dominante dans la cascade de mort cellulaire induite par les UVB. La surexpression de Bcl-2 dans des kératinocytes humains bloque le clivage de Bid et l'apoptose induite par les UVB (Assefa *et al.*, 2003a). Dans ce contexte, la voie apoptotique mitochondriale et la famille de protéines régulatrices Bcl-2 semblent jouer un rôle important.

La balance entre molécules pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bid) et molécules anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L) détermine si l'apoptose est induite ou inhibée (Kroemer, 1997). Les protéines anti-apoptotiques empêchent la perméabilité mitochondriale ainsi que la libération de cytochrome c et d'ERO dans le cytoplasme (Reed, 1997).

V.2.2. Le rôle du suppresseur de tumeurs p53

Le suppresseur de tumeurs p53 est qualifié de « gardien du génome » et son rôle consiste à induire l'arrêt du cycle cellulaire. Ce processus est alors suivi de la réparation de l'ADN grâce à des systèmes cellulaires spécialisés qui empêchent la réplication de l'ADN endommagé et l'accumulation d'altérations génétiques. De plus, p53 a un rôle crucial d'inducteur apoptotique afin d'éliminer les cellules défectueuses et précancéreuses (Ziegler *et al.*, 1994).

La spécificité de p53 dans les réponses induites par les UVB a été mise en évidence grâce à son rôle dans la formation de kératinocytes apoptotiques appelés « sunburn cells » (SC) (Claerhout *et al.*, 2006; Daniels *et al.*, 1961; Murphy *et al.*, 2001). Ces cellules sont fortement endommagées et sont en général dirigées vers un processus apoptotique. Dans ce contexte, l'apoptose se révèle très utile pour l'élimination de cellules susceptibles de devenir cancéreuses. De plus, p53 médie la voie apoptotique mitochondriale en interagissant directement avec la mitochondrie et/ou avec des protéines régulatrices de l'apoptose comme Bcl-2.

V.2.3. Le rôle des lysosomes

La perméabilité membranaire lysosomiale, en libérant des enzymes protéolytiques dans le cytosol suite à une exposition aux UV, contribue à la mort cellulaire (Roberg *et al.*, 1999; Roberg and Ollinger, 1998). La perméabilité membranaire lysosomiale précède la libération de cytochrome c et l'activation des caspases en réponse à des agents inducteurs d'apoptose comme le stress oxydatif (Roberg *et al.*, 1999).

Les dommages oxydatifs induits par les UVA dans les lysosomes sont suivis d'une dégradation de la ferritine puis d'une libération de fer libre dans le cytosol, entraînant des dommages cutanés (Pourzand *et al.*, 1999).

VI. L'IMMUNOSUPPRESSION

Les UV sont absorbés par l'épiderme et induisent des altérations dans les fonctions immunitaires, on parle de photo-immunosuppression (PIS) (**Figure 11**) (de Gruijl, 2008; Hanneman *et al.*, 2006; Murphy, 2009; Norval, 2006). Ils induisent une diminution de l'immunité acquise et de l'immunité innée. Ils agissent en initiant une cascade d'évènements tels que des dommages membranaires, des dommages de l'ADN (Kripke *et al.*, 1992), une induction de certains facteurs de transcription cytoplasmiques, un profil de cytokines particulier et une isomérisation de l'acide urocanique (UCA) (De Fabo and Noonan, 1983; Norval *et al.*, 1995).

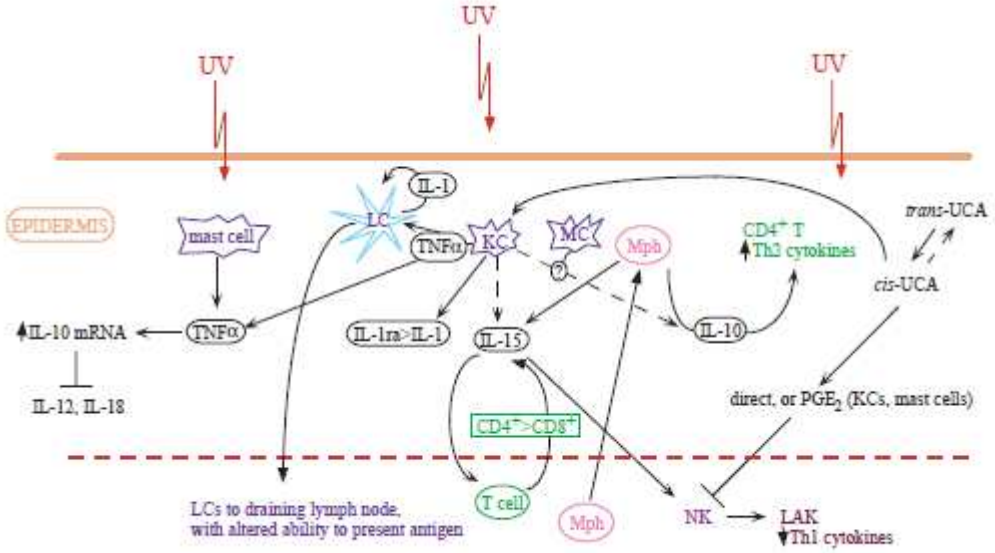


Figure 11 : Les mécanismes de l'immunosuppression induite par les UV. IL, interleukine ; UCA, acide urocanique ; PGE2 : prostaglandine E2 ; KC, kératinocyte ; LAK, cellule activée par les lymphokines ; LC, cellule de Langerhans ; MC, mélanocyte ; Mph, monocyte/macrophage ; NK, cellule « natural killer » (Duthie *et al.*, 1999).

Le système immunitaire cutané, appelé SALT (pour Skin-Associated Lymphoid Tissue) comporte des cellules dendritiques (Meunier *et al.*, 1993), des kératinocytes producteurs de cytokines, le réseau endothélial des veinules post-capillaires, des lymphocytes T et le système lymphoïde régional. Les cellules de Langerhans épidermiques représentent les cellules présentatrices d'antigènes de l'épiderme et jouent un rôle critique dans l'immunosurveillance des épithéliums de revêtement contre de nombreux agents exogènes (Meunier *et al.*, 1998). Ces cellules expriment à leur surface les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et se distinguent par l'expression de la molécule CD1a. Elles captent les éléments étrangers de l'organisme et le protège en initiant une réponse immunitaire à médiation cellulaire.

VI.1. Les mécanismes de la PIS

Les UVB peuvent induire une immunosuppression locale et systémique (Meunier, 1999). Les mécanismes impliqués dans la PIS sont complexes et font intervenir:

- Une action sur les cellules de Langerhans: les UV peuvent agir directement sur celles-ci mais également en activant la production de certaines cytokines par les kératinocytes (TNF-α, IL-1, IL-12 et surtout IL-1D) ;
- L'isomérisation d'un photorécepteur de la couche cornée, l'acide *trans* urocanique (UCA) en dérivé *cis* immunosuppresseur ;
- Des cellules monocytaires $CD36^{+}DR^{+}CD1a^{-}$ qui apparaissent dans l'épiderme après une forte dose d'UV.

Les UV modifient le nombre, le phénotype et la fonction des cellules de Langerhans (Kitajima and Takashima, 1999). Ces effets s'observent non seulement avec les UVB mais également avec les UVA longs (UVA1) (Dumay *et al.*, 2001). Après irradiation, les cellules de Langerhans sont susceptibles d'entrer en apoptose et/ou de perdre leurs processus dendritiques.

VI.2. Rôle de l'ADN au cours de la PIS

L'action du rayonnement UVB sur l'ADN est largement dominée par la formation de photoproduits dimériques entre deux bases pyrimidiques adjacentes. La formation de ces dimères dans les kératinocytes pourrait entraîner la production anormale de certaines cytokines comme l'IL-6, l'IL-10 ou le TNF-α.

VI.3. Rôle de l'acide urocanique

L'isomère *trans* de l'UCA est synthétisé dans la couche cornée à partir de l'histidine sous l'action d'une enzyme, l'histidine ammonia-lyase. Il est transformé en partie en isomère *cis* sous l'action des UV. Le *cis*-UCA semble jouer un rôle essentiel au cours des toutes premières phases de la PIS (Norval *et al.*, 1995; Norval *et al.*, 1989). Il est impliqué dans la diminution des réactions d'hypersensibilité retardée (HSR) et d'hypersensibilité de contact (HSC) observées après irradiation par les UVB.

VII. L'INFLAMMATION

Les UV augmentent le flux sanguin et l'infiltration par les leucocytes, comme les macrophages et les neutrophiles, dans la peau (Di Nuzzo *et al.*, 2000; Katiyar *et al.*, 1999; Meunier *et al.*, 1995). L'augmentation de la production d'oxyde nitrique (•NO) et des prostaglandines contribue à ces évènements (Warren *et al.*, 1993; Weller, 1997). De plus, l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion, comme ICAM-1, à la surface des kératinocytes contribue également à l'infiltration des leucocytes dans la peau et est nécessaire à leur interaction avec les kératinocytes. ICAM-1 est inductible par le TNF-α, l'IL-1β, l'IFN-γ et les UV (Krutmann *et al.*, 1990). L'induction d'ICAM-1 par les UVB, dans la lignée kératinocytaire humaine HaCaT, fait intervenir les ERO et le facteur de transcription NF-κB (Lee Jin Park, 2006).

La péroxydation lipidique induite par les UV augmente la production des prostaglandines (PG), comme PGE_2, à l'origine de l'inflammation cutanée (Hruza and Pentland, 1993). La PGE_2 est produite à partir de l'acide arachidonique par la forme inductible de la cyclooxygénase (COX), COX-2. En effet, comme l'activité phospholipase est induite par les UV, ceci augmente la disponibilité de l'acide arachidonique pour la production des PG. D'autres médiateurs chimiques, comme le TNF-α et l'IL-1α, contribuent également à l'inflammation induite par les UV (Grewe *et al.*, 1993).

VIII. LE STRESS OXYDATIF

Le stress oxydatif fera l'objet de la partie 3 de la synthèse bibliographique.

Les ERO sont des entités à faible vie, générées de façon continue et à faibles doses au cours du métabolisme aérobie. Leur production excessive, lors d'une exposition aux UV, a une action délétère sur les protéines, l'ADN et les lipides membranaires (péroxydation lipidique). Les conséquences de cette production de radicaux libres sont les suivantes : rupture des membranes biologiques, inactivation de certains récepteurs, libération de produits de péroxydation mutagènes et cytotoxiques. La production d'ERO implique l'intervention de photosensibilisateurs endogènes variés comme la phéomélanine, expliquant en partie le risque accru de cancers cutanés chez les sujets blonds ou roux.

IX. LES CANCERS CUTANÉS

La photocarcinogenèse cutanée se définit comme l'ensemble des phénomènes aboutissant à la formation d'un cancer de la peau dû aux UV (Black *et al.*, 1997; de Gruijl, 2000; Nishigori, 2006) (**Figure 12**).

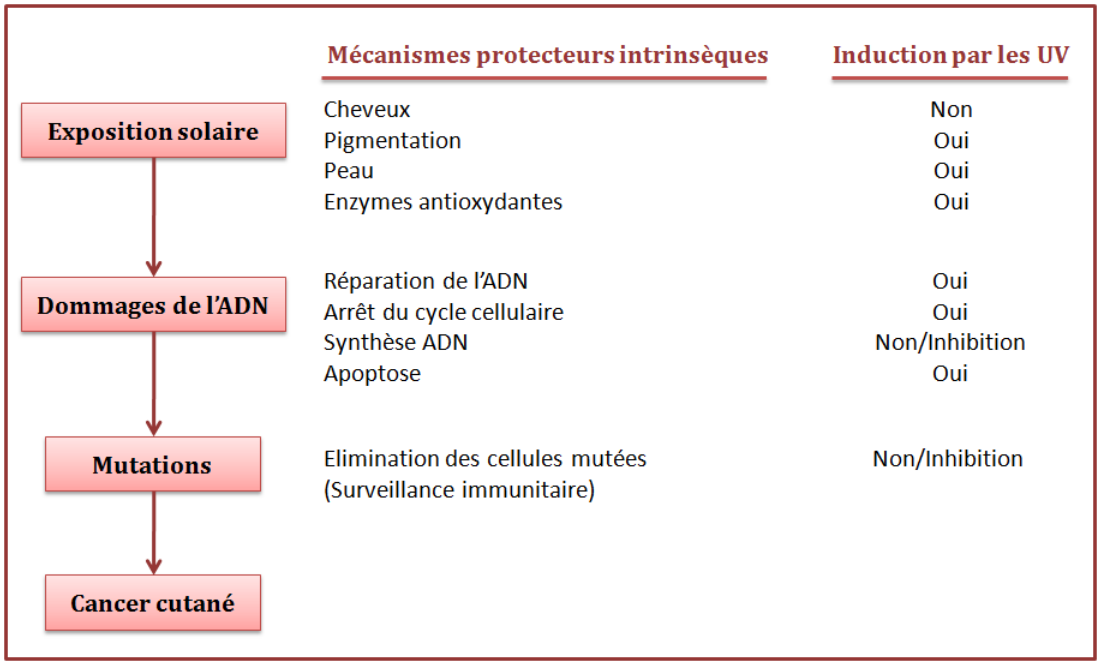


Figure 12 : Photocarcinogenèse et mécanismes de protection intrinsèques contre les cancers cutanés induits par les UV. (Runger, 2007).

Les cancers cutanés sont les cancers les plus fréquemment rencontrés et représentent plus de 100.000 nouveaux cas par an en France (source août 2009). Les radiations UV sont l'élément étiologique majeur responsable de ces cancers (English *et al.*, 1998; Monograph, 1992; Rosso *et al.*, 1996). 90 à 95% des cancers cutanés sont représentés par les carcinomes basocellulaires et épidermoïdes (prolifération des kératinocytes) et 5 à 10% sont représentés par les mélanomes (prolifération des mélanocytes). D'autres facteurs comme l'épaisseur de la peau, la pigmentation cutanée et les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent influencer les réponses de la peau aux UV et par conséquent, le risque de développer un cancer cutané. Deux types d'exposition solaire peuvent entraîner l'apparition d'un cancer cutané: les expositions intermittentes aiguës sur une peau non préparée (mélanomes) ou les expositions chroniques (carcinomes).

IX.1. Les carcinomes

Les carcinomes cutanés sont représentés essentiellement par les carcinomes basocellulaires (CBC), les plus fréquents, d'évolution lente, qui ne métastasent jamais et par les carcinomes épidermoïdes (CE) qui peuvent métastaser (Einspahr *et al.*, 2002).

Le CBC ne survient jamais sur une lésion précancéreuse alors que ce n'est pas le cas du CE qui peut survenir à partir d'une kératose actinique, d'une radiodermite ou d'une brûlure.

IX.2. Les mélanomes

Le mélanome est un cancer cutané rare mais extrêmement grave (plus de 25% de mortalité à 5 ans). 7.000 nouveaux cas de mélanomes sont diagnostiqués chaque année en France et ce cancer est responsable de plus de 1.000 décès. L'épaisseur de la tumeur (indice de Breslow) reste l'indice pronostique le plus fiable pour déterminer la survie à 5 ans. Le mélanome apparaît en peau saine sous forme d'une tache pigmentée ressemblant à un grain de beauté. Dans 25% des cas environ, le mélanome est une dégénérescence d'un grain de beauté dont les contours, la couleur et l'aspect se modifient.

PARTIE 2 : RECEPTEURS AUX MELANOCORTINES DE TYPE 1 (MC1R) ET α-MSH

Les récepteurs aux mélanocortines sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui regroupent cinq membres (MC1R, MC2R, MC3R, MC4R et MC5R) (Cone, 2000). Chaque sous-type de ce récepteur est exprimé spécifiquement dans certains tissus et régule diverses fonctions biologiques. Au cours de ce projet de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au récepteur MC1R qui est exprimé au niveau de la peau et est impliqué dans la régulation de la pigmentation et de l'inflammation.

I. GÉNÉRALITÉS SUR LES RCPG

Les RCPG représentent la plus grande famille des récepteurs membranaires. Ces récepteurs ont la capacité de lier des ligands de nature très diverse comme des photons, des peptides ou des hormones.

I.1. La structure des RCPG et des protéines G

I.1.1. La structure des RCPG

La structure des RCPG est basée sur le modèle de la rhodopsine dont la structure tridimensionnelle a été résolue en 2000 (Palczewski *et al.*, 2000). Ces récepteurs sont caractérisés par une structure à sept hélices α transmembranaires (TM), reliée par trois boucles extracellulaires (e_1, e_2, e_3) et trois boucles intracellulaires (i_1, i_2, i_3) (**Figure 13**).

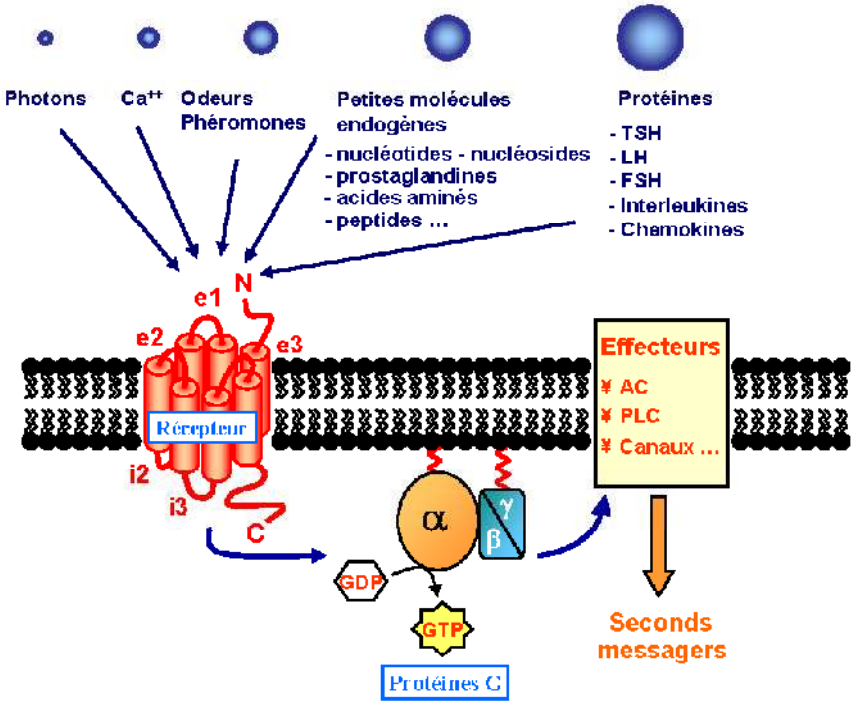


Figure 13 : Structure des RCPG (Bockaert and Pin, 1999).

Les RCPG sont répartis en trois classes (Bockaert and Pin, 1999). La classe A, dont font partie la rhodopsine et le MC1R, est la plus représentée. La classe B des RCPG comprend les récepteurs liant la calcitonine et la sécrétine et la classe C regroupe les récepteurs du glutamate, du GABA (acide gamma-aminobutyrique) et du calcium.

I.1.2. La structure des protéines G

Les protéines hétérotrimériques ou protéines G portent une activité GTPasique. Ces protéines intracellulaires, localisées préférentiellement au niveau de la membrane plasmique, forment un assemblage tripartite composé d'une sous-unité Gα et d'un complexe βγ indissociable (**Figure 13**). Les sous-unités Gα sont classées en quatre familles: $G\alpha_{s/olf}$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, $G\alpha_{12/13}$ (Gilman, 1987) et sont composées de deux domaines bien distincts : un domaine GTPase impliqué dans l'échange GDP/GTP et dans l'hydrolyse du GTP ainsi qu'un domaine riche en hélices α susceptible d'interagir avec les RCPG et la sous-unité Gβ.

I.2. Les mécanismes d'activation des RCPG

I.2.1. L'activation des protéines G

A l'état inactif, la protéine G comprend les trois sous-unités Gα, Gβ et Gγ. La sous-unité Gα lie une molécule de GDP (guanosine diphosphate) au niveau de son domaine GTPase. L'activation du récepteur par son agoniste se traduit par un couplage du récepteur à la protéine G puis par une diminution de l'affinité de la sous-unité Gα pour le GDP, qu'elle expulse (Gilman, 1987; Neer, 1995). La conséquence majeure de l'échange GDP/GTP semble être une dissociation du complexe hétérotrimérique : Gα-GTP et le complexe Gβγ (Neer, 1995) . Les sous-unités dissociées activent alors différents effecteurs spécifiques comme l'adénylate cyclase (AC) ou la phospholipase C (PLC). Pour terminer le cycle, une RGS (pour Regulator G-protein Signaling) déphosphoryle le GTP en GDP ce qui met fin au signal d'activation.

I.2.2. La transduction du signal

La liaison d'un ligand sur son récepteur et l'activation successive de la protéine G, représentent les deux premières étapes indispensables à la transmission d'un signal à l'intérieur de la cellule. La protéine Gα activée peut interagir avec différentes classes d'effecteurs dont l'AC et la PLC.

L'adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (AMPc), considéré comme second messager, est produit à partir d'adénosine triphosphate (ATP) par l'AC membranaire. Certains récepteurs peuvent contrôler la production d'AMPc en agissant via l'activation de protéines G spécifiques, capables de stimuler (Gs) ou d'inhiber (Gi) sa production.

D'autres protéines G sont associées à des voies de signalisation activant la PLCβ. Cette enzyme membranaire, une fois activée par la sous-unité Gαq, clive le phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate en inositol triphosphate (IP_3) et en diacylglycérol (DAG). Ces deux seconds messagers agissent à leur tour comme des effecteurs.

L'IP_3 se lie sur des canaux calciques du réticulum endoplasmique (RE) et permet d'augmenter la concentration cytoplasmique en calcium. Le DAG agit sur la protéine kinase C (PKC) et favorise l'ouverture de canaux calciques membranaires.

I.3. La désensibilisation des RCPG

La majorité des RCPG possède un mécanisme de désensibilisation homologue (**Figure 14**) qui consiste en une atténuation de la signalisation suite à la liaison de l'agoniste (Luttrell and Lefkowitz, 2002 ; Pitcher, 1998). Ce mécanisme permet d'éviter une stimulation prolongée du récepteur. Cette régulation négative nécessite un découplage physique entre le récepteur et les protéines G.

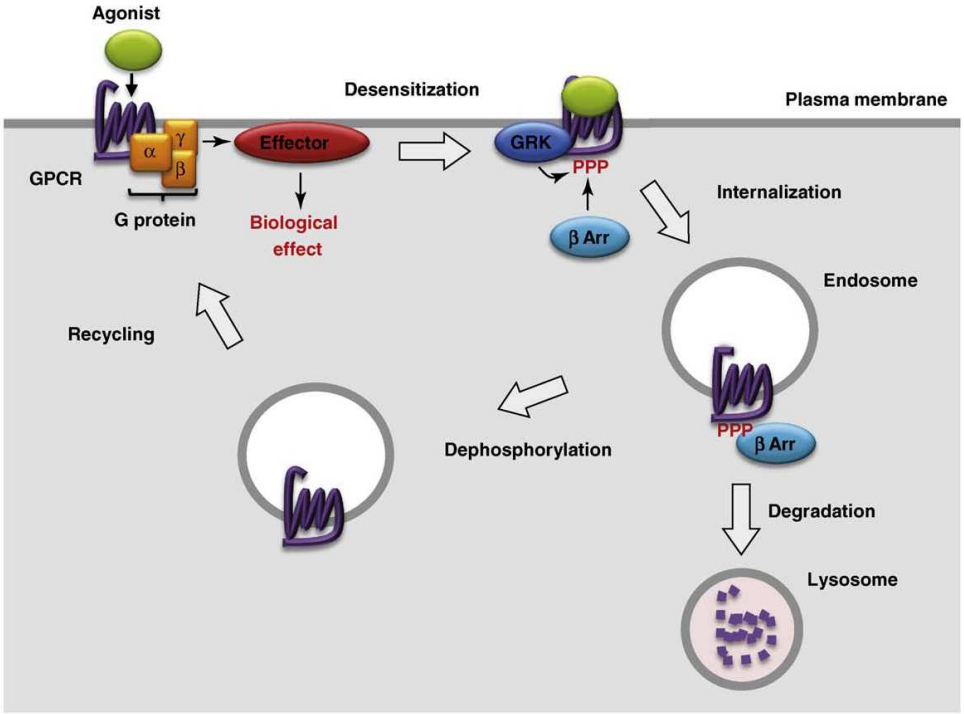


Figure 14 : Internalisation et désensibilisation des RCPG. β Arr : β-arrestine ; GRK : G-protein Receptor Kinase ; PPP : phosphorylation ; GPCR : G-Protein Coupled Receptor (Calebiro *et al.*, 2010).

La désensibilisation homologue dépend de la phosphorylation du récepteur lié à son agoniste sur des résidus sérine (Ser) et thréonine (Thr) localisés au niveau de l'extrémité C-terminale (Bouvier et al., 1988; Hausdorff et al., 1989; Lohse et al., 1990).

Les mécanismes principaux de la désensibilisation des RCPG font intervenir plusieurs classes de protéines kinases : la PKA et la PKC activées par les seconds messagers (AMPc, calcium et DAG) qui phosphorylent le récepteur indépendamment de son état conformationnel (Hausdorff et al., 1989) et une famille de kinases spécifiques des RCPG appelée GRK (pour G-protein Receptor Kinase) (Luttrell and Lefkowitz, 2002 ; Pitcher, 1998) qui phosphoryle le récepteur dans sa conformation active (Ferguson et al., 1996; Lohse et al., 1989). Cette phosphorylation se traduit par le recrutement à la membrane plasmique d'une protéine cytosolique, la β-arrestine (Lohse et al., 1990). La β-arrestine joue un rôle fondamental dans l'internalisation des RCPG car elle permet la formation des puits recouverts de clathrine et peut interagir avec la protéine adaptatrice de clathrine AP2 dans le phénomène d'endocytose (Goodman et al., 1996; Laporte et al., 1999). Le récepteur internalisé peut alors suivre deux voies ; il peut être recyclé à la membrane cellulaire, on parle alors de resensibilisation, ou être dégradé.

II. LE RECEPTEUR AUX MELANOCORTINES DE TYPE 1

II.1. Généralités sur les récepteurs aux mélanocortines

Les récepteurs aux mélanocortines sont tous des RCPG à sept hélices transmembranaires, qui médient leurs effets intracellulaires en activant des voies dépendantes de l'AMPc. Ces cinq récepteurs montrent des affinités différentes pour leurs ligands, les mélanocortines (MCs), et des niveaux d'expression spécifiques dans certains tissus (**Tableau 1**). La liaison du ligand sur le récepteur est rendue possible car les MCs possèdent une seconde boucle intracellulaire et des domaines C- et N-terminaux de petite taille (Catania *et al.*, 2004).

Récepteur	Agonistes	Antagonistes	Expression	Fonction
MC1R	α-MSH=ACTH>β-MSH>γ-MSH	Agouti	Peau, cellules immunitaires	Pigmentation, inflammation
MC2R	ACTH		Cortex adrénal	stéroïdogenèse
MC3R	α-MSH=β-MSH=γ-MSH=ACTH	AgRP	Système nerveux central, placenta, système digestif	Régulation des fonctions cardiovasculaires, thermorégulation, immunomodulation
MC4R	α-MSH=ACTH>β-MSH>γ-MSH	AgRP, Agouti	Système nerveux central	Homéostasie énergétique, fonction érectile, douleur
MC5R	α-MSH>ACTH=β-MSH>>γ-MSH		Peau, glande adrénale, thymus, reproduction, estomac, lymphocytes, système nerveux central	Régulation des fonctions exocrines, immunomodulation.

Tableau 1 : La famille des récepteurs aux mélanocortines (Maaser et al., 2006).

II.1.1. Le récepteur MC1R

Le récepteur MC1R, qui possède 317 acides aminés, a été le premier récepteur aux mélanocortines à avoir été cloné (Chhajlani and Wikberg, 1992; Mountjoy *et al.*, 1992). Ce récepteur a un rôle primordial dans la physiologie cutanée, l'inflammation et la mélanogenèse (Slominski *et al.*, 2000).

Le récepteur MC1R est exprimé dans les mélanocytes (Roberts *et al.*, 2006) et dans les cellules du système immunitaire comme les macrophages (Star *et al.*, 1995), les lymphocytes (Neumann Andersen *et al.*, 2001), les cellules dendritiques (Becher *et al.*, 1999) et les neutrophiles (Catania *et al.*, 1996). De plus, le récepteur MC1R est induit par les UVB *in vitro* dans les kératinocytes humains normaux (Chakraborty *et al.*, 1999; Garcin *et al.*, 2009) et dans l'épiderme *in vivo* (Schiller *et al.*, 2004).

II.1.2. Le récepteur MC2R

Le récepteur MC2R régule la libération des stéroïdes par le cortex adrénal, via l'activation de la PKA, ce qui est essentiel pour la synthèse des enzymes stéroïdiennes (Penhoat *et al.*, 1989).

II.1.3. Le récepteur MC3R

Le récepteur MC3R à des affinités de liaison similaires pour toutes les MCs. Le MC3R est exprimé dans le système nerveux central, dans les tissus périphériques et dans les cellules immunitaires. L'activation de ce récepteur passe par une activation des voies de signalisation dépendantes de l'AMPc mais également des phospholides-inositol (Konda *et al.*, 1994). Le MC3R joue un rôle important dans la régulation des fonctions cardiovasculaires, dans la thermorégulation et dans l'appétit (Getting, 2002; Low, 2004). De plus, le MC3R joue un rôle important dans les effets anti-inflammatoires de l'α-MSH (Getting, 2002; Getting *et al.*, 2002; Getting *et al.*, 2003a).

II.1.4. Le récepteur MC4R

Le récepteur MC4R est activé de manière similaire à celle du récepteur MC1R et joue un rôle majeur dans la régulation de l'appétit et de l'homéostasie énergétique.

II.1.5. Le récepteur MC5R

Le récepteur MC5R a été le dernier récepteur aux mélanocortines à être cloné et identifié chez l'Homme (Gantz *et al.*, 1994). Les MCs se lient au MC5R de manière similaire à celle du MC1R. Le récepteur MC5R joue un rôle dans la thermorégulation et dans l'immunomodulation (Buggy, 1998).

II.2. La structure du récepteur MC1R

Le récepteur MC1R a été cloné en 1992 par l'équipe de Chhajlani et Wikberg (Chhajlani and Wikberg, 1992) et par l'équipe de Mountjoy (Mountjoy *et al.*, 1992) de façon indépendante. Des analyses basées sur la similarité de séquences ont montré que le MC1R appartenait à la classe A des RCPG, dont le prototype est la rhodopsine (Gether, 2000). Le MC1R est une protéine membranaire intégrale, de 317 acides aminés chez l'Homme, qui possède les caractéristiques propres aux RCPG à savoir, un domaine N-terminal extracellulaire, sept domaines transmembranaires (TM) et une extension C-terminale intracellulaire (**Figure 15**).

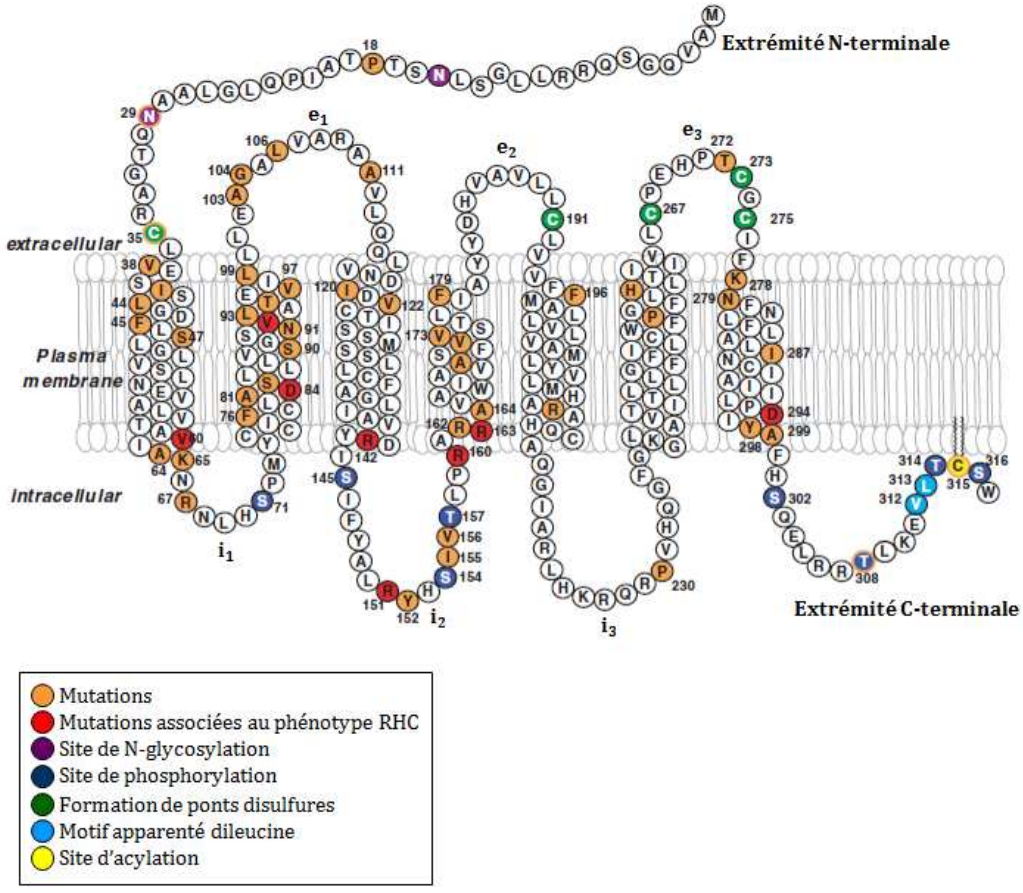


Figure 15: Structure du récepteur à la mélanocortine de type 1 (Garcia-Borron *et al.*, 2005). La séquence primaire représentée correspond à celle du récepteur de type sauvage. RHC : Red Hair Color, phénotype peau claire/cheveux roux ; i_x : boucle intracellulaire n°x ; e_x : boucle extracellulaire n°x.

II.2.1. Le domaine N-terminal

La majorité des protéines membranaires contiennent un peptide signal en N-terminal qui cible la protéine naissante au réticulum endoplasmique et est rapidement enlevé par clivage protéolytique. Cependant, le domaine N-terminal du MC1R ne correspond pas au consensus du peptide signal et la suppression des 27 premiers acides aminés n'a pas d'effet sur la liaison du ligand ou le niveau d'expression dans les cellules cos (Schioth *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent donc que le MC1R appartient à la classe des protéines membranaires qui utilise le premier domaine transmembranaire comme ancre de signal non clivable (Wallin and von Heijne, 1995).

Le récepteur MC1R contient deux séquences de glycosylation $_{15}$NSTP$_{18}$ et $_{29}$NQTG$_{32}$ en N-terminal (Sanchez-Laorden *et al.*, 2006a; Sanchez Mas *et al.*, 2002; Solca *et al.*, 1989). De plus, la cystéine présente près de l'extrémité N-terminale et du domaine transmembranaire n°1 (TM1) est conservée dans tous les récepteurs à la mélanocortine et est nécessaire à leurs fonctions. En effet, la mutation de la cystéine en glycine (Frandberg *et al.*, 2001) ou en alanine (Sanchez-Laorden *et al.*, 2006b) inactive le récepteur. Ceci peut être expliqué par le fait qu'un pont disulfure intracellulaire peut exister avec un partenaire présent dans la troisième boucle intracellulaire (i_3) ou que le pont disulfure peut contribuer à la dimérisation du récepteur.

II.2.2. Les boucles extracellulaires

Les boucles extracellulaires du MC1R sont courtes (Holst *et al.*, 2002; Prusis *et al.*, 1997; Ringholm *et al.*, 2004) et particulièrement, la boucle extracellulaire n°2 caractéristique de tous les récepteurs à la mélanocortine. Il a été mis en évidence que la mutation des résidus Glu$_{269}$ et Thr$_{272}$ en Ala dans la boucle extracellulaire n°3 diminuait l'affinité de liaison des agonistes sur le MC1R, ce qui laisse penser que ces résidus seraient impliqués dans la reconnaissance des ligands (Chhajlani *et al.*, 1996).

La liaison des agonistes est réalisée par un réseau d'acides aminés aromatiques et chargés localisés dans plusieurs domaines transmembranaires incluant le TM6.

La mutation de la Cys_{267} et de la Cys_{275} en Gly ou en Ala abolit la fonction du récepteur (Frandberg *et al.*, 2001; Holst *et al.*, 2002) suggérant que ces résidus forment un pont disulfure intramoléculaire entre le TM6 et le TM7 nécessaire à la fonction du MC1R.

II.2.3. Les boucles intracellulaires

Les boucles intracellulaires des RCPG fournissent une interface pour les protéines G hétérotrimériques et contiennent des cibles de phosphorylation impliquées dans la régulation de la signalisation, de l'internalisation et du recyclage des récepteurs (Strader *et al.*, 1994).

Chez la souris, la mutation naturelle *tobacco* $S_{69}L$ entraîne une hyperactivité du mc1r (Robbins *et al.*, 1993). La Ser_{69} et son homologue humain, la Ser_{71}, sont localisées dans la boucle intracellulaire n°1, suggérant que cette boucle est importante pour l'activité normale du récepteur.

Le tripeptide $_{141}DRY_{143}$, caractéristique des RCPG de classe A, est localisé à l'interface entre le TM3 et la boucle intracellulaire n°2. C'est un élément critique pour la fonction du MC1R puisqu'on observe une perte de fonction partielle chez le mutant humain $R_{142}H$ (Schioth *et al.*, 1999). Le MC1R possède également des sites de phosphorylation par la PKA ($_{142}RYIS_{145}$ et $_{151}RYHS_{154}$) et par la PKC ($_{157}TLPR_{160}$) dans la boucle intracellulaire n°2.

II.2.4. Les domaines transmembranaires

Dans les RCPG de classe A, le site de liaison du ligand est une poche localisée à l'interface entre le milieu extracellulaire et la membrane plasmique et est formée grâce aux différents domaines transmembranaires. Une région chargée contenant la Glu_{94} (TM2), l'Asp_{117} et l'Asp_{121} (TM3) interagissent avec un résidu Arg présent dans le pharmacophore His-Phe-Arg-Trp (HFRW) des MCs.

Un réseau de résidus aromatiques localisé près de l'extrémité extracellulaire des TM4, TM5 et TM6 peut contribuer à la liaison de l'agoniste en interagissant avec les résidus aromatiques du pharmacophore (Yang *et al.*, 1997). Onze mutations fonctionnelles ont été identifiées dans le TM2 (**Figure 15**) et la plupart d'entre elles ont d'importantes conséquences fonctionnelles.

II.2.5. Le domaine C-terminal

Le domaine C-terminal du récepteur MC1R est composé de 19 acides aminés dont 6 sont invariants. Dans les RCPG, le domaine C-terminal est impliqué dans :

- L'interaction du complexe ligand-récepteur avec les protéines G (Strader *et al.*, 1994) ;
- La disposition correcte du récepteur dans la membrane plasmique par acylation (palmitoylation ou myristoylation) des résidus Cys et l'intégration de la chaîne acyl dans la bicouche lipidique (Qanbar and Bouvier, 2003) ;
- Les signaux pour le trafic intracellulaire de la protéine (Schulein *et al.*, 1998).

Une délétion des cinq derniers acides aminés dans le MC1R, incluant le tripeptide invariant terminal CSW, est suffisante pour abolir la fonction du récepteur (Sanchez-Laorden *et al.*, 2006b). Cette abolition est due à la diminution de l'expression en surface du récepteur.

II.3. Les ligands du MC1R

Le récepteur MC1R est régulé à la fois par des agonistes, les MCs et par des peptides antagonistes naturels, l'ASP (pour Agouti Signal Protein).

II.3.1. Le précurseur pro-opiomélanocortine (POMC)

Les MCs dérivent d'une protéine précurseur appelée pro-opiomélanocortine (POMC). Cette protéine est présente dans l'hypothalamus, dans le système immunitaire, dans la rate, dans les poumons, dans les mélanocytes et dans le système digestif (Wikberg *et al.*, 2000).

La modification post-traductionnelle de la POMC aboutit à la génération des MCs, de la β-lipotropine, de la γ-lipotropine et de la β-endorphine (Gantz and Fong, 2003). Les MCs possèdent une séquence d'acides aminés commune His-Phe-Arg-Trp (HFRW) qui est la séquence minimale requise pour la liaison, l'activation et les effets biologiques du récepteur (Hadley et al., 1996) (**Figure 16**).

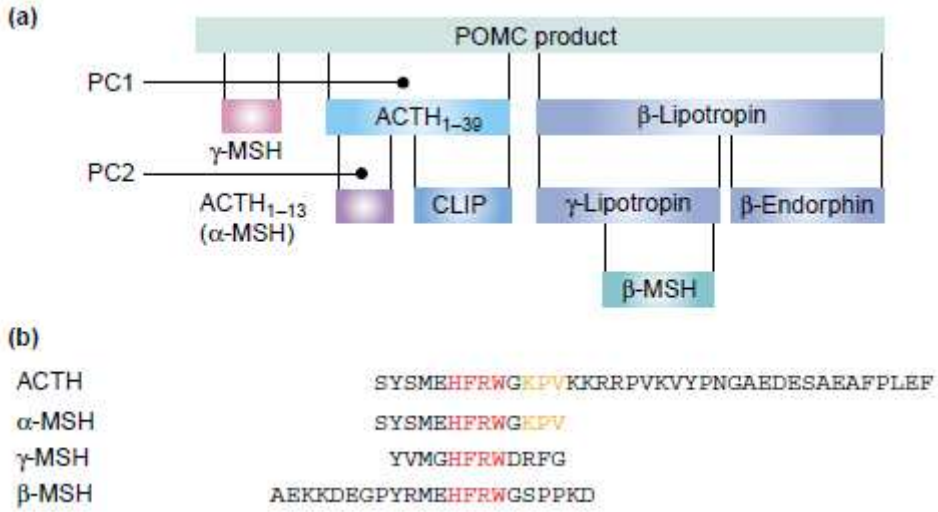


Figure 16: Représentation schématique du peptide POMC et de ses fragments. (a) le peptide POMC est clivé par les prohormones convertases PC1 et PC2. Le clivage protéolytique par PC1 génère l'hormone adrénocorticotropique (ACTH). Le clivage protéolytique par PC2 génère l'α-MSH. **(b)** Tous les peptides dérivés de la POMC contiennent un motif amino-acide commun HFRW (en rouge). Le peptide KPV (en orange) est capable, quant à lui, d'inhiber les effets de l'IL-1 (Getting, 2002).

La POMC est une protéine de 241 acides aminés chez l'Homme (Takahashi *et al.*, 1981) qui contient trois domaines principaux (**Figure 16**) :

- Une séquence centrale hautement conservée l'$ACTH_{1\text{-}39}$, avec l'α-MSH en N-terminal ;
- La β-lipotropine en C-terminal qui peut être clivée pour générer la β-endorphine ;
- La région N-terminale qui contient la γ-MSH (Castro and Morrison, 1997).

Les produits dérivés de la POMC, à savoir la β-lipotropine, l'$ACTH_{1-39}$, la β-endorphine et les MCs (α-, β-, γ-MSH), sont obtenus après clivages protéolytiques par des enzymes de conversion des pro-hormones (PC) et par des carboxypeptidases. Dans le cas des MCs, PC1 clive POMC en $ACTH_{1-39}$ et β-lipotropine et PC2 clive POMC en β-endorphine et α-MSH (Benjannet *et al.*, 1991) (**Figure 16**).

II.3.2. L'α-MSH

L'hormone de stimulation des mélanocytes ou α-MSH est un peptide de treize acides aminés qui possède la séquence N-terminale de l'ACTH (**Figure 17**). Son extrémité N-terminale est acétylée et son extrémité C-terminale est amidée. L'α-MSH résulte du clivage de la POMC et joue un rôle important dans l'immunité, l'inflammation et la pigmentation (Bohm *et al.*, 2006; Lipton and Catania, 1997; Luger *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2006).

L'α-MSH a été découverte dans la glande pituitaire (Eberle, 1988) mais on la retrouve dans les cellules épithéliales, dans les cellules immunitaires (cellules de Langerhans, lymphocytes B, cellules NK), dans les mélanocytes, dans les kératinocytes et dans les mélanomes (Bhardwaj and Luger, 1994; Loir *et al.*, 1997; Luger *et al.*, 2000; Luger *et al.*, 1997; Slominski *et al.*, 2000; Thody *et al.*, 1983).

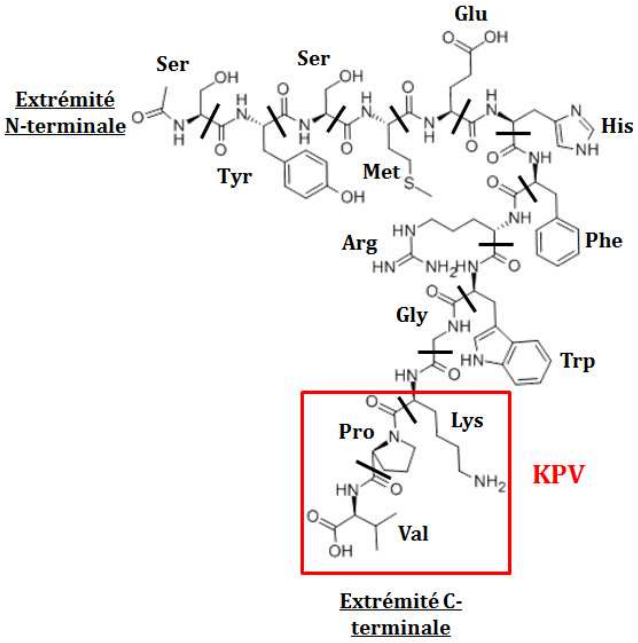


Figure 17: Structure de l'hormone de stimulation des mélanocytes ou α-MSH.

De nombreux dérivés de l'α-MSH ont été synthétisés (Castrucci *et al.*, 1984; Hruby *et al.*, 1993; Sawyer *et al.*, 1980) dont la [Nle^4-$_D$-Phe^7]-α-MSH ou NDP-MSH qui est le premier analogue à avoir vu le jour (Sawyer *et al.*, 1980). La substitution de la $_L$-Phe (Sarkar-Agrawal *et al.*, 2004) en $_D$-Phe dans la structure de l'α-MSH donne un peptide plus stable et plus actif (Sawyer *et al.*, 1982).

Les trois acides aminés en C-terminal de l'α-MSH, Lys-Pro-Val ou KPV (**Figure 17**), médient les activités anti-inflammatoires de l'hormone (Lipton and Catania, 1997; Luger *et al.*, 2003). De plus, le KPV médie ses effets anti-inflammatoires indépendamment du récepteur MC1R (Dalmasso *et al.*, 2008; Mandrika *et al.*, 2001) mais via l'inhibition du récepteur à l'IL-1β (Getting *et al.*, 2003b).

II.3.3. L'ASIP et l'AGRP

L'*agouti* code pour une protéine de 131 acides aminés contenant une séquence signal, l'ASP chez la souris et l'ASIP chez l'Homme (Bultman *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1995). Cette protéine est exprimée dans le derme papillaire au niveau des follicules pileux (Slominski *et al.*, 2005) et dans la peau humaine (Voisey *et al.*, 2006). L'ASIP possède un domaine C-terminal riche en résidus Cys, motif que l'on retrouve fréquemment dans les toxines d'invertébrés. La mutation dominante du gène *agouti* entraîne chez la souris un pelage de couleur jaune, une obésité, une résistance à l'insuline et une prédisposition à l'apparition de tumeurs. La coloration jaune du pelage est le résultat d'un antagonisme chronique de l'ASIP sur le récepteur MC1R alors que le phénotype obèse est plutôt le résultat d'antagonismes au niveau des récepteurs MC3R et MC4R. L'AGRP (pour Agouti Related Protein) a été identifiée, à partir de banques de données, sur la base d'homologies de séquences avec l'ASIP (Ollmann *et al.*, 1997). L'AGRP est exprimée dans l'hypothalamus, le cortex adrénal, les poumons et les reins. Il s'agit d'un antagoniste compétitif pour les récepteurs MC3R et MC4R qui agit comme facteur de stimulation de l'appétit.

L'ASIP se lie au récepteur MC1R et inhibe les effets de l'α-MSH ainsi que la synthèse d'AMPc consécutive à la stimulation du récepteur (Siegrist *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1997). L'ASIP est un agoniste inverse du MC1R qui a le potentiel *in vivo* de réguler le récepteur même en absence de MCs.

La liaison de l'ASIP sur le récepteur peut entraîner deux effets : une compétition directe pour le site de liaison et une inhibition de la signalisation du récepteur (Barsh *et al.*, 2000).

Dans les mélanocytes en culture, l'ASIP inhibe la synthèse de l'eumélanine, l'activité tyrosinase et réduit les niveaux de deux enzymes de la mélanogenèse, la DHICA oxydase (TRP-1) et la DOPAchrome tautomérase (DCT) (Aberdam *et al.*, 1998; Furumura *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 1997; Voisey *et al.*, 2006). De plus, l'ASIP inhibe l'expression du gène de la *microphtalmie* induite par l'α-MSH ainsi que les niveaux de la protéine MITF associée dans les mélanomes murins B16 (Aberdam *et al.*, 1998). Enfin, l'ASIP inhibe la différentiation des mélanoblastes en mélanocytes matures et son expression entraîne la synthèse de la phéomélanine (Yen *et al.*, 1994). L'ASIP se comporte donc comme un facteur de régulation de la pigmentation cutanée (Abdel-Malek *et al.*, 2001; Jordan and Jackson, 1998; Norton *et al.*, 2007; Voisey and van Daal, 2002; Wolff, 2003).

III. RÉGULATIONS DU RECEPTEUR MC1R

Le récepteur MC1R joue un rôle central dans la détermination du phénotype pigmentaire, dans la sensibilité au soleil et dans l'habilité à bronzer (Rees, 2004). Plus de 120 gènes (Bennett and Lamoreux, 2003) sont connus pour réguler la pigmentation chez les mammifères. Un de ces gènes clés est le *MC1R* qui a été cloné et caractérisé en 1992 (Chhajlani and Wikberg, 1992; Mountjoy *et al.*, 1992).

III.1. Les variants non fonctionnels du MC1R

Parmi les nombreux gènes qui régulent la pigmentation cutanée, le gène *MC1R* semble être le plus polymorphe (Sturm *et al.*, 1998). Environ 35 variants alléliques du *MC1R* ont été identifiés (Box *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1998) dont neuf étant des variants perte de fonction (Schaffer and Bolognia, 2001; Sturm *et al.*, 2001).

Ces variants non fonctionnels consistent en la substitution d'un seul acide aminé dans la séquence du *MC1R* ce qui entraîne des modifications dans la signalisation du récepteur (Frandberg *et al.*, 1998; Jimenez-Cervantes *et al.*, 2001a; Jimenez-Cervantes *et al.*, 2001b; Ringholm *et al.*, 2004; Schioth *et al.*, 1999). Huit de ces variants ($I_{40}T$, $V_{60}L$, $V_{92}M$, $V_{122}M$, $R_{142}H$, $R_{151}C$, $R_{160}W$ et $R_{162}P$) sont regroupés au niveau du TM2 et de la boucle i_2 (Valverde *et al.*, 1995). Le 9ème variant, $D_{294}H$, est situé dans le TM7 (**Figure 18**).

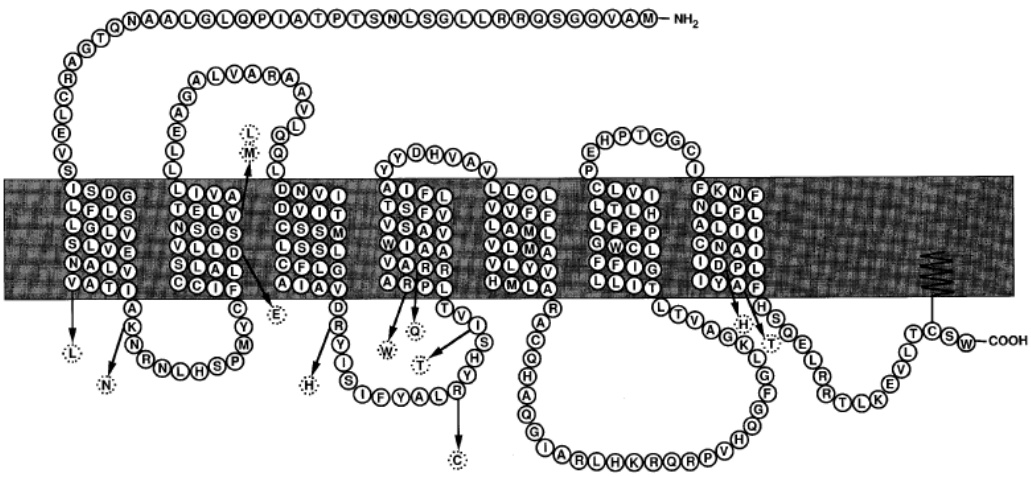


Figure 18: Positions des mutations non fonctionnelles dans la structure primaire du récepteur MC1R (Box *et al.*, 1997).

Les variants non fonctionnels $R_{142}H$, $R_{151}C$, $R_{160}W$ et $D_{294}H$ sont associés à un phénotype cheveux roux/peau claire (Bastiaens *et al.*, 2001; Box *et al.*, 1997; Flanagan *et al.*, 2001; Healy *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1998; Valverde *et al.*, 1995) que l'on nomme le phénotype RHC (pour Red Hair Color). Les individus qui possèdent ces mutations RHC montrent une forte sensibilité au soleil (Box *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 1995) et un risque accru de développer un mélanome (Kennedy *et al.*, 2001; Palmer *et al.*, 2000) ou un carcinome des cellules basales ou squameuses (Bastiaens *et al.*, 2001; Box *et al.*, 2001). Ces mutations sont très fréquentes dans les populations d'Europe du Nord et d'Australie puisqu'environ 75% des individus possèdent ces variants alléliques (Box *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1998; Valverde *et al.*, 1995).

Les allèles RHC correspondent donc à des allèles ayant perdu partiellement la fonction du récepteur MC1R sauvage.

Ces modifications fonctionnelles peuvent aller d'une diminution modérée de l'affinité de l'agoniste ou de l'efficacité de couplage avec les protéines G ($V_{92}M$) à une perte complète de la fonction du MC1R ($D_{84}E$ et $D_{294}H$). Dans le cas du mutant $R_{151}C$, l'affinité de liaison pour l'α-MSH est similaire à celle du récepteur MC1R sauvage mais il diffère par son incapacité à stimuler la production d'AMPc (Frandberg *et al.*, 1998). En effet, le variant $R_{151}C$ est localisé dans la boucle i_2 qui contient deux séquences consensus pour la reconnaissance de la PKA (Chhajlani and Wikberg, 1992; Eberle *et al.*, 1993). Ces séquences peuvent être bloquées par la mutation, inhibant ainsi la signalisation du récepteur.

III.2. Régulations de l'activité du récepteur MC1R

III.2.1. Dimérisation du récepteur MC1R

La plupart des RCPG forment des dimères et des oligomères (Angers *et al.*, 2002; Breitwieser, 2004; Milligan, 2001). La dimérisation est un évènement précoce dans la biosynthèse du récepteur MC1R qui a lieu dans le réticulum endoplasmique. Cette dimérisation implique la formation de quatre ponts disulfures et d'interactions non covalentes (Zanna *et al.*, 2008). Des études récentes ont montré que le récepteur MC1R pouvait dimériser dans les cellules vivantes (Mandrika *et al.*, 2005), dans les cellules hétérologues et dans les mélanomes (Sanchez-Laorden *et al.*, 2006a).

L'hétérodimérisation des formes sauvages et mutantes du récepteur MC1R a de nombreuses conséquences fonctionnelles. On observe des effets dominants-négatifs qui diminuent l'expression du récepteur sauvage à la surface de la cellule (Sanchez-Laorden *et al.*, 2006a; Zanna *et al.*, 2008), des modulations dans les propriétés pharmacologiques comme l'affinité du ligand ou le couplage aux protéines G (Sanchez-Laorden *et al.*, 2006a) et des changements dans les vitesses de désensibilisation et d'internalisation du récepteur (Beaumont *et al.*, 2007; Sanchez-Laorden *et al.*, 2007; Sanchez-Laorden *et al.*, 2006a). De plus, la dimérisation implique des échanges entre certains domaines de sorte que deux unités défectueuses peuvent aboutir au final à une unité partiellement active, c'est le phénomène de complémentation partielle.

III.2.2. Désensibilisation et internalisation du récepteur MC1R

Dans la plupart des RCPG, la signalisation cellulaire du récepteur est atténuée dans les minutes suivant la liaison de l'agoniste. Ce mécanisme est appelé désensibilisation homologue (Luttrell and Lefkowitz, 2002; Pitcher *et al.*, 1998). D'autre part, dans la désensibilisation dite hétérologue, la signalisation du récepteur est atténuée par des agents n'agissant par sur le récepteur lui-même. Les désensibilisations homologue et hétérologue impliquent la phosphorylation du récepteur par deux classes de kinases : les kinases activées par les seconds messagers comme la PKA ou la PKC et une famille de kinases spécifiques des RCPG, les GRKs (pour G-protein Receptor Kinases) (Luttrell and Lefkowitz, 2002; Pitcher *et al.*, 1998). Le récepteur phosphorylé a alors l'incapacité de se coupler aux voies de transduction du signal. De plus, la phosphorylation du récepteur est souvent suivie de son internalisation et contribue à déclencher de nouveaux signaux via l'activation de kinases cytosoliques (Aragay *et al.*, 1998; Gutkind, 2000; Luttrell and Lefkowitz, 2002; Shenoy and Lefkowitz, 2003).

Dans les récepteurs aux mélanocortines, la désensibilisation homologue a été mise en évidence pour le mc4r dans des cellules hypothalamiques GT1-7 murines (Shinyama *et al.*, 2003) et pour le mc2r dans des cellules adrénocorticales Y1 murines (Baig *et al.*, 2001). La désensibilisation homologue des récepteurs mc1r murin et MC1R humain a été étudiée dans des lignées de mélanomes homozygotes pour le gène sauvage et dans des systèmes hétérologues exprimant le gène cloné (Sanchez-Mas *et al.*, 2005). Elle est médiée par les GRK2 et GRK6 (**Figure 19**). La cotransfection d'une de ces kinases avec le gène *MC1R* dans des cellules HEK 293T inhibe fortement la signalisation du récepteur. Cependant, l'expression d'un mutant dominant-négatif GRK2 dans des mélanomes humains stimule les réponses AMPc dépendantes de l'agoniste alors que la surexpression de la GRK6 dans ces cellules les réduits (Sanchez-Mas *et al.*, 2005).

La phosphorylation des RCPG par les GRKs est souvent suivie par l'internalisation des complexes récepteur-ligand dans des vésicules d'endocytose (Luttrell and Lefkowitz, 2002; Pitcher *et al.*, 1998). L'internalisation peut être suivie, soit par la dégradation du récepteur par les lysosomes, soit par le recyclage du récepteur à la membrane plasmique (**Figure 19**).

Une étude portant sur la liaison et l'internalisation d'un ligand radiomarqué dans des mélanomes murins B16 a montré que le ligand était rapidement internalisé et transporté dans les lysosomes où il était dégradé (Wong and Minchin, 1996). Aucune preuve de recyclage du récepteur à la membrane plasmique n'a été mise en évidence, suggérant que la protéine doit être également dégradée. D'autres études de liaison ont montré que de longues expositions aux MCs diminuaient le nombre de sites de liaison à l'α-MSH dans certaines lignées de mélanomes (Siegrist *et al.*, 1994). Comme les MCs stimulent l'expression génique du *MC1R*, le nombre de sites de liaison dans la membrane plasmique des mélanocytes exposés continuellement à l'agoniste dépend de la balance entre deux effets opposés : la séquestration du récepteur et probablement sa dégradation d'une part, et l'activation de l'expression du gène d'autre part.

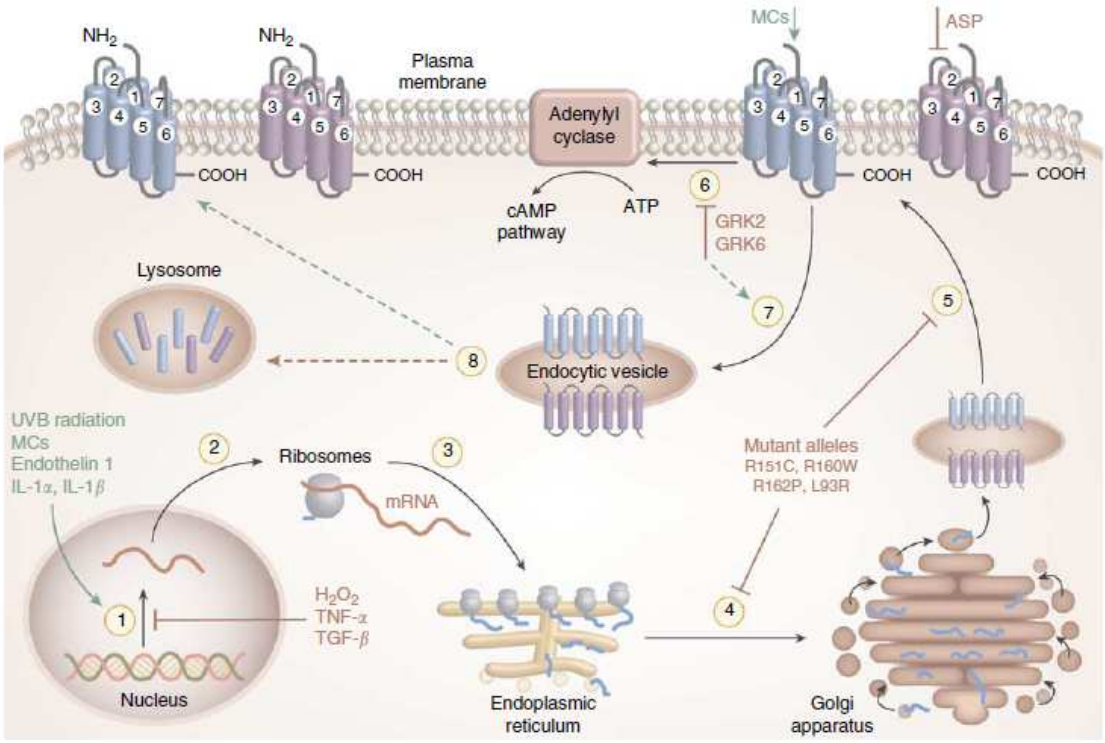


Figure 19 : Régulations de l'expression et de la signalisation du récepteur MC1R. Les évènements activateurs et inhibiteurs sont représentés en vert et en rouge, respectivement. (**1**) La transcription du gène *MC1R* est stimulée par les UV, les MCs, l'IL-1α et l'IL-1β et est inhibée par le TNF-α, le TGF-β et l'H_2O_2. (**2**) Le transcrit est transporté dans le cytosol où la traduction commence. (**3**) La protéine naissante s'associe au RE, lieu des modifications post-traductionnelles. (**4**) La protéine se dirige ensuite vers l'appareil de Golgi. (**5**) Les récepteurs matures quittent l'appareil de Golgi pour être adressés à la membrane plasmique. Le trafic intracellulaire de la protéine peut être bloqué par certaines mutations entraînant alors une rétention des récepteurs dans la cellule. (**6**) Le récepteur, sous forme de dimère, est activé par les MCs et est inhibé par l'ASP. Suite à la liaison du ligand, le récepteur est couplé à l'AC via les protéines Gs hétérotrimériques. Le récepteur actif est un substrat pour les GRK2 et GRK6 qui phosphorylent le récepteur et bloquent son couplage fonctionnel. (**7**) Le récepteur désensibilisé et son ligand sont internalisés dans des vésicules d'endocytose. (**8**) Le récepteur internalisé est soit dégradé dans les lysosomes soit recyclé à la membrane plasmique (Bohm *et al.*, 2006).

III.2.3. Activité constitutive du récepteur MC1R

L'activité constitutive est une propriété fréquente des RCPG (Bond and Ijzerman, 2006; Smit *et al.*, 2007) qui reflète un équilibre allostérique entre un état actif et un état inactif du récepteur (Chen *et al.*, 2000; Kenakin, 2001; Lefkowitz *et al.*, 1993).

L'activité constitutive du MC1R a été mise en évidence dans des systèmes de surexpression du MC1R (Garcin, 2007; Garcin *et al.*, 2007; Garcin *et al.*, 2009) et dans une lignée humaine de mélanomes (Sanchez-Mas *et al.*, 2004). L'expression hétérologue du *MC1R* sauvage entraîne une augmentation de la synthèse d'AMPc, indépendamment de toute stimulation par l'agoniste, alors que les mutants non fonctionnels du MC1R montrent une faible activation basale de l'AMPc (Sanchez-Mas *et al.*, 2004). Dans les cellules HEK transfectées par le récepteur MC1R, l'activité constitutive maximale atteint environ 40% des concentrations d'AMPc observées après liaison de l'agoniste (Sanchez-Mas *et al.*, 2004).

III.3. Régulation de l'expression du récepteur MC1R

III.3.1. Régulation par les UV

L'expression génique du *MC1R* est induite par les UV dans les mélanocytes (Funasaka *et al.*, 1998), dans les mélanomes (Chakraborty *et al.*, 1995; Corre *et al.*, 2004), dans les kératinocytes humains normaux (Chakraborty *et al.*, 1999; Garcin *et al.*, 2009) et dans l'épiderme humain *in vivo* (Schiller *et al.*, 2004). Les UV entraînent une redistribution des sites de liaison à l'α-MSH entre la membrane plasmique et un pôle interne (Chakraborty *et al.*, 1991).

III.3.2. Régulation par les mélanocortines

L'α-MSH augmente les niveaux d'ARNm *MC1R* dans les mélanomes (Eberle *et al.*, 1993; Siegrist and Eberle, 1993) et dans les mélanocytes (Funasaka *et al.*, 1998; Rouzaud *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2002) (**Figure 20**).

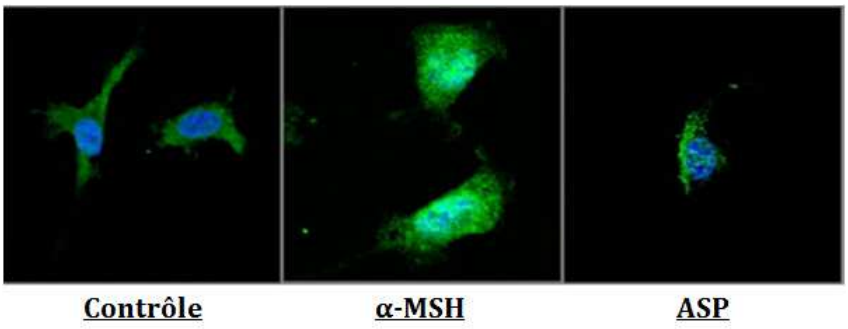


Figure 20 : Expression du récepteur mc1r après traitement par l'α-MSH ou l'ASP dans des mélanocytes murins melan-a. Détection immunohistochimique de l'expression du récepteur mc1r à l'aide d'un anticorps anti-mc1r. Les mélanocytes melan-a montrent une expression diffuse pour le mc1r (en vert) dans les conditions normales (contrôle). L'expression du mc1r augmente quand les cellules sont traitées par l'α-MSH mais est inhibée quand les cellules sont traitées par l'ASP (Rouzaud *et al.*, 2003).

Des analyses par RACE (pour Rapid Amplification of cDNA Ends) ont mises en évidence trois transcripts *mc1r* différents dans les mélanocytes. L'efficacité de transcription est la plus forte pour la forme T2 induite par l'α-MSH, est intermédiaire pour le transcrit basal T1 et est fortement réprimée dans la forme T3 associée à l'ASP. De plus, l'α-MSH peut augmenter l'expression génique du *mc1r* dans les mélanocytes murins par une activation à la fois transcriptionnelle et traductionnelle alors que l'ASP réprime *mc1r* principalement au niveau traductionnel (Rouzaud *et al.*, 2003).

III.3.3. Régulation par MITF

De nombreuses études ont montré que l'expression du récepteur MC1R était régulée par le facteur de transcription associé à la microphtalmie, MITF. MITF est exprimé dans le cœur, les mastocytes, les précurseurs ostéoblastiques et les mélanocytes (Bertolotto *et al.*, 1998).

C'est un facteur de transcription qui appartient à la superfamille des b-HLH-LZ (pour basic Helix-Loop-Helix Leucin Zipper) contenant un domaine riche en leucine et un domaine de transactivation en N-terminal. Le promoteur minimal *MC1R* contient une E-box (CANNTG) immédiatement en amont du site d'initiation de la transcription (Moro *et al.*, 1999). La M-box (M pour mélanocyte) est une sous-catégorie de l'E-box et est une séquence cible pour MITF (AGT**CATGTG**CT). Les travaux d'Aoki et de Moro ont montré que l'activité du promoteur *MC1R* était stimulée d'un facteur 5 en présence du MITF (Aoki and Moro, 2002).

III.3.4. Régulation par USF-1

Le facteur de transcription USF-1 appartient à la famille des Upstream Stimulating Factor (USF). Cette famille comporte deux membres, USF-1 et USF-2 (Sawadogo, 1988; Sawadogo *et al.*, 1988). Les facteurs USF appartiennent à la superfamille des b-HLH-LZ (pour basic Helix-Loop-Helix Leucin Zipper) qui comprend également le facteur MITF (Atchley and Fitch, 1997). L'USF-1 se lie, sous forme phosphorylé, à l'E-box (CATGTG) (Moro *et al.*, 1999) présente sur le promoteur du *MC1R* (Corre *et al.*, 2004).

Le facteur de transcription USF-1 est impliqué dans la pigmentation induite par les UV (**Figure 21**). En réponse aux UV, il est activé par phosphorylation par la MAP kinase p38 au niveau de la Thr_{153} (Corre *et al.*, 2009; Galibert *et al.*, 2001). Le facteur USF-1 phosphorylé coopère alors avec la protéine MITF dans l'activation transcriptionnelle des gènes de la mélanogenèse comme le *MC1R*, la *DCT*, la *POMC* et la *tyrosinase* (Corre and Galibert, 2006; Corre *et al.*, 2004; Galibert *et al.*, 2001).

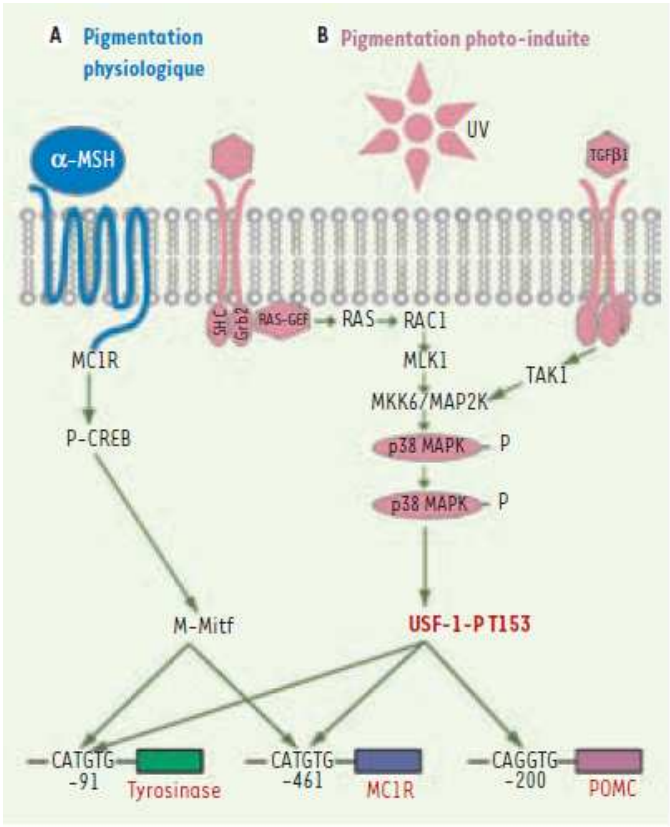


Figure 21 : Régulation de la pigmentation photo-induite par USF-1. À la suite d'une stimulation par les UV, la phosphorylation d'USF-1 par la MAP kinase p38 est induite, permettant l'induction de l'expression des gènes de la pigmentation (*tyrosinase*, *POMC*, *MC1R*) par USF-1 après fixation aux boîtes E (CANNTG) (Corre and Galibert, 2006).

Ces évènements conduisent à une augmentation de l'expression de ces gènes ce qui résulte en une synthèse accrue du pigment mélanique et donc à une photoprotection plus efficace de la peau (Corre *et al.*, 2006; Corre *et al.*, 2004; Galibert *et al.*, 2001). Outre son rôle majeur dans la pigmentation cutanée induite par les UV, USF-1 est aussi un régulateur clé de la réponse au stress dont le stress oxydatif (Corre and Galibert, 2005; Corre *et al.*, 2009).

IV. ACTIVITES BIOLOGIQUES ASSOCIEES A L'α-MSH ET AU MC1R

L'α-MSH, via l'activation de la voie AMPc, est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dans des cultures de mélanocytes humains et d'augmenter la synthèse de la mélanine (Im *et al.*, 1998). Récemment, il a été découvert un nouveau rôle pour l'α-MSH comme facteur de survie.

En effet, elle permet d'empêcher l'apoptose induite par les UV dans les mélanocytes humains en augmentant la réparation des photoproduits de l'ADN et en réduisant la libération de l'H_2O_2 (Bohm *et al.*, 2005b; Kadekaro *et al.*, 2005).

IV.1. La mélanogenèse

La pigmentation cutanée est due à la mélanine qui est produite puis sécrétée par les mélanocytes présents dans la couche basale de l'épiderme. La mélanine est synthétisée puis transportée dans des organelles spécifiques appelés mélanosomes.

La pigmentation mélanique est génétiquement prédéterminée. Cependant, elle peut être régulée par les UV ainsi que par de nombreux agents qui sont capables de stimuler ou d'inhiber la pigmentation cutanée. Des facteurs solubles comme les MCs, le MITF ou l'ASP régulent l'expression du récepteur MC1R en jouant sur la mélanine totale. Chez l'Homme, la mélanine totale, c'est-à-dire le ratio eumélanine/phéomélanine dans la peau, diffère selon les individus et les différents phototypes cutanés (Fitzpatrick, 1988; Hunt *et al.*, 1995). Les individus de phototypes cutanés I et II (phototypes clairs) ont un faible contenu en mélanine et produisent majoritairement la phéomélanine ce qui se traduit par une faible habilité à bronzer et un risque accru de développer un cancer cutané (Epstein, 1983; Pathak, 1995). A l'inverse, les individus de phototypes cutanés V et VI (phototypes foncés) ont un contenu en mélanine plus important et produisent majoritairement de l'eumélanine photoprotectrice.

IV.1.1. La synthèse des mélanines

Les mélanines produites sont de deux types : les eumélanines et les phéomélanines (Ito and Wakamatsu, 2003). En général, les mélanines correspondent chez l'Homme à un mélange d'eumélanines et de phéomélanines en différentes proportions (**Figure 22**).

Propriétés	Eumélanines	Phéomélanines
Mélanines		
Couleur	Noire ou brune	Jaune/orangé ou brun clair
Solubilité	Insoluble (acide ou base)	Soluble dans les bases
Unité structurale	5,6-dihydroxyindole	1,4-benzothiazinyl
Teneur en azote	6-9%	8-10%
Teneur en soufre	0-1%	9-12%
Précurseur(s)	Tyrosine	Tyrosine/Cystéine
Mélanosomes		
Forme	Hélicoïdale	Sphérique
Structure	Lamellaire ou filamenteuse	Microvésiculeux ou microgranuleux

Figure 22: Différences entre eumélanines et phéomélanines (Mantoux and Ortonne, 2003).

Les différences de couleur de peau sont dues à l'intensité de la pigmentation mélanique, au nombre et au type de mélanosomes. Dans les peaux blanches, les mélanosomes sont peu nombreux et leur maturation est souvent incomplète (stades I à III). Dans les peaux noires, leur nombre augmente et ils sont majoritairement de stade IV. Les eumélanines sont des mélanines de couleur brune ou noire. Elles résultent de la polymérisation oxydative de différents précurseurs indoliques dérivés de la DOPAquinone dont la 5,6-dihydroxyindole (DHI). Les phéomélanines sont caractérisées par leur couleur jaune orangée. Elles contiennent de l'azote et du soufre et proviennent de la polymérisation oxydative des cystéinylDOPA (Slominski *et al.*, 2004). Sous l'effet des UV, la synthèse des mélanines augmente et constitue le système photoprotecteur le plus important car elles absorbent plus de 90% des UV. Malgré tout, environ 15% des UVB parviennent jusqu'à la couche basale de l'épiderme et 50% des UVA atteignent le derme.

Les mélanines sont synthétisées par un mécanisme appelé mélanogenèse (**Figure 23**) (Ito *et al.*, 2000). La tyrosine est oxydée en DOPAquinone par une enzyme majeure de la mélanogenèse, la tyrosinase. En absence de cystéine, la DOPAquinone est transformée en cycloDOPA par addition intramoléculaire puis en DOPAchrome et DOPA par une réaction rédox. La DOPAchrome se décompose pour former majoritairement la 5,6-dihydroxyindole (DHI) et minoritairement l'acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA), réaction catalysée par la DOPAchrome tautomérase ou TRP-2. Enfin, la DHICA et la DHI sont oxydées en eumélanines par la DHICA oxydase (TRP-1) et par la tyrosinase respectivement. En présence de cystéine, la DOPAquinone réagit avec la cystéine pour former la 5-S-cystéinylDOPA et minoritairement, la 2-S-cystéinylDOPA.

Les cystéinylDOPA sont oxydées pour former des intermédiaires benzothiazines puis des phéomélanines. La conversion de la tyrosine en L-DOPA est l'étape critique et limitante de la voie de synthèse puisque son inhibition entraîne la suppression de la synthèse de la mélanine (Hearing and Jimenez, 1987).

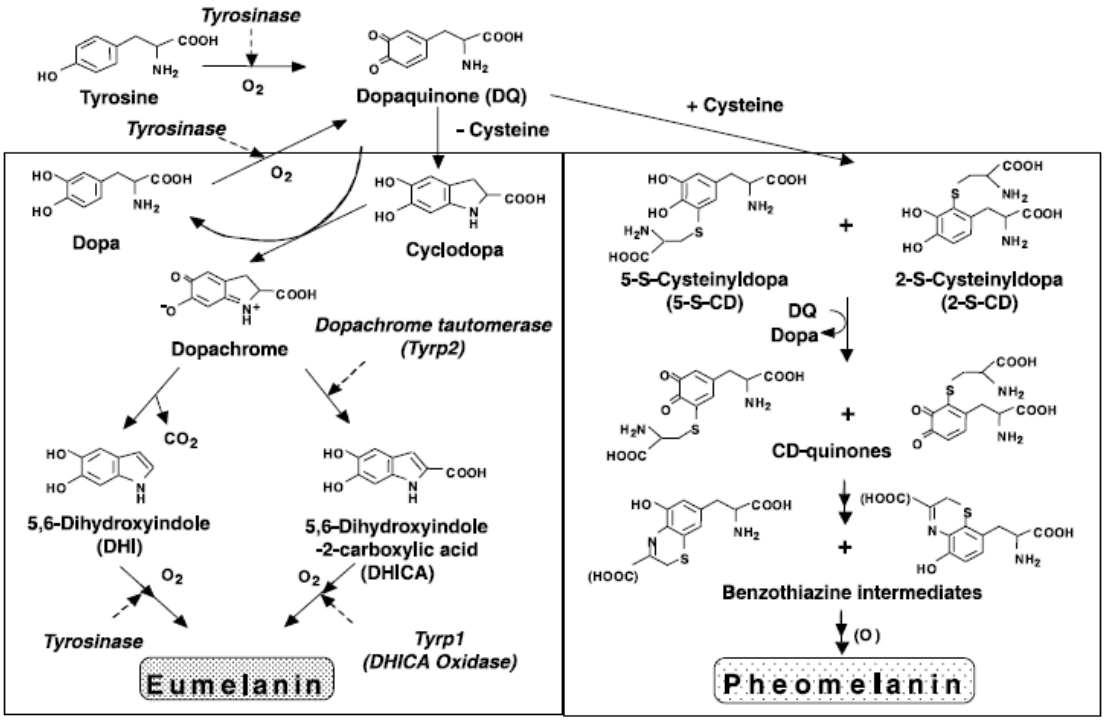


Figure 23 : Voie de synthèse des mélanines. DOPA : dihydroxyphénylalanine ; TRP : tyrosinase-related protein (Ito, 2003).

Les eumélanines ont un pouvoir photoprotecteur environ 1.000 fois supérieur à celui des phéomélanines. Les eumélanines sont capables d'absorber les radicaux libres générés par les UV protégeant ainsi la peau de leurs effets délétères.

IV.1.2. Régulations de la mélanogenèse

IV.1.2.1. Les ultraviolets

In vivo, la mélanogenèse est régulée principalement par les rayonnements UVA et UVB de la lumière solaire. Des arguments expérimentaux montrent que les UV, et plus particulièrement les UVB, peuvent agir directement sur les mélanocytes pour stimuler la mélanogenèse. Les UVB induisent de nombreuses lésions dans l'ADN qui sont capables de stimuler la mélanogenèse (Eller *et al.*, 1996) et l'excision des dimères de thymine est un événement essentiel dans la régulation de ce processus photo-induit (cf. partie 1, paragraphe IV de la synthèse bibliographique).

IV.1.2.2. La tyrosinase

La tyrosinase est l'enzyme limitante de la mélanogenèse (Hearing and Tsukamoto, 1991). Elle catalyse les deux premières réactions de la voie de synthèse des mélanines, l'hydroxylation de la tyrosine en DOPA et l'oxydation de la DOPA en DOPAquinone. L'induction de l'activité tyrosinase est due en partie à l'activation de l'enzyme déjà présente dans la cellule. Cette régulation post-traductionnelle peut faire intervenir des réactions de phosphorylation ou de glycosylation de l'enzyme. L'augmentation de la mélanogenèse implique aussi une synthèse *de novo* de la tyrosinase.

IV.1.2.3. Le système mélanocortine, l'AMPc et MITF

Lerner et McGuire ont été les premiers à montrer l'influence de l'α-MSH sur la pigmentation cutanée chez l'Homme (Lerner and McGuire, 1961). *In vitro*, l'addition d'α-MSH et d'ACTH sur des mélanocytes en culture entraîne une stimulation importante de l'activité tyrosinase et de la synthèse des eumélanines.

Il a été mis en évidence que l'α-MSH pouvait réguler l'activité de la tyrosinase directement dans les mélanosomes indépendamment du récepteur MC1R (Marles *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2000; Slominski *et al.*, 1993; Spencer *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2004).

En 1999, les travaux de Moore *et al.* ont mis en évidence la formation d'un complexe stable entre l'α-MSH et la (6R)-$_L$-érythro-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine ($6BH_4$) (Moore *et al.*, 1999; Schallreuter *et al.*, 2008). Comme l'activité tyrosinase est inhibée par la $6BH_4$, l'α-MSH peut lever cette inhibition en se liant à la $6BH_4$ sans passer par le récepteur MC1R (Schallreuter *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 2005).

La protéine agouti, un antagoniste du récepteur MC1R, bloque la différentiation mélanocytaire et l'eumélanogenèse induite par l'α-MSH *in vivo* dans les mélanocytes murins (Aberdam *et al.*, 1998). Ceci se traduit *in vivo*, chez les souris surexprimant agouti (mutation dominante *lethal yellow* et *viable yellow*), par une synthèse préférentielle de phéomélanines. Des mutations au locus *extension* qui code pour le récepteur MC1R donnent également des animaux au pelage jaune plutôt que marron. Ces mutations résultent en un récepteur non fonctionnel qui ne peut plus activer l'AMPc sous l'action de son ligand ; la source majeure d'AMPc dans les mélanocytes étant relié au signal α-MSH/MC1R (Abdel-Malek *et al.*, 1995). De plus, l'AMPc contrôle les enzymes de la mélanogenèse via les mêmes motifs que ceux utilisés par MITF. Les travaux de Bertolotto *et al.* ont montré que l'AMPc augmentait l'expression de MITF, à la fois dans les mélanocytes humains normaux et dans les mélanomes murins B16 (Bertolotto *et al.*, 1998). L'AMPc active la PKA et la PKA phosphoryle et active CREB (pour cAMP Response Element Binding Protein). Lorsque CREB est activé, il se lie au domaine CRE (pour cAMP Response Element) présent dans le promoteur du gène *microphtalmia*, ce qui active sa transcription. Ceci entraîne une augmentation de la liaison de la protéine MITF sur le promoteur de la *tyrosinase* ce qui augmente son expression et la synthèse des mélanines (Busca and Ballotti, 2000; Corre *et al.*, 2006; Kadekaro *et al.*, 2003) (**Figure 24**).

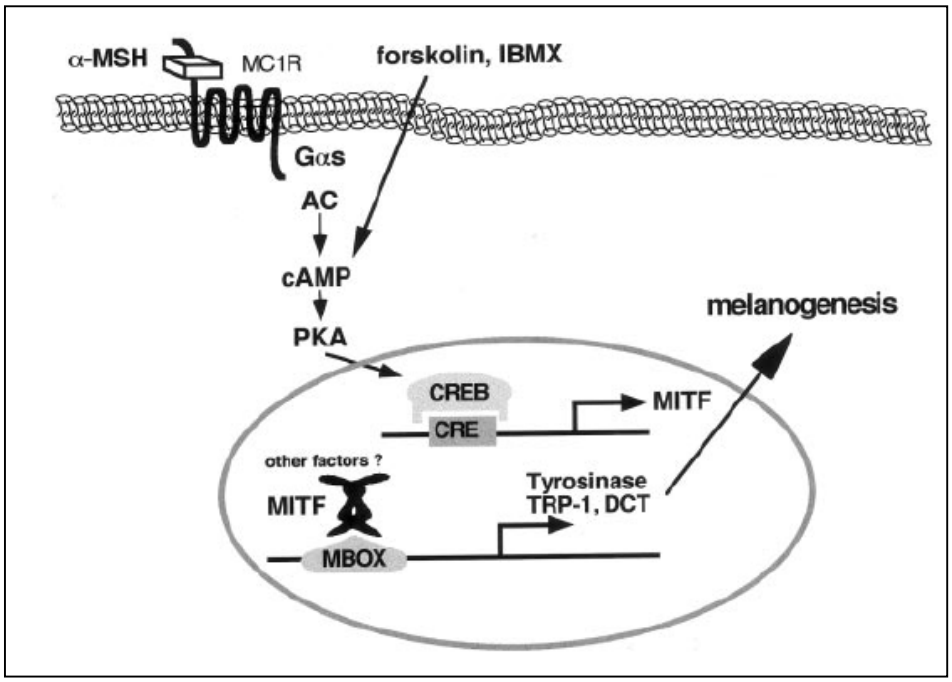


Figure 24: Régulation de la mélanogenèse par l'AMPc. Cette régulation implique le facteur de transcription MITF comme transducteur du signal (Busca and Ballotti, 2000).

Une autre voie, activée par l'AMPc, régule de façon négative la mélanogenèse via l'activation de ERK (pour Extracellular signal-Regulated Kinases) ce qui induit la phosphorylation puis la dégradation de MITF par le protéasome (Park *et al.*, 2009b; Wu *et al.*, 2000). De plus, la BMP-4 (pour Bone Morphogenetic Protein-4), un membre de la famille du TGF-β (Shi and Massague, 2003), module négativement la mélanogenèse en réduisant l'expression de la tyrosinase dans des mélanocytes humains en culture (Yaar *et al.*, 2006).

IV.1.2.4. Le calcium

La libération de calcium dans le cytosol des mélanocytes se déroule via la voie IP_3/DAG. Cette voie contrôle l'activation de la PKC-β qui stimule l'activité de la tyrosinase en phosphorylant les deux résidus Ser en C-terminal de l'enzyme (Park *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000). La libération intracellulaire de calcium par l'IP_3 contrôle alors le transport actif de la $_L$-phénylalanine et sa conversion en $_L$-tyrosine via la calmoduline, une ATPase dépendante du calcium.

Ceci permet d'avoir une concentration suffisante de $_L$-tyrosine pour satisfaire la mélanogenèse (Schallreuter *et al.*, 2004; Schallreuter and Wood, 1999). De plus, le calcium se lie à la mélanine avec la même affinité que pour la calmoduline (Hoogduijn *et al.*, 2004), régulant ainsi le statut rédox des mélanocytes et empêchant la formation d'un stress oxydatif.

IV.1.2.5. Le facteur suppresseur de tumeur p53

p53 est un effecteur de la pigmentation induite par les UV (Cui *et al.*, 2007). Lorsqu'il est activé, il augmente les niveaux d'ARNm et de protéine de la tyrosinase ce qui stimule la mélanogenèse (Eller and Gilchrest, 2000; Gilchrest *et al.*, 1996; Khlgatian *et al.*, 2002; Nylander *et al.*, 2000). Les travaux de Cui *et al.* ont mis en évidence une séquence consensus p53 dans le promoteur du gène de la *POMC* (Cui *et al.*, 2007). Après exposition aux UV chez la souris, l'activation de p53 stimule la transcription du promoteur de la *POMC* dans les kératinocytes ce qui augmente la libération d'α-MSH. L'α-MSH ainsi libérée, stimule le récepteur MC1R augmentant ainsi la production d'eumélanine (Cui *et al.*, 2007). Il a également été montré que p53 régulait de manière transcriptionnelle le facteur nucléaire des hépatocytes 1α (HNF-1α) qui est un facteur de transcription pour la tyrosinase (Schallreuter *et al.*, 2008).

IV.1.2.6. Le péroxyde d'hydrogène H_2O_2

Les mélanocytes sont très sensibles au stress oxydatif car ces cellules contiennent de faibles niveaux de catalase (Yohn *et al.*, 1991). Or, la tyrosinase est très sensible aux ERO car elle possède 17 cystéines dans ses domaines C- et N-terminaux ce qui peut entraîner des changements structuraux de l'enzyme. La régulation et la protection de la tyrosinase contre les ERO est assurée par TRP-1 et TRP-2. Ces enzymes possèdent une homologie de séquence avec la tyrosinase au niveau de domaines riches en cystéines. Ils ciblent l'oxydation médiée par H_2O_2 éliminant ainsi les ERO. En effet, TRP-1 possède une activité péroxydase (Halaban and Moellmann, 1990) et TRP-2 une fonction DOPAchrome tautomérase (Prota, 1992).

IV.1.2.7. Le monoxyde d'azote (•NO)

Dans l'épiderme, les UV activent une NO synthase de type neuronale qui semble être impliquée dans la transmission du signal mélanogénique des UV (Virag *et al.*, 2002). Les effets du •NO sont dus à l'activation d'une guanylate cyclase soluble qui entraîne une augmentation de la production de GMPc par les mélanocytes. Comme pour l'AMPc, la cible moléculaire finale du •NO et du GMPc est la tyrosinase dont ils augmentent l'expression et l'activité.

IV.2. L'inflammation

L'α-MSH possède des effets anti-inflammatoires majeurs (Brzoska *et al.*, 2008) médiés par le récepteur MC1R. Néanmoins, il est fort probable que les effets anti-inflammatoires de l'α-MSH *in vitro* soient médiés non seulement par le récepteur MC1R mais également par d'autres voies effectrices. Ceci a été mis en évidence chez des patients possédant un mutant *MC1R* non fonctionnel (phénotype RHC) (Cooper *et al.*, 2005) ou chez des animaux déficients pour le gène *mc1r* (mutation *yellow*) (Getting *et al.*, 2003b; Ichiyama *et al.*, 1999).

Cependant, un obstacle à l'utilisation de l'α-MSH dans le traitement des maladies inflammatoires est son effet pigmentaire. Néanmoins, la majorité des effets anti-inflammatoires de l'α-MSH semble être médiée par le tripeptide KPV qui correspond à l'α-MSH_{11-13} (Lipton and Catania, 1997) et qui possède, quant à lui, aucune action pigmentaire.

IV.2.1. Les mécanismes anti-inflammatoires associés à l'α-MSH

IV.2.1.1. La production des cytokines pro-inflammatoires

Les réponses inflammatoires cutanées sont largement médiées par la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF-α) et de cytokines immunostimulatrices comme l'IFN-γ par les cellules épidermiques. De nombreux travaux ont montré que l'α-MSH était capable d'inhiber l'inflammation (Eves *et al.*, 2006; Lipton and Catania, 1997) et la production des cytokines pro-inflammatoires. Ce mécanisme n'est pas restreint aux cellules cutanées et apparaît être conservé dans toutes les cellules exprimant le récepteur MC1R.

La liaison de l'α-MSH sur le récepteur MC1R entraîne l'inhibition de certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF-α, l'IL-2, l'IFN-γ, l'IL-4 et l'IL-13 (Adachi *et al.*, 1999; Luger *et al.*, 1996; Luger *et al.*, 2003) et de la chimiokine dérivée des kératinocytes, KC (Getting *et al.*, 2002; Getting *et al.*, 2003b). De plus, l'α-MSH inhibe le TNF-α et l'H_2O_2 générés par le stress oxydatif (Elliott *et al.*, 2004; Haycock *et al.*, 2000; Moustafa *et al.*, 2002).

IV.2.1.2. La synthèse d'IL-10

L'α-MSH active la production d'IL-10 (Bhardwaj *et al.*, 1996), une cytokine aux activités immunosuppressives. Ces effets immunosuppresseurs ont été mis en évidence dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (cellules PBMC) (Bhardwaj *et al.*, 1996) ainsi que dans des kératinocytes humains épidermiques (Redondo *et al.*, 1998).

IV.2.1.3. L'expression des molécules d'adhésion

Des études sur plusieurs types cellulaires cutanés comme les mélanocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales ont montré que l'α-MSH était capable de supprimer l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 (Bohm *et al.*, 2005a; Hill *et al.*, 2006; Kalden *et al.*, 1999; Morandini *et al.*, 1998; Sarkar *et al.*, 2003; Scholzen *et al.*, 2003). Les mélanomes répondent aux effets anti-inflammatoires de l'α-MSH de manière similaire aux autres cellules cutanées.

ICAM-1 joue un rôle central dans le contrôle des réactions inflammatoires et immunitaires en coordonnant les interactions intercellulaires entre les cellules cibles de la peau et les lymphocytes T (Kirnbauer *et al.*, 1992). Les niveaux d'ICAM-1 sont normalement très faibles dans les kératinocytes humains (Singer *et al.*, 1989; Vejlsgaard *et al.*, 1989) et dans les mélanocytes (Kirnbauer *et al.*, 1992; Yohn *et al.*, 1990). Cependant, les niveaux d'expression peuvent être induits quand les cellules sont exposées à des stimuli pro-inflammatoires (IFN-γ, IL-1, IL-6, LPS et TNF-α) (Dustin *et al.*, 1988; Kirnbauer *et al.*, 1992; Krutmann *et al.*, 1990; Yohn *et al.*, 1990). A l'inverse, les lignées cellulaires humaines de mélanomes (A375, HBL) peuvent exprimer des niveaux élevés d'ICAM-1 à leur surface (Kirnbauer *et al.*, 1992). Cette expression constitutive d'ICAM-1 peut inhiber la liaison des lymphocytes T aux cellules tumorales (Kageshita *et al.*, 1993). L'α-MSH peut inhiber significativement la production d'ICAM-1 induite par le TNF-α dans les mélanocytes et les mélanomes (Hedley *et al.*, 1998; Morandini *et al.*, 1998). L'IBMX et la forskoline peuvent également inhiber cette production, suggérant que l'α-MSH inhibe les voies de l'inflammation via l'AMPc (Hedley *et al.*, 1998; Morandini *et al.*, 1998). De plus, l'inhibition d'ICAM-1 par l'α-MSH est reliée au nombre de récepteurs MC1R exprimé par la cellule (Morandini *et al.*, 1998).

D'autres molécules de surface modulées par l'α-MSH sont le CD86 et le CD40 qui ont un rôle dans la présentation antigénique par les monocytes et les cellules dendritiques. Dans les monocytes traités par le LPS, l'α-MSH supprime l'expression du CD86 mais pas du CD80 (Bhardwaj *et al.*, 1997). De plus, la modulation de l'expression des molécules d'adhésion peut réduire la migration leucocytaire et par conséquent, l'inflammation qui lui est associée. En conditions non inflammatoires, l'expression du MC1R dans les monocytes et les cellules endothéliales n'est pas détectable.

IV.2.1.4. Les médiateurs pro-inflammatoires

L'α-MSH supprime la synthèse de PGE stimulée par l'IL-1 (Cannon *et al.*, 1986). Néanmoins, cet effet est dépendant du type cellulaire puisqu'il est observé dans les mélanomes mais pas dans les cellules HaCaT (Nicolaou *et al.*, 2004). Dans les macrophages murins, l'α-MSH inhibe la production de •NO en inhibant l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) (Star *et al.*, 1995). De plus, l'α-MSH inhibe les réponses biologiques médiées par l'IL-8 dans les neutrophiles en diminuant l'expression de CXCR1 et CXCR2 via l'inhibition des sérines protéases (Manna *et al.*, 2006).

IV.2.1.5. Le facteur nucléaire NF-κB

Au niveau moléculaire, les effets anti-inflammatoires de l'α-MSH sont médiés par l'inhibition du facteur nucléaire NF-κB. Les travaux de thèse de Geneviève Garcin ont montré que la surexpression d'un récepteur MC1R fonctionnel dans des kératinocytes humains HaCaT stimulés par l'α-MSH, entraînait une inhibition de l'expression du TNF-α induite par les UVB. Cette inhibition serait alors responsable d'une activité basale plus faible de NF-κB dans ces cellules (Garcin, 2007; Garcin *et al.*, 2009).

L'activation du facteur nucléaire NF-κB a lieu en réponse à de nombreux stimuli inflammatoires. Ceux-ci déclenchent la protéolyse du composé inhibiteur cytoplasmique IκBα et masque le signal de localisation nucléaire, permettant ainsi la translocation du complexe hétérodimérique p50-p65 dans le noyau. Une interaction spécifique entre le NF-κB et certaines régions promotrices facilite l'activation de l'ARN polymérase II et par conséquent, la synthèse d'ARN (Ghosh *et al.*, 1998).

En 1998, Manna et Aggarwal ont montré pour la première fois que l'α-MSH inhibait l'activation de NF-κB dans des cellules monocytaires humaines U937 (Manna and Aggarwal, 1998). Un peu plus tard, l'équipe de Luger démontra que l'α-MSH pouvait inhiber l'activation de NF-κB induite par le LPS dans des cellules endothéliales HMEC-1, entraînant ainsi une inhibition de l'expression de certaines molécules d'adhésion comme VCAM-1 et l'E-sélectine (Kalden *et al.*, 1999).

De plus, l'équipe de Lipton montra que l'inhibition de NF-κB, par administration d'α-MSH, entraînait une réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et de l'inflammation périphérique (Ichiyama *et al.*, 1999). Dans les lignées cellulaires macrophagiques RAW264.7 stimulées par le LPS, l'α-MSH, l'α-MSH_{1-10} et le KPV inhibent la translocation nucléaire de NF-κB mais seules l'α-MSH et l'α-MSH_{1-10} entraînent des réponses dépendantes de l'AMPc (Mandrika *et al.*, 2001). Plus récemment, des travaux ont montré que l'α-MSH inhibait l'expression de la métalloprotéinase MMP-13 induite par le TNF-α en modulant l'activation de NF-κB et de la kinase p38 dans une lignée cellulaire de sarcomes humains HTB-94 qui expriment le récepteur MC1R (Yoon *et al.*, 2008).

IV.2.2. Les mécanismes anti-inflammatoires associés au KPV

Le KPV est la séquence minimale de l'α-MSH nécessaire pour inhiber l'inflammation *in vivo* (Lipton and Catania, 1997). Le KPV inhibe l'activation de NF-κB induite par le TNF-α, des MAPK, de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-12) (Dalmasso *et al.*, 2008) et de l'H_2O_2 (Haycock *et al.*, 2000; Moustafa *et al.*, 2002) dans les kératinocytes et les mélanomes. Le KPV exerce des effets anti-inflammatoires indépendamment du récepteur MC1R (Dalmasso *et al.*, 2008; Mandrika *et al.*, 2001) mais interfère avec la liaison de l'IL-1β sur son récepteur de type I (Getting *et al.*, 2003b; Mugridge *et al.*, 1991). En effet, le KPV ressemble à un antagoniste du récepteur à l'IL-1, le peptide KPT (Ferreira *et al.*, 1988). De plus, le KPV n'induit pas d'augmentation de l'AMPc et agit également dans les mutants MC1R non fonctionnels (Getting *et al.*, 2003b).

Récemment, Dalmasso *et al.* ont montré que les effets anti-inflammatoires du KPV n'était pas médiés par le récepteur MC1R mais par le pepT1 (Dalmasso *et al.*, 2008). Le pepT1 est un transporteur oligopeptidique localisé à la membrane apicale des cellules épithéliales de l'intestin et qui cotransporte les peptides et les protons (Steel *et al.*, 1997). L'effet du KPV sur l'inflammation est maintenant utilisé dans le traitement de certaines maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn (Laroui *et al.*, 2010). Pour cela, des nanoparticules ont été synthétisées afin de délivrer le KPV directement au niveau du site inflammatoire à une concentration 12.000 fois inférieure qu'en solution et pour la même efficacité thérapeutique.

PARTIE 3 : LES ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE DANS LA CELLULE

Le stress oxydatif est une situation dans laquelle la cellule ne contrôle plus la présence excessive d'espèces réactives de l'oxygène ou ERO et d'espèces réactives de l'azote ou ERA (Halliwell and Gutteridge, 1999; Valko *et al.*, 2006). Ces espèces chimiques interviennent à plusieurs niveaux :

- Elles sont générées par les UV, les rayons X et les rayons γ ;
- Elles sont produites par les réactions catalysées par les métaux ;
- Elles sont produites par les neutrophiles et les macrophages durant l'inflammation ;
- Ce sont les sous-produits des réactions catalysées par la chaîne respiratoire mitochondriale (Cadenas, 1989).

Les ERO sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques car elles peuvent avoir des effets à la fois bénéfiques et délétères dans les organismes vivants (Valko *et al.*, 2004). Concernant les effets bénéfiques, elles interviennent dans les mécanismes de défense contre les agents infectieux et dans l'induction des réponses cellulaires. Par contre, à de fortes concentrations, les ERO peuvent entraîner d'importants dommages dans les structures cellulaires et notamment, au niveau des membranes biologiques, des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Poli *et al.*, 2004) ; on parle alors de stress oxydatif. Les effets délétères des ERO sont contrés par l'action d'un système complexe d'enzymes et de molécules antioxydantes (Halliwell, 1996). L'accumulation de dommages oxydatifs dans les cellules est à l'origine du vieillissement cutané, de cancers et de maladies neurodégénératives (Halliwell and Gutteridge, 1999).

I. LE STRESS OXYDATIF

I.1. Chimie et biochimie du stress oxydatif

Les radicaux libres sont des molécules ou des fragments moléculaires contenant un ou plusieurs électrons non appariés (**Figure 25**), ce qui confère une forte réactivité à la molécule. Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires appelé radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$), ou dérivent de l'azote comme le monoxyde d'azote ($^{\bullet}NO$) (Yoshikawa *et al.*, 2000). D'autres espèces dérivées de l'oxygène comme l'oxygène singulet ($^1O_2$), le péroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitropéroxyde (ONOOH) ne sont pas des radicaux libres, mais peuvent être des précurseurs de radicaux.

Les ERO peuvent être produites à partir de substances endogènes et exogènes. Les sources potentielles endogènes incluent la NADPH oxydase, la mitochondrie, les péroxysomes et l'inflammation (Inoue *et al.*, 2003). D'autres sources endogènes de génération d'ERO cellulaires sont les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages. L'activation des macrophages entraîne une augmentation de l'assimilation en oxygène qui se traduit par la production d'$O_2^{\bullet -}$, de $^{\bullet}NO$ et d'H_2O_2 (Conner and Grisham, 1996) (**Figure 25**). Les ERO peuvent être également produites par des sources exogènes comme les composés chlorés, les métaux et les UV.

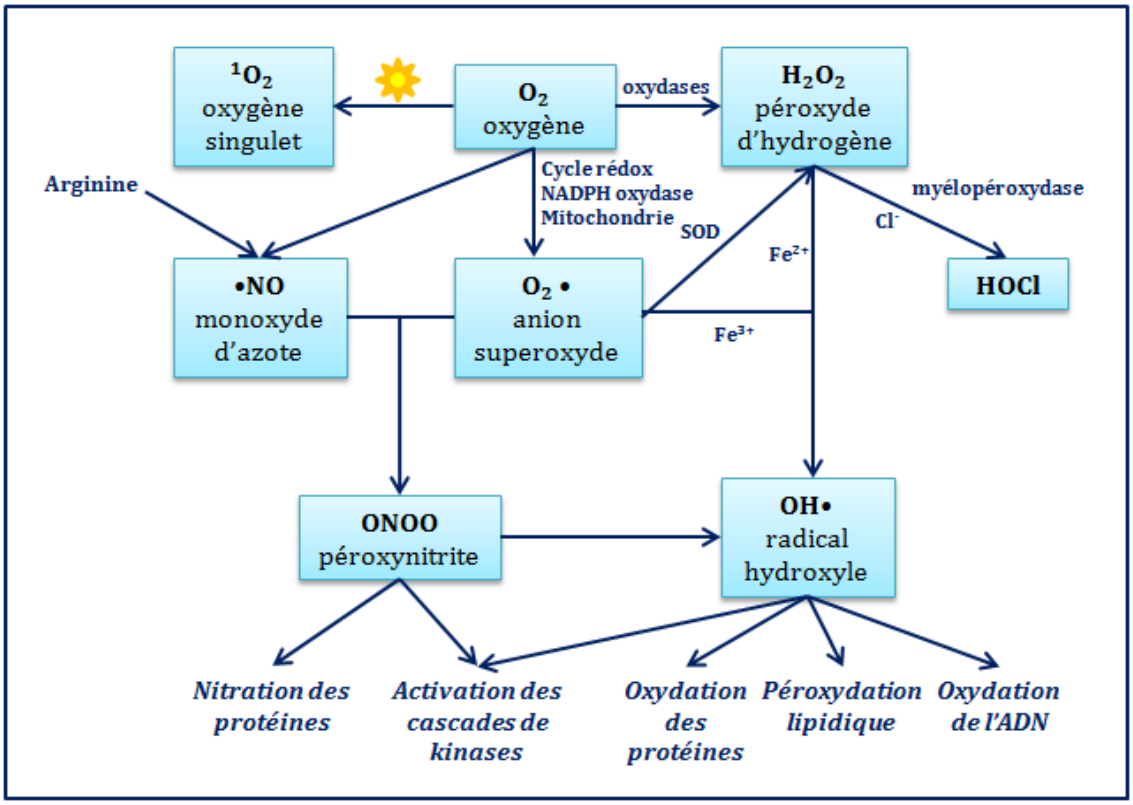


Figure 25: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène. SOD : superoxyde dismutase (Favier, 2003).

I.1.1. Les espèces réactives de l'oxygène

L'$O_2^{\bullet-}$, radical primaire, est produit par divers processus métaboliques ou par une réaction de photosensibilisation de type 2. Cette réaction photodynamique passe par la transformation d'un substrat en radical libre, qui interagit alors avec l'oxygène pour former l'$O_2^{\bullet-}$. Il peut ensuite interagir avec d'autres molécules afin de générer des radicaux secondaires, soit directement soit par des réactions catalysées par des métaux ou des enzymes (Fridovich, 1986). $O_2^{\bullet-}$ ne réagit pas directement avec les polypeptides, les sucres ou les acides nucléiques mais est transformé par une réaction de dismutation en H_2O_2 (Desideri and Falconi, 2003) :

$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (réaction catalysée par la superoxyde dismutase ou SOD)

La génération de radicaux libres est étroitement reliée à la présence de métaux (Valko *et al.*, 2005). Ainsi, la libération de Fe(II) peut participer à la réaction de Fenton générant ainsi de l'•OH très réactif (Klebanoff, 1980; Thannickal and Fanburg, 2000) :

$Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + {}^{\bullet}OH + OH^-$

L'$O_2^{\bullet-}$ participe également à la réaction de Haber-Weiss qui combine la réaction de Fenton et la réduction du Fe(III) par l'$O_2^{\bullet-}$:

$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + {}^{\bullet}OH + OH^-$ (Liochev and Fridovich, 2002)

I.1.2. Les espèces réactives de l'azote

L'oxyde nitrique ($^{\bullet}NO$) est impliqué dans différents processus physiologiques comme la transmission neuronale, la régulation de la pression sanguine, les mécanismes de défense, la relaxation musculaire et l'immunité (Alderton *et al.*, 2001; Archer, 1993; Bergendi *et al.*, 1999; Forstermann *et al.*, 1998). Le $^{\bullet}NO$ est généré dans les tissus biologiques par les oxydes nitriques synthases (NOS) qui transforment l'arginine en citrulline (Ghafourifar and Cadenas, 2005). La $_L$-arginine potentialise la cytotoxicité et les dommages à l'ADN induits par une exposition des cellules HaCaT aux UVA et cette action est bloquée par un inhibiteur des NO synthases, la $_L$-thio-$_L$-thiocitrulline (Didier *et al.*, 1999). Ces auteurs suggèrent également que le ratio oxyde nitrique/anion superoxyde joue un rôle clé dans ces processus (Didier *et al.*, 1999). Dans le milieu extracellulaire, le $^{\bullet}NO$ réagit avec l'oxygène et l'eau pour former des ions nitrates et nitrites.

Les cellules du système immunitaire produisent à la fois de l'$O_2^{\bullet-}$ et du $^{\bullet}NO$ durant l'inflammation qui peuvent réagir ensemble et produire l'anion péroxynitrique ($ONOO^-$), un radical libre causant des fragmentations de l'ADN et des oxydations lipidiques (Carr *et al.*, 2000) :

$^{\bullet}NO + O_2^{\bullet-} \rightarrow ONOO^-$

Le $^{\bullet}NO$ se lie ensuite rapidement à certains métaux de transition comme le Fe(II):

$Fe(II) + {}^{\bullet}NO \rightarrow Fe(II)\text{-}NO$

I.2. Les conséquences du stress oxydatif

La production excessive de radicaux libres provoque des dommages au niveau des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les lipides et les glucides. Des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés lors de l'oxydation des lipides peuvent également se produire.

I.2.1. Les dommages de l'ADN

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux oxygénés. On dénombre cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par •OH (Dizdaroglu *et al.*, 2002) : les bases oxydées, les sites abasiques, les adduits intra-caténaires, les cassures de brins et les pontages ADN-protéines (Cadet *et al.*, 2002) (**Figure 26**).

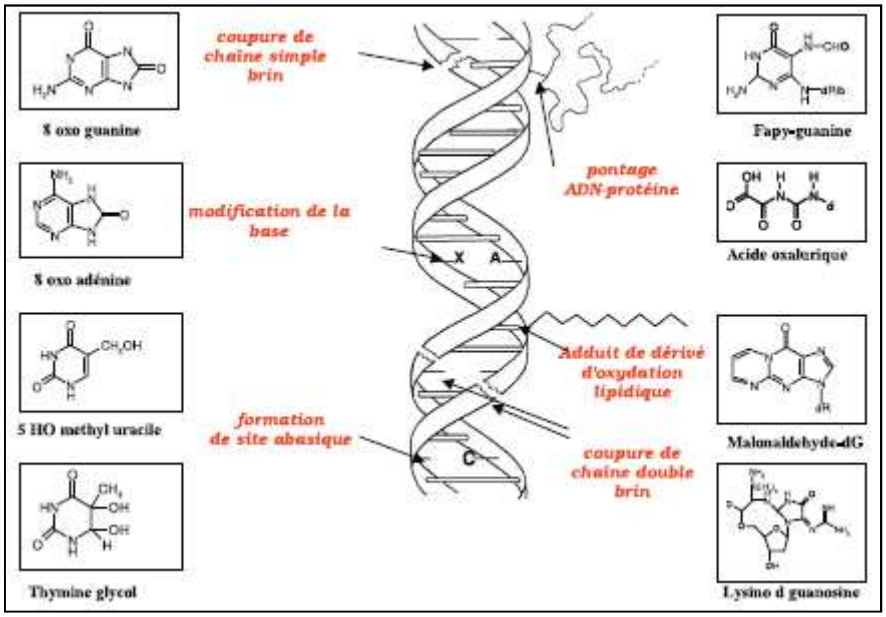


Figure 26: Les dommages oxydatifs de l'ADN par les espèces réactives de l'oxygène (Favier, 2003).

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées comme la 8 oxo-guanine ou l'oxazolone. Les ERO peuvent aussi attaquer la liaison entre la base et le sucre créant un site abasique.

Elles peuvent également attaquer le sucre lui-même créant une coupure de chaîne simple brin (**Figure 26**). Les dommages indirects de l'ADN sont la conséquence de l'attaque des lipides dont la péroxydation génère des aldéhydes mutagènes.

En plus des ERO, l'$ONOO^-$ et le $^{\bullet}NO$ peuvent être impliqués dans les dommages de l'ADN (Brown and Borutaite, 2001). Après réaction avec la guanine, l'$ONOO^-$ entraîne la formation de la 8-nitroguanine. De part sa structure, cet adduit entraîne à son tour des modifications de bases de type G:C→T:A.

I.2.2. Les dommages des lipides

Les lipides et les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque radicalaire de $^{\bullet}OH$ (Esterbauer *et al.*, 1991; Marnett, 1999). Ce radical est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué. Cette réaction est appelée péroxydation lipidique (Esterbauer *et al.*, 1992) (**Figure 27**). Les péroxydes peuvent alors suivre plusieurs voies. Ils peuvent être réduits et neutralisés par une enzyme antioxydante, la GPx ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes comme l'éthane, l'éthylène ou le pentane. Le radical péroxyle peut libérer différents aldéhydes toxiques et carcinogènes comme le malonaldialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxy-2-nonénal (HNE) (**Figure 27**). La transmission en chaîne de la réaction de péroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E présente dans les membranes biologiques.

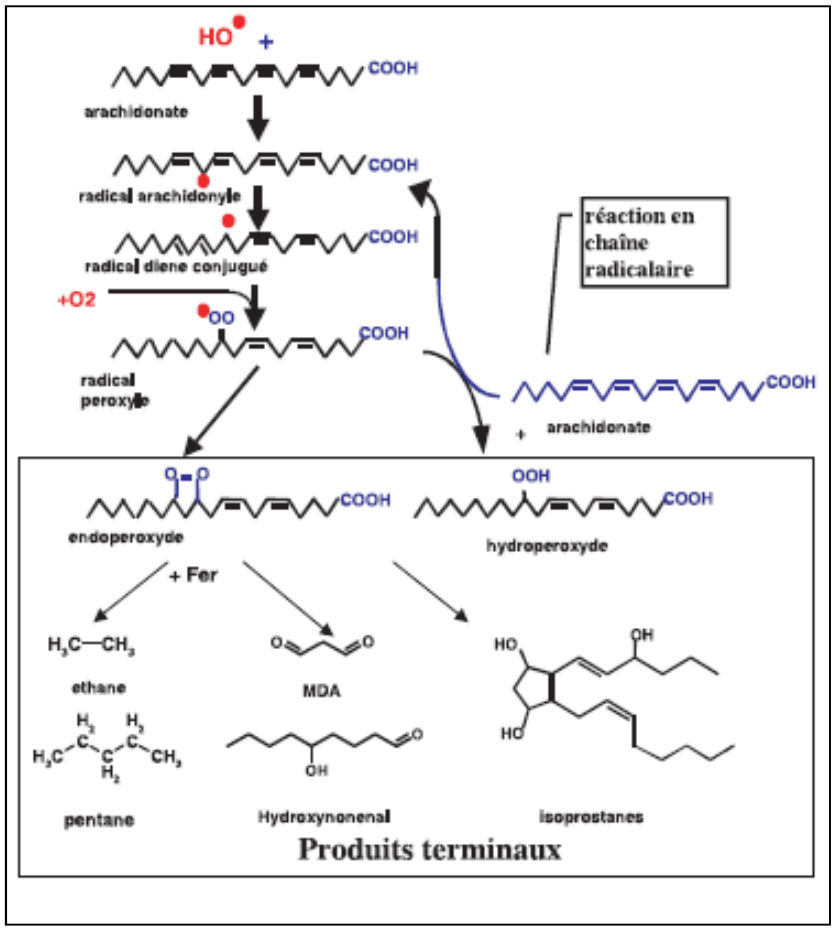


Figure 27: Mécanismes en chaîne de la péroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés. MDA : malonaldialdéhyde ; HO• : radical hydroxyle (Favier, 2003).

Cette péroxydation lipidique peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. L'attaque des lipides circulants aboutit à la formation de lipoprotéines de densité légère (LDL) oxydées qui, captées par les macrophages, formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome. L'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité des membranes et entraîne un dysfonctionnement de certains récepteurs et des voies de transduction du signal.

I.2.3. Les dommages des protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont celles qui contiennent un groupement sulfhydryle (SH), motif que l'on retrouve dans de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport (**Figure 28**).

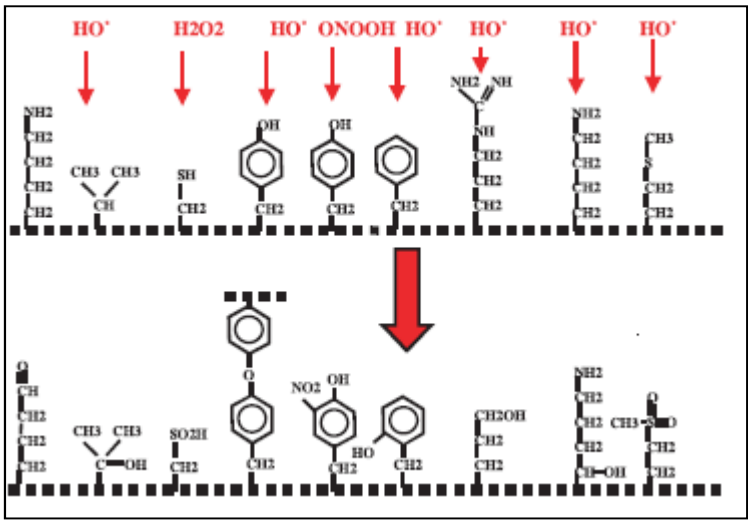


Figure 28: Modifications des chaînes latérales des acides aminés après attaque radicalaire (Favier, 2003)**.**

Les dommages protéiques catalysés par les métaux regroupent la scission oxydative, la perte de résidus histidine, les ponts bi-tyrosine, l'introduction de groupements carbonyles, la formation de groupements alkyles R•, alkoxyles RO• et alkylpéroxyles ROO• et la formation de radicaux (Davies, 1987; Davies and Delsignore, 1987; Davies *et al.*, 1987a; Davies *et al.*, 1987b; Stadtman, 1990). Les chaînes latérales de tous les acides aminés peuvent être oxydées par les UV et par l'action des ERO et des ERA (Stadtman, 2004), et en particulier par l'action de •OH.

Le •NO réagit rapidement avec l'$O_2^{\bullet-}$ pour former de l'$ONOO^-$ capable de réagir à son tour avec les groupements sulfhydryles présents dans les protéines au niveau des résidus tyrosine et tryptophane. Il peut également oxyder les résidus méthionine en méthionine sulfoxyde. La nitration des résidus tyrosine est un processus irréversible qui empêche la phosphorylation de ces résidus dans les protéines régulatrices.

Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation des zones hydrophobes. Elles vont alors former des amas anormaux associés aux lipides sous le terme de lipofuschines.

I.2.4. Les dommages des glucides

Les ERO attaquent majoritairement les protéoglycanes du cartilage. De plus, le glucose peut s'oxyder en présence de traces métalliques et libérer des cétoaldéhydes, de l'H_2O_2 et du $^{\bullet}OH$.

I.3. Les mécanismes de défense antioxydant

Les effets du stress oxydatif sont contrés par l'action d'un système complexe d'antioxydants non enzymatiques et enzymatiques. Les enzymes antioxydantes les plus efficaces sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathione péroxydase (GPx) (Mates *et al.*, 1999). Les antioxydants non enzymatiques incluent la vitamine C (ascorbate), la vitamine E (tocophérol), les caroténoïdes, les thiols (glutathion, thiorédoxine et acide lipoïque) et les polyphénols (McCall and Frei, 1999).

I.3.1. Les enzymes antioxydantes

I.3.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD catalyse la dismutation de l'$O_2^{\bullet -}$ en O_2 et en H_2O_2. Cette enzyme existe sous plusieurs isoformes qui diffèrent selon la nature de leur centre actif métallique. Chez l'Homme, il existe trois formes de SOD : la SOD cytosolique Cu, Zn-SOD, la SOD mitochondriale Mn-SOD et la SOD extracellulaire EC-SOD (Landis and Tower, 2005).

I.3.1.2. La catalase

La catalase est une enzyme présente chez les plantes, les animaux et les bactéries aérobies (Mates *et al.*, 1999) qui est localisée dans le péroxysome.

Cette enzyme catalyse la conversion du H_2O_2 en O_2 et H_2O suivant la réaction :

$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

I.3.1.3. La glutathione péroxydase (GPx)

Il existe deux formes de GPx, la glutathione-*S*-transférase (GST) indépendante du sélénium et la GPx qui est dépendante du sélénium (Mates *et al.*, 1999). L'Homme possède quatre GPx (Mates *et al.*, 1999) qui ont pour rôle de réduire les péroxydes en sélénoles (Se-OH). Les GPx agissent en coordination avec le tripeptide glutathion (GSH). Le substrat des GPx est l'H_2O_2 ou un péroxyde organique ROOH. La GPx décompose les péroxydes en eau ou en alcool tout en oxydant simultanément le GSH selon la réaction :

$2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$

$2\ GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$

I.3.2. Les antioxydants non enzymatiques

I.3.2.1. La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est un antioxydant très puissant. Elle augmente les niveaux intracellulaires de GSH ce qui joue un rôle important dans la protection des groupements thiols des protéines (Naziroglu and Butterworth, 2005). Ces partenaires majeurs sont la vitamine E et les caroténoïdes mais elle agit également avec les enzymes antioxydantes. La vitamine C coopère avec la vitamine E afin de régénérer l'α-tocophérol à partir des radicaux α-tocophérols présents dans les membranes et les lipoprotéines (Carr and Frei, 1999; Kojo, 2004). La vitamine C peut directement piéger l'$O_2^{\bullet -}$, l'$^{\bullet}OH$, l'$^1O_2$ et réduire l'H_2O_2 en eau (Noctor and Foyer, 1998).

Des études *in vitro* et *ex vivo* ont montré que la vitamine C plasmatique était capable d'augmenter la résistance à la péroxydation lipidique même en présence d'ions métalliques actifs et d'H_2O_2 (Suh *et al.*, 2003).

La vitamine C est également capable de réguler certains facteurs modulant l'expression génique, l'apoptose et diverses fonctions cellulaires (You *et al.*, 2000). Enfin, les cellules traitées par la vitamine C et exposées aux UVB montrent une diminution de l'ordre de 50% de la phosphorylation de JNK (pour c-Jun N-terminal Kinase) indiquant que cette vitamine inhibe les voies de signalisation JNK/AP-1 (pour Activator Protein-1) (McArdle *et al.*, 2002).

I.3.2.2. La vitamine E

La vitamine E est une vitamine liposoluble qui existe sous huit formes différentes. L'α-tocophérol est la forme la plus active chez l'Homme et est considéré comme l'antioxydant membranaire majeur utilisé par les cellules (Burton and Ingold, 1989). La fonction principale de la vitamine E est de protéger les cellules contre la péroxydation lipidique (Pryor, 2000). L'α-tocophérol est converti en un radical α-tocophérol par le transfert d'un hydrogène labile à un lipide ou à un radical péroxyle lipidique. Le radical α-tocophérol est ensuite réduit en la forme originale de l'α-tocophérol par l'acide ascorbique (Kojo, 2004).

I.3.2.3. Les antioxydants des fonctions thiols

I.3.2.3.1. Le glutathion (GSH)

Le GSH est très abondant dans le cytosol, dans le noyau et dans la mitochondrie où il est l'antioxydant soluble majeur de ces compartiments cellulaires (Masella *et al.*, 2005). La forme réduite du glutathion est le GSH et la forme oxydée est le glutathion disulfure (GSSG).

Un environnement oxydatif entraîne une modification rapide des groupements thiols des protéines (protéine-SH). Des réactions d'oxydation aboutissent à des acides sulféniques (protéine-SOH) et à des radicaux thiyls (protéine-S$^{\bullet}$) (Ji *et al.*, 1999). Ces produits partiellement oxydés réagissent avec le GSH et forment des protéines *S*-glutathiolées (protéine-SSG).

Ces protéines-SSG entrent dans le cycle du GSH où elles sont réduites, par la glutathione réductase, la glutarédoxine et la thiorédoxine, en groupements thiols protéiques (protéine-SH). Cependant, si le processus d'oxydation des groupements thiols n'est pas piégé par le GSH, on assiste à la formation irréversible d'acides sulfiniques (protéine-SO_2H) et d'acides sulfoniques (protéine-SO_3H) (**Figure 29**).

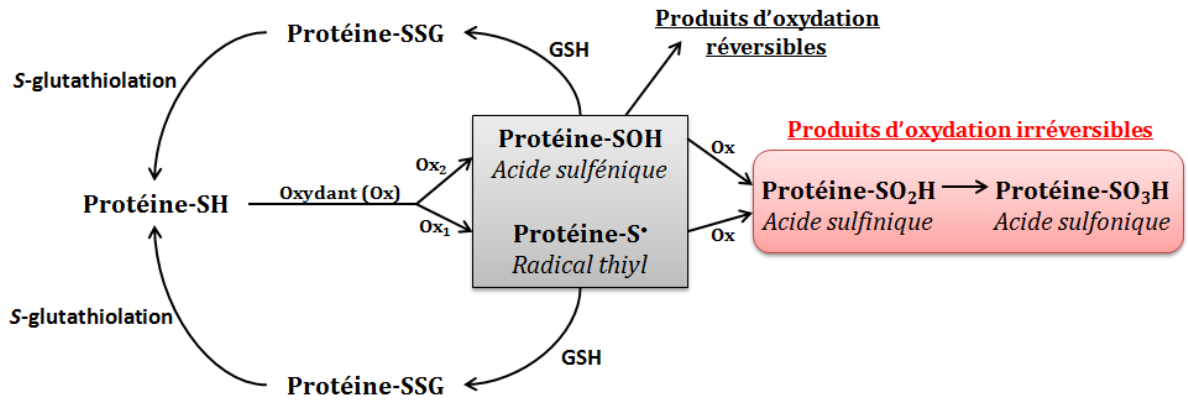


Figure 29 : Rôle du GSH dans l'oxydation des groupements thiols des protéines (Valko *et al.*, 2006).

I.3.2.3.2. Le système thiorédoxine

La thiorédoxine (TRX) est une petite protéine multifonctionnelle contenant un site actif conservé Cys-Gly-Pro-Cys (Nakamura *et al.*, 1997) et deux groupements thiols adjacents. La TRX contrôle un grand nombre de facteurs de transcription affectant la prolifération cellulaire. Elle inhibe l'activité de NF-κB dans le cytoplasme et augmente la liaison de NF-κB à l'ADN dans le noyau (Hirota *et al.*, 1999).

I.3.2.4. Les oligoéléments

Le sélénium est un antioxydant qui empêche la transformation maligne des cellules normales. Ces effets protecteurs sont dus à la présence du sélénium dans la GPx et dans la thiorédoxine réductase (TrxR), enzymes impliquées dans la protection de l'ADN et des autres composés cellulaires contre le stress oxydatif (Schrauzer, 2000; Trueba *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006).

Le sélénium est également impliqué dans la transduction du signal via l'activation des MAPK (pour Mitogen-Activated Protein Kinases) et de certains facteurs de transcription comme AP-1, NF-κB et p53 (Makropoulos *et al.*, 1996).

Le zinc joue un rôle essentiel dans l'intégrité des membranes cellulaires et est un composé de plus de 300 enzymes fonctionnant dans le métabolisme des lipides, des protéines et des sucres (Parkin, 2004). Le zinc stabilise la conformation des facteurs de transcription et module les processus de transduction du signal (Formigari *et al.*, 2007). De plus, des études ont mis en évidence que le zinc pouvait interagir avec le cuivre et le fer afin de diminuer le contenu en métaux des tissus et afin de retarder les processus oxydatifs (Bagchi *et al.*, 1997; Bray and Bettger, 1990).

I.3.2.5. Les polyphénols

Les composés phénoliques comme les flavonoïdes, l'épigallocatéchine gallate (EGCG) et le resvératrol sont des antioxydants qui fonctionnent comme terminateurs de chaînes de radicaux libres et comme chélateurs d'ions métalliques (Schroeter *et al.*, 2002). Les antioxydants phénoliques (PhOH) interfèrent avec la péroxydation lipidique par le transfert rapide d'atomes d'hydrogène aux radicaux libres selon la réaction :

$ROO^{\bullet} + PhOH \rightarrow ROOH + PhO^{\bullet}$

II. SOURCES CELLULAIRES ET REGULATIONS DES ERO

II.1. Le péroxysome

II.1.1. Le stress oxydatif péroxysomal

Les péroxysomes sont des organites cellulaires chargés de la détoxification des cellules. Ils jouent un rôle majeur dans la production et la capture des ERO, en particulier de l'H_2O_2 produit par les mitochondries.

Le processus métabolique majeur contribuant à la génération de l'H_2O_2 dans les péroxysomes est la β-oxydation des acides gras à longues chaînes et les réactions enzymatiques des flavines oxydases.

Afin de dégrader les ERO et de maintenir un équilibre entre production et capture des ERO, les péroxysomes possèdent des mécanismes de défense antioxydants (**Figure 30**).

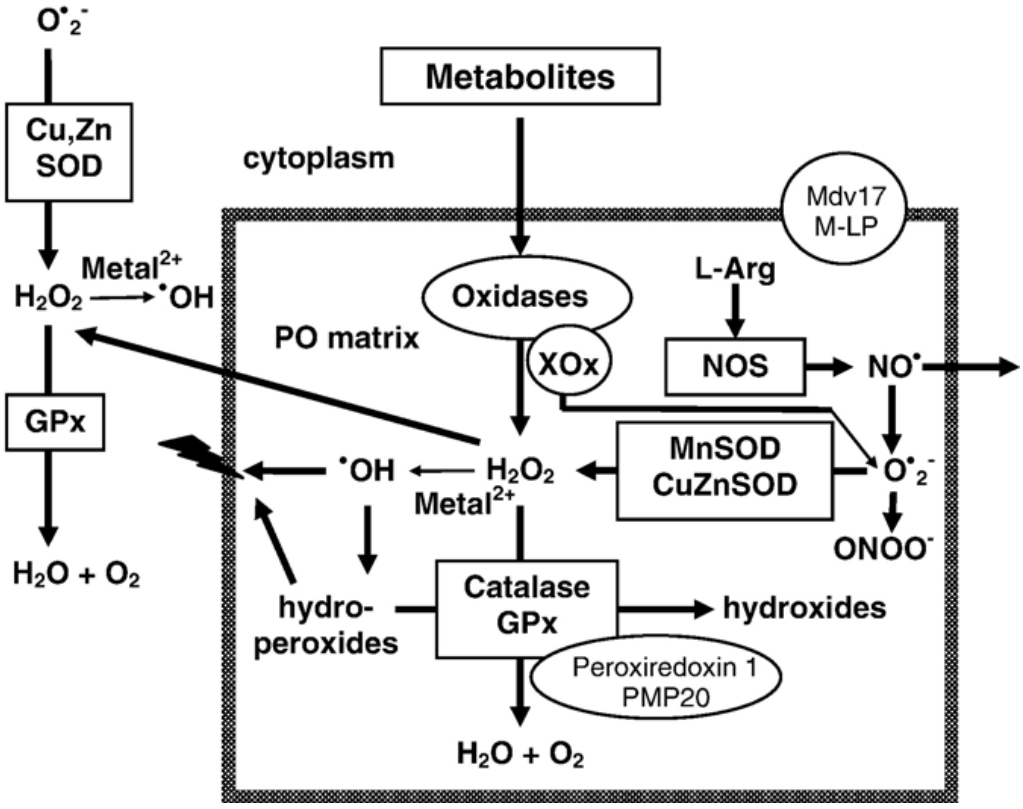


Figure 30: Représentation schématique des enzymes péroxysomales qui produisent et dégradent les ERO (Schrader and Fahimi, 2006).

II.1.2. Les enzymes péroxysomales

II.1.2.1. Les enzymes péroxysomales de génération d'ERO

Dans les péroxysomes, les sources majeures de production d'H_2O_2 sont les oxydases qui transfèrent l'hydrogène vers l'oxygène moléculaire (**Tableau 2**).

Enzyme	Substrat	ERO
AcylCoA oxydases	Acides gras à longues chaînes	**H_2O_2**
Urate oxydase	Acide urique	**H_2O_2**
Xanthine oxydase	Xanthine	**H_2O_2, $O_2^{\cdot-}$**
$_D$-amino acide oxydase	$_D$-proline	**H_2O_2**
Acide pipécolique oxydase	Acide $_L$-pipécolique	**H_2O_2**
$_D$-aspartate oxydase	$_D$-aspartate N-méthyl-$_D$-aspartate	**H_2O_2**
Sarcosine oxydase	Sarcosine, pipécolate	**H_2O_2**
Acide $_L$-alpha-hydroxyle oxydase	Glycolate, lactate	**H_2O_2**
Polyamine oxydase	N-acétyl spermine/spermidine	**H_2O_2**
Oxyde nitrique synthase	$_L$-arginine	**•NO**

Tableau 2 : Enzymes péroxysomales de génération d'ERO (Schrader and Fahimi, 2006).

La β-oxydation des acides gras est le processus métabolique le plus important dans les péroxysomes contribuant à la formation d'H_2O_2 (Poirier *et al.*, 2006). Le métabolisme lipidique péroxysomal est inductible par une grande variété de substrats endogènes et exogènes via le facteur de transcription nucléaire PPARα (Reddy, 2004).

II.1.2.2. Les enzymes péroxysomales d'élimination des ERO

Dans les péroxysomes, on retrouve également des enzymes antioxydantes qui vont contribuer à l'élimination des ERO (**Tableau 3**).

Enzyme	Substrat	Enzyme également présente dans :
Catalase	**H_2O_2**	Cytoplasme, noyau, mitochondrie
GPx	**H_2O_2**	Tous les compartiments cellulaires
Mn-SOD	**$O_2^{\bullet-}$**	Mitochondrie
Cu, Zn-SOD	**$O_2^{\bullet-}$**	Cytoplasme
Epoxyde hydrolase	**Epoxydes**	RE et cytoplasme
Péroxyrédoxine I	**H_2O_2**	Cytoplasme, noyau, mitochondrie
PMP 20	**H_2O_2**	Péroxysomes

Tableau 3: Enzymes de dégradation des ERO dans les péroxysomes. Mn, manganèse ; Cu, cuivre ; Zn, zinc ; RE, réticulum endoplasmique ; PMP, protéine membranaire péroxysomale (Schrader and Fahimi, 2006).

Dans la plupart des cellules eucaryotes, la Mn-SOD est localisée dans la mitochondrie mais on la retrouve également dans les péroxysomes (Singh *et al.*, 1999).

La péroxyrédoxine I possède une activité péroxydase dépendante de la thiorédoxine avec une forte affinité pour les hèmes pro-oxydants (Iwahara *et al.*, 1995). Ces enzymes jouent un rôle important dans la protection des cellules contre le stress oxydatif et dans la signalisation cellulaire (Hofmann *et al.*, 2002).

II.1.3. Les régulations du stress oxydatif dans les péroxysomes

II.1.3.1. Les régulations enzymatiques

Une élévation de l'oxygène moléculaire induit une augmentation modérée du volume des péroxysomes et des enzymes impliquées dans la capture des ERO. Une élévation des enzymes antioxydantes peut inhiber l'apoptose et promouvoir la carcinogénèse (Corcoran *et al.*, 1994).

II.1.3.2. Les régulations morphologiques

Dans les cellules en culture, le stress oxydatif induit des changements morphologiques des péroxysomes. En effet, une élongation des péroxysomes est observée après UV ou après exposition directe à l'H_2O_2 (Hockberger *et al.*, 1999; Schrader and Fahimi, 2004; Schrader *et al.*, 1999). Le traitement par des antioxydants bloque l'élongation des péroxysomes suggérant le rôle des ERO dans la croissance péroxysomale induite par les UV (Schrader *et al.*, 1999).

II.1.3.3. Péroxysomes et inflammation

L'acide arachidonique est un substrat pour la β-oxydation péroxysomale et stimule la production d'ERO dans les cellules en culture (Dymkowska *et al.*, 2006). Le TNF-α supprime l'expression de la catalase et de certaines enzymes péroxysomales (Beier *et al.*, 1992) et réduit simultanément les niveaux d'ARNm des enzymes de la β-oxydation (Beier *et al.*, 1997). Comme les péroxysomes ont un rôle central dans le catabolisme des médiateurs lipidiques de l'inflammation comme les leucotriènes B4 (Jedlitschky *et al.*, 1991), la perte de fonction des péroxysomes peut contribuer largement à la prolongation et à l'intensification des processus inflammatoires.

II.2. La mitochondrie

II.2.1. Généralités sur les mitochondries

Les mitochondries sont des organites présents dans toutes les cellules des organismes eucaryotes. Elles sont constituées de deux membranes (une interne et une externe), d'un espace inter-membranaire et d'une matrice (**Figure 31**).

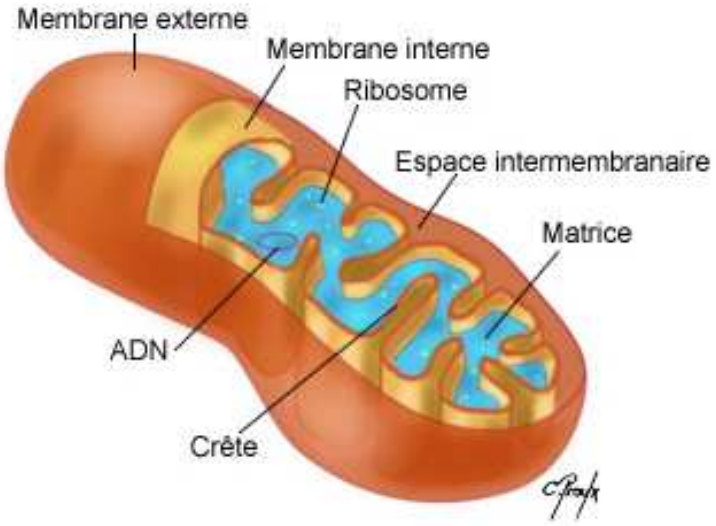


Figure 31 : Coupe schématique d'une mitochondrie (Campbell, 1995).

La mitochondrie est considérée comme la centrale énergétique de la cellule car c'est le siège de la phosphorylation oxydative. Lors du cycle respiratoire, l'énergie des molécules organiques comme le glucose est transformée en énergie directement utilisable par la cellule sous forme d'ATP. Les deux dernières phases de la respiration cellulaire ont lieu dans la mitochondrie. Il s'agit du cycle de Krebs dans la matrice et de la chaîne de transport d'électrons au niveau de la membrane interne (**Figure 32**). Un autre rôle de la mitochondrie est sa participation au mécanisme de l'apoptose (Degli Esposti, 2004; Gogvadze *et al.*, 2006; Jeong and Seol, 2008; Wang and Youle, 2009).

Enfin, la mitochondrie est une importante source d'ERO dans les cellules (Adam-Vizi and Chinopoulos, 2006; Andreyev *et al.*, 2005; Balaban *et al.*, 2005; Turrens, 2003). Cette production d'ERO contribue aux dommages mitochondriaux dans certaines pathologies mais est également importante dans la signalisation cellulaire. L'ERO majoritaire est l'$O_2^{\bullet -}$ qui est produite dans la matrice mitochondriale (Forman and Kennedy, 1974; Weisiger and Fridovich, 1973).

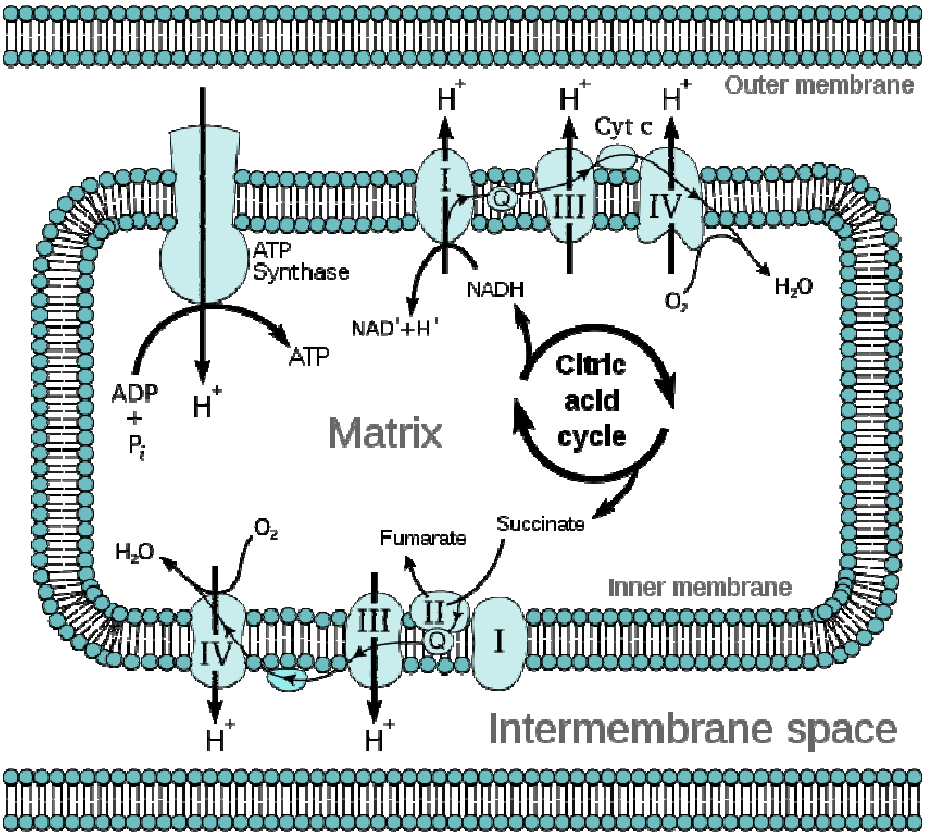


Figure 32 : Représentation schématique de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. I : complexe I ou NADH deshydrogénase ; II : complexe II ou succinate Q réductase ; III : complexe III ou cytochrome c réductase cytochrome b-c1 ; IV : complexe IV ou cytochrome c oxydase ; citric acid cycle : cycle de Krebs (illustration extraite de http://fr.wikipedia.org/wiki/Chaîne_respiratoire).

II.2.2. Le métabolisme des ERO dans la mitochondrie

II.2.2.1. Le stress oxydatif mitochondrial

La majorité des ERO sont produites par la respiration mitochondriale. Environ 1 à 2% de l'oxygène moléculaire consommé durant la respiration est converti en radicaux libres. La réduction de l'oxygène moléculaire produit un intermédiaire stable, l'$O_2^{\bullet -}$ qui sert de précurseur à la plupart des ERO (**Figure 33**).

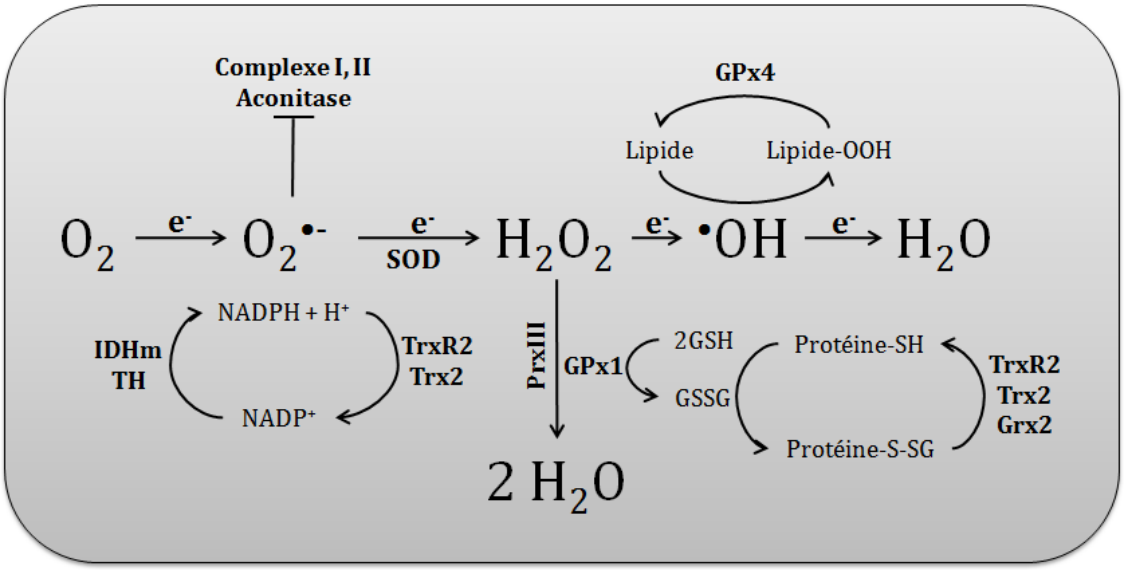


Figure 33 : Production et inactivation des ERO dans la mitochondrie. GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion disulfure ; GPx : glutathione péroxydase ; Grx : glutarédoxine ; IDHm : isocitrate mitochondriale deshydrogénase ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; Prx : péroxyrédoxine ; SOD : superoxyde dismutase ; TH : transhydrogénase ; Trx : thiorédoxine ; TrxR : thiorédoxine réductase (Ott *et al.*, 2007).

La chaîne de transport d'électrons mitochondriale (**Figure 32**) contient plusieurs centres oxydo-réducteurs qui peuvent capturer des électrons à l'oxygène moléculaire, servant donc de source primaire à la production d'ERO dans les cellules (Andreyev *et al.*, 2005). Cette génération est très importante comparée à la production d'ERO cytosolique. De plus, des travaux ont révélé qu'il existait des liens étroits entre la mitochondrie et le système NADPH oxydase (Lee *et al.*, 2006; Wosniak *et al.*, 2009).

La production d'ERO mitochondriale débute par le transfert d'un électron de l'oxygène moléculaire, au niveau des complexes I et III, qui conduit à la formation d'$O_2^{\bullet-}$ (Turrens, 1997). L'$O_2^{\bullet-}$ est ensuite capturé par la Mn-SOD entraînant la formation d'H_2O_2 (**Figure 33**). Enfin, l'H_2O_2 réagit en présence de métaux de transition réduits comme le fer et entraîne la production d'•OH.

La mitochondrie est également une source de •NO. Le •NO est généré par la famille des oxydes nitriques synthases (NOS) qui incluent la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inductible (iNOS). Ces enzymes synthétisent le •NO en utilisant la L-arginine comme substrat et le NADPH comme donneur d'électrons. Des études ont suggéré qu'un isoforme NOS était présent dans la mitochondrie (Bates *et al.*, 1996; Frandsen *et al.*, 1996; Kobzik *et al.*, 1995).

La fonction principale des NOS est de réguler les taux respiratoires en inhibant de façon réversible la cytochrome c oxydase (Giulivi, 2003). La réaction du $^{\bullet}NO$ avec $O_2^{\bullet-}$ génère une espèce hautement réactive, le $ONOO^-$ qui est à l'origine de l'oxydation et de la nitration des protéines (Radi *et al.*, 1991).

Enfin, l'$^1O_2$ peut avoir également un rôle dans l'état oxydo-réducteur de la mitochondrie. Cette ERO est à l'origine des dommages de l'ADN mitochondrial induits par les UVA (Berneburg *et al.*, 1999) et agit sur la voie intrinsèque de l'apoptose en libérant les protéines pro-apoptotiques (Danial and Korsmeyer, 2004).

II.2.2.2. Le système antioxydant mitochondrial

La plus importante des protections antioxydantes dans la mitochondrie est le GSH et les enzymes antioxydantes qui lui sont liées comme la GPx1 et la GPx4 (**Figure 33**). Elles catalysent la réduction de l'H_2O_2 et des hydropéroxydes lipidiques, avec le GSH comme donneur d'électrons. La GPx4 réduit les groupements hydropéroxydes des phospholipides, des lipoprotéines et des esters de cholestérol. En raison de sa petite taille et de l'importance de sa surface hydrophobe, la GPx4 peut interagir avec les hydropéroxydes des lipides membranaires et ce, plus efficacement que la voie de la phospholipase A_2-GPx1 (Antunes *et al.*, 1995).

Le système thiorédoxine mitochondrial, qui inclut la thiorédoxine 2 (Trx2) et la thiorédoxine réductase 2 (TrxR2), permet de maintenir les protéines mitochondriales sous forme réduite (**Figure 33**). Le système thiorédoxine peut également interagir avec les péroxyrédoxines (Prx), une famille de péroxydases spécifiques des fonctions thiols, afin de réduire l'H_2O_2 et les hydropéroxydes lipidiques (Chae *et al.*, 1999). Un isoforme de la Prx, la PrxIII, est exclusivement retrouvé dans la mitochondrie (Watabe *et al.*, 1997).

II.2.3. Les conséquences du stress oxydatif mitochondrial sur l'apoptose

II.2.3.1. Oxydation de la cardiolipine et libération du cytochrome c

Le cytochrome c est normalement lié à la membrane interne mitochondriale par une association avec la cardiolipine, un phospholipide anionique. La cardiolipine est seulement présente dans la mitochondrie où elle confère fluidité et stabilité aux membranes. L'oxydation de la cardiolipine diminue son affinité de liaison pour le cytochrome c ce qui facilite sa mobilisation (**Figure 34**).

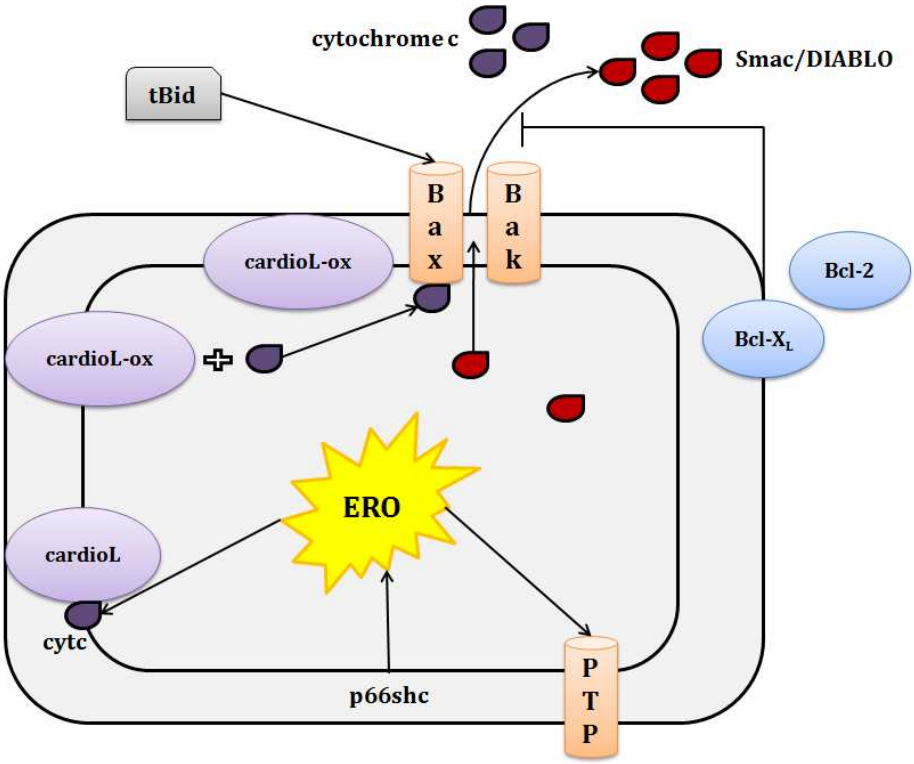


Figure 34 : Rôle des ERO dans le contrôle de la mort cellulaire au sein de la mitochondrie. cardioL : cardiolipine ; cardioL-ox : cardiolipine oxydée ; cytc : cytochrome c ; PTP : pore de perméabilité transitionnel ; ERO : espèces réactives de l'oxygène (Ott *et al.*, 2007).

La libération du cytochrome c durant l'apoptose est un processus en deux étapes. Dans la première étape, le cytochrome c se détache de la membrane interne mitochondriale puis dans la seconde étape, on assiste à une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et à une libération du cytochrome c dans le cytosol (Ott *et al.*, 2002).

Les ERO facilitent la dissociation entre le cytochrome c et la cardiolipine (Shidoji *et al.*, 1999) en activant la péroxydation lipidique (Kirkland *et al.*, 2002) ce qui se traduit par une libération du cytochrome c dans le cytosol via les pores formés par les protéines pro-apoptotiques (**Figure 34**). De plus, la production d'ERO entraîne une oxydation de la cardiolipine combinée à une inhibition du complexe IV de la chaîne de transport d'électrons (Petrosillo *et al.*, 2005).

II.2.3.2. Les modulateurs pro-oxydants des ERO

Une source possible d'ERO dans la mitochondrie des cellules apoptotiques est la protéine p66Shc, une enzyme qui utilise les équivalents réduits de la chaîne de transport d'électrons pour oxyder le cytochrome c (Giorgio *et al.*, 2005) (**Figure 34**). Cette enzyme forme un complexe avec Hsp70 qui est dissocié pendant l'apoptose. Cette dissociation est suivie d'une libération de p66Shc qui se lie au cytochrome c ce qui génère de l'H_2O_2.

Le facteur de transcription p53 est également impliqué dans la régulation de l'oxydation cellulaire. L'interaction des ERO avec l'ADN entraîne des dommages importants qui induisent une stabilisation de p53. L'augmentation de l'activité de p53 déclenche alors l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax et PUMA entraînant une libération du cytochrome c et l'activation de la cascade apoptotique.

II.3. Le système NADPH oxydase

La famille des NADPH oxydases également appelée Nox (pour NADPH oxydases) sont des protéines impliquées dans le transfert d'électrons à travers les membranes biologiques (Bedard and Krause, 2007). Les NADPH oxydases sont les seules enzymes dont la fonction primaire et unique est de produire des ERO. De manière générale, l'accepteur d'électrons est l'oxygène et le produit de la réaction du transfert d'électrons est l'$O_2^{\bullet -}$. Il existe sept isoformes Nox qui sont spécifiques de certains tissus et de certaines cellules (**Tableau 4**).

Isoforme	Répartition tissulaire majeure	Répartition tissulaire mineure
Nox1	Colon	Muscle, endothélium, placenta, prostate, ostéoclastes
Nox2	Phagocytes	Lymphocytes B, neurones, cardiomyocytes, muscle, hépatocytes, endothélium, cellules souches hématopoïétiques
Nox3	Oreille interne	Cerveau, rein et rate embryonnaires
Nox4	Rein, vaisseaux sanguins	Ostéoclastes, endothélium, muscle, cellules souches hématopoïétiques, fibroblastes, kératinocytes, mélanomes, neurones
Nox5	Lymphe	Endothélium, muscle, pancréas, placenta, estomac
Duox1	Thyroïde	Epithélium respiratoire, cervelet
Duox2	Thyroïde	Glandes salivaires, épithélium respiratoire, utérus, pancréas

Tableau 4 : Distribution tissulaire des enzymes Nox (Bedard and Krause, 2007).

II.3.1. Les enzymes Nox

Les propriétés structurales des enzymes Nox sont conservées entre les différents membres de la famille et incluent :

- Un site de liaison au NADPH côté C-terminal ;
- Une région de liaison au FAD ;
- Six domaines transmembranaires conservés ;
- Quatre histidines hautement conservées se liant au hème et localisées sur les domaines transmembranaires III et V (**Figure 35**).

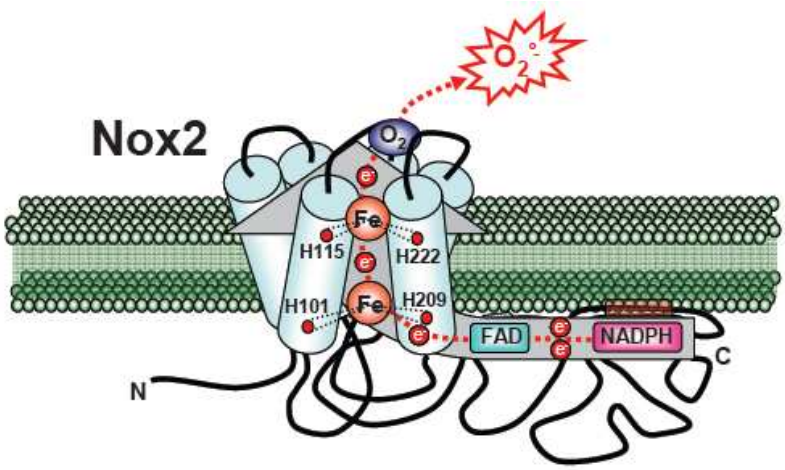


Figure 35 : Structure de l'isoforme Nox2 de la NADPH oxydase. Les histidines relient les deux hèmes contenant chacun un atome de fer (illustration extraite de la thèse de Minh Vu Chuong Nguyen (NGuyen, 2008)).

II.3.1.1. Nox2 : prototype Nox

Nox2 ou gp91^{phox} a été décrite pour la première fois dans les neutrophiles et les macrophages et est encore appelée NADPH oxydase phagocytaire. Nox2 est également exprimée dans les cellules non phagocytaires comme les neurones (Serrano *et al.*, 2003), les cardiomyocytes (Heymes *et al.*, 2003), les myocytes (Javesghani *et al.*, 2002), les hépatocytes (Reinehr *et al.*, 2005), les cellules endothéliales (Gorlach *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 1996; Li and Shah, 2002) et les cellules souches hématopoïétiques (Piccoli *et al.*, 2005).

Nox2 est activée via une série d'interactions protéine/protéine. La phosphorylation de p47^{phox} entraîne un changement conformationnel permettant à Nox2 d'interagir avec p22^{phox} (Groemping *et al.*, 2003; Sumimoto *et al.*, 1996). p47^{phox} organise la translocation des autres facteurs cytosoliques, d'où son appellation de sous-unité organisatrice. La localisation membranaire de p47^{phox} entraîne la sous-unité activatrice p67^{phox} et la petite sous-unité p40^{phox} directement en contact avec Nox2 (Han *et al.*, 1998) (**Figure 36**).

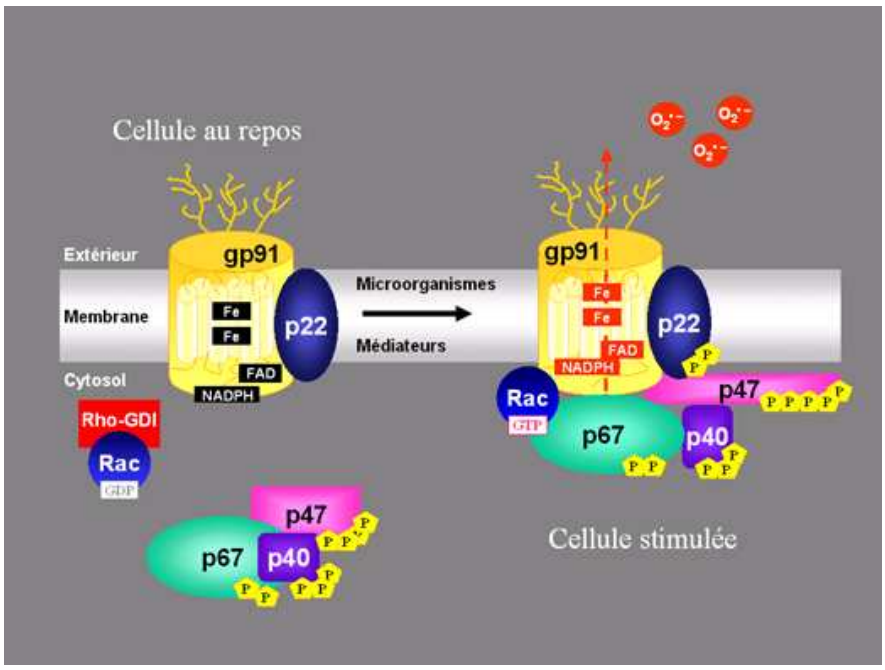


Figure 36 : Assemblage et activation de l'isoforme Nox2 ou gp91^{phox} de la NADPH oxydase. Nox2 requiert p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} et Rac. La phosphorylation de p47^{phox} est requise pour l'activation de Nox2 (illustration extraite de http://www-timc.imag.fr).

Enfin, la GTPase Rac interagit directement avec Nox2 (Diebold and Bokoch, 2001) puis avec p67^{phox} (Koga *et al.*, 1999; Lapouge *et al.*, 2000). Une fois assemblé, le complexe est actif et génère de l'$O_2^{\bullet-}$ en transférant un électron du NADPH présent dans le cytosol vers l'oxygène présent dans l'espace extracellulaire.

Nox2 est une chaîne d'oxydo-réduction transmembranaire qui relie un donneur d'électrons, le NADPH à un accepteur d'électrons, l'oxygène, présent du côté de la membrane externe. Nox2 transfère les électrons via une série d'étapes impliquant le FAD et se liant aux acides aminés $_{337}$HPFTLSA et $_{355}$IRIVGD (Vignais, 2002) et à deux centres hèmes asymétriques présents dans les domaines transmembranaires III et V (**Figure 35**). Les histidines H_{101} et H_{209} se lient à l'hème interne et les histidines H_{115} et H_{222} à l'hème externe (Finegold et al., 1996). Dans une première étape, les électrons sont transférés du NADPH au FAD, processus régulé par le domaine d'activation de p67^{phox} (Nisimoto et al., 1999). Dans une seconde étape, un seul électron est transféré de la flavine réduite $FADH_2$ vers le centre Fer de l'hème interne. Comme le centre Fer ne peut accepter qu'un seul électron à la fois, l'hème interne doit donner son électron à l'hème externe avant d'accepter un nouvel électron de la part de la flavine FADH partiellement réduite.

Enfin, pour créer un état énergétiquement stable, l'oxygène doit se lier à l'hème externe et accepter l'électron (Cross and Segal, 2004; Doussiere et al., 1996; Vignais, 2002).

II.3.1.2. Nox1

Nox1 a été le premier homologue de Nox2 à avoir été décrit (Banfi *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 1999). Nox1 est fortement exprimé dans l'épithélium du colon (Banfi *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 1999; Szanto *et al.*, 2005) et on le retrouve également dans certaines lignées cancéreuses comme la lignée de tumeurs colorectales Caco-2 (Clark *et al.*, 2004; Perner *et al.*, 2003).

La découverte dans le colon d'homologues des sous-unités cytosoliques de la NADPH oxydase phagocytaire a permit de montrer que la génération d'$O_2^{\bullet-}$ par Nox1 dépendait de sous-unités cytosoliques (Banfi et al., 2003; Cheng and Lambeth, 2004; Geiszt et al., 2003; Takeya et al., 2003). Ces nouvelles sous-unités cytosoliques ont été appelées NoxO1 (pour Nox Organisatrice 1 ou homologue de $p47^{phox}$) et NoxA1 (pour Nox Activatrice 1 ou homologue de $p67^{phox}$) (**Figure 37**).

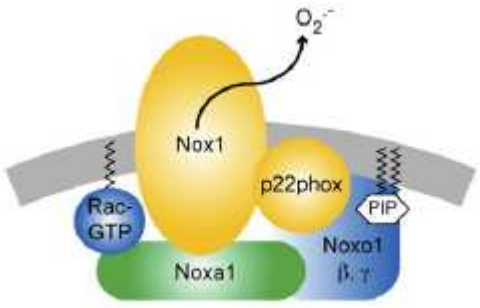


Figure 37 : Représentation structurale de l'isoforme Nox1 de la NADPH oxydase. NoxA1 : Nox Activatrice 1 ; NoxO1 : Nox Organisatrice 1 ; PIP : phosphatidyl-inositol phosphate (Opitz *et al.*, 2007).

En plus de son activité constitutive dans une grande variété de tissus (**Tableau 4**), Nox1 est induit dans certaines conditions.

Dans le muscle lisse vasculaire, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), la prostaglandine $F_{2\alpha}$ et l'angiotensine II induisent l'expression de Nox1 (Katsuyama *et al.*, 2002; Lassegue *et al.*, 2001; Suh *et al.*, 1999; Wingler *et al.*, 2001). Des études sur l'expression inductible de Nox1 dans le système vasculaire ont montré le rôle majeur de la transactivation du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR), de la PI3K et de la PKC-δ (Fan *et al.*, 2005). Dans les kératinocytes, les travaux de Chamulitrat *et al.* ont montré que Nox1 était localisé au niveau nucléaire et faiblement au niveau cytoplasmique (Chamulitrat *et al.*, 2003).

II.3.1.3. Nox3

Nox3 a été décrit pour la première fois en 2000 grâce à sa similarité de séquence avec les autres isoformes Nox (Kikuchi *et al.*, 2000). D'après certaines études fonctionnelles, $p22^{phox}$ est requit pour l'activation de Nox3 (Kawahara *et al.*, 2005; Ueno *et al.*, 2005) et la suppression de $p22^{phox}$ inhibe la production d'ERO induite par Nox3 (Kawahara *et al.*, 2005). Les études actuelles semblent aller dans le sens d'une activation constitutive de Nox3 ; NoxO1 étant la sous-unité clé pour son activation.

II.3.1.4. Nox4

Nox4 est fortement exprimé dans le rein (Geiszt *et al.*, 2000; Shiose *et al.*, 2001) mais également dans les kératinocytes (Chamulitrat *et al.*, 2004) et les mélanomes (Brar *et al.*, 2002). Nox4 est une enzyme dépendante de $p22^{phox}$ qu'elle stabilise (Ambasta *et al.*, 2004; Kawahara *et al.*, 2005; Martyn *et al.*, 2006). Néanmoins, l'activation de Nox4 ne requiert pas la présence de sous-unités cytosoliques (Geiszt *et al.*, 2000; Martyn *et al.*, 2006; Shiose *et al.*, 2001)

II.3.1.5. Nox5

Nox5 a été découverte en 2001 par deux groupes (Banfi *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2001). Les isoformes décrits dans les travaux de Banfi *et al.* (Nox5-α, -β, -γ et –δ) se distinguent des autres isoformes Nox1, Nox2, Nox3 et Nox4 par la présence d'un long domaine intracellulaire N-terminal contenant un domaine de liaison au calcium (Banfi *et al.*, 2001; Banfi *et al.*, 2004) (**Figure 38**).

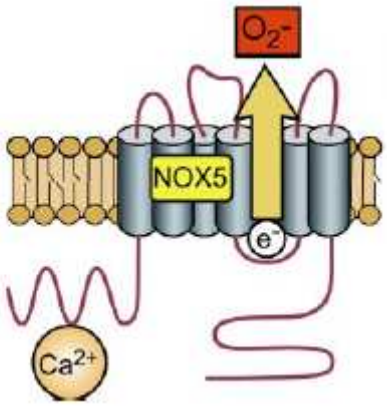


Figure 38 : Représentation structurale de l'isoforme Nox5 de la NADPH oxydase. Nox5 est activée par le calcium et ne semble pas nécessiter la présence d'autres sous-unités (Bedard and Krause, 2007).

L'activation de Nox5 est uniquement médiée par une augmentation de la concentration en calcium cytosolique (Banfi *et al.*, 2004).

II.3.1.6. Duox1/2

Les protéines Duox ou thyroïdes oxydases ont été mises en évidence pour la première fois dans la thyroïde (De Deken *et al.*, 2000; Dupuy *et al.*, 1999). En plus de leur domaine de liaison au calcium, les Duox possèdent un septième domaine transmembranaire en N-terminal contenant un domaine péroxydase (**Figure 39**).

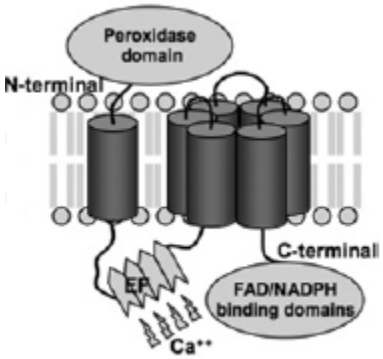


Figure 39 : Représentation structurale des isoformes Duox de la NADPH oxydase. Duox contient un domaine de liaison au calcium ainsi qu'un domaine péroxydase en N-terminal (Dworakowski *et al.*, 2006).

Duox1 est induite en réponse à l'IL-4 et à l'IL-13 et Duox2 est induite en réponse à l'IFN-γ dans l'épithélium respiratoire (Harper *et al.*, 2005). Ces enzymes ne requièrent pas la présence de sous-unités cytosoliques et peuvent directement être activées par le calcium (Ameziane-El-Hassani *et al.*, 2005).

II.3.2. Sous-unités Nox et protéines régulatrices

Nox2 requiert l'assemblage d'au moins cinq partenaires pour son activation:

- $p22^{phox}$ membranaire qui stabilise Nox et ancre les facteurs cytosoliques ;
- Les protéines cytosoliques $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$;
- La petite GTPase Rac ;
- Le facteur modulateur $p40^{phox}$ (**Figure 36**).

II.3.2.1. $p22^{phox}$

$p22^{phox}$ est une protéine membranaire qui possède la fonction de se lier aux protéines Nox, qu'elle stabilise, et aux sous-unités régulatrices. $p22^{phox}$ interagit avec Nox1 (Laude *et al.*, 2005; Takeya *et al.*, 2003), Nox2 (DeLeo *et al.*, 2000; Parkos *et al.*, 1988), Nox3 (Kawahara *et al.*, 2005; Ueno *et al.*, 2005) et Nox4 (Ambasta *et al.*, 2004; Martyn *et al.*, 2006).

La région responsable de cette interaction est une région riche en proline localisée en C-terminal de p22^{phox} (DeLeo *et al.*, 1995; Leto *et al.*, 1994) et qui est capable d'interagir avec les domaines SH3 des sous-unités organisatrices p47^{phox} et NoxO1.

II.3.2.2. Sous-unités organisatrices : NoxO1 et p47^{phox}

Deux sous-unités organisatrices sont connues : p47^{phox} ou NoxO2 (Nunoi *et al.*, 1988; Volpp *et al.*, 1988) et NoxO1. Les protéines NoxO1 et p47^{phox} possèdent chacune des domaines phox (PX) qui interagissent avec les lipides membranaires. De plus, elles possèdent des domaines SH3 qui interagissent avec les régions riches en proline de p22^{phox} (Leto *et al.*, 1994; Takeya *et al.*, 2003). Enfin, le domaine riche en proline permet également l'interaction avec les sous-unités activatrices p67^{phox} et NoxA1.

La différence majeure entre p47^{phox} et NoxO1 est la présence d'un domaine d'auto-inhibition dans p47^{phox}. Ce domaine d'auto-inhibition se lie au domaine SH3 empêchant l'association avec p22^{phox}. Après phosphorylation du domaine d'auto-inhibition, le domaine SH3 est exposé et permet à p47^{phox} de se lier à p22^{phox}. L'absence d'un domaine d'auto-inhibition dans NoxO1 suggère que celle-ci est activée de manière constitutive.

II.3.2.3. Sous-unités activatrices : NoxA1 et p67^{phox}

Deux sous-unités activatrices sont connues : p67^{phox} (ou NoxA2) et NoxA1. Ce sont des protéines cytoplasmiques non glycosylées qui contiennent une répétition tétratricopeptide (TPR) en N-terminal, un domaine d'activation hautement conservé, un domaine PB1 (pour Phox and Bem 1) et un domaine SH3 en C-terminal.

p67^{phox} et NoxA1 interagissent avec les domaines riches en proline de p47^{phox} et NoxO1 via leur domaine SH3 (de Mendez *et al.*, 1997; Groemping and Rittinger, 2005; Takeya *et al.*, 2003). p67^{phox} et NoxA1 peuvent également interagir directement avec les protéines Nox (Nox1-3) via leur domaine d'activation (Banfi *et al.*, 2003; Han *et al.*, 1998; Nisimoto *et al.*, 1999; Sumimoto *et al.*, 2005; Takeya *et al.*, 2003).

Enfin, les répétitions TPR servent à l'interaction avec la petite GTPase Rac (Grizot *et al.*, 2001; Koga *et al.*, 1999; Lapouge *et al.*, 2000; Sumimoto *et al.*, 2005; Takeya *et al.*, 2003).

II.3.2.4. p40^{phox}

p40^{phox} est une protéine cytosolique non glycosylée de 40 kDa qui interagit avec p47^{phox} et p67^{phox} (Lapouge *et al.*, 2002). Elle est constituée d'un domaine SH3, d'un domaine PX et d'un domaine PB1. La fonction principale de cette protéine est de réguler Nox2.

II.3.2.5. La petite GTPase Rac

Il existe trois sortes de protéines Rac chez les mammifères : Rac1 qui est ubiquitaire, Rac2 qui est exprimée dans les cellules myéloïdes et Rac3 que l'on retrouve dans le système nerveux central. Les protéines Rac sont impliquées dans la régulation de Nox2 mais ces GTPases régulent également d'autres fonctions cellulaires comme la mise en place du cytosquelette. De plus, les protéines Rac régulent également la production d'ERO mitochondriale (Radisky *et al.*, 2005; Werner and Werb, 2002).

III. LES ROLES DES ERO DANS LA PEAU

La peau sert d'interface avec l'environnement et constitue une enveloppe protectrice contre les agressions physiques et chimiques telles que les UV et les xénobiotiques. De nombreux agents chimiques peuvent être soit des oxydants soit catalyser la production d'ERO directement ou indirectement. Les ERO peuvent alors activer de nombreuses voies de signalisation cellulaire dans l'inflammation, l'immunité ou l'apoptose et être impliquées dans certaines pathologies cutanées comme les cancers de la peau ou le vitiligo (Bickers and Athar, 2006).

III.1. ERO et UV

Les UV peuvent causer des dommages biologiques directs et indirects via la production d'ERO. Bien que les UVA et les UVB entraînent tous deux un stress oxydatif, les UVA restent cependant la cause majoritaire du stress oxydatif dans les cellules (de Gruijl, 2000). Les UVB stimulent majoritairement la production d'$O_2^{\bullet-}$ par la NADPH oxydase et par la chaîne respiratoire mitochondriale (Jurkiewicz and Buettner, 1996; Masaki *et al.*, 1995) alors que les UVA produisent de l'$^1O_2$ par des réactions de photosensibilisation et de l'$O_2^{\bullet-}$ par la NADPH oxydase (Valencia and Kochevar, 2008).

Les UV entraînent une inhibition des enzymes antioxydantes (catalase et GPx) et des antioxydants non enzymatiques (vitamine E, ubiquinone et GSH) (Fuchs *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 1989). Des études ont démontré que la SOD protégeait les kératinocytes humains contre les dommages induits par les UVB (Sasaki *et al.*, 1997, 2000a) alors que les fibroblastes développaient, quant à eux, une réponse adaptative des enzymes antioxydantes après exposition aux UVA (Meewes *et al.*, 2001; Poswig *et al.*, 1999; Shindo and Hashimoto, 1997). Dans la peau humaine, des expositions uniques aux UV entraînent une réduction transitoire de l'activité SOD qui est suivie par une augmentation de la péroxydation lipidique (Punnonen *et al.*, 1991). Cependant, après exposition chronique aux UVB, une induction de l'activité SOD épidermique est observée (Punnonen *et al.*, 1995). Ces études démontrent donc que les UVA et les UVB peuvent altérer à la fois les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques et affectent, par conséquent, les mécanismes de défense contre les ERO dans la peau.

III.2. ERO et pigmentation

Les ERO ont une action paradoxale sur les mélanocytes car elles peuvent avoir un effet dépigmentant mais peuvent également augmenter la pigmentation de la peau. Un exemple de dégénérescence des mélanocytes par le stress oxydatif est représenté par le vitiligo. La peau des patients atteints par un vitiligo montre de forts niveaux de SOD mais de faibles taux de catalase (Sravani *et al.*, 2009). Ce déséquilibre dans la balance antioxydante entraîne alors une accumulation d'H_2O_2 dans la peau.

Des travaux récents ont montré que l'H_2O_2 ciblait directement les mélanocortines chez les patients atteints de vitiligo (Spencer *et al.*, 2007).

Les ERO peuvent également accélérer la pigmentation cutanée en augmentant la concentration des facteurs mélanogéniques comme la tyrosinase et la TRP-1 (Romero-Graillet *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 2000b). De plus, l'H_2O_2 active la phénylalanine hydroxylase épidermique (PAH) qui est une enzyme produisant la $_L$-tyrosine à partir de l'acide aminé essentiel, la $_L$-phénylalanine. Cette enzyme contribue alors à la mélanogénèse en augmentant le taux de $_L$-tyrosine, le substrat initial de la tyrosinase (Schallreuter *et al.*, 2004).

III.3. ERO et photovieillissement cutané

Les ERO ont un rôle dans le photovieillissement cutané. L'$^1O_2$ généré par les UVA stimule l'expression de la métalloprotéinase matricielle MMP-1 dans les fibroblastes dermiques via la sécrétion d'IL-1α et d'IL-6 (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1993; Wlaschek *et al.*, 1994). Certains lipides oxydés, comme la forme hydropéroxyde de l'acide linoléique, augmentent également l'expression des MMP-1 et MMP-3 (Ohuchida *et al.*, 1991). L'expression de la MMP-1 est stimulée par l'activation de JNK déclenchée par les ERO après exposition aux UV. L'activation de JNK est due à la phosphorylation continue du récepteur à l'EGF puisque les ERO inhibent les phosphatases (Denu and Tanner, 1998).

III.4. ERO et signalisation cellulaire

Les ERO jouent un rôle physiologique dans certains aspects de la signalisation cellulaire et de sa régulation (Palmer and Paulson, 1997) (**Figure 40**). En effet, les ERO interfèrent avec l'expression de certains gènes et de certaines voies de signalisation (Thannickal and Fanburg, 2000). Elles peuvent, en fonction de leur concentration, entraîner soit une réponse positive comme la prolifération cellulaire soit une réponse négative comme l'arrêt du cycle cellulaire ou la mort cellulaire.

D'autres exemples de régulation par les ERO incluent la régulation de la concentration en calcium cytosolique, de la phosphorylation des protéines et de l'activation de certains facteurs de transcription (Storz, 2005).

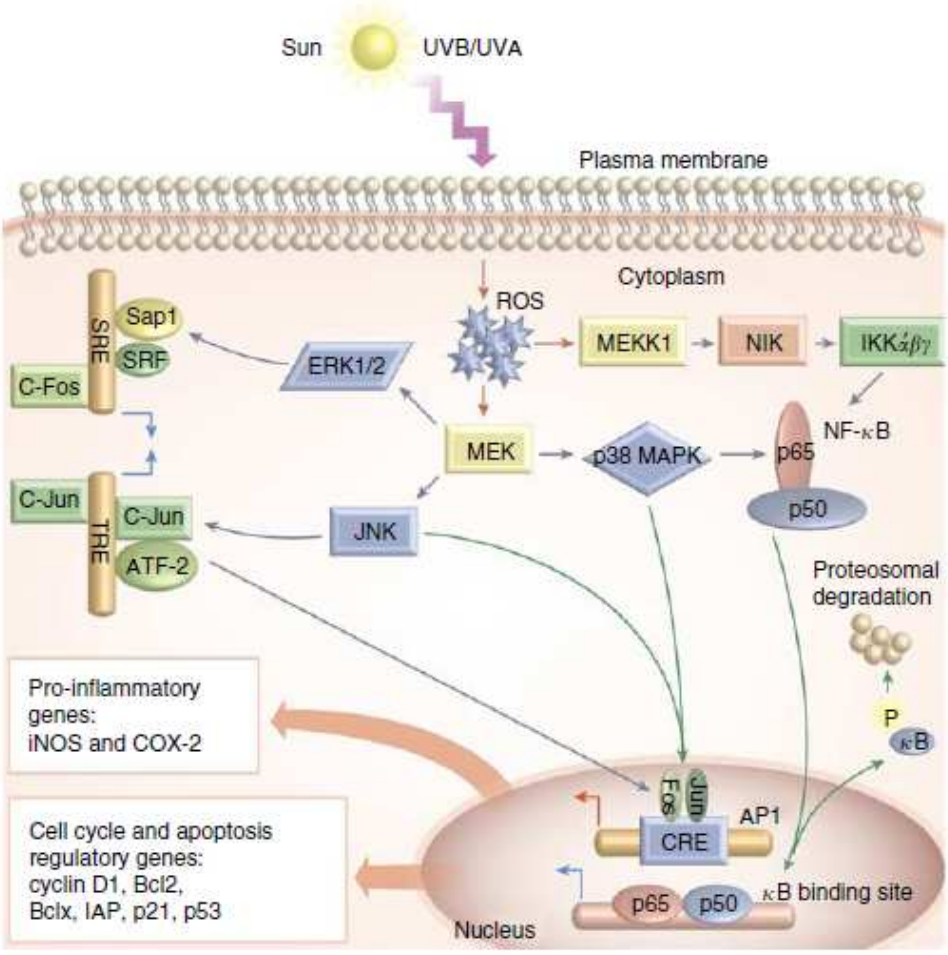


Figure 40 : Régulations des voies de signalisation cellulaire par les ERO dans la peau (Bickers and Athar, 2006).

III.4.1. Phosphorylation et déphosphorylation

La phosphorylation des protéines joue un rôle critique dans la régulation d'un grand nombre de voies de signalisation cellulaire chez les eucaryotes. Il s'agit d'un processus dynamique et réversible qui requiert non seulement une protéine kinase mais également une protéine phosphatase. Ces kinases et ces phosphatases interviennent dans la mitogénèse, dans l'adhésion cellulaire, dans la transformation oncogénique ou encore dans l'apoptose (Cheng *et al.*, 2006; Chiarugi and Fiaschi, 2007; Schmid *et al.*, 1998).

De nombreuses études ont montré que le stress oxydatif pouvait moduler les activités kinases et phosphatases dans les cellules (Charest *et al.*, 2006; Chiarugi and Fiaschi, 2007).

III.4.1.1. Les sérine/thréonine kinases

Tous les récepteurs à sérine/thréonine kinases sont des membres de la superfamille du TGF-β. Le TGF-β1 stimule la production d'ERO dans de nombreuses cellules (Huang *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 1998) et supprime l'expression de certaines enzymes antioxydantes comme la Mn-SOD, la Cu, Zn-SOD et la catalase.

Le calcium agit comme facteur de signalisation et régule de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différentiation et l'apoptose (Parekh and Penner, 1997). Les ERO induisent une libération de calcium intracellulaire activant certaines kinases et en particulier la PKC. Celle-ci contient des régions riches en cystéine au niveau de ses domaines régulateurs et de son site catalytique qui peuvent être modifiées par des oxydants (Gopalakrishna and Jaken, 2000).

Les MAPK relayent les signaux générés par des stimuli exogènes et endogènes à l'espace intracellulaire via la phosphorylation de protéines. Durant ce processus, les MAPK interagissent avec certains médiateurs comme les récepteurs aux facteurs de croissance, les RCPG, les tyrosine kinases et les facteurs de transcription (Lopez-Ilasaca *et al.*, 1997). Il existe quatre familles de MAPK : ERK (pour Extracellular-Regulated Kinase), JNK, p38 et BMAPK-1 (pour Big MAPK-1). Ces MAPK jouent un rôle dans la prolifération cellulaire, dans la différentiation et dans l'apoptose (Kyriakis and Avruch, 2001). Les produits de l'activation de Nox1, l'$O_2^{\bullet-}$ et l'H_2O_2 peuvent activer la cascade des MAPK au niveau de MEK et ERK1/2 et la production d'H_2O_2 endogène induit ERK et non p38 (Iles and Forman, 2002). La balance entre l'activation d'ERK et de JNK est un facteur clé pour la survie cellulaire et le déclenchement de l'apoptose (Baines and Molkentin, 2005; Cross *et al.*, 2000; Strniskova *et al.*, 2002).

III.4.1.2. Les phosphatases

Les ERO inhibent les phosphatases probablement en interagissant avec leurs groupements sulfydryls localisés au niveau des résidus cystéines qui forment les ponts disulfures inter- et intra-moléculaires (Poli *et al.*, 2004; Thannickal and Fanburg, 2000). Ces changements structuraux altèrent la conformation des protéines ce qui déclenchent certaines voies de signalisation dépendantes des facteurs de croissance, des kinases Src/Abl, des MAPK et des PI3K. Ces voies de signalisation entraînent alors l'activation de certains facteurs de transcription comme AP-1, NF-κB et p53 (Groeger *et al.*, 2009).

III.4.2. Cytokines et facteurs de croissance

Il existe cinq familles de récepteurs aux cytokines : les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines (IL-1), les récepteurs des cytokines de classe I ou hématopoïétines, les récepteurs des cytokines de classe II ou IFN (IFN-γ), les récepteurs des TNF (TNF-α) et les récepteurs des chimiokines. Dans le cytosol, les sous-unités des récepteurs sont associées à des protéines JAK (pour Janus Kinases) qui vont assurer la transduction du signal. Les récepteurs aux facteurs de croissance transmettent, quant à eux, l'information cellulaire via la voie des MAPK (Ballif and Blenis, 2001; Cano and Mahadevan, 1995; Davis, 1994; English and Cobb, 2002; Hazzalin and Mahadevan, 2002; Obata *et al.*, 2000; Seger and Krebs, 1995). Les ERO sont produites par les récepteurs aux facteurs de croissance comme le récepteur à l'EGF (Bae *et al.*, 1997), les récepteurs aux cytokines (TNF-α et IFN-γ) et les récepteurs aux interleukines (IL-1β) (Sundaresan *et al.*, 1996). Les ERO générées par ces voies de signalisation fonctionnent comme seconds messagers et interviennent dans la prolifération cellulaire et l'apoptose.

III.4.3. Les facteurs de transcription nucléaire

Les facteurs de transcription contrôlent l'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, l'immunité, la prolifération cellulaire et l'apoptose.

Le NF-κB est impliqué dans l'inflammation et AP-1 est important pour la croissance cellulaire et la différentiation. *p53* est un gène qui est associé à plus de la moitié des cancers chez l'Homme (Sun and Oberley, 1996). C'est également un gardien de l'intégrité du génome et son inactivation entraîne des dysfonctionnements dans le contrôle du cycle cellulaire.

Le facteur de transcription AP-1 appartient aux sous-familles de Jun et de Fos. Ces facteurs peuvent se lier aux agents promoteurs de tumeurs (TPA) ou aux éléments de réponse à l'AMPc (CRE). L'activité d'AP-1 est induite par les métaux en présence d'H_2O_2, par certaines cytokines et par des stress chimiques et physiques. Cette induction est médiée majoritairement par JNK et p38 (Pinkus *et al.*, 1996). L'activation d'AP-1 entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire et peut réguler positivement et négativement l'apoptose. Enfin, AP-1 participe à la transformation oncogénique en interagissant avec l'oncogène Ha-Ras.

Le NF-κB est un facteur de transcription ubiquitaire et inductible des gènes impliqués dans la survie cellulaire, la différentiation et la croissance (Amiri and Richmond, 2005; Pande and Ramos, 2005). Les ERO sont des seconds messagers impliqués dans l'activation de NF-κB via le TNF-α et l'IL-1 (Baud and Karin, 2001; Hughes *et al.*, 2005). L'importance des ERO dans l'activation de NF-κB a été mise en évidence dans plusieurs études qui montraient que l'activation de NF-κB était inhibée par des antioxydants comme la *N*-acétyl cystéine (NAC), les polyphénols et la vitamine E (Glauert, 2007; Lee *et al.*, 2005; Rota *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2010).

Le facteur de transcription p53 joue un rôle clé dans la protection des cellules contre l'oncogenèse (Hofseth *et al.*, 2004). De nombreuses études ont montré que le stress oxydatif entraînait des mutations de p53 (Renzing *et al.*, 1996) et était impliqué dans l'apoptose médiée par p53 (Polyak *et al.*, 1997).

III.5. ERO et inflammation

Les UV stimulent l'infiltration des macrophages et des neutrophiles dans la peau et par conséquent, active l'inflammation.

Une augmentation de la production des ERO ainsi que des prostaglandines comme la PGE_2 contribuent à ces événements (Warren *et al.*, 1993; Weller, 1997). Les ERO produites en réponse aux UV peuvent alors causer des mutations et donc jouer un rôle majeur dans la photocarcinogenèse. De plus, la péroxydation lipidique est causée, soit par une très forte exposition solaire qui se traduit par une augmentation des ERO cutanées, soit par un défaut dans les mécanismes de défense antioxydants (Beani, 2001; Didier *et al.*, 2001a; Didier *et al.*, 2001b; Mouret *et al.*, 2005).

OBJECTIFS

DU

TRAVAIL

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le récepteur MC1R possède des rôles primordiaux dans la pigmentation cutanée, les cancers de la peau et l'inflammation. Cependant, le gène *MC1R* est très polymorphe et les individus porteurs de mutations non fonctionnelles sont plus sensibles au soleil et ont un risque accru de développer un mélanome ou un carcinome. La compréhension des mécanismes de régulation du récepteur MC1R après exposition aux UV constitue donc un enjeu majeur pour le développement de nouvelles stratégies de photoprotection.

Durant ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés aux rôles du récepteur MC1R dans les réponses oxydatives induites par les UVA dans des kératinocytes humains HaCaT. Ce modèle d'étude s'est révélé très intéressant pour étudier les rôles du MC1R et de son variant non fonctionnel $R_{151}C$ dans un contexte de cellules exposées aux UV. Pour répondre à cette problématique, nous avons étudié plusieurs points:

1. Quel est le rôle du récepteur MC1R dans le stress oxydatif induit par les UVA ?
2. Quelle est la source majeure de production des ERO intracellulaire dans notre modèle ?
3. Quels sont les mécanismes de régulation du stress oxydatif par le récepteur MC1R ?

Notre travail a débuté par la caractérisation fonctionnelle de nos différentes lignées afin d'établir un modèle d'étude précis. Puis, nous nous sommes focalisés sur les effets antioxydants du récepteur MC1R sur le stress oxydatif induit par les UVA. Enfin, nous avons abordé les mécanismes de régulation par l'étude de l'isoforme Nox1 de la NADPH oxydase et de la transactivation entre le récepteur MC1R et l'EGFR.

Ces travaux de thèse ont fait l'objet d'un article soumis à publication dans «*Journal of Investigative Dermatology* ».

RESULTATS

PARTIE 1 : ELABORATION D'UN MODELE CELLULAIRE DE SUR-EXPRESSION DU MC1R

Le récepteur MC1R est fortement exprimé dans les mélanocytes (Roberts *et al.*, 2006) mais on le retrouve également dans d'autres types cellulaires comme les monocytes (Bhardwaj *et al.*, 1997; Rajora *et al.*, 1996), les cellules endothéliales (Hartmeyer *et al.*, 1997) et les fibroblastes dermiques (Boston and Cone, 1996). Il a été mis en évidence que les UV augmentaient l'expression du récepteur MC1R dans les mélanomes (Bolognia *et al.*, 1989; Chakraborty *et al.*, 1991; Eberle *et al.*, 1993; Eller *et al.*, 1996; Siegrist *et al.*, 1989; Siegrist *et al.*, 1994) et dans les mélanocytes humains normaux (De Luca *et al.*, 1993; Donatien *et al.*, 1992; Funasaka *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2002).

L'expression du MC1R peut être induite par les UV (Scott *et al.*, 2002), par les mélanocortines (Garcia-Borron *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 1996) ou après différenciation par du Ca^{2+} (Chakraborty *et al.*, 1999). Néanmoins, des travaux récents n'ont pas mis en évidence une expression du MC1R dans les cellules HaCaT (Roberts *et al.*, 2006). De plus, la production d'AMPc intracellulaire n'est pas augmentée après stimulation par la NDP-MSH dans les kératinocytes et dans les fibroblastes alors qu'une forte induction est observée dans les lignées mélanocytaires (Roberts *et al.*, 2006). Des résultats contradictoires sur les kératinocytes et sur les fibroblastes ont été observés. Les travaux de Donatien *et al.* et ceux de Suzuki *et al.* n'ont pas mis en évidence de liaison de l'agoniste dans ces types cellulaires (Donatien *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 1996) alors que d'autres études ont montré qu'une liaison spécifique pouvait être établie dans ces cellules (Bohm and Luger, 2004; Chakraborty *et al.*, 1999; Funasaka *et al.*, 2001). Néanmoins, les UVB stimulent l'expression du MC1R dans les kératinocytes humains normaux *in vitro* (Chakraborty *et al.*, 1999; Garcin *et al.*, 2009) et dans l'épiderme humain *in vivo* (Schiller *et al.*, 2004).

I. CHOIX DU MODÈLE CELLULAIRE

Les kératinocytes représentent 90% des cellules de l'épiderme et sont fortement soumis à l'exposition au rayonnement UV.

La lignée cellulaire HaCaT a été mise au point par l'équipe du Dr Fusenig en 1988 (Boukamp *et al.*, 1988). Cette lignée cellulaire dérive de la culture primaire à long-terme de kératinocytes cutanés humains. Ces cellules sont considérées immortelles, possèdent des marqueurs chromosomiques spécifiques stables mais ne sont pas tumorigènes. Même après plusieurs passages, les cellules HaCaT conservent une remarquable capacité à se différencier normalement. Ces cellules ont été obtenues après excision chirurgicale de peau humaine située à la périphérie d'un mélanome localisé dans le dos. Cette lignée cellulaire a été développée après une culture prolongée à température élevée et en présence de faibles concentrations de Ca^{2+} (Boukamp *et al.*, 1988).

Contrairement aux cellules humaines transformées à l'aide de virus, les cellules HaCaT, bien qu'immortelles, conservent largement leur capacité à restituer un épiderme structuré après transplantation *in vivo*. L'immortalisation a été causée par l'inactivation du gène *p53* par mutations des deux allèles par les UV. Malgré cela, les cellules HaCaT restent relativement proches de kératinocytes humains normaux et offrent ainsi un modèle d'étude *in vitro* intéressant dans les travaux portant sur la photobiologie cutanée (Fusenig and Boukamp, 1998).

Nous avons donc mis au point un modèle expérimental pour étudier *in vitro* le rôle du récepteur MC1R dans les mécanismes oxydatifs induits par les UV. Ce modèle repose sur la transfection stable de kératinocytes immortalisés humains HaCaT par le gène codant pour la forme sauvage du *MC1R* et par un gène *MC1R* muté ($R_{151}C$). Le variant $R_{151}C$ se caractérise par une mutation au niveau d'un acide aminé. L'arginine 151 est remplacée par une cystéine au niveau de la boucle intracellulaire n°2 du récepteur ce qui abolit son activité (Garcia-Borron *et al.*, 2005). Les sujets porteurs de ces mutations ont un phénotype cheveux roux/peaux claires appelé RHC (cf. partie 2 de la synthèse bibliographique). L'obtention de ces différentes lignées cellulaires a fait partie du travail de thèse de Geneviève Garcin (Garcin, 2007) et le protocole d'obtention des différents clones est décrit dans la partie Matériels & Méthodes, paragraphe I de ce mémoire.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons utilisé les cellules HaCaT sauvages (HaCaT wt), les cellules exprimant la forme sauvage du gène *MC1R* (HaCaT-MC1R) et celles exprimant le gène *MC1R* muté (HaCaT-$R_{151}C$).

II. ETUDE DE L'EXPRESSION DU MC1R

L'expression des récepteurs MC1R dans les cellules HaCaT transfectées a été montrée par PCR quantitative en temps réel (qPCR). La méthodologie employée est décrite dans la partie Matériels & Méthodes, paragraphe III de ce mémoire. Le niveau d'expression du MC1R a été mesuré dans les cellules HaCaT non transfectées (HaCaT wt), dans deux clones différents de cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et dans deux clones différents de cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clones 15 et 30). Les résultats de la qPCR sont présentés **Figure 41**.

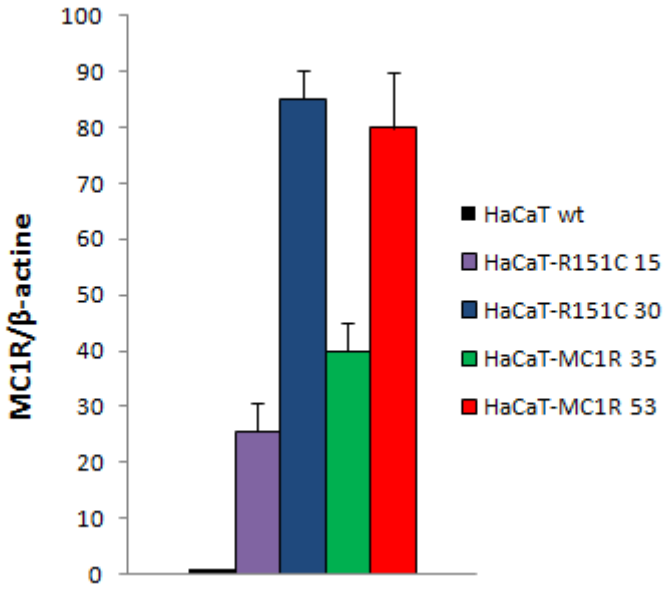


Figure 41 : Expression stable du récepteur MC1R et du variant non fonctionnel $R_{151}C$ dans les cellules HaCaT. L'expression du gène *MC1R* est déterminé par qPCR en utilisant des primers spécifiques (sens : TGTCGTCTTCAGCACGCTCTT ; anti-sens : CGTACAGCACGGCCATGA). Les données sont normalisées par rapport à la β-actine.

Le niveau d'expression du MC1R, observé après 40 cycles d'amplification, est environ 40 et 80 fois plus élevé dans les clones 35 et 53 respectivement, par rapport aux cellules HaCaT sauvages. De manière similaire, le niveau d'expression du récepteur MC1R est 25 et 85 fois plus élevé dans les clones 15 et 30 respectivement, par rapport aux cellules HaCaT sauvages.

La quantification a été réalisée à l'aide d'un gène domestique exprimé de façon ubiquitaire dans tous les types cellulaires, la β-actine.

III. PROPRIETES DE LIAISON DE L'A-MSH POUR LE RECEPTEUR MC1R

Les propriétés fonctionnelles des cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et des cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) ont été étudiées par un test de liaison par compétition en présence d'un ligand radiomarqué, la [^{125}I]-NDP-MSH. Ce radioligand est un analogue de l'α-MSH couramment utilisé dans ce type de technique. Les cellules HaCaT sauvages sont utilisées comme contrôle négatif (**Figure 42**).

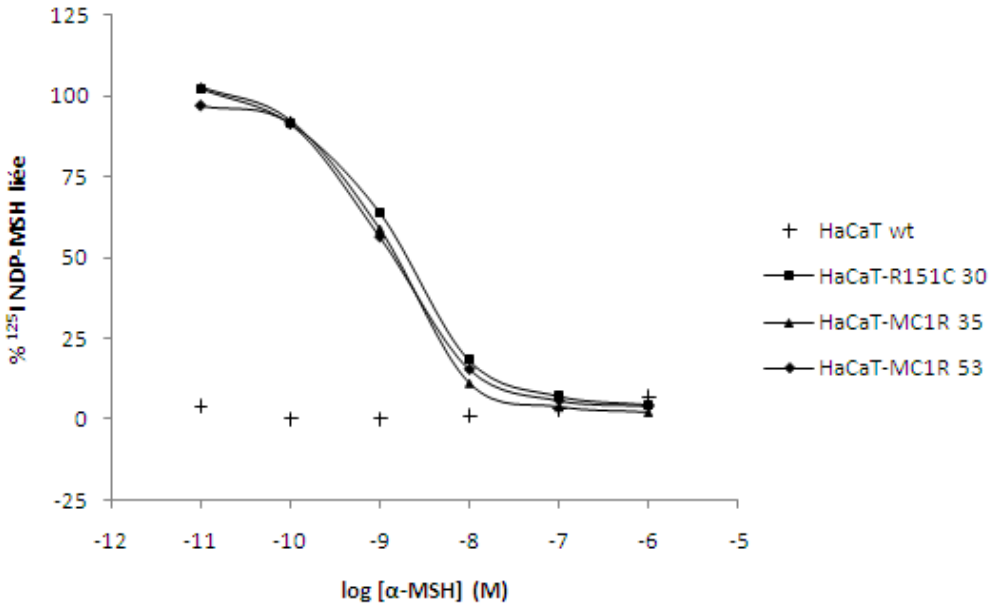


Figure 42 : Déplacement de la [^{125}I]-NDP-MSH par l'α-MSH sur cellules entières de la lignée HaCaT. Les cellules HaCaT wt, HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et HaCaT-R_{151}C (clone 30) sont incubées deux heures à 37°C en présence de 100.000 cpm de [^{125}I]-NDP-MSH et de concentrations croissantes d'α-MSH comprises entre 10^{-11} et 10^{-6} M. Le pourcentage de radioligand lié spécifiquement a été calculé de la façon suivante : % radioligand lié de manière spécifique = [100 × (échantillon–liaison non spécifique)]/(liaison totale–liaison non spécifique). IC_{50} (clone 30) = 1,89 nM ; IC_{50} (clone 35) = 1,26 nM et IC_{50} (clone 53) = 1,43 nM.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de Roberts *et al.* (Roberts *et al.*, 2006). Nous n'observons pas de liaison spécifique de la [^{125}I]-NDP-MSH dans les cellules HaCaT sauvages. Les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et les cellules HaCaT-R_{151}C (clone 30) montrent une cinétique de liaison spécifique et saturable en présence de [^{125}I]-NDP-MSH. De plus, l'affinité du radioligand pour le récepteur MC1R est similaire dans toutes les cellules transfectées avec des IC_{50} de 1,26 nM et de 1,43 nM dans les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53 respectivement) et de 1,89 nM dans les cellules HaCaT-R_{151}C (clone 30).

Par conséquent, la mutation non fonctionnelle R_{151}C du récepteur MC1R n'affecte pas la liaison de l'α-MSH pour le récepteur. Ces résultats sont concordants puisque la mutation R_{151}C affecte la boucle intracellulaire n°2 du récepteur (Garcia-Borron *et al.*, 2005) et n'a donc pas d'effet sur la liaison de l'α-MSH au MC1R.

IV. PRODUCTION D'AMPC INTRACELLULAIRE DANS LES CELLULES HaCaT

IV.1. Couplage fonctionnel

La production d'AMPc constitue l'un des premiers événements consécutifs à la liaison de l'α-MSH au récepteur MC1R. Elle résulte du couplage fonctionnel entre les protéines G hétérotrimériques et le MC1R, suivi de l'activation de l'adénylate cyclase. La mesure de la production d'AMPc permet de vérifier l'activation du récepteur mais pas les fonctions biologiques qui lui sont associées. A ces fins, nous avons mesuré la production d'AMPc intracellulaire dans les cellules HaCaT sauvages, HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et HaCaT-$R_{151}C$ (clones 15 et 30) après stimulation par des concentrations croissantes d'α-MSH comprises entre 10^{-6} et 10^{-11} M. En parallèle, nous avons incubé les cellules HaCaT en présence de forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, qui nous a servi de contrôle positif. Les résultats sont présentés **Figure 43**.

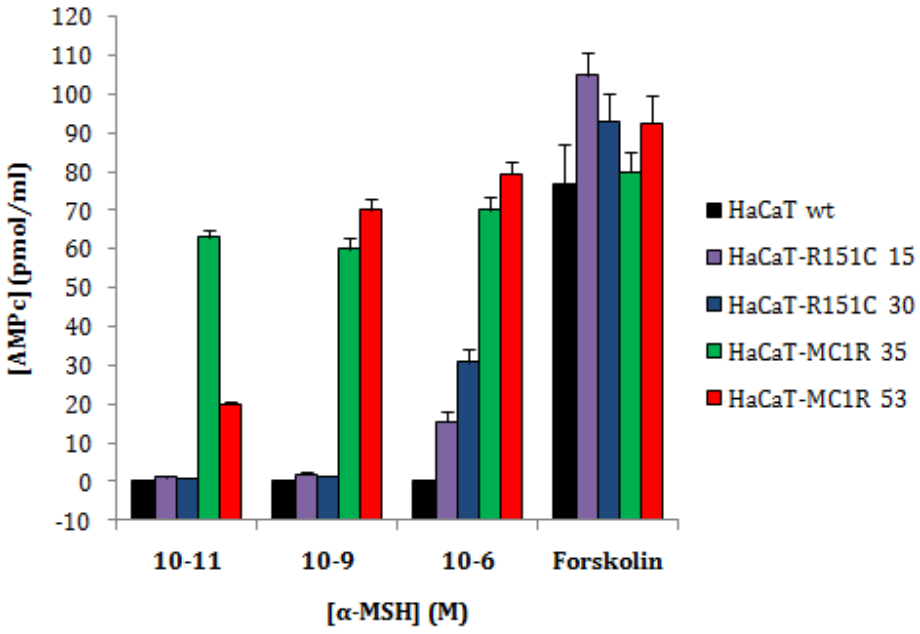


Figure 43 : Couplage fonctionnel des récepteurs MC1R et $R_{151}C$ dans les cellules HaCaT. Les cellules HaCaT wt, HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et HaCaT-$R_{151}C$ (clones 15 et 30) sont incubées 1 heure à 37°C avec des concentrations croissantes d'α-MSH comprises entre 10^{-6} et 10^{-11} M. En parallèle, les cellules HaCaT sont incubées avec de la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase (contrôle positif). La quantité d'AMPc accumulée dans les cellules est mesurée par un kit de quantification RIA (*PerkinElmer Life Science Inc.*).

L'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc dans les cellules HaCaT-MC1R, incubées en présence d'α-MSH, indique que ces cellules expriment les protéines $G\alpha_S$ nécessaires au couplage avec le MC1R et que ce couplage est fonctionnel. La production maximale d'AMPc est obtenue pour des concentrations en α-MSH supérieures ou égales à 10^{-9} M.

Les résultats montrent également que la stimulation des cellules HaCaT sauvages avec l'α-MSH n'entraîne pas de production d'AMPc intracellulaire, quelle que soit la concentration en agoniste utilisée. Concernant les cellules HaCaT-$R_{151}C$, nous avons vu précédemment (**Figure 42**) que la liaison de l'α-MSH sur le récepteur MC1R n'était pas affectée. Par contre, nous n'observons pas de production d'AMPc intracellulaire après stimulation par des concentrations d'α-MSH de 10^{-11} et 10^{-9} M. Pour des concentrations d'α-MSH plus élevées (10^{-6} M), on observe une production d'AMPc intracellulaire plus importante comparé aux cellules HaCaT sauvages mais cette production reste bien inférieure à celle obtenue dans les cellules HaCaT-MC1R.

Par conséquent, la mutation non fonctionnelle $R_{151}C$ affecte le couplage fonctionnel du récepteur MC1R.

IV.2. Activité constitutive du MC1R

Les mélanocytes et les mélanomes en culture expriment un nombre faible de molécules de MC1R avec environ 1.000 sites de liaison à l'α-MSH par cellule (Ghanem *et al.*, 1988; Siegrist *et al.*, 1989). A l'inverse, les cultures primaires de mélanocytes murins expriment plus de 100.000 sites par cellule. Il est généralement admis que cette différence est compensée par une forte affinité du récepteur MC1R pour l'ACTH et l'α-MSH et par une absence de désensibilisation du récepteur après liaison de ces ligands (Mountjoy *et al.*, 1992). Une autre hypothèse consiste en une hyperactivité ou une forte activité constitutive basale du récepteur MC1R. En effet, l'activité constitutive basale est relativement fréquente dans les RCPG (Bond and Ijzerman, 2006; Costa and Cotecchia, 2005; Costa and Herz, 1989; Cotecchia, 2007; Milligan, 2003; Sanchez-Mas *et al.*, 2004).

De plus, certaines données suggèrent que le degré d'activation constitutive du MC1R pourrait jouer un rôle important sur le plan physiologique (Adan, 2006; Garcin, 2007; Garcin *et al.*, 2009; Sanchez-Mas *et al.*, 2004).

Les travaux de thèse de Geneviève Garcin ont mis en évidence une accumulation d'AMPc dans les cellules HaCaT-MC1R, indépendamment de toute stimulation par l'α-MSH. En revanche, les cellules HaCaT-$R_{151}C$ ne présentent pas de production d'AMPc basale (Garcin, 2007; Garcin *et al.*, 2009). Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Sanchez-Mas *et al.* et indiquent une activité constitutive du MC1R dans les cellules HaCaT-MC1R (Sanchez-Mas *et al.*, 2004).

PARTIE 2: LE RECEPTEUR MC1R: UNE ACTION ANTIOXYDANTE CONTRE LES UV ?

Les radicaux libres sont générés en partie par le métabolisme aérobie et l'inflammation. Ils peuvent également entraîner des dommages cellulaires si les mécanismes antioxydants de défense sont submergés (Escobedo *et al.*, 2004; Sander *et al.*, 2004).

Les ERO sont générées dans la peau irradiée et sont impliquées dans toutes les étapes de la carcinogenèse (Chang *et al.*, 2003; F'Guyer *et al.*, 2003; Ichihashi *et al.*, 2003). Parallèlement, la défense antioxydante naturelle est contrée après exposition aux UV. En effet, les UV diminuent le contenu cellulaire en GSH et suppriment l'activité de la SOD et de la catalase dans les cellules normales (Heck *et al.*, 2003; Polte and Tyrrell, 2004). L'irradiation des kératinocytes par les UVB *in vitro* stimule de façon dose-dépendante la production intracellulaire d'H_2O_2 (Peus *et al.*, 1998). De plus, les UVA et les UVB induisent une augmentation des ERO intracellulaire via l'activation du récepteur membranaire à l'EGF (EGFR) et de l'activité NADPH oxydase kératinocytaire (Nox1) (Bae *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2004; Peus *et al.*, 1999; von Montfort *et al.*, 2006).

Le but de cette étude a été d'étudier le rôle du récepteur MC1R sur le stress oxydatif induit par des doses croissantes d'UVB ou d'UVA. Les cellules HaCaT sauvages ont été utilisées comme contrôles négatifs. Nous avons également utilisé deux clones fonctionnels MC1R, le clone 35 et le clone 53, qui ont été caractérisés précédemment sur le plan fonctionnel (cf. partie I des résultats). En parallèle, nous avons comparé ces résultats avec le mutant non fonctionnel $R_{151}C$ (clone 30). Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle du récepteur MC1R sur le stress oxydatif induit par les UVA et les UVB. Dans un second temps, nous avons testé plusieurs molécules antioxydantes connues pour potentialiser l'action du récepteur MC1R et de son agoniste, l'α-MSH sur le stress oxydatif photoinduit.

I. ROLE DU RECEPTEUR MC1R SUR LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UV

I.1. Les UVB induisent un stress oxydatif qui est partiellement inhibé par le récepteur MC1R

Les UVB induisent la production d'H_2O_2 dans les kératinocytes (Katiyar *et al.*, 2001; Peus *et al.*, 1999; Peus *et al.*, 1998). Cette production initie alors la phosphorylation des MAP kinases et l'expression de gènes impliqués dans la carcinogenèse (Katiyar *et al.*, 2001; Peus *et al.*, 1999). L'H_2O_2, générée dans les kératinocytes après exposition aux UVB, stimule la phosphorylation de l'EGFR (Peus *et al.*, 1999).

Dans un premier temps, nous avons vérifié si la production d'ERO intracellulaire était un événement précoce de l'exposition des cellules HaCaT aux UV. Immédiatement après exposition aux UV, une quantité significative d'ERO peut être détectée dans les cellules HaCaT. Nous avons mesuré le stress oxydatif induit par les UVB en utilisant le carboxy-H_2DCF-DA, une sonde connue pour détecter la production d'H_2O_2 intracellulaire (Rezvani *et al.*, 2006). Les cellules ont été exposées à des doses croissantes d'UVB comprises entre 30 et 300 mJ/cm^2. Pour information, une dose de 30 mJ/cm^2 d'UVB correspond à la dose reçue durant 30 secondes d'exposition solaire au mois d'août en Europe (Lebert *et al.*, 2002). Le protocole de marquage des cellules ainsi que leur irradiation est décrit dans la partie Matériels & Méthodes, paragraphes IV et VI. Nous avons réalisé cette étude sur les cellules HaCaT sauvages et sur les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53).

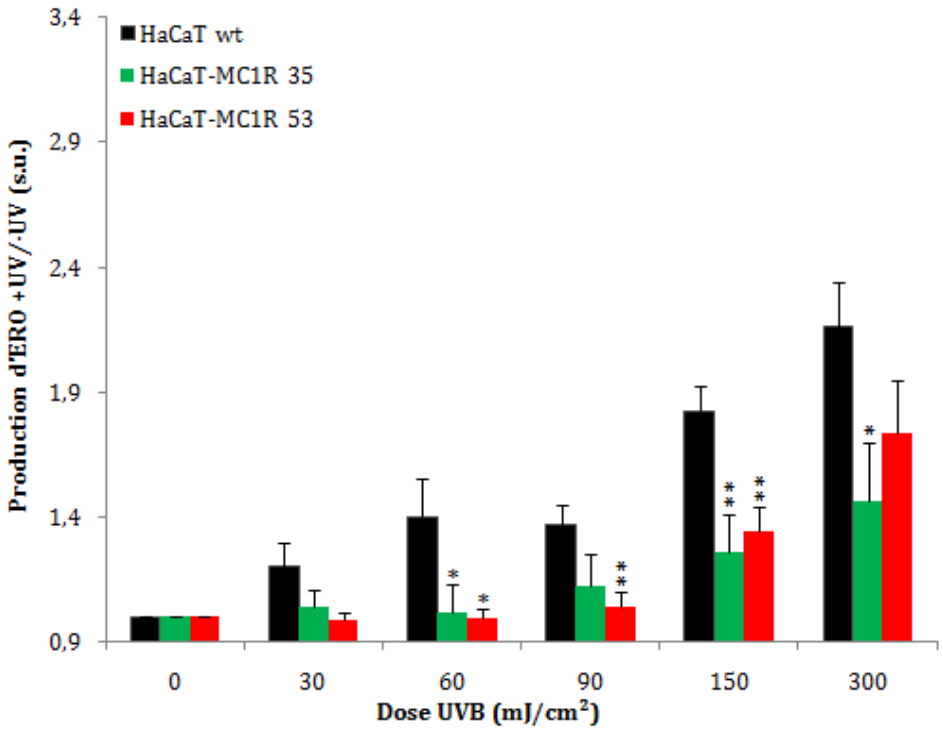


Figure 44 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVB dans les cellules HaCaT. Les cellules HaCaT wt (en noir) et les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) sont exposées à des doses UVB de 30, 60, 90, 150 et 300 mJ/cm². En parallèle, un contrôle non irradié est réalisé (contrôle négatif). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non irradiées et normalisées à 1. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT wt à la même irradiation – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si p<0,05* et à 99% si p<0,01**).

D'après les résultats obtenus (**Figure 44**), nous pouvons observer que les UVB induisent une production d'ERO dose-dépendante. En effet, ils augmentent la production d'ERO basale d'un facteur de 1,2 à 2,2 dans les cellules HaCaT sauvages, le stress oxydatif maximal étant observé pour 300 mJ/cm² d'UVB. La transfection du récepteur MC1R dans les cellules HaCaT atténue la formation des ERO de 13% et 18% à 30 mJ/cm², de 18% et 24% à 90 mJ/cm² et de 31% et 26% à 150 mJ/cm² dans les clones 35 et 53 respectivement (**Tableau 5**). Ces résultats semblent montrer que l'expression d'un récepteur MC1R fonctionnel dans les cellules HaCaT atténue le stress oxydatif induit par les UVB (**Figure 44**).

% inhibition (/HaCaT wt)	Dose UVB (mJ/cm²)				
	30	60	90	150	300
HaCaT-MC1R 35	13 ± 5%	27 ± 8%*	18 ± 9%	31 ± 8%**	32 ± 11%*
HaCaT-MC1R 53	18 ± 3%	29 ± 2%*	24 ± 4%**	26 ± 5%**	20 ± 9%

Tableau 5 : Inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVB dans les cellules HaCaT transfectées par le récepteur MC1R. Les % d'inhibition sont calculés par rapport aux cellules HaCaT wt à la même dose d'UVB.

I.2. Les UVA induisent un stress oxydatif qui est partiellement inhibé par le récepteur MC1R

Les UVA produisent des effets biologiques délétères dans lesquels l'$^1O_2$ semble jouer un rôle majeur (Baier *et al.*, 2007; Miyamoto *et al.*, 2003). Ils sont impliqués dans le développement des cancers cutanés photoinduits (Afaq *et al.*, 2005; Baliga and Katiyar, 2006; Svobodova *et al.*, 2003) et dans le vieillissement prématuré de la peau (Burke, 2010; Krutmann, 2000; Sjerobabski Masnec and Poduje, 2008). Les UVA sont également responsables de photodermatoses cutanées (Hasan *et al.*, 1997).

De nombreuses études ont mis en évidence la génération rapide et transitoire d'ERO en réponse aux UVA dans des kératinocytes humains normaux (Beauchamp and Fridovich, 1970; He *et al.*, 2005; Lawley *et al.*, 2000; Pourzand and Tyrrell, 1999; Tyrrell, 1991; Valencia and Kochevar, 2008).

Nous avons par la suite focalisé ce travail de thèse sur les UVA car la majorité de leurs actions mutagènes et carcinogènes semble être médiée par les ERO (de Gruijl, 2000; Krutmann, 2000; Tobi *et al.*, 2002). Nous avons évalué le stress oxydatif en utilisant des doses croissantes d'UVA comprises entre 0,6 et 9 J/cm² qui correspondent à des doses physiologiques. Cette étude a été menée sur les cellules HaCaT sauvages, sur les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et sur les cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30).

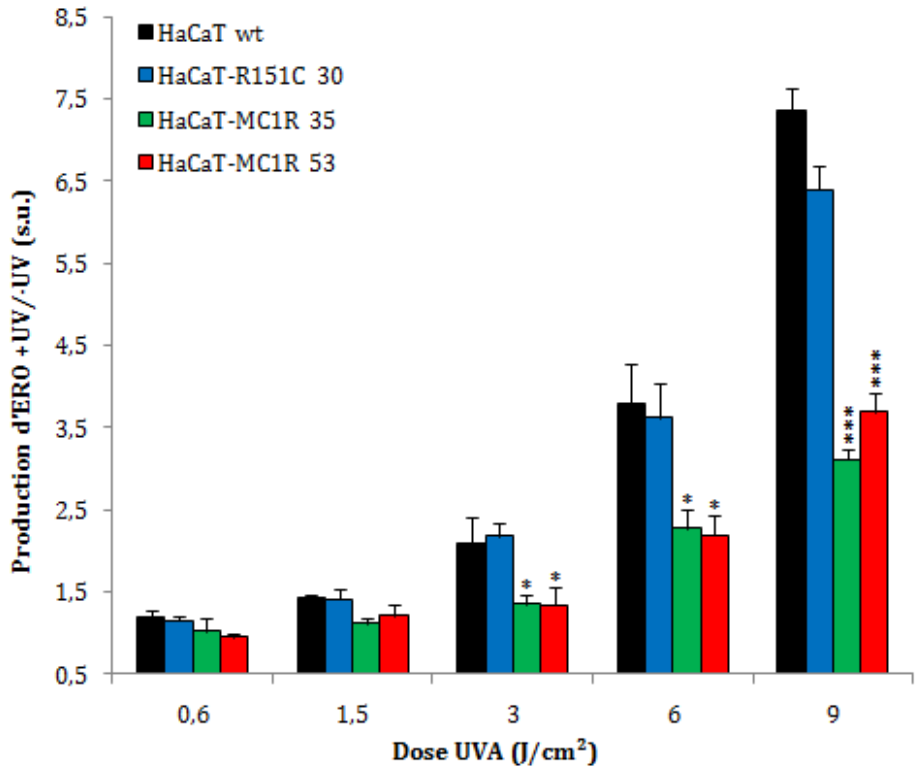


Figure 45 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et les cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30, en bleu) sont exposées à des doses UVA de 0.6, 1.5, 3, 6 et 9 J/cm². En parallèle, un contrôle non irradié est réalisé (contrôle négatif). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non irradiées et normalisées à 1 (données non montrées). Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT wt à la même irradiation – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si p<0,05*, à 99% si p<0,01** et à 99,9% si p<0,001***).

Les UVA induisent une production d'ERO dose-dépendante (**Figure 45**). En effet, ils augmentent la production d'ERO basale d'un facteur de 1,5 à 7,5 dans les cellules HaCaT sauvages, le stress oxydatif maximal étant observé pour 9 J/cm² d'UVA. La transfection du récepteur MC1R dans les cellules HaCaT atténue la formation des ERO de 36% à 3 J/cm², de 40% et 42% à 6 J/cm² et de 58% et 50% à 9 J/cm² dans les clones 35 et 53 respectivement (**Tableau 6**). A toutes doses testées, la production d'ERO par les cellules HaCaT-$R_{151}C$ est similaire à celle produite par les cellules HaCaT sauvages.

% inhibition (/HaCaT wt)	Dose UVA (J/cm²)				
	0,6	**1,5**	**3**	**6**	**9**
HaCaT-MC1R 35	15 ± 6%	22 ± 4%**	36 ± 5%*	40 ± 6%*	58 ± 1%***
HaCaT-MC1R 53	22 ± 4%*	15 ± 9%	36 ± 10%*	42 ± 6%*	50 ± 3%***
HaCaT-$R_{151}C$ 30	-	-	-	-	13± 4 %

Tableau 6 : Inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT transfectées par le récepteur MC1R et le variant non fonctionnel $R_{151}C$. Les % d'inhibition sont calculés par rapport aux cellules HaCaT wt à la même dose d'UVA.

Ces résultats montrent que l'expression d'un récepteur MC1R fonctionnel dans les cellules HaCaT atténue de façon significative le stress oxydatif induit par les UVA. Ces données montrent que le MC1R a une activité constitutive et sont ainsi en accord avec les études précédentes (Garcin, 2007; Garcin *et al.*, 2007; Garcin *et al.*, 2009; Sanchez-Mas *et al.*, 2004).

II. ROLES DE QUELQUES ANTIOXYDANTS POTENTIELS SUR LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA

II.1. L'α-MSH

Des travaux récents ont mis en évidence le rôle de l'α-MSH, un agoniste du récepteur MC1R, comme antioxydant (Haycock *et al.*, 2000; Moustafa *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2009; Valverde *et al.*, 1996). L'α-MSH réagit avec le cofacteur $6BH_4$ en formant un complexe qui protège le $6BH_4$ contre l'oxydation induite par l'H_2O_2 (Moore *et al.*, 1999; Schallreuter *et al.*, 1999). De plus, les travaux d'Haycock *et al.* ont montré que l'α-MSH agissait rapidement via un mécanisme dépendant de l'AMPc afin d'éliminer les ERO générées dans la cellule (Haycock *et al.*, 2000).

II.1.1. L'α-MSH inhibe le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT-MC1R

Nous avons donc évalué les effets de l'α-MSH sur le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT sauvages, HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30). Les cellules ont été préincubées 1 heure avec 1 µM d'α-MSH et ont été exposées à des irradiations UVA comprises entre 0,6 et 9 J/cm². Immédiatement après l'irradiation, la production d'ERO intracellulaire a été quantifiée en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés **Figure 46**.

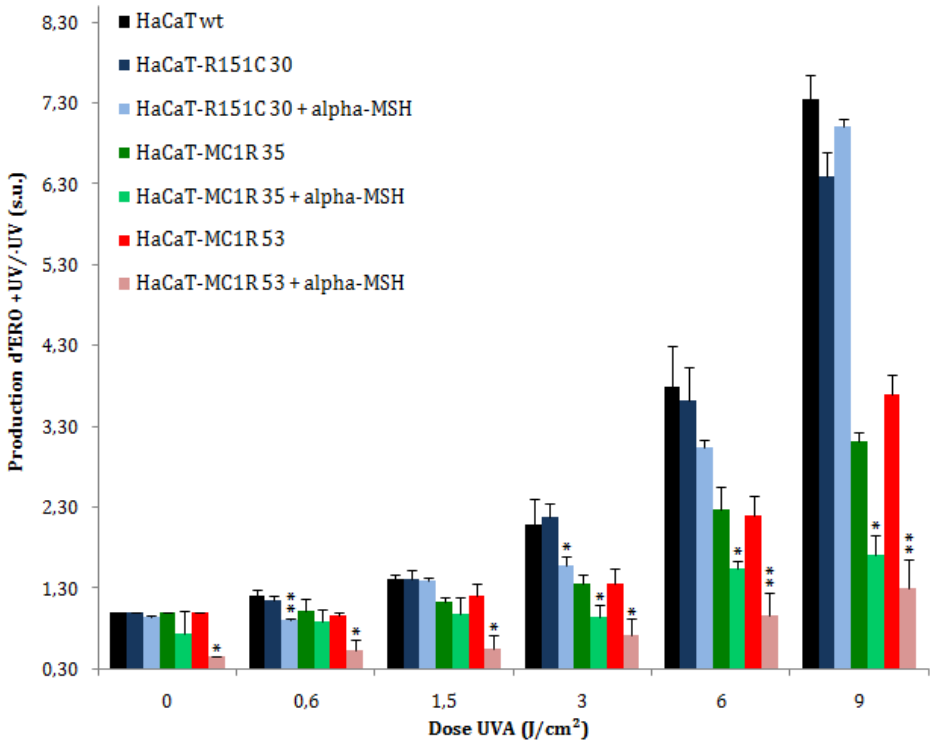


Figure 46 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par l'α-MSH. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et les cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30, en bleu) sont traitées pendant 1 heure avec 1 µM d'α-MSH puis sont exposées à des doses UVA de 0.6, 1.5, 3, 6 et 9 J/cm². En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par l'α-MSH sont réalisés (contrôles négatifs). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non irradiées et non traitées par l'α-MSH qui sont normalisées à 1. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par l'α-MSH – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si $p<0,05$* et à 99% si $p<0,01$**).

Lorsque les cellules HaCaT sauvages et HaCaT-$R_{151}C$ clone 30 sont stimulées par l'α-MSH, nous n'observons pas d'effet sur la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA. Ces résultats sont concordants puisque les cellules HaCaT sauvages n'expriment pas le récepteur MC1R et que la mutation $R_{151}C$ est localisée au niveau de la boucle intracellulaire n°2 rendant ce mutant incapable de stimuler la production d'AMPc (Frandberg *et al.*, 1998; Garcia-Borron *et al.*, 2005). En revanche, l'α-MSH bloque le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53). Après stimulation par l'α-MSH, la production d'ERO intracellulaire diminue de 55% et 66% à 3 J/cm², de 59% et 75% à 6 J/cm² et de 77% et 82% à 9 J/cm² dans les cellules HaCaT-MC1R clones 35 et 53 respectivement (**Tableau 7**).

% inhibition	Dose UVA (J/cm²)					
	0	**0,6**	**1,5**	**3**	**6**	**9**
HaCaT-MC1R 35	26 ± 2%	27 ± 13%	31 ± 15%	55 ± 8%*	59 ± 4%*	77 ± 3%*
HaCaT-MC1R 53	54 ± 1%	57 ± 11%*	61 ± 12%*	66 ± 9%*	75 ± 7%**	82 ± 5%**
HaCaT-$R_{151}C$ 30	-	24 ± 1%**	-	24 ± 6%*	20 ± 2%	-

Tableau 7: Inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par l'α-MSH dans les cellules HaCaT transfectées par le récepteur MC1R et le variant non fonctionnel $R_{151}C$. Les % d'inhibition sont calculés par rapport aux cellules HaCaT wt à la même dose d'UVA.

Ces résultats ainsi que ceux d'Haycock *et al.* (Haycock *et al.*, 2000) semblent donc montrer que l'α-MSH inhibe le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT qui surexpriment un récepteur MC1R fonctionnel.

II.1.2. L'α-MSH inhibe le stress nitrique induit par les UVA dans les cellules HaCaT-MC1R

Nous venons de montrer que l'α-MSH semblait inhiber le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT qui surexpriment un récepteur MC1R fonctionnel. De manière similaire, nous avons étudié l'impact de l'α-MSH sur la production de •NO induite par les UVA dans les cellules HaCaT.

A ces fins, les cellules HaCaT-MC1R clone 53 ont été prétraitées 1 heure par 1 µM d'α-MSH puis ont été exposées à des irradiations UVA comprises entre 0,6 et 9 J/cm². La production de •NO a été quantifiée 1 heure après l'irradiation grâce à une sonde fluorescente spécifique, le DAF-FM diacétate, par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés **Figure 47**.

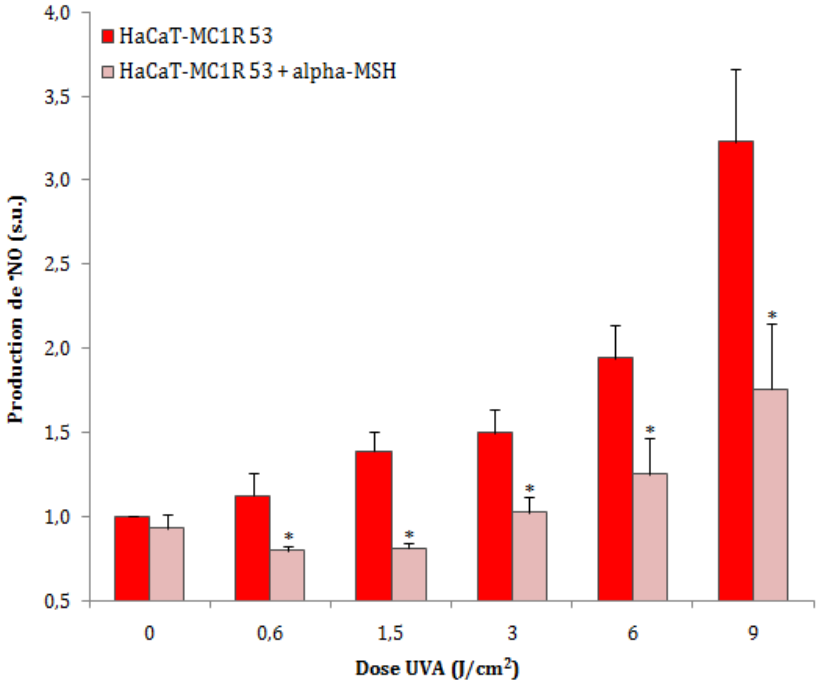


Figure 47 : Production d'oxyde nitrique induite par les UVA dans les cellules HaCaT-MC1R traitées par l'α-MSH. Les cellules HaCaT-MC1R (clone 53, en rouge) sont prétraitées par l'α-MSH (1 µM, 1 heure) puis sont exposées à des doses UVA de 0.6, 1.5, 3, 6 et 9 J/cm². En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par l'α-MSH est réalisé (contrôles négatifs). La production de •NO est déterminée 1 heure après irradiation en mesurant la fluorescence du DAF-FM diacétate (1 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'oxyde nitrique a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non irradiées et non traitées par l'α-MSH qui sont normalisées à 1. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par l'α-MSH – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si p<0,05*).

Nos résultats semblent montrer que pour toutes les doses d'UVA testées, l'α-MSH inhibe de façon significative la production de •NO dans les cellules HaCaT transfectées par un récepteur MC1R fonctionnel.

II.2. Le KPV

La majorité des actions anti-inflammatoires de l'α-MSH semble être due au tripeptide Lys-Pro-Val (KPV) ou peptide de Lipton (Lipton and Catania, 1997) qui correspond aux acides aminés 11 à 13 sur la séquence de l'α-MSH.

Le KPV fait l'objet du paragraphe IV.2.2. de la partie 2 de la synthèse bibliographique de ce mémoire.

II.2.1. Mesure de la cytotoxicité du KPV dans les cellules HaCaT

Nous avons tout d'abord évalué la cytotoxicité du KPV dans les cellules HaCaT sauvages à l'aide d'un test MTT qui est une méthode de numérisation des cellules vivantes (Mosmann, 1983). Le KPV est testé à différentes concentrations dans le milieu de culture des cellules HaCaT sauvages pendant 24 heures. Le protocole de ce test est décrit dans la partie Matériels & Méthodes, paragraphe VIII de ce mémoire.

Le KPV (Lys-Pro-Val-NH_2) que nous avons utilisé au cours de ce projet a été synthétisé au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM, UMR CNRS 5247) de Montpellier. Les résultats sont présentés **Tableau 8**.

Les mesures de densité optique (absorbance) des 6 puits traités avec la même concentration de KPV sont moyennées. Cette moyenne est comparée à la moyenne des mesures obtenues pour les 6 puits témoin (test t de Student – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si $p<0,05$*).

Les viabilités des cellules traitées sont exprimées en pourcentage par rapport au témoin (cellules non traitées) de 100% (DO traité/DO témoin × 100).

	[KPV] (M)							
	0	**10^{12}**	**10^{11}**	**10^{10}**	**10^{9}**	**10^{8}**	**10^{7}**	**10^{6}**
Absorbance moyenne (570 nm)	0,106 ± 0,006	0,084 ± 0,007	0,087 ± 0,010	0,095 ± 0,007	0,102 ± 0,006	0,096 ± 0,007	0,096 ± 0,003	0,099 ± 0,002
% viabilité	**100**	**79***	**82**	**89**	**96**	**90**	**91**	**93**
p (Student)		*0,019*	*0,073*	*0,124*	*0,326*	*0,136*	*0,084*	*0,140*

Tableau 8 : Cytotoxicité du KPV dans les cellules HaCaT sauvages. La cytotoxicité est mesurée après une incubation de 24 heures avec le KPV.

Ce produit ne présente pas de cytotoxicité cellulaire aux concentrations évaluées.

II.2.2. Etude des propriétés de liaison du KPV pour le récepteur MC1R

Les propriétés fonctionnelles des cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et des cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) ont été étudiées par un test de liaison par compétition en présence d'un ligand radiomarqué, la [^{125}I]-NDP-MSH et de concentrations croissantes de KPV. Les cellules HaCaT sauvages sont utilisées comme contrôle négatif (**Figure 48**). Le protocole de cette technique est décrit dans la partie Matériels & Méthodes, paragraphe II de ce mémoire.

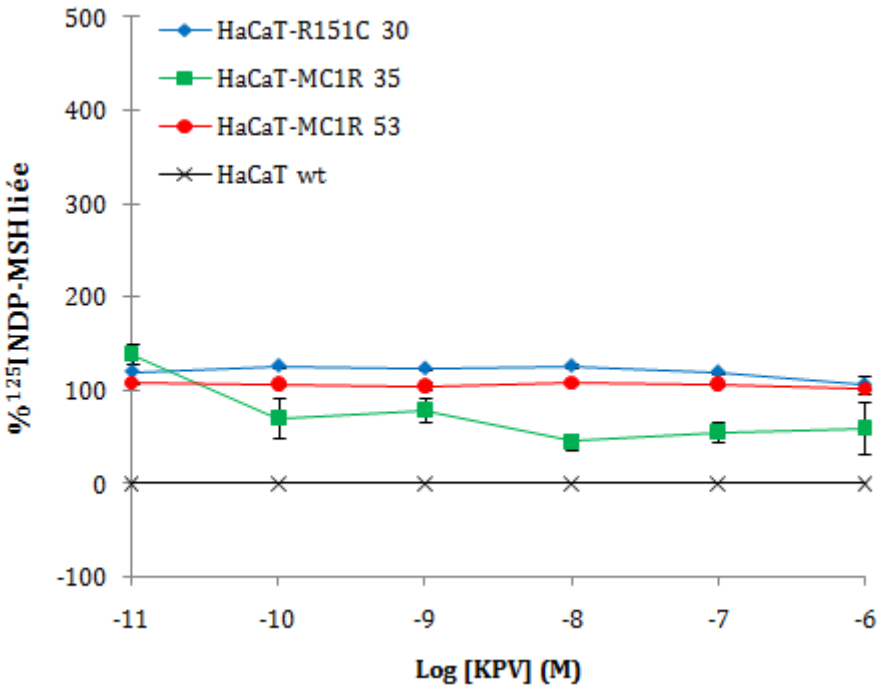


Figure 48 : Déplacement de la [^{125}I]-NDP-MSH par le KPV sur cellules entières de la lignée HaCaT. Les cellules HaCaT wt (en noir), HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et HaCaT-R_{151}C (clone 30, en bleu) sont incubées deux heures à 37°C en présence de 100.000 cpm de [^{125}I]-NDP-MSH et de concentrations croissantes de KPV comprises entre 10^{-11} et 10^{-6} M. Le pourcentage de radioligand lié spécifiquement a été calculé de la façon suivante : % radioligand lié de manière spécifique = [100 × (échantillon–liaison non spécifique)]/(liaison totale–liaison non spécifique).

D'après les résultats obtenus, nous pouvons observer que le KPV ne se lie pas au récepteur MC1R surexprimé dans les cellules HaCaT, que ce soit dans les mutants fonctionnels que dans le variant R_{151}C. Ces résultats sont cohérents puisqu'ils vont dans le sens de ceux publiés par Mandrika *et al.* (Mandrika *et al.*, 2001).

II.2.3. Le KPV inhibe le stress oxydatif induit par les UVA

Il s'agit maintenant d'évaluer le stress oxydatif induit par 9 J/cm^2 d'UVA dans les cellules HaCaT sauvages, HaCaT-MC1R (clone 53) et HaCaT-R_{151}C (clone 30) traitées par 1 µM de KPV pendant 1 heure. Les résultats sont présentés **Figure 49**.

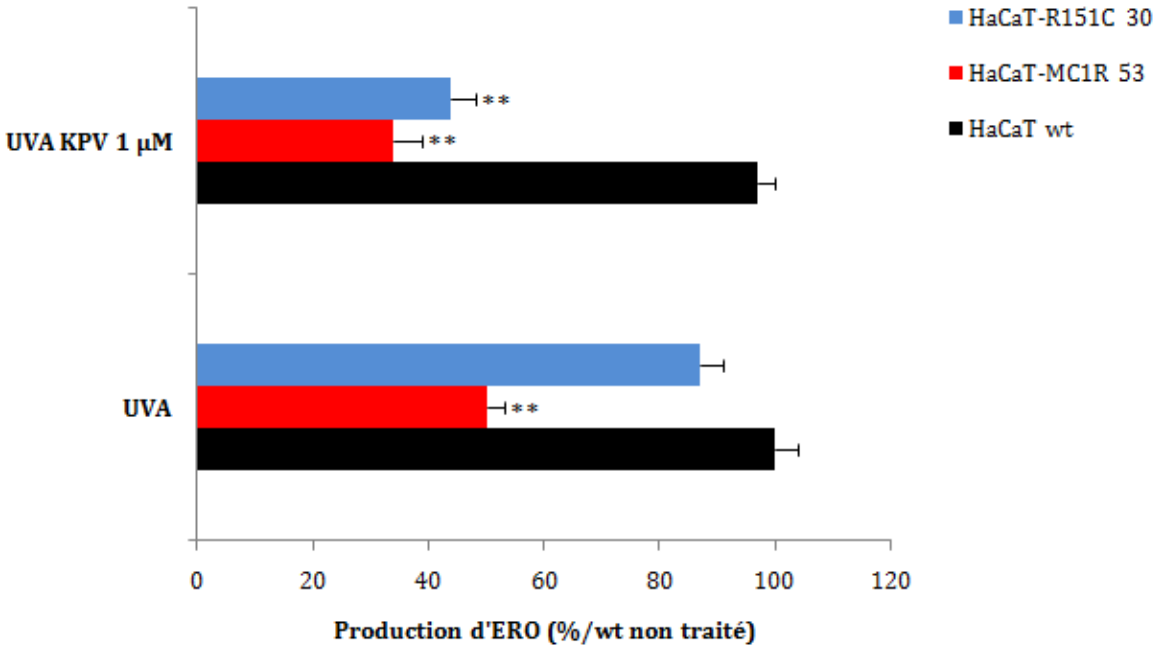


Figure 49 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le KPV. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clone 53, en rouge) et les cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30, en bleu) sont préincubées pendant 1 heure avec 1 µM de KPV puis sont exposées à 9 J/cm² d'UVA. En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par le KPV sont réalisés (contrôles négatifs). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT sauvages non traitées par le KPV qui sont normalisées à 100%. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par le KPV – comparaison des moyennes – différence significative à 99% si p<0,01**).

Le KPV inhibe le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53 ainsi que dans les cellules HaCaT surexprimant le variant non fonctionnel $R_{151}C$. En effet, le KPV atténue la production d'ERO de 66% dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53 et de 56% dans les cellules HaCaT-$R_{151}C$ clone 30. Par contre, le stress oxydatif induit par les UVA n'est pas modulé quand les cellules HaCaT sauvages sont traitées par le KPV.

Ces résultats suggèrent donc que le KPV aurait une action antioxydante contre le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules qui surexpriment le récepteur MC1R qu'il soit fonctionnel ou non. Ces résultats sont cohérents avec ceux publiés par Getting *et al*. qui montraient que le KPV n'induisait pas d'augmentation de l'AMPc intracellulaire et agissait également dans les mutants MC1R non fonctionnels (Getting *et al.*, 2003b).

A l'heure actuelle, les mécanismes d'action du KPV *in vitro* et *in vivo* sont encore peu connus. Les effets anti-inflammatoires du KPV peuvent être partiellement indépendants du récepteur MC1R (Brzoska *et al.*, 2008; Getting *et al.*, 2003b; Kannengiesser *et al.*, 2008). En effet, certains travaux ont montré qu'il n'y avait pas de liaison du KPV sur le récepteur MC1R dans des mélanomes murins B16 (Lyson *et al.*, 1994) et dans des macrophages murins RAW 264.7 surexprimant le récepteur MC1R (Mandrika *et al.*, 2001). Les actions du KPV seraient médiées par sa liaison à un transporteur oligopeptidique couplé aux protons, le PepT1 (Dalmasso *et al.*, 2008). Néanmoins, d'autres auteurs ont montré qu'une partie des activités anti-inflammatoires du KPV pouvait être médiée par un antagonisme du récepteur à l'IL-1β (Getting *et al.*, 2003b).

Dans les cellules gliales, le KPV diminue l'expression du TNF-α et réduit la libération du $^{\bullet}NO$ après stimulation par l'IFN-γ (Galimberti *et al.*, 1999; Lipton *et al.*, 1999). Or, l'expression du récepteur MC1R dans les cellules HaCaT entraîne une inhibition de l'expression du TNF-α induite par les UVB (Garcin, 2007; Garcin *et al.*, 2009). L'ensemble de ces données pourraient expliquer les propriétés antioxydantes du KPV dans les cellules HaCaT-MC1R via l'inhibition du TNF-α.

De plus, les travaux d'Elliott *et al.* ont montré que la transfection du récepteur MC1R dans des cellules CHO entraînait une augmentation significative du Ca^{2+} intracellulaire (Elliott *et al.*, 2004). Or, le KPV augmente le Ca^{2+} intracellulaire dans les cellules NHK et HaCaT mais seulement quand la voie AMPc est inhibée (Elliott *et al.*, 2004). Ces résultats pourraient expliquer en partie l'effet du KPV sur le stress oxydatif induit par les UVA dans le mutant non fonctionnel $R_{151}C$.

II.3. L'acide caféique

L'acide caféique ou acide 3,4-dihydroxycinnamique est une molécule photochimique naturelle présente dans de nombreux légumes, herbes médicinales et plantes (**Figure 50**).

L'acide caféique possède de nombreuses propriétés pharmacologiques incluant des effets antioxydants (Nardini *et al.*, 1997) et anti-inflammatoires (Fesen *et al.*, 1994).

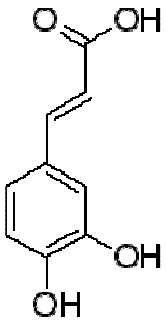


Figure 50 : Structure de l'acide caféique

L'acide caféique protège de manière significative les lymphocytes et les cellules HaCaT contre les effets cytotoxiques induits par une exposition aux UV (Poquet *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2009). De plus, l'acide caféique, en présence d'α-MSH, augmente l'activité tyrosinase et le contenu en mélanine extracellulaire (An *et al.*, 2008) et inhibe la génération d'H_2O_2 à l'origine de l'activation de l'EGFR (Vacaresse *et al.*, 2001).

II.3.1. Mesure de la cytotoxicité de l'acide caféique dans les cellules HaCaT

Nous avons évalué la cytotoxicité de l'acide caféique sur les cellules HaCaT-MC1R clone n°53. L'acide caféique est testé à différentes concentrations dans le milieu de culture des cellules HaCaT-MC1R clone 53 pendant 24 heures. Les résultats sont présentés **Tableau 9**.

Les viabilités des cellules traitées sont exprimées en pourcentage par rapport au témoin (cellules non traitées) de 100% (DO traité/DO témoin × 100). Les mesures de viabilité des 6 puits traités avec la même concentration de produit sont moyennées. Cette moyenne est comparée à la mesure obtenue pour les 6 puits témoin (test t de Student – comparaison des moyennes – différence significative à 99% si $p<0,01$**).

[acide caféique] (µg/ml)									
	0	**0,01**	**0,06**	**0,3**	**1,6**	**8**	**40**	**80**	**160**
Viabilité moyenne (%)	100 ± 3	107 ± 2	109 ± 3	106 ± 1	101 ± 3	101 ± 3	119 ± 4	123 ± 2	97 ± 3
% viabilité	**100**	**107**	**109**	**106**	**101**	**101**	**119****	**123****	**97**
p (Student)		*0,093*	*0,058*	*0,065*	*0,804*	*0,867*	*0,005*	*0,0005*	*0,572*

Tableau 9 : Cytotoxicité de l'acide caféique dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53. La cytotoxicité est mesurée après une incubation de 24 heures avec l'acide caféique.

Ce produit ne présente pas de cytotoxicité cellulaire aux concentrations évaluées. De plus, l'acide caféique semble avoir un effet prolifératif sur les cellules HaCaT-MC1R clone 53 aux concentrations de 40 et 80 µg/ml.

II.3.2. L'acide caféique inhibe le stress oxydatif induit par les UVA

Nous avons évalué le stress oxydatif induit par 9 J/cm^2 d'UVA dans les cellules HaCaT sauvages, HaCaT-MC1R (clone 53) et HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) après un traitement par 50 et 80 µg/ml d'acide caféique pendant 24 heures. Les résultats sont présentés **Figure 51**.

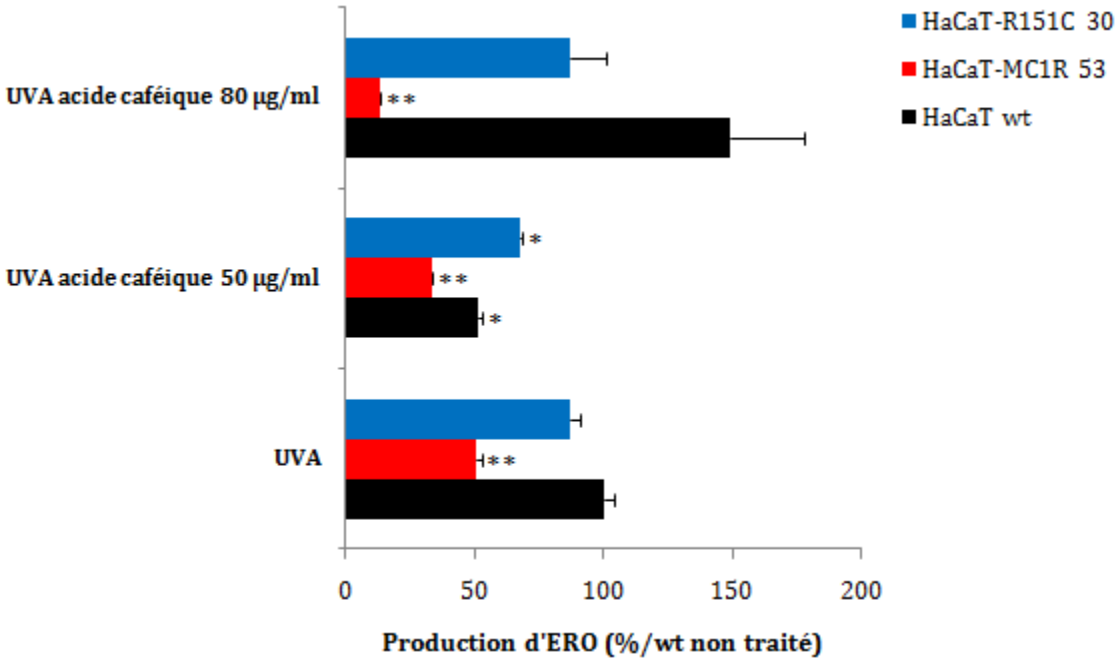


Figure 51 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par l'acide caféique. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clone 53, en rouge) et les cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30, en bleu) sont préincubées pendant 24 heures avec 50 et 80 µg/ml d'acide caféique puis sont exposées à 9 J/cm² d'UVA. En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par l'acide caféique sont réalisés (contrôles négatifs). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT sauvages non traitées par l'acide caféique qui sont normalisées à 100%. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par l'acide caféique – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si $p<0,05$* et à 99% si $p<0,01$**).

L'acide caféique inhibe le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT surexprimant un récepteur MC1R fonctionnel aux deux concentrations testées. En effet, l'acide caféique atténue la production d'ERO de 67% à 50 µg/ml et de 87% à 80 µg/ml. Dans les cellules HaCaT sauvages et dans les cellules HaCaT surexprimant le variant non fonctionnel $R_{151}C$, nous pouvons observer une inhibition de la production d'ERO induite par les UVA quand les cellules sont traitées par 50 µg/ml d'acide caféique. L'acide caféique atténue la production d'ERO de 49% dans les cellules HaCaT sauvages et de 32% dans les cellules HaCaT-$R_{151}C$ clone 30.

En revanche, pour une concentration d'acide caféique plus importante (80 µg/ml), nous n'observons pas de modulation du stress oxydatif induit par les UVA dans ces cellules.

L'acide caféique possède donc une action antioxydante importante et semble protéger les cellules HaCaT contre le stress oxydatif induit par les UVA. De plus, cette action antioxydante semble être augmentée par l'expression d'un récepteur MC1R fonctionnel dans ces cellules et ce, même pour de fortes concentrations en acide caféique. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que l'acide caféique potentialise les actions de l'α-MSH (An *et al.*, 2008).

II.4. La bétuline

II.4.1. Synthèse bibliographique sur la bétuline

La bétuline (lup-20(29)-ène-3β, 28-diol), également connu sous le nom de bétulinol, bétuline et alcool bétulinique, est un triterpène pentacyclique issu du bouleau (**Figure 52**) connu pour posséder des activités anti-inflammatoires (Alakurtti *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2002; Zdzisinska *et al.*, 2003), antioxydantes et anti-tumorales (Alakurtti *et al.*, 2006; Fulda *et al.*, 1999; Pisha *et al.*, 1995; Zuco *et al.*, 2002).

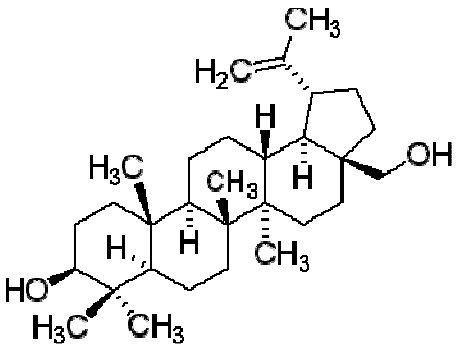


Figure 52 : Structure de la bétuline

II.4.1.1. Activités anti-tumorales

La bétuline possède une forte activité contre certaines tumeurs (Zuco *et al.*, 2002). Ce composé possède un effet cytotoxique sur la croissance des mélanomes B16-F10 *in vivo* lorsqu'il est utilisé en combinaison avec la vincristine. Ces deux composés induisent un arrêt du cycle cellulaire et entraînent l'apoptose des mélanomes (Liu *et al.*, 2004; Sawada *et al.*, 2004). Cette activité pro-apoptotique requiert la production d'ERO, la rupture du potentiel membranaire mitochondrial (Liu *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2003), la libération du cytochrome c (Li *et al.*, 2010) et l'activation des caspases (Wick *et al.*, 1999).

II.4.1.2. Activités anti-inflammatoires

La bétuline possède une activité anti-inflammatoire (Mukherjee *et al.*, 1997) ainsi que des effets analgésiques via l'inhibition de la synthèse des métabolites de l'acide arachidonique (Lin *et al.*, 2009). Les effets anti-inflammatoires de la bétuline sont médiés par l'inhibition de la production de •NO et par l'augmentation des activités des enzymes antioxydantes comme la SOD et la GPx (Lin *et al.*, 2009). De plus, la bétuline inhibe la phospholipase A2 (PLA_2) (Bernard *et al.*, 2001) et module la production d'IL-10, de TNF-α et d'IFN-γ (Alakurtti *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2002).

II.4.1.3. Activités antioxydantes

La bétuline a un effet protecteur contre les radicaux libres et augmente l'activité de la SOD (Lin *et al.*, 2009). De plus, elle réduit l'expression des sous-unités catalytiques Nox4 et $p22^{phox}$ de la NADPH oxydase qui sont associées à une réduction de la production d'ERO (Steinkamp-Fenske *et al.*, 2007).

II.4.1.4. Activités sur le récepteur MC1R

Des études récentes ont montré que le récepteur MC1R était une cible pour la bétuline mais que ce composé ne stimulait pas la production d'AMPc après liaison au récepteur MC1R (Muceniece *et al.*, 2007).

II.4.2. Mesure de la cytotoxicité de la bétuline dans les cellules HaCaT

Comme pour les précédents actifs, nous avons d'abord évalué la cytotoxicité de la bétuline dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53. La bétuline est testée à différentes concentrations dans le milieu de culture des cellules HaCaT-MC1R clone 53 pendant 24 heures. Les résultats sont présentés **Tableau 10**.

	[bétuline] (µg/ml)								
	0	**0,01**	**0,06**	**0,3**	**1,6**	**8**	**40**	**80**	**160**
Absorbance moyenne (570 nm)	0,289 ± 0,016	0,308 ± 0,005	0,288 ± 0,042	0,280 ± 0,052	0,263 ± 0,042	0,170 ± 0,015	0,086 ± 0,02	0,082 ± 0,004	0,039 ± 0,006
% viabilité	**100**	**107**	**100**	**97**	**91**	**59****	**30****	**29****	**13****
p (Student)		*0,051*	*0,967*	*0,705*	*0,221*	*0,000*	*0,000*	*0,000*	*0,000*

Tableau 10 : Cytotoxicité de la bétuline dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53. La cytotoxicité est mesurée après une incubation de 24 heures avec la bétuline.

Ce produit ne présente pas de cytotoxicité cellulaire pour des concentrations de 0,01 et 0,06 µg/ml. Aux concentrations de 0,3 et 1,6 µg/ml de ce produit, la viabilité est de 97% et 91% respectivement, ce qui est acceptable. En revanche, pour des concentrations supérieures à 8 µg/ml, ce produit est fortement cytotoxique.

II.4.3. La bétuline inhibe le stress oxydatif induit par les UVA

Nous avons évalué le stress oxydatif induit par 9 J/cm² d'UVA dans les cellules HaCaT sauvages, HaCaT-MC1R (clone 53) et HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) après un traitement par 1,6 µg/ml de bétuline pendant 24 heures. Les résultats sont présentés **Figure 53**.

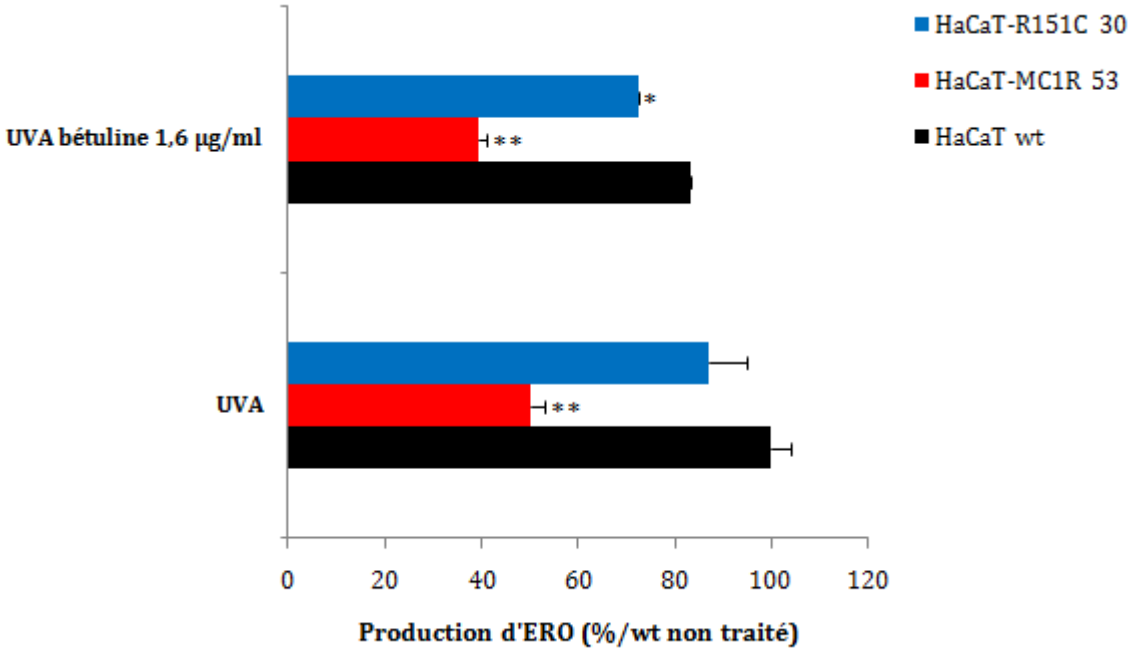


Figure 53 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par la bétuline. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clone 53, en rouge) et les cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30, en bleu) sont préincubées pendant 24 heures avec 1,6 µg/ml de bétuline puis sont exposées à 9 J/cm² d'UVA. En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par la bétuline sont réalisés (contrôles négatifs). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT sauvages non traitées par la bétuline qui sont normalisées à 100%. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par la bétuline – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si p<0,05* et à 99% si p<0,01**).

La bétuline inhibe le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT exprimant un récepteur MC1R fonctionnel. En effet, la bétuline atténue la production d'ERO de 61% quand les cellules sont traitées par 1,6 µg/ml de bétuline.

Dans les cellules HaCaT exprimant le variant non fonctionnel $R_{151}C$, nous pouvons observer une petite inhibition de la production d'ERO induite par les UVA quand les cellules sont traitées par 1,6 µg/ml de bétuline. La bétuline atténue la production d'ERO de 28% dans ces cellules. En revanche, le stress oxydatif induit par les UVA n'est pas modulé de manière significative quand les cellules HaCaT sauvages sont traitées par la bétuline.

La bétuline possède donc une action antioxydante importante et semble protéger les cellules HaCaT qui expriment le récepteur MC1R contre le stress oxydatif induit par les UVA. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le récepteur MC1R est une cible pour la bétuline (Muceniece *et al.*, 2007). Les travaux de Muceniece *et al.* ont également montré que la bétuline était incapable de stimuler la production d'AMPc intracellulaire (Muceniece *et al.*, 2007) comme c'est le cas pour le KPV (cf. paragraphe II.2.3). Par conséquent, nous pouvons penser que les mécanismes d'action de la bétuline et du KPV peuvent être similaires. La bétuline pourrait exercer ses actions antioxydantes indépendamment de la voie AMPc mais par d'autres mécanismes comme la voie du Ca^{2+} intracellulaire. Peu d'études ont été réalisées concernant le lien entre la bétuline et la libération du Ca^{2+} intracellulaire, à l'exception de celle de Chou *et al.* en 2000. Ces auteurs ont mis en évidence une augmentation de la production de Ca^{2+} intracellulaire en réponse à l'acide bétulinique dans des cellules rénales de chien MDCK (Chou *et al.*, 2000).

II.5. Le Médiacalm

Le Médiacalm est un actif riche en composés hydroxybenzoïques de la racine *Boerhavia diffusa* commercialisé par Silab. Ce composé permet de limiter l'amplification de la réaction inflammatoire en réduisant la libération de médiateurs pro-inflammatoires comme le NF-κB et la PGE_2 (Mehrotra *et al.*, 2002; Pandey *et al.*, 2005). De plus, testé à 1%, le Médiacalm permet de stimuler de 173% la synthèse d'α-MSH.

II.5.1. Mesure de la cytotoxicité du Médiacalm dans les cellules HaCaT

Comme pour les précédents actifs, nous avons d'abord évalué la cytotoxicité du Médiacalm dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53. Le Médiacalm a été testé à différentes concentrations dans le milieu de culture des cellules HaCaT-MC1R clone 53 pendant 24 heures. Les résultats sont présentés **Tableau 11**.

	[Médiacalm] (%)								
	0	**0,0008**	**0,004**	**0,02**	**0,1**	**0,5**	**2**	**5**	**10**
Viabilité moyenne (%)	100 ± 2	102 ± 2	104 ± 4	108 ± 3	88 ± 10	98 ± 3	88 ± 1	65 ± 2	48 ± 2
% viabilité	**100**	**102**	**104**	**108***	**88**	**98**	**88**	**65****	**48****
p (Student)		*0,468*	*0,493*	*0,040*	*0,377*	*0,286*	*0,006*	*0,000*	*0,000*

Tableau 11 : Cytotoxicité du Médiacalm dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53. La cytotoxicité est mesurée après une incubation de 24 heures avec le Médiacalm.

Ce produit ne présente pas de cytotoxicité cellulaire aux concentrations de 0,0008%, 0,004% et 0,02%. Aux concentrations de 0,1%, 0,5% et 2%, la viabilité est de 88%, 98% et 88% respectivement, ce qui est acceptable. En revanche, pour des concentrations de 5% et 10%, ce produit devient cytotoxique.

II.5.2. Le Médiacalm inhibe le stress oxydatif induit par les UVA

Nous avons évalué le stress oxydatif induit par 9 J/cm^2 d'UVA dans les cellules HaCaT sauvages, HaCaT-MC1R (clone 53) et HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) après un traitement par du Médiacalm à 0,1% et 0,5% pendant 24 heures. Les résultats sont présentés **Figure 54**.

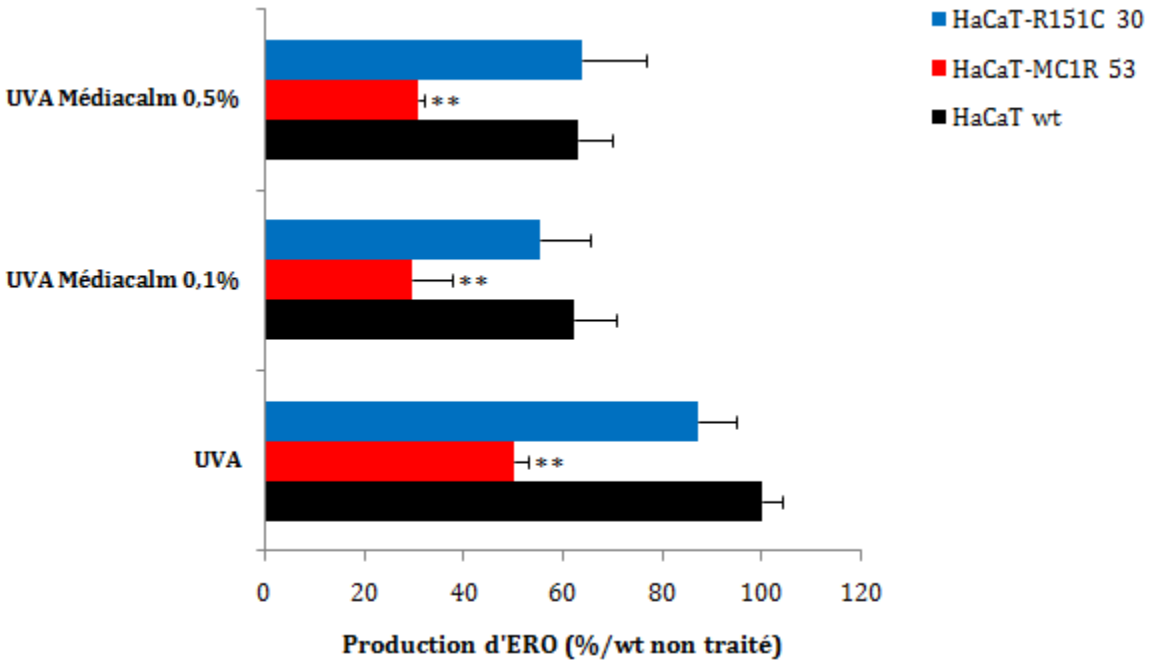


Figure 54 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le Médiacalm. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clone 53, en rouge) et les cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30, en bleu) sont préincubées pendant 24 heures avec 0,1% et 0,5% de Médiacalm puis sont exposées à 9 J/cm² d'UVA. En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par le Médiacalm sont réalisés (contrôles négatifs). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT sauvages non traitées par le Médiacalm qui sont normalisées à 100%. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par le Médiacalm – comparaison des moyennes – différence significative à 99% si p<0,01**).

Le Médiacalm inhibe le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT exprimant un récepteur MC1R fonctionnel aux deux concentrations testées. En effet, le Médiacalm diminue la production d'ERO de 70% à 0,1% et de 69% à 0,5%. En revanche, le stress oxydatif induit par les UVA n'est pas modulé de manière significative quand les cellules HaCaT sauvages et celles exprimant le variant non fonctionnel $R_{151}C$ sont traitées par le Médiacalm.

Le Médiacalm possède donc une action antioxydante importante et semble protéger les cellules HaCaT qui expriment un récepteur MC1R fonctionnel contre le stress oxydatif induit par les UVA. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le Médiacalm stimule la production d'α-MSH.

PARTIE 3 : LE RECEPTEUR MC1R INHIBE LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA PAR DES MECANISMES DEPENDANTS DE L'AMPc ET DE L'EGFR

I. ROLE DE LA MITOCHONDRIE SUR LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA

Les kératinocytes sont directement exposés à un environnement pro-oxidatif et sont particulièrement vulnérables aux dommages causés par les ERO (Thiele *et al.*, 1997). La mitochondrie est étroitement impliquée dans l'apoptose et le déclenchement du processus de différenciation kératinocytaire (Allombert-Blaise *et al.*, 2003; Polakowska *et al.*, 1994; Tamiji *et al.*, 2005). En 2007, Hornig-Do *et al.* ont montré que les kératinocytes utilisaient la chaîne respiratoire mitochondriale non seulement pour la synthèse d'ATP mais également pour l'accumulation d'$O_2^{\bullet-}$ (Hornig-Do *et al.*, 2007). Le faible taux de Mn-SOD dans les kératinocytes semble expliquer pourquoi l'$O_2^{\bullet-}$ n'est pas détoxifié de manière efficace (Hornig-Do *et al.*, 2007).

La mitochondrie est, de façon quantitative, la principale source d'ERO dans la cellule (Cadenas and Davies, 2000). L'$O_2^{\bullet-}$ est produit dans la matrice mitochondriale par le complexe I ou NADH ubiquinone oxydoréductase et par le complexe III ou ubiquinone cytochrome c oxydoréductase (Chen *et al.*, 2003). Des travaux récents ont mis en évidence que l'activation de la cascade AMPc inhibait l'accumulation de l'H_2O_2 et l'activité du complexe I (Bellomo *et al.*, 2006).

La mitochondrie et la famille Nox des NADPH oxydases sont les deux sources majeures de production d'ERO dans la cellule (Fleury *et al.*, 2002; Lambeth, 2004). La mitochondrie génère des ERO comme sous-produits de la respiration et des inhibiteurs de la chaîne respiratoire, comme la roténone ou le KCN, atténuent la production d'ERO dans de nombreux types cellulaires (Felty *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2005). L'$O_2^{\bullet-}$ mitochondrial est généré comme sous-produit de la phosphorylation oxydative.

Environ 1 à 3% de l'O_2 mitochondrial consommé n'est pas complètement réduit ; les électrons libres peuvent alors interagir rapidement avec l'O_2 moléculaire et former de l'$O_2^{\bullet-}$, l'ERO majoritaire dans la mitochondrie (Batandier *et al.*, 2002; Gauuan *et al.*, 2002; Kudin *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2002). Une étude récente a mis en évidence un lien entre la mitochondrie et Nox1 pour la production d'ERO dans des cellules humaines embryonnaires rénales 293T (Lee *et al.*, 2006).

Afin de mettre en évidence un rôle potentiel de la mitochondrie dans la génération d'ERO, une méthode de détection de la génération d'$O_2^{\bullet-}$ mitochondriale a été mise en place (Gomes *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2006; Soh, 2006). Un nouveau fluorophore, le MitoSox, a été récemment introduit pour la détection sélective d'$O_2^{\bullet-}$ dans la mitochondrie des cellules vivantes (Robinson *et al.*, 2006). Ce fluorophore a été validé dans plusieurs types cellulaires incluant des oligodendrocytes (Robinson *et al.*, 2006), des cellules rétiniennes (Lieven *et al.*, 2006), des neurones (Abramov *et al.*, 2007; Zimmerman *et al.*, 2007) et des cardiomyocytes (Fauconnier *et al.*, 2007).

I.1. L'antimycine A induit un stress oxydatif mitochondrial dans les cellules HaCaT

Le fluorophore MitoSox n'a jamais été testé sur des lignées kératinocytaires. Par conséquent, nous avons voulu tout d'abord mesurer la production d'$O_2^{\bullet-}$ dans notre modèle cellulaire HaCaT après stimulation du stress oxydatif mitochondrial par l'antimycine A. L'antimycine A est un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale connu pour induire la production d'$O_2^{\bullet-}$. Les résultats sont présentés **Figure 55**.

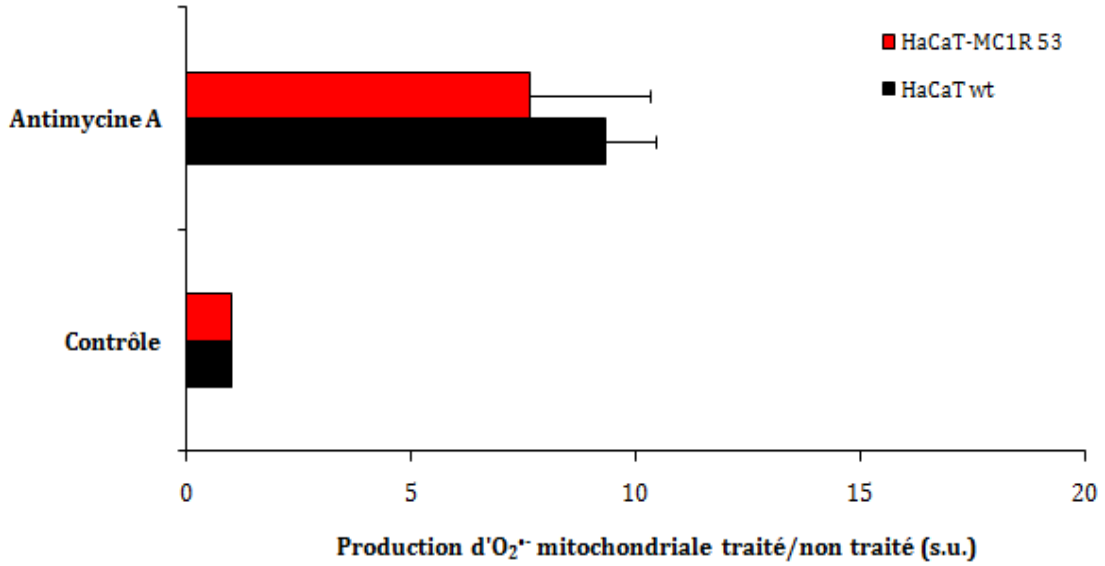


Figure 55 : Mesure de la production d'ERO mitochondriale induite par l'antimycine A dans les cellules HaCaT. Les cellules HaCaT wt (en noir) et les cellules HaCaT-MC1R (clone 53, en rouge) sont traitées par l'antimycine A (50 µM, 1 heure). En parallèle, un témoin non traité par l'antimycine A est également utilisé (contrôle négatif). La production d'ERO mitochondriale est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du MitoSox (5 µM, 10 minutes) par cytométrie en flux. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO mitochondriale a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non traitées par l'antimycine A qui sont normalisées à 1. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes.

En présence d'antimycine A, on observe une forte production d'$O_2^{\bullet-}$ dans les cellules HaCaT sauvages et dans les cellules HaCaT-MC1R (clone 53). En effet, l'antimycine A augmente la production d'ERO mitochondriale d'un facteur de 9,32 dans les cellules HaCaT sauvages et d'un facteur de 7,66 dans les cellules HaCaT-MC1R (clone 53), suggérant que l'antimycine A induit bien un stress oxydatif mitochondrial dans notre lignée kératinocytaire HaCaT. Une possible limitation de la détection de la production d'$O_2^{\bullet-}$ mitochondriale par le MitoSox est qu'il peut se lier à l'ADN nucléaire après oxydation (Mukhopadhyay *et al.*, 2007b).

Nous avons donc montré que la sonde de mesure des ERO mitochondriaux, le MitoSox, peut être utilisée dans notre modèle cellulaire HaCaT.

I.2. Le stress oxydatif mitochondrial n'est pas affecté par l'expression d'un récepteur MC1R fonctionnel dans les cellules HaCaT

Nous avons ensuite voulu évaluer l'importance du stress oxydatif mitochondrial dans les suites immédiates d'une exposition aux UVA avec des doses de 3 et 9 J/cm² d'UVA. Immédiatement après l'irradiation, les cellules ont été marquées avec le MitoSox (Kudin *et al.*, 2004). Les résultats sont présentés **Figure 56**.

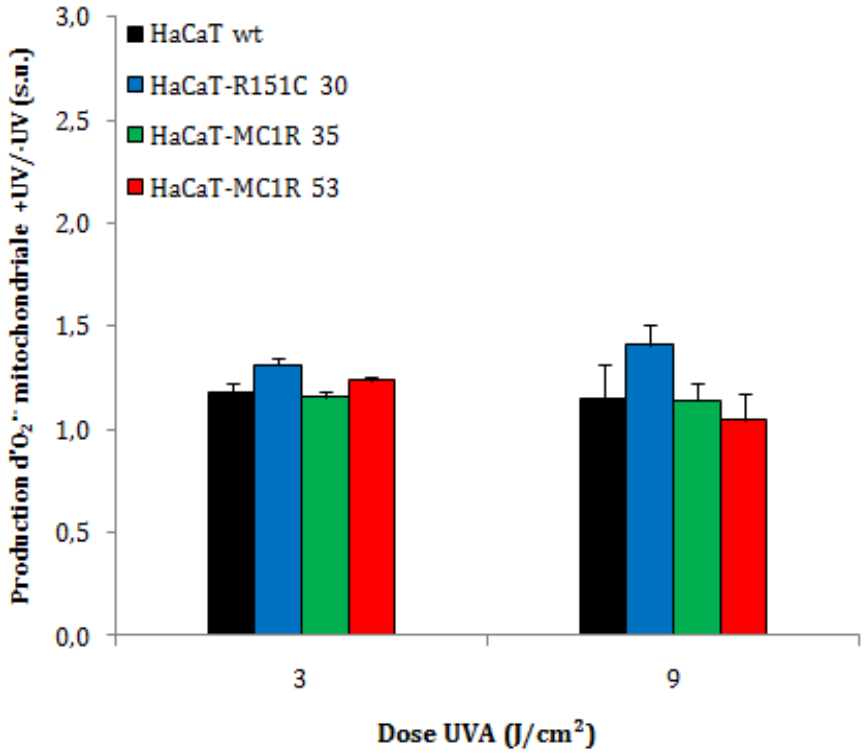


Figure 56 : Mesure de la production d'ERO mitochondriale induite par les UVA dans les cellules HaCaT. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et les cellules HaCaT-R_{151}C (clone 30, en bleu) sont exposées à des doses UVA de 3 et 9 J/cm². En parallèle, un contrôle non irradié est réalisé (contrôle négatif, données non montrées). La production d'ERO mitochondriale est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du MitoSox (5 µM, 10 minutes) par cytométrie en flux. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO mitochondriale a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non irradiées qui sont normalisées à 1 (données non montrées). Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes.

Nos résultats montrent que les UVA n'ont pas d'effet sur la fluorescence du MitoSox dans toutes les cellules HaCaT étudiées (**Figure 56**). Ces résultats sont en accord avec ceux de Schroeder *et al.* qui ont montré que la production d'ERO mitochondriale n'était pas affectée par les UVA dans des fibroblastes cutanés humains (Schroeder *et al.*, 2007).

Ainsi, immédiatemment après exposition aux UVA, la production d'ERO mitochondriale dans les cellules HaCaT n'est pas affectée par l'expression d'un récepteur MC1R fonctionnel.

II. ROLE DE LA NADPH OXYDASE SUR LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA

L'autre source principale de la production des ERO dans la cellule est le système enzymatique appelé NADPH oxydase (cf. partie 3 de la synthèse bibliographique). Ce complexe enzymatique catalyse la réduction de O_2 en $O_2^{\bullet -}$ en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons (Lambeth, 2004). Ce système enzymatique est composé de sous-unités membranaires (gp91^{phox}/Nox2 et p22^{phox}) et de sous-unités cytosoliques (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} et Rac1) qui s'assemblent pour former l'enzyme active (Babior *et al.*, 2002).

Les kératinocytes humains normaux expriment la sous-unité catalytique gp91^{phox}/Nox2 ainsi que son homologue, Nox1 (Chamulitrat *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005; Valencia and Kochevar, 2006; Valencia *et al.*, 2006). Valencia *et al.* ont montré que l'irradiation par les UVA entraînait la formation d'ERO dans les kératinocytes humains normaux via un mécanisme dépendant du système NADPH oxydase et impliquant la sous-unité Nox1 (Valencia and Kochevar, 2008).

II.1. L'apocynine inhibe le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT qui ne surexpriment pas un récepteur MC1R fonctionnel

Nous avons voulu évaluer le rôle de la NADPH oxydase en utilisant un inhibiteur, l'apocynine, qui supprime la translocation des sous-unités cytoplasmiques $p47^{phox}$ et $gp91^{phox}$ (Stolk *et al.*, 1994; Touyz *et al.*, 2002).

Les cellules ont été traitées 1 heure avec 10 µM d'apocynine et ont été exposées à des irradiations UVA comprises entre 3 et 9 J/cm². Immédiatement après l'irradiation, la production d'ERO intracellulaire a été quantifiée en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés **Figure 57**.

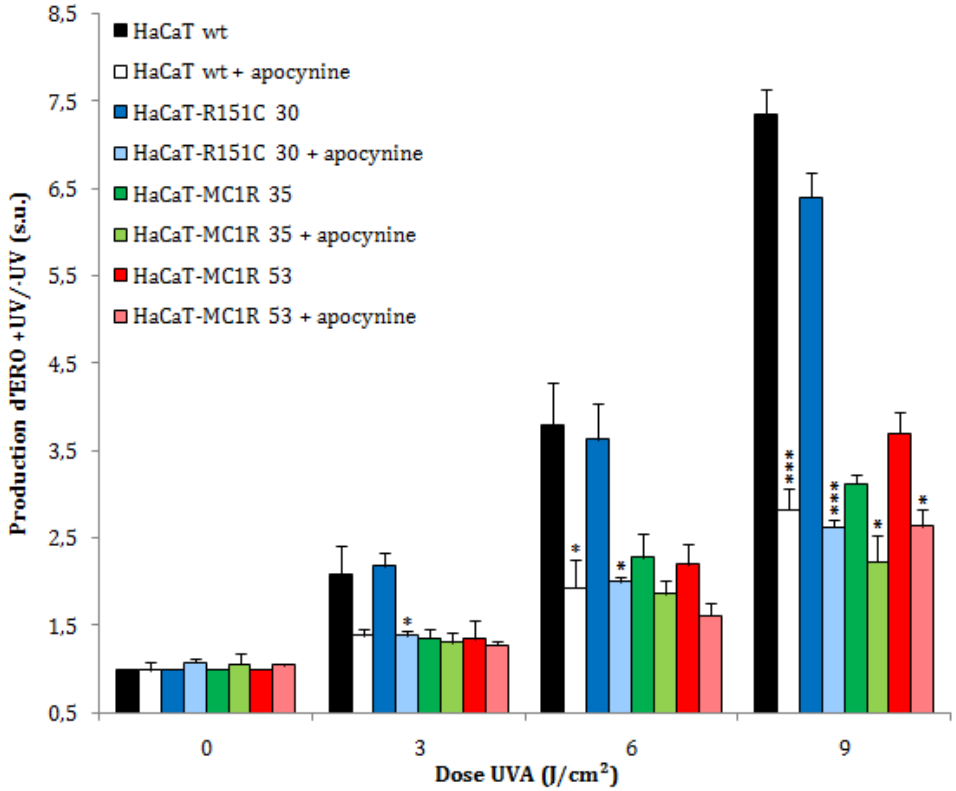


Figure 57 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par l'apocynine. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et les cellules HaCaT-R_{151}C (clone 30, en bleu) sont traitées pendant 1 heure avec 10 µM d'apocynine puis sont exposées à des doses UVA de 3, 6 et 9 J/cm². En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par l'apocynine sont réalisés (contrôles négatifs). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non irradiées et non traitées par l'apocynine qui sont normalisées à 1. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par l'apocynine – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si p<0,05* et à 99,9% si p<0,001***).

L'apocynine bloque le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT sauvages et HaCaT-R_{151}C (clone 30). Après stimulation par l'apocynine, la production d'ERO intracellulaire diminue de 34% et 37% à 3 J/cm², de 49% et 45% à 6 J/cm² et de 62% et 59% à 9 J/cm² dans les cellules HaCaT sauvages et HaCaT-R_{151}C (clone 30) respectivement (**Tableau 12**).

% inhibition	Dose UVA (J/cm²)		
	3	6	9
HaCaT wt	34 ± 4%	49 ± 9%*	62 ± 4%***
HaCaT-MC1R 35	-	18 ± 7%	29 ± 9%*
HaCaT-MC1R 53	-	26 ± 6%	28 ± 5%*
HaCaT-$R_{151}C$ 30	37 ± 3%*	45 ± 2%*	59 ± 1%***

Tableau 12: Inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par l'apocynine dans les cellules HaCaT. Les % d'inhibition sont calculés par rapport aux cellules HaCaT non traitées par l'apocynine et à la même dose d'UVA.

Nous pouvons observer que lorsque les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) sont stimulées par l'apocynine, la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA est peu modulée (**Figure 57**). Il semblerait donc que le stress oxydatif induit par les UVA dans notre modèle HaCaT ait pour origine majeure le système NADPH oxydase. Cette hypothèse est fortement plausible puisque des travaux récents ont mis en évidence que les UVA stimulaient la production d'ERO intracellulaire dans les kératinocytes via la sous-unité Nox1 de la NADPH oxydase (Valencia and Kochevar, 2008).

Ces résultats suggèrent que le système NADPH oxydase pourrait jouer un rôle important dans le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT. De plus, le récepteur MC1R pourrait exercer son rôle d'antioxydant en agissant sur le système NADPH oxydase.

II.2. Le récepteur MC1R inhibe le stress oxydatif via un mécanisme dépendant de l'AMPc

De nombreux travaux ont montré l'implication de la production d'AMPc intracellulaire et de l'activation de son médiateur, la PKA sur la régulation négative de la production d'ERO intracellulaire dans les phagocytes (Crawford *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2005; Simchowitz *et al.*, 1980). Récemment, Kim *et al.* ont identifié un nouveau mécanisme de régulation négative de la production d'ERO intracellulaire dépendante de Nox1. Cette régulation implique la phosphorylation de la sous-unité activatrice de Nox1, NoxA1, par la PKA (Kim *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que des hormones ou des agents capables de stimuler la production d'AMPc et par conséquent, l'activation de la PKA peuvent reproduire cette régulation négative du stress oxydatif dans les cellules.

II.2.1. L'H-89 lève l'inhibition du MC1R sur le stress oxydatif induit par les UVA

L'H-89 ou N-[2-((p-bromocinnamyl) amino) éthyl]-5-isoquinolinesulfonamide (**Figure 58**) est un inhibiteur spécifique de la PKA (Ki=48 nM) (Lochner and Moolman, 2006). L'H-89 inhibe également, à fortes concentrations, la CaM kinase (Ki=29,7 µM), la caséine kinase I (Ki=38,3 µM) et la PKC (Ki=31,7 µM).

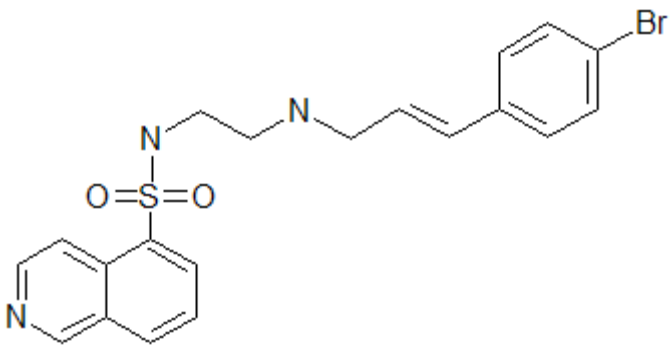


Figure 58 : Structure de l'H-89 dihydrochloride

II.2.1.1. Mesure de la cytotoxicité de l'H-89 dans les cellules HaCaT

Nous avons tout d'abord évalué la cytotoxicité de l'H-89 dans les cellules HaCaT sauvages et HaCaT-MC1R (clone 53). L'H-89 est testé pendant 24 heures à différentes concentrations comprises entre 0,05 et 50 µM dans le milieu de culture des cellules ce qui correspond à 1 et à 1000 fois le Ki de la PKA. Ces concentrations ne sont pas suffisantes pour inhiber d'autres kinases. Les résultats sont présentés **Figure 59**.

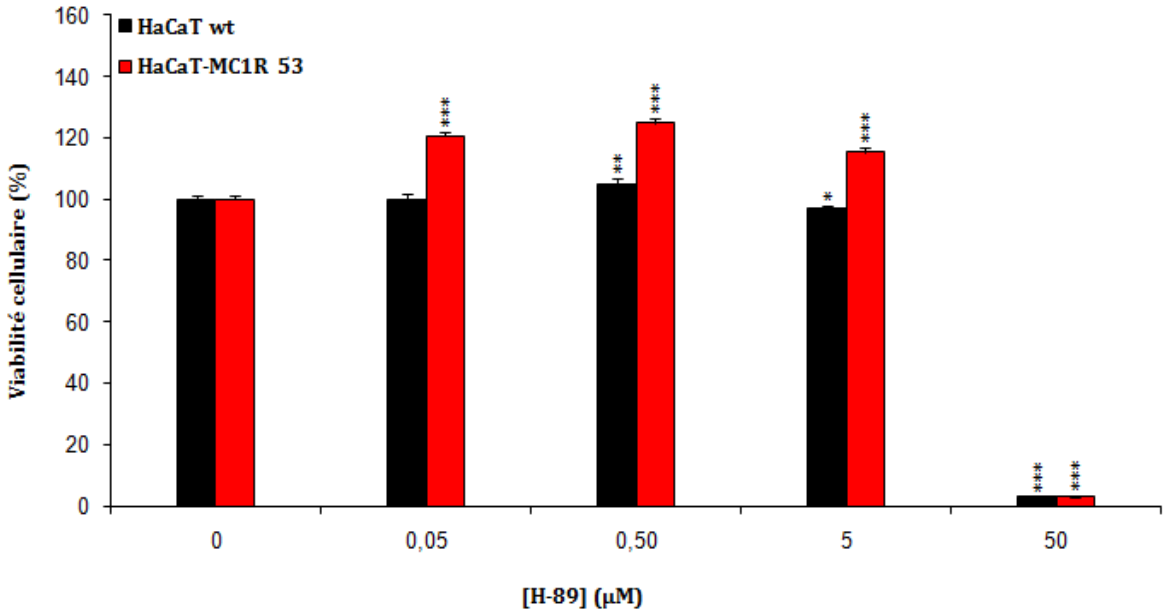


Figure 59 : Mesure de la cytotoxicité de l'H-89 dans les cellules HaCaT. Les cellules HaCaT wt (en noir) et HaCaT-MC1R (clone 53, en rouge) sont traitées pendant 24 heures par des concentrations d'H-89 de 0.05, 0.5, 5 et 50 µM. En parallèle, un contrôle non traité par l'H-89 est également utilisé. La cytotoxicité est ensuite mesurée à l'aide d'un test MTT. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de six réplicats (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par l'H-89 – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si p<0,05*, à 99% si p<0,01** et à 99,9% si p<0,001***).

Ce produit présente une cytotoxicité cellulaire à partir d'une concentration de 50 µM. Par contre, pour des concentrations comprises entre 0,05 et 5 µM, l'H-89 semble avoir un effet prolifératif sur les cellules HaCaT surexprimant le récepteur MC1R. Pour la suite des expériences, nous avons choisi de travailler avec une concentration d'H-89 de 5 µM.

II.2.1.2. Mesure du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par l'H-89

Les cellules ont été traitées par 5 µM d'H-89 pendant 1 heure et ont été irradiées par 9 J/cm² d'UVA. Immédiatement après l'irradiation, la production d'ERO intracellulaire a été quantifiée en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés **Figure 60**.

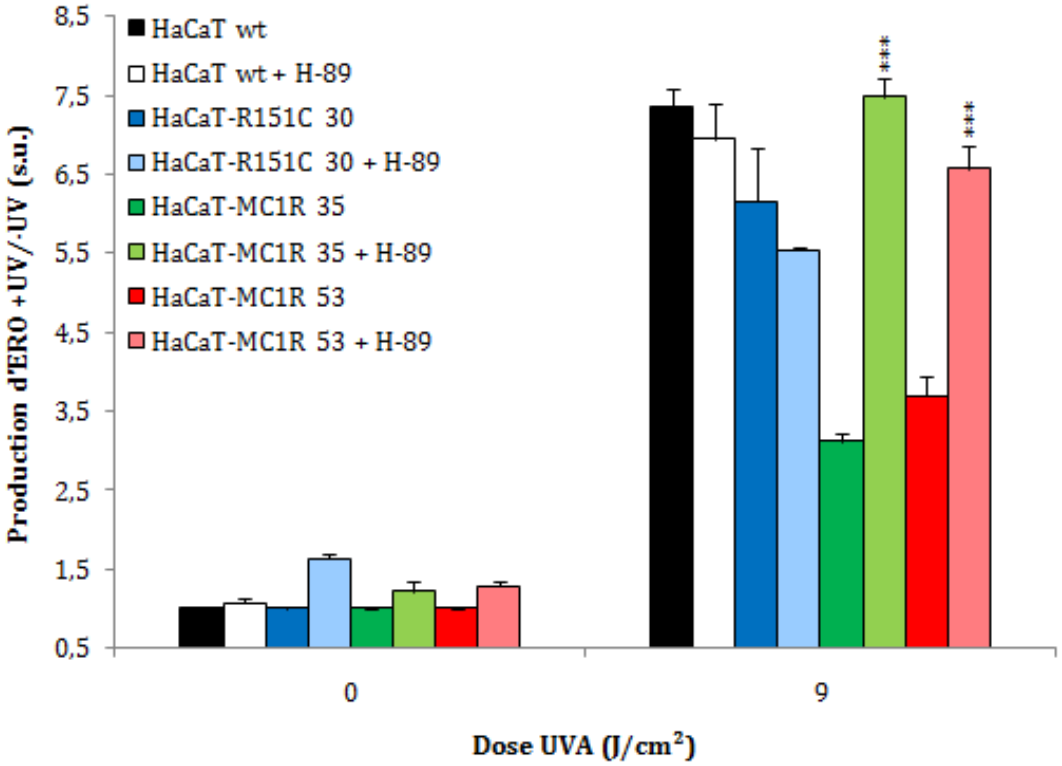


Figure 60 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par l'H-89. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et les cellules HaCaT-R_{151}C (clone 30, en bleu) sont traitées pendant 1 heure avec 5 µM d'H-89 puis sont exposées à une dose d'UVA de 9 J/cm². En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par l'H-89 sont réalisés (contrôles négatifs). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non irradiées et non traitées par l'H-89 qui sont normalisées à 1. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par l'H-89 – comparaison des moyennes – différence significative à 99,9% si $p<0,001$***).

L'H-89 ne modifie pas le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT sauvages et dans les cellules HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30). Ces résultats sont cohérents puisque les cellules HaCaT sauvages n'expriment pas le récepteur MC1R et par conséquent, ne possèdent pas la voie d'activation dépendante de l'AMPc. Dans le cas du variant non fonctionnel, la mutation $R_{151}C$ est localisée au niveau de la boucle intracellulaire n°2 du récepteur MC1R ce qui entraîne un découplage avec les protéines G (Garcia-Borron *et al.*, 2005) et par conséquent, un dysfonctionnement de la voie d'activation dépendante de l'AMPc.

Dans le cas des cellules HaCaT surexprimant un récepteur MC1R fonctionnel (clones 35 et 53), nous observons une augmentation de la production d'ERO intracellulaire quand ces cellules sont traitées par l'H-89 et irradiées par 9 J/cm² d'UVA. Après stimulation par l'H-89, la production d'ERO intracellulaire augmente de 239% et de 178% dans les cellules HaCaT-MC1R clones 35 et 53 respectivement (**Tableau 13**) et atteint des niveaux similaires à ceux observés dans les cellules HaCaT sauvages et HaCaT-$R_{151}C$ clone 30 (**Figure 60**).

% activation	Dose UVA (J/cm²)
	9
HaCaT-MC1R 35	239 ± 8%***
HaCaT-MC1R 53	178 ±8%***

Tableau 13: Activation de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par l'H-89 dans les cellules HaCaT-MC1R. Les % d'activation sont calculés par rapport aux cellules HaCaT irradiées et non traitées par l'H-89.

Lorsque le récepteur MC1R est stimulé, nous observons une production d'AMPc intracellulaire et une activation de la PKA. Lorsque les cellules HaCaT-MC1R sont traitées par l'H-89, l'activation de la PKA est inhibée et se traduit par une augmentation de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA. Cette augmentation atteint le même niveau que celui observé dans les cellules HaCaT qui ne possède pas cette voie d'activation dépendante de l'AMPc (**Figure 61**).

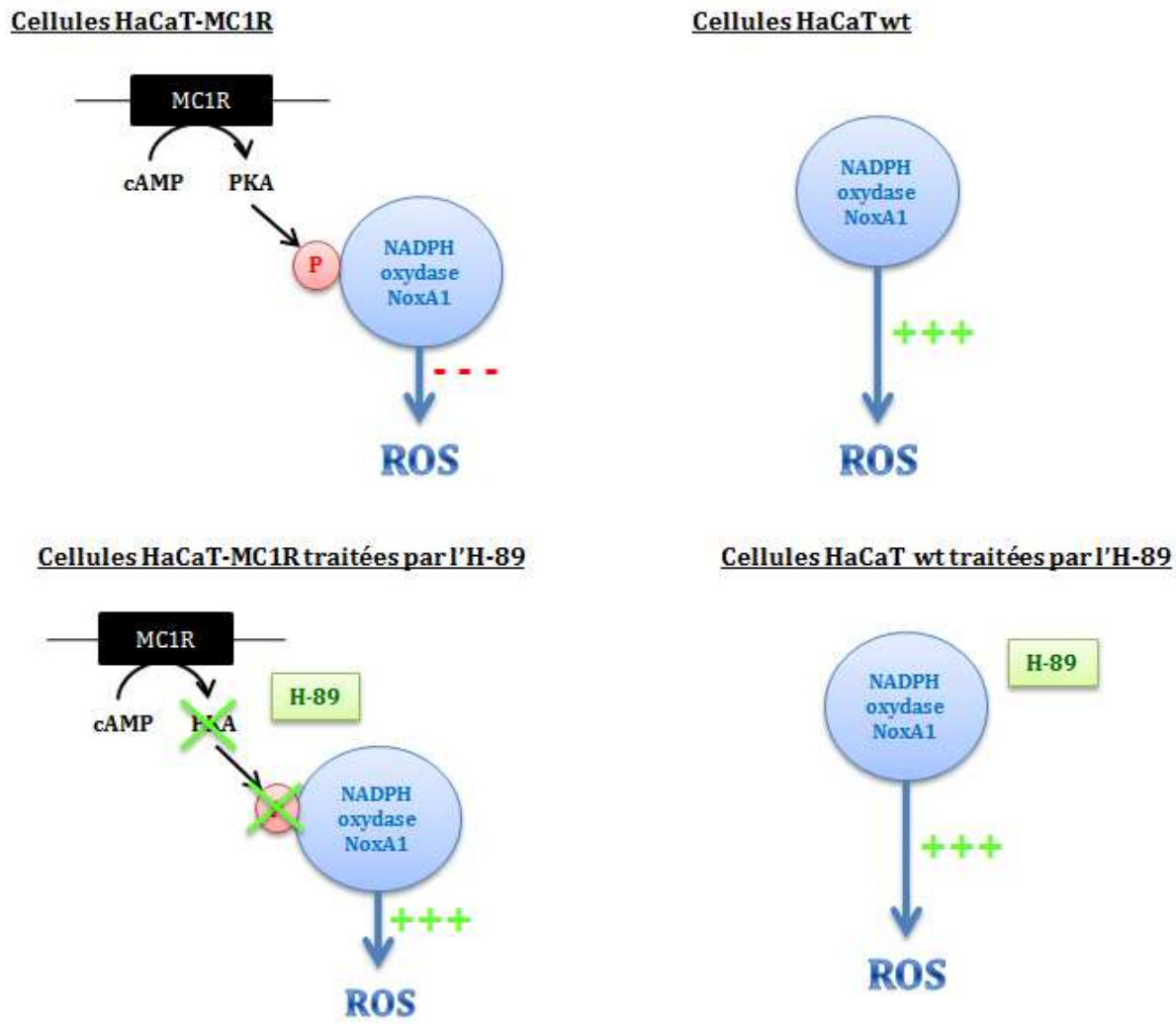


Figure 61 : Mécanisme d'action hypothétique du récepteur MC1R sur le système NADPH oxydase. Les résultats obtenus ainsi que ceux de Kim *et al.* nous ont permis d'établir ce mécanisme d'action théorique (Kim *et al.*, 2007). Le récepteur MC1R inhiberait le système NADPH oxydase via un mécanisme dépendant de l'AMPc. L'activation de la PKA phosphorylerait alors la sous-unité NoxA1 de la NADPH oxydase ce qui se traduirait par une diminution de la production d'ERO intracellulaire. L'inhibition de la PKA par l'H-89 permet de lever cette inhibition.

En d'autres termes, l'H-89 lève l'inhibition du récepteur MC1R sur le stress oxydatif induit par les UVA et provenant du système NADPH oxydase. Ces résultats ainsi que ceux de Kim *et al.* nous amènent à penser que le récepteur MC1R inhiberait le système NADPH oxydase via un mécanisme dépendant de l'AMPc (Kim *et al.*, 2007).

II.2.2. L'activation de l'AMPc inhibe le stress oxydatif induit par les UVA dans le mutant non fonctionnel $R_{151}C$

Afin de mettre en évidence le rôle de l'AMPc dans la modulation du stress oxydatif induit par les UVA par le récepteur MC1R, nous avons ensuite utilisé un activateur d'adénylate cyclase, la forskoline (**Figure 62**).

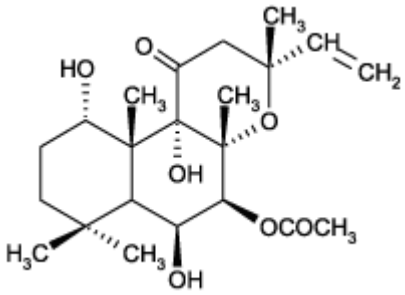


Figure 62 : Structure de la forskoline. Illustration extraite de http://www.fermentek.co.il/struct/forskolin.gif

La forskoline est un composé diterpénique extrait de la racine de *Coleus forskolii*. C'est un activateur non sélectif des adénylates cyclases qui a pour effet d'augmenter le niveau d'AMPc intracellulaire (Insel and Ostrom, 2003; Morris *et al.*, 1991; Seamon *et al.*, 1983).

Nous avons montré précédemment (**Figure 43**) que l'incubation des cellules HaCaT avec la forskoline entraînait une forte induction de la production d'AMPc intracellulaire.

II.2.2.1. Mesure de la cytotoxicité de la forskoline dans les cellules HaCaT

Nous avons tout d'abord évalué la cytotoxicité de la forskoline dans les cellules HaCaT sauvages et HaCaT-MC1R (clone 53). La forskoline a été testée pendant 24 heures à différentes concentrations comprises entre 0,1 et 100 µM dans le milieu de culture des cellules. Les résultats sont présentés **Figure 63**.

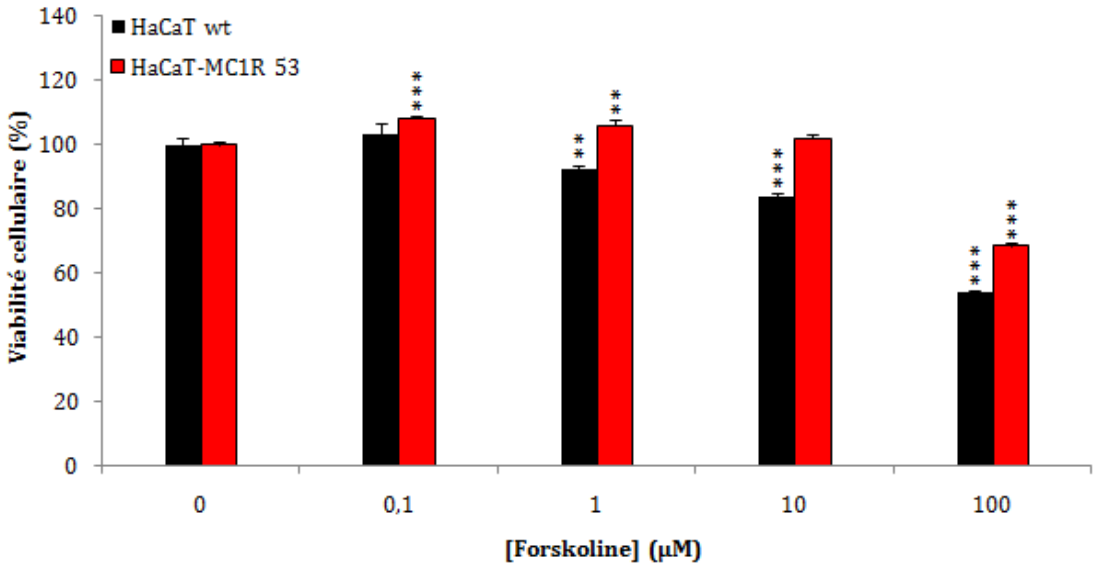


Figure 63 : Mesure de la cytotoxicité de la forskoline dans les cellules HaCaT. Les cellules HaCaT wt (en noir) et HaCaT-MC1R (clone 53, en rouge) sont traitées pendant 24 heures par des concentrations de forskoline de 0.1, 1, 10 et 100 µM. En parallèle, un contrôle non traité par la forskoline est également utilisé. La cytotoxicité est ensuite mesurée à l'aide d'un test MTT. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de six réplicats (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par la forskoline – comparaison des moyennes – différence significative à 99% si p<0,01** et à 99,9% si p<0,001***).

Pour des concentrations de forskoline comprises entre 0,1 et 10 µM, nous observons peu d'effet cytotoxique. Néanmoins, une concentration de 100 µM de forskoline entraîne une mortalité de 46% et de 31% des cellules HaCaT sauvages et HaCaT-MC1R clone 53 respectivement. Pour la suite des expériences, nous avons donc choisi de travailler avec une concentration de forskoline de 10 µM.

II.2.2.2. Mesure du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par la forskoline

Les cellules ont été préincubées en présence d'IBMX, un inhibiteur non spécifique des phosphodiestérases qui inhibent la dégradation de l'AMPc, puis ont été traitées par 10 µM de forskoline pendant 1 heure. A l'issue de l'incubation, les cellules HaCaT ont été irradiées par 9 J/cm^2 d'UVA.

Immédiatement après l'irradiation, la production d'ERO intracellulaire a été quantifiée en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés **Figure 64**.

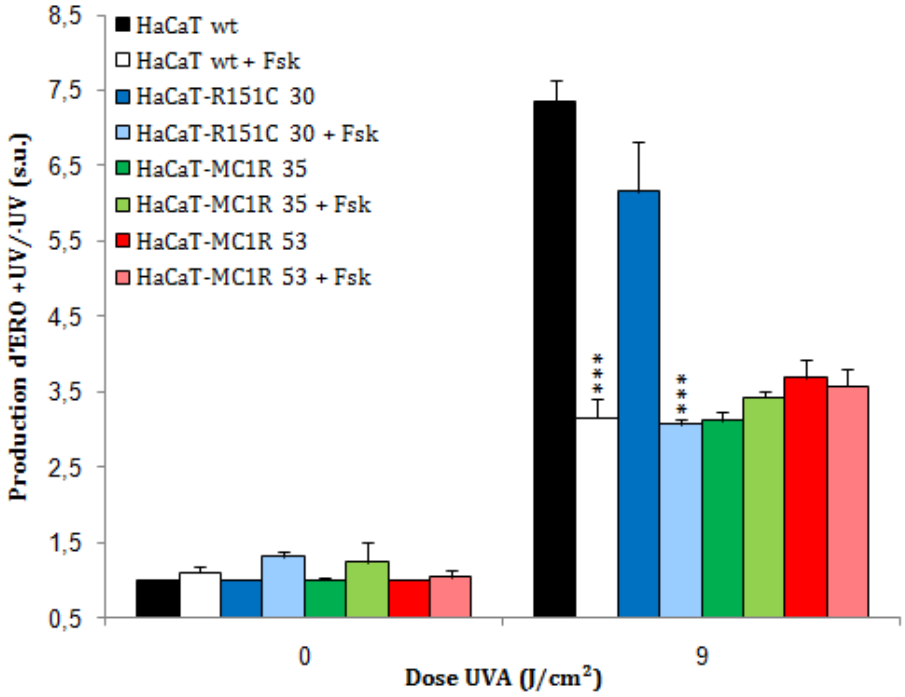


Figure 64 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par la forskoline. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et les cellules HaCaT-R_{151}C (clone 30, en bleu) sont prétraitées par l'IBMX (1 mM, 1 heure) puis sont incubées pendant 1 heure avec 10 µM de forskoline. Les cellules HaCaT sont ensuite exposées à une dose d'UVA de 9 J/cm². En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par la forskoline sont réalisés (contrôles négatifs). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non irradiées et non traitées par la forskoline qui sont normalisées à 1. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par la forskoline – comparaison des moyennes – différence significative à 99,9% si $p<0,001$***).

La forskoline ne modifie pas le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT surexprimant un récepteur MC1R fonctionnel.

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) produisent un niveau basal d'AMPc intracellulaire important (Garcin, 2007; Garcin *et al.*, 2007) et par conséquent, l'activation de la voie AMPc par la forskoline n'a pas d'effet sur le stress oxydatif induit par les UVA dans ces cellules.

Dans le cas des cellules HaCaT sauvages et HaCaT-$R_{151}C$ clone 30, nous observons une inhibition de la production d'ERO intracellulaire quand ces cellules sont traitées par la forskoline et irradiées par 9 J/cm² d'UVA. Après stimulation par la forskoline, la production d'ERO intracellulaire diminue de 57% dans les cellules HaCaT sauvages et de 52% dans les cellules HaCaT-$R_{151}C$ clone 30 (**Tableau 14**) pour atteindre des niveaux similaires à ceux observés dans les cellules HaCaT surexprimant le récepteur MC1R fonctionnel (**Figure 64**).

% inhibition	Dose UVA (J/cm²)
	9
HaCaT wt	57 ± 3%***
HaCaT-$R_{151}C$ 30	52 ±1%***

Tableau 14: Inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par la forskoline dans les cellules HaCaT sauvages et dans le variant non fonctionnel $R_{151}C$. Les % d'activation sont calculés par rapport aux cellules HaCaT irradiées et non traitées par la forskoline.

Ces résultats confirment le rôle inhibiteur de l'AMPc dans la régulation de la production des ERO après exposition aux UVA.

II.3. La phosphorylation de NoxA1 est augmentée dans les cellules HaCaT-MC1R

L'activation de Nox1 est liée à son interaction avec des sous-unités régulatrices comme NoxO1 et NoxA1 (Bedard and Krause, 2007).

Des données récentes ont suggéré que l'activité de la NADPH oxydase pouvait être régulée par la PKA (Kim *et al.*, 2007). De plus, Kim *et al.* ont montré que la PKA phosphorylait NoxA1 ce qui entraînait une inhibition de la production d'ERO intracellulaire (Kim *et al.*, 2007).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré la phosphorylation de NoxA1 dans les cellules HaCaT sauvages, HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et HaCaT-R_{151}C clone 30. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de co-immunoprécipitation de NoxA1 décrite dans la publication de Kim *et al.* en 2007 (Kim *et al.*, 2007). Le protocole détaillé de cette technique est décrite dans la partie Matériels & Méthodes (paragraphe IX). L'immunoprécipitation de NoxA1 a ensuite été révélée par Western-Blot en utilisant un anticorps dirigé contre NoxA1 (NoxA1 total) et un anticorps dirigé contre les cibles phosphorylées par la PKA (NoxA1 phosphorylé). Le protocole détaillé de la technique du Western-Blot est décrite dans la partie Matériels & Méthodes (paragraphe X). Les résultats sont présentés **Figure 65**.

Figure 65 : Analyse par Western-Blot de la phosphorylation de NoxA1 par la PKA dans les cellules HaCaT. Les cellules HaCaT sauvages, HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et HaCaT-R_{151}C (clone 30) sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-NoxA1. Puis, les extraits cellulaires sont soumis à un Western-Blot, sont transférés sur membrane de nitrocellulose puis sont incubés avec un anticorps anti-NoxA1 ou anti-PKA (Ser/Thr) comme il est décrit dans la partie Matériels & Méthodes de ce mémoire (paragraphes IX et X).

L'immunoprécipitation de NoxA1 révélée par l'anticorps anti-NoxA1 nous a servi comme contrôle de la quantité de protéine totale NoxA1 présente dans les cellules HaCaT. La protéine NoxA1 a une taille attendue de 51,7 kDa.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons observer que la protéine NoxA1 totale est bien présente dans les différentes lignées cellulaires HaCaT et à des niveaux similaires. La forte densité du signal vient du fait que nous avons immunoprécipité spécifiquement la protéine NoxA1 et qu'elle est, par conséquent, fortement exprimée.

L'immunoprécipitation de NoxA1 révélée par un anticorps qui cible les sites de phosphorylation Ser/Thr reconnus par la PKA nous a permis de mettre en évidence les états de phosphorylation de NoxA1 dans les différentes lignées cellulaires HaCaT. D'après les données exposées, la protéine NoxA1 n'est pas phosphorylée de la même manière dans les différentes cellules HaCaT (**Figure 65**). Il apparaît que NoxA1 est moins phosphorylée dans les cellules HaCaT sauvages et HaCaT-$R_{151}C$ clone 30 que dans les cellules HaCaT surexprimant un récepteur MC1R fonctionnel. En effet, la protéine NoxA1 est 3,31 fois et 3,22 fois plus phosphorylée dans les cellules HaCaT-MC1R clones 35 et 53 respectivement, que dans les cellules HaCaT sauvages. Le variant non fonctionnel $R_{151}C$ présente, quant à lui, une phosphorylation de la protéine NoxA1 par la PKA plus faible que dans les cellules HaCaT-MC1R mais 1,78 fois plus importante que dans les cellules HaCaT sauvages (**Tableau 15**). Ces résultats indiquent que la surexpression d'un récepteur MC1R fonctionnel dans les cellules HaCaT est associée à une augmentation de la phosphorylation de la protéine NoxA1.

Cellules	% de phosphorylation
HaCaT wt	100%
HaCaT-$R_{151}C$ 30	178 ± 10%
HaCaT-MC1R 35	331 ± 16%
HaCaT-MC1R 53	322 ± 19%

Tableau 15: Phosphorylation de NoxA1 par la PKA dans les cellules HaCaT. Le Western-Blot de NoxA1 phosphorylé est analysé à l'aide du logiciel d'imagerie Bio1D (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France). Les données sont exprimées en % de densité optique (D.O.) comparées aux cellules HaCaT wt qui sont normalisées à 100%.

Ces données, ainsi que celle de Kim *et al.*, vont dans le sens de notre hypothèse de départ à savoir, que le récepteur MC1R inhibe le système NADPH oxydase par un mécanisme dépendant de l'AMPc (Kim *et al.*, 2007). En effet, la protéine PKA produite lors de la signalisation du récepteur MC1R, phosphoryle la sous-unité activatrice NoxA1 de Nox1 du système NADPH oxydase entraînant ainsi une inhibition de la production d'ERO intracellulaire (**Figure 66**). Les sites majeurs de phosphorylation de NoxA1 par la PKA sont la Ser_{172} et la Ser_{461}. Ces sites de phosphorylation sont présents au niveau du domaine TPR de Rac1 et du domaine SH3 de NoxO1 empêchant alors leur interaction. Par conséquent, la protéine NoxA1 phosphorylée ne peut plus se lier au complexe Nox1 inhibant ainsi son activité (Kim *et al.*, 2007).

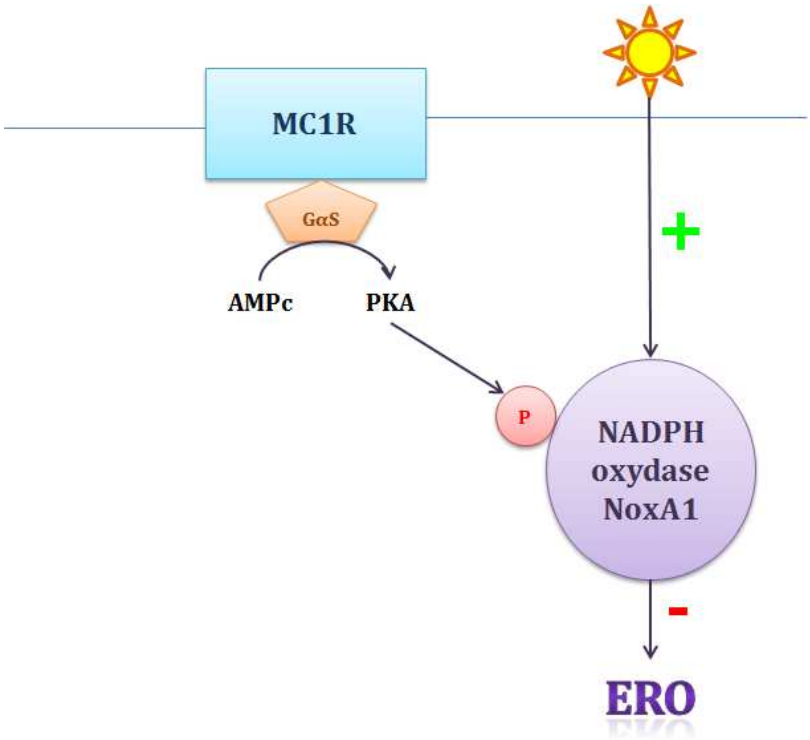


Figure 66 : Mécanisme d'action hypothétique de la voie AMPc sur le système NADPH oxydase. Les résultats obtenus ainsi que ceux de Kim *et al.* nous ont permis d'établir ce mécanisme d'action théorique (Kim *et al.*, 2007). L'activation du récepteur MC1R entraîne une augmentation intracellulaire d'AMPc et une activation de la PKA. La PKA produite phosphoryle alors la Ser_{172} et la Ser_{461} de la sous-unité NoxA1 du système NADPH oxydase entraînant alors une inhibition de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA.

III. ROLE DE L'EGFR SUR LE STRESS OXYDATIF INDUIT PAR LES UVA

L'activation de Nox1 est régulée par NoxO1 et NoxA1 (Banfi *et al.*, 2003; Cheng and Lambeth, 2004; Geiszt *et al.*, 2003; Takeya *et al.*, 2003). De plus, comme c'est le cas pour Nox2, Nox1 forme un hétérodimère avec $p22^{phox}$ essentiel pour la production d'ERO induite par l'EGF (Kawahara *et al.*, 2007; Takeya *et al.*, 2003; Taura *et al.*, 2009). D'autres études ont également mis en évidence la régulation négative de l'activité Nox1 par ERK via la phosphorylation de la Ser_{282} de NoxA1 (Oh *et al.*, 2010). Cette phosphorylation désensibilise l'activité de Nox1 en modulant l'activité de Rac.

Le récepteur à l'EGF (EGFR) est connu pour stimuler l'activité Nox1 entraînant la production d'$O_2^{\bullet-}$ et d'H_2O_2 (Bae *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2004). L'inhibition de la NADPH oxydase coïncide avec une inhibition des niveaux d'ARNm de l'*EGFR* et une inhibition de sa phosphorylation dans des hépatomes de rat (Sancho and Fabregat, 2010). Les ERO, dont l'H_2O_2, sont connues pour activer l'EGFR dans des kératinocytes irradiés par les UVA et les UVB (Peus *et al.*, 1998; von Montfort *et al.*, 2006). Une étude réalisée sur les cellules HaCaT a mis en évidence que la production d'ERO induite par l'angiotensine II augmentait les niveaux d'expression de l'EGFR alors que l'apocynine les inhibaient, suggérant un lien étroit entre l'activité NADPH oxydase et l'EGFR (Nakai *et al.*, 2008). Ces résultats ont été confirmés par les travaux de Chen *et al.* qui ont montré que Nox1 médiait la production d'ERO intracellulaire stimulée par l'EGF (Chen *et al.*, 2008). βPix (pour PAK-interacting exchange factor), un facteur d'échange à guanine pour Rac, interagit avec Nox1. La formation d'un complexe Nox1/βPix/NoxO1 est une étape critique de la production d'ERO induite par l'EGF (Park *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006).

Nous avons voulu savoir si la formation d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT était liée à l'EGFR et à ERK. Pour cela, nous avons utilisé un inhibiteur de l'EGFR, le PD153035 et un inhibiteur de ERK, le PD98059.

III.1. L'inhibition de l'EGFR et de ERK augmente le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT-MC1R

Des travaux récents ont pu mettre en évidence de nouveaux mécanismes de transduction du signal dans les RCPG, certains ne passant pas par l'activation des protéines G (Luttrell, 2008). La stimulation de la plupart des RCPG entraîne une activation rapide des voies des MAP kinases (MAPK). Il existe trois classes majeures de MAPK : ERK, JNK/SAPK (pour c-Jun N-terminal kinase/Stress-activated protein kinase) et p38. La voie de ERK est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et le passage des cellules en mitose ou en meïose alors que les voies JNK/SAPK et p38 sont impliquées dans l'apoptose et dans l'arrêt de la croissance cellulaire (**Figure 67**).

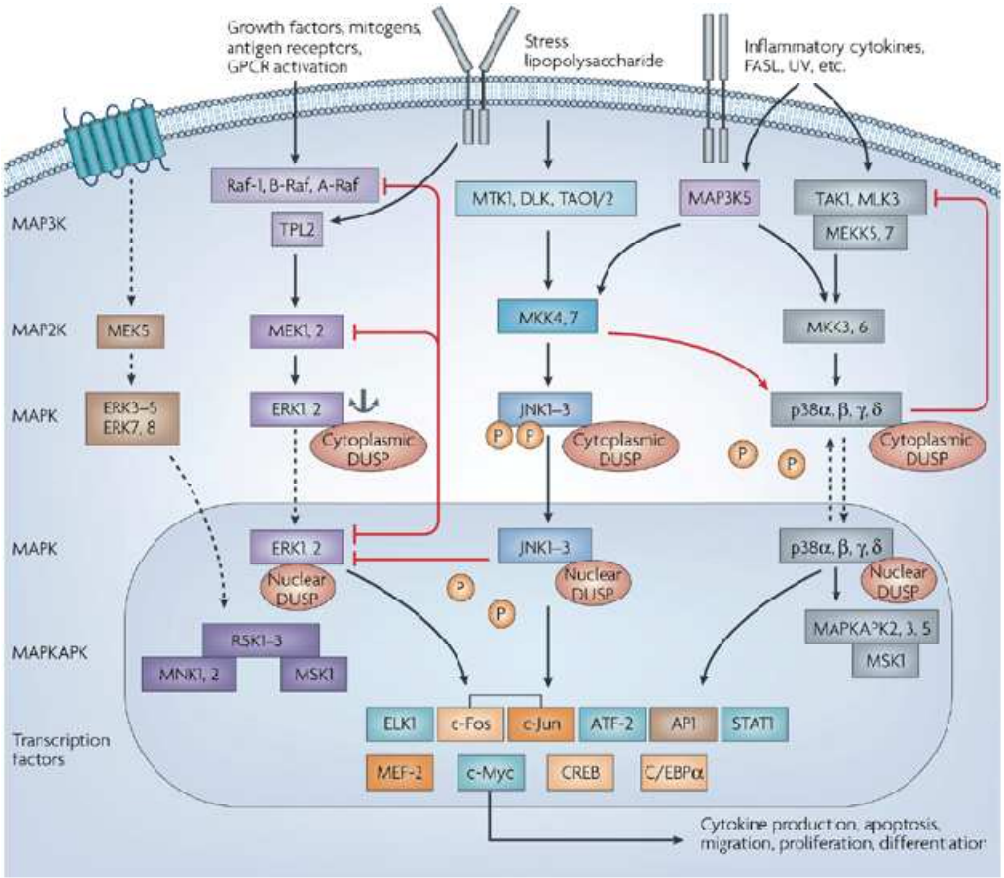


Figure 67 : Voie des MAP kinases. Illustration extraite de http://www.nature.com.

Les mécanismes d'activation de ERK par les RCPG impliquent le plus souvent l'activation des tyrosine kinases Src et de la petite protéine G, Ras (Luttrell *et al.*, 1996; van Biesen *et al.*, 1995). La transactivation des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) comme l'EGFR ou le PDGF par les RCPG a été mise en évidence dans de nombreux modèles cellulaires (Arthur *et al.*, 2006; Bhola and Grandis, 2008; Filardo, 2002; Hackel *et al.*, 1999; Jeanneteau and Chao, 2006; Kanno *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2006; Shah and Catt, 2004).

III.1.1. Mesure de la cytotoxicité du PD153035 dans les cellules HaCaT sauvages

Nous avons tout d'abord évalué la cytotoxicité du PD153035 dans les cellules HaCaT sauvages. Ce composé est testé pendant 24 heures à différentes concentrations comprises entre 0,005 et 50 µM dans le milieu de culture (**Figure 68**).

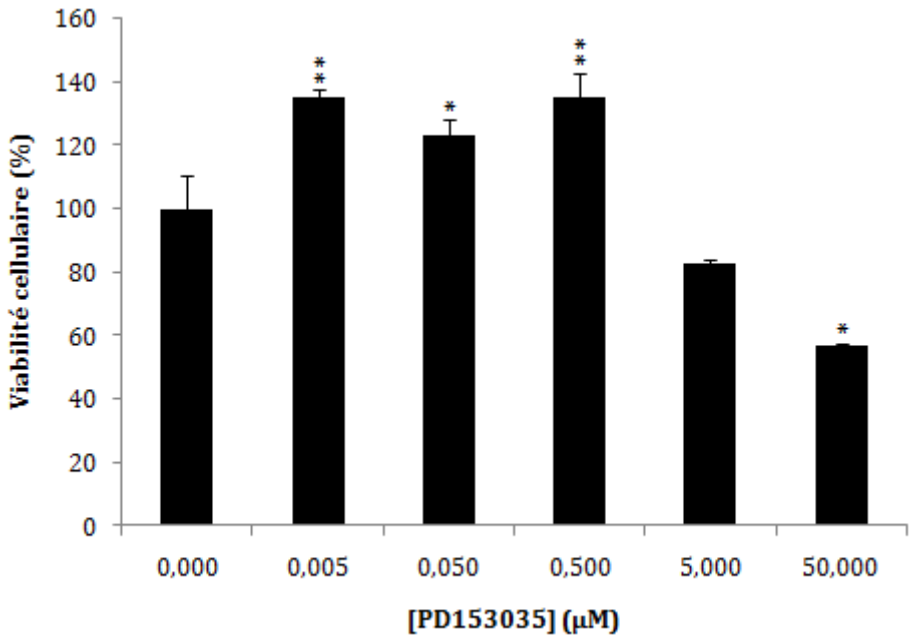


Figure 68 : Mesure de la cytotoxicité du PD153035 dans les cellules HaCaT sauvages. Les cellules HaCaT wt sont traitées pendant 24 heures par des concentrations de PD153035 de 0.005, 0.05, 0.5, 5 et 50 µM. En parallèle, un contrôle non traité par le PD153035 est également utilisé. La cytotoxicité est ensuite mesurée à l'aide d'un test MTT. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de six réplicats (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par le PD153035 – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si p<0,05* et à 99% si p<0,01**).

Ce produit présente une cytotoxicité cellulaire à partir d'une concentration de 50 µM. Pour une concentration de 5 µM, la mortalité des cellules HaCaT sauvages est de 20% environ. En revanche, pour des concentrations comprises entre 0,005 et 0,5 µM, le PD153035 semble avoir un effet prolifératif sur les cellules HaCaT sauvages. Pour la suite des expériences, nous avons choisi de travailler avec une concentration de PD153035 de 0,5 µM.

III.1.2. Mesure du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le PD153035

Les cellules ont été traitées 1 heure avec 0,5 µM de PD153035 et ont été exposées à une irradiation UVA de 9 J/cm^2. Immédiatement après l'irradiation, la production d'ERO intracellulaire a été quantifiée en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés **Figure 69**.

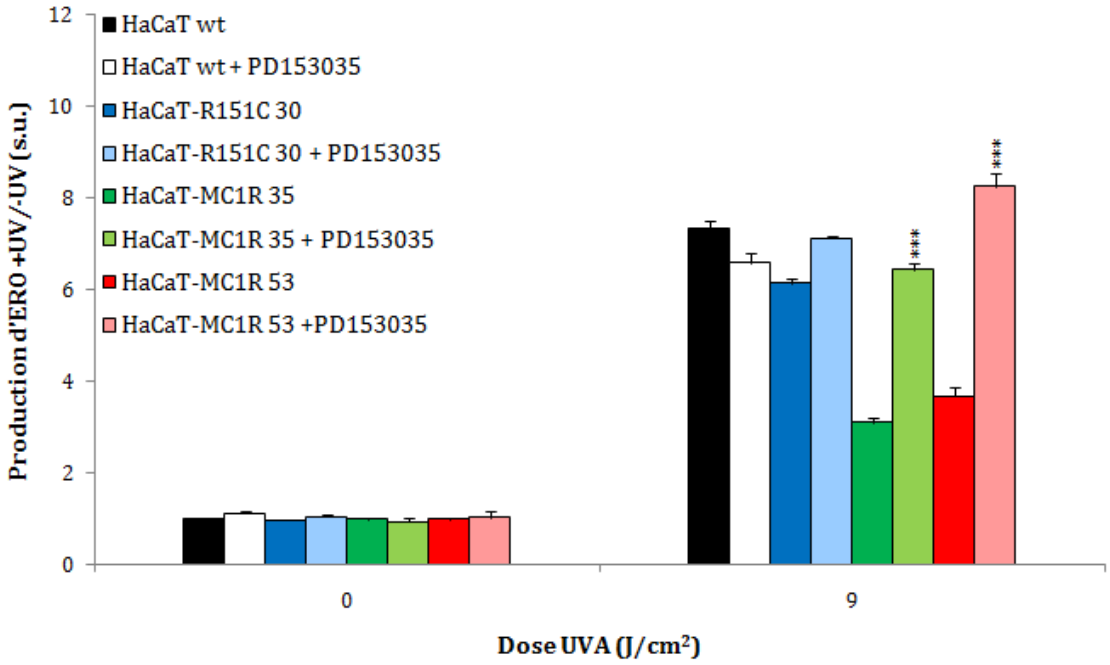


Figure 69 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le PD153035. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et les cellules HaCaT-R_{151}C (clone 30, en bleu) sont traitées pendant 1 heure avec 0,5 µM de PD153035 puis sont exposées à une dose d'UVA de 9 J/cm². En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par le PD153035 sont réalisés (contrôles négatifs). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non irradiées et non traitées par le PD153035 qui sont normalisées à 1. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par le PD153035 – comparaison des moyennes – différence significative à 99,9% si p<0,001***).

Le PD153035 ne modifie pas le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT sauvages et dans les cellules HaCaT-R_{151}C (clone 30).

Dans le cas des cellules HaCaT surexprimant un récepteur MC1R fonctionnel (clones 35 et 53), nous observons une augmentation de la production d'ERO intracellulaire quand ces cellules sont traitées par l'inhibiteur de l'EGFR et sont irradiées par 9 J/cm² d'UVA. En effet, la production d'ERO intracellulaire augmente de 206% dans les cellules HaCaT-MC1R clone 35 et de 224% dans celles du clone 53 (**Tableau 16**) pour atteindre des niveaux similaires à ceux observés dans les cellules HaCaT sauvages et HaCaT-R_{151}C clone 30 (**Figure 69**).

% activation	Dose UVA (J/cm²)
	9
HaCaT-MC1R 35	206 ± 5%***
HaCaT-MC1R 53	224 ± 8%***

Tableau 16: Activation de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par le PD153035 dans les cellules HaCaT-MC1R. Les % d'activation sont calculés par rapport aux cellules HaCaT irradiées et non traitées par le PD153035.

En conclusion, l'inhibition de l'EGFR restaure la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT qui surexpriment un récepteur MC1R fonctionnel. Ces données suggèrent donc que l'EGFR serait impliqué dans les propriétés antioxydantes du récepteur MC1R sur le stress oxydatif induit par les UVA.

III.1.3. Mesure du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le PD98059

ERK est la voie mitogénique majeure initiée par l'activation de l'EGFR (Blenis, 1993; Marshall, 1995) et est impliqué dans la régulation de la production d'ERO intracellulaire induite par l'EGF (Oh *et al.*, 2010). Par conséquent, nous avons ensuite traité les cellules HaCaT avec un inhibiteur spécifique de ERK, le PD98059.

Les cellules HaCaT sauvages, HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et HaCaT-$R_{151}C$ clone 30 ont été traitées 1 heure avec 20 µM de PD98059 et ont été exposées à une irradiation UVA de 9 J/cm². Immédiatement après l'irradiation, la production d'ERO intracellulaire a été quantifiée en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés **Figure 70**.

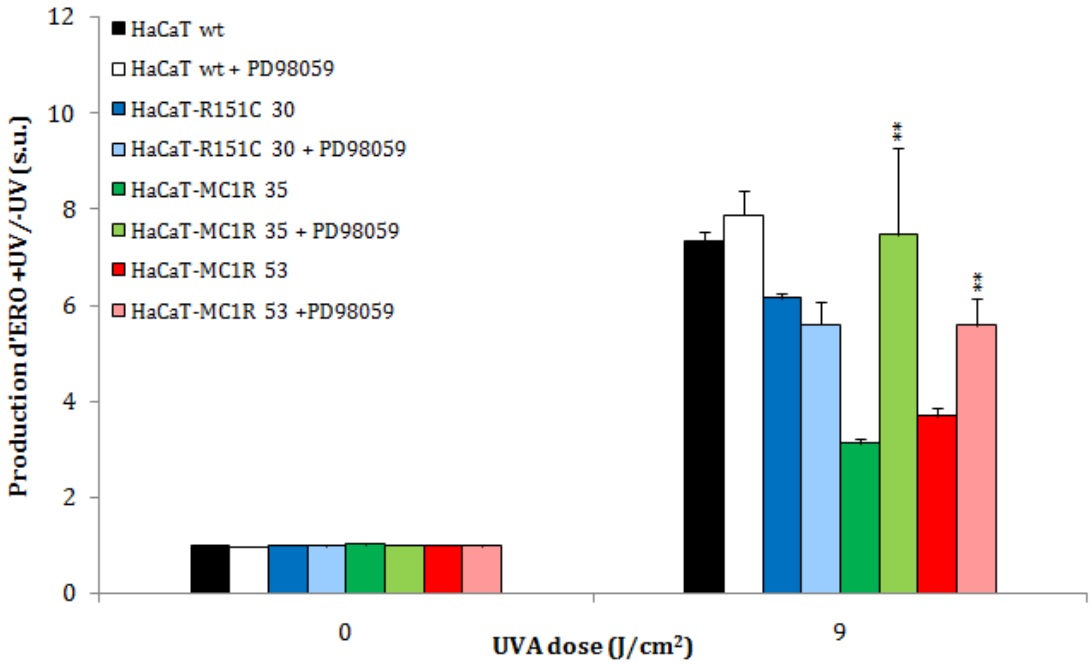


Figure 70 : Production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT traitées par le PD98059. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et les cellules HaCaT-R_{151}C (clone 30, en bleu) sont traitées pendant 1 heure avec 20 µM de PD98059 puis sont exposées à une dose d'UVA de 9 J/cm². En parallèle, un contrôle non irradié ainsi qu'un contrôle non traité par le PD98059 sont réalisés (contrôles négatifs). La production d'ERO intracellulaire est déterminée immédiatement après irradiation en mesurant la fluorescence du produit d'oxydation du carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 heure) par cytométrie en flux. Grâce au marquage IP (5 µg/ml), nous avons discriminé la population morte de la population vivante. A partir des différentes moyennes de fluorescence obtenues, la production d'ERO a été calculée par rapport aux cellules HaCaT non irradiées et non traitées par le PD98059 qui sont normalisées à 1. Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT non traitées par le PD98059 – comparaison des moyennes – différence significative à 99% si p<0,01**).

Le PD98059 ne modifie pas le stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT sauvages et dans les cellules HaCaT-R_{151}C (clone 30).

Dans le cas des cellules HaCaT surexprimant un récepteur MC1R fonctionnel (clones 35 et 53), nous observons une augmentation de la production d'ERO intracellulaire quand ces cellules sont traitées par un inhibiteur de ERK et irradiées par 9 J/cm² d'UVA. En effet, la production d'ERO intracellulaire augmente de 240% dans les cellules HaCaT-MC1R clone 35 et de 151% dans les cellules HaCaT-MC1R clone 53 (**Tableau 17**).

% activation	Dose UVA (J/cm²)
	9
HaCaT-MC1R 35	240 ± 58%**
HaCaT-MC1R 53	151 ± 15%**

Tableau 17: Activation de la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA après stimulation par le PD98059 dans les cellules HaCaT-MC1R. Les % d'activation sont calculés par rapport aux cellules HaCaT irradiées et non traitées par le PD98059.

L'inhibition de ERK restaure la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA dans les cellules HaCaT qui surexpriment un récepteur MC1R fonctionnel mais pas dans les cellules HaCaT sauvages et dans le variant non fonctionnel $R_{151}C$.

Ces résultats suggèrent que la régulation du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules HaCaT pourrait être liée à des transactivations entre le récepteur MC1R et la voie de signalisation EGFR/ERK (Stork and Schmitt, 2002).

III.2. L'inhibition de l'EGFR et de ERK diminue la production d'AMPc induite par l'α-MSH dans les cellules HaCaT-MC1R

De nombreux exemples de transactivations entre les RCPG et l'EGFR ont été décrits et les mécanismes régulant ces interactions dépendent à la fois du RCPG et du type cellulaire (Rozengurt, 2007). Par exemple, les RCPG peuvent transactiver l'EGFR via des voies de signalisation intracellulaires impliquant la voie AMPc/PKA (Barbier *et al.*, 1999; Drube *et al.*, 2006; Gerits *et al.*, 2008).

Nous avons mesuré les niveaux d'AMPc intracellulaires dans les cellules HaCaT sauvages, HaCaT-MC1R (clones 35 et 53) et HaCaT-$R_{151}C$ clone 30 stimulées par l'α-MSH seule ou en présence d'un inhibiteur de l'EGFR (PD153035) ou d'un inhibiteur de ERK (PD98059) (**Figure 71**).

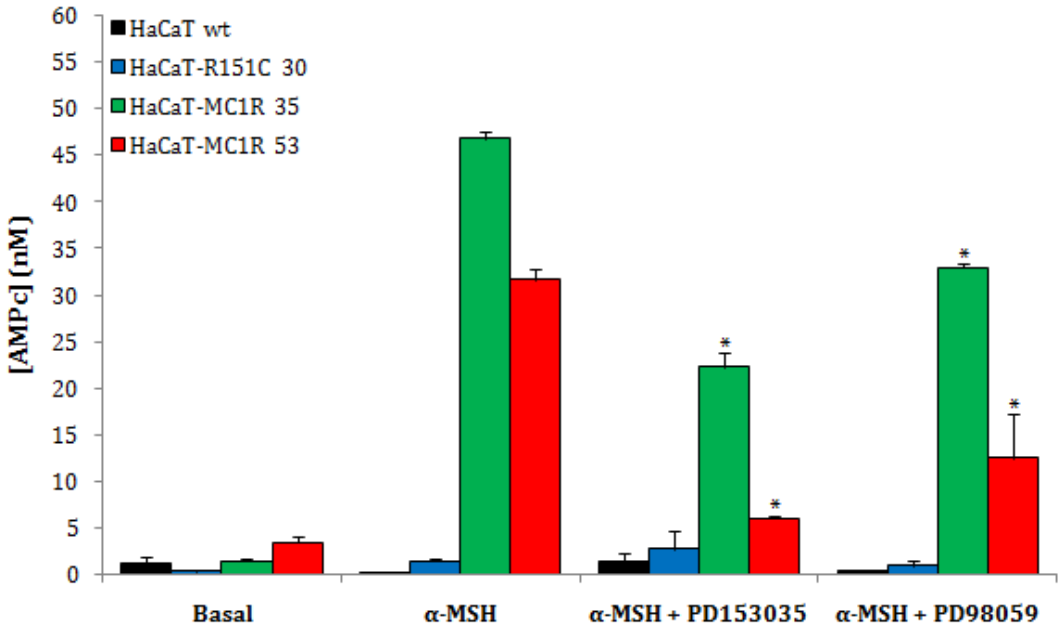


Figure 71 : Mesure de la production d'AMPc intracellulaire induite par l'α-MSH dans les cellules HaCaT traitées par le PD153035 et par le PD98059. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et les cellules HaCaT-R_{151}C clone 30 (en bleu) sont stimulées pendant 1 heure par l'α-MSH (1 µM) seule ou en présence de PD153035 (0,5 µM) ou de PD98059 (20 µM) puis la concentration d'AMPc intracellulaire est déterminée à l'aide d'un kit AMPc LANCE (*PerkinElmer Life Science Inc.*) comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes (paragraphe II.1.4). Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes (test t de Student par rapport aux cellules HaCaT stimulées par l'α-MSH seule – comparaison des moyennes – différence significative à 95% si p<0,05*).

Comme nous avions pu le mettre en évidence précédemment, l'α-MSH augmente les niveaux d'AMPc intracellulaires dans les cellules HaCaT-MC1R (cf. partie 1 des résultats paragraphe IV). En revanche, les cellules HaCaT sauvages et HaCaT-R_{151}C ne présentent pas d'induction de la production d'AMPc intracellulaire lorsqu'elles sont stimulées par l'α-MSH.

Le traitement des cellules par le PD153035 (inhibiteur de l'EGFR) et par le PD98059 (inhibiteur de ERK) réduit de manière significative la production d'AMPc intracellulaire induite par l'α-MSH dans les cellules HaCaT exprimant un récepteur MC1R fonctionnel (**Figure 71**), suggérant donc qu'il existe un lien étroit entre le récepteur MC1R et la voie de l'EGFR/ERK.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé la même expérience en présence de forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase (**Figure 72**).

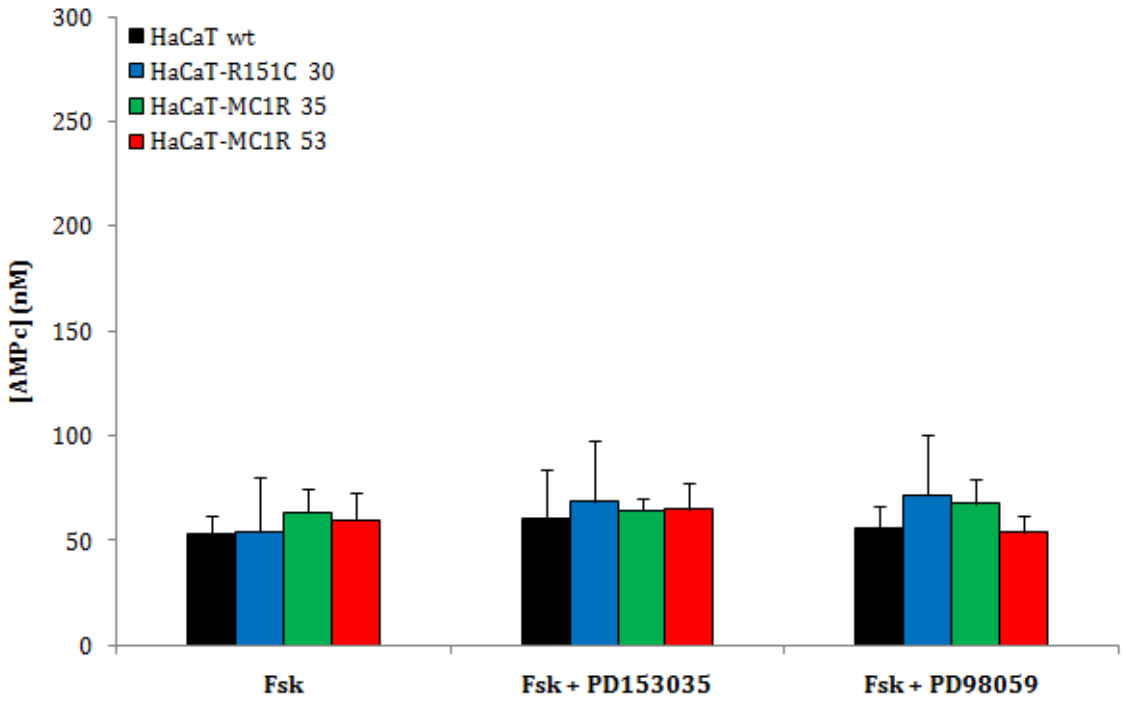


Figure 72 : Mesure de la production d'AMPc intracellulaire induite par la forskoline dans les cellules HaCaT traitées par le PD153035 et par le PD98059. Les cellules HaCaT wt (en noir), les cellules HaCaT-MC1R (clones 35 et 53, en vert et rouge respectivement) et les cellules HaCaT-R_{151}C clone 30 (en bleu) sont traitées pendant 1 heure par l'IBMX (1 mM) puis sont stimulées par la forskoline (10 µM) seule ou en présence de PD153035 (0,5 µM) ou de PD98059 (20 µM). La concentration d'AMPc intracellulaire est déterminée à l'aide d'un kit AMPc LANCE (*PerkinElmer Life Science Inc.*) comme décrit dans la partie Matériels & Méthodes (paragraphe II.1.4). Les données indiquées correspondent à la moyenne ± écart-type de trois expériences indépendantes.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons observer que l'inhibition de l'EGFR ainsi que celle de ERK n'ont aucun effet sur la production d'AMPc intracellulaire induite par la forskoline.

.

DISCUSSION

&

PERSPECTIVES

DISCUSSION & PERSPECTIVES

I. DISCUSSION

I.1. MC1R & modèle d'étude

Les kératinocytes HaCaT sont transfectés de manière stable par le récepteur MC1R. Ils représentent un modèle particulièrement intéressant pour les études structurales portant sur les RCPG et pour la caractérisation pharmacologique de ligands potentiels au sein de cellules irradiées. Cependant, ce modèle d'étude présente plusieurs limites :

- Les rôles du récepteur MC1R sont étudiés dans des kératinocytes et non dans des mélanocytes.
- Les cellules transfectées expriment un nombre de récepteurs supérieur à celui observé dans les cellules exprimant de manière endogène le MC1R (Garcin, 2007; Garcin *et al.*, 2007; Garcin *et al.*, 2009).
- Les cellules HaCaT présentent des mutations du facteur de transcription p53 (Boukamp *et al.*, 1988), une hyperméthylation du promoteur p16 (Chaturvedi *et al.*, 1999) et des altérations au niveau de l'activation de NF-κB (Chaturvedi *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 1999). Enfin, les cellules HaCaT sont plus sensibles à l'apoptose induite par le TNF-α (Chaturvedi *et al.*, 2006) et par les UV (Chaturvedi *et al.*, 1999).
- A l'heure actuelle, il n'existe pas d'inhibiteur pharmacologique du récepteur MC1R.

I.2. MC1R & stress oxydatif

1. Ce travail de thèse a montré que la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA était inhibée dans les cellules HaCaT-MC1R et que cette inhibition était renforcée en présence d'α-MSH.

Nous avons utilisé des concentrations d'α-MSH de 10^{-6} M, proches de celles qui sont utilisées dans de nombreuses études portant sur les kératinocytes (Haycock *et al.*, 2000; Kokot *et al.*, 2009). D'autres travaux réalisés sur les cellules HaCaT utilisent l'α-MSH à des concentrations de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-8} M (Elliott *et al.*, 2004; Garcin *et al.*, 2009; Moustafa *et al.*, 2002).

La caractérisation pharmacologique de nos lignées a montré que la saturation des sites de liaison n'était pas totale pour une concentration en NDP-MSH de 10^{-9} M et qu'elle atteignait 100% pour une concentration de 10^{-6} M. Les études, utilisant l'α-MSH à 10^{-9} M, portent en général sur les mélanocytes (Abdel-Malek *et al.*, 2006; Abdel-Malek *et al.*, 2009; Kadekaro *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009). Les travaux de Song *et al* utilisent l'α-MSH sur des cultures primaires de mélanocytes et pour des incubations beaucoup plus longues (4 jours) comparées à notre méthode d'étude (Song *et al.*, 2009).

La production d'AMPc intracellulaire dans nos lignées HaCaT est similaire pour des concentrations de 10^{-9} et 10^{-6} M d'α-MSH bien que la saturation des sites de liaison soit différente. Ces résultats peuvent s'expliquer par un phénomène d'amplification de la réponse biologique associée au MC1R. Cependant, les mécanismes moléculaires à l'origine de ce phénomène ne sont pas connus.

2. L'originalité et l'intérêt de ce travail réside sur le fait que la phosphorylation de NoxA1 par la PKA est augmentée dans les cellules HaCaT-MC1R et que cette phosphorylation est à l'origine de l'action antioxydante du récepteur MC1R.

Cependant, la phosphorylation de NoxA1 dans les cellules HaCaT-$R_{151}C$ n'est pas négligeable. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus lors de l'étude du stress oxydatif induit par les UVA en présence d'α-MSH. Le couplage fonctionnel du $R_{151}C$ avec les protéines $G\alpha_S$ est très réduit et se traduit par une forte inhibition de la synthèse d'AMPc (Garcia-Borron *et al.*, 2005; Herraiz *et al.*, 2009; Newton *et al.*, 2007; Ringholm *et al.*, 2004; Sanchez-Laorden *et al.*, 2007). Pourtant, dans notre modèle, Le taux d'AMPc intracellulaire induit par l'α-MSH n'est pas nul.

L'incubation de kératinocytes HaCaT en présence d'α-MSH, d'ACTH ou de KPV entraîne une augmentation rapide et significative du Ca^{2+} intracellulaire lorsque la voie AMPc est inhibée (Elliott *et al.*, 2004). Il existerait des liens entres les voies de signalisation AMPc/PKA et IP_3/Ca^{2+} (Hsiao *et al.*, 2007; Zanassi *et al.*, 2001).

Les phosphodiestérases (PDE) sont des régulateurs de la concentration locale en AMPc dans la cellule (Beavo, 1995; Conti, 2000) qui influencent les états d'activité de la PKA et de l'AMPc (Conti, 2000). L'AMPc produit est dégradé par l'action de ces PDE (Conti and Jin, 1999; Houslay and Milligan, 1997; Manganiello and Degerman, 1999; Soderling and Beavo, 2000). En présence de faibles taux d'AMPc dans la cellule, ces PDE peuvent être régulées de manière négative par les AKAPs, la PKA et le gradient d'AMPc intracellulaire (Dodge *et al.*, 2001). Les AKAPs (pour A-Kinase Anchoring Protein) sont des molécules chaperonnes qui placent la PKA proche de ses effecteurs et de ses substrats (Colledge and Scott, 1999; Dessauer, 2009; Pidoux and Tasken, 2010). Par ailleurs, les AKAPs peuvent faciliter les transactivations entre la PKA et la voie EGFR/ERK (Barbier *et al.*, 1999; Bornfeldt and Krebs, 1999; Drube *et al.*, 2006; Gerits *et al.*, 2008).

3. Nos résultats indiquent que l'inhibition du stress oxydatif induit par les UVA peut être liée à des transactivations entre le MC1R et la voie EGFR/ERK (Stork and Schmitt, 2002). Les travaux d'Oh *et al.* ont montré que ERK phosphorylait NoxA1 en présence d'EGF, entraînant une inhibition de l'activité Nox1 (Oh *et al.*, 2010). L'activation de l'EGFR peut réguler l'internalisation des RCPG via leur phosphorylation par les GRKs. Dans le cas du récepteur MC1R, il s'agit des GRK2 et GRK6 (Luttrell and Lefkowitz, 2002; Pitcher *et al.*, 1998).

I.3. MC1R et photoprotection

Les individus qui possèdent des mutations non fonctionnelles du MC1R (phénotype RHC) montrent une forte sensibilité au soleil (Box *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 1995) et un risque accru de développer un mélanome (Kennedy *et al.*, 2001; Palmer *et al.*, 2000) ou un carcinome (Bastiaens *et al.*, 2001; Box *et al.*, 2001). Des travaux récents ont montré que ces variants étaient associés à une augmentation du photovieillissement cutané (Elfakir *et al.*, 2009). La sensibilité des individus de phénotype RHC pourrait s'expliquer par une réduction de l'effet photoprotecteur de la mélanine et par une inhibition des mécanismes de protection non pigmentaires médiés par le récepteur MC1R (Robinson *et al.*, 2010).

II. PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de cette thèse sont intéressants pour le développement de nouvelles stratégies en photoprotection. Ils pourront certainement apporter quelques réponses dans la lutte contre le photovieillissement, les cancers cutanés et l'inflammation photo-induite. Pour la suite de ce projet, nous nous proposons de suivre plusieurs axes de recherche :

1. **Etude sur d'autres lignées cellulaires :** Nous étudierons le stress oxydatif induit par les UVA dans des cellules qui expriment de façon endogène le récepteur MC1R comme les mélanocytes et les mélanomes. Néanmoins, le polymorphisme du MC1R pourra être un frein à cette étude. Afin de bloquer l'expression du récepteur MC1R dans ces cellules, nous pourrons utiliser des siRNA (pour small interfering RNA).

2. **Approfondir les mécanismes de la transactivation :** Il s'agira d'étudier l'effet de l'EGF sur des changements éventuels dans les mécanismes d'internalisation et dans les états de phosphorylation du récepteur MC1R.

3. **Approfondir le mécanisme d'action du KPV :** Nous étudierons trois mécanismes possibles : la voie du Ca^{2+} intracellulaire, la liaison du KPV sur le récepteur à l'IL-1β (Getting *et al.*, 2003b) et l'existence potentielle d'un autre site de liaison sur le récepteur MC1R.

4. **Etude structurale du récepteur MC1R :** Ce projet pourra nous permettre de mieux appréhender la liaison des ligands, l'activation et les mécanismes d'internalisation du récepteur. Ce travail pourra être réalisé en collaboration avec certaines équipes de l'Institut.

MATERIELS

&

METHODES

MATERIELS & METHODES

L'α-MSH, la NDP-MSH et le KPV (Lys-Pro-Val-NH_2) que nous avons utilisé au cours de ce projet de thèse ont été synthétisés au sein de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM, UMR CNRS 5247) de Montpellier.

I. CULTURE CELLULAIRE

I.1. Cellules HaCaT

La lignée HaCaT a été établie par l'équipe du Professeur N.E. Fusenig (Institut de Biochimie, Centre de Recherche sur le Cancer, Heidelberg, Allemagne) à partir de kératinocytes humains spontanément immortalisés. Les cellules sont maintenues dans un milieu de culture DMEM (*Lonza*) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (*Invitrogen*), 2 mM de glutamine (*Lonza*), 25 U/ml de pénicilline et 25 µg/ml de streptomycine (*Lonza*). Les cellules HaCaT sont ensuite conservées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2.

La culture est entretenue deux fois par semaine de la manière suivante : les cellules sont lavées par une solution de PBS (*Lonza*) puis sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (*Lonza*) pendant 20 minutes dans l'incubateur. La solution de trypsine est ensuite inhibée par un volume équivalent de milieu de culture DMEM. Les cellules sont ensuite repiquées dans de nouvelles flasques de culture au 1/10ème environ.

I.2. Cellules HaCaT-MC1R

Les cellules HaCaT-MC1R sont des cellules HaCaT exprimant de manière stable le récepteur MC1R.

Le protocole de transfection de ces cellules a fait l'objet de la thèse de Doctorat de Geneviève Garcin (Garcin, 2007; Garcin *et al.*, 2007; Garcin *et al.*, 2009) et est le suivant : les cellules HaCaT sont ensemencées en boîtes de Pétri à raison de $2{,}5.10^6$ cellules par boîte dans un milieu de culture DMEM sans rouge de phénol (*Lonza*) et sans antibiotiques.

Le lendemain, les cellules sont transfectées avec le plasmide contenant le gène humain codant pour le MC1R de type sauvage (pcDNA3/hMC1R) de la manière suivante : 15 µg de plasmide sont dilués dans 1500 µl d'Opti-MEM® (*Invitrogen*). En parallèle, 15 µl de Lipofectamine 2000™ (*Invitrogen*) sont diluées dans 1500 µl d'Opti-MEM® et incubées 5 minutes à température ambiante. Les deux solutions contenant l'ADN et la Lipofectamine 2000™ sont ensuite mélangées et incubées 20 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite ajouté aux cellules pour une durée de 5 heures avant d'être changé et remplacé par du milieu de culture DMEM sans rouge de phénol et sans antibiotiques.

Le lendemain de la transfection, les cellules sont décollées et diluées au 1/3. Après encore 24 heures, les cellules sont incubées en présence de milieu de culture DMEM supplémenté avec de la généticine (G418) à une concentration finale de 1 mg/ml. Le milieu contenant l'agent de sélection G418 est renouvelé tous les deux jours jusqu'à l'obtention de clones isolés composés de cellules ayant intégrées le gène codant pour le récepteur MC1R. L'obtention de clones isolés prend environ deux à trois semaines.

Les cellules sont cultivées dans le même milieu de culture DMEM et selon le même protocole que pour les cellules HaCaT sauvages (cf. paragraphe I.1.).

I.3. Cellules HaCaT-$R_{151}C$

Une lignée de cellules HaCaT exprimant de manière stable le variant non fonctionnel $R_{151}C$ a été construite selon le même protocole que pour la lignée HaCaT-MC1R (Garcin, 2007; Garcin *et al.*, 2009). Le plasmide contenant le gène codant pour le récepteur $R_{151}C$ nous a été fourni par le Docteur R. Sturm (Université de Queensland, Brisbane, Australie).

II. ETUDES PHARMACOLOGIQUES

II.1. Etude des propriétés de liaison

Deux types de tests de liaison sont couramment utilisés en pharmacologie afin de caractériser l'interaction entre un ligand et son récepteur : le test de liaison par compétition et le test de liaison par saturation. Ces deux tests impliquent l'utilisation d'un ligand radiomarqué. Dans toutes les études réalisées sur le récepteur MC1R, le ligand radiomarqué largement utilisé est un analogue de l'α-MSH, la [^{125}I]-NDP-MSH.

II.1.1. Marquage de la NDP-MSH à l'iode 125

La [^{125}I]-NDP-MSH est préparée à partir de la NDP-MSH selon la méthode à la chloramine T (Chen *et al.*, 1994; Hunter and Greenwood, 1962; Hussain *et al.*, 1993). L'iode 125 est incorporé sur la tyrosine en position 2 de la NDP-MSH. 250 µCi (2,5 µl) de ^{125}I, Na sont ajoutés à 5 µg de NDP-MSH diluée dans 2,5 µl d'un tampon phosphate de sodium (0,5 M, pH 7.4). 2,5 µl de chloramine T (*Sigma*) à 0,5 mg/ml sont ajoutées au mélange réactionnel. La réaction est ensuite arrêtée après 30 secondes par ajout de 100 µl d'une solution de métabisulfite de sodium à 2 mg/ml.

La [^{125}I]-NDP-MSH est purifiée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse sur une colonne de type C18 (gradient de 0 à 100% d'acétonitrile contenant 0,1% de TFA en 20 minutes, débit de 1 ml/min). La fraction de 500 µl contenant le radioligand est aliquotée et conservée à -20°C après ajout de 250 µl de tampon de stockage (Hepes 50 mM, BSA 4%).

II.1.2. Test de liaison par compétition

II.1.2.1. Principe de la technique

Cette technique permet de définir la constante d'affinité (Ki) d'un ligand non radiomarqué pour son récepteur. Les cellules exprimant les sites récepteurs ou des préparations enrichies en ces sites sont mises en présence d'une solution contenant le ligand non marqué et le radioligand. Il s'établit alors une compétition entre le ligand non marqué et le radioligand pour l'occupation des sites récepteurs.

Lors de ces tests, la concentration en radioligand est fixe et la concentration en ligand froid variable. Ainsi, plus la concentration en ligand froid est importante, moins il y aura de ligand radiomarqué fixé aux sites récepteurs.

La courbe de déplacement du radioligand est obtenue en reportant sur un graphique la liaison spécifique du radioligand en fonction du logarithme de la concentration en ligand froid (**Figure 73**).

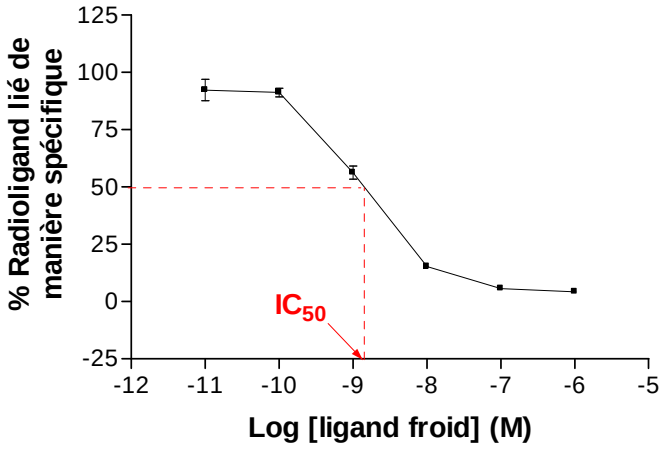


Figure 73 : Test de liaison par compétition. Courbe de déplacement du radioligand.

L'IC_{50} est la concentration en ligand froid qui permet de déplacer 50% de la quantité de radioligand fixée aux récepteurs. L'affinité Ki du ligand pour son récepteur est calculée à partir de la relation de Chang et Prusoff :

$Ki = IC_{50} \times [Kd / (Kd + H)]$

Le Kd représente l'affinité du radioligand pour le site récepteur et H représente la concentration en radioligand utilisée.

II.1.2.2. Protocole

Les cellules sont ensemencées en boîtes 24 puits, à raison de 10^5 cellules par puit. Le lendemain, les cellules sont lavées une fois par une solution de PBS contenant 0,5% de BSA (*Euromedex*). Elles sont ensuite incubées dans un milieu DMEM additionné de 0,5% de BSA et de 0,3 mM de 1,10-phénanthroline (*Sigma*) qui est un inhibiteur de métalloprotéases. Selon les conditions testées, les cellules sont traitées par 100.000 cpm de [^{125}I]-NDP-MSH en présence ou non de concentrations croissantes de ligand froid (α-MSH ou KPV) comprises entre 10^{-11} et 10^{-6} M (volume final de 500 µl) pendant 2 heures à 37°C. A l'issue de l'incubation, les cellules sont lavées deux fois par une solution de PBS contenant 0,5% de BSA puis sont lysées par 200 µl de NaOH 0,1 M (*Sigma*) pendant 30 minutes à 37°C. La radioactivité est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur γ.

Chaque essai est réalisé en triplicat. La liaison non spécifique est mesurée en traitant les cellules par 10^{-6} M de ligand froid seul. Cette radioactivité non spécifique est ensuite soustraite à l'ensemble des échantillons. La liaison totale est mesurée en traitant les cellules par 100.000 cpm de radioligand seul. La radioactivité mesurée est ensuite moyennée puis normalisée à 100%. Pour chaque concentration de ligand froid testée, on détermine le pourcentage de radioligand lié spécifiquement de la manière suivante :

% radioligand lié de manière spécifique = [100 × (échantillon – liaison non spécifique)] / (liaison totale – liaison non spécifique)

II.1.3. Mesure de la production d'AMPc intracellulaire par radio-immunologie

L'activation du récepteur MC1R par un agoniste entraîne le couplage du récepteur aux protéines Gs, l'activation de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc intracellulaire.

II.1.3.1. Principe de la technique

Le principe de base de cette technique de radio-immunologie est la compétition entre un antigène non radioactif et un antigène radioactif pour un nombre fixé de sites de liaison sur l'anticorps. Quand l'antigène non marqué présent dans les échantillons et une quantité fixée d'antigène marqué réagissent avec l'anticorps, on observe une diminution de l'antigène marqué alors que la quantité d'antigène non marqué augmente. En d'autres termes, plus la quantité de radioactivité est faible, plus la production d'AMPc est importante dans les échantillons.

II.1.3.2. Protocole

Les cellules sont cultivées en boîtes 6 puits à raison de 10^5 cellules/puit pendant 48 heures.

Les cellules sont lavées une fois par 500 µl d'une solution de PBS contenant 2% de BSA. Les cellules sont ensuite incubées 1 heure à 37°C dans un milieu MEM (*Invitrogen*) contenant de l'IBMX (*Sigma*) à 10^{-3} M, en présence de concentrations d'α-MSH de 10^{-11}, 10^{-9} et 10^{-6} M (volume final de 500 µl). L'IBMX est un inhibiteur de phosphodiestérases, enzymes dégradant l'AMPc. Chaque essai est réalisé en triplicat. Un témoin positif est inclut pour chaque test : il consiste à incuber les cellules en présence de forskoline (*Sigma*). Ce composé va interagir directement avec l'adénylate cyclase pour stimuler la production intracellulaire d'AMPc.

Un échantillon incubé seulement en présence de milieu de culture permettra de déterminer le niveau basal d'AMPc présent dans les cellules.

A la fin de l'incubation, les cellules sont placées sur un lit de glace et lavées deux fois par une solution de PBS contenant 2% de BSA préalablement refroidie (4°C). Les cellules sont perméabilisées par une solution glacée d'éthanol 65%. Après une heure d'incubation dans la glace, le surnageant est récupéré.

Le protocole de mesure de l'AMPc intracellulaire employé correspond à la procédure « acétylée » décrite dans le kit cAMP [^{125}I] « radioimmuneassay » (*PerkinElmer Life Sciences Inc.*). Une gamme étalon d'AMPc de 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 et 4 pmol/ml est préparée à l'aide de la solution stock d'AMPc à 50.000 pmol/l fournie. Les standards sont acétylés par 10 µl d'un mélange 2/3 triéthylamine, 1/3 anhydride acétique (réactif d'acétylation). Les échantillons sont d'abord dilués 5 fois puis 100 µl d'échantillon est acétylé par 5 µl de réactif d'acétylation. 900 µl de tampon AMPc est ajouté dans chaque tube. Les échantillons sont donc dilués au 1/50ème. Les standards sont, quant à eux, dilués avec le tampon AMPc acétylé.

100 µl de solution « traceur » (marqueur radioactif + sérum) est ajouté dans tous les tubes. En parallèle, un blanc est préparé (tampon AMPc + solution « traceur ») ainsi qu'un zéro (tampon AMPc + solution « traceur » + complexe antisérum). Les échantillons ainsi que la gamme sont incubés pendant 16 à 18 heures à 4°C avec 100 µl de solution « traceur ». A l'issue de l'incubation, les complexes sont précipités puis les tubes sont centrifugés (15 minutes, 1.200 g, 4°C). Les culots sont analysés à l'aide d'un compteur γ.

II.1.4. Mesure de la production d'AMPc intracellulaire par immunofluorescence

II.1.4.1. Principe de la technique

Le test AMPc LANCE (*PerkinElmer Life Sciences Inc.*) est un test immunologique impliquant la technologie du FRET (pour Fluorescence Resonance Energy Transfer) en temps résolu.

Ce test est basé sur la compétition entre un complexe traceur AMPc lié à l'europium et l'échantillon, pour les sites de liaison présents sur des anticorps spécifiques marqués par la sonde Alexa Fluor 647.

Lorsque les anticorps sont liés au complexe traceur, un pulse à 340 nm excite les molécules chélatées à l'europium du traceur. L'énergie émise est transférée à la molécule d'Alexa sur les anticorps, qui émet alors à 665 nm (**Figure 74**). La fluorescence mesurée à 665 nm diminue donc en présence d'AMPc et par conséquent, le signal résultant est inversement proportionnel à la concentration d'AMPc présente dans l'échantillon.

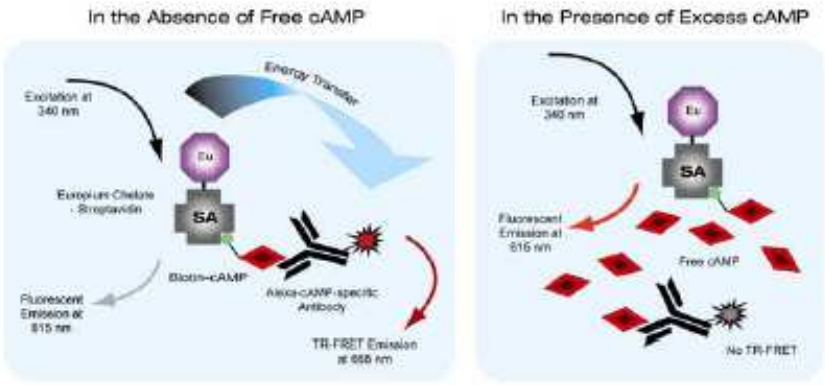


Figure 74 : Principe du test AMPc LANCE

II.1.4.2. Préparation des échantillons

Les cellules sont cultivées en flasque de 175 cm^2 48 heures avant l'expérience. Au bout de 48 heures, les cellules HaCaT sont décollées par une solution de trypsine-EDTA pendant 20 minutes à 37°C dans l'incubateur. La trypsine est ensuite inhibée par un volume équivalent de milieu de culture DMEM. Puis, les cellules sont centrifugées (5 minutes, 1.200 g) puis lavées une fois par une solution d'HBSS (pour Hank's Buffered Salt Solution).

Les cellules sont ensuite resuspendues dans le tampon de stimulation à une concentration de $1{,}67.10^5$ cellules/ml.

On ajoute ensuite l'anticorps anti-AMPc marqué à l'Alexa Fluor 647, dilué au 1/100ème, aux différentes suspensions cellulaires et les différentes dilutions de composés à tester sont préparées (**Tableau 18**).

Composé		[Initiale] (M)	[Finale] (M)
Milieu de stimulation	Contrôle négatif	-	-
α-MSH	Agoniste du MC1R	2.10^{-6}	10^{-6}
PD98059	Inhibiteur de ERK	4.10^{-5}	2.10^{-5}
PD153035	Inhibiteur de l'EGFR	1.10^{-6}	5.10^{-7}
Forskoline	Contrôle positif	2.10^{-5}	10^{-5}

Tableau 18 : Dilutions des composés à tester pour le dosage de l'AMPc.

II.1.4.3. Dosage de la production d'AMPc

Dans une plaque de 96 puits (*PerkinElmer Life Sciences Inc.*), on ajoute 6 µl des différents échantillons à tester : standards AMPc, composés, milieu d'incubation et forskoline. Ensuite, on ajoute 6 µl de suspension cellulaire contenant l'anticorps anti-AMPc couplé à l'Alexa Fluor 647 et on incube la plaque 1 heure à température ambiante. A l'issue de l'incubation, on ajoute 12 µl de mélange de détection contenant la streptavidine couplée à l'europium et la biotine-AMPc et on incube la plaque 1 heure à température ambiante. Les signaux de FRET en temps résolu sont mesurés par un lecteur TRF (VICTOR, *PerkinElmer Life Sciences Inc.*).

III. ETUDE DE L'EXPRESSION DU MC1R PAR PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

III.1. Extraction de l'ARNm par le TRIzol®

Les cellules sont cultivées en boîtes 6 puits à raison de 2.10^5 cellules par puit et traitées selon l'étude à réaliser.

L'extraction des ARN totaux est réalisée selon le protocole décrit par *Invitrogen* pour le réactif TRIzol®. Les cellules sont lysées par ajout de TRIzol®, scrappées, homogénéisées et aliquotées en tube Eppendorf. Les échantillons sont mis à incuber 5 minutes à température ambiante afin de permettre une complète dissociation des complexes nucléoprotéiques. L'ajout de chloroforme suivi d'une étape de centrifugation (15 minutes, 12.000 g, 4°C) permet la séparation de la solution en une phase aqueuse contenant l'ARN et en une phase organique contenant l'ADN. L'ARN est précipité par ajout d'alcool isopropylique. Après un temps d'incubation de 10 minutes à température ambiante, les échantillons sont centrifugés (10 minutes, 12.000 g, 4°C). Le culot est lavé par de l'éthanol 75%. Après une nouvelle étape de centrifugation (5 minutes, 7.500 g, 4°C), le culot d'ARN est séché, dissous dans de l'eau DEPC (*Invitrogen*) et incubé 10 minutes à 55°C.

La quantité d'ARN présente dans chaque échantillon est évaluée après mesure de la densité optique (DO) à 260 nm d'une fraction de l'échantillon, sachant qu'une unité de DO équivaut à 40 µg/ml d'ARN. Les ARN sont conservés à -80°C.

III.2. Transcription inverse

L'étape de transcription inverse va permettre, à partir de l'ARN isolé, la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc).

Cette synthèse nécessite l'utilisation d'une ADN polymérase ARN dépendante (M-MLV, *Invitrogen*), d'une amorce anti-sens et d'un mélange des quatre déoxyribonucléotides triphosphates : dATP, dGTP, dCTP, dTTP (dNTP, *Invitrogen*). Dans notre cas, nous utilisons une amorce poly-T qui va se fixer spécifiquement à la queue poly-A des ARNm et permettre ainsi la synthèse des ADNc de tous les ARNm présents dans l'échantillon.

En pratique, 2 µg d'ARN sont mélangés avec 1 µl d'oligo-dT (*Invitrogen*) et 1 µl de dNTP puis sont incubés 5 minutes à 65°C. Ensuite, 4 µl de tampon 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM, $MgCl_2$ 15 mM), 2 µl de DTT (*Euromedex*) et 1 µl de polymérase sont ajoutés. Le milieu réactionnel est ajusté à 20 µl avec de l'eau DEPC et mis à incuber à 37°C pendant 50 minutes puis à 70°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont conservés à -80°C.

III.3. PCR quantitative en temps réel

III.3.1. Principe de la qPCR

La PCR quantitative en temps réel ou qPCR est basée sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé au cours de la réaction de PCR. La détection en temps réel est réalisée grâce au couplage d'un thermocycler et d'un fluorimètre. Le marqueur fluorescent utilisé au cours des différentes études réalisées est le SYBR Green I (**Figure 75**).

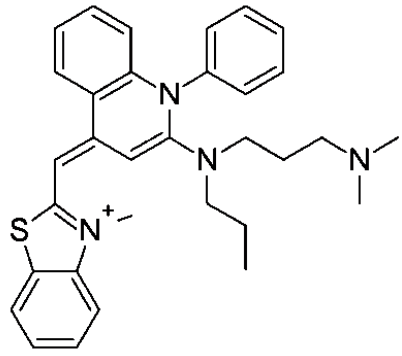


Figure 75 : Structure du SYBR Green I

Ce fluorophore se fixe dans le petit sillon de la double hélice d'ADN de manière régulière (environ 1 molécule toutes les 10 paires de bases) entraînant l'émission d'une fluorescence à 530 nm alors que la fluorescence du colorant en solution, non fixé à l'ADN, est négligeable. Ainsi, le signal fluorescent émis au cours de la réaction de PCR est proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé et à la longueur des fragments amplifiés.

L'inconvénient majeur de ce type de marqueur est son absence de spécificité étant donné qu'il se fixe sur n'importe quelle séquence d'ADN présente dans le milieu réactionnel. La spécificité du signal amplifié est contrôlée en analysant les courbes de fusion obtenues en fin de PCR et qui donnent les températures de fusion (Tm) des produits amplifiés.

Pour chaque échantillon analysé, un contrôle interne est utilisé. Il permet de normaliser les résultats. Nous avons utilisé la β-actine lors de nos travaux.

III.3.2. Etude de l'expression du MC1R

L'ADNc de nos échantillons est dilué cinq fois avant d'être utilisé en qPCR. Le protocole employé est celui décrit par Roche pour le marqueur SYBR Green I (LightCycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, *Roche*).

Les différentes amorces employées au cours de nos travaux sont décrites dans le **Tableau 19**.

	Amorce sens	Amorce anti-sens
MC1R	TGTCGTCTTCAGCACGCTCTT	CGTACAGCACGGCCATGA
β-actine	CTGAGCTCGCCAGTGAATG	TTTAGGGGCCATCAGCTTCAAA

Tableau 19: Amorces utilisées pour l'étude du MC1R par qPCR. Sont également mentionnées les amorces utilisées pour le contrôle β-actine.

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- **Phase de dénaturation initiale** : 95°C pendant 10 minutes ;
- **Phase d'amplification** : 40 cycles au total, chacun constitué des phases suivantes : dénaturation (95°C pendant 10 secondes), hybridation (58°C pendant 10 secondes) et élongation (72°C pendant 10 secondes) ;
- **Courbe de fusion** : de 50°C à 95°C avec une rampe de 0,1°C par seconde.

IV. METHODOLOGIE GENERALE D'IRRADIATION DES CELLULES

Les cellules, cultivées en flasques de 75 cm^2, sont lavées une fois par du PBS stérile puis sont décollées par une solution de trypsine-EDTA pendant 20 minutes à 37°C dans l'incubateur. Une fois les cellules décollées, la trypsine est inhibée par un volume équivalent de milieu de culture DMEM. Puis, les cellules sont centrifugées (5 minutes, 1.200 g) puis lavées une fois par une solution de PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal décomplémenté. A l'issue de la dernière centrifugation, les cellules sont resuspendues dans la solution de PBS contenant 1% de sérum de veau fœtal décomplémenté (milieu d'irradiation). Pour les expériences d'irradiation, on utilise des boîtes de Pétri de 10 mm^2, sans les couvercles, dans lesquelles on introduit 1 ml de cellules afin de former une fine couche de cellules en suspension.

Nous disposons au sein du laboratoire d'une lampe médicale Waldmann 800k qui délivre soit des UVA (spectre d'émission compris entre 320 nm et 400 nm) soit des UVB (spectre d'émission compris entre 280 nm et 320 nm). L'appareil est équipé de lampes Philips 40W pour les UVA et de lampes Philips de type TL 20W/12RS pour les UVB.

L'irradiance des lampes, exprimée en mW/cm^2, est mesurée avec un UV-mètre de type Waldmann. La dose d'UV, exprimée en mJ/cm^2, reçue par les cellules est proportionnelle à l'irradiance des lampes et au temps d'exposition des cellules :

Dose UV (mJ/cm^2) = Irradiance (mW/cm^2) × Temps d'exposition (s)

L'irradiance de la lampe a été mesurée très régulièrement et est restée stable à 4 mW/cm^2 pour les UVA (**Tableau 20**) et à 0,43 mW/cm^2 pour les UVB (**Tableau 21**) tout au long des différentes expériences réalisées.

Dose UVA (J/cm^2)	Temps d'exposition (minutes)
0,6	2'30
1,5	6'15
3	12'30
6	25
9	37'30

Tableau 20: Temps d'exposition des cellules HaCaT aux UVA dans les différentes expériences.

Dose UVB (mJ/cm^2)	Temps d'exposition (minutes)
30	1'22
60	2'44
90	4'06
150	5'11
300	10'22

Tableau 21 : Temps d'exposition des cellules HaCaT aux UVB dans les différentes expériences.

Après l'irradiation, les cellules sont remises à l'incubateur avec le traitement approprié à l'expérience ou utilisées immédiatement selon l'étude réalisée.

V. MESURE DU STRESS NITRIQUE

Le DAF-FM diacétate est un réactif permettant de quantifier de faibles concentrations d'oxyde nitrique. Développée en 1998 par Kojima *et al.* (Kojima *et al.*, 1998a; Kojima *et al.*, 1998b), cette sonde est essentiellement non fluorescente sous forme libre mais lorsqu'elle réagit avec l'oxyde nitrique, elle forme un benzotriazole fluorescent (**Figure 76**). Le DAF-FM diacétate est un composé perméant qui diffuse à travers les membranes biologiques. Une fois dans les cellules, il est déacétylé par des estérases intracellulaires et devient le DAF-FM.

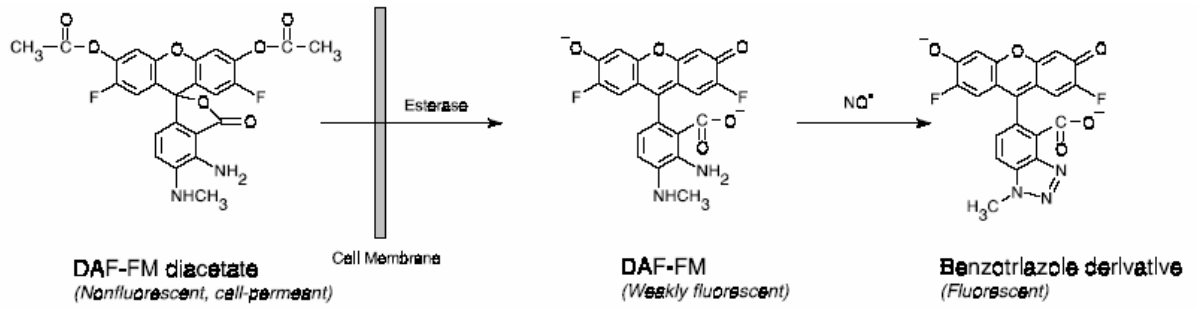


Figure 76: Schéma réactionnel de la détection de l'oxyde nitrique par le DAF-FM diacétate. Illustration extraite de http://www.invitrogen.fr

V.1. Induction par les UVA

Les cellules sont irradiées par 0.6, 1.5, 3, 6 et 9 J/cm^2 d'UVA (cf. paragraphe IV). En parallèle, un témoin non irradié est conservé dans l'incubateur. A l'issue de l'irradiation, les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2 pendant 1 heure. A l'issue de l'incubation, les cellules sont marquées par 1 µM de DAF-FM diacétate (*Invitrogen*) pendant 1 heure à 37°C et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite centrifugées puis incubées 15 minutes supplémentaires à 37°C et à l'obscurité afin de permettre la complète dé-estérification des groupements diacétates intracellulaires. Les cellules sont ensuite aliquotées dans des tubes de cytométrie puis sont centrifugées (5 minutes, 1.000 g, 20°C).

Afin de mesurer la viabilité cellulaire, les cellules sont resuspendues dans 5 µg/ml d'iodure de propidium (*Sigma*) dans le PBS et sont incubées 15 minutes à température ambiante. La morphologie et la fluorescence des cellules sont ensuite mesurées par cytométrie en flux (FACScan, Beckton Dickinson, France). Les données sont ensuite traitées par le logiciel DakoCytomation (Summit, Fort Collins, CO).

V.2. Mesure en présence d'α-MSH

Les cellules sont traitées par 1 µM d'α-MSH (**Figure 17**), un agoniste du récepteur MC1R, pendant 1 heure avant d'être irradiées par les différentes doses d'UVA (cf. paragraphe V.1).

VI. MESURE DU STRESS OXYDATIF

VI.1. Mesure des ERO intracellulaires

Le carboxy-H_2DCF-DA (**Figure 77**) est un dérivé perméant de la fluorescéine spécifique des ERO intracellulaires. Le carboxy-H_2DCF-DA n'est pas fluorescent sous forme acétylée. Mais, lorsque les groupements acétates sont clivés par les estérases intracellulaires et que l'oxydation a eu lieu dans la cellule (Brandt and Keston, 1965; Cathcart *et al.*, 1983; Jakubowski and Bartosz, 2000; Keston and Brandt, 1965), la sonde émet une fluorescence qui est directement relié au stress oxydatif produit par la cellule.

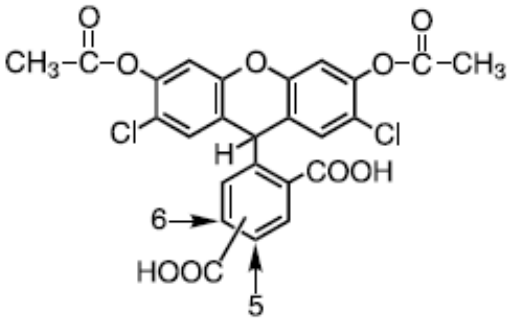


Figure 77: Structure du carboxy-H_2DCF-DA.
Illustration extraite de http://www.invitrogen.com

VI.1.1. Protocole général

Les cellules sont irradiées par 30, 60, 90, 150 et 300 mJ/cm^2 d'UVB ou par 0.6, 1.5, 3, 6 et 9 J/cm^2 d'UVA (cf. paragraphe IV). En parallèle, un témoin non irradié est conservé dans l'incubateur. Immédiatement après irradiation, les cellules sont marquées par 10 µM de carboxy-H_2DCF-DA (*Invitrogen*) pendant 1 heure à 37°C et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite aliquotées dans des tubes de cytométrie puis sont centrifugées (5 minutes, 1.000 g, 20°C). Afin de mesurer la viabilité cellulaire, les cellules sont resuspendues dans 5 µg/ml d'iodure de propidium dans le PBS et sont incubées 15 minutes à température ambiante. La morphologie et la fluorescence des cellules sont ensuite mesurées par cytométrie en flux (FACScan, Beckton Dickinson, France). Les données sont ensuite traitées par le logiciel DakoCytomation (Summit, Fort Collins, CO).

VI.1.2. Mesure en présence d'α-MSH

Les cellules sont traitées par 1 µM d'α-MSH (**Figure 17**) pendant 1 heure avant d'être irradiées par 0.6, 1.5, 3, 6 et 9 J/cm^2 d'UVA.

VI.1.3. Mesure en présence de KPV

Les cellules sont traitées par 1 µM de KPV (**Figure 17**) pendant 1 heure avant d'être irradiées par 9 J/cm^2 d'UVA.

VI.1.4. Mesure en présence d'acide caféique

Les cellules sont traitées par 50 et 80 µg/ml d'acide caféique (*Sigma*) (**Figure 50**) pendant 24 heures avant d'être irradiées par 9 J/cm^2 d'UVA.

VI.1.5. Mesure en présence de bétuline

Les cellules sont traitées par 1,6 µg/ml de bétuline (*Sigma*) (**Figure 52**) pendant 24 heures avant d'être irradiées par 9 J/cm^2 d'UVA.

VI.1.6. Mesure en présence de Médiacalm

Les cellules sont traitées par 0,1% et 0,5% de Médiacalm (*Silab*) pendant 24 heures avant d'être irradiées par 9 J/cm^2 d'UVA.

VI.1.7. Mesure en présence d'apocynine

Les cellules sont traitées par 10 µM d'apocynine (*Calbiochem*), un inhibiteur du système NADPH oxydase, pendant 1 heure avant d'être irradiées par 3, 6 et 9 J/cm^2 d'UVA.

VI.1.8. Mesure en présence d'H-89

Les cellules sont traitées par 5 µM d'H-89 (*Calbiochem*), un inhibiteur de la PKA (**Figure 58**), pendant 1 heure avant d'être irradiées par 9 J/cm^2 d'UVA.

VI.1.9. Mesure en présence de forskoline

Les cellules sont traitées pendant 1 heure avec 1 mM d'IBMX, un inhibiteur de phosphodiestérases, puis avec 10 µM de forskoline (**Figure 62**), un activateur d'adénylate cyclase, pendant 1 heure avant d'être irradiées par 9 J/cm^2 d'UVA.

VI.1.10. Mesure en présence de PD153035

Les cellules sont traitées pendant 1 heure avec 0,5 µM de PD153035 (*Calbiochem*), un inhibiteur de l'EGFR, pendant 1 heure avant d'être irradiées par 9 J/cm^2 d'UVA.

VI.1.11. Mesure en présence de PD98059

Les cellules sont traitées pendant 1 heure avec 20 µM de PD98059 (*Calbiochem*), un inhibiteur de ERK, pendant 1 heure avant d'être irradiées par 9 J/cm^2 d'UVA.

VI.2. Mesure des ERO mitochondriales

Nous avons mesuré la production d'espèces réactives de l'oxygène mitochondriale, l'$O_2^{\bullet-}$ à l'aide d'une sonde spécifique, le MitoSox™ (Mukhopadhyay *et al.*, 2007a; Mukhopadhyay *et al.*, 2007b). Le MitoSox™ permet la détection sélective de $O_2^{\bullet-}$ dans la mitochondrie des cellules vivantes. La charge positive du groupement phosphonium du MitoSox™ cible de façon sélective la mitochondrie, où ce fluorochrome s'accumule en fonction du potentiel membranaire mitochondrial et émet alors une fluorescence rouge après oxydation par $O_2^{\bullet-}$ (Robinson et al., 2006).

VI.2.1. Induction par les UVA

Les cellules sont irradiées par 3, 6 et 9 J/cm^2 d'UVA (cf. paragraphe IV). En parallèle, un témoin non irradié est conservé dans l'incubateur. Immédiatement après irradiation, les cellules sont marquées par 5 µM de MitoSox™ (*Invitrogen*) pendant 10 minutes à 37°C et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite aliquotées dans des tubes de cytométrie puis sont centrifugées (5 minutes, 1.000 g, 20°C). La morphologie et la fluorescence des cellules sont ensuite mesurées par cytométrie en flux (FACScan, Beckton Dickinson, France). Les données sont ensuite traitées par le logiciel DakoCytomation (Summit, Fort Collins, CO).

VI.2.2. Induction par l'antimycine A

L'antimycine A est un inhibiteur du complexe III de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons connu pour induire la production d'$O_2^{\bullet-}$.

Les cellules sont traitées par 50 µM d'antimycine A (*Sigma*) pendant 1 heure. A l'issue de l'incubation, les cellules sont marquées par 5 µM de MitoSox™ pendant 10 minutes à 37°C et à l'obscurité. Les cellules sont ensuite aliquotées dans des tubes de cytométrie puis sont centrifugées (5 minutes, 1.000 g, 20°C).

La morphologie et la fluorescence des cellules sont ensuite mesurées par cytométrie en flux (FACScan, Beckton Dickinson, France). Les données sont ensuite traitées par le logiciel DakoCytomation (Summit, Fort Collins, CO).

VII. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE

VII.1. Principe de la technique

Le test de cytotoxicité MTT est une méthode rapide de numérisation des cellules vivantes (Mosmann, 1983). Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2,5-diphényltétrazolium). Le MTT (*Sigma*) est un colorant jaune qui est oxydé par la succinate deshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en cristaux de formazan de couleur bleue (Slater *et al.*, 1963). L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique.

VII.2. Protocole

Les cellules HaCaT sont cultivées en plaques 96 puits à une densité de 10.000 cellules/puit dans 100 µl de milieu de culture DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2. Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence (au bout de 24 heures environ), le milieu DMEM est retiré. Les cellules sont ensuite traitées par différentes concentrations de composés dans un milieu DMEM dépourvu de sérum en six essais pendant 24 heures. Au bout de 24 heures, la solution de MTT (10 µl, 5 mg/ml) est ajoutée dans chaque puit. Deux heures après, le milieu est aspiré et les cristaux violets de formazan sont dissous dans 100 µl de tampon de lyse (50% DMF, 20% SDS, 30% H_2O).

L'absorbance est détectée à 570 nm et à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à lecteur de plaques (VICTOR, *PerkinElmer Life Sciences Inc.*). Le pourcentage de viabilité cellulaire est calculé de la façon suivante :

$$\frac{(DO570nm - DO660nm \text{ cellules traitées}) - \text{moyenne } (DO570nm - DO660nm \text{ milieu seul})}{(DO570nm - DO660nm \text{ cellules non traitées}) - \text{moyenne } (DO570nm - DO660nm \text{ milieu seul})}$$

VIII. DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD

VIII.1. Principe du dosage

La méthode de Bradford (Bradford, 1976) est un dosage colorimétrique se manifestant par le changement de couleur du bleu de Coomassie après complexation avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. La forme anionique liée du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 595 nm. Les formes cationiques libres du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

VIII.2. Protocole

Dans un premier temps, une gamme étalon de BSA de 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 et 15 mg/ml est préparée à partir d'une solution stock à 15 mg/ml diluée dans du tampon de lyse RIPA (cf. annexe 1). En parallèle, 3 µl de chaque échantillon à doser est prélevé dans un tube à hémolyse. Puis, 2,5 ml de réactif de Bradford (*Biorad*) dilué au 1/5ème dans l'eau est ajouté dans chaque tube. Les tubes sont mis à incuber 15 à 30 minutes à température ambiante et l'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption.

IX. PROTOCOLE DE CO-IMMUNOPRÉCIPITATION

IX.1. Principe de la technique

L'immunoprécipitation (**Figure 78**) est une technique utilisant des anticorps spécifiques à la protéine d'intérêt afin de la piéger dans un lysat cellulaire. Les complexes anticorps/protéine sont précipités par l'ajout d'une forme insoluble de protéine A ou de protéine G.

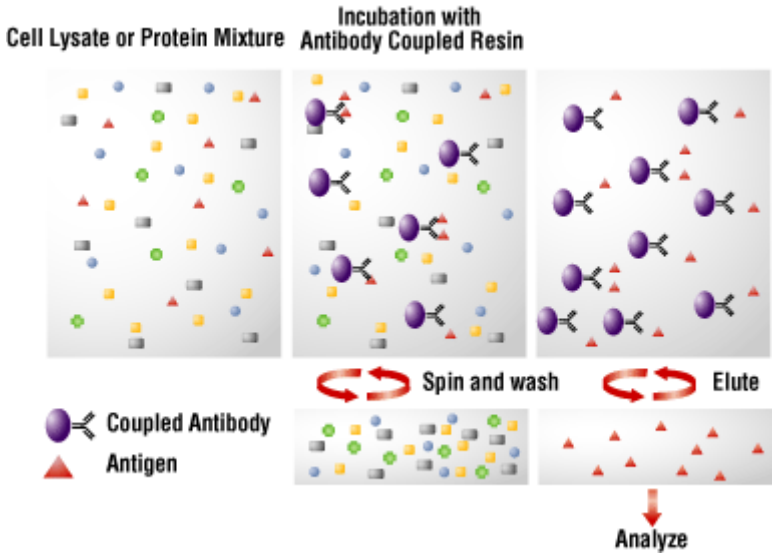


Figure 78: Principe de l'immunoprécipitation.
Illustration extraite de http://thunder.biosci.umbc.edu

IX.2. Préparation des échantillons cellulaires

Les cellules sont cultivées en boîtes de Pétri de 10 cm^2 pendant 48 heures environ. Lorsque les cellules atteignent 70 à 80% de confluence, le milieu DMEM est retiré. Les cellules sont lavées deux fois par du PBS glacé puis 1 ml de tampon de lyse RIPA (cf. annexe 1) est ajouté dans chaque boîte de Pétri. Les cellules sont mises à incuber 10 à 15 minutes sur la glace.

A l'issue de l'incubation, les cellules sont transférées dans un tube Eppendorf et sont centrifugées (10 minutes, 12.000 g, 4°C) afin d'éliminer les particules. Le surnageant est conservé sur la glace.

IX.3. Protocole

L'anticorps anti-NoxA1 dilué au 1/500ème (*AbNova*) est ajouté à 500 µl de lysat cellulaire. Les complexes antigène/anticorps sont mis en présence une nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, 50 µl de billes de protéine G (*GE Healthcare*) sont ajoutés pendant 4 heures à 4°C et sous agitation. A l'issue de l'incubation, les complexes immuns sont centrifugés (20 secondes, 12.000 g, 4°C) et le culot est conservé. Le culot est lavé trois fois avec le tampon de lyse RIPA (cf. annexe 1) et une fois avec le tampon de lavage (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0). Les échantillons sont centrifugés (20 secondes, 12.000 g, 4°C) entre les lavages. Le culot de chaque échantillon est resuspendu dans 30 µl de tampon de charge (cf. annexe 1) et est dénaturé pendant 30 minutes à 95°C. Après une dernière étape de centrifugation (20 secondes, 12.000 g, 4°C), le surnageant est traité par 1 µl de bleu de bromophénol (*Sigma*) à 0,1%. Les échantillons sont ensuite analysés par Western-Blot.

X. ANALYSE DES PROTEINES D'INTERET PAR WESTERN-BLOT

X.1. Principe de la technique

Cette technique permet de détecter une protéine spécifique dans un échantillon donné d'extrait ou d'homogénat tissulaire. La technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines, préalablement dénaturées, selon leur masse. Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. La méthode fut mise au point dans le laboratoire de George Stark à Stanford.

X.2. Séparation et transfert des protéines

Les protéines (20 µg) sont déposées sur un gel composé de 5% d'acrylamide/bisacrylamide (cf. annexe 1). Ce dernier va permettre la concentration des échantillons avant leur pénétration dans un gel de séparation constitué d'un mélange à 10% d'acrylamide/bisacrylamide (cf. annexe 1). La séparation des protéines se fait par électrophorèse dans un tampon de migration 1X (cf. annexe 1) dans un champ électrique de 130 V et pendant 90 minutes. A la fin de la migration, le gel de concentration est éliminé.

La membrane de nitrocellulose est incubée pendant 20 minutes dans du tampon de transfert 1X froid (cf. annexe 1). Le gel et la membrane sont alors disposés en sandwich entre des feuilles de papier Whatmann et des spontex imbibés de tampon de transfert 1X froid, dans un module de transfert. Le module est disposé dans une cuve contenant du tampon de transfert 1X froid (cf. annexe 1) et un bac à glaçon permettant de maintenir le module au froid. Le transfert est effectué à 100 V, pendant 50 minutes et sous agitation. A l'issue du transfert, la membrane est incubée en présence de rouge Ponceau afin de vérifier que la quantité de protéine déposée est homogène d'un puit à l'autre.

X.3. Détection des protéines d'intérêt

La membrane de nitrocellulose est incubée une heure dans un tampon de blocage contenant 5% de lait (cf. annexe 1). Cette étape permet de saturer tous les sites non occupés de la membrane ce qui va permettre de diminuer le bruit de fond généré par la fixation de l'anticorps primaire. La membrane est ensuite lavée trois fois 5 minutes avec du tampon TTBS (cf. annexe 1). Puis, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C et sous agitation, en présence des anticorps primaires NoxA1 ou phospho-(Ser/Thr) PKA substrate (*Cell Signaling*) dilués au 1/1000ème dans une solution de TTBS contenant 5% de BSA (cf. annexe 1).

Le lendemain, la membrane est lavée trois fois 5 minutes avec le tampon TTBS (cf. annexe 1). Puis, elle est incubée durant une heure à température ambiante et sous agitation, en présence des anticorps secondaires anti-lapin (*Cell Signaling*) et anti-souris (*Sigma*) couplés à la péroxydase de raifort (HRP pour Horseradish Peroxidase) dilués au 1/1000ème dans une solution de TTBS contenant 5% de lait (cf. annexe 1). A l'issue de l'incubation, la membrane est lavée trois fois 5 minutes avec le tampon TTBS (cf. annexe 1). La membrane est incubée en présence d'H_2O_2 et de luminol (kit ECL Plus, *GE Healthcare*) pendant 5 minutes. Le luminol est le substrat de la péroxydase, la dégradation de celui-ci par la HRP s'accompagne de l'émission de photons. Cette émission est révélée par imagerie. Les blots sont révélés par le logiciel Bio1D (Vilmer Lourmat, Marne la Vallée, France) et sont exprimés en densités optiques relative (ROD).

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I, Akcali C, Harriger MD, Boyce ST*, et al.* (1995) Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1789-1793.

Abdel-Malek ZA, Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Todorovic A, Koikov LN, McNulty JC*, et al.* (2006) Melanoma prevention strategy based on using tetrapeptide alpha-MSH analogs that protect human melanocytes from UV-induced DNA damage and cytotoxicity. *FASEB J* 20:1561-1563.

Abdel-Malek ZA, Ruwe A, Kavanagh-Starner R, Kadekaro AL, Swope V, Haskell-Luevano C*, et al.* (2009) alpha-MSH tripeptide analogs activate the melanocortin 1 receptor and reduce UV-induced DNA damage in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:635-644.

Abdel-Malek ZA, Scott MC, Furumura M, Lamoreux ML, Ollmann M, Barsh GS*, et al.* (2001) The melanocortin 1 receptor is the principal mediator of the effects of agouti signaling protein on mammalian melanocytes. *J Cell Sci* 114:1019-1024.

Aberdam E, Bertolotto C, Sviderskaya EV, de Thillot V, Hemesath TJ, Fisher DE*, et al.* (1998) Involvement of microphthalmia in the inhibition of melanocyte lineage differentiation and of melanogenesis by agouti signal protein. *J Biol Chem* 273:19560-19565.

Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR (2007) Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci* 27:1129-1138.

Adachi S, Nakano T, Vliagoftis H, Metcalfe DD (1999) Receptor-mediated modulation of murine mast cell function by alpha-melanocyte stimulating hormone. *J Immunol* 163:3363-3368.

Adam-Vizi V, Chinopoulos C (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 27:639-645.

Adan RA (2006) Constitutive receptor activity series: endogenous inverse agonists and constitutive receptor activity in the melanocortin system. *Trends Pharmacol Sci* 27:183-186.

Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H (2005) Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res* 571:153-173.

Alakurtti S, Makela T, Koskimies S, Yli-Kauhaluoma J (2006) Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci* 29:1-13.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.

Allombert-Blaise C, Tamiji S, Mortier L, Fauvel H, Tual M, Delaporte E*, et al.* (2003) Terminal differentiation of human epidermal keratinocytes involves mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway. *Cell Death Differ* 10:850-852.

Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP (2004) Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* 279:45935-45941.

Ameziane-El-Hassani R, Morand S, Boucher JL, Frapart YM, Apostolou D, Agnandji D*, et al.* (2005) Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca2+-dependent H2O2-generating activity. *J Biol Chem* 280:30046-30054.

Amiri KI, Richmond A (2005) Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24:301-313.

An SM, Lee SI, Choi SW, Moon SW, Boo YC (2008) p-Coumaric acid, a constituent of Sasa quelpaertensis Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by alpha-melanocyte stimulating hormone. *Br J Dermatol* 159:292-299.

Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70:200-214.

Angers S, Salahpour A, Bouvier M (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:409-435.

Antunes F, Salvador A, Pinto RE (1995) PHGPx and phospholipase A2/GPx: comparative importance on the reduction of hydroperoxides in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 19:669-677.

Aoki H, Moro O (2002) Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R). *Life Sci* 71:2171-2179.

Aragay AM, Mellado M, Frade JM, Martin AM, Jimenez-Sainz MC, Martinez AC*, et al.* (1998) Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2985-2990.

Archer S (1993) Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 7:349-360.

Arthur DB, Akassoglou K, Insel PA (2006) P2Y2 and TrkA receptors interact with Src family kinase for neuronal differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 347:678-682.

Assefa Z, Garmyn M, Vantieghem A, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede JR*, et al.* (2003a) Ultraviolet B radiation-induced apoptosis in human keratinocytes: cytosolic activation of procaspase-8 and the role of Bcl-2. *FEBS Lett* 540:125-132.

Assefa Z, Yaita T, Haire RG, Tachimori S (2003b) Photoluminescence and raman studies of curium and americium complexes of 6-methyl 2-(2-pyridyl)-benzimidazole: evidence for an efficient intramolecular energy transfer. *Inorg Chem* 42:7375-7377.

Atchley WR, Fitch WM (1997) A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5172-5176.

B

Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 397:342-344.

Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB*, et al.* (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272:217-221.

Bagchi D, Carryl OR, Tran MX, Bagchi M, Vuchetich PJ, Krohn RL*, et al.* (1997) Protection against chemically-induced oxidative gastrointestinal tissue injury in rats by bismuth salts. *Dig Dis Sci* 42:1890-1900.

Baier J, Maisch T, Maier M, Landthaler M, Baumler W (2007) Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin. *J Invest Dermatol* 127:1498-1506.

Baig AH, Swords FM, Noon LA, King PJ, Hunyady L, Clark AJ (2001) Desensitization of the Y1 cell adrenocorticotropin receptor: evidence for a restricted heterologous mechanism implying a role for receptor-effector complexes. *J Biol Chem* 276:44792-44797.

Baines CP, Molkentin JD (2005) STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 38:47-62.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483-495.

Baliga MS, Katiyar SK (2006) Chemoprevention of photocarcinogenesis by selected dietary botanicals. *Photochem Photobiol Sci* 5:243-253.

Ballif BA, Blenis J (2001) Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ* 12:397-408.

Banfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH (2003) Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 278:3510-3513.

Banfi B, Maturana A, Jaconi S, Arnaudeau S, Laforge T, Sinha B*, et al.* (2000) A mammalian H+ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science* 287:138-142.

Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demaurex N*, et al.* (2001) A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 276:37594-37601.

Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ*, et al.* (2004) Mechanism of Ca2+ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 279:18583-18591.

Barbier AJ, Poppleton HM, Yigzaw Y, Mullenix JB, Wiepz GJ, Bertics PJ*, et al.* (1999) Transmodulation of epidermal growth factor receptor function by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 274:14067-14073.

Barsh G, Gunn T, He L, Schlossman S, Duke-Cohan J (2000) Biochemical and genetic studies of pigment-type switching. *Pigment Cell Res* 13 Suppl 8:48-53.

Bastiaens MT, ter Huurne JA, Kielich C, Gruis NA, Westendorp RG, Vermeer BJ*, et al.* (2001) Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair. *Am J Hum Genet* 68:884-894.

Batandier C, Fontaine E, Keriel C, Leverve XM (2002) Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *J Cell Mol Med* 6:175-187.

Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB (1996) Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* 218:40-44.

Baud V, Karin M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11:372-377.

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.

Beauchamp C, Fridovich I (1970) A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem* 245:4641-4646.

Beaumont KA, Shekar SN, Newton RA, James MR, Stow JL, Duffy DL*, et al.* (2007) Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for MC1R variant alleles. *Hum Mol Genet* 16:2249-2260.

Beavo JA (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75:725-748.

Becher E, Mahnke K, Brzoska T, Kalden DH, Grabbe S, Luger TA (1999) Human peripheral blood-derived dendritic cells express functional melanocortin receptor MC-1R. *Ann N Y Acad Sci* 885:188-195.

Bedard K, Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313.

Beier K, Volkl A, Fahimi HD (1992) Suppression of peroxisomal lipid beta-oxidation enzymes of TNF-alpha. *FEBS Lett* 310:273-276.

Beier K, Volkl A, Fahimi HD (1997) TNF-alpha downregulates the peroxisome proliferator activated receptor-alpha and the mRNAs encoding peroxisomal proteins in rat liver. *FEBS Lett* 412:385-387.

Bellomo F, Piccoli C, Cocco T, Scacco S, Papa F, Gaballo A*, et al.* (2006) Regulation by the cAMP cascade of oxygen free radical balance in mammalian cells. *Antioxid Redox Signal* 8:495-502.

Benjannet S, Rondeau N, Day R, Chretien M, Seidah NG (1991) PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3564-3568.

Bennett DC, Lamoreux ML (2003) The color loci of mice--a genetic century. *Pigment Cell Res* 16:333-344.

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65:1865-1874.

Bernard P, Scior T, Didier B, Hibert M, Berthon JY (2001) Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A(2) inhibitors. *Phytochemistry* 58:865-874.

Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H*, et al.* (1999) Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem* 274:15345-15349.

Bertolotto C, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP*, et al.* (1998) Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol* 142:827-835.

Bhardwaj R, Becher E, Mahnke K, Hartmeyer M, Schwarz T, Scholzen T*, et al.* (1997) Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. *J Immunol* 158:3378-3384.

Bhardwaj RS, Luger TA (1994) Proopiomelanocortin production by epidermal cells: evidence for an immune neuroendocrine network in the epidermis. *Arch Dermatol Res* 287:85-90.

Bhardwaj RS, Schwarz A, Becher E, Mahnke K, Aragane Y, Schwarz T*, et al.* (1996) Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes. *J Immunol* 156:2517-2521.

Bhola NE, Grandis JR (2008) Crosstalk between G-protein-coupled receptors and epidermal growth factor receptor in cancer. *Front Biosci* 13:1857-1865.

Bickers DR, Athar M (2006) Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 126:2565-2575.

Black HS, deGruijl FR, Forbes PD, Cleaver JE, Ananthaswamy HN, deFabo EC*, et al.* (1997) Photocarcinogenesis: an overview. *J Photochem Photobiol B* 40:29-47.

Blenis J (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5889-5892.

Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18:1723-1729.

Bohm M, Eickelmann M, Li Z, Schneider SW, Oji V, Diederichs S*, et al.* (2005a) Detection of functionally active melanocortin receptors and evidence for an immunoregulatory activity of alpha-melanocyte-stimulating hormone in human dermal papilla cells. *Endocrinology* 146:4635-4646.

Bohm M, Luger TA (2004) Melanocortins in fibroblast biology--current update and future perspective for dermatology. *Exp Dermatol* 13 Suppl 4:16-21.

Bohm M, Luger TA, Tobin DJ, Garcia-Borron JC (2006) Melanocortin receptor ligands: new horizons for skin biology and clinical dermatology. *J Invest Dermatol* 126:1966-1975.

Bohm M, Wolff I, Scholzen TE, Robinson SJ, Healy E, Luger TA*, et al.* (2005b) alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *J Biol Chem* 280:5795-5802.

Bolognia J, Murray M, Pawelek J (1989) UVB-induced melanogenesis may be mediated through the MSH-receptor system. *J Invest Dermatol* 92:651-656.

Bond RA, Ijzerman AP (2006) Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 27:92-96.

Borner C (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39:615-647.

Bornfeldt KE, Krebs EG (1999) Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal* 11:465-477.

Boston BA, Cone RD (1996) Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* 137:2043-2050.

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.

Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG*, et al.* (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333:370-373.

Box NF, Duffy DL, Irving RE, Russell A, Chen W, Griffyths LR*, et al.* (2001) Melanocortin-1 receptor genotype is a risk factor for basal and squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 116:224-229.

Box NF, Wyeth JR, O'Gorman LE, Martin NG, Sturm RA (1997) Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet* 6:1891-1897.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Brandt R, Keston AS (1965) Synthesis of Diacetyldichlorofluorescin: A Stable Reagent for Fluorometric Analysis. *Anal Biochem* 11:6-9.

Brar SS, Kennedy TP, Sturrock AB, Huecksteadt TP, Quinn MT, Whorton AR*, et al.* (2002) An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C1212-1224.

Bray TM, Bettger WJ (1990) The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 8:281-291.

Breitwieser GE (2004) G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res* 94:17-27.

Brown GC, Borutaite V (2001) Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 52:189-195.

Brzoska T, Luger TA, Maaser C, Abels C, Bohm M (2008) Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocr Rev* 29:581-602.

Buggy JJ (1998) Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. *Biochem J* 331 (Pt 1):211-216.

Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP (1992) Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71:1195-1204.

Burke KE (2010) Photoaging: the role of oxidative stress. *G Ital Dermatol Venereol* 145:445-459.

Burton GW, Ingold KU (1989) Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci* 570:7-22.

Busca R, Ballotti R (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 13:60-69.

C

Cadenas E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58:79-110.

Cadenas E, Davies KJ (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-230.

Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, *et al.* (2002) Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem* 383:933-943.

Cadet J, Douki T, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (2001) Effects of UV and visible radiations on cellular DNA. *Curr Probl Dermatol* 29:62-73.

Cadet J, Sage E, Douki T (2005) Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571:3-17.

Cadet J, Vigny P, Midden WR (1990) Photoreactions of furocoumarins with biomolecules. *J Photochem Photobiol B* 6:197-206.

Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ (2010) Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31:221-228.

Campbell *Biologie*, De Boeck University edn, 1995.

Cannon JG, Tatro JB, Reichlin S, Dinarello CA (1986) Alpha melanocyte stimulating hormone inhibits immunostimulatory and inflammatory actions of interleukin 1. *J Immunol* 137:2232-2236.

Cano E, Mahadevan LC (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 20:117-122.

Carr A, Frei B (1999) Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13:1007-1024.

Carr AC, McCall MR, Frei B (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1716-1723.

Castro MG, Morrison E (1997) Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev Neurobiol* 11:35-57.

Castrucci AM, Hadley ME, Sawyer TK, Hruby VJ (1984) Enzymological studies of melanotropins. *Comp Biochem Physiol B* 78:519-524.

Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM (2004) Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 56:1-29.

Catania A, Rajora N, Capsoni F, Minonzio F, Star RA, Lipton JM (1996) The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro. *Peptides* 17:675-679.

Cathcart R, Schwiers E, Ames BN (1983) Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal Biochem* 134:111-116.

Chae HZ, Kang SW, Rhee SG (1999) Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* 300:219-226.

Chakraborty A, Slominski A, Ermak G, Hwang J, Pawelek J (1995) Ultraviolet B and melanocyte-stimulating hormone (MSH) stimulate mRNA production for alpha MSH receptors and proopiomelanocortin-derived peptides in mouse melanoma cells and transformed keratinocytes. *J Invest Dermatol* 105:655-659.

Chakraborty AK, Funasaka Y, Pawelek JM, Nagahama M, Ito A, Ichihashi M (1999) Enhanced expression of melanocortin-1 receptor (MC1-R) in normal human keratinocytes during differentiation: evidence for increased expression of POMC peptides near suprabasal layer of epidermis. *J Invest Dermatol* 112:853-860.

Chakraborty AK, Orlow SJ, Bolognia JL, Pawelek JM (1991) Structural/functional relationships between internal and external MSH receptors: modulation of expression in Cloudman melanoma cells by UVB radiation. *J Cell Physiol* 147:1-6.

Chamulitrat W, Schmidt R, Tomakidi P, Stremmel W, Chunglok W, Kawahara T*, et al.* (2003) Association of gp91phox homolog Nox1 with anchorage-independent growth and MAP kinase-activation of transformed human keratinocytes. *Oncogene* 22:6045-6053.

Chamulitrat W, Stremmel W, Kawahara T, Rokutan K, Fujii H, Wingler K*, et al.* (2004) A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122:1000-1009.

Chang H, Oehrl W, Elsner P, Thiele JJ (2003) The role of H2O2 as a mediator of UVB-induced apoptosis in keratinocytes. *Free Radic Res* 37:655-663.

Charest A, Wilker EW, McLaughlin ME, Lane K, Gowda R, Coven S*, et al.* (2006) ROS fusion tyrosine kinase activates a SH2 domain-containing phosphatase-2/phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling axis to form glioblastoma in mice. *Cancer Res* 66:7473-7481.

Chaturvedi V, Bodner B, Qin JZ, Nickoloff BJ (2006) Knock down of p53 levels in human keratinocytes increases susceptibility to type I and type II interferon-induced apoptosis mediated by a TRAIL dependent pathway. *J Dermatol Sci* 41:31-41.

Chaturvedi V, Qin JZ, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, Nickoloff BJ (1999) Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *J Biol Chem* 274:23358-23367.

Chen G, Way J, Armour S, Watson C, Queen K, Jayawickreme CK*, et al.* (2000) Use of constitutive G protein-coupled receptor activity for drug discovery. *Mol Pharmacol* 57:125-134.

Chen P, Hussain A, Tai HH, Dittert LW (1994) An improved method of radioiodination with chloramine T. *Anal Biochem* 219:159-161.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278:36027-36031.

Chen W, Shang WH, Adachi Y, Hirose K, Ferrari DM, Kamata T (2008) A possible biochemical link between NADPH oxidase (Nox) 1 redox-signalling and ERp72. *Biochem J* 416:55-63.

Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD (2001) Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269:131-140.

Cheng G, Lambeth JD (2004) NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain. *J Biol Chem* 279:4737-4742.

Cheng Y, Zhao Q, Liu X, Araki S, Zhang S, Miao J (2006) Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, p53 and ROS in the association of apoptosis and senescence in vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 580:4911-4915.

Chhajlani V, Wikberg JE (1992) Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett* 309:417-420.

Chhajlani V, Xu X, Blauw J, Sudarshi S (1996) Identification of ligand binding residues in extracellular loops of the melanocortin 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 219:521-525.

Chiarugi P, Fiaschi T (2007) Redox signalling in anchorage-dependent cell growth. *Cell Signal* 19:672-682.

Chou KJ, Fang HC, Chung HM, Cheng JS, Lee KC, Tseng LL*, et al.* (2000) Effect of betulinic acid on intracellular-free Ca(2+) levels in Madin Darby canine kidney cells. *Eur J Pharmacol* 408:99-106.

Claerhout S, Van Laethem A, Agostinis P, Garmyn M (2006) Pathways involved in sunburn cell formation: deregulation in skin cancer. *Photochem Photobiol Sci* 5:199-207.

Clark RA, Epperson TK, Valente AJ (2004) Mechanisms of activation of NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis* 57:S22-23.

Cohen SM, Cordeiro-Stone M, Kaufman DG (2007) Early replication and the apoptotic pathway. *J Cell Physiol* 213:434-439.

Colledge M, Scott JD (1999) AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol* 9:216-221.

Cone RD *The melanocortin receptors*, Humana Press edn: Totowa, N.J., 2000.

Conner EM, Grisham MB (1996) Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12:274-277.

Conti M (2000) Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 14:1317-1327.

Conti M, Jin SL (1999) The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63:1-38.

Cooper A, Robinson SJ, Pickard C, Jackson CL, Friedmann PS, Healy E (2005) Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-induced lymphocyte proliferation in humans independently of melanocortin 1 receptor gene status. *J Immunol* 175:4806-4813.

Corcoran GB, Fix L, Jones DP, Moslen MT, Nicotera P, Oberhammer FA*, et al.* (1994) Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 128:169-181.

Corre S, Galibert MD (2005) Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 18:337-348.

Corre S, Galibert MD (2006) [USF as a key regulatory element of gene expression]. *Med Sci (Paris)* 22:62-67.

Corre S, Mekideche K, Adamski H, Mosser J, Watier E, Galibert MD (2006) In vivo and ex vivo UV-induced analysis of pigmentation gene expressions. *J Invest Dermatol* 126:916-918.

Corre S, Primot A, Baron Y, Le Seyec J, Goding C, Galibert MD (2009) Target gene specificity of USF-1 is directed via p38-mediated phosphorylation-dependent acetylation. *J Biol Chem* 284:18851-18862.

Corre S, Primot A, Sviderskaya E, Bennett DC, Vaulont S, Goding CR*, et al.* (2004) UV-induced expression of key component of the tanning process, the POMC and MC1R genes, is dependent on the p-38-activated upstream stimulating factor-1 (USF-1). *J Biol Chem* 279:51226-51233.

Costa T, Cotecchia S (2005) Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 26:618-624.

Costa T, Herz A (1989) Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7321-7325.

Cotecchia S (2007) Constitutive activity and inverse agonism at the alpha1adrenoceptors. *Biochem Pharmacol* 73:1076-1083.

Crawford MA, Aylott CV, Bourdeau RW, Bokoch GM (2006) Bacillus anthracis toxins inhibit human neutrophil NADPH oxidase activity. *J Immunol* 176:7557-7565.

Cross AR, Segal AW (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta* 1657:1-22.

Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 256:34-41.

Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE*, et al.* (2007) Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128:853-864.

D

Dalmasso G, Charrier-Hisamuddin L, Thu Nguyen HT, Yan Y, Sitaraman S, Merlin D (2008) PepT1-mediated tripeptide KPV uptake reduces intestinal inflammation. *Gastroenterology* 134:166-178.

Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116:205-219.

Daniels F, Jr., Brophy D, Lobitz WC, Jr. (1961) Histochemical responses of human skin following ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* 37:351-357.

Davies KJ (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 262:9895-9901.

Davies KJ, Delsignore ME (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem* 262:9908-9913.

Davies KJ, Delsignore ME, Lin SW (1987a) Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* 262:9902-9907.

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

Davis RJ (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci* 19:470-473.

De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G*, et al.* (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 275:23227-23233.

De Fabo EC, Noonan FP (1983) Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *J Exp Med* 158:84-98.

de Gruijl FR (2000) Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods Enzymol* 319:359-366.

de Gruijl FR (2008) UV-induced immunosuppression in the balance. *Photochem Photobiol* 84:2-9.

De Luca M, Siegrist W, Bondanza S, Mathor M, Cancedda R, Eberle AN (1993) Alpha melanocyte stimulating hormone (alpha MSH) stimulates normal human melanocyte growth by binding to high-affinity receptors. *J Cell Sci* 105 (Pt 4):1079-1084.

de Mendez I, Homayounpour N, Leto TL (1997) Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol Cell Biol* 17:2177-2185.

Degli Esposti M (2004) Mitochondria in apoptosis: past, present and future. *Biochem Soc Trans* 32:493-495.

DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Nauseef WM (2000) Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* 275:13986-13993.

DeLeo FR, Yu L, Burritt JB, Loetterle LR, Bond CW, Jesaitis AJ*, et al.* (1995) Mapping sites of interaction of p47-phox and flavocytochrome b with random-sequence peptide phage display libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7110-7114.

Denu JM, Tanner KG (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37:5633-5642.

Desideri A, Falconi M (2003) Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochem Soc Trans* 31:1322-1325.

Dessauer CW (2009) Adenylyl cyclase--A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 76:935-941.

Di Nuzzo S, Sylva-Steenland RM, Koomen CW, de Rie MA, Das PK, Bos JD*, et al.* (2000) Exposure to UVB induces accumulation of LFA-1+ T cells and enhanced expression of the chemokine psoriasin in normal human skin. *Photochem Photobiol* 72:374-382.

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

Didier C, Kerblat I, Drouet C, Favier A, Beani JC, Richard MJ (2001a) Induction of thioredoxin by ultraviolet-A radiation prevents oxidative-mediated cell death in human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 31:585-598.

Didier C, Pouget JP, Cadet J, Favier A, Beani JC, Richard MJ (2001b) Modulation of exogenous and endogenous levels of thioredoxin in human skin fibroblasts prevents DNA damaging effect of ultraviolet A radiation. *Free Radic Biol Med* 30:537-546.

Diebold BA, Bokoch GM (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol* 2:211-215.

Diffey BL (2002) Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* 28:4-13.

Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32:1102-1115.

Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD*, et al.* (2001) mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J* 20:1921-1930.

Donatien PD, Hunt G, Pieron C, Lunec J, Taieb A, Thody AJ (1992) The expression of functional MSH receptors on cultured human melanocytes. *Arch Dermatol Res* 284:424-426.

Douki T, Cadet J (2001) Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry* 40:2495-2501.

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

Doussiere J, Gaillard J, Vignais PV (1996) Electron transfer across the O2- generating flavocytochrome b of neutrophils. Evidence for a transition from a low-spin state to a high-spin state of the heme iron component. *Biochemistry* 35:13400-13410.

Drube S, Stirnweiss J, Valkova C, Liebmann C (2006) Ligand-independent and EGF receptor-supported transactivation: lessons from beta2-adrenergic receptor signalling. *Cell Signal* 18:1633-1646.

Dubus P, Vergier B (2000) Histologie cutanée. In: *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* (Cosmétologie et Dermatologie Esthétique, 9 p.

Dumay O, Karam A, Vian L, Moyal D, Hourseau C, Stoebner P*, et al.* (2001) Ultraviolet AI exposure of human skin results in Langerhans cell depletion and reduction of epidermal antigen-presenting cell function: partial protection by a broad-spectrum sunscreen. *Br J Dermatol* 144:1161-1168.

Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D, Virion A (1999) Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem* 274:37265-37269.

Dustin ML, Singer KH, Tuck DT, Springer TA (1988) Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Exp Med* 167:1323-1340.

Duthie MS, Kimber I, Norval M (1999) The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Dermatol* 140:995-1009.

Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, Shah AM (2006) Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 34:960-964.

Dymkowska D, Szczepanowska J, Wieckowski MR, Wojtczak L (2006) Short-term and long-term effects of fatty acids in rat hepatoma AS-30D cells: the way to apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1763:152-163.

E

Eberle AN *The Melanotrophins: Chemistry, Physiology and Mechanisms of Action.*: Switzerland: Karger, 1988.

Eberle AN, Siegrist W, Bagutti C, Chluba-De Tapia J, Solca F, Wikberg JE*, et al.* (1993) Receptors for melanocyte-stimulating hormone on melanoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 680:320-341.

Einspahr JG, Stratton SP, Bowden GT, Alberts DS (2002) Chemoprevention of human skin cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 41:269-285.

Elfakir A, Ezzedine K, Latreille J, Ambroisine L, Jdid R, Galan P*, et al.* (2009) Functional MC1R-gene variants are associated with increased risk for severe photoaging of facial skin. *J Invest Dermatol* 130:1107-1115.

Eller MS, Gilchrest BA (2000) Tanning as part of the eukaryotic SOS response. *Pigment Cell Res* 13 Suppl 8:94-97.

Eller MS, Ostrom K, Gilchrest BA (1996) DNA damage enhances melanogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1087-1092.

Elliott RJ, Szabo M, Wagner MJ, Kemp EH, MacNeil S, Haycock JW (2004) alpha-Melanocyte-stimulating hormone, MSH 11-13 KPV and adrenocorticotropic hormone signalling in human keratinocyte cells. *J Invest Dermatol* 122:1010-1019.

English DR, Armstrong BK, Kricker A, Winter MG, Heenan PJ, Randell PL (1998) Case-control study of sun exposure and squamous cell carcinoma of the skin. *Int J Cancer* 77:347-353.

English JM, Cobb MH (2002) Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 23:40-45.

Epstein JH (1983) Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging. *J Am Acad Dermatol* 9:487-502.

Escobedo J, Pucci AM, Koh TJ (2004) HSP25 protects skeletal muscle cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 37:1455-1462.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13:341-390.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81-128.

Eves PC, MacNeil S, Haycock JW (2006) alpha-Melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma. *Peptides* 27:444-452.

F

F'Guyer S, Afaq F, Mukhtar H (2003) Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19:56-72.

Fan C, Katsuyama M, Nishinaka T, Yabe-Nishimura C (2005) Transactivation of the EGF receptor and a PI3 kinase-ATF-1 pathway is involved in the upregulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase. *FEBS Lett* 579:1301-1305.

Fauconnier J, Andersson DC, Zhang SJ, Lanner JT, Wibom R, Katz A*, et al.* (2007) Effects of palmitate on Ca(2+) handling in adult control and ob/ob cardiomyocytes: impact of mitochondrial reactive oxygen species. *Diabetes* 56:1136-1142.

Favier A (2003) Le stress oxydant - Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*:108-115.

Felty Q, Xiong WC, Sun D, Sarkar S, Singh KP, Parkash J*, et al.* (2005) Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers. *Biochemistry* 44:6900-6909.

Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG (1996) G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* 74:1095-1110.

Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S (1988) Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* 334:698-700.

Fesen MR, Pommier Y, Leteurtre F, Hiroguchi S, Yung J, Kohn KW (1994) Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. *Biochem Pharmacol* 48:595-608.

Filardo EJ (2002) Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:231-238.

Finegold AA, Shatwell KP, Segal AW, Klausner RD, Dancis A (1996) Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J Biol Chem* 271:31021-31024.

Fitzpatrick TB (1988) The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 124:869-871.

Flanagan N, Ray AJ, Todd C, Birch-Machin MA, Rees JL (2001) The relation between melanocortin 1 receptor genotype and experimentally assessed ultraviolet radiation sensitivity. *J Invest Dermatol* 117:1314-1317.

Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84:131-141.

Forman HJ, Kennedy JA (1974) Role of superoxide radical in mitochondrial dehydrogenase reactions. *Biochem Biophys Res Commun* 60:1044-1050.

Formigari A, Irato P, Santon A (2007) Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146:443-459.

Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12:773-790.

Frandberg PA, Doufexis M, Kapas S, Chhajlani V (1998) Human pigmentation phenotype: a point mutation generates nonfunctional MSH receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 245:490-492.

Frandberg PA, Doufexis M, Kapas S, Chhajlani V (2001) Cysteine residues are involved in structure and function of melanocortin 1 receptor: Substitution of a cysteine residue in transmembrane segment two converts an agonist to antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* 281:851-857.

Frandsen U, Lopez-Figueroa M, Hellsten Y (1996) Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 227:88-93.

Fridovich I (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247:1-11.

Fuchs J, Groth N, Herrling T (2000) In vitro and in vivo assessment of the irritation potential of different spin traps in human skin. *Toxicology* 151:55-63.

Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM, Wilson DS, Carcamo G, Packer L (1989) Acute effects of near ultraviolet and visible light on the cutaneous antioxidant defense system. *Photochem Photobiol* 50:739-744.

Fulda S, Jeremias I, Steiner HH, Pietsch T, Debatin KM (1999) Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer* 82:435-441.

Funasaka Y, Chakraborty AK, Hayashi Y, Komoto M, Ohashi A, Nagahama M*, et al.* (1998) Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1alpha, interleukin-1beta, endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Dermatol* 139:216-224.

Funasaka Y, Chakraborty AK, Yodoi J, Ichihashi M (2001) The effect of thioredoxin on the expression of proopiomelanocortin-derived peptides, the melanocortin 1 receptor and cell survival of normal human keratinocytes. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6:32-37.

Furumura M, Potterf SB, Toyofuku K, Matsunaga J, Muller J, Hearing VJ (2001) Involvement of ITF2 in the transcriptional regulation of melanogenic genes. *J Biol Chem* 276:28147-28154.

Fusenig NE, Boukamp P (1998) Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* 23:144-158.

G

Galibert MD, Carreira S, Goding CR (2001) The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression. *EMBO J* 20:5022-5031.

Galimberti D, Baron P, Meda L, Prat E, Scarpini E, Delgado R*, et al.* (1999) Alpha-MSH peptides inhibit production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by microglial cells activated with beta-amyloid and interferon gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 263:251-256.

Gantz I, Fong TM (2003) The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E468-474.

Gantz I, Shimoto Y, Konda Y, Miwa H, Dickinson CJ, Yamada T (1994) Molecular cloning, expression, and characterization of a fifth melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1214-1220.

Garcia-Borron JC, Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C (2005) Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Res* 18:393-410.

Garcin G. Rôles du MC1R et de l'alpha-MSH dans les réponses kératinocytaires au rayonnement ultraviolet. Thèse thesis, Université Montpellier I, Montpellier, 2007.

Garcin G, Douki T, Stoebner PE, Guesnet J, Guezennec A, Martinez J*, et al.* (2007) Cell surface expression of melanocortin-1 receptor on HaCaT keratinocytes and alpha-melanocortin stimulation do not affect the formation and repair of UVB-induced DNA photoproducts. *Photochem Photobiol Sci* 6:585-593.

Garcin G, Le Gallic L, Stoebner PE, Guezennec A, Guesnet J, Lavabre-Bertrand T*, et al.* (2009) Constitutive Expression of MC1R in HaCaT Keratinocytes Inhibits Basal and UVB-induced TNF-alpha Production. *Photochem Photobiol* 85:1440-1450.

Gauuan PJ, Trova MP, Gregor-Boros L, Bocckino SB, Crapo JD, Day BJ (2002) Superoxide dismutase mimetics: synthesis and structure-activity relationship study of MnTBAP analogues. *Bioorg Med Chem* 10:3013-3021.

Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8010-8014.

Geiszt M, Lekstrom K, Witta J, Leto TL (2003) Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. *J Biol Chem* 278:20006-20012.

Gerits N, Kostenko S, Shiryaev A, Johannessen M, Moens U (2008) Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cell Signal* 20:1592-1607.

Gether U (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21:90-113.

Getting SJ (2002) Melanocortin peptides and their receptors: new targets for anti-inflammatory therapy. *Trends Pharmacol Sci* 23:447-449.

Getting SJ, Christian HC, Flower RJ, Perretti M (2002) Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotropic hormone efficacy in gouty arthritis. *Arthritis Rheum* 46:2765-2775.

Getting SJ, Christian HC, Lam CW, Gavins FN, Flower RJ, Schioth HB*, et al.* (2003a) Redundancy of a functional melanocortin 1 receptor in the anti-inflammatory actions of melanocortin peptides: studies in the recessive yellow (e/e) mouse suggest an important role for melanocortin 3 receptor. *J Immunol* 170:3323-3330.

Getting SJ, Schioth HB, Perretti M (2003b) Dissection of the anti-inflammatory effect of the core and C-terminal (KPV) alpha-melanocyte-stimulating hormone peptides. *J Pharmacol Exp Ther* 306:631-637.

Ghafourifar P, Cadenas E (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci* 26:190-195.

Ghanem GE, Comunale G, Libert A, Vercammen-Grandjean A, Lejeune FJ (1988) Evidence for alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) receptors on human malignant melanoma cells. *Int J Cancer* 41:248-255.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.

Gilchrest BA, Eller MS (1999) DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4:35-40.

Gilchrest BA, Park HY, Eller MS, Yaar M (1996) Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol* 63:1-10.

Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56:615-649.

Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C*, et al.* (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122:221-233.

Giulivi C (2003) Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. *Free Radic Biol Med* 34:397-408.

Glauert HP (2007) Vitamin E and NF-kappaB activation: a review. *Vitam Horm* 76:135-153.

Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2006) Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1757:639-647.

Gomes A, Fernandes E, Lima JL (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* 65:45-80.

Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW*, et al.* (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383:447-450.

Gopalakrishna R, Jaken S (2000) Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 28:1349-1361.

Gorlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R (2000) A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 87:26-32.

Grewe M, Trefzer U, Ballhorn A, Gyufko K, Henninger H, Krutmann J (1993) Analysis of the mechanism of ultraviolet (UV) B radiation-induced prostaglandin E2 synthesis by human epidermoid carcinoma cells. *J Invest Dermatol* 101:528-531.

Grizot S, Fieschi F, Dagher MC, Pebay-Peyroula E (2001) The active N-terminal region of p67phox. Structure at 1.8 A resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* 276:21627-21631.

Groeger G, Quiney C, Cotter TG (2009) Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 11:2655-2671.

Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K (2003) Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 113:343-355.

Groemping Y, Rittinger K (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* 386:401-416.

Gutkind JS (2000) Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE* 2000:re1.

H

Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11:184-189.

Hadley ME, Hruby VJ, Jiang J, Sharma SD, Fink JL, Haskell-Luevano C*, et al.* (1996) Melanocortin receptors: identification and characterization by melanotropic peptide agonists and antagonists. *Pigment Cell Res* 9:213-234.

Halaban R, Moellmann G (1990) Murine and human b locus pigmentation genes encode a glycoprotein (gp75) with catalase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4809-4813.

Halliwell B (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16:33-50.

Halliwell B, Gutteridge JMC *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd edn. Oxford University Press, 1999.

Han CH, Freeman JL, Lee T, Motalebi SA, Lambeth JD (1998) Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* 273:16663-16668.

Hanneman KK, Cooper KD, Baron ED (2006) Ultraviolet immunosuppression: mechanisms and consequences. *Dermatol Clin* 24:19-25.

Harper RW, Xu C, Eiserich JP, Chen Y, Kao CY, Thai P*, et al.* (2005) Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium. *FEBS Lett* 579:4911-4917.

Hartmeyer M, Scholzen T, Becher E, Bhardwaj RS, Schwarz T, Luger TA (1997) Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1 and produce increased levels of IL-8 upon stimulation with alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Immunol* 159:1930-1937.

Hasan T, Nyberg F, Stephansson E, Puska P, Hakkinen M, Sarna S*, et al.* (1997) Photosensitivity in lupus erythematosus, UV photoprovocation results compared with history of photosensitivity and clinical findings. *Br J Dermatol* 136:699-705.

Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1989) Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 264:12657-12665.

Haycock JW, Rowe SJ, Cartledge S, Wyatt A, Ghanem G, Morandini R*, et al.* (2000) Alpha-melanocyte-stimulating hormone reduces impact of proinflammatory cytokine and peroxide-generated oxidative stress on keratinocyte and melanoma cell lines. *J Biol Chem* 275:15629-15636.

Hazzalin CA, Mahadevan LC (2002) MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:30-40.

He YY, Huang JL, Block ML, Hong JS, Chignell CF (2005) Role of phagocyte oxidase in UVA-induced oxidative stress and apoptosis in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 125:560-566.

Healy E, Flannagan N, Ray A, Todd C, Jackson IJ, Matthews JN*, et al.* (2000) Melanocortin-1-receptor gene and sun sensitivity in individuals without red hair. *Lancet* 355:1072-1073.

Hearing VJ, Jimenez M (1987) Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem* 19:1141-1147.

Hearing VJ, Tsukamoto K (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J* 5:2902-2909.

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.

Hedley SJ, Gawkrodger DJ, Weetman AP, Morandini R, Boeynaems JM, Ghanem G*, et al.* (1998) alpha-Melanocyte stimulating hormone inhibits tumour necrosis factor-alpha stimulated intercellular adhesion molecule-1 expression in normal cutaneous human melanocytes and in melanoma cell lines. *Br J Dermatol* 138:536-543.

Herraiz C, Jimenez-Cervantes C, Zanna P, Garcia-Borron JC (2009) Melanocortin 1 receptor mutations impact differentially on signalling to the cAMP and the ERK mitogen-activated protein kinase pathways. *FEBS Lett* 583:3269-3274.

Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G*, et al.* (2003) Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 41:2164-2171.

Hill RP, MacNeil S, Haycock JW (2006) Melanocyte stimulating hormone peptides inhibit TNF-alpha signaling in human dermal fibroblast cells. *Peptides* 27:421-430.

Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K*, et al.* (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.

Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, Lavin C, Chu S, Dadras S*, et al.* (1999) Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H2O2 in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6255-6260.

Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383:347-364.

Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC (2004) p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 25:177-181.

Holick MF (1994) McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 60:619-630.

Holick MF (2002) Sunlight and vitamin D: both good for cardiovascular health. *J Gen Intern Med* 17:733-735.

Holst B, Elling CE, Schwartz TW (2002) Metal ion-mediated agonism and agonist enhancement in melanocortin MC1 and MC4 receptors. *J Biol Chem* 277:47662-47670.

Hoogduijn MJ, Cemeli E, Ross K, Anderson D, Thody AJ, Wood JM (2004) Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H2O2-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca2+. *Exp Cell Res* 294:60-67.

Hornig-Do HT, von Kleist-Retzow JC, Lanz K, Wickenhauser C, Kudin AP, Kunz WS*, et al.* (2007) Human epidermal keratinocytes accumulate superoxide due to low activity of Mn-SOD, leading to mitochondrial functional impairment. *J Invest Dermatol* 127:1084-1093.

Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE (2009) Cell death. *N Engl J Med* 361:1570-1583.

Houslay MD, Milligan G (1997) Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci* 22:217-224.

Hruby VJ, Sharma SD, Toth K, Jaw JY, al-Obeidi F, Sawyer TK*, et al.* (1993) Design, synthesis, and conformation of superpotent and prolonged acting melanotropins. *Ann N Y Acad Sci* 680:51-63.

Hruza LL, Pentland AP (1993) Mechanisms of UV-induced inflammation. *J Invest Dermatol* 100:35S-41S.

Hsiao HY, Mak OT, Yang CS, Liu YP, Fang KM, Tzeng SF (2007) TNF-alpha/IFN-gamma-induced iNOS expression increased by prostaglandin E2 in rat primary astrocytes via EP2-evoked cAMP/PKA and intracellular calcium signaling. *Glia* 55:214-223.

Huang C, Li J, Ding M, Leonard SS, Wang L, Castranova V*, et al.* (2001) UV Induces phosphorylation of protein kinase B (Akt) at Ser-473 and Thr-308 in mouse epidermal Cl 41 cells through hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 276:40234-40240.

Hughes G, Murphy MP, Ledgerwood EC (2005) Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappaB to modulate tumour necrosis factor-induced apoptosis: evidence from mitochondria-targeted antioxidants. *Biochem J* 389:83-89.

Hunt G, Kyne S, Ito S, Wakamatsu K, Todd C, Thody A (1995) Eumelanin and phaeomelanin contents of human epidermis and cultured melanocytes. *Pigment Cell Res* 8:202-208.

Hunter WM, Greenwood FC (1962) Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495-496.

Hussain AA, Awad R, Crooks PA, Dittert LW (1993) Chloramine-T in radiolabeling techniques. I. Kinetics and mechanism of the reaction between chloramine-T and amino acids. *Anal Biochem* 214:495-499.

I

Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M*, et al.* (2003) UV-induced skin damage. *Toxicology* 189:21-39.

Ichiyama T, Sakai T, Catania A, Barsh GS, Furukawa S, Lipton JM (1999) Inhibition of peripheral NF-kappaB activation by central action of alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Neuroimmunol* 99:211-217.

Iles KE, Forman HJ (2002) Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res* 26:95-105.

Im S, Moro O, Peng F, Medrano EE, Cornelius J, Babcock G*, et al.* (1998) Activation of the cyclic AMP pathway by alpha-melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res* 58:47-54.

Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I*, et al.* (2003) Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 10:2495-2505.

Insel PA, Ostrom RS (2003) Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell Mol Neurobiol* 23:305-314.

Ito S (2003) The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res* 16:230-236.

Ito S, Wakamatsu K (2003) Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res* 16:523-531.

Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H (2000) Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res* 13 Suppl 8:103-109.

Iwahara S, Satoh H, Song DX, Webb J, Burlingame AL, Nagae Y*, et al.* (1995) Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol. *Biochemistry* 34:13398-13406.

J

Jakubowski W, Bartosz G (2000) 2,7-dichlorofluorescin oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int* 24:757-760.

Javesghani D, Magder SA, Barreiro E, Quinn MT, Hussain SN (2002) Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med* 165:412-418.

Jeanneteau F, Chao MV (2006) Promoting neurotrophic effects by GPCR ligands. *Novartis Found Symp* 276:181-189; discussion 189-192, 233-187, 275-181.

Jedlitschky G, Huber M, Volkl A, Muller M, Leier I, Muller J*, et al.* (1991) Peroxisomal degradation of leukotrienes by beta-oxidation from the omega-end. *J Biol Chem* 266:24763-24772.

Jeong SY, Seol DW (2008) The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* 41:11-22.

Ji Y, Akerboom TP, Sies H, Thomas JA (1999) S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitroso glutathione. *Arch Biochem Biophys* 362:67-78.

Jimenez-Cervantes C, Germer S, Gonzalez P, Sanchez J, Sanchez CO, Garcia-Borron JC (2001a) Thr40 and Met122 are new partial loss-of-function natural mutations of the human melanocortin 1 receptor. *FEBS Lett* 508:44-48.

Jimenez-Cervantes C, Olivares C, Gonzalez P, Morandini R, Ghanem G, Garcia-Borron JC (2001b) The Pro162 variant is a loss-of-function mutation of the human melanocortin 1 receptor gene. *J Invest Dermatol* 117:156-158.

Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT (1996) Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 271:H1626-1634.

Jordan SA, Jackson IJ (1998) Melanocortin receptors and antagonists regulate pigmentation and body weight. *Bioessays* 20:603-606.

Jurkiewicz BA, Buettner GR (1996) EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human. *Photochem Photobiol* 64:918-922.

K

Kadekaro AL, Kavanagh R, Kanto H, Terzieva S, Hauser J, Kobayashi N*, et al.* (2005) alpha-Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer Res* 65:4292-4299.

Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, Abdel-Malek ZA (2003) Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Res* 16:434-447.

Kageshita T, Yoshii A, Kimura T, Kuriya N, Ono T, Tsujisaki M*, et al.* (1993) Clinical relevance of ICAM-1 expression in primary lesions and serum of patients with malignant melanoma. *Cancer Res* 53:4927-4932.

Kalden DH, Scholzen T, Brzoska T, Luger TA (1999) Mechanisms of the antiinflammatory effects of alpha-MSH. Role of transcription factor NF-kappa B and adhesion molecule expression. *Ann N Y Acad Sci* 885:254-261.

Kannengiesser K, Maaser C, Heidemann J, Luegering A, Ross M, Brzoska T*, et al.* (2008) Melanocortin-derived tripeptide KPV has anti-inflammatory potential in murine models of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 14:324-331.

Kanno H, Horikawa Y, Hodges RR, Zoukhri D, Shatos MA, Rios JD*, et al.* (2003) Cholinergic agonists transactivate EGFR and stimulate MAPK to induce goblet cell secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C988-998.

Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, Mukhtar H (2001) Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Toxicol Appl Pharmacol* 176:110-117.

Katiyar SK, Matsui MS, Elmets CA, Mukhtar H (1999) Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem Photobiol* 69:148-153.

Katsuyama M, Fan C, Yabe-Nishimura C (2002) NADPH oxidase is involved in prostaglandin F2alpha-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF2alpha. *J Biol Chem* 277:13438-13442.

Kawahara T, Quinn MT, Lambeth JD (2007) Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol Biol* 7:109.

Kawahara T, Ritsick D, Cheng G, Lambeth JD (2005) Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation. *J Biol Chem* 280:31859-31869.

Kenakin T (2001) Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J* 15:598-611.

Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W*, et al.* (2001) Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol* 117:294-300.

Keston AS, Brandt R (1965) The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide. *Anal Biochem* 11:1-5.

Khlgatian MK, Hadshiew IM, Asawanonda P, Yaar M, Eller MS, Fujita M*, et al.* (2002) Tyrosinase gene expression is regulated by p53. *J Invest Dermatol* 118:126-132.

Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, Fukumoto M (2000) NADPH oxidase subunit, gp91(phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 254:237-243.

Kim JS, Diebold BA, Babior BM, Knaus UG, Bokoch GM (2007) Regulation of Nox1 activity via protein kinase A-mediated phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 binding. *J Biol Chem* 282:34787-34800.

Kirkland RA, Adibhatla RM, Hatcher JF, Franklin JL (2002) Loss of cardiolipin and mitochondria during programmed neuronal death: evidence of a role for lipid peroxidation and autophagy. *Neuroscience* 115:587-602.

Kirnbauer R, Charvat B, Schauer E, Kock A, Urbanski A, Forster E*, et al.* (1992) Modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human melanocytes and melanoma cells: evidence for a regulatory role of IL-6, IL-7, TNF beta, and UVB light. *J Invest Dermatol* 98:320-326.

Kitajima T, Takashima A (1999) Langerhans cell responses to ultraviolet B radiation. *J Dermatol Sci* 19:153-160.

Klebanoff SJ (1980) Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med* 93:480-489.

Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS (1995) Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun* 211:375-381.

Koga H, Terasawa H, Nunoi H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H (1999) Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 274:25051-25060.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H*, et al.* (1998a) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70:2446-2453.

Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H*, et al.* (1998b) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 46:373-375.

Kojo S (2004) Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 11:1041-1064.

Kokot A, Metze D, Mouchet N, Galibert MD, Schiller M, Luger TA*, et al.* (2009) Alpha-melanocyte-stimulating hormone counteracts the suppressive effect of UVB on Nrf2 and Nrf-dependent gene expression in human skin. *Endocrinology* 150:3197-3206.

Konda Y, Gantz I, DelValle J, Shimoto Y, Miwa H, Yamada T (1994) Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor. *J Biol Chem* 269:13162-13166.

Kripke ML, Cox PA, Alas LG, Yarosh DB (1992) Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7516-7520.

Kroemer G (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3:614-620.

Krutmann J (2000) Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. *J Dermatol Sci* 23 Suppl 1:S22-26.

Krutmann J, Kock A, Schauer E, Parlow F, Moller A, Kapp A*, et al.* (1990) Tumor necrosis factor beta and ultraviolet radiation are potent regulators of human keratinocyte ICAM-1 expression. *J Invest Dermatol* 95:127-131.

Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279:4127-4135.

Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807-869.

L

Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4:181-189.

Landis GN, Tower J (2005) Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 126:365-379.

Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG*, et al.* (1999) The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3712-3717.

Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K (2002) Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. A central role for p67phox. *J Biol Chem* 277:10121-10128.

Lapouge K, Smith SJ, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K (2000) Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. *Mol Cell* 6:899-907.

Laroui H, Dalmasso G, Nguyen HT, Yan Y, Sitaraman SV, Merlin D (2010) Drug-loaded nanoparticles targeted to the colon with polysaccharide hydrogel reduce colitis in a mouse model. *Gastroenterology* 138:843-853 e841-842.

Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y*, et al.* (2001) Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 88:888-894.

Laude K, Cai H, Fink B, Hoch N, Weber DS, McCann L*, et al.* (2005) Hemodynamic and biochemical adaptations to vascular smooth muscle overexpression of p22phox in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H7-12.

Lawley W, Doherty A, Denniss S, Chauhan D, Pruijn G, van Venrooij WJ*, et al.* (2000) Rapid lupus autoantigen relocalization and reactive oxygen species accumulation following ultraviolet irradiation of human keratinocytes. *Rheumatology (Oxford)* 39:253-261.

Leach AP (1998) Apoptosis: molecular mechanism for physiologic cell death. *Clin Lab Sci* 11:346-349.

Lebert M, Schuster M, Hader DP (2002) The European Light Dosimeter Network: four years of measurements. *J Photochem Photobiol B* 66:81-87.

Lee Jin Park SMJ, Ha Yong Song, Ji Ae Lee, Mi Young Yang, Young Hee Kang, Hyung Joo Kwong, Tae-Yoon Kim, Soo Young Choi and Jinseu Park (2006) The enhanced monocyte adhesiveness after UVB exposure requires ROS and NF-kB signaling in human keratinocyte. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39:618-625.

Lee SB, Bae IH, Bae YS, Um HD (2006) Link between mitochondria and NADPH oxidase 1 isozyme for the sustained production of reactive oxygen species and cell death. *J Biol Chem* 281:36228-36235.

Lee SY, Lee JW, Lee H, Yoo HS, Yun YP, Oh KW*, et al.* (2005) Inhibitory effect of green tea extract on beta-amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF-kappaB and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms. *Brain Res Mol Brain Res* 140:45-54.

Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* 14:303-307.

Lerner AB, McGuire JS (1961) Effect of alpha- and betamelanocyte stimulating hormones on the skin colour of man. *Nature* 189:176-179.

Leto TL, Adams AG, de Mendez I (1994) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10650-10654.

Lewis DA, Hengeltraub SF, Gao FC, Leivant MA, Spandau DF (2006) Aberrant NF-kappaB activity in HaCaT cells alters their response to UVB signaling. *J Invest Dermatol* 126:1885-1892.

Li JM, Shah AM (2002) Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 277:19952-19960.

Li Y, He K, Huang Y, Zheng D, Gao C, Cui L, *et al.* (2010) Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells. *Mol Carcinog* 49:630-640.

Lieven CJ, Hoegger MJ, Schlieve CR, Levin LA (2006) Retinal ganglion cell axotomy induces an increase in intracellular superoxide anion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1477-1485.

Lin P, Welch EJ, Gao XP, Malik AB, Ye RD (2005) Lysophosphatidylcholine modulates neutrophil oxidant production through elevation of cyclic AMP. *J Immunol* 174:2981-2989.

Lin YC, Cheng HY, Huang TH, Huang HW, Lee YH, Peng WH (2009) Analgesic and anti-inflammatory activities of Torenia concolor Lindley var. formosana Yamazaki and betulin in mice. *Am J Chin Med* 37:97-111.

Liochev SI, Fridovich I (2002) The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 7:55-57; author reply 59-60.

Lipton JM, Catania A (1997) Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. *Immunol Today* 18:140-145.

Lipton JM, Zhao H, Ichiyama T, Barsh GS, Catania A (1999) Mechanisms of antiinflammatory action of alpha-MSH peptides. In vivo and in vitro evidence. *Ann N Y Acad Sci* 885:173-182.

Liu WK, Ho JC, Cheung FW, Liu BP, Ye WC, Che CT (2004) Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line. *Eur J Pharmacol* 498:71-78.

Liu Y, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80:780-787.

Lochner A, Moolman JA (2006) The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev* 24:261-274.

Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 265:3202-3211.

Lohse MJ, Lefkowitz RJ, Caron MG, Benovic JL (1989) Inhibition of beta-adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3011-3015.

Loir B, Bouchard B, Morandini R, Del Marmol V, Deraemaecker R, Garcia-Borron JC*, et al.* (1997) Immunoreactive alpha-melanotropin as an autocrine effector in human melanoma cells. *Eur J Biochem* 244:923-930.

Lopez-Ilasaca M, Crespo P, Pellici PG, Gutkind JS, Wetzker R (1997) Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* 275:394-397.

Low MJ (2004) Role of proopiomelanocortin neurons and peptides in the regulation of energy homeostasis. *J Endocrinol Invest* 27:95-100.

Luger TA, Bhardwaj RS, Grabbe S, Schwarz T (1996) Regulation of the immune response by epidermal cytokines and neurohormones. *J Dermatol Sci* 13:5-10.

Luger TA, Brzoska T, Scholzen TE, Kalden DH, Sunderkotter C, Armstrong C*, et al.* (2000) The role of alpha-MSH as a modulator of cutaneous inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 917:232-238.

Luger TA, Scholzen T, Grabbe S (1997) The role of alpha-melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2:87-93.

Luger TA, Scholzen TE, Brzoska T, Bohm M (2003) New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 994:133-140.

Luttrell LM (2008) Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* 39:239-264.

Luttrell LM, Hawes BE, van Biesen T, Luttrell DK, Lansing TJ, Lefkowitz RJ (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 271:19443-19450.

Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115:455-465.

Lyson K, Ceriani G, Takashima A, Catania A, Lipton JM (1994) Binding of anti-inflammatory alpha-melanocyte-stimulating-hormone peptides and proinflammatory cytokines to receptors on melanoma cells. *Neuroimmunomodulation* 1:121-126.

M

Maaser C, Kannengiesser K, Kucharzik T (2006) Role of the melanocortin system in inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1072:123-134.

Madronich S, McKenzie RL, Bjorn LO, Caldwell MM (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J Photochem Photobiol B* 46:5-19.

Makropoulos V, Bruning T, Schulze-Osthoff K (1996) Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF-kappa B and HIV-1 LTR promoter activity. *Arch Toxicol* 70:277-283.

Mandrika I, Muceniece R, Wikberg JE (2001) Effects of melanocortin peptides on lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced NF-kappaB DNA binding and nitric oxide production in macrophage-like RAW 264.7 cells: evidence for dual mechanisms of action. *Biochem Pharmacol* 61:613-621.

Mandrika I, Petrovska R, Wikberg J (2005) Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun* 326:349-354.

Manganiello VC, Degerman E (1999) Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): diverse regulators of cyclic nucleotide signals and inviting molecular targets for novel therapeutic agents. *Thromb Haemost* 82:407-411.

Manna SK, Aggarwal BB (1998) Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents. *J Immunol* 161:2873-2880.

Manna SK, Sarkar A, Sreenivasan Y (2006) Alpha-melanocyte-stimulating hormone down-regulates CXC receptors through activation of neutrophil elastase. *Eur J Immunol* 36:754-769.

Mantoux F, Ortonne JP (2003) Physiologie du système pigmentaire. In: *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* (Dermatologie: Paris, 10 p.

Marles LK, Peters EM, Tobin DJ, Hibberts NA, Schallreuter KU (2003) Tyrosine hydroxylase isoenzyme I is present in human melanosomes: a possible novel function in pigmentation. *Exp Dermatol* 12:61-70.

Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424:83-95.

Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.

Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG (2006) Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18:69-82.

Masaki H, Atsumi T, Sakurai H (1995) Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 206:474-479.

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16:577-586.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603.

McArdle F, Rhodes LE, Parslew R, Jack CI, Friedmann PS, Jackson MJ (2002) UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. *Free Radic Biol Med* 33:1355-1362.

McCall MR, Frei B (1999) Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* 26:1034-1053.

Meewes C, Brenneisen P, Wenk J, Kuhr L, Ma W, Alikoski J*, et al.* (2001) Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity. *Free Radic Biol Med* 30:238-247.

Mehrotra S, Mishra KP, Maurya R, Srimal RC, Singh VK (2002) Immunomodulation by ethanolic extract of Boerhaavia diffusa roots. *Int Immunopharmacol* 2:987-996.

Meunier L (1999) [Mechanisms of cutaneous photo-immunosuppression: the role of dendritic cells]. *Ann Dermatol Venereol* 126:762-764.

Meunier L, Bata-Csorgo Z, Cooper KD (1995) In human dermis, ultraviolet radiation induces expansion of a CD36+ CD11b+ CD1- macrophage subset by infiltration and proliferation; CD1+ Langerhans-like dendritic antigen-presenting cells are concomitantly depleted. *J Invest Dermatol* 105:782-788.

Meunier L, Gonzalez-Ramos A, Cooper KD (1993) Heterogeneous populations of class II MHC+ cells in human dermal cell suspensions. Identification of a small subset responsible for potent dermal antigen-presenting cell activity with features analogous to Langerhans cells. *J Immunol* 151:4067-4080.

Meunier L, Raison-Peyron N, Meynadier J (1998) [UV-induced immunosuppression and skin cancers]. *Rev Med Interne* 19:247-254.

Milligan G (2001) Oligomerisation of G-protein-coupled receptors. *J Cell Sci* 114:1265-1271.

Milligan G (2003) Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol* 64:1271-1276.

Miyamoto S, Martinez GR, Martins AP, Medeiros MH, Di Mascio P (2003) Direct evidence of singlet molecular oxygen [O2(1Deltag)] production in the reaction of linoleic acid hydroperoxide with peroxynitrite. *J Am Chem Soc* 125:4510-4517.

Miyamura Y, Coelho SG, Wolber R, Miller SA, Wakamatsu K, Zmudzka BZ*, et al.* (2007) Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 20:2-13.

Monograph IARC (1992) Solar and Ultraviolet Radiation. In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Vol. 55, Lyon: International Agency for Research on Cancer.

Moore J, Wood JM, Schallreuter KU (1999) Evidence for specific complex formation between alpha-melanocyte stimulating hormone and 6(R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin using near infrared Fourier transform Raman spectroscopy. *Biochemistry* 38:15317-15324.

Morandini R, Boeynaems JM, Hedley SJ, MacNeil S, Ghanem G (1998) Modulation of ICAM-1 expression by alpha-MSH in human melanoma cells and melanocytes. *J Cell Physiol* 175:276-282.

Mori K, Kitayama J, Shida D, Yamashita H, Watanabe T, Nagawa H (2006) Lysophosphatidic acid-induced effects in human colon carcinoma DLD1 cells are partially dependent on transactivation of epidermal growth factor receptor. *J Surg Res* 132:56-61.

Moro O, Ideta R, Ifuku O (1999) Characterization of the promoter region of the human melanocortin-1 receptor (MC1R) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 262:452-460.

Morris DI, Robbins JD, Ruoho AE, Sutkowski EM, Seamon KB (1991) Forskolin photoaffinity labels with specificity for adenylyl cyclase and the glucose transporter. *J Biol Chem* 266:13377-13384.

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

Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD (1992) The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257:1248-1251.

Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T (2006) Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13765-13770.

Mouret S, Philippe C, Gracia-Chantegrel J, Banyasz A, Karpati S, Markovitsi D*, et al.* (2010) UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA: a direct photochemical mechanism? *Org Biomol Chem* 8:1706-1711.

Mouret S, Sauvaigo S, Peinnequin A, Favier A, Beani JC, Leccia MT (2005) E6* oncoprotein expression of human papillomavirus type-16 determines different ultraviolet sensitivity related to glutathione and glutathione peroxidase antioxidant defence. *Exp Dermatol* 14:401-410.

Moustafa M, Szabo M, Ghanem GE, Morandini R, Kemp EH, MacNeil S*, et al.* (2002) Inhibition of tumor necrosis factor-alpha stimulated NFkappaB/p65 in human keratinocytes by alpha-melanocyte stimulating hormone and adrenocorticotropic hormone peptides. *J Invest Dermatol* 119:1244-1253.

Muceniece R, Saleniece K, Riekstina U, Krigere L, Tirzitis G, Ancans J (2007) Betulin binds to melanocortin receptors and antagonizes alpha-melanocyte stimulating hormone induced cAMP generation in mouse melanoma cells. *Cell Biochem Funct* 25:591-596.

Mugridge KG, Perretti M, Ghiara P, Parente L (1991) Alpha-melanocyte-stimulating hormone reduces interleukin-1 beta effects on rat stomach preparations possibly through interference with a type I receptor. *Eur J Pharmacol* 197:151-155.

Mukherjee PK, Saha K, Das J, Pal M, Saha BP (1997) Studies on the anti-inflammatory activity of rhizomes of Nelumbo nucifera. *Planta Med* 63:367-369.

Mukhopadhyay P, Rajesh M, Hasko G, Hawkins BJ, Madesh M, Pacher P (2007a) Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nat Protoc* 2:2295-2301.

Mukhopadhyay P, Rajesh M, Yoshihiro K, Hasko G, Pacher P (2007b) Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358:203-208.

Murphy G, Young AR, Wulf HC, Kulms D, Schwarz T (2001) The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp Dermatol* 10:155-160.

Murphy GM (2009) Ultraviolet radiation and immunosuppression. *Br J Dermatol* 161 Suppl 3:90-95.

N

Nakai K, Yoneda K, Igarashi J, Moriue T, Kosaka H, Kubota Y (2008) Angiotensin II enhances EGF receptor expression levels via ROS formation in HaCaT cells. *J Dermatol Sci* 51:181-189.

Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 15:351-369.

Nardini M, Natella F, Gentili V, Di Felice M, Scaccini C (1997) Effect of caffeic acid dietary supplementation on the antioxidant defense system in rat: an in vivo study. *Arch Biochem Biophys* 342:157-160.

Naziroglu M, Butterworth PJ (2005) Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Can J Appl Physiol* 30:172-185.

Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80:249-257.

Neumann Andersen G, Nagaeva O, Mandrika I, Petrovska R, Muceniece R, Mincheva-Nilsson L*, et al.* (2001) MC(1) receptors are constitutively expressed on leucocyte subpopulations with antigen presenting and cytotoxic functions. *Clin Exp Immunol* 126:441-446.

Newton RA, Roberts DW, Leonard JH, Sturm RA (2007) Human melanocytes expressing MC1R variant alleles show impaired activation of multiple signaling pathways. *Peptides* 28:2387-2396.

NGuyen MVC. NADPH oxydase Nox4 native et recombinante - composés quinoniques, éléments de régulation. Université Grenoble I - Joseph Fourier, Grenoble, 2008.

Nicolaou A, Estdale SE, Tsatmali M, Herrero DP, Thody AJ (2004) Prostaglandin production by melanocytic cells and the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone. *FEBS Lett* 570:223-226.

Nishigori C (2006) Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 5:208-214.

Nisimoto Y, Motalebi S, Han CH, Lambeth JD (1999) The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* 274:22999-23005.

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate And Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249-279.

Norton HL, Kittles RA, Parra E, McKeigue P, Mao X, Cheng K*, et al.* (2007) Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians. *Mol Biol Evol* 24:710-722.

Norval M (2006) The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression. *Prog Biophys Mol Biol* 92:108-118.

Norval M, Gibbs NK, Gilmour J (1995) The role of urocanic acid in UV-induced immunosuppression: recent advances (1992-1994). *Photochem Photobiol* 62:209-217.

Norval M, Simpson TJ, Ross JA (1989) Urocanic acid and immunosuppression. *Photochem Photobiol* 50:267-275.

Nunoi H, Rotrosen D, Gallin JI, Malech HL (1988) Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science* 242:1298-1301.

Nylander K, Bourdon JC, Bray SE, Gibbs NK, Kay R, Hart I*, et al.* (2000) Transcriptional activation of tyrosinase and TRP-1 by p53 links UV irradiation to the protective tanning response. *J Pathol* 190:39-46.

O

Obata T, Brown GE, Yaffe MB (2000) MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit Care Med* 28:N67-77.

Oh H, Jung HY, Kim J, Bae YS (2010) Phosphorylation of serine282 in NADPH oxidase activator 1 by Erk desensitizes EGF-induced ROS generation. *Biochem Biophys Res Commun* 394:691-696.

Ohuchida M, Sasaguri Y, Morimatsu M, Nagase H, Yagi K (1991) Effect of linoleic acid hydroperoxide on production of matrix metalloproteinases by human skin fibroblasts. *Biochem Int* 25:447-452.

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I*, et al.* (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278:135-138.

Opitz N, Drummond GR, Selemidis S, Meurer S, Schmidt HH (2007) The 'A's and 'O's of NADPH oxidase regulation: a commentary on "Subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms". *Free Radic Biol Med* 42:175-179.

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007) Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12:913-922.

Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002) Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1259-1263.

P

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA*, et al.* (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-745.

Palmer HJ, Paulson KE (1997) Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev* 55:353-361.

Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, O'Gorman LE, Green AC*, et al.* (2000) Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 66:176-186.

Pande V, Ramos MJ (2005) NF-kappaB in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. *Curr Med Chem* 12:357-374.

Pandey R, Maurya R, Singh G, Sathiamoorthy B, Naik S (2005) Immunosuppressive properties of flavonoids isolated from Boerhaavia diffusa Linn. *Int Immunopharmacol* 5:541-553.

Parekh AB, Penner R (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77:901-930.

Park HS, Lee SH, Park D, Lee JS, Ryu SH, Lee WJ*, et al.* (2004) Sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, beta Pix, Rac1, and Nox1 in growth factor-induced production of H2O2. *Mol Cell Biol* 24:4384-4394.

Park HS, Park D, Bae YS (2006) Molecular interaction of NADPH oxidase 1 with betaPix and Nox Organizer 1. *Biochem Biophys Res Commun* 339:985-990.

Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest BA (2009a) Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci*.

Park HY, Perez JM, Laursen R, Hara M, Gilchrest BA (1999) Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 274:16470-16478.

Park HY, Wu C, Yaar M, Stachur CM, Kosmadaki M, Gilchrest BA (2009b) Role of BMP-4 and Its Signaling Pathways in Cultured Human Melanocytes. *Int J Cell Biol* 2009:750482.

Parkin G (2004) Chemistry. Zinc-zinc bonds: a new frontier. *Science* 305:1117-1118.

Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH (1988) Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3319-3323.

Pathak MA (1995) Functions of melanin and protection by melanin. In: *Melanin: Its Role in Human Photoprotection.* (Overland Park: Valdenmar Publishing Compagny, 125-133.

Pattison DI, Davies MJ (2006) Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS*:131-157.

Penhoat A, Jaillard C, Saez JM (1989) Corticotropin positively regulates its own receptors and cAMP response in cultured bovine adrenal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4978-4981.

Perner A, Andresen L, Pedersen G, Rask-Madsen J (2003) Superoxide production and expression of NAD(P)H oxidases by transformed and primary human colonic epithelial cells. *Gut* 52:231-236.

Peters EM, Tobin DJ, Seidah NG, Schallreuter KU (2000) Pro-opiomelanocortin-related peptides, prohormone convertases 1 and 2 and the regulatory peptide 7B2 are present in melanosomes of human melanocytes. *J Invest Dermatol* 114:430-437.

Petrosillo G, Di Venosa N, Ruggiero FM, Pistolese M, D'Agostino D, Tiravanti E*, et al.* (2005) Mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia/reperfusion can be attenuated by oxygen tension control. Role of oxygen-free radicals and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 1710:78-86.

Peus D, Vasa RA, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C, Pittelkow MR (1999) UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 112:751-756.

Peus D, Vasa RA, Meves A, Pott M, Beyerle A, Squillace K*, et al.* (1998) H2O2 is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 110:966-971.

Piccoli C, Ria R, Scrima R, Cela O, D'Aprile A, Boffoli D*, et al.* (2005) Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. *J Biol Chem* 280:26467-26476.

Pidoux G, Tasken K (2010) Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J Mol Endocrinol* 44:271-284.

Pinkus R, Weiner LM, Daniel V (1996) Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem* 271:13422-13429.

Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA*, et al.* (1995) Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* 1:1046-1051.

Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67:653-692.

Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK (2006) Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 1763:1413-1426.

Polakowska RR, Piacentini M, Bartlett R, Goldsmith LA, Haake AR (1994) Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. *Dev Dyn* 199:176-188.

Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E (2004) Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 11:1163-1182.

Polte T, Tyrrell RM (2004) Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression. *Free Radic Biol Med* 36:1566-1574.

Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389:300-305.

Poquet L, Clifford MN, Williamson G (2008) Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. *Arch Biochem Biophys* 476:196-204.

Poswig A, Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Hommel C, Quel G*, et al.* (1999) Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation. *J Invest Dermatol* 112:13-18.

Pouget JP, Douki T, Richard MJ, Cadet J (2000) DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet assay. *Chem Res Toxicol* 13:541-549.

Pourzand C, Tyrrell RM (1999) Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochem Photobiol* 70:380-390.

Pourzand C, Watkin RD, Brown JE, Tyrrell RM (1999) Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: the role of ferritin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6751-6756.

Prasad NR, Jeyanthimala K, Ramachandran S (2009) Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. *J Photochem Photobiol B* 95:196-203.

Prota G *Melanins and Melanogenesis*. Academic Press: San Diego, 1992.

Prusis P, Schioth HB, Muceniece R, Herzyk P, Afshar M, Hubbard RE*, et al.* (1997) Modeling of the three-dimensional structure of the human melanocortin 1 receptor, using an automated method and docking of a rigid cyclic melanocyte-stimulating hormone core peptide. *J Mol Graph Model* 15:307-317, 334.

Pryor WA (2000) Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med* 28:141-164.

Punnonen K, Autio P, Kiistala U, Ahotupa M (1991) In-vivo effects of solar-simulated ultraviolet irradiation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in human epidermis. *Br J Dermatol* 125:18-20.

Punnonen K, Lehtola K, Autio P, Kiistala U, Ahotupa M (1995) Chronic UVB irradiation induces superoxide dismutase activity in human epidermis in vivo. *J Photochem Photobiol B* 30:43-48.

Q

Qanbar R, Bouvier M (2003) Role of palmitoylation/depalmitoylation reactions in G-protein-coupled receptor function. *Pharmacol Ther* 97:1-33.

Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, Nickoloff BJ (1999) Role of NF-kappaB in the apoptotic-resistant phenotype of keratinocytes. *J Biol Chem* 274:37957-37964.

R

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266:4244-4250.

Radisky DC, Levy DD, Littlepage LE, Liu H, Nelson CM, Fata JE*, et al.* (2005) Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436:123-127.

Rajora N, Ceriani G, Catania A, Star RA, Murphy MT, Lipton JM (1996) alpha-MSH production, receptors, and influence on neopterin in a human monocyte/macrophage cell line. *J Leukoc Biol* 59:248-253.

Raskin CA (1997) Apoptosis and cutaneous biology. *J Am Acad Dermatol* 36:885-896; quiz 897-888.

Ravanat JL, Di Mascio P, Martinez GR, Medeiros MH, Cadet J (2000) Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J Biol Chem* 275:40601-40604.

Reddy JK (2004) Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: biotic and xenobiotic sensing. *Am J Pathol* 164:2305-2321.

Redondo P, Garcia-Foncillas J, Okroujnov I, Bandres E (1998) Alpha-MSH regulates interleukin-10 expression by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 290:425-428.

Reed JC (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387:773-776.

Rees JL (2004) The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet* 75:739-751.

Reinehr R, Becker S, Eberle A, Grether-Beck S, Haussinger D (2005) Involvement of NADPH oxidase isoforms and Src family kinases in CD95-dependent hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem* 280:27179-27194.

Renzing J, Hansen S, Lane DP (1996) Oxidative stress is involved in the UV activation of p53. *J Cell Sci* 109 (Pt 5):1105-1112.

Rezvani HR, Mazurier F, Cario-Andre M, Pain C, Ged C, Taieb A*, et al.* (2006) Protective effects of catalase overexpression on UVB-induced apoptosis in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* 281:17999-18007.

Ringholm A, Klovins J, Rudzish R, Phillips S, Rees JL, Schioth HB (2004) Pharmacological characterization of loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor that are associated with red hair. *J Invest Dermatol* 123:917-923.

Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L, Baack E*, et al.* (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72:827-834.

Roberg K, Johansson U, Ollinger K (1999) Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 27:1228-1237.

Roberg K, Ollinger K (1998) Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Pathol* 152:1151-1156.

Roberts DW, Newton RA, Beaumont KA, Helen Leonard J, Sturm RA (2006) Quantitative analysis of MC1R gene expression in human skin cell cultures. *Pigment Cell Res* 19:76-89.

Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM*, et al.* (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15038-15043.

Robinson S, Dixon S, August S, Diffey B, Wakamatsu K, Ito S*, et al.* (2010) Protection against UVR involves MC1R-mediated non-pigmentary and pigmentary mechanisms in vivo. *J Invest Dermatol* 130:1904-1913.

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.

Rosen CF, Jacques SL, Stuart ME, Gange RW (1990) Immediate pigment darkening: visual and reflectance spectrophotometric analysis of action spectrum. *Photochem Photobiol* 51:583-588.

Rosso S, Zanetti R, Martinez C, Tormo MJ, Schraub S, Sancho-Garnier H*, et al.* (1996) The multicentre south European study 'Helios'. II: Different sun exposure patterns in the aetiology of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer* 73:1447-1454.

Rota C, Bergamini S, Daneri F, Tomasi A, Virgili F, Iannone A (2002) N-Acetylcysteine negatively modulates nitric oxide production in endotoxin-treated rats through inhibition of NF-kappaB activation. *Antioxid Redox Signal* 4:221-226.

Rouzaud F, Annereau JP, Valencia JC, Costin GE, Hearing VJ (2003) Regulation of melanocortin 1 receptor expression at the mRNA and protein levels by its natural agonist and antagonist. *FASEB J* 17:2154-2156.

Rozengurt E (2007) Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 213:589-602.

Runger TM (2007) How different wavelengths of the ultraviolet spectrum contribute to skin carcinogenesis: the role of cellular damage responses. *J Invest Dermatol* 127:2103-2105.

S

Sakai C, Ollmann M, Kobayashi T, Abdel-Malek Z, Muller J, Vieira WD*, et al.* (1997) Modulation of murine melanocyte function in vitro by agouti signal protein. *EMBO J* 16:3544-3552.

Sanchez-Laorden BL, Jimenez-Cervantes C, Garcia-Borron JC (2007) Regulation of human melanocortin 1 receptor signaling and trafficking by Thr-308 and Ser-316 and its alteration in variant alleles associated with red hair and skin cancer. *J Biol Chem* 282:3241-3251.

Sanchez-Laorden BL, Sanchez-Mas J, Martinez-Alonso E, Martinez-Menarguez JA, Garcia-Borron JC, Jimenez-Cervantes C (2006a) Dimerization of the human melanocortin 1 receptor: functional consequences and dominant-negative effects. *J Invest Dermatol* 126:172-181.

Sanchez-Laorden BL, Sanchez-Mas J, Turpin MC, Garcia-Borron JC, Jimenez-Cervantes C (2006b) Variant amino acids in different domains of the human melanocortin 1 receptor impair cell surface expression. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52:39-46.

Sanchez-Mas J, Guillo LA, Zanna P, Jimenez-Cervantes C, Garcia-Borron JC (2005) Role of G protein-coupled receptor kinases in the homologous desensitization of the human and mouse melanocortin 1 receptors. *Mol Endocrinol* 19:1035-1048.

Sanchez-Mas J, Hahmann C, Gerritsen I, Garcia-Borron JC, Jimenez-Cervantes C (2004) Agonist-independent, high constitutive activity of the human melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Res* 17:386-395.

Sanchez Mas J, Olivares Sanchez C, Ghanem G, Haycock J, Lozano Teruel JA, Garcia-Borron JC*, et al.* (2002) Loss-of-function variants of the human melanocortin-1 receptor gene in melanoma cells define structural determinants of receptor function. *Eur J Biochem* 269:6133-6141.

Sancho P, Fabregat I (2010) NADPH oxidase NOX1 controls autocrine growth of liver tumor cells through up-regulation of the epidermal growth factor receptor pathway. *J Biol Chem* 285:24815-24824.

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.

Sarkar-Agrawal P, Vergilis I, Sharpless NE, DePinho RA, Runger TM (2004) Impaired processing of DNA photoproducts and ultraviolet hypermutability with loss of p16INK4a or p19ARF. *J Natl Cancer Inst* 96:1790-1793.

Sarkar A, Sreenivasan Y, Manna SK (2003) alpha-Melanocyte-stimulating hormone induces cell death in mast cells: involvement of NF-kappaB. *FEBS Lett* 549:87-93.

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.

Sasaki H, Akamatsu H, Horio T (2000a) Protective role of copper, zinc superoxide dismutase against UVB-induced injury of the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Invest Dermatol* 114:502-507.

Sasaki M, Horikoshi T, Uchiwa H, Miyachi Y (2000b) Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment Cell Res* 13:248-252.

Saunders PJ, Diffey BL (1995) Ambulatory monitoring of ultraviolet erythema in photosensitive subjects. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 11:22-24.

Sawada N, Kataoka K, Kondo K, Arimochi H, Fujino H, Takahashi Y, *et al.* (2004) Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. *Br J Cancer* 90:1672-1678.

Sawadogo M (1988) Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. II. DNA binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF. *J Biol Chem* 263:11994-12001.

Sawadogo M, Van Dyke MW, Gregor PD, Roeder RG (1988) Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 263:11985-11993.

Sawyer TK, Hruby VJ, Wilkes BC, Draelos MT, Hadley ME, Bergsneider M (1982) Comparative biological activities of highly potent active-site analogues of alpha-melanotropin. *J Med Chem* 25:1022-1027.

Sawyer TK, Sanfilippo PJ, Hruby VJ, Engel MH, Heward CB, Burnett JB, *et al.* (1980) 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine-alpha-melanocyte-stimulating hormone: a highly potent alpha-melanotropin with ultralong biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:5754-5758.

Schaffer JV, Bolognia JL (2001) The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond. *Arch Dermatol* 137:1477-1485.

Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD (2008) Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts. *Exp Dermatol* 17:395-404.

Schallreuter KU, Moore J, Tobin DJ, Gibbons NJ, Marshall HS, Jenner T, *et al.* (1999) alpha-MSH can control the essential cofactor 6-tetrahydrobiopterin in melanogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 885:329-341.

Schallreuter KU, Wazir U, Kothari S, Gibbons NC, Moore J, Wood JM (2004) Human phenylalanine hydroxylase is activated by H2O2: a novel mechanism for increasing the L-tyrosine supply for melanogenesis in melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 322:88-92.

Schallreuter KU, Wood JM (1999) The importance of L-phenylalanine transport and its autocrine turnover to L-tyrosine for melanogenesis in human epidermal melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 262:423-428.

Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Briviba K, Sies H (1993) Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett* 331:304-306.

Schiller M, Brzoska T, Bohm M, Metze D, Scholzen TE, Rougier A*, et al.* (2004) Solar-simulated ultraviolet radiation-induced upregulation of the melanocortin-1 receptor, proopiomelanocortin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone in human epidermis in vivo. *J Invest Dermatol* 122:468-476.

Schioth HB, Petersson S, Muceniece R, Szardenings M, Wikberg JE (1997) Deletions of the N-terminal regions of the human melanocortin receptors. *FEBS Lett* 410:223-228.

Schioth HB, Phillips SR, Rudzish R, Birch-Machin MA, Wikberg JE, Rees JL (1999) Loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor are common and are associated with red hair. *Biochem Biophys Res Commun* 260:488-491.

Schmid E, El Benna J, Galter D, Klein G, Droge W (1998) Redox priming of the insulin receptor beta-chain associated with altered tyrosine kinase activity and insulin responsiveness in the absence of tyrosine autophosphorylation. *FASEB J* 12:863-870.

Scholzen TE, Sunderkotter C, Kalden DH, Brzoska T, Fastrich M, Fisbeck T*, et al.* (2003) Alpha-melanocyte stimulating hormone prevents lipopolysaccharide-induced vasculitis by down-regulating endothelial cell adhesion molecule expression. *Endocrinology* 144:360-370.

Schrader M, Fahimi HD (2004) Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122:383-393.

Schrader M, Fahimi HD (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1763:1755-1766.

Schrader M, Wodopia R, Fahimi HD (1999) Induction of tubular peroxisomes by UV irradiation and reactive oxygen species in HepG2 cells. *J Histochem Cytochem* 47:1141-1148.

Schrauzer GN (2000) Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell Mol Life Sci* 57:1864-1873.

Schroeder P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S, Krutmann J (2007) Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med* 43:128-135.

Schroeter H, Boyd C, Spencer JP, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C (2002) MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 23:861-880.

Schubert SY, Neeman I, Resnick N (2002) A novel mechanism for the inhibition of NF-kappaB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants. *FASEB J* 16:1931-1933.

Schulein R, Hermosilla R, Oksche A, Dehe M, Wiesner B, Krause G, *et al.* (1998) A dileucine sequence and an upstream glutamate residue in the intracellular carboxyl terminus of the vasopressin V2 receptor are essential for cell surface transport in COS.M6 cells. *Mol Pharmacol* 54:525-535.

Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA (2002) Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 15:433-439.

Seamon KB, Daly JW, Metzger H, de Souza NJ, Reden J (1983) Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives. *J Med Chem* 26:436-439.

Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726-735.

Serrano F, Kolluri NS, Wientjes FB, Card JP, Klann E (2003) NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res* 988:193-198.

Shah BH, Catt KJ (2004) GPCR-mediated transactivation of RTKs in the CNS: mechanisms and consequences. *Trends Neurosci* 27:48-53.

Shaw M, Cohen P, Alessi DR (1998) The activation of protein kinase B by H2O2 or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J* 336 (Pt 1):241-246.

Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003) Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* 375:503-515.

Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700.

Shidoji Y, Hayashi K, Komura S, Ohishi N, Yagi K (1999) Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 264:343-347.

Shindo Y, Hashimoto T (1997) Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UVA irradiation. *J Dermatol Sci* 14:225-232.

Shinyama H, Masuzaki H, Fang H, Flier JS (2003) Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization. *Endocrinology* 144:1301-1314.

Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, Hirai M, Hirakata H, Naito S, *et al.* (2001) A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney. *J Biol Chem* 276:1417-1423.

Siegrist W, Eberle AN (1993) Homologous regulation of the MSH receptor in melanoma cells. *J Recept Res* 13:263-281.

Siegrist W, Solca F, Stutz S, Giuffre L, Carrel S, Girard J*, et al.* (1989) Characterization of receptors for alpha-melanocyte-stimulating hormone on human melanoma cells. *Cancer Res* 49:6352-6358.

Siegrist W, Stutz S, Eberle AN (1994) Homologous and heterologous regulation of alpha-melanocyte-stimulating hormone receptors in human and mouse melanoma cell lines. *Cancer Res* 54:2604-2610.

Siegrist W, Willard DH, Wilkison WO, Eberle AN (1996) Agouti protein inhibits growth of B16 melanoma cells in vitro by acting through melanocortin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 218:171-175.

Simchowitz L, Fischbein LC, Spilberg I, Atkinson JP (1980) Induction of a transient elevation in intracellular levels of adenosine-3',5'-cyclic monophosphate by chemotactic factors: an early event in human neutrophil activation. *J Immunol* 124:1482-1491.

Singer KH, Tuck DT, Sampson HA, Hall RP (1989) Epidermal keratinocytes express the adhesion molecule intercellular adhesion molecule-1 in inflammatory dermatoses. *J Invest Dermatol* 92:746-750.

Singh AK, Dobashi K, Gupta MP, Asayama K, Singh I, Orak JK (1999) Manganese superoxide dismutase in rat liver peroxisomes: biochemical and immunochemical evidence. *Mol Cell Biochem* 197:7-12.

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.

Sjerobabski Masnec I, Poduje S (2008) Photoaging. *Coll Antropol* 32 Suppl 2:177-180.

Slater TF, Sawyer B, Straeuli U (1963) Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta* 77:383-393.

Slominski A, Paus R, Wortsman J (1993) On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology. *Mol Cell Endocrinol* 93:C1-6.

Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84:1155-1228.

Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S (2000) Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev* 80:979-1020.

Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, Schallreuter KU, Paus R, Tobin DJ (2005) Hair follicle pigmentation. *J Invest Dermatol* 124:13-21.

Smit MJ, Vischer HF, Bakker RA, Jongejan A, Timmerman H, Pardo L*, et al.* (2007) Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive g protein-coupled receptor activity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:53-87.

Smith R, Healy E, Siddiqui S, Flanagan N, Steijlen PM, Rosdahl I*, et al.* (1998) Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population. *J Invest Dermatol* 111:119-122.

Soderling SH, Beavo JA (2000) Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 12:174-179.

Soh N (2006) Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. *Anal Bioanal Chem* 386:532-543.

Solca F, Siegrist W, Drozdz R, Girard J, Eberle AN (1989) The receptor for alpha-melanotropin of mouse and human melanoma cells. Application of a potent alpha-melanotropin photoaffinity label. *J Biol Chem* 264:14277-14281.

Song X, Mosby N, Yang J, Xu A, Abdel-Malek Z, Kadekaro AL (2009) alpha-MSH activates immediate defense responses to UV-induced oxidative stress in human melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res* 22:809-818.

Spencer JD, Chavan B, Marles LK, Kauser S, Rokos H, Schallreuter KU (2005) A novel mechanism in control of human pigmentation by {beta}-melanocyte-stimulating hormone and 7-tetrahydrobiopterin. *J Endocrinol* 187:293-302.

Spencer JD, Gibbons NC, Rokos H, Peters EM, Wood JM, Schallreuter KU (2007) Oxidative stress via hydrogen peroxide affects proopiomelanocortin peptides directly in the epidermis of patients with vitiligo. *J Invest Dermatol* 127:411-420.

Sravani PV, Babu NK, Gopal KV, Rao GR, Rao AR, Moorthy B*, et al.* (2009) Determination of oxidative stress in vitiligo by measuring superoxide dismutase and catalase levels in vitiliginous and non-vitiliginous skin. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 75:268-271.

Stadtman ER (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 9:315-325.

Stadtman ER (2004) Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem* 11:1105-1112.

Star RA, Rajora N, Huang J, Stock RC, Catania A, Lipton JM (1995) Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8016-8020.

Steel A, Nussberger S, Romero MF, Boron WF, Boyd CA, Hediger MA (1997) Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PepT1. *J Physiol* 498 (Pt 3):563-569.

Steinkamp-Fenske K, Bollinger L, Xu H, Yao Y, Horke S, Forstermann U*, et al.* (2007) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase and NADPH oxidase by betulinic acid in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 322:836-842.

Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ (1994) Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:95-102.

Stork PJ, Schmitt JM (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 12:258-266.

Storz P (2005) Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 10:1881-1896.

Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63:101-132.

Strniskova M, Barancik M, Ravingerova T (2002) Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes. *Gen Physiol Biophys* 21:231-255.

Sturm RA, Box NF, Ramsay M (1998) Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *Bioessays* 20:712-721.

Sturm RA, Teasdale RD, Box NF (2001) Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* 277:49-62.

Suh J, Zhu BZ, Frei B (2003) Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 34:1306-1314.

Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D*, et al.* (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401:79-82.

Sumimoto H, Hata K, Mizuki K, Ito T, Kage Y, Sakaki Y*, et al.* (1996) Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. *J Biol Chem* 271:22152-22158.

Sumimoto H, Miyano K, Takeya R (2005) Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun* 338:677-686.

Sun Y, Oberley LW (1996) Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med* 21:335-348.

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K*, et al.* (1996) Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem J* 318 (Pt 2):379-382.

Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA (1996) Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 137:1627-1633.

Suzuki I, Tada A, Ollmann MM, Barsh GS, Im S, Lamoreux ML*, et al.* (1997) Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. *J Invest Dermatol* 108:838-842.

Svobodova A, Psotova J, Walterova D (2003) Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 147:137-145.

Svobodova A, Walterova D, Vostalova J (2006) Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150:25-38.

Szanto I, Rubbia-Brandt L, Kiss P, Steger K, Banfi B, Kovari E*, et al.* (2005) Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol* 207:164-176.

T

Takahashi H, Teranishi Y, Nakanishi S, Numa S (1981) Isolation and structural organization of the human corticotropin--beta-lipotropin precursor gene. *FEBS Lett* 135:97-102.

Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T*, et al.* (2003) Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 278:25234-25246.

Tamiji S, Beauvillain JC, Mortier L, Jouy N, Tual M, Delaporte E*, et al.* (2005) Induction of apoptosis-like mitochondrial impairment triggers antioxidant and Bcl-2-dependent keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 125:647-658.

Tan Y, Yu R, Pezzuto JM (2003) Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin Cancer Res* 9:2866-2875.

Taura M, Miyano K, Minakami R, Kamakura S, Takeya R, Sumimoto H (2009) A region N-terminal to the tandem SH3 domain of p47phox plays a crucial role in the activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem J* 419:329-338.

Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L1005-1028.

Thiele JJ, Podda M, Packer L (1997) Tropospheric ozone: an emerging environmental stress to skin. *Biol Chem* 378:1299-1305.

Thody AJ, Ridley K, Penny RJ, Chalmers R, Fisher C, Shuster S (1983) MSH peptides are present in mammalian skin. *Peptides* 4:813-816.

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H*, et al.* (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.

Tobi SE, Gilbert M, Paul N, McMillan TJ (2002) The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, protects against the oxidative cellular and genotoxic damage of UVA radiation. *Int J Cancer* 102:439-444.

Touyz RM, Chen X, Tabet F, Yao G, He G, Quinn MT*, et al.* (2002) Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 90:1205-1213.

Trueba GP, Sanchez GM, Giuliani A (2004) Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. *Front Biosci* 9:2029-2044.

Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17:3-8.

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335-344.

Tyrrell RM (1991) UVA (320-380 nm) radiation as an oxidative stress. In: *Oxidative Stress: oxidants and antioxidants* (Sies H, ed), London: Academic Press, 57-83.

U

Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H (2005) The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem* 280:23328-23339.

V

Vacaresse N, Vieira O, Robbesyn F, Jurgens G, Salvayre R, Negre-Salvayre A (2001) Phenolic antioxidants trolox and caffeic acid modulate the oxidized LDL-induced EGF-receptor activation. *Br J Pharmacol* 132:1777-1788.

Vaisman A, Woodgate R (2001) Unique misinsertion specificity of poliota may decrease the mutagenic potential of deaminated cytosines. *EMBO J* 20:6520-6529.

Valencia A, Kochevar IE (2006) Ultraviolet A induces apoptosis via reactive oxygen species in a model for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Free Radic Biol Med* 40:641-650.

Valencia A, Kochevar IE (2008) Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 128:214-222.

Valencia A, Rajadurai A, Carle AB, Kochevar IE (2006) 7-Dehydrocholesterol enhances ultraviolet A-induced oxidative stress in keratinocytes: roles of NADPH oxidase, mitochondria, and lipid rafts. *Free Radic Biol Med* 41:1704-1718.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266:37-56.

Valko M, Morris H, Cronin MT (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12:1161-1208.

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.

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11:328-330.

Valverde P, Manning P, Todd C, McNeil CJ, Thody AJ (1996) Tyrosinase may protect human melanocytes from the cytotoxic effects of the superoxide anion. *Exp Dermatol* 5:247-253.

van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E*, et al.* (1995) Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376:781-784.

van Kranen HJ, de Laat A, van de Ven J, Wester PW, de Vries A, Berg RJ*, et al.* (1997) Low incidence of p53 mutations in UVA (365-nm)-induced skin tumors in hairless mice. *Cancer Res* 57:1238-1240.

Vejlsgaard GL, Ralfkiaer E, Avnstorp C, Czajkowski M, Marlin SD, Rothlein R (1989) Kinetics and characterization of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on keratinocytes in various inflammatory skin lesions and malignant cutaneous lymphomas. *J Am Acad Dermatol* 20:782-790.

Vignais PV (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59:1428-1459.

Virag L, Szabo E, Bakondi E, Bai P, Gergely P, Hunyadi J*, et al.* (2002) Nitric oxide-peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp Dermatol* 11:189-202.

Voisey J, Gomez-Cabrera Mdel C, Smit DJ, Leonard JH, Sturm RA, van Daal A (2006) A polymorphism in the agouti signalling protein (ASIP) is associated with decreased levels of mRNA. *Pigment Cell Res* 19:226-231.

Voisey J, van Daal A (2002) Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment Cell Res* 15:10-18.

Volpp BD, Nauseef WM, Clark RA (1988) Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 242:1295-1297.

von Montfort C, Fernau NS, Beier JI, Sies H, Klotz LO (2006) Extracellular generation of hydrogen peroxide is responsible for activation of EGF receptor by ultraviolet A radiation. *Free Radic Biol Med* 41:1478-1487.

W

Wallin E, von Heijne G (1995) Properties of N-terminal tails in G-protein coupled receptors: a statistical study. *Protein Eng* 8:693-698.

Wang C, Youle RJ (2009) The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet* 43:95-118.

Warren JB, Loi RK, Coughlan ML (1993) Involvement of nitric oxide synthase in the delayed vasodilator response to ultraviolet light irradiation of rat skin in vivo. *Br J Pharmacol* 109:802-806.

Watabe S, Hiroi T, Yamamoto Y, Fujioka Y, Hasegawa H, Yago N*, et al.* (1997) SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur J Biochem* 249:52-60.

Webb AR, Holick MF (1988) The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3. *Annu Rev Nutr* 8:375-399.

Weisiger RA, Fridovich I (1973) Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* 248:3582-3592.

Weller R (1997) Nitric oxide--a newly discovered chemical transmitter in human skin. *Br J Dermatol* 137:665-672.

Werner E, Werb Z (2002) Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *J Cell Biol* 158:357-368.

Wick W, Grimmel C, Wagenknecht B, Dichgans J, Weller M (1999) Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1306-1312.

Wikberg JE, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C*, et al.* (2000) New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res* 42:393-420.

Wilson BD, Ollmann MM, Kang L, Stoffel M, Bell GI, Barsh GS (1995) Structure and function of ASP, the human homolog of the mouse agouti gene. *Hum Mol Genet* 4:223-230.

Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH (2001) Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 31:1456-1464.

Wlaschek M, Heinen G, Poswig A, Schwarz A, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K (1994) UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem Photobiol* 59:550-556.

Wolff GL (2003) Regulation of yellow pigment formation in mice: a historical perspective. *Pigment Cell Res* 16:2-15.

Wong W, Minchin RF (1996) Binding and internalization of the melanocyte stimulating hormone receptor ligand [Nle4, D-Phe7] alpha-MSH in B16 melanoma cells. *Int J Biochem Cell Biol* 28:1223-1232.

Wood JM, Chavan B, Hafeez I, Schallreuter KU (2004) Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H2O2. *Biochem Biophys Res Commun* 325:1412-1417.

Wood JM, Gibbons NC, Schallreuter KU (2006) Melanocortins in human melanocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 52:75-78.

Wosniak J, Jr., Santos CX, Kowaltowski AJ, Laurindo FR (2009) Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: effects of mild mitochondrial dysfunction on angiotensin II-mediated increase in Nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal* 11:1265-1278.

Wu M, Hemesath TJ, Takemoto CM, Horstmann MA, Wells AG, Price ER*, et al.* (2000) c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev* 14:301-312.

Y

Yaar M, Wu C, Park HY, Panova I, Schutz G, Gilchrest BA (2006) Bone morphogenetic protein-4, a novel modulator of melanogenesis. *J Biol Chem* 281:25307-25314.

Yamashita K, Lu H, Lu J, Chen G, Yokoyama T, Sagara Y*, et al.* (2002) Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin Chim Acta* 325:91-96.

Yang Y, Dickinson C, Haskell-Luevano C, Gantz I (1997) Molecular basis for the interaction of [Nle4,D-Phe7]melanocyte stimulating hormone with the human melanocortin-1 receptor. *J Biol Chem* 272:23000-23010.

Yen TT, Gill AM, Frigeri LG, Barsh GS, Wolff GL (1994) Obesity, diabetes, and neoplasia in yellow A(vy)/- mice: ectopic expression of the agouti gene. *FASEB J* 8:479-488.

Ying Z, Kampfrath T, Sun Q, Parthasarathy S, Rajagopalan S (2010) Evidence that alpha-lipoic acid inhibits NF-kappaB activation independent of its antioxidant function. *Inflamm Res*.

Yohn JJ, Critelli M, Lyons MB, Norris DA (1990) Modulation of melanocyte intercellular adhesion molecule-1 by immune cytokines. *J Invest Dermatol* 95:233-237.

Yohn JJ, Norris DA, Yrastorza DG, Buno IJ, Leff JA, Hake SS*, et al.* (1991) Disparate antioxidant enzyme activities in cultured human cutaneous fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes. *J Invest Dermatol* 97:405-409.

Yoon SW, Chun JS, Sung MH, Kim JY, Poo H (2008) alpha-MSH inhibits TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-13 expression by modulating p38 kinase and nuclear factor kappaB signaling in human chondrosarcoma HTB-94 cells. *Osteoarthritis Cartilage* 16:115-124.

Yoon YS, Lee JH, Hwang SC, Choi KS, Yoon G (2005) TGF beta1 induces prolonged mitochondrial ROS generation through decreased complex IV activity with senescent arrest in Mv1Lu cells. *Oncogene* 24:1895-1903.

Yoshikawa T, Yamamoto Y, Naito Y *Free radicals in chemistry*, Oica International edn. Biology and Medicine: Londres, 2000.

You WC, Zhang L, Gail MH, Chang YS, Liu WD, Ma JL*, et al.* (2000) Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. *J Natl Cancer Inst* 92:1607-1612.

Z

Zanassi P, Paolillo M, Feliciello A, Avvedimento EV, Gallo V, Schinelli S (2001) cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. *J Biol Chem* 276:11487-11495.

Zanna PT, Sanchez-Laorden BL, Perez-Oliva AB, Turpin MC, Herraiz C, Jimenez-Cervantes C*, et al.* (2008) Mechanism of dimerization of the human melanocortin 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 368:211-216.

Zdzisinska B, Rzeski W, Paduch R, Szuster-Ciesielska A, Kaczor J, Wejksza K*, et al.* (2003) Differential effect of betulin and betulinic acid on cytokine production in human whole blood cell cultures. *Pol J Pharmacol* 55:235-238.

Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J*, et al.* (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372:773-776.

Zimmerman MC, Oberley LW, Flanagan SW (2007) Mutant SOD1-induced neuronal toxicity is mediated by increased mitochondrial superoxide levels. *J Neurochem* 102:609-618.

Zuco V, Supino R, Righetti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C*, et al.* (2002) Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett* 175:17-25.

ANNEXES

ANNEXE 1: COMPOSITION DES TAMPONS

Tampon de lyse RIPA	
NaCl	150 mM
NP-40	1%
Sodium déoxycholate	0,5%
SDS	0,1%
Tris-HCl	50 mM, pH 8.0

Tampon de charge	
SDS	1%
DTT	100 mM
Tris-HCl	50 mM, pH 7.5

Tampon pH 8.8 (Tris 1,5 M, SDS 4%)	
Tris Base	187 g
SDS 10%	40 ml
Eau milli Q	qsp 1 L

Ajuster à pH 8.8 avec HCl 12 N.

Tampon pH 6.8 (Tris 0,5 M, SDS 4%)	
Tris Base	60 g
SDS 10%	40 ml
Eau milli Q	qsp. 1 L

Ajuster à pH 6.8 avec HCl 12N.

Gel de concentration à 5%	
Tampon pH 6.8	2,27 ml
Eau milli Q	5,5 ml
Acrylamide 40%	1,12 ml
APS 10%	45,25 µl
Temed	9,15 µl

Gel de séparation à 10%	
Tampon pH 8.8	2,5 ml
Eau milli Q	4,95 ml
Acrylamide 40%	2,5 ml
APS 10%	50 µl
Temed	5 µl

Tampon de migration 10X	
Tris Base	30 g
Glycine	144 g
SDS 10%	100 ml
Eau milli Q	qsp 1 L

Tampon de migration 1X	
Tp de migration 10X	100 ml
Eau milli Q	qsp 1 L

Tampon de transfert 10X	
Tris Base	30 g
Glycine	144 g
Eau milli Q	qsp 1 L

Tampon de transfert 1X	
Tp de transfert 10X	100 ml
Méthanol	200 ml
Eau milli Q	qsp 1 L

Tampon TBS 10X	
Tris Base	24,2 g
NaCl	80 g
Eau milli Q	qsp 1 L

Ajuster à 7.6 avec HCl 12N.

Tampon TTBS	
Tampon TBS 10X	100 ml
Tween 4	5 ml
Eau milli Q	qsp 1 L

Tampon de blocage	
Lait	2,5 g
Tampon TTBS	qsp. 50 ml

ANNEXE 2: LISTE DES PUBLICATIONS & DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

CONGRES

- 6ème congrès de l'école doctorale CBS² Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé, **5-7 mai 2008**, Montpellier, France.
- Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (CARD), **11-13 septembre 2008**, Toulouse, France.
- 25th Congress of International Federation Societies of Cosmetic Chemistry (IFSCC), **6-9 octobre 2008**, Barcelone, Espagne.
- Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (CARD), **3-5 juin 2009**, Reims, France.
- Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (CARD), **20-21 juin 2010**, Marseille, France.

PUBLICATIONS

- **Nieto L, Joseph G, Stella A, Henri P, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B, Clottes E, Erard M** (**2007**). Differential effects of phosphorylation on DNA binding properties of N Oct-3 are dictated by protein/DNA complex structures. *J Mol Biol*. **370**(4):687-700.
- **Henri P, Beaumel S, Guezennec A, Poumès C, Stoebner PE, Stasia MJ, Guesnet J, Martinez J, Meunier L** (**2010**). MC1R expression in HaCaT keratinocytes inhibits UVA-induced ROS production via EGFR and cAMP-dependent mechanisms. *J Invest Dermatol.* (*soumis*).

COMMUNICATIONS ORALES

- **Henri P**. Le récepteur à la mélanocortine de type 1 (MC1R): une action antioxydante contre les ultraviolets? 6ème congrès de l'école doctorale CBS² Sciences Chimiques et Biologiques pour la santé, **5-7 mai 2008**, Montpellier, France.

- **Henri P, Meunier L, Guezennec A, Poumès C, Stoebner PE, Martinez J, Guesnet J**. Melanocortin receptor type 1: an antioxidant action against UV light? 25th congress of International Federation Societies of Cosmetic Chemistry (IFSCC), **6-9 octobre 2008**, Barcelone, Espagne.
- **Henri P, Meunier L, Guezennec A, Poumès C, Stoebner PE, Martinez J, Guesnet J**. MC1R expression in HaCaT keratinocytes inhibits UVA-induced ROS production via a cAMP dependent mechanism and stimulates NoxA1 phosphorylation. Congrès Annuel de Recherche Dermatologique (CARD), **3-5 juin 2009**, Reims, France.

POSTERS

- **Henri P, Stoebner PE, Martinez J, Meunier L**. Expression of MC1R in keratinocytes modulates UVA-induced oxidative stress by NADPH oxidase via CAMP dependent mechanisms. Conseil scientifique de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), **25-26 mars 2009**, Montpellier, France

ANNEXE 3: ARTICLE SOUMIS A *JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY*

MC1R Expression in HaCaT Keratinocytes Inhibits UVA-Induced ROS Production via EGFR and cAMP-Dependent Mechanisms

Pauline Henri [1], Sylvain Beaumel [4], Anne Guezennec [2], Carine Poumès [2], Pierre-Emmanuel Stoebner [1,3], Marie-José Stasia [4], Joëlle Guesnet [2], Jean Martinez [1] and Laurent Meunier [1,3]

[1] Institut of Biomolecules Max Mousseron (IBMM), University Montpellier I and II, UMR CNRS 5247, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France

[2] Yves Saint Laurent Research and Development, 28-34 Boulevard du Parc, 92200 Neuilly sur Seine, France

[3] Department of Dermatology, University Hospital Caremeau, Place du Professeur Robert Debré, 30029 Nîmes Cedex 9, France

[4] Chronic Granulomatous Disease Diagnosis and Research Center (CDiReC), University Hospital Grenoble, Therex-TIMC/Imag UMR CNRS 5525, University Joseph Fourier, 38043 Grenoble Cedex 09, France

Correspondence : Pr. Laurent Meunier, IBMM, University Montpellier I and II, UMR CNRS 5247, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France.

E-mail : laurent.meunier@univ-montp1.fr

Short title: MC1R inhibits UVA-induced ROS.

MC1R Expression in HaCaT Keratinocytes Inhibits UVA-Induced ROS Production via EGFR and cAMP-Dependent Mechanisms

Pauline Henri [1], Sylvain Beaumel [4], Anne Guezennec [2], Carine Poumès [2], Pierre-Emmanuel Stoebner [1,3], Marie-José Stasia [4], Joëlle Guesnet [2], Jean Martinez [1] and Laurent Meunier [1,3]

[1] Institut of Biomolecules Max Mousseron (IBMM), University Montpellier I and II, UMR CNRS 5247, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5, France

[2] Yves Saint Laurent Research and Development, 28-34 Boulevard du Parc, 92200 Neuilly sur Seine, France

[3] Department of Dermatology, University Hospital Caremeau, Place du Professeur Robert Debré, 30029 Nîmes Cedex 9, France

[4] Chronic Granulomatous Disease Diagnosis and Research Center (CDiReC), University Hospital Grenoble, Therex-TIMC/Imag UMR CNRS 5525, University Joseph Fourier, 38043 Grenoble Cedex 09, France

Correspondence : Pr. Laurent Meunier, IBMM, University Montpellier I and II, UMR CNRS 5247, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 5, France.

E-mail : laurent.meunier@univ-montp1.fr

Short title: MC1R inhibits UVA-induced ROS.

Abbreviations: α-MSH: alpha-melanocyte stimulating hormone; cAMP: 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate; carboxy-H_2DCF-DA: 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FBS: Foetal Bovine Serum; H-89 : N-[2-(p-bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide; IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine; NADPH oxidase : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase ; PD153035: 4-[(3-bromophenyl) amino]-6,7-dimethoxyquinazoline; PD98059: 2'-amino-3'-methoxyflavone; PKA : protein kinase A; RIPA buffer: radioimmunoprecipitation buffer.

ABSTRACT

Ultraviolet A (UVA) radiations are responsible for deleterious effects, mainly due to reactive oxygen species (ROS) production. Alpha-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) binds to Melanocortin-1 Receptor (MC1R) in melanocytes to stimulate pigmentation and modulate cutaneous inflammatory responses. MC1R may be induced in keratinocytes after UV exposure. To investigate the effect of MC1R signaling on UVA-induced ROS (UVA-ROS) production, we generated HaCaT cells that stably express human MC1R (HaCaT-MC1R) or the Arg151Cys ($R_{151}C$) non-functional variant (HaCaT-$R_{151}C$). We then assessed ROS production immediately after UVA exposure and found that: (1) UVA-ROS production was strongly reduced in HaCaT-MC1R but not in HaCaT-$R_{151}C$ cells compared to parental HaCaT cells; (2) this inhibitory effect was further amplified by α-MSH treatment of HaCaT-MC1R cells before UVA exposure; (3) after UVA irradiation, NoxA1 phosphorylation was increased in HaCaT-MC1R compared to HaCaT and HaCaT-$R_{151}C$ cells. Inhibition of PKA in HaCaT-MC1R cells resulted in a marked increase of UVA-ROS production; (4) the ability of HaCaT-MC1R cells to produce UVA-ROS was restored by inhibiting epidermal growth factor receptor (EGFR) or extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity before UVA exposure. Our findings suggest that constitutive activity of MC1R in keratinocytes may reduce UVA-induced oxidative stress via EGFR and cAMP-dependent mechanisms.

INTRODUCTION

UVA radiations (320-400 nm) have cutaneous deleterious effects and are potent inducers of ROS. Increased level of ROS in the skin is a major cause of cellular damage that leads to apoptosis, lipid peroxidation, photoaging and skin cancers. α-MSH is derived from pro-opiomelanocortin (POMC) and is expressed both in the central nervous system and peripheral tissues including skin (Slominski *et al.*, 2000). Recent studies have demonstrated that α-MSH could inhibit intracellular peroxidation in keratinocytes and melanoma cells (Haycock *et al.*, 2000), decrease oxidative burst in human macrophages (Sarkar *et al.*, 2003) and inhibit the production of superoxide radicals (Oktar *et al.*, 2004), thus indicating that it may stimulate a quick anti-oxidant defense. The actions of α-MSH are mediated by its binding to all the known melanocortin receptors (i.e. MC1, -3, -4 and -5R) except MC2R. MCRs are G protein-coupled, seven-pass transmembrane receptors (GPCRs) that activate cAMP-dependent pathways. MC1R expression is not restricted to melanocytes and has been observed in several other cell types including keratinocytes, fibroblasts, monocytes, dendritic and endothelial cells suggesting other functions for this receptor (Luger *et al.*, 2000). Indeed, several data show that α-MSH is involved in the regulation of apoptosis, inflammation and UV-induced immune suppression (Bohm *et al.*, 2005). Furthermore, recent findings demonstrate that, like other GPCRs, MC1R may display agonist independent activity which results in increased levels of cAMP (Garcin *et al.*, 2007; Garcin *et al.*, 2009; Sanchez-Mas *et al.*, 2004). The human *MC1R* gene is highly polymorphic and several variants, such as the $Arg_{151}Cys$ ($R_{151}C$) mutation, are associated with the red hair color phenotype (RHC) (Valverde *et al.*, 1995), poor tanning ability and elevated risk of melanoma and carcinoma (Kennedy *et al.*, 2001).

These variants can bind to α-MSH but are unable to activate adenylate cyclase in cell cultures. Under the action of α-MSH, MC1R regulates the amount and type of pigment production and is a major determinant of the skin phototype and sensitivity to UV light. Moreover, after UV irradiation, both mRNA and the protein expression of MC1R are induced *in vitro* and *in vivo* at the cell surface of keratinocytes (Chakraborty *et al.*, 1999). In this study, we investigated the effect of MC1R signaling on UVA-induced ROS (UVA-ROS) production in keratinocytes that express high level of MC1R at the cell surface. For that purpose, we used the immortalized human keratinocyte cell line HaCaT (Fusenig and Boukamp, 1998), stably transfected with wild type human *MC1R* (HaCaT-MC1R) or the non-functional variant $R_{151}C$ ((HaCaT-$R_{151}C$) (Garcin *et al.*, 2007; Garcin *et al.*, 2009). We focused our analysis on UVA radiations since most of the mutagenic and carcinogenic effects of UVA appears to be mediated through ROS production (de Gruijl, 2000).

RESULTS

Generation of HaCaT cells that stably express functional MC1R

To investigate the effects of MC1R signaling on UVA-ROS production we used HaCaT cell lines that stably express human wild type *MC1R* (HaCaT-MC1R cells) or the *MC1R* variant $R_{151}C$ (HaCaT-$R_{151}C$ cells) (Garcin *et al.*, 2007; Garcin *et al.*, 2009). First we assessed the functional properties of MC1R and of the $R_{151}C$ variant in these cells by using the ^{125}I-NDP-MSH synthetic α-MSH analogue in competitive radioligand binding assays. In agreement with Roberts et al. (Roberts *et al.*, 2006), we did not observe any specific binding of ^{125}I-NDP-MSH in parental HaCaT cells (Figure 1a). Conversely, the affinity of the radioligand was similar in all transfected HaCaT cells indicating that MC1R binding to α-MSH was unaffected by the $R_{151}C$ mutation. On the other hand, incubation with α-MSH strongly increased cAMP production only in HaCaT-MC1R cells similarly to previous studies (Garcin *et al.*, 2007; Garcin *et al.*, 2009; Sanchez-Mas *et al.*, 2004), but not in parental HaCaT and HaCaT-$R_{151}C$ cells (Figure 1b). Incubation with forskolin, which directly activates adenylyl cyclase, increased cAMP production in all cell lines.

UVA-ROS production is strongly reduced in HaCaT-MC1R cells and almost completely abrogated after α-MSH treatment.

We then analyzed the effects of a broad range of UVA doses (0.6 J/cm² to 9 J/cm²) on the different HaCaT cell lines and observed, immediately after UVA exposure, a dose-dependent and marked increase of intracellular ROS production in parental HaCaT and HaCaT-$R_{151}C$ cells (Figure 2), whereas UVA-ROS production was significantly reduced in the two HaCaT-MC1R clones (Figure 2).

We then investigated whether α-MSH could modulate UVA-ROS production by pre-incubating cells with 1 µM α-MSH for 1 hour before UVA irradiation (0.6 J/cm^2 to 9 J/cm^2). α-MSH significantly blocked UVA-ROS production in HaCaT-MC1R cells (clones 35 and 53), whereas it had no effect on UVA-ROS production in HaCaT (data not shown) or a minor effect in HaCaT-R_{151}C cells (Figure 2).

UVA-ROS inhibition is dependent on NADPH oxidase and cAMP/PKA pathways.

Since UVA is known to stimulate ROS production in keratinocytes mainly via a Nox1-based NADPH oxidase mechanism (Valencia and Kochevar, 2008), HaCaT cells were pre-treated with 10 µM Apocynin, a NADPH oxidase inhibitor for 1 hour and then UVA-irradiated (9 J/cm^2). Apocynin inhibited UVA-ROS production by 63±2 % in parental HaCaT cells and by 59±1% in HaCaT-R_{151}C cells ($P<0.001$; n=3), confirming that NADPH oxidase plays a major role in UVA-ROS production (data not shown). Apocynin inhibited UVA-ROS production by only 29±10% (clone 35) and 28±5% (clone 53) in HaCaT-MC1R cells ($P<0.05$; n=3), suggesting that most of the ROS production in these cells is also dependent on a NADPH oxidase mechanism.

Mitochondria were not involved in UVA-ROS generation since mitochondrial superoxide anion production was not detected in parental and transfected HaCaT cells immediately after UVA exposure (data not shown).

The increased cAMP level in HaCaT-MC1R cells could be responsible for the strong reduction of UVA-ROS production in these cells. To verify this hypothesis, HaCaT cells were stimulated with 5 µM H-89, an inhibitor of PKA (which is activated by cAMP), for 1 hour and then UVA-irradiated (9 J/cm^2).

H-89 had no effect on HaCaT and HaCaT-R_{151}C cells, but markedly increased UVA-ROS production in HaCaT-MC1R cells (Figure 3). These results indicate that UVA-ROS production inhibition in HaCaT-MC1R cells is linked to their strong cAMP response.

NoxA1 phosphorylation is increased in HaCaT-MC1R cells.

Nox1 activation depends on interaction with regulatory subunits including NoxO1 and NoxA1 (Bedard and Krause, 2007). Recent findings suggest that PKA-dependent phosphorylation of the regulatory NoxA1 subunit is a new pathway for inhibition of ROS production (Kim *et al.*, 2007). To verify this hypothesis, NoxA1 was immunoprecipitated in the different HaCaT cell lines and its phosphorylation status was determined by immunoblotting with an anti-phospho-Ser/Thr PKA antibody. NoxA1 phosphorylation was higher in HaCaT-MC1R cells than in parental HaCaT or HaCaT-R_{151}C cells that showed a phosphorylation level comparable to that of HaCaT cells (Figure 4). These results indicate that over-expression of functional MC1Rs in HaCaT cells is associated with increased phosphorylation of NoxA1.

Inhibition of EGFR and ERK increases ROS production after UVA exposure in HaCaT-MC1R cells.

Since a link may exist between Nox1 activity and EGFR activation (Chen *et al.*, 2008) and since GPCRs may transactivate EGFR (Bhola and Grandis, 2008), we then investigated the effect of the EGFR inhibitor PD153035 (0.5 µM for 1 hour) on UVA-ROS production in the different HaCaT cell lines. EGFR inhibition restored UVA-ROS production in HaCaT-MC1R cells, but had no effects on the parental HaCaT and HaCaT-R_{151}C cell lines (Figure 5a).

Then, as ERK is the major mitogenic pathway initiated by EGFR activation (Blenis, 1993; Marshall, 1995) and is implicated in the regulation of EGF-induced ROS generation (Oh *et al.*, 2010), we treated cells with a specific ERK inhibitor (20 µM PD98059 for 1 hour) before UVA irradiation (9 J/cm^2). ERK inhibition also increased UVA-ROS production in HaCaT-MC1R cells, but not in the parental HaCaT and HaCaT-R_{151}C cell lines (Figure 5b). These results suggest that EGFR, ERK and MC1R may act in concert to regulate ROS production after UVA exposure.

EGFR and ERK inhibition decrease α-MSH-induced cAMP production in HaCaT-MC1R cells.

To test this hypothesis, we then measured cAMP levels in HaCaT cells after stimulation either with α-MSH (1 µM, 1 hour) alone or in combination with 0.5 µM PD153035 (EGFR inhibitor) or with 20 µM PD98059 (ERK inhibitor) for 1 hour. As expected, α-MSH increased intracellular cAMP levels in HaCaT-MC1R cells, but not in parental HaCaT and HaCaT-R_{151}C cells. Conversely, PD153035 and PD98059 pre-treatment strongly reduced α-MSH-induced cAMP production in HaCaT-MC1R cells (Figure 6), whereas it had no effect on forskolin-induced (10 µM, 1 hour) cAMP production (data not shown).

DISCUSSION

In this study we assessed the effects of UV light on keratinocytes that express high levels of MC1R at the cell surface as it may occur in human skin after solar exposure by using HaCaT cell lines that stably express MC1R or the non-functional $Arg_{151}Cys$ ($R_{151}C$) variant. Although MC1R expression in HaCaT cells is controversial, our results are in agreement with those by Roberts (Roberts *et al.*, 2006) and confirm that HaCaT keratinocytes do not express MC1R. Our findings indicate that in HaCaT-MC1R cells (but not in HaCaT-$R_{151}C$ cells) early ROS production after UVA irradiation is reduced and almost abrogated after α-MSH treatment.

MC1R is a G-protein coupled receptor (GPCR) and its activation leads to the interaction of activated G-proteins with adenylate cyclase causing an accumulation of cAMP. Constitutive activity may be a feature of GPCRs and high agonist independent MC1R activity, which results in increased levels of cAMP, has been described in human cells (Garcin *et al.*, 2007; Garcin *et al.*, 2009; Sanchez-Mas *et al.*, 2004). Our data confirm these findings and demonstrate that stable expression of MC1R in HaCaT cells is sufficient to strongly inhibit ROS production after UVA exposure. These effects are probably mediated by increased levels of intracellular cAMP because ROS production was not inhibited in HaCaT-$R_{151}C$ cells, which express a non-functional variant of MC1R, and the H-89 inhibitor of PKA (which is activated by cAMP) had no effect on HaCaT-$R_{151}C$ cells. Although cAMP production and PKA activation have been implicated in the negative regulation of ROS production by phagocytes (Crawford *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2005), little is known about their role in Nox1 activity. It has recently been reported that PKA phosphorylation of NoxA1, one of the regulatory subunits of Nox1 (Bedard and Krause, 2007), results in inhibition of Nox1 activity (Kim *et al.*, 2007).

Similarly, the finding that NoxA1 phosphorylation was higher in HaCaT-MC1R cells than in parental HaCaT or HaCaT-$R_{151}C$ cells suggests that inhibition of ROS production in HaCaT-MC1R cells is due to down-regulation of Nox1 activity induced by an increase of cAMP and subsequent PKA activation.

We then show that pre-treatment with the EGFR inhibitor PD153035 or with the ERK inhibitor PD98059 restored the ability of HaCaT-MC1R cells to produce ROS after UVA exposure, indicating that the regulation of UVA-ROS production in HaCaT-MC1R cells might depend on cross-talks between MC1R and EGFR/ERK signaling pathways (Stork and Schmitt, 2002). Indeed, many examples of cross-talk between GPCRs and EGFRs have been described and mechanisms regulating these interactions depend on both the GPCR and cell type (Rozengurt, 2007). For instance, GPCRs can transactivate EGFRs through intracellular signaling pathways that might include cAMP and PKA activation (Barbier *et al.*, 1999; Drube *et al.*, 2006; Gerits *et al.*, 2008). EGFR activation may regulate GPCR internalization through phosphorylation of GPCR kinases (GRKs) (Chen *et al.*, 2008) and over-expression of GRK2 enhances ERK activation induced by EGF stimulation (Gao *et al.*, 2005). Thus, although most of the published reports concern EGF activation through GPCR stimulation, one cannot exclude MC1R activation through EGFR signaling.

In conclusion, our data demonstrate that MC1R expression is sufficient to strongly inhibit UVA-ROS production and that α-MSH stimulation enforces this inhibition. The mechanisms involved are certainly multiple but seem to depend mainly on cAMP production and subsequent NoxA1 phosphorylation which results in down-regulation of Nox1 activity. The present findings are based on over-expression studies and the physiological relevance of our results has to be demonstrated.

Moreover, UV light effects on HaCaT cells should be interpreted with caution since this cell line presents several abnormalities including p53 double mutation, p16 promoter hypermethylation and alterations in some of the molecular events necessary for NF-κB activation (Chaturvedi *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 1999). Nevertheless, our results suggest that the MC1R genotype may modulate ROS production in the epidermis after UV exposure and that MC1R signaling in keratinocytes may play an important role in the regulation of UV-induced inflammation and carcinogenesis through its agonist-independent activity. Recent findings indicate that MC1R protects from UV light *in vivo* by a combination of pigmentary and non-pigmentary effects (Robinson *et al.*, 2010). Furthermore, MC1R gene variants, particularly loss-of-function variants, are associated with strongly increased risk of severe photoaging (Elfakir *et al.*, 2009). The skin phototype (related to MC1R allele) may be correlated with UV-induced inflammation through expression of MC1R by keratinocytes and the diminished level of UV-ROS production in subjects with functional MC1R could thus protect against inflammation and malignant transformation.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

The HaCaT cell line was obtained from N.E. Fusenig (Institute of Biochemistry, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany). Cells were cultured in DMEM containing 10% FBS (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), 2 mM L-glutamine, 25 U/ml penicillin and 25 µg/ml streptomycin (Lonza, Verviers, Belgium) and maintained at 37°C in 5% CO_2 in a humidified environment. HaCaT-MC1R (clones 35 and 53) and HaCaT-R_{151}C (clone 30) were previously established in our laboratory (Garcin *et al.*, 2007; Garcin *et al.*, 2009). HaCaT-MC1R and HaCaT-R_{151}C cells were cultured like parental HaCaT cells.

Binding assays

Parental and transfected HaCaT cells were plated in 24-well plates (1×10^5 cells per well). After 24 hours, cells were incubated at 37°C with increased concentrations of α-MSH (Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR CNRS 5247, Montpellier, France) ranging from 10 pM to 10 µM and 100 000 cpm of ^{125}I-NDP-MSH (Perkin Elmer Life Science, Boston, MA) in DMEM, 0.5% BSA and 0.3 mM 1,10-phenanthroline (Sigma, St Louis, MO) for 2 hours. Radioactivity was measured with a γ counter and results were fitted by non linear regression analysis using the GraphPad Prism software (San Diego, CA).

Cyclic AMP assays

Parental and transfected HaCaT cells were plated in 96-well plates (1000 cells per well) and incubated at room temperature with 1 µM α-MSH, 0.5 µM PD153035, 20 µM PD98059 or 10 µM forskolin for 1 hour.

All experiments were performed in the presence of BSA and IBMX. cAMP concentration was measured with the LANCE cAMP kit (PerkinElmer Life Science, Boston, MA) according to the manufacturer's instructions using a Victor plate reader (Wallac, PerkinElmer Life Science, Boston, MA).

UVA irradiation

Parental and transfected HaCaT cells were seeded (1×10^6 cells per 100 mm Petri dishes) in PBS containing 1% FBS and exposed to UVA radiation at doses ranging from 0.6 to 9 J/cm^2. Cells were irradiated with a Waldmann 800k light source composed of UVA Philips 40W lamps (Herbert Waldmann, Werk für Lichtechnik Schwenningen, Bischheim, Germany). The irradiance (4 mW/cm^2) was measured using a UV light meter (Herbert Waldmann, Werk für Lichtechnik Schwenningen, Bischheim, Germany).

Detection of intracellular ROS production

Parental and transfected HaCaT cells were treated with 1 µM α-MSH, 5 µM H-89, 0.5 µM PD153035 or 20 µM PD98059 (Calbiochem, San Diego, CA) for 1 hour and then exposed to UVA radiation at doses ranging from 0.6 to 9 J/cm^2. Immediately after UVA exposure, cells were incubated at 37°C under dark conditions with the carboxy-H_2DCF-DA ROS-sensitive probe (10 µM) (Invitrogen, Groningen, NL) for 1 hour. Cell fluorescence was quantified by flow cytometry analysis using a FacScan cytometer (Becton-Dickinson, France). Data were collected with the DakoCytomation (Fort Collins, CO) software.

Coimmunoprecipitation and immunoblotting

Parental and transfected HaCaT cells were lysed in RIPA buffer (Sigma, St Louis, MO) and then incubated on ice for 15 minutes. Whole-cell lysates were incubated with anti-NoxA1 antibody (1:500) (Abnova, Taipei, Taiwan) at 4℃ overnight. The resulting complexes were captured with 10% G-Sepharose (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany) at 4℃ for 4 hours. Immunoprecip itates were resolved on 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). Blots were blocked with Tris-buffered saline (TBS) (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.6 and 2 mM $MgCl_2$) containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat milk at room temperature for 1 hour. Blots were incubated with anti-NoxA1 (1:1000) and -phosphor-(Ser/Thr) PKA (1:1000) (Cell Signaling Technology, Boston, MA) primary antibodies at 4℃ overnight. Primary antibody binding was detected by incubation with anti-rabbit (Cell Signaling Technology, Boston, MA) and anti-mouse (Sigma, St Louis, MO) secondary antibodies linked to horseradish peroxidase. Blots were visualized with Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). Blots were analyzed with the Bio1D image analysis software (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France) and results were expressed as relative optical densities (ROD).

Data analysis

Data were expressed as mean ± SEM of three independent experiments and differences were analyzed for significance using a paired Student's *t*-test. Error bars represent standard deviations of the mean.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Christophe Duperray for technical support in flow cytometry and acknowledge Elisabetta Andermarcher for critical reading of the manuscript. We are grateful to Dr Celia Jimenez-Cervantes (University of Murcia, Spain) for providing the vector for human wild-type *MC1R*. We also thank Dr Richard Sturm (University of Queensland, Australia) for the generous gift of pcDNA3.1-R_{151}C.

REFERENCES

Barbier AJ, Poppleton HM, Yigzaw Y, Mullenix JB, Wiepz GJ, Bertics PJ*, et al.* (1999) Transmodulation of epidermal growth factor receptor function by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 274:14067-14073.

Bedard K, Krause KH (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313.

Bhola NE, Grandis JR (2008) Crosstalk between G-protein-coupled receptors and epidermal growth factor receptor in cancer. *Front Biosci* 13:1857-1865.

Blenis J (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5889-5892.

Bohm M, Wolff I, Scholzen TE, Robinson SJ, Healy E, Luger TA*, et al.* (2005) alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *J Biol Chem* 280:5795-5802.

Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Bolognia J, Sodi S, Ichihashi M*, et al.* (1999) UV light and MSH receptors. *Ann N Y Acad Sci* 885:100-116.

Chaturvedi V, Qin JZ, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, Nickoloff BJ (1999) Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. *J Biol Chem* 274:23358-23367.

Chen W, Shang WH, Adachi Y, Hirose K, Ferrari DM, Kamata T (2008) A possible biochemical link between NADPH oxidase (Nox) 1 redox-signalling and ERp72. *Biochem J* 416:55-63.

Crawford MA, Aylott CV, Bourdeau RW, Bokoch GM (2006) Bacillus anthracis toxins inhibit human neutrophil NADPH oxidase activity. *J Immunol* 176:7557-7565.

de Gruijl FR (2000) Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Methods Enzymol* 319:359-366.

Drube S, Stirnweiss J, Valkova C, Liebmann C (2006) Ligand-independent and EGF receptor-supported transactivation: lessons from beta2-adrenergic receptor signalling. *Cell Signal* 18:1633-1646.

Elfakir A, Ezzedine K, Latreille J, Ambroisine L, Jdid R, Galan P*, et al.* (2009) Functional MC1R-gene variants are associated with increased risk for severe photoaging of facial skin. *J Invest Dermatol* 130:1107-1115.

Fusenig NE, Boukamp P (1998) Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog* 23:144-158.

Gao J, Li J, Ma L (2005) Regulation of EGF-induced ERK/MAPK activation and EGFR internalization by G protein-coupled receptor kinase 2. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37:525-531.

Garcin G, Douki T, Stoebner PE, Guesnet J, Guezennec A, Martinez J*, et al.* (2007) Cell surface expression of melanocortin-1 receptor on HaCaT keratinocytes and alpha-melanocortin stimulation do not affect the formation and repair of UVB-induced DNA photoproducts. *Photochem Photobiol Sci* 6:585-593.

Garcin G, Le Gallic L, Stoebner PE, Guezennec A, Guesnet J, Lavabre-Bertrand T*, et al.* (2009) Constitutive expression of MC1R in HaCaT keratinocytes inhibits basal and UVB-induced TNF-alpha production. *Photochem Photobiol* 85:1440-1450.

Gerits N, Kostenko S, Shiryaev A, Johannessen M, Moens U (2008) Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cell Signal* 20:1592-1607.

Haycock JW, Rowe SJ, Cartledge S, Wyatt A, Ghanem G, Morandini R*, et al.* (2000) Alpha-melanocyte-stimulating hormone reduces impact of proinflammatory cytokine and peroxide-generated oxidative stress on keratinocyte and melanoma cell lines. *J Biol Chem* 275:15629-15636.

Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W*, et al.* (2001) Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol* 117:294-300.

Kim JS, Diebold BA, Babior BM, Knaus UG, Bokoch GM (2007) Regulation of Nox1 activity via protein kinase A-mediated phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 binding. *J Biol Chem* 282:34787-34800.

Lin P, Welch EJ, Gao XP, Malik AB, Ye RD (2005) Lysophosphatidylcholine modulates neutrophil oxidant production through elevation of cyclic AMP. *J Immunol* 174:2981-2989.

Luger TA, Brzoska T, Scholzen TE, Kalden DH, Sunderkotter C, Armstrong C*, et al.* (2000) The role of alpha-MSH as a modulator of cutaneous inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 917:232-238.

Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.

Oh H, Jung HY, Kim J, Bae YS (2010) Phosphorylation of serine282 in NADPH oxidase activator 1 by Erk desensitizes EGF-induced ROS generation. *Biochem Biophys Res Commun* 394:691-696.

Oktar BK, Yuksel M, Alican I (2004) The role of cyclooxygenase inhibition in the effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on reactive oxygen species production by rat peritoneal neutrophils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 71:1-5.

Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, Nickoloff BJ (1999) Role of NF-kappaB in the apoptotic-resistant phenotype of keratinocytes. *J Biol Chem* 274:37957-37964.

Roberts DW, Newton RA, Beaumont KA, Helen Leonard J, Sturm RA (2006) Quantitative analysis of MC1R gene expression in human skin cell cultures. *Pigment Cell Res* 19:76-89.

Robinson S, Dixon S, August S, Diffey B, Wakamatsu K, Ito S*, et al.* (2010) Protection against UVR involves MC1R-mediated non-pigmentary and pigmentary mechanisms in vivo. *J Invest Dermatol* 130:1904-1913.

Rozengurt E (2007) Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 213:589-602.

Sanchez-Mas J, Hahmann C, Gerritsen I, Garcia-Borron JC, Jimenez-Cervantes C (2004) Agonist-independent, high constitutive activity of the human melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Res* 17:386-395.

Sarkar A, Sreenivasan Y, Manna SK (2003) alpha-Melanocyte-stimulating hormone inhibits lipopolysaccharide-induced biological responses by downregulating CD14 from macrophages. *FEBS Lett* 553:286-294.

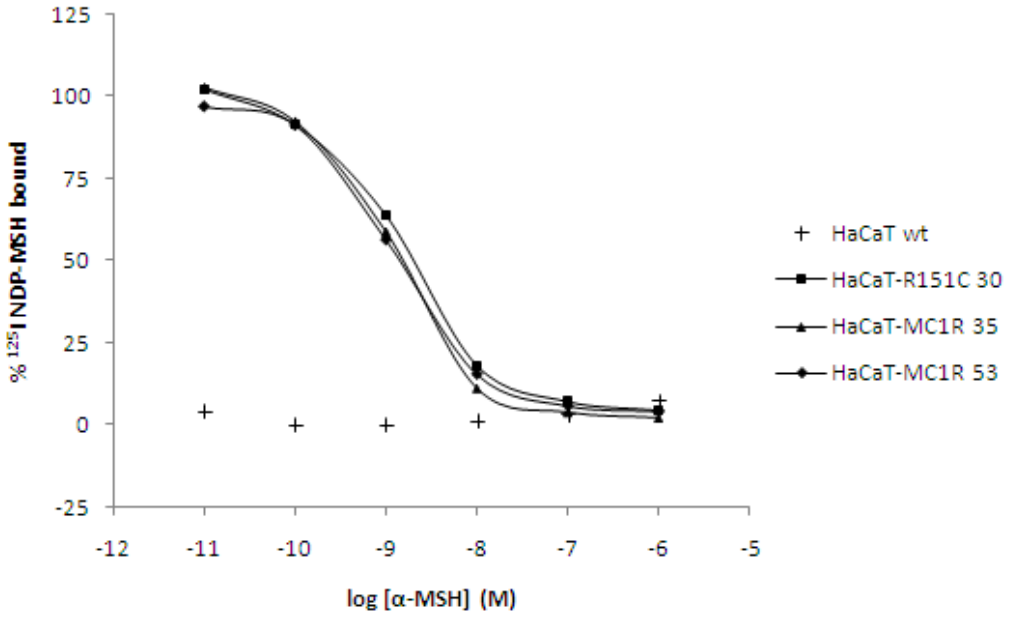
Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S (2000) Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. *Physiol Rev* 80:979-1020.

Stork PJ, Schmitt JM (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 12:258-266.

Valencia A, Kochevar IE (2008) Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 128:214-222.

Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11:328-330.

a


125
100
75
50
25
0
-25
% 125I NDP-MSH bound
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [α-MSH] (M)
HaCaT wt
HaCaT-R151C 30
HaCaT-MC1R 35
HaCaT-MC1R 53

b

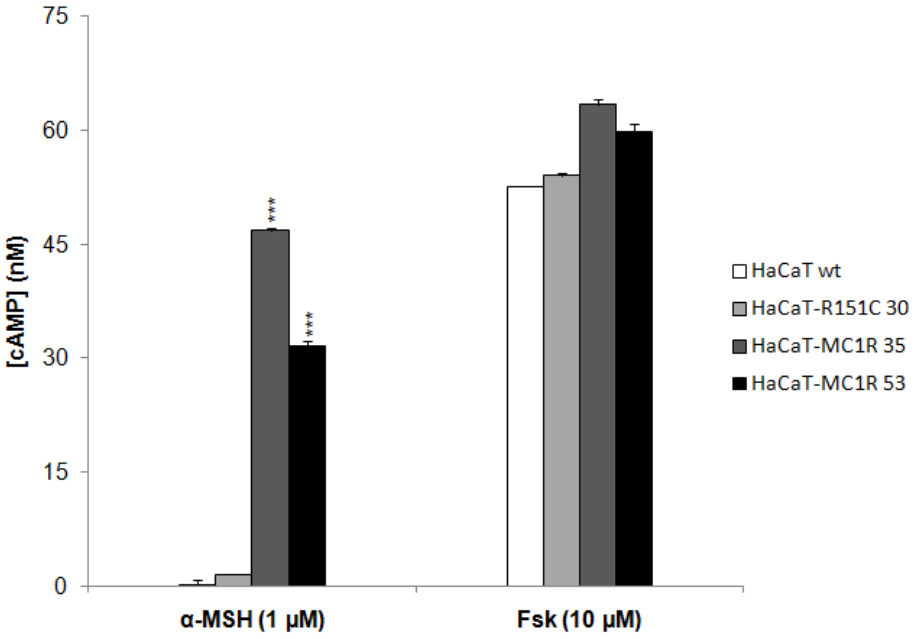

75
60
45
30
15
0
[cAMP] (nM)
***
***
α-MSH (1 µM)
Fsk (10 µM)
HaCaT wt
HaCaT-R151C 30
HaCaT-MC1R 35
HaCaT-MC1R 53

Figure 1

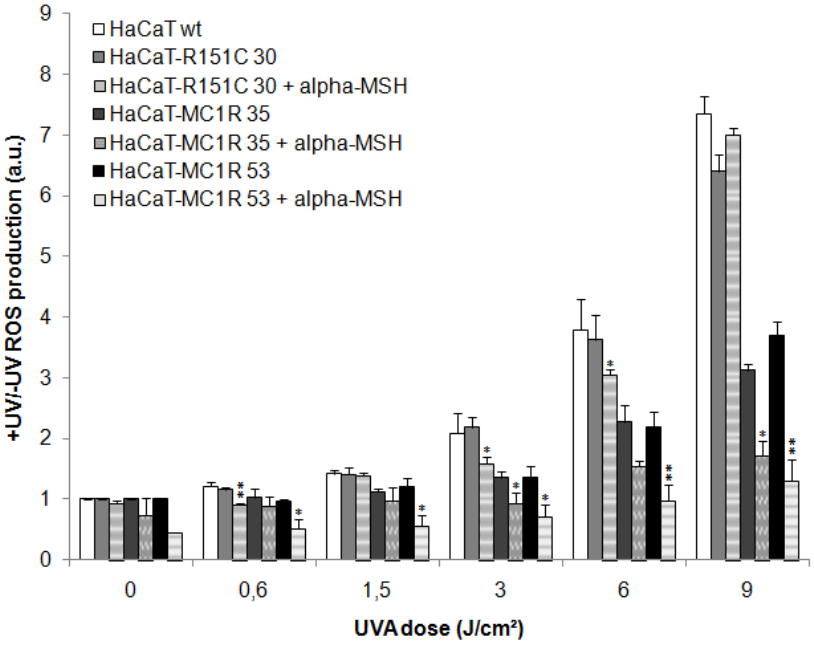

HaCaT wt
HaCaT-R151C 30
HaCaT-R151C 30 + alpha-MSH
HaCaT-MC1R 35
HaCaT-MC1R 35 + alpha-MSH
HaCaT-MC1R 53
HaCaT-MC1R 53 + alpha-MSH
+UV/-UV ROS production (a.u.)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
0,6
1,5
3
6
9
UVA dose (J/cm²)

Figure 2

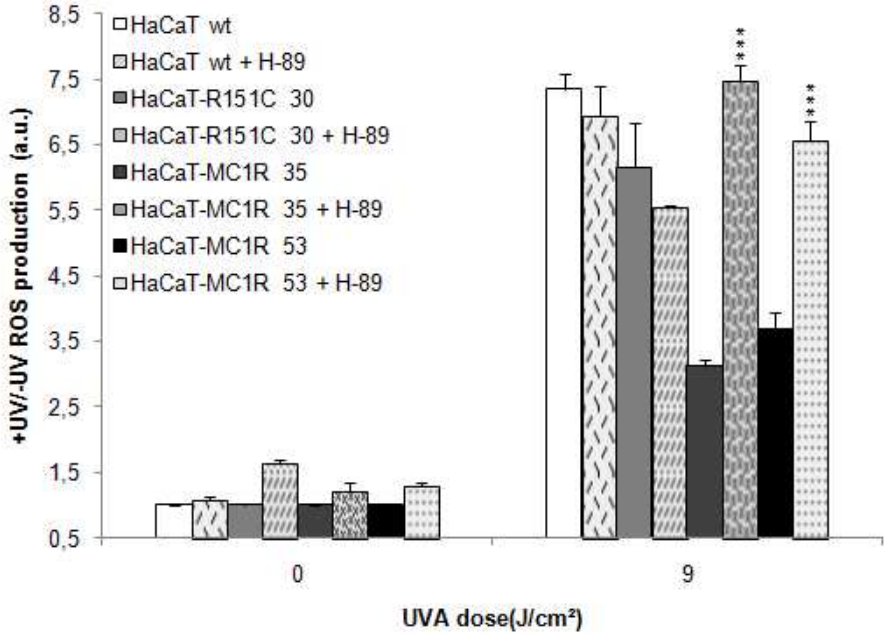
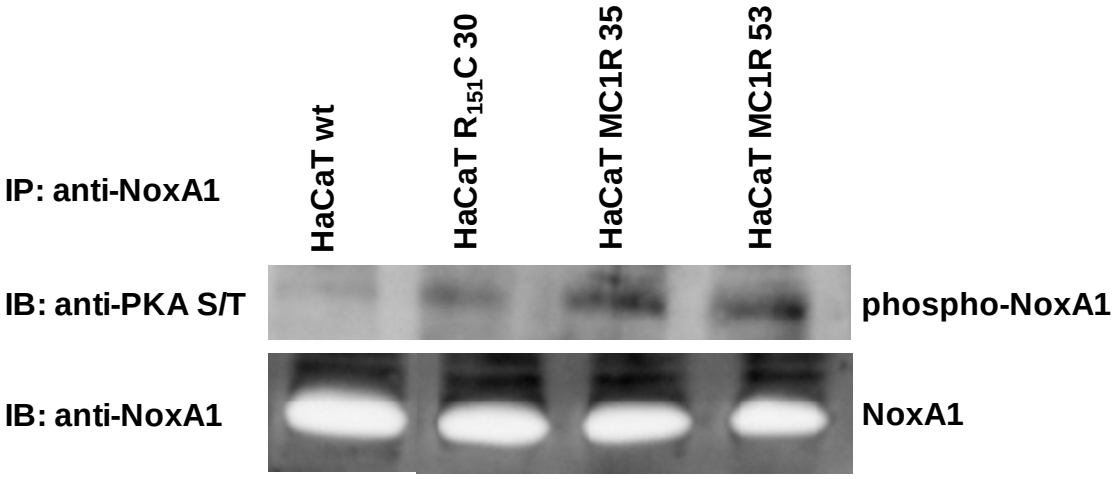

8,5
7,5
6,5
5,5
4,5
3,5
2,5
1,5
0,5
+UV/-UV ROS production (a.u.)
HaCaT wt
HaCaT wt + H-89
HaCaT-R151C 30
HaCaT-R151C 30 + H-89
HaCaT-MC1R 35
HaCaT-MC1R 35 + H-89
HaCaT-MC1R 53
HaCaT-MC1R 53 + H-89
***
***
0
9
UVA dose(J/cm²)

Figure 3

a



b

Cells	Phosphorylation (% of HaCaT wt control)
HaCaT wt	100
HaCaT-R_{151}C 30	178 ± 10
HaCaT-MC1R 35	331 ± 16
HaCaT-MC1R 53	322 ± 19

Figure 4

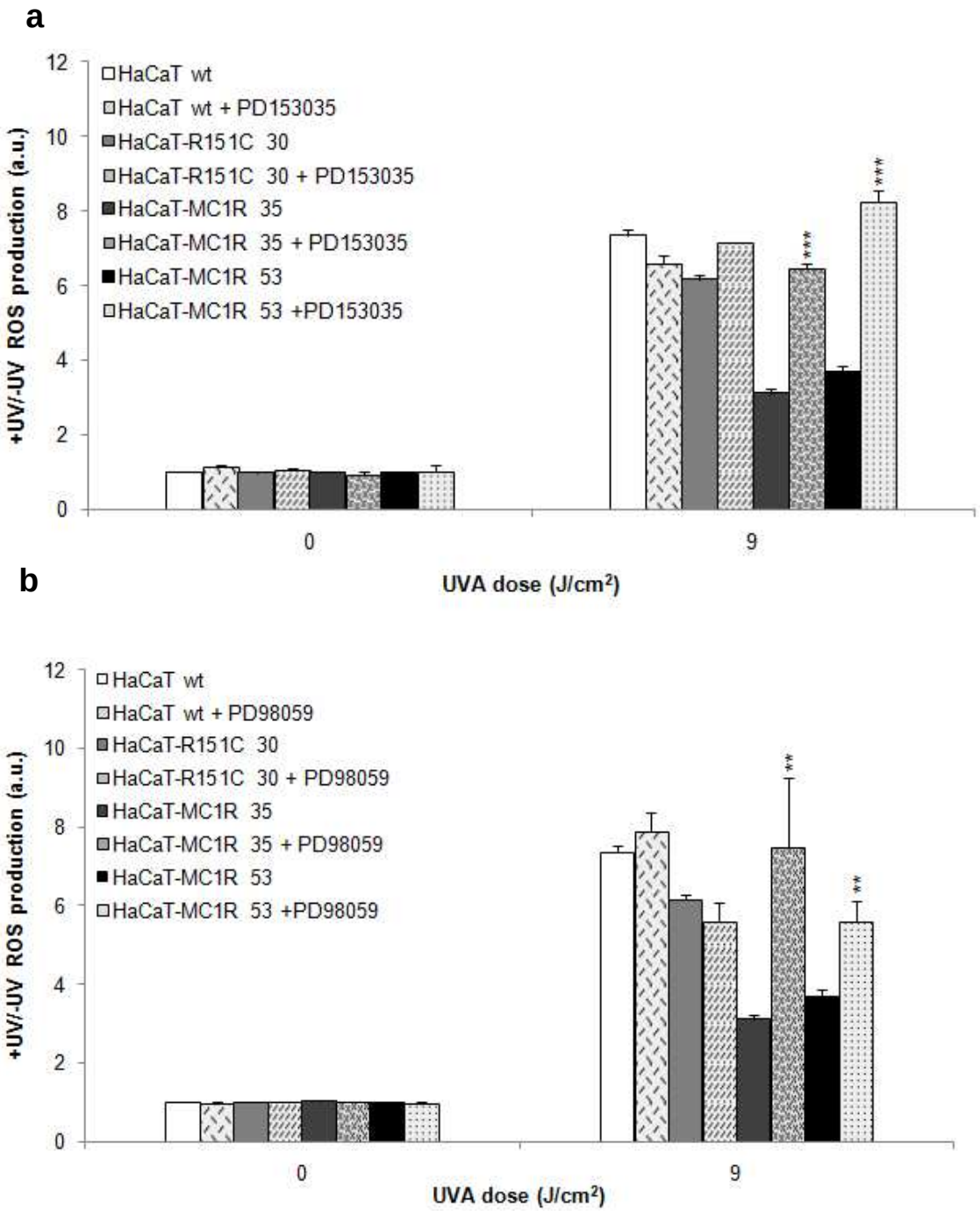

a
HaCaT wt
HaCaT wt + PD153035
HaCaT-R151C 30
HaCaT-R151C 30 + PD153035
HaCaT-MC1R 35
HaCaT-MC1R 35 + PD153035
HaCaT-MC1R 53
HaCaT-MC1R 53 +PD153035
+UV/-UV ROS production (a.u.)
UVA dose (J/cm²)
b
HaCaT wt
HaCaT wt + PD98059
HaCaT-R151C 30
HaCaT-R151C 30 + PD98059
HaCaT-MC1R 35
HaCaT-MC1R 35 + PD98059
HaCaT-MC1R 53
HaCaT-MC1R 53 +PD98059
+UV/-UV ROS production (a.u.)
UVA dose (J/cm²)

Figure 5

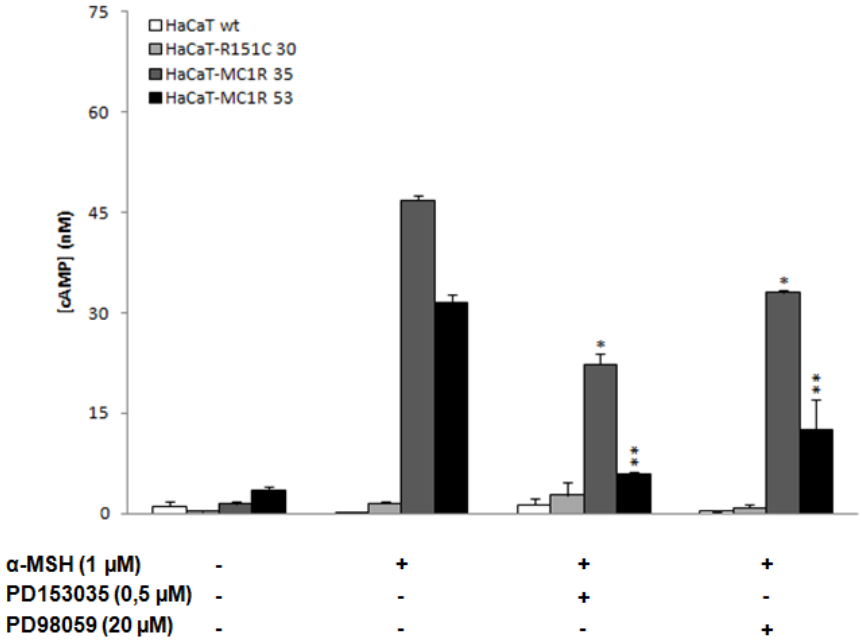

75
60
45
30
15
0
[cAMP] (nM)
HaCaT wt
HaCaT-R151C 30
HaCaT-MC1R 35
HaCaT-MC1R 53
*
*
*
**
α-MSH (1 µM) - + + +
PD153035 (0,5 µM) - - + -
PD98059 (20 µM) - - - +

Figure 6

Figure 1. HaCaT wt and HaCaT-$R_{151}C$ cells do not express functionally activated MC1R. (**a**) Competition binding data. HaCaT wt, HaCaT-MC1R (clones 35 and 53) and HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) were incubated 2 hours at 37°C with 10 0.000 cpm ^{125}I-NDP-MSH and increasing concentrations of α-MSH (10 pM to 1 µM). The radioactivity specifically bound was measured on a γ counter. IC_{50} (30)=1.89 nM; IC_{50} (35)=1.26 nM and IC_{50} (53)=1.43 nM. (**b**) Functional coupling of MC1R and $R_{151}C$. HaCaT cells were challenged for 1 hour with α-MSH (1 µM) or forskolin (Fsk, positive control, 10 µM) before determination of the cAMP concentration by a LANCE cAMP kit as described in the Materials and Methods section. Data are expressed as mean ± SEM for three independent experiments. ***, P<0.001 (Student's t test) compared with HaCaT wt with the same treatment.

Figure 2. MC1R expression and α-MSH stimulation inhibit UVA-induced ROS in HaCaT cells. HaCaT wt, HaCaT-MC1R (clones 35 and 53) and HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) cells were preincubated with α-MSH (1 µM, 1 hour) and were exposed to UVA radiation (0.6 J/cm^2 to 9 J/cm²). Immediately after UV exposure, ROS production was quantified by measuring the fluorescence from the oxidation product of carboxy-H_2DCF-DA as described in the Materials and Methods section. For each cellular type, non-treated and non-irradiated negative controls were used and results are shown as variations of fluorescence intensities (arbitrary units, a.u.) of probe compared to non-irradiated cells. Data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. *, P<0.05 and **, P<0.01 (Student's t test) compared non-treated and treated HaCaT cells irradiated at the same UVA dose.

Figure 3. UVA-induced oxidative stress is inhibited in HaCaT-MC1R cells by a cAMP/PKA dependent mechanism. HaCaT wt, HaCaT-MC1R (clones 35 and 53) and HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) were preincubated with H-89 (5 µM, 1 hour) and were exposed to UVA radiation (9 J/cm²). Immediately after UV exposure, ROS production was quantified by measuring the fluorescence from the oxidation product of carboxy-H_2DCF-DA as described in the Materials and Methods section. For each cellular type, non-treated and non-irradiated negative controls were added and results are shown as variation of fluorescence intensities (arbitrary units, a.u.) of probe compared to non-irradiated and non-treated cells. Data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. ***, P<0.001 (Student's t test) compared with non-treated HaCaT cells at the same irradiation UVA dose.

Figure 4. NoxA1 phosphorylation by PKA is upregulated in HaCaT-MC1R cells.**(a)** Western-Blot analysis of NoxA1 phosphorylation by PKA in HaCaT cells. HaCaT wt, HaCaT-MC1R (clones 35 and 53) and HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) cell lysates were immunoprecipitated with anti-NoxA1 antibody. Cellular extracts were resolved by SDS-PAGE electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane and probed with specific anti-NoxA1 or anti-PKA Ser/Thr antibodies as described in the Materials and Methods section. **(b)** The phosphorylated NoxA1 blot was analyzed with Bio1D image analysis software (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France). Data are expressed as % of relative optical densities (ROD) compared to HaCaT wt cells normalized to 100%.

Figure 5. Effects on EGFR and ERK inhibitors on UVA-induced oxidative stress in HaCaT cells. (**a**) HaCaT wt, HaCaT-MC1R (clones 35 and 53) and HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) cells were preincubated with the PD153035 EGFR inhibitor (0,5 µM, 1 hour) and were exposed to a 9 J/cm² UVA dose. (**b**) HaCaT wt, HaCaT-MC1R (clones 35 and 53) and HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) cells were preincubated with the PD98059 ERK inhibitor (20 µM, 1 hour) and were exposed to a 9 J/cm² UVA dose. Immediately after UV exposure, ROS production was quantified by measuring the fluorescence from the oxidation product of carboxy-H_2DCF-DA (10 µM, 1 hour) by flow cytometry. For each cellular type, non-treated and non-irradiated negative controls were added and results are shown as variation of fluorescence intensities (arbitrary units, a.u.) of probe compared to non-irradiated and non-treated cells. Data are expressed as mean ± SEM from three independent experiments. **, P<0.01 and ***, P<0.001 (Student's t test) compared with non-treated HaCaT cells irradiated at the same UVA dose.

Figure 6. EGFR and ERK inhibition decrease α-MSH-induced cAMP production in HaCaT-MC1R cells. HaCaT wt, HaCaT-MC1R (clones 35 and 53) and HaCaT-$R_{151}C$ (clone 30) were stimulated for 1 hour with α-MSH (1 µM), EGFR inhibitor PD153035 (0,5 µM) or ERK inhibitor PD98059 (20 µM) before determination of the cAMP concentration by a cAMP LANCE kit as described in the Materials and Methods section. Data are expressed as mean ± SEM for three independent experiments. *, P<0.05 and **, P<0.01 (Student's t test) compared with HaCaT cells stimulated by α-MSH alone.

RESUME

Les ultraviolets A (UVA) sont carcinogènes et produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le récepteur à la mélanocortine de type 1 (MC1R) est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) qui est impliqué dans la mélanogénèse et dans l'inflammation cutanée. Certains variants du gène sont associés à un risque accru de mélanomes et de carcinomes cutanés. Le MC1R est exprimé surtout dans les mélanocytes mais son expression peut être induite par les UV *in vitro* dans les kératinocytes et *in vivo* dans la peau. Le récepteur MC1R est activé par l'α-MSH.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier les effets du récepteur MC1R sur le stress oxydatif induit par les UVA dans des lignées kératinocytaires humaines HaCaT exprimant le récepteur MC1R ou son variant non fonctionnel $Arg_{151}Cys$. Nous avons montré que la production d'ERO intracellulaire induite par les UVA est fortement inhibée dans les cellules HaCaT-MC1R et que cette inhibition est renforcée en présence d'α-MSH. L'inhibition du stress oxydatif induit par les UVA dans les cellules transfectées par le MC1R est en partie dépendante de la phosphorylation de la sous-unité activatrice, NoxA1 de la NADPH oxydase. Le traitement des cellules HaCaT-MC1R par un inhibiteur du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) restaure l'habilité de ces cellules à induire un stress oxydatif après irradiation UVA.

Ces résultats montrent que l'activité constitutive du récepteur MC1R dans des kératinocytes pourrait inhiber le stress oxydatif induit par les UVA via des mécanismes dépendants de l'AMPc et de l'EGFR.

MOTS CLES : α-MSH ; EGFR ; ERO ; kératinocytes ; MC1R ; Nox1 ; UVA.

Thèse préparée au sein de l'**I**nstitut des **B**iomolécules **M**ax **M**ousseron, Equipe de Pharmacologie Cellulaire
IBMM, UMR CNRS 5247, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier I, 15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier cedex 5