

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



D 115 018665 0

1^{er} exemplaire

ITE Joseph FOURIER - GRENOBLE I
Sciences Technologie Médecine

UFR de PHARMACIE

Domaine de la Merci - LA TRONCHE

ANNEE : 1996

N° d'ORDRE : 7046

**AUTOFLUORESCENCE DE LA PEAU
ET
APPLICATIONS EN DERMATOLOGIE**

CAS PARTICULIER : LE VIEILLISSEMENT CUTANE

THESE

**Présentée à l'Université Joseph FOURIER - GRENOBLE 1 pour obtenir
le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

Mlle Sophie DELORME

[Données à caractère
personnel]

Cette thèse sera soutenue publiquement le 15 novembre 1996

Devant :

**Madame le Professeur A.M. MARIOTTE Présidente du Jury
Monsieur le Professeur P. AGACHE
Monsieur J. de RIGAL, Docteur en Physique**



« Chaque âge a sa beauté, et cette beauté doit toujours être une liberté »

*Robert BRASILLACH
Les Sept Couleurs (Plon)*

**A Jacques-Antoine,
à ma mère,
à toute ma famille
et à mes ami(e)s.**

. REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement :

Madame le Professeur A.M. MARIOTTE pour avoir accepté la présidence du Jury de ma thèse d'exercice et pour m'avoir orientée dans l'élaboration de ce travail,

Monsieur le Professeur P. AGACHE pour avoir également accepté de participer à la réalisation de ce travail, pour m'avoir fait profiter de ses connaissances et de ses conseils en dermatologie, mais aussi pour la visite ô combien enrichissante de Besançon, tant pour ses anecdotes historiques que pour sa gastronomie !

Monsieur J. de RIGAL pour son accueil chaleureux dans le Laboratoire de Biométrie de L'OREAL, son encadrement et sa participation à l'élaboration de cette thèse,

Monsieur GOETZ et **Monsieur BAUER** de m'avoir permis d'effectuer mon stage de DEA au sein des Laboratoires de Recherche Avancée de L'OREAL,

Monsieur A. GUIOLET pour sa participation active à la partie expérimentale, pour sa grande disponibilité, ses explications claires et sa patience,

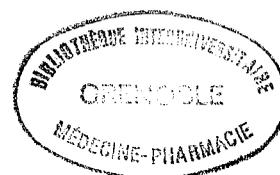
Madame A. BAGUE pour son dynamisme, son efficacité et ses bons gâteaux,

Monsieur BATISSE, **Madame DIAKHATE** pour leur soutien respectif en informatique et en statistiques,

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et ma profonde reconnaissance à toute l'équipe de Biométrie, ainsi qu'à tous ceux qui ont bien voulu m'accorder du temps pour participer aux mesures.

. SOMMAIRE

. REMERCIEMENTS.....	3
. SOMMAIRE	1
. INTRODUCTION	3
. PREMIERE PARTIE	5
. I STRUCTURE DE LA PEAU HUMAINE	6
.I.1 L'épiderme.....	7
.I.2 La jonction dermo-épidermique	9
.I.3 Le derme	9
.I.4 L'hypoderme.....	10
.I.5 Les organes annexes	11
. II PROPRIETES OPTIQUES DE LA PEAU	13
.II.1 Quelques définitions :	13
.II.2 Propriétés optiques des différentes couches cutanées	15
. III AUTOFLUORESCENCE DE LA PEAU.....	20
.III.1 Absorption de la lumière.....	20
.III.2 Désactivation des molécules - Emission.....	21
. IV APPLICATIONS DIAGNOSTICS EN DERMATOLOGIE	23
.IV.1 Utilisations de la lampe de Wood	23
.IV.1.1 La lampe de Wood	23
.IV.1.2 Applications dermatologiques.....	24
.IV.2 Application aux écrans solaires.....	32
. V AXES DE RECHERCHE SUR L'AUTOFLUORESCENCE DE LA PEAU	34
.V.1 Etude de la distribution des chromophores dans la peau	34
.V.2 Cancérologie cutanée	36
.V.3 Etudes réalisées sur diverses pathologies	38
.V.4 Etude de l'érythème et de la pigmentation	41
.V.5 Thérapie photodynamique d'acne vulgaris.....	43



. DEUXIEME PARTIE	46
. I INTRODUCTION	47
. II LE VIEILLISSEMENT CUTANE.....	48
. <i>II.1 Le vieillissement cutané intrinsèque</i>	48
.II.1.1 Modifications cliniques	49
.II.1.2 Modifications fonctionnelles.....	49
.II.1.3 Modifications structurales ⁵⁴	50
.II.1.4 Modifications cellulaires.....	51
. <i>II.2 Le vieillissement cutané actinique ou «dermato-héliose»</i>	52
.II.2.1 Modifications cliniques ⁵⁴	52
.II.2.2 Modifications structurales ^{52, 53, 54}	54
.II.2.3 Modifications cellulaires.....	55
. <i>II.3 Comparaison entre le chrono et le photovieillissement</i>	56
. III DEMARCHE EXPERIMENTALE.....	58
. IV MATERIELS ET METHODES	59
. <i>IV.1 Appareils d'éclairage</i>	59
. <i>IV.2 Détecteur</i>	60
. <i>IV.3 Méthodes de mesure de la fluorescence et de la réflexion diffuse</i>	61
. <i>IV.4 Le chromamètre® Minolta CR200</i>	62
. V ETUDE IN VITRO.....	63
. <i>V.1 Matériel biologique</i>	63
. <i>V.2 Résultats et discussion</i>	63
.V.2.1 Importance des conditions d'excitation.....	63
.V.2.2 Etude de la réflexion diffuse	64
.V.2.3 Etude de la fluorescence	66
. VI ETUDE IN VIVO	68
. <i>VI.1 Méthode</i>	68
. <i>VI.2 Résultats</i>	69
.VI.2.1 Illustrations spectrales : mesure de réflexion diffuse.....	69
.VI.2.2 Analyse des paramètres biophysiques.....	71
.VI.2.3 Etude de la couleur de la peau.....	83
.VI.2.4 Analyse en composante principale.....	84
.VI.2.5 Analyse PLS	85
. <i>VI.3 Discussion</i>	85
. VII CONCLUSION.....	89
. CONCLUSION.....	90
. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	93

. INTRODUCTION

L'autofluorescence de la peau a été observée pour la première fois en 1908. Depuis, le développement de la spectrofluorimétrie appliquée à l'autofluorescence de la peau humaine a permis le diagnostic de pathologies cutanées^{1,2,3} et l'étude de phénomènes photobiologiques tels que le photovieillissement^{4,5}. Plus généralement, l'illumination des tissus suivie de l'analyse du spectre de la lumière émise ou diffusée en réponse à cette excitation optique, permet d'en déterminer l'état : normal, bénin, précancéreux, cancéreux ou encore érythémateux, pigmenté⁶. L'évaluation de l'efficacité d'un traitement ou encore des conséquences des facteurs environnementaux fait aussi partie des domaines d'exploitation de l'autofluorescence.

Dès les années trente, les dermatologues s'intéressent à ce phénomène en utilisant des lampes mercure pour l'examen rapide de la peau. Equipées de filtres, ces lampes permettent le diagnostic de certaines mycoses cutanées mais aussi l'évaluation du niveau de précipitation de la mélanine (dermique ou épidermique). Actuellement, des mesures quantitatives de l'érythème et de la pigmentation ou de certaines infections bactériennes sont aussi possibles.

Dans la première partie de ce mémoire, nous faisons quelques rappels sur la structure de la peau, ses propriétés optiques et sur le phénomène d'autofluorescence. Nous présentons ensuite les applications actuelles de l'autofluorescence et les axes de recherche en cours de développement.

Dans la deuxième partie, nous avons étudié le vieillissement cutané, sujet qui a fait l'objet de travaux expérimentaux réalisés dans les Laboratoires de Recherche Fondamentale de L'OREAL. Nous avons essayé de caractériser ce processus biologique complexe à l'aide de paramètres biophysiques fondés sur la fluorescence intrinsèque de la peau. Nous avons travaillé à la fois *in vitro* et *in vivo* afin de nous rapprocher le plus possible de la réalité.

. PREMIERE PARTIE

I STRUCTURE DE LA PEAU HUMAINE

La peau comporte de l'extérieur vers l'intérieur trois zones distinctes^{7,8,10} : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

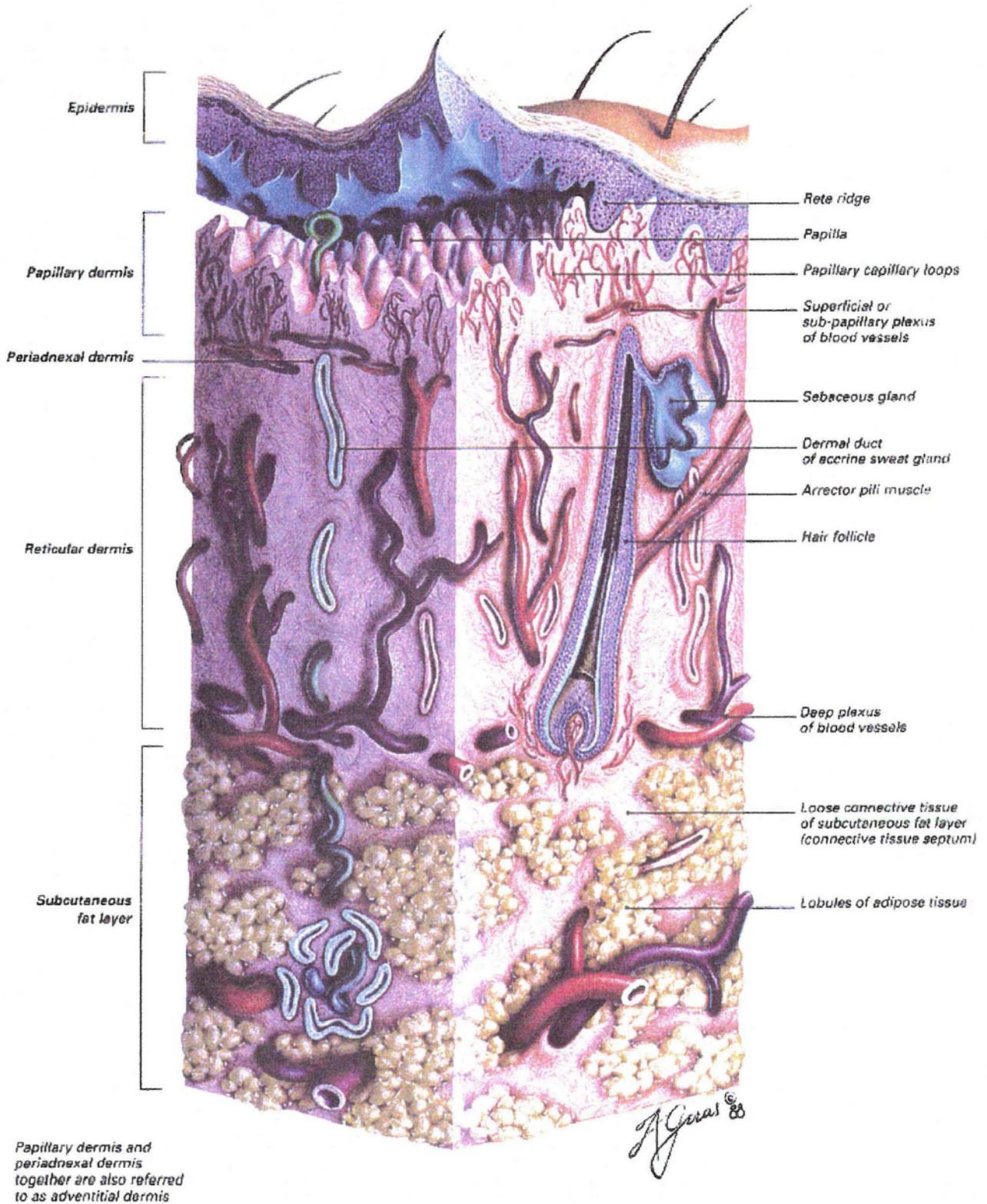


Figure 1 : Coupe schématique de la peau
from Dermatology - A medical artist's interpretation - Sandoz illustrated⁹

.1.1 L'épiderme

L'épiderme est un épithélium malpighien pluristratifié jouant un rôle de protection. Il est constitué à 95% de kératinocytes qui sont en constant renouvellement. Tous les kératinocytes contiennent des filaments intermédiaires de kératine dans leur cytoplasme et forment des jonctions desmosomales avec les cellules adjacentes.

L'épaisseur de l'épiderme varie de 50 à 150 µm en moyenne selon les zones ; elle est particulièrement importante sur des zones de friction telles que la paume ou la plante, où le *stratum corneum* peut lui-même atteindre 1 mm ou plus. Par contre ce dernier ne représente qu'une vingtaine de microns d'épaisseur sur le bras ou le visage. Le renouvellement de l'épiderme se fait en 20 à 30 jours.

On distingue cinq couches cellulaires (de bas en haut vers la surface) nommées soit par leur position, soit par les propriétés structurales de leurs cellules :

La couche basale (ou *stratum germinatum*)

La couche basale est formée d'une seule assise de cellules, cuboïdales. Elles sont unies entre elles par des desmosomes sur lesquels s'insèrent les tonofilaments. Par leur face inférieure, pourvue seulement d'hémidesmosomes, elles reposent sur une membrane basale. Cette couche basale est la couche génératrice, siège d'une forte activité mitotique. Toutes les cellules basales ne possèdent pas la capacité de se diviser. Lorsqu'une cellule quitte la couche basale, son temps normal de transition vers le *stratum corneum* est d'au moins quatorze jours. Le passage du *stratum corneum* à la desquamation nécessite de nouveau quatorze jours.

Entre ces éléments fondamentaux s'intercalent les mélanocytes et certaines cellules à destinée sensorielle, l'appareil de Merkel.

La couche épineuse (ou *stratum spinosum*)

Cette couche est la couche la plus épaisse de l'épiderme ; elle est constituée de 3 à 10 assises de cellules polygonales, les kératinocytes. Elles s'aplatissent peu à peu vers la surface. Elles sont traversées par les tonofibrilles qui s'attachent sur les desmosomes, unis à leur vis-à-vis situés sur les cellules adjacentes.

Dans les kératinocytes sont dispersés de nombreux grains de mélanine synthétisés par les mélanocytes et des cellules dont le rôle est lié à l'immunogénicité de l'épiderme, les

cellules de Langerhans et des lymphocytes T. La mélanine est disposée en ombrelle au dessus du noyau.

La couche granuleuse (ou *stratum granulosum*)

La couche granuleuse comporte une à quatre assises de cellules très aplaties, dont le plus grand diamètre est parallèle à la surface de la peau. Ces cellules sont basophiles et contiennent des grains de kératohyaline, les kératinosomes, chargés de protéines spécifiques, la profillaggrine, la loricrine et de filaments intermédiaires de kératine¹⁰. La conversion de la profillaggrine en unités monomériques de fillaggrine intervient progressivement au cours de la transition d'une cellule granuleuse en cellule cornifiée par protéolyse et déphosphorylation. La fillaggrine sert de matrice protéique dans la couche cornée ; elle entoure et favorise l'agrégation des filaments de kératine.

L'absence ou l'anormalité structurelle des granules de kératohyaline est un signe histologique de troubles de la kératinisation. Ces changements morphologiques sont corrélés aux anomalies d'expression de la fillaggrine. Chez les patients atteints d'ichthyose vulgaire par exemple, il y a une réduction importante ou une absence des granules de kératohyaline et de fillaggrine.

Les cellules granuleuses ne synthétisent et ne modifient pas uniquement des nouvelles protéines impliquées dans la kératinisation, elles jouent aussi un rôle dans leur propre destruction programmée : perte progressive du noyau et des constituants cellulaires mais conservation des filaments de kératine et de la matrice de fillaggrine.

La couche cornée (ou *stratum corneum*)

La couche cornée est composée de bas en haut de la couche claire, de la couche compacte puis de la couche disjointe.

La couche claire (ou *stratum lucidum*) est formée d'une seule assise de cellules aplaties, dépourvues de noyaux et d'inclusions, et se colore mal au Giemsa. Traversées par des trousseaux de fibres de kératine, elle caractérise la transition de la cellule granuleuse vers la cellule cornifiée et ne s'observe que dans les épidermes épais (palme plantaire...).

La couche cornée joue un rôle de protection mécanique contre les agressions extérieures et de barrière contre la perte hydrique. Elle est constituée de cellules dépourvues de noyaux, les cornéocytes, d'une épaisseur de l'ordre de 0.1 à 0.4 μm .

Elle est compacte, complètement kératinisée dans ses premières assises (*stratum compactum*) et disjointe dans ses assises superficielles qui comportent peu de desmosomes (*stratum disjonctum*). Elle est recouverte d'un film hydrolipidique, le sébum.

.1.2 La jonction dermo-épidermique

L'épiderme est lié par des hémidesmosomes à la membrane basale sur laquelle viennent s'ancrer, à sa face profonde, des fibres de collagènes du derme superficiel.

.1.3 Le derme

Le derme est le tissu de soutien et de nutrition pour l'épiderme. Il a une épaisseur variant de 1 à 4 mm. C'est un tissu conjonctif traversé par un réseau vasculo-nerveux important et composé de plusieurs éléments :

- la **substance fondamentale** est un gel colloïdal amorphe. Elle est composée de protéoglycanes et glycoprotéines de structure, et remplit les espaces entre les fibres de collagène et d'élastine.
- les **fibres conjonctives** : fibres collagènes (90 %) et fibres de réticuline qui leur sont apparentées par leur ultrastructure, fibres élastiques (4 %). Outre leur rôle structural, ces fibres participent à la morphogenèse, la cicatrisation des tissus, l'adhérence des cellules et leur migration.
- **divers éléments cellulaires** : ce sont essentiellement des fibroblastes et fibrocytes, histiocytes, mastocytes, et éventuellement les cellules des lignées sanguines.

La structure du derme n'est pas homogène et l'on distingue trois plans : le derme fonctionnel, le derme adventiciel et le derme réticulaire. Une bande très fine sous-épidermique qui est plus ou moins confondue avec la membrane basale s'observe parfois. Elle contient des fibres de collagène de type I, fines et organisées en un réseau dense.

Le derme fonctionnel

Il comprend la membrane basale sur laquelle repose l'épiderme et les filaments d'ancrage qui l'amarrent sur les microfibrilles. La membrane basale est une charpente



de collagène de type IV associée à différentes protéines : laminine, fibronectine, antigènes spécifiques. Les filaments d'ancrage sont du collagène type VII.

Le derme adventiciel

Il comprend le derme papillaire situé dans les sinuosités ou papilles de la ligne de jonction dermo-épidermique, et le derme péri-annexiel entourant chaque glande sébacée ou sudoripare et chaque follicule pileux. Le derme papillaire représente environ le dixième de l'épaisseur totale du derme.

Les cellules y sont nombreuses et la substance fondamentale dense. Les fibres fines de collagène de type III et les fibres de réticuline abondantes tendent à se disposer verticalement. Les fibres élastiques en forme d'arcades verticales s'attachent à la membrane basale épidermique.

Le derme réticulaire (ou chorion)

Dans le derme moyen et profond, les cellules sont moins abondantes, les fibres collagènes de type I épaissies, tendent à se disposer horizontalement, entremêlées à des fibres élastiques. La transition entre le derme papillaire et le derme réticulaire est brutale et se distingue par l'augmentation du diamètre des fibres de collagène.

.1.4 L'hypoderme

L'hypoderme, encore appelé tissu graisseux sous-cutané ou pannicule adipeux, ou fascia de Camper est un tissu cellulaire interposé entre le derme et les plans profonds musculo-aponévrotiques ou périostés. Il est rattaché au derme par les expansions de fibres collagènes et élastiques. C'est un tissu adipeux, divisé en lobes par des travées conjonctivo-élastiques, où passent les nerfs et les vaisseaux. Il assure une protection mécanique, constitue une réserve d'énergie et de nutriments, et joue un rôle dans le processus de thermorégulation.

Cette couche graisseuse sous-dermique, parfois pratiquement absente dans certaines régions du corps, malléoles, front, face antéro-interne du tibia, est plus ou moins hypertrophiée suivant les localisations et les individus. Son épaisseur normale est d'environ 1 cm, mais peut atteindre plusieurs centimètres en cas d'hypertrophie importante. Sa particularité est de posséder une importante arcade bordante continue sous-cutanée vasculo-nerveuse et surtout lymphatique.

.I.5 Les organes annexes

Le tégument renferme diverses formations dites annexes :

Le follicule pilo-sébacé

Il se présente comme une invagination de l'épiderme et comporte le poil, la glande sébacée et le muscle arrecteur. La base du poil se trouve dans le derme réticulaire et il traverse la peau dans une gaine épithéliale. La glande sébacée est située dans le derme et s'ouvre dans le canal pileux. Elle est de taille variable, en alvéole simple ou multiple, à grappes. Le canal pileux centré par le poil traverse le derme papillaire puis l'épiderme et débouche à sa surface par l'orifice pilo-sébacé. La membrane basale, en continuité avec la base épidermique entoure l'ensemble de l'appareil pilo-sébacé.

Les glandes sudoripares

De très petites tailles, les glandes sudoripares sont responsables de la sécrétion de la sueur. On distingue les glandes eccrines, profondes, hypodermiques et les glandes apocrines qui s'abouchent dans le follicule pilo-sébacé ou dans son entourage.

- les **glandes eccrines** sont très nombreuses ; chez l'adulte, on dénombre environ 100 à 200 glandes sudoripares eccrines par centimètre carré après vingt ans, avec une diminution chez le sujet âgé non seulement du nombre de glandes, mais encore de leur activité entraînant une sécheresse de la peau par diminution de l'excrétion sudorale, responsable des phénomènes de prurit volontiers accusés à cet âge. Au nombre de 2 à 3 millions, elles sont capables de rejeter 2 à 3 litres d'eau par heure.

La sueur est un liquide incolore, contenant 99 % d'eau, 0.5 % de sels minéraux, 0.5 % de substances organiques et d'autres éléments tels que l'acide lactique, les lactates, et l'acide urécanique. De pH acide, la sueur contient aussi des acides aminés, du calcium, du phosphore, des protéines, du fer et divers composés en quantités extrêmement minimes. Des substances exogènes peuvent être également éliminées par la sueur : médicaments, colorants, toxiques, alcool, certains produits du métabolisme interne. A cette sueur eccrine inodore, lors de son excrétion, s'ajoutent des produits malodorants résultant de la lyse bactérienne et de l'oxydation des lipides de surface. Sa sécrétion s'effectue sous contrôle nerveux (phénomènes psychiques) et hormonal. Elle est aussi régulée par des facteurs locaux tels que la température locale, l'état hygrométrique de l'air, la concentration excessive de sel, l'existence d'un stimulus intense et prolongé.

Le rôle des glandes eccrines, dans le contrôle de la température interne, est capital. L'évaporation de la sueur fait baisser la température centrale de l'organisme et si sa perspiration est insensible et permanente, la transpiration peut se voir par moments. La glande sudoripare, par reflux continuels d'eau dans le canal excréteur, fonctionnerait comme un «conduit de chaleur». La partie sudorale fournit l'eau, et le canal sudoral a deux fonctions bien différentes : dans sa partie inférieure intradermique se situe le «conduit de chaleur» et la condensation se fait dans l'alambic intra-épidermique : la vapeur d'eau monte dans le système sudoral, est reprise par l'épithélium du tube mucipare qui ramène l'eau condensé vers le bas. La profondeur de la peau est ainsi refroidie par le système. Si la quantité de calories à éliminer augmente par le phénomène de fièvre, une partie de la vapeur d'eau s'échappe, entraînant avec elle des calories. La perte liquidienne est alors compensée automatiquement par l'hyperactivité réactionnelle de la glande.

- les **glandes apocrines** sont issues du germe épithélial primaire et localisées au niveau des aisselles, de la région ano-génito-périnéale et des mamelons. Ces glandes ont une fonction très différente de celle des glandes eccrines. Elles ont une sécrétion laiteuse, solide en séchant, fluorescente en lampe de Wood, moins acide que la sueur eccrine. Chez les mammifères supérieurs, cette sécrétion est une composante de la fonction sexuelle. Elle répond plus à des stimulus psychiques qu'à des variations thermiques. Le délai de réponse est de vingt secondes après le stimulus, avec une période réfractaire de plusieurs heures.

Comme nous venons de le voir, la peau est un milieu structuré mais complexe. La diversité du revêtement cutané reflète les variations d'épaisseur de l'épiderme, la structure du derme et la vascularisation, la distribution de la pigmentation, la richesse et la qualité des annexes, la densité des poils et l'équilibre écologique de surface. Cette diversité procure un certain dynamisme aux propriétés optiques de la peau. De ce fait, l'étude de l'interaction de la lumière avec la peau est un moyen intéressant pour examiner certaines pathologies cutanées.

.II PROPRIETES OPTIQUES DE LA PEAU

Ses propriétés optiques sont gouvernées par les lois de Descartes¹¹ et résultent de quatre phénomènes : la réflexion, la réfraction, l'absorption et la dispersion ou diffusion.

.II.1 Quelques définitions :

- La **réflexion** a lieu lorsqu'une surface renvoie de la lumière dans une direction privilégiée. Si la surface réfléchissante est plane, c'est un miroir plan et la réflexion est dite spéculaire :

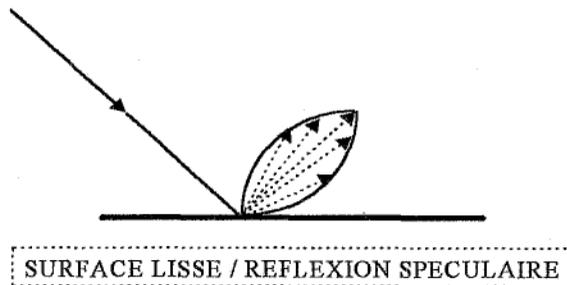


Figure 2

Une surface rugueuse comme la peau disperse la réflexion :

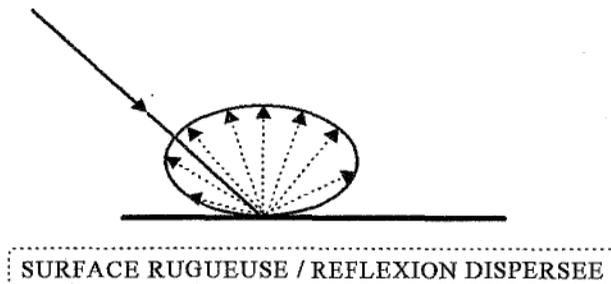


Figure 3

1ère loi : le rayon réfléchi d'indice r est dans le plan d'incidence défini par le rayon incident i et la normale N au point d'incident.

2ème loi : l'angle de réflexion est égale à l'angle d'incidence :

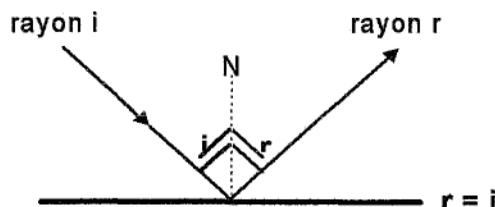


Figure 4

- La **réfraction** correspond au changement brusque de direction de propagation de la lumière à l'interface de deux milieux d'indices différents.

1ère loi : le rayon réfracté d'indice r' est dans le plan d'incidence.

2ème loi : pour deux milieux transparents donnés, le rapport du sinus de l'angle d'incidence au sinus de l'angle de réfraction est constant : $n = \sin i / \sin r'$. La constante n est appelée indice relatif du second milieu par rapport au premier. On désigne simplement l'indice relatif d'un milieu par rapport à l'air.

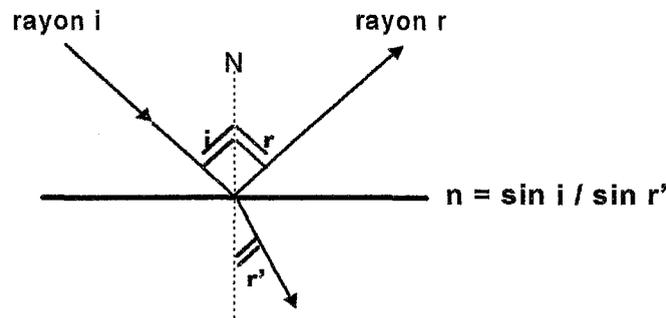


Figure 5

- La **dispersion** : la séparation des radiations contenues dans une lumière complexe est le phénomène de dispersion chromatique. Ce phénomène dépend de la nature de la lumière et de la taille des objets diffusant¹⁴. Il en résulte deux types de dispersion :
 - la **dispersion de Rayleigh** obtenue lorsque la lumière rencontre des particules dont le rayon r est tel que : $r < 0.1\lambda / 2\pi$. Elle est de faible intensité, isotrope et inversement proportionnelle à la longueur d'onde.
 - la **dispersion de Mie** est obtenue avec des particules dont le rayon est supérieur ou égal à la longueur d'onde. Elle dépend peu de la longueur d'onde et est anisotrope. L'énergie lumineuse est rétrodiffusée vers l'arrière avec une intensité plus importante que vers l'avant. Lorsque les particules dispersantes deviennent très grandes par rapport à la longueur d'onde, la théorie de MIE se réduit aux propriétés optiques telles que la réflexion et la réfraction.

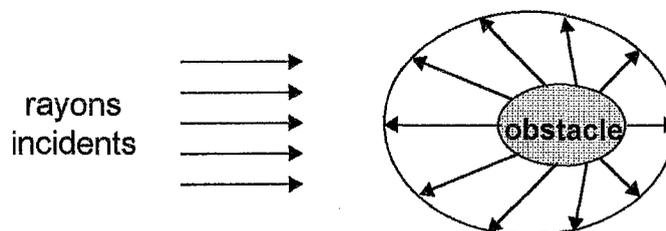


Figure 6 : Dispersion de MIE

- **L'absorption** : c'est la disparition d'un photon avec transfert d'énergie à un atome ou une molécule qui se trouve alors dans un état excité.

.II.2 Propriétés optiques des différentes couches cutanées

Lorsqu'un rayon lumineux atteint la surface de la peau, 4 à 7% du rayonnement est réfléchi directement (réflexion régulière ou spéculaire) dû au changement d'indice de réfraction entre la peau ($n_D \approx 1.55$) et l'air ($n_D = 1.0$). Le reste, 93 à 96 %, est transmis aux différentes couches cutanées où les trajets vont être modifiés en fonction de l'hétérogénéité du tissu traversé^{12,13}.

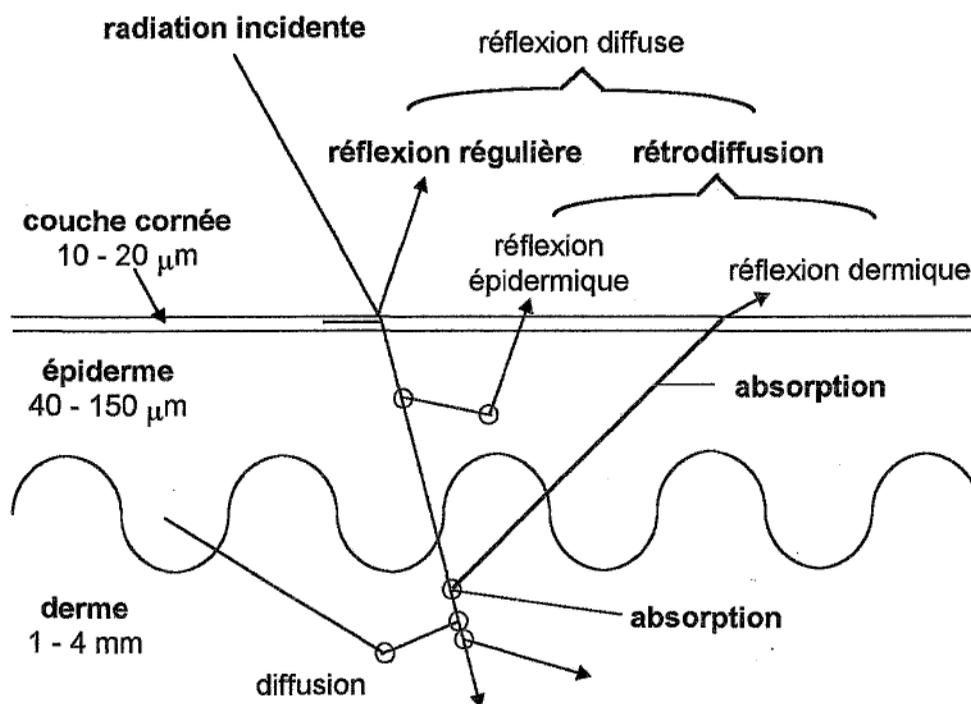


Figure 7 : Interaction de la peau avec des radiations. Le rayon incident est réfléchi par la surface, diffusé et absorbé lors de sa traversée dans la peau.

Les propriétés optiques de la peau reflètent sa structure et sa composition. Le *stratum corneum* (S.C.) et l'épiderme, compacts et fins, absorbent en majorité la lumière. Des pigments spécifiques y sont enrésés et procurent, par absorption, une photoprotection vis à vis des ultra-violets (UV). La pigmentation et surtout l'épaisseur du S.C. jouent un rôle très important dans la transmission des rayons UV à travers ces couches¹⁷. Le derme au contraire est épais et pratiquement acellulaire, c'est là que les phénomènes de diffusion sont les plus importants¹⁴.

Le trajet optique du rayonnement dépend de la longueur d'onde :

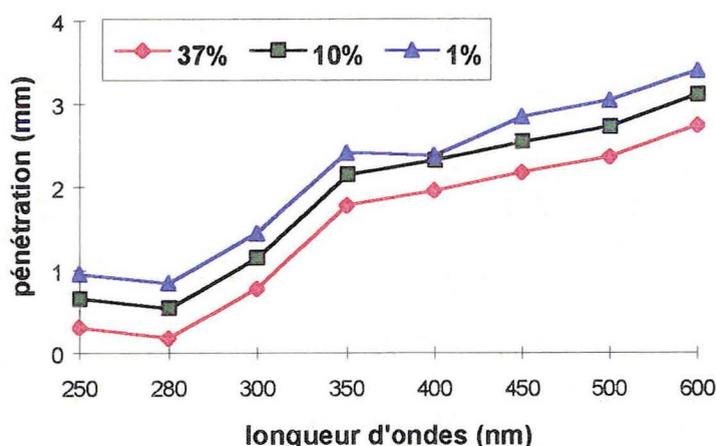


Figure 8 : Pénétration du rayonnement solaire dans la peau pour 3 % d'énergie restante¹⁵

Au niveau du *Stratum Corneum* (S.C.)

Le S.C. est le siège de plusieurs phénomènes²⁴ :

- des *réflexions internes* importantes dues à la nature stratifiée du S.C.
- des *diffusions multiples* liées aux caractéristiques géométriques des constituants du S.C. (tonofilaments, desmosomes, mélanosomes) dont les diamètres sont de l'ordre des longueurs d'onde dans l'UV et le visible.
- des absorptions à différentes longueurs d'onde^{16,17} :
 - il existe une forte absorption dans l'UVC et l'UVB centrée vers 275 nm due *aux acides aminés aromatiques* tels que le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Les *acides gras insaturés* des lipides du S.C. participent faiblement à cette absorption.
 - *l'acide urocanique*, sécrété dans la sueur et dérivé de l'histidine par désamination est sélectivement retenu par l'épiderme. Cette sécrétion est sous le contrôle de l'histidinase, enzyme stimulée par les UV. Cet acide présente une bande d'absorption maximale vers 265 -280 nm¹².
 - l'absorption dans le visible et l'infra-rouge (IR) est modérée.

Le S.C. réémet une partie de la lumière et participe ainsi au phénomène de réflexion diffuse de la peau, mais la majeure partie du rayonnement est transmise à l'épiderme et au derme.

Au niveau de l'épiderme^{14,16,17}

L'ultrastructure finement granulée de l'épiderme provoque une importante diffusion dans l'UV et le visible. Cette diffusion engendre la réflexion épidermique, partie de la rétrodiffusion. Mais le phénomène optique qui prédomine est l'absorption par les nombreuses particules absorbantes présentes à différents niveaux de l'épiderme :

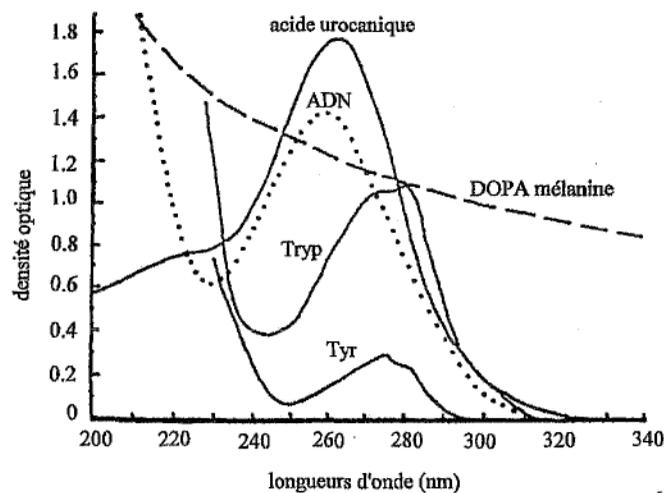


Figure 9: Spectre d'absorption des chromophores majeurs de l'épiderme¹⁴

- les *acides nucléiques* et les *acides aminés aromatiques* : Sandritter¹⁸ a noté un maximum d'absorption vers 260 nm au niveau des kératinocytes basaux alors que dans l'épiderme superficiel et le S.C., le maximum apparaît à 275 nm. La perte de l'ADN (absorption maximale à 260 nm) et l'augmentation en protéines (absorption maximale à 275 nm) expliqueraient cette différence durant la maturation et la migration des kératinocytes vers le haut.
- la *mélanine* est le chromophore le plus important de l'épiderme et le seul pigment dont le spectre d'absorption s'étend jusqu'aux UVA, au visible et au proche infrarouge. La mélanogénèse est régulée par les facteurs génétiques, hormonaux et les UV. Notons que les phénomènes associés au bronzage de la peau diminuent de moitié la transmission du rayonnement visible vers le derme.

Au niveau du derme^{14,16,17,24}

Les radiations arrivant au derme sont principalement celles appartenant au domaine du visible et du proche infrarouge(IR) (400-1000 nm) (Cf. Figure 8).

Dans le derme, la dispersion joue un rôle majeur ; elle est due principalement aux fibres de collagène et varie inversement avec la longueur d'onde. Une grande partie des rayons dispersés retourne vers la surface de la peau (rétrodiffusion). Cette réflexion dermique est importante dans l'UV et plus faible dans le visible, en partie à cause de la présence de molécules absorbantes :

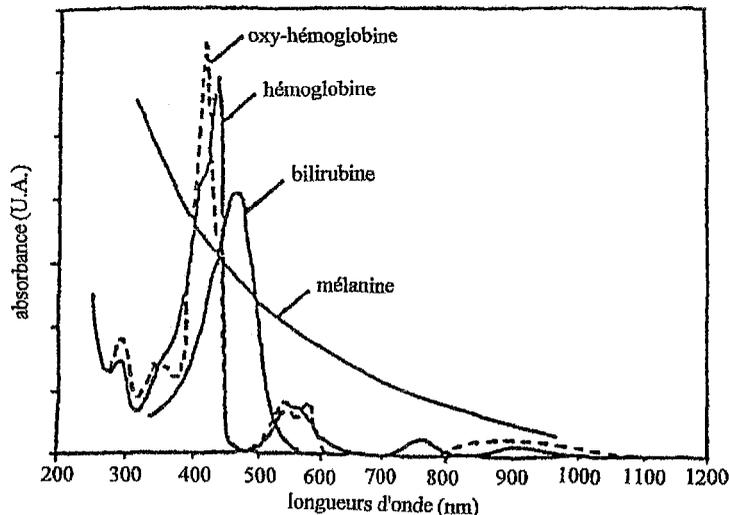


Figure 10 : Spectre d'absorption des pigments du derme¹⁷

- l'hémoglobine, l'oxyhémoglobine et la bilirubine présentes dans les vaisseaux sanguins du derme superficiel, absorbent entre 400 et 500 nm.
- le rayonnement proche du rouge et de l'IR étant peu absorbé, pénètre profondément et atteint le tissu sous-cutané, principalement dans une fenêtre de 700 - 1100 nm.

Remarques

Les propriétés optiques de la peau dépendent aussi d'autres facteurs¹⁹ :

- *du relief cutané* : les nombreuses ridules superficielles à la surface de la peau modifient l'angle d'incidence de la lumière, un angle plus faible augmente le pourcentage de lumière réfléchi. A ce phénomène de réflexion s'ajoutent des diffusions multiples dues aux irrégularités microscopiques provenant de la nature desquamante du S.C..

- *de l'état d'hydratation de la surface cutanée* : celle-ci est hygroscopique et il est démontré que sa transparence augmente en fonction de l'hydratation.

- *de l'état d'imprégnation de la surface cutanée par les lipides* : les glandes sébacées sécrètent le sébum qui se dépose en un film lipidique à la surface de la peau ; l'indice

de réfraction du S.C. devient de l'ordre de 1,45 ce qui diminue le pourcentage de lumière réfléchi.

- de *l'importance de la transpiration* : la sueur augmente la pénétration des UV au niveau de la peau.

.III AUTOFLUORESCENCE DE LA PEAU

L'autofluorescence de la peau est définie par une émission lumineuse consécutive à l'absorption de photons ; elle est induite par l'interaction d'une radiation électromagnétique avec les fluorophores naturels de la peau²⁰. Comme tout phénomène de photoluminescence, la fluorescence nécessite deux étapes : l'absorption et l'émission.

.III.1 Absorption de la lumière

L'autofluorescence est donc basée sur la propriété de certaines molécules à absorber des radiations lumineuses à des longueurs d'onde précises ($E = h\nu$). Les substances qui absorbent dans l'UV et le visible doivent posséder des doubles liaisons et éventuellement des électrons appartenant à des doublets libres (électrons π ou n), c'est à dire des groupements chromophores. Leur distribution dans la peau n'est pas uniforme comme l'affirment certains modèles²¹, mais stratifiée²⁰.

Un chromophore présente un ou plusieurs groupes d'atomes correspondant à des régions de spectres électroniques ou de vibrations dépendant peu de la composition du reste de la molécule²². La présence de groupements auxochromes et le phénomène de conjugaison favorisent leur absorption.

Lorsque l'énergie incidente est suffisante, les molécules passent de l'état singulet fondamental (1M_0) à un état singulet excité supérieur (1M_n) : $h\nu = E(^1M_n) - E(^1M_0)$ avec E l'énergie de l'état correspondant, h la constante de Planck et ν la fréquence. Ce changement d'énergie lors de l'absorption correspond à la somme des variations d'énergie électronique, vibratoire et rotatoire de la molécule : $\Delta E = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r$. Chaque niveau électronique est divisé en plusieurs niveaux vibratoires qui eux-mêmes sont divisés en plusieurs niveaux rotatoires (Cf. *Figure 2*).

.III.2 Désactivation des molécules - Emission

Toute molécule à l'état excité peut retourner à l'équilibre de différentes façons :

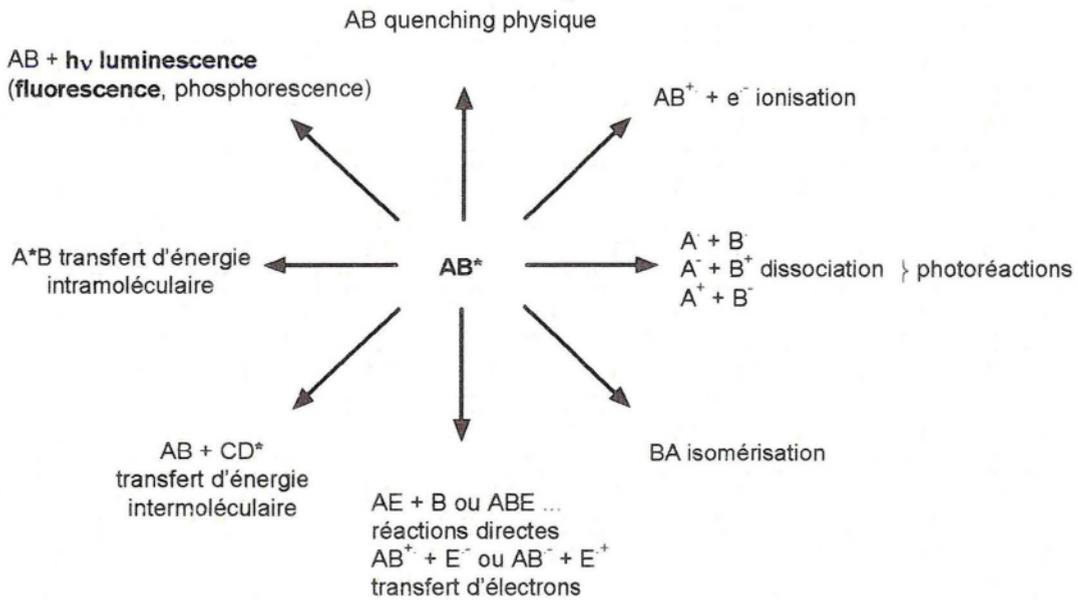


Figure 11 : Devenir de l'énergie d'excitation

La fluorescence résulte du passage de l'état singulet excité (1M_1 , état vibrationnel le plus bas) à l'état singulet fondamental (1M_0) avec émission d'un rayonnement de plus grande longueur d'onde que celle du rayonnement incident (Loi de Stokes). L'émission de fluorescence est immédiate et son temps de vie est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-9} secondes et n'est pas perceptible à l'oeil nu.

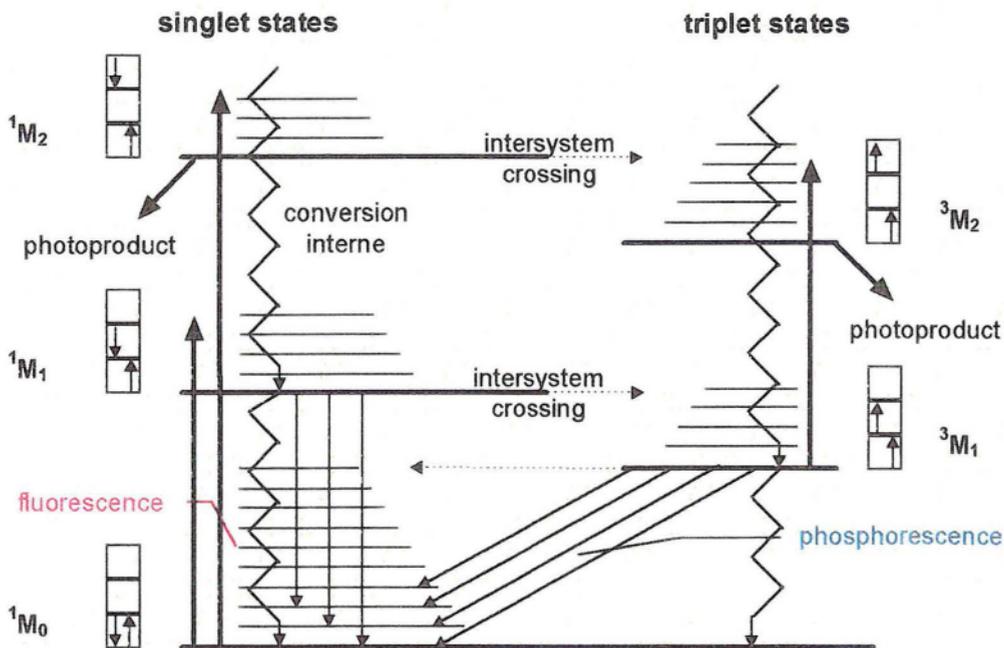


Figure 12 : Diagramme simplifié de Jablonski représentant les différents niveaux d'énergie d'une molécule²³.

Le **spectre de fluorescence** se décompose en deux parties :

- le **spectre d'excitation** qui correspond au spectre de la lumière absorbée par le chromophore, caractérisé par un ou plusieurs maxima d'absorption (λ_{exc}). D'autres processus peuvent intervenir tels que des transferts d'énergie ou des réactions photochimiques, ce qui entraîne des modifications des spectres d'absorption et d'excitation.
- le **spectre d'émission** qui d'après la loi de Stokes, est décalé vers les grandes longueurs d'onde (λ_{em}) (déplacement de Stokes). La transition lors de l'émission a le plus souvent pour origine le niveau excité π^* ($\pi^* \rightarrow \pi$) et se fera en effet toujours de $^1M_1 \rightarrow ^1M_0$. De ce fait, la forme du spectre d'émission est indépendante de la longueur d'onde d'excitation²⁴.

Le **rendement quantique** de fluorescence est défini par le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Il est égal à 1 lorsque toutes les molécules excitées fluorescent. En cas de concurrence, le rendement quantique de fluorescence devient inférieur à l'unité et peut devenir nul.

Après ces rappels sur la structure et les propriétés optiques de la peau, et sur le phénomène d'autofluorescence, nous allons décrire les applications de la spectrofluorimétrie en dermatologie.

.IV APPLICATIONS DIAGNOSTICS EN DERMATOLOGIE

Les propriétés de fluorescence de la peau sont depuis une trentaine d'année mises à profit pour les applications diagnostics de différentes pathologies cutanées. Les troubles de la pigmentation, certaines infections fongiques superficielles et bactériennes sont mis en évidence par la lampe de Wood. La détermination des indices de protection des écrans solaires est une application plus récente de la fluorescence.

.IV.1 Utilisations de la lampe de Wood

En lumière noire, les ongles et les dents apparaissent blancs tandis que la peau devient bleue, voire brune aux niveaux des zones hyperpigmentées. Cette fluorescence vers 440 nm correspondrait au coenzyme A réduit alors que vers 450 nm, d'autres complexes enzymatiques seraient aussi responsables de ce phénomène. La mélanine absorbe surtout à des longueurs d'onde courtes dans le visible, vers 440-450 nm, ce qui explique la couleur foncée de la peau en lumière de Wood et justifie l'utilisation de cette lampe notamment dans les troubles de la pigmentation.

D'autres types de fluorescence sont produits, par exemple lorsque la peau contient une substance chimique excitable en quantité importante telle que les porphyrines ou les produits de dégradation de la kératine... De même, la prise de certains médicaments dits photosensibilisants induit une fluorescence plus ou moins persistante de la peau¹⁶.

.IV.1.1 La lampe de Wood

La lampe de Wood est une lampe à vapeur de mercure, moyenne pression (1 atm) équipée d'une enveloppe en verre pourvue d'un filtre Nickel-Cobalt ne transmettant que les radiations UVA. Son spectre est continu de 320 à environ 400 nm et centré à 365 nm (Cf. Figure 13). Cette lampe est parfois appelée «lumière noire». La coupure dans les UV courts dépend de la pureté du verre.¹⁶

Son utilisation se fait dans une pièce noire afin d'optimiser la visibilité à l'œil nu de la fluorescence.

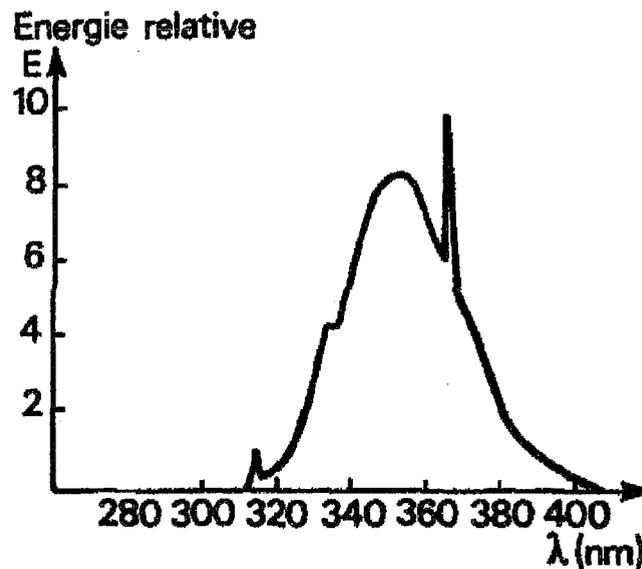


Figure 13 : Spectre de la lumière noire

.IV.1.2 Applications dermatologiques

.IV.1.2.1 Diagnostic des troubles de la pigmentation en mélanine^{25,26}

Il existe trois catégories de troubles pigmentaires : les hypomélanoses, les hypermélanoses brunes (épidermiques) et les hypermélanoses grises ou bleues (dermiques).

Les hypomélanoses ou leukodermies sont définies en fonction de la présence, la réduction ou l'absence de mélanocytes :

- un trouble *mélanocytopénique* est une hypomélanose avec absence de mélanocytes
- un trouble *mélanopénique* présente un nombre normal de mélanocytes, mais leur contenu en mélanosomes est réduit. Lorsque le nombre de mélanocytes est normal et que la quantité de mélanine est augmentée, il s'agit au contraire d'un trouble d'hyperpigmentation dit *mélanotique*. Un trouble *mélanocytotique* correspond à une augmentation de mélanocytes.
- un trouble *non-mélanotique* est une aberration pigmentaire dans laquelle la pigmentation n'est pas constituée par la mélanine mais par un autre chromophore exogène tel que la minocycline (tétracycline) ou la chlorpromazine (phénothiazine). Il s'agit d'un effet secondaire dépendant ou non de la dose ingérée. Par exemple, la minocycline entraîne une pigmentation brun-bleu, parfois définitive des cicatrices d'acné et de brûlures (non liée à la dose), ou une pigmentation diffuse prédominant au visage (dose cumulée > 100 grammes)²⁷.

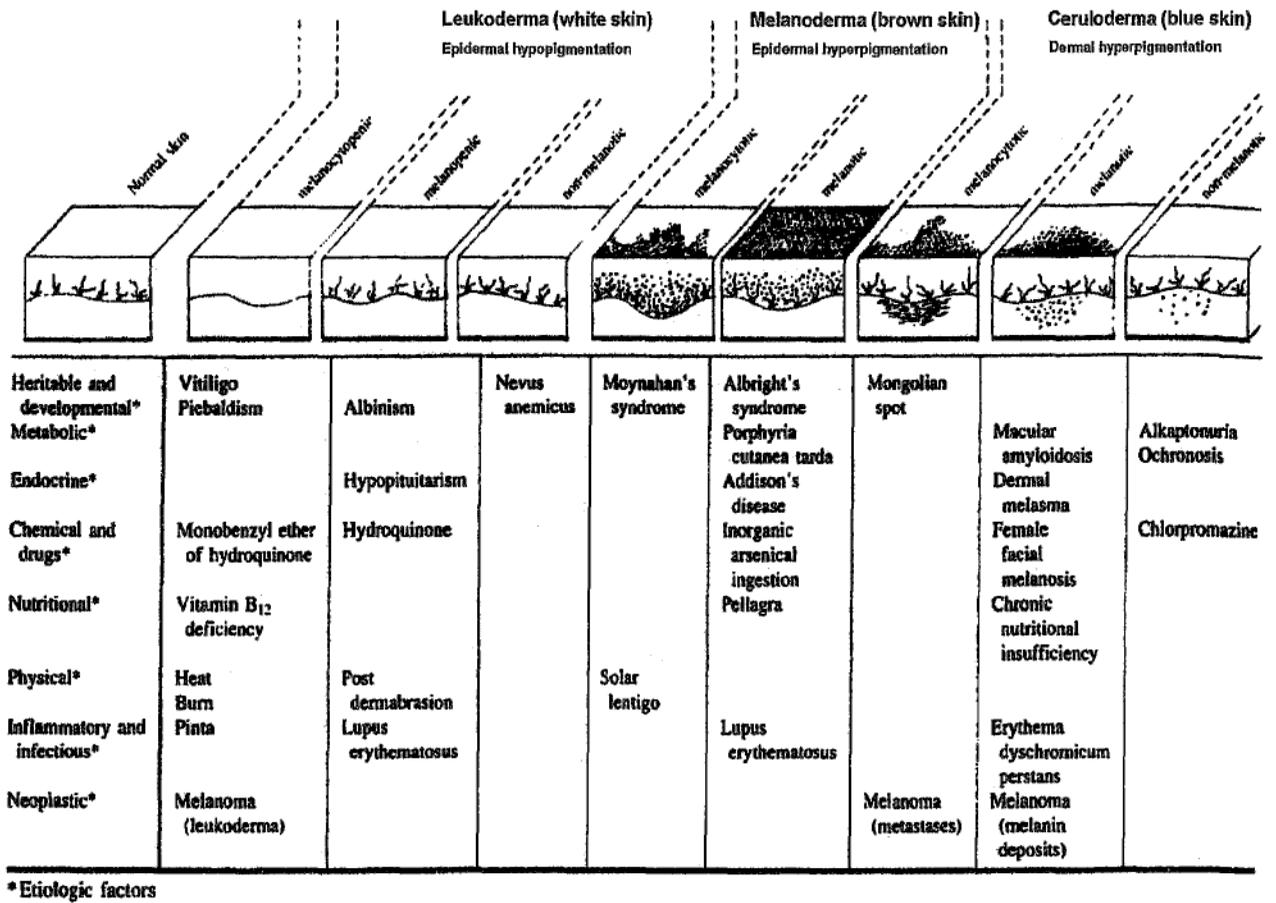


Figure 14 : Classification clinico-pathologique des troubles de la pigmentation²⁸

Technique de diagnostic

La lampe de Wood est utilisée dans certains cas d'anormalités pigmentaires et de cancers cutanés²⁹, dans le but d'estimer la profondeur de la pigmentation : pigmentation épidermique ou pigmentation dermique. En effet, la mélanine absorbe beaucoup dans l'UV et le visible.

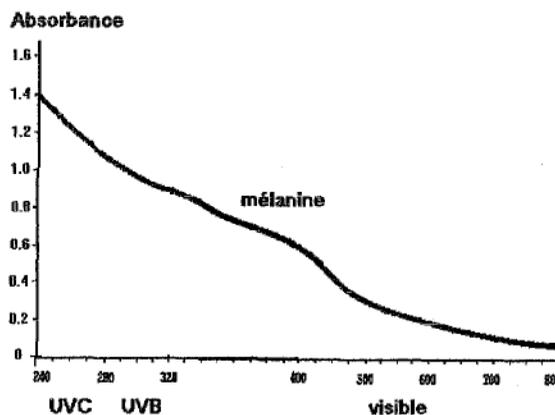


Figure 15 : Spectre d'absorption et de fluorescence de la mélanine

La technique repose sur la comparaison du degré de pigmentation (minimal, modéré, important) en lumière visible par rapport au degré en lumière noire. Au niveau de l'épiderme, le degré de pigmentation augmente et apparaît plus élevé en lumière de Wood alors qu'il reste identique au niveau du derme.

Ces observations cliniques sont liées aux propriétés optiques de la peau. La couleur observée d'une zone cutanée plus ou moins riche en mélanine est constituée des longueurs d'onde renvoyées par le pigment :

- si la mélanine est très superficielle, comme dans les peaux noires, la lumière visible est absorbée en grande partie et seul le reste du rayonnement retourne à l'oeil. Il y a absence de couleur, la peau est foncée. En lumière de Wood, le rayonnement UVA pénètre moins profondément, le derme réfléchit très peu de lumière et la fluorescence provient uniquement de l'épiderme et de la couche cornée. Par conséquent, la couleur de la peau apparaît plus foncée que dans le visible.
- dans le cas d'une pigmentation dermique, la variation de la pigmentation est moins évidente, voire absente en raison de la plus faible fluorescence en profondeur.

Une lésion épidermique de degré 2 (hypermélanose modérée) subira une augmentation et apparaîtra sous la lampe de Wood comme une lésion de degré 4 alors qu'un trouble de la pigmentation dermique restera de degré 2. Par contre les hypomélanoses apparaissent plus claires sous la lumière noire.

Le tableau ci-dessous présente la fluorescence de trois types de troubles pigmentaires :

Troubles pigmentaires	Fluorescence
absence totale de pigmentation	blanc vif - bleuté
hypopigmentation	blanc
hyperpigmentation	violet brun

Tableau 1 : Quelques troubles pigmentaires



Exemple d'une hypopigmentation épidermale chez un patient atteint de vitiligo³⁰



Exemple d'une hyperpigmentation épidermale chez un patient ayant des éphélides²⁶

Figure 16 : Photos de patients en lumière visible (a) et sous lampe de Wood (b)

.IV.1.2.2 Diagnostic des infections fongiques superficielles³¹

Ces infections sont communes ; elles regroupent les infections à dermatophytes, le pityriasis versicolor et les infections à *candida*. Souvent l'examen sous lampe de Wood des zones infectées est un moyen rapide et suffisant pour la détection de nombreuses infections microbiologiques.

■ Infections à dermatophytes³¹

Les dermatophytes sont des champignons provoquant des infections superficielles de la peau, aussi communément appelées dermatophytoses. La transmission peut se faire d'un individu à l'autre, par contact avec le sol ou avec un animal et ceci, partout dans le monde. Dans environ 20 % de la population, il s'agit d'infections chroniques alors que 90 % des hommes adultes ont probablement eu une ou plusieurs infections superficielles fongiques. L'apparition et la fréquence de ces infections semblent plus importantes dans les zones tropicales, présentant un climat humide.

On distingue plusieurs espèces fongiques selon le lieu de l'infection, mais une seule peut être révélée à l'aide de la lampe de Wood : **la teigne tondante** (*tinea capitis*).

Tinea capitis est, à l'origine, une maladie infantile surgissant surtout entre 3 et 9 ans. Elle atteint le cuir chevelu de deux façons différentes : soit les spores sont à l'intérieur de la gaine, et il s'agit d'une infection endothrix, qui est non inflammatoire et provoquée le plus souvent par un *Trichophyton* ; soit les spores restent sur le cheveu, et il s'agit alors d'une infection ectothrix, inflammatoire et produite par *Microsporum* et *Trichophyton*.

Dans tous les cas, la première étape dans le diagnostic de *tinea capitis* est l'examen clinique : des zones d'alopecie sont souvent accompagnées de point noirs caractéristiques. Certaines infections fongiques du cuir chevelu sont diagnostiquées à l'aide de la lampe de Wood : une lumière jaune-verte fluorescente provenant des microspories est observée au niveau du cuir chevelu¹⁶. Cette fluorescence est typique des teignes dues à *M. audouinii*, *M. canis*, *M. distortum* et à quelques autres champignons provoquant une infection ectothrix. Elle serait issue des métabolites du tryptophane³² et/ou d'un produit de dégradation de la kératine dont la nature chimique n'est pas encore connue.

L'examen à l'aide de la lampe de Wood est inefficace dans le cas de lésions causées par *T. tonsurans* et par d'autres producteurs de spores induisant des infections ecto-

ou endothrix. Il existe cependant des faux-négatifs. Parfois, certaines lésions du cuir chevelu ne présentent pas de fluorescence sous la lampe de Wood, et le diagnostic de la teigne est écarté. Malheureusement, quelques patients sont alors traités localement avec des stéroïdes lesquels exacerbent l'infection. Par conséquent, en cas d'incertitude, il est important d'effectuer une culture microbiologique du grattage afin d'obtenir un diagnostic définitif³².

dermatophyte	fluorescence
<i>Microsporum audouini</i>	+ jaune-vert
<i>M. canis</i>	idem
<i>M. distortum</i>	idem
<i>M. ferrugineum</i>	idem
<i>Trichophyton tonsurans</i>	- légèrement blanc sur des cheveux blonds ou blancs
<i>T. schoenleini</i>	+/- normalement négatif fluoresce parfois gris-blanc ou vert clair
<i>T. verrucosum</i>	-
<i>T. equinum</i>	-

Tableau 2 : Fluorescence de divers dermatophytes sous lampe de Wood³³

■ *Tinea versicolor*

Le pityriasis versicolor est une infection fongique superficielle parfois confondue avec d'autres pathologies cutanées telles que le pityriasis blanc acromiant (dartres), la syphilis secondaire ou encore le vitiligo. Les facteurs prédisposés sont la transpiration excessive, la malnutrition, les maladies chroniques, l'immunosuppression, la chaleur, l'humidité et les climats tropicaux.

Il s'agit d'une invasion mycosique du *stratum corneum* par une levure lipophile et dimorphique, *Malassezia furfur* aussi appelée *Pityrosporum orbiculare*. *M. furfur* est une levure saprophyte de la peau, qui colonise normalement le follicule pileux. Lorsqu'elle prend une forme micellaire, elle se propage dans les couches superficielles du derme

et fait apparaître une éruption érythémateuse cutanée. *Tinea versicolor* est fréquemment retrouvée sur la tête, le cou, le haut du dos, formant des macules squameuses rondes ou ovales, hypo ou le plus souvent hyperpigmentée avec des bords hyperpigmentés). La maladie est chronique et l'hypopigmentation persiste plusieurs mois sans s'écailler et sans que l'on puisse identifier l'organisme. Cette observation clinique peut prêter à confusion avec le diagnostic du vitiligo.

Parfois, la levure est présente sur la peau de certains patients, aux endroits où il y a du sébum (dos, ventre, pellicules), mais ne déclenche pas l'infection (état saprophyte, non contagieux). Le portage de la levure est permanent mais le déclenchement de la maladie chez un individu sain dépend de l'intégrité de la peau.

Sous la lumière noire, les zones cutanées activement infectées par *tinea versicolor* apparaissent plus claires que la peau adjacente, et présentent une fluorescence jaune pâle-orange. Cet examen complète le diagnostic sur scotch et permet d'évaluer l'étendue totale de la maladie.

.IV.1.2.3 Diagnostic d'érythrasma

Erythrasma est une infection cutanée superficielle, causée par *Corynebacterium minutissimum*. Cliniquement, elle se manifeste par une éruption cutanée brun-rouge, squameuse, parfois prurigineuse et peut apparaître à divers endroits, entre les doigts de pieds, au niveau du pli crural, de l'aîne ou dans la région axillaire²⁵.

Cette infection est plus courante dans les zones tropicales où l'humidité et la chaleur favorisent son développement³⁴. Une forme plus généralisée apparaît le plus souvent chez les diabétiques et les femmes noires dans les climats humides.

Le diagnostic peut être rapidement confirmé par l'examen de l'éruption sous lampe de Wood. Une fluorescence rouge-corail est observée, due à un pigment porphyrrique soluble dans l'eau produit par l'organisme responsable. Si la zone est nettoyée avant l'examen, la fluorescence peut être absente.

Dans les régions intertrigineuses, *C. minutissimum*, lorsqu'il est présent, n'est pas toujours la seule cause des changements cutanés. D'autres infections bactériennes ou fongiques, un intertrigo, un psoriasis ou encore une dermatose séborrhéique peuvent compliquer le diagnostic et doivent de ce fait être pris en compte selon la partie du corps impliquée³³.

.IV.1.2.4 Diagnostic des infections à *Pseudomonas*

La fluorescence vert-pâle des infections à *Pseudomonas aeruginosa* s'explique par la présence de pyocyanine. Ce germe est souvent rencontré sur des plaies chez les grands brûlés ou au niveau des doigts de pied³⁵. Cette technique peut considérablement diminuer la morbidité par la mise en route d'un traitement précoce.

.IV.1.2.5 Diagnostic de certains germes anaérobiques

Il est actuellement possible d'identifier rapidement et de déterminer la sensibilité d'un antibiotique sur des bactéries aérobies. Mais cela reste plus difficile, plus long et moins fiable en ce qui concerne les bactéries anaérobies.

- ***Propionibacterium acnes***

L'acné est fréquemment associé à l'état séborrhéique. L'agent infectieux presque toujours associé est *Propionibacterium acnes*. Résidant au niveau de l'appareil pilo-sébacé, ce *Corynebactérium Acnes* transforme les triglycérides du sébum en acides gras libres qui entraînent une réaction inflammatoire importante, une hyperkératose et une formation de comédons.

La quantification de l'acné est difficile. Seule l'appréciation clinique et les techniques de photographie permettent une évaluation du degré de sévérité de l'état pathologique et de l'efficacité du traitement. Sous la lampe de Wood, l'apparition d'une fluorescence rose-corail typique semble être un bon indicateur de la présence de *P. acnes*. Ce sont les porphyrines synthétisées par la bactérie qui émettent vers 600-650 nm.

Récemment, N. Kollias et L.C Lucchina³⁶ ont repris et amélioré une méthode de mesure de l'acné à l'aide d'une lampe de Wood et d'une technique spécifique de photographie. La fluorescence, attribuée aux coproporphyrines III et protoporphyrines IX, est proportionnelle à la densité de la population de *P. acnes*.

Une échelle de 0 à 3 a ainsi été instaurée pour attribuer des degrés de fluorescence : 0 = aucune ; 1 = faible ; 2 = modérée ; 3 = étendue. Une échelle de -1 à 4 a servi à évaluer le changement de fluorescence entre le début du traitement et douze semaines de traitement : -1 = < 0% (augmentation) ; 0 = 0% à 25% (presque inchangé) ; 1 = 26% à 50% (diminution minimale) ; 2 = 51% à 75% (faible diminution), 3 = 76% à 95% (diminution marquée) ; 4 = > 96% (presque plus rien).

Cette évaluation de la fluorescence permet non seulement de détecter la présence de *P. acnes*, mais permet aussi de mesurer l'absorption et l'efficacité des antibiotiques tels que la clindamycine, l'érythromycine ou encore les tétracyclines. Dans cette optique, M.R. Martin et son équipe³⁷ ont mis au point une méthode d'évaluation de l'absorption et l'efficacité de différentes classes d'antibiotiques (tétracycline et clindamycine), au niveau des orifices folliculaires nasaux par fluorescence.

• *Bacteroides melaninogenicus*

Une des causes de gangrène gazeuse est *B. melaninogenicus*, en association avec des organismes coliformes aérobies. La culture de *B. melaninogenicus* s'est révélée difficile en milieu hospitalier, d'où l'intérêt d'une détection physique plus rapide. Sous les ultraviolets, l'organisme émet une fluorescence rouge caractéristique. Des études d'absorption spectrale ont montré que cette fluorescence provenait d'un composé ayant une structure chimique proche de celle de l'hème³⁸.

Comme nous l'avons vu précédemment, d'autres bactéries émettent aussi dans le rouge (*C. minutissimum*, *Streptomyces albus* ou *C. acnes*). Cependant, aucun de ces organismes ne devrait produire de diagnostic faux-positif de *B. melaninogenicus* dans les plaies car la fluorescence de chaque bactérie présente un ton de rouge différent. Cette méthode non-invasive permet une identification et une mise en place d'un traitement rapide et sûr.

.IV.2 Application aux écrans solaires

Actuellement, la détermination de l'indice de protection d'un écran solaire est basée sur la dose érythémale minimale (DEM). Cette méthode présente actuellement deux inconvénients majeurs :

- la dose d'UV délivrée à la peau augmente selon une progression arithmétique ou géométrique et de ce fait, amène une imprécision inévitable dans la mesure de la DEM et du facteur de protection de la peau. De plus l'appréciation clinique de l'érythème est relativement subjective et peut varier selon l'examineur.
- cette méthode est invasive ; elle nécessite un contrôle médical et la prise de précautions.

Une méthode basée sur l'atténuation de l'autofluorescence de la peau *in vivo*³⁹, permet d'éviter la réaction érythémateuse. Il s'agit d'une méthode rapide et non-invasive de mesure des indices de protection des filtres solaires à différentes concentrations. Elle permet aussi de déterminer leur rémanence et la persistance de leur effet protecteur.

L'excitation de la peau à 290 nm induit une émission lumineuse à 335 nm due au tryptophane contenu dans les protéines du *stratum corneum*. Ces deux longueurs d'onde ont été choisies comme références car elles sont respectivement dans l'UVB et l'UVA.

L'indice de protection (IP) est calculé à partir du coefficient d'atténuation R :

$$R = \frac{F_p + R_p}{F_f + R_f}$$

F_p : fluorescence de la peau à 335 nm ; F_f : fluorescence de la peau à 335 nm après application du filtre ;

R_p : réflexion de la peau à 290 nm ; R_f : réflexion de la peau à 290 nm après application du filtre.

Dans des conditions optimales de mesure (angle de détection, ouverture de fente du détecteur optimum ...), l'atténuation de la fluorescence varie linéairement avec l'IP :

$$IP = R \times K \text{ avec } K = \frac{T_1 \times T_2}{T_{UV}}$$

T₁ : transmission du filtre à 290 nm ; T₂ : transmission du filtre à 335 nm ;

T_{UV} : transmission du filtre à la longueur d'onde correspondant au maximum de sensibilité de la peau en UVB et en UVA selon le spectre d'action du filtre. En UVA, la peau est plus sensible à 350 nm alors que la réaction érythémateuse a son maximum de réponse à 305 nm.

L'atténuation de fluorescence observée après application d'un filtre est le produit de celles de l'excitation (280 nm) et de l'émission (335 nm). Le coefficient K permet de corriger l'atténuation due à l'absorption du filtre.

Contrairement à l'utilisation qualitative de la lampe de Wood, cette application est quantitative et évite l'utilisation trop fréquente de la méthode invasive de Schultze pour la mise au point d'un filtre solaire. Cependant, aujourd'hui encore la méthode officielle de mesure de l'IP est basée sur la détermination d'une DEM.

.V AXES DE RECHERCHE SUR L'AUTOFLUORESCENCE DE LA PEAU

Plusieurs axes de recherche sont actuellement étudiés : la caractérisation des chromophores de la peau, la cancérologie cutanée, l'évaluation de l'érythème et de la pigmentation, le traitement de l'acné par les UV et diverses pathologies.

.V.1 Etude de la distribution des chromophores dans la peau

L'évaluation correcte de la fluorescence intrinsèque de la peau nécessite des connaissances précises des chromophores. Leurs spectres d'excitation et d'émission au niveau de l'épiderme et du derme ont fait l'objet de nombreuses études *ex vivo*⁴⁰ (Cf. Figure 17 d et e) et *in vivo*^{4,20}. Utz⁴⁰ a travaillé *ex vivo* sur des échantillons de peau humaine prélevés sur des patients âgés de 40 à 87 ans. Ses résultats obtenus dans un large domaine spectral confirment les expériences menées *in vivo* :

- le tryptophane et la tyrosine présents dans l'épiderme sont responsables d'un premier pic de fluorescence : $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ et $\lambda_{ém} = 340 \text{ nm}$ (Cf. Figure 17a). L'intensité de fluorescence de ce pic varie très peu d'un échantillon à l'autre. Ceci s'explique en partie par l'absence d'atténuation du signal par la mélanine localisée plus profondément. Le contenu en tryptophane et tyrosine dans l'épiderme est deux fois plus important que dans le derme.
- il est plus difficile d'interpréter la nature de l'autofluorescence de la peau de 400 à 480 nm. Les spectres d'émission et d'excitation ne sont pas constants (Cf. Figure 17b). Les chromophores impliqués seraient probablement le nicotinamide dinucléotide (NADH) et des composants du derme, l'élastine et le collagène⁴⁰. Cette liste est probablement incomplète et pourrait être affinée par la présence d'éventuels photoproduits. Le NADH est présent dans les cellules et donc surtout au niveau de l'épiderme. Son spectre d'émission est peu modifié par la présence de la mélanine contrairement à celui de l'élastine et du collagène. Ces deux derniers sont présents essentiellement dans le derme réticulaire. Leurs spectres d'émission et d'excitation subissent une absorption par la mélanine, mais aussi par l'hémoglobine, la bilirubine, les porphyrines et les caroténoïdes. L'intensité de fluorescence est diminuée mais la forme du spectre peut également changer.

- dans la région spectrale du rouge, l'intensité de fluorescence est encore plus faible que dans l'UV et le bleu. Le maximum d'excitation se situe vers 400 nm et d'émission vers 600 nm (Cf. Figure 17c). D'autres pics d'émission moins prononcés sont observés entre 580 et 640 nm. Les chromophores impliqués ici sont les porphyrines.

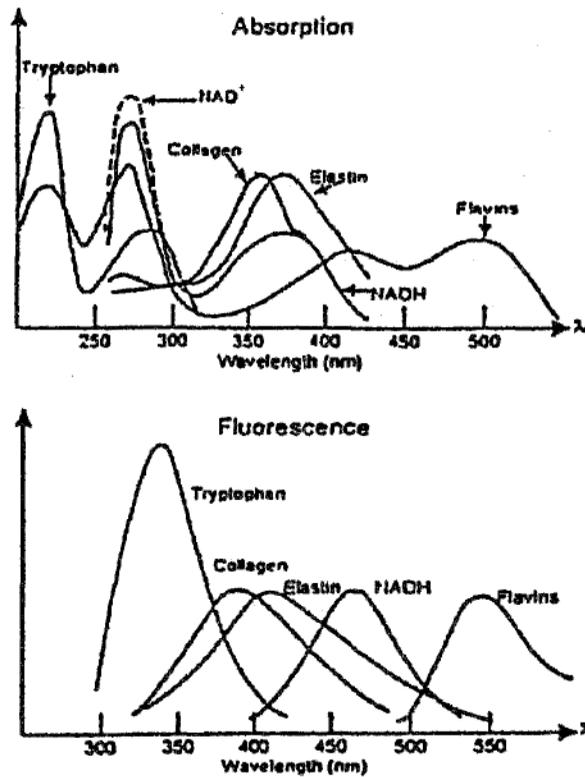


Figure 17 : Spectres d'excitation et d'émission de la peau dans différentes régions spectrales

Zeng et Mac Aulay²⁰ ont eux aussi étudié la distribution des chromophores *in vitro*. Ils ont mis en évidence des différences au niveau du spectre d'émission : l'autofluorescence du derme supérieur est plus jaune alors que celle du derme inférieur est plus verte. Cette différence serait due à la composition chimique des chromophores ; le derme papillaire contient en majorité du collagène type III et peu de collagène type I et inversement pour le derme réticulaire. La comparaison de ces spectres avec les spectres de fluorescence *in vivo* met surtout en avant la contribution du derme papillaire et du *stratum corneum*.

Ces renseignements sur les chromophores sont extrêmement importants pour la compréhension des spectres de fluorescence et pour l'utilisation de la

spectrofluorimétrie à des fins diagnostiques. Par conséquent, la poursuite de telles études est nécessaire.

.V.2 Cancérologie cutanée

La différenciation clinique des cancers de la peau par rapport aux lésions non malignes est difficile, particulièrement durant les phases initiales du développement du cancer. Normalement, un diagnostic précis nécessite une évaluation histopathologique ou cytopathologique de chaque lésion. A ce propos, le développement d'instruments de diagnostics précis, en temps réel, et non-invasifs conduirait à une réduction du nombre de biopsies et de procédures chirurgicales inutiles².

La présence de porphyrines endogènes dans les tumeurs a été mise en évidence la première fois par la lampe de Wood². Ce fluorophore endogène d'origine bactérienne est présent au niveau des zones nécrotiques des tumeurs mais n'est pas retrouvé systématiquement, comme par exemple dans le cancer du colon ou de la muqueuse orale. Parmi de nombreux chromophores endogènes étudiés, les formes oxydées ou réduites du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD et NADH) s'avèrent intéressantes pour le diagnostic des cancers².

Le NAD est une forme ubiquitaire et est impliquée dans le transport d'énergie. Excité en lumière monochromatique à 366 nm avec une lampe à mercure haute pression, le NADH fluoresce vers 475 nm dans la peau et le NAD constitue un épaulement vers 445 nm. La fluorescence du NADH est plus importante que celle de la forme oxydée. Son intensité reflète l'activité respiratoire et métabolique des cellules. L'idée de mesurer ces activités par l'intermédiaire du NADH a déjà fait l'objet de nombreuses études en cancérologie ainsi qu'en cardiologie dans l'ischémie myocardique.

• Etudes *in vivo*

Lohmann⁴¹ a publié en 1988 ses travaux sur la fluorescence des mélanomes et naevus. Il a constaté qu'au niveau des mélanomes cutanés, le métabolisme cellulaire était augmenté, particulièrement à la limite entre le tissu sain et cancéreux. La peau saine présente une faible intensité de fluorescence (30 coups/100 ms), ce qui est dix fois inférieur à la fluorescence en bordure de mélanomes malins :

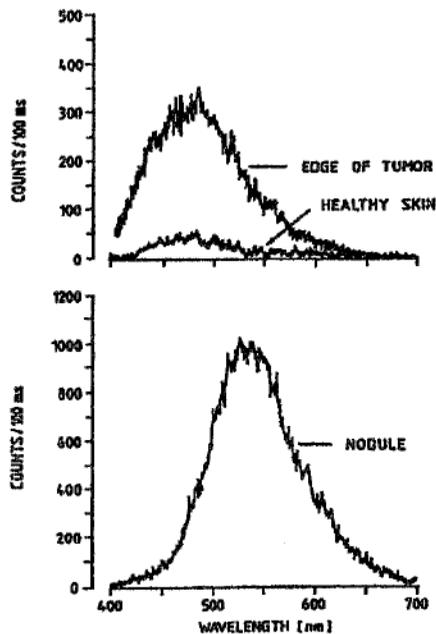


Figure 18 : Spectre de fluorescence de la peau saine, maligne et d'un nodule ($\lambda_{exc} = 366 \text{ nm}$)⁴¹

Dans la zone pigmentée de la tumeur, aucune fluorescence n'est détectée, la lumière d'excitation est absorbée avec une grande intensité. Dans le cas de grains de beauté, le nombre de coups est encore plus faible (5 coups/100 ms). De plus, Lohmann a remarqué occasionnellement une importante fluorescence des nodules vers 535 nm, excités à 366 nm. Tous les nodules de mélanomes ne possèdent pas cette caractéristique (Cf. Figure 18).

Lohmann⁴¹ a suggéré que pendant la formation de mélanomes, de grandes quantités de NADH étaient nécessaires au système biologique pour faire face aux processus oxydatifs impliqués dans la genèse des mélanomes. Par conséquent, le NADH était oxydé en NAD faisant apparaître un épaulement vers 445 nm. Par contre, aucune explication certaine ne peut être avancée pour le spectre de fluorescence observé à 535 nm. Des précurseurs du NADH, fluorescents, pourraient être impliqués.

Un an plus tard, Lohmann⁴² examine la fluorescence d'échantillons de peau provenant de patients présentant des naevi ou des mélanomes superficiels. Les résultats diagnostics obtenus se sont révélés identiques à ceux obtenus après examen histologique. L'analyse de la fluorescence procurerait même des informations supplémentaires sur les changements moléculaires.

En 1991, Lohmann W., Nilles M. et Bödeker RH.¹ ont travaillé sur le rapport Intensité maximale à l'extérieur de la lésion / Intensité minimale à l'intérieur. Ils ont montré que

le logarithme de ce rapport permettait une meilleure distinction entre un naevi et un mélanome ou un naevi dysplasique.

L'équipe de HJ Sterenborg² et SL Jacques⁴³ a réalisé dans des conditions à peu près similaires l'expérience menée par Lohmann, mais n'est pas arrivée à retrouver de grandes variations de fluorescence sur les mêmes lésions.

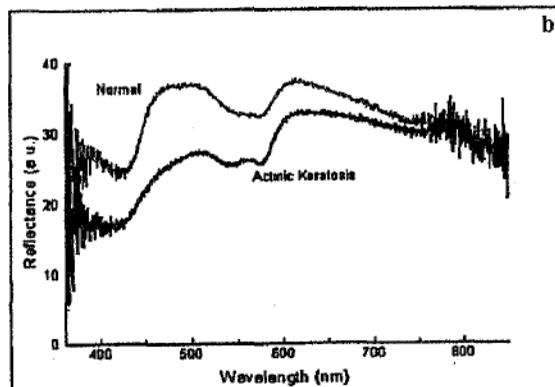
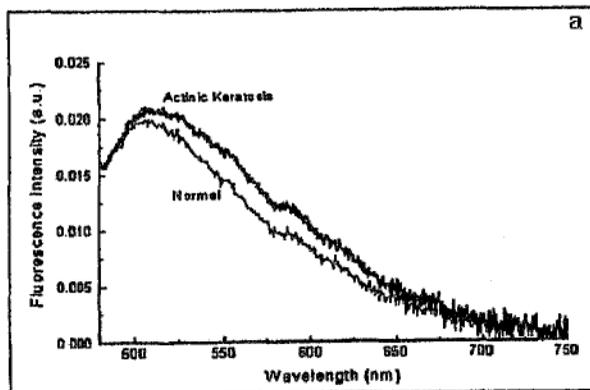
• **Etudes ex-vivo**

L'étude de la fluorescence en microscopie sur des coupes de peau a récemment amélioré les possibilités de diagnostic⁴⁴. Les images de fluorescence sont uniques et peuvent caractériser trois catégories de pathologies différentes : des changements au niveau de l'épithélium dans le psoriasis, la kératose séborrhéique et le basaliome au niveau des naevi et mélanomes malins, au sein du tissu connectif dans le cas d'élastose solaire. La méthode est très sensible et peut être utile comme technique rapide pour diagnostiquer les biopsies lors d'interventions chirurgicales.

Les perspectives des méthodes spectroscopiques de fluorescence et d'imageries microscopiques sont d'une importance capitale en matière de prévention des cancers cutanés, de détection précoce et de mise en place rapide des traitements. D'autres travaux sont développés à ce sujet ; soit ils font intervenir des fluorophores exogènes (colorants photosensibilisants utilisés en thérapie photodynamique), soit ils utilisent les propriétés optiques de la peau comme la réflexion diffuse⁴⁵.

.V.3 Etudes réalisées sur diverses pathologies

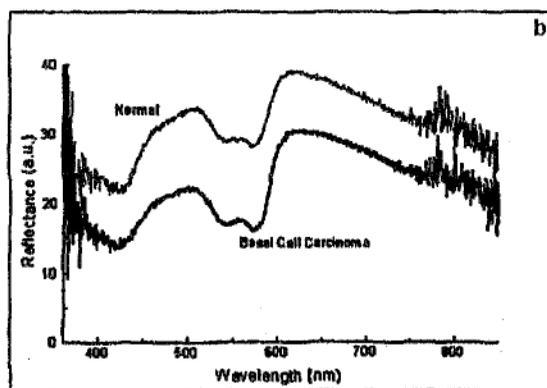
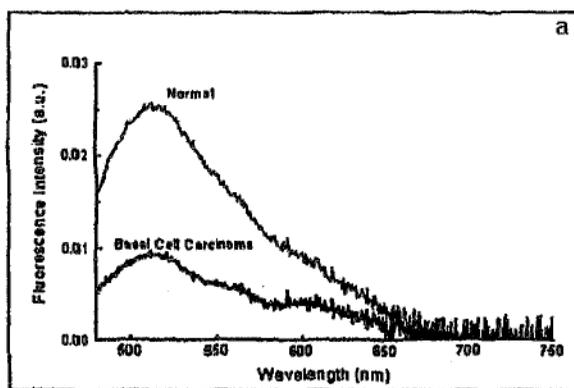
Zeng et Mac Aulay³ ont publié cette année leurs derniers travaux sur l'étude spectroscopique en UV de différents types de pathologies. Ils ont analysé le spectre de réflexion diffuse et le spectre de fluorescence de la peau, dans le but de différencier et d'enregistrer la progression des lésions cutanées telles que la kératose actinique ou le carcinome baso-cellulaire (Cf. Figures 19 et 20 et tableau 3).



a - Spectre d'AF d'une kératose actinique et d'une zone de peau normale ($\lambda_{exc.} = 442 \text{ nm}$)³.

b - Spectre de réflexion diffuse d'une kératose actinique et d'une zone de peau normale³.

Figure 19



a - Spectre d'AF d'un carcinome baso-cellulaire et d'une zone de peau normale ($\lambda_{exc.} = 442 \text{ nm}$)³.

b - Spectre de réflexion diffuse d'un carcinome baso-cellulaire et d'une zone de peau normale³.

Figure 20

Name of disease	# of lesions measured	Fluorescence spectral characteristics	
		Intensity	Shape
Psoriasis	28	Lower than Normal.	23 sites with Peak at 635 nm. 5 sites without the 635 nm peak. 1 site with double peak at 635 nm & 675 nm.
Seborrheic Keratosis	26	16 sites Higher than Normal. 10 sites Lower than Normal.	Similar to Normal (in spectral shape and position of main peak).
Basal Cell Carcinoma	11	Lower than Normal.	Similar to Normal, more blood.
Nevus of Ota	8	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Pustule Acne	7	4 sites Lower than Normal. 3 sites Higher than Normal.	Similar to Normal.
Port Wine Stain	6	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Spider Angioma	4	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Compound Nevus	4	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Intradermal Nevus	4	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Junctional Nevus	4	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Congenital Nevus	3	2 sites Lower than Normal. 1 sites Higher than Normal.	Similar to Normal.
Verruca Vulgaris	3	Higher than Normal.	Similar to Normal.
Vitiligo	3	Higher than Normal.	Similar to Normal.
Actinic Keratosis	3	Higher than Normal.	Similar to Normal.
Lentigo Simplex	3	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Cherry Angioma	3	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Nevus Sebaceous	2	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Cafe Au Lait Macule	2	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Acne Nodule	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Acrochodon	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Angiolymphoid Hyperplasia	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Closed Comedone	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Dermatofibroma	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Discoid Lupus Erythematosus	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Eczema	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Erythrasma	1	Lower than Normal.	Very different from Normal.
Familial Dermal Melanosis	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Melasma	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Molluscum Contagiosum	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Nevus of Ito	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Plaque	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Post Inflammatory Pigmentation	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Post Zoster Scar	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Small Keloid	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.
Verruca Plana	1	Lower than Normal.	Similar to Normal.

Tableau 3 : Caractéristiques des spectres de l'autofluorescence de différents types de pathologies cutanées³.

.V.4 Etude de l'érythème et de la pigmentation

La présence de chromophores en concentration variable tels que l'hémoglobine et la mélanine modifie le spectre d'autofluorescence de la peau. Sinichkin et coll.⁶ ont essayé d'estimer le degré de pigmentation et l'érythème cutané en faisant varier ces concentrations.

Dix volontaires sains se sont prêtés à l'expérience et ont subi une irradiation progressive jusqu'à atteindre 4 DEM. L'excitation a été réalisée à 337 nm et un maximum d'émission a été observé vers 460 nm. Plus l'érythème était important, plus la fluorescence s'est avérée faible. Par contre, au 7^{ème} jour après l'exposition, lors de la desquamation de la peau, la fluorescence a augmenté de nouveau pour retourner vers la normale.

En effet, l'augmentation de la concentration en pigments héminiques et mélaniques (pigmentation spontanée puis retardée 72 h après) entraîne une absorption plus grande de l'énergie d'excitation et d'émission, surtout dans la région du bleu-vert.

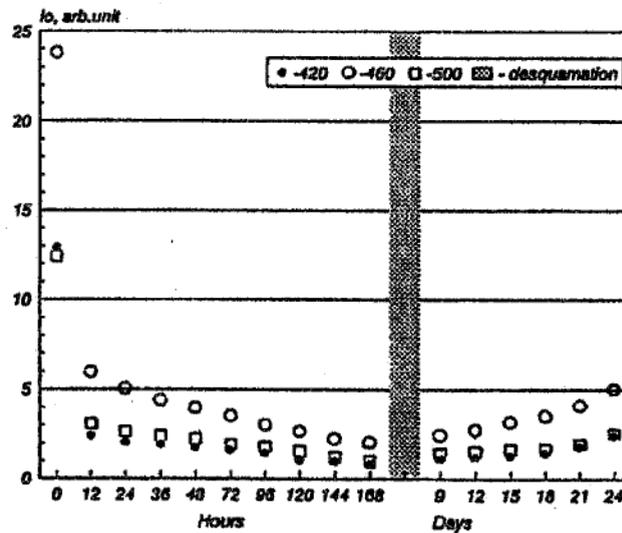
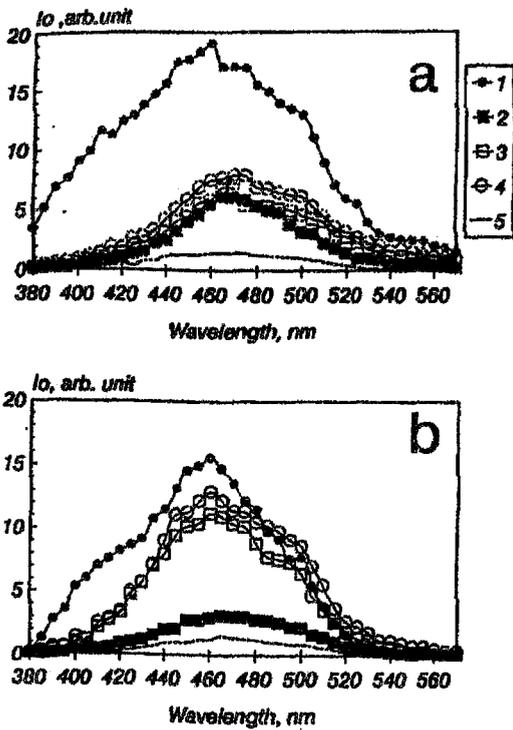


Figure 21 : Intensité de la fluorescence de la peau développant un érythème mesurée à 420, 460 et 500 nm⁶.

Sinichkin a aussi travaillé sur l'effet de la pression. Une diminution de l'irrigation sanguine du derme sous compression a provoqué un effet contraire : la fluorescence a augmenté.



- a - 7 jours après irradiation UV
 b - 14 jours après irradiation UV
 1 - AF de la peau normale ;
 2 - $1.4 \cdot 10^4$ Pa ; 3 - $8.4 \cdot 10^4$ Pa ;
 4 - $14 \cdot 10^4$ Pa ; 5 - érythème sans pression

Figure 22 : Autofluorescence de la peau érythémateuse et subissant différentes forces de pression⁶.

A partir d'une pression supérieure à 10^5 Pa, la différence au niveau des intensités de fluorescence est due à l'absorption de la mélanine.

Sinichkin a défini un index érythémal calculé à l'aide de la formule suivante :

$$E \equiv D_E^*(\lambda) - D_N^*(\lambda) = \log\left(\frac{I_F^N}{I_F^E}\right)$$

avec $\lambda = 460$ nm pic de fluorescence maximale ;

D_E^* représente l'absorption de la fluorescence par la peau érythémateuse, D_N^* par la peau normale ;

I_F^E est l'intensité de fluorescence de la peau érythémateuse, I_F^N de la peau normale.

L'index mélanique peut être défini par une formule analogue où les fluorescences I_F^E et I_F^N sont mesurées sous une pression de 10^5 Pa (absence de sang dans le derme).

En 1995, Sinichkin et Utz⁴⁶ ont établi un système optique dans le but d'obtenir une meilleure résolution spatiale et des informations objectives sur la concentration et la distribution des chromophores de la peau. Deux axes de recherche sont actuellement très développés et très liés, l'étude de la réflexion diffuse et de la fluorescence.

Sinichkin et Utz ont appréhendé ces deux phénomènes expérimentalement et mathématiquement par modélisation du processus de distribution de la lumière (modélisation de Monte Carlo). Les résultats obtenus par modélisation confirment ceux obtenus de façon expérimentale (Cf. paragraphe précédent). Cependant une légère différence apparaît : l'autofluorescence calculée de la peau érythémateuse est deux fois plus élevée que l'autofluorescence expérimentalement mesurée.

Ces études récentes procurent des informations intéressantes sur l'état des couches superficielles de la peau et peuvent être utilisées pour la détermination quantitative de leur contenu en mélanine et en hémoglobine.

.V.5 Thérapie photodynamique d'acne vulgaris

Comme nous l'avons vu au chapitre V.1.2.5 (Diagnostic de certains germes anaérobiques), excitée vers 405 nm, la peau humaine présente une fluorescence dans la région spectrale du rouge. Le spectre est constitué de 3 pics principaux vers 600, 620 et 640 nm, typiques des métalloporphyrines telles que la zinc-protoporphyrine, la coproporphyrine et la protoporphyrine IX respectivement. La fluorescence est localisée dans les follicules sébacés contenant *Propionibacterium acnes* responsable de la production des porphyrines. En opposition à l'utilisation de porphyrines exogènes pour la thérapie photodynamique des tumeurs, la production intrinsèque de porphyrines peut être utilisée pour le traitement de l'acné en lumière visible.

König et col.⁴⁷ ont travaillé en irradiant l'excédent de bactéries afin d'estimer l'effet thérapeutique induit. Des mesures de fluorescence ont été effectuées sur vingt personnes dont cinq souffrant d'*acne vulgaris*. L'intensité et le rapport des trois pics de fluorescence varient d'une zone à l'autre selon le ou les chromophores impliqués.

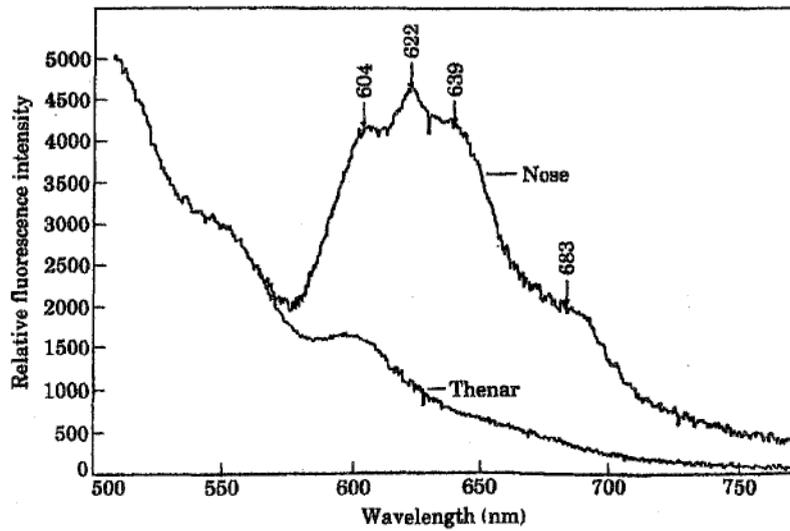


Figure 23 : Spectre de l'AF de la peau *in vivo*, autour du nez et sur la paume de la main (absence de follicule). Trois pics apparaissent vers 600, 620 et 640 nm ($\lambda_{exc} = 407$ nm, $5mW\ cm^{-2}$).

Des expériences de photoblanchiment ont été réalisées sur des comédons. Les réactions chimiques mises en jeu sont oxygène dépendantes et entraînent une diminution de la fluorescence. Le pic à 635 nm diminue beaucoup plus rapidement que celui à 620 nm. En milieu anaérobie, le processus de photoblanchiment est retardé. Lorsque la réduction de l'oxygène est arrêtée, l'intensité de fluorescence diminue très rapidement.

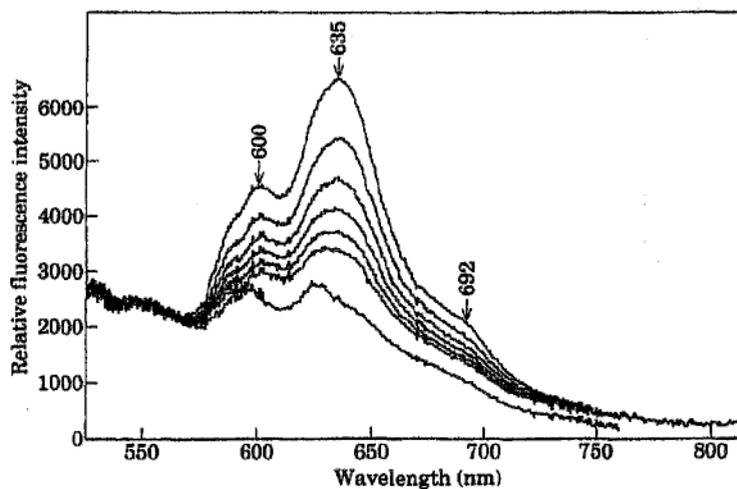


Figure 24 : Fluorescence des comédons dans des conditions normales à différentes énergies d'irradiation (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 et 1.2 et 2.0 $J\ cm^{-2}$ de haut en bas).

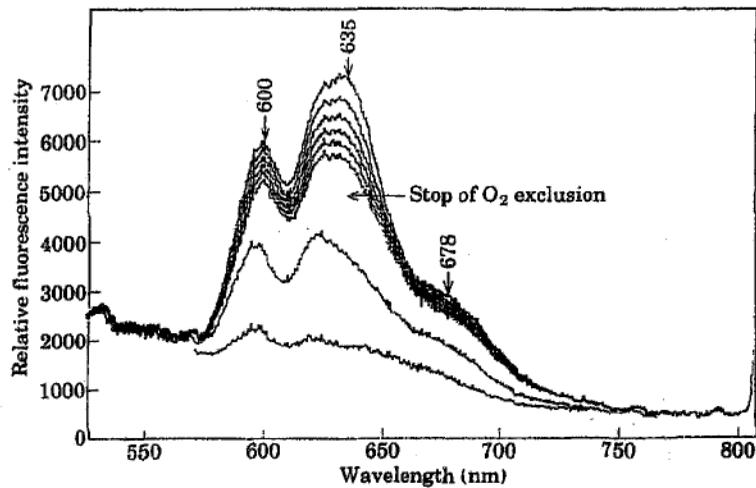


Figure 25 : Fluorescence des comédons dans des conditions anaérobiques à différentes énergies d'irradiation (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 et 1.2 J cm⁻² de haut en bas). Les deux dernières courbes ont été mesurées après arrêt des conditions anaérobiques (1.4 et 2.5 J cm⁻²).

Les porphyrines endogènes agissent comme des photosensibilisants cytotoxiques. L'irradiation de *Propionibacterium acnes* induit des processus de photo-oxydation conduisant à des réactions phototoxiques et à la photodestruction oxygène dépendante du sensibilisant (blanchiment et formation de photoproduits). Il est de ce fait possible d'établir une corrélation entre les changements d'intensité de fluorescence et le nombre de bactéries.

Par conséquent, l'utilisation de porphyrines endogènes comme photosensibilisants dans le but d'une thérapie photodynamique de l'*acne vulgaris* semble possible. Ce traitement se ferait en lumière visible par irradiation d'importantes zones cutanées. Son efficacité dépend de la concentration en porphyrine endogène et oxygène ainsi que de la profondeur de pénétration du rayonnement. Cette technique permettrait aux dermatologues de mesurer l'effet en observant le comportement et l'évolution de la courbe d'autofluorescence de la peau.

. DEUXIEME PARTIE

.I INTRODUCTION

Dans cette deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'autofluorescence de la peau dans le but d'essayer d'évaluer le vieillissement cutané. A l'heure actuelle, cet axe de recherche est encore peu étudié ; seule l'équipe de Leffell⁴ a mené des recherches *in vivo* sur l'évaluation du vieillissement et photovieillissement.

Comme nous l'avons vu dans la première partie, la peau est constituée de différents composants dont certains fluorescent. Sa fluorescence intrinsèque est surtout liée à l'élastine⁴⁸ et au collagène⁴⁹, deux composants majeurs du derme. Ceux-ci subissent des altérations physico-chimiques au cours du temps et on parle de "chronométrage" du vieillissement. Leur spectre d'émission pourrait nous renseigner sur ces altérations, sur leur propre évolution structurale dans le temps, et par conséquent sur l'âge physiologique et photobiologique de la peau.

Nous allons donc présenter cette deuxième partie en deux temps :

- dans un premier temps, nous exposerons les causes du vieillissement biologique, c'est à dire les facteurs extrinsèques tels que la photoexposition, et les facteurs génomiques. Nous présenterons ensuite les conséquences de ces facteurs, les modifications cutanées^{5,60} engendrées par le vieillissement intrinsèque et actinique, telles que des réactions de glycation irréversibles...

- dans un deuxième temps, nous étudierons la fluorescence intrinsèque *in vitro* d'un modèle de peau reconstruite afin de mettre au point la méthode de mesure, puis *in vivo* chez l'homme. D'après les données bibliographiques sur le vieillissement, nous essayerons de trouver des liens entre les modifications des spectres de fluorescence et celles de la peau avec l'âge, ainsi que des explications.

.II LE VIEILLISSEMENT CUTANE

Le vieillissement cutané est défini par l'ensemble des altérations du revêtement cutané, résultant de l'accumulation au fil des années des modifications progressives, irréversibles et inévitables de ses différents composants. La conséquence est un changement de niveau de l'homéostasie. L'une des caractéristiques frappantes est sa grande variabilité d'un individu à l'autre au sein d'une population, d'un endroit à l'autre pour un même individu.

L'origine de ce vieillissement est multiple : il s'agit d'une combinaison de facteurs intrinsèques et extrinsèques, plus ou moins importante qui fait que l'âge physiologique ne correspond pas toujours à l'âge chronologique.

.II.1 Le vieillissement cutané intrinsèque

Les facteurs intrinsèques font surtout apparaître des modifications nettes sur les régions photoprotégées. Inéluctables, ils agissent selon deux modalités :

- un **déterminisme génétique**, mis en évidence par Hayflick⁵¹. Véritable horloge biologique, cette programmation du vieillissement affecte aussi bien la peau que les autres organes. Elle provoque une perte de la capacité de division cellulaire, une perte d'information du génome et une perte de la structure des mitochondries.
- un **ensemble de facteurs endogènes** : une série d'erreurs moléculaires imprévisibles sur les synthèses enzymatiques, de mutations de l'ADN ou encore de lésions membranaires. Ainsi au niveau cellulaire, on constate des altérations témoignant d'une diminution du métabolisme : perte ou inactivation des gènes codant les ARN ribosomiaux, augmentation de la fraction inactive des enzymes, accumulation de produits de dégradation⁵².

Ces deux types de causes que l'on a voulu opposer autrefois, ont été réunis par la reconnaissance de l'importance des espèces actives de l'oxygène et des réactions produisant les radicaux libres qui agissent aussi bien sur l'élément génétique que sur les facteurs endogènes.

.II.1.1 Modifications cliniques

Plus net au niveau des zones photoprotégées, il se caractérise par :

- un amincissement portant sur l'ensemble des composants de la peau (atrophie de l'épiderme, du derme et de l'hypoderme), avec pour conséquence une augmentation de la fragilité cutanée,
- une diminution quantitative et une altération fonctionnelle du tissu élastique responsable de la perte de l'élasticité cutanée,
- une discrète accentuation des rides d'expression⁵³.

.II.1.2 Modifications fonctionnelles⁵⁴

Les modifications cutanées liées à l'âge ont pour conséquences fonctionnelles :

- une desquamation ralenti (ichthyose simple) due à une diminution de la cohésion dermo-épidermique,
- une moins bonne cicatrisation des plaies, secondaire à la diminution du turn-over épidermique,
- une augmentation de la fonction barrière et une baisse de la clearance chimique (baisse de la microvascularisation dermique),
- diminution de l'activité mitotique.
- une diminution de certaines propriétés comme :
 - la perception sensorielle accompagnée d'une augmentation du risque de traumatisme,
 - la capacité de réponse immune, secondaire à la diminution du nombre de cellules de Langerhans et des cellules T, avec pour conséquence une diminution de la fréquence et de l'intensité des réactions d'hypersensibilité et une augmentation du risque de cancer cutané,
 - la capacité de réponse inflammatoire, secondaire à la diminution du nombre de mastocytes péri-vasculaires, de leur plus grande résistance à la dégranulation et à la diminution de l'étendue des plexus vasculaires superficiels,

- la thermorégulation, secondaire à la diminution du nombre de glandes sudorales, de la microvascularisation et de la graisse sous-cutanée avec majoration du risque d'hypothermie et de coup de chaleur, diminution de la production de sueur,
- la protection mécanique, secondaire à l'aplatissement de la jonction dermo-épidermique.

.II.1.3 Modifications structurales⁵⁴

Au niveau épidermique

- atrophie des couches épineuses,
- augmentation de la couche cornée par hypertrophie des cornéocytes,
- diminution du nombre de bourgeons papillaires,
- diminution du nombre des bourgeons papillaires,

Au niveau de la jonction dermo-épidermique

- aplatissement et élargissement des papilles (aplatissement de l'interface),
- diminution de la cohésion dermo-épidermique,
- duplication de la *lamina densa*.

Au niveau dermique

Des modifications importantes sont observées au niveau de la synthèse et de l'architecture du réseau de macromolécules.

- La modification des **fibres élastiques** constitue le premier témoin du vieillissement dermique. Elle correspond à une lyse élastique, c'est à dire une diminution du nombre et du diamètre des fibres élastiques qui sont souvent fragmentées.

Les fibres oxytalanes, composées uniquement de microfibrilles et caractéristiques du derme papillaire, subissent une lyse irrégulière, deviennent grêles, et n'atteignent plus la membrane basale, puis elles disparaissent. Au fur et à mesure que le vieillissement s'accroît, la bande papillaire devient large et désertique. Les fibres élastiques, constituées d'élastine et de microfibrilles, ainsi que les fibres élastiques matures deviennent de plus en plus dystrophiques, traduisant une réduction du squelette.

- La structure des **fibres de collagène** n'est pas modifiée par le vieillissement cutané mais les faisceaux apparaissent dissociés par une substance fondamentale abondante et deviennent grêles et désordonnés, surtout au niveau du derme papillaire.

Les fibres de collagène sembleraient se stabiliser et être plus résistantes à la dégradation enzymatique, peut-être en raison de leur entrecroisement.

- Le **fibroblaste** est une cellule clef du tissu conjonctif qui intervient dans la formation et la stabilisation des fibres élastiques, mais aussi dans leur dystrophie et leur lyse :

- par l'intermédiaire de son génome,

- par la sécrétion d'une métalloprotéase qui détruit la fibre élastique qu'il a édifiée,

- par la qualité et la quantité de ses sécrétions d'élastine et de glycoprotéines de structure,

- par son action sur le métabolisme des LDL (Low Density Lipoprotein) qui diminue avec l'âge, d'où accumulation de ces dernières dans l'interstitium, ce qui entraîne une diminution de l'élasticité des fibres élastiques et une augmentation de la vitesse de leur lyse.

La raréfaction des fibroblastes et leur perte de cohésion avec l'interstitium représente l'un des éléments fondamentaux du vieillissement cutané.

- La **microcirculation** est raréfiée et désorganisée, surtout au niveau des capillaires sous-épidermiques en raison de l'aplatissement de la jonction dermo-épidermique. Cependant les capillaires ne sont pas dilatés.
- La **substance fondamentale** qui contient des glycosaminoglycanes et des protéoglycanes serait diminuée, contrairement à ce qui se passe dans le vieillissement actinique. La fibronectine dermique est diminuée et le taux cutané de cholestérol et d'apoprotéine B (constituant majeur des LDL) est nettement augmenté.

.II.1.4 Modifications cellulaires

Des découvertes récentes montrent que les cultures cellulaires provenant de l'adulte produisent moins de facteur épidermique activant le thymocyte que celles provenant du nouveau-né et pouvant avoir des implications immunologiques et prolifératives pour le vieillissement cutané⁵⁵.

- **Les mélanocytes**

A partir de l'âge de 30 ans, le nombre de mélanocytes DOPA positif (contenant du 3,4 DihydroPhénylAlanine) diminue de 8 à 20% tous les dix ans aussi bien en peau insolaire qu'en peau non insolaire. Les études manquent pour préciser si ce phénomène est dû à une diminution réelle du nombre de mélanocytes ou à une perte de l'activité tyrosinase. Quoiqu'il en soit, la disparition du pigment mélanique réduit la protection naturelle de la peau aux UV⁵². La densité des mélanosomes dans les mélanocytes s'accroît avec l'âge ; ce fait peut-être expliqué par l'apparition des lentigo séniles en peau exposée. Inversement, le nombre de naevi diminue après l'âge de 40 ans et devient pratiquement nul après 80 ans.

- **Les cellules de Langerhans**

Le nombre et l'activité fonctionnelle des cellules de Langerhans sont diminués, surtout en peau insolaire. Cette constatation suggère l'existence de deux phénomènes indépendants mais qui pourraient être additionnels, l'un propre au vieillissement, l'autre en rapport avec l'exposition aux UV. Ce déficit immunitaire local favorise la survenue des cancers cutanés photo-induits.

.II.2 Le vieillissement cutané actinique ou «dermato-héliose»

Le vieillissement actinique survient sur les zones photoexposées et dépend de la qualité de la photoprotection naturelle du sujet et de la dose cumulée d'UV reçue. L'âge «solaire» est actuellement plus avancé que l'âge «chronologique».

Les facteurs extrinsèques, nutritionnels, hormonaux, toxiques et surtout climatiques (ultraviolets) jouent un rôle déterminant dans l'accélération des processus physiologiques du vieillissement. La responsabilité des radiations UV est importante : ce sont les effets cumulés et synergiques des UVB, des UVA et peut-être des infrarouges qui sont à l'origine du vieillissement actinique⁵⁶.

.II.2.1 Modifications cliniques^{54,57}

Les aspects cliniques réalisés sont le résultat de lésions épidermiques et de lésions dermiques souvent intriquées.

Lésions épidermiques

- L'**atrophie épidermique** touche surtout les avant-bras et le dos des mains. Elle résulte en grande partie de la sénescence vraie : l'épiderme aminci, transparent se laisse plisser sur un conjonctif lâche.
- L'**hypertrophie** et les dystrophies s'expriment dans les kératoses actiniques puis les carcinomes.
- Les **troubles pigmentaires** sont fréquents. Le *lentigo solaire*, tache pigmentée homogène, témoigne d'une hyperactivité du mélanocyte comme la *mélanose de Dubreuilh*. A l'inverse, l'hypomélanose idiopathique en goutte des membres inférieurs, plus fréquente chez la femme, est souvent le témoin d'une exposition intense. Il en est de même des cicatrices stellaires.
- La **maladie de Favre et Racouchot** ou élastoïdose à kystes et à comédons, se voit sur les régions temporales et paranasales. Anomalie épithéliale liée à l'élastose solaire, elle est caractérisée par des papules jaunâtres élastosiques associées à des kystes, des comédons et parfois une hypertrichose.
- Les **adénomes sébacés dits séniles** sont des hyperplasies des glandes sébacées, survenant après photoexposition naturelle prolongée.

Lésions dermiques

- L'**épaississement** de la peau et une **coloration jaunâtre** sont caractéristiques de plusieurs lésions dermiques telles que la nuque rhomboïdale, la peau citréine de Milian ou encore l'élastome diffus de Dubreuilh.
- Les **rides** des zones exposées sont profondes et ne disparaissent pas à l'étirement transversal.
- Les **télangiectasies** sont une dilatation des microvaisseaux induite par le soleil. Cette dilatation s'explique sans doute par des anomalies cellulaires pariétales, et la diminution de la contre-pression exercée sur leur paroi par le derme. L'une des caractéristiques cliniques du vieillissement micro-circulatoire cutané est la fragilité capillaire dont le purpura sénile et les angiomes représentent un aspect.

.II.2.2 Modifications structurales^{52, 53, 54}

Au niveau de l'épiderme

L'atrophie épithéliale est la marque du vieillissement chronologique mise en évidence par une couche basale aplatie et un amincissement épidermique. Sur la peau insolaée, l'acanthose est habituelle, marquée de foyers de dysplasie kératinocytaire. Ceux-ci sont les précurseurs des proliférations épidermiques.

Alors que le nombre de mélanocytes DOPA positif diminue avec l'âge, une prolifération localisée dans les zones insola es est responsable d'une pigmentation locale. Un trouble de transfert du pigment aux kératinocytes augmente l'hétérogénéité de la pigmentation.

Le nombre de cellules de Langerhans diminue nettement et les annexes épithéliales sont plus hypertrophiques qu'atrophiques.

Au niveau du derme

La matrice conjonctive est la cible principale du rayonnement solaire. **L'élastose solaire** est à ce titre caractéristique. Elle correspond à l'accumulation dermique d'un tissu élastique dystrophique et est responsable de la perte d'élasticité des téguments. Les fibres élastiques matures apparaissent nombreuses, épaisses, fragmentées et irrégulières, se fondant en une masse amorphe désorganisée ; le nombre de microfibrilles oxytalanes est fortement augmenté. Tout se passe comme si les UV stimulaient la synthèse d'un matériau amorphe anormal.

De plus, les fibres élastiques présentent des aspects de désintégration compatibles avec une lyse enzymatique. La présence de macrophages et de mastocytes au voisinage immédiat des fibres altérées, conforterait cette hypothèse.

L'élastose actinique s'associe à une **perte massive en collagène** : les fibres et les faisceaux de collagène matures sont diminués alors que la proportion de collagène soluble augmente. Leur dégradation dite basophile, serait secondaire à l'action d'enzymes protéolytiques présentes au sein des cellules composant l'infiltrat inflammatoire dermique lié à l'action des UVB sur la peau (mastocytes et neutrophiles polynucléaires).

Le collagène de type III augmente par rapport au collagène de type I et certains pontages sont de plus en plus fréquents.

La quantité de **protéoglycanes** et **glycosaminoglycanes** est augmentée dans des proportions rappelant celles de la peau foetale alors que l'évolution chronobiologique naturelle va vers leur franche diminution.

La microcirculation est altérée : les capillaires apparaissent raréfiés, dilatés et tortueux. Il existe un épaissement marqué de la paroi des veinules post-capillaires, secondaire à des dépôts concentriques au niveau de leur membrane basale.

.II.2.3 Modifications cellulaires

Les **fibroblastes** sont nombreux, volumineux et fonctionnellement actifs de même que les **mastocytes** partiellement dégranulés. Ils témoignent par leur présence de phénomènes inflammatoires chroniques.

Les kératinocytes et les fibroblastes dermiques provenant des zones photoexposées ont une durée de vie plus courte. Cette diminution est parallèle à l'âge et à la sévérité du vieillissement actinique cliniquement apparent.

En résumé, les lésions de l'épiderme vont dans le sens d'une hyperactivité pathologique. Pour le derme, les anomalies constatées ne relèvent pas d'une dégénérescence des tissus, mais d'un phénomène actif de type inflammatoire avec néosynthèse anormale et / ou activation de phénomènes cataboliques.

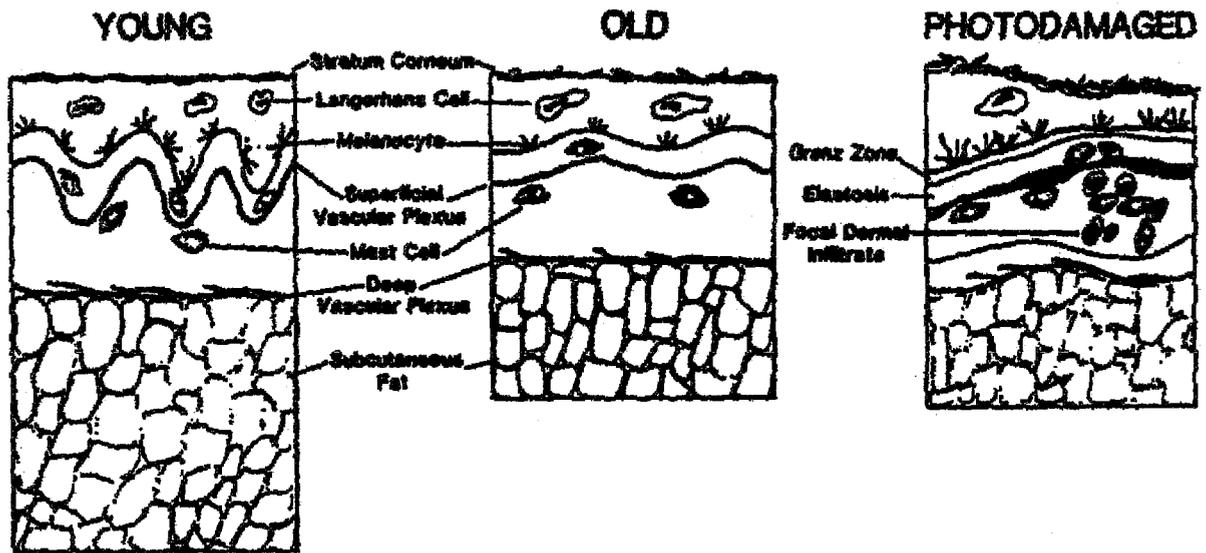
.II.3 Comparaison entre le chrono et le photovieillissement

	chronovieillissement	photovieillissement
aspects cliniques	perte d'élasticité rides de faibles profondeurs	nodules, jaunissement, rougeurs, rides profondes, perte importante d'élasticité
épaisseur cutanée	↓	↑
fibroblastes	inactifs	actifs
cellules inflammatoires	normalement absent	augmentation
mastocytes	↓	↑
collagène : contenu	↓	↓
solubilité	↓	↓
synthèse	↓	?
fibres	épaississement	dégénération basophile
élastine : contenu	↓ après 70 ans	↑ importante
fibres	désintégration	anormales
microfibres	↓	↑ au début
GAG et PG	faible ↓	↑ importante
microvascularisation	perte modérée	perte importante , anormale et télangiectasie

Tableau 4 : Comparaison entre le chrono et photovieillissement

Les modifications physiologiques observées au cours du vieillissement et photovieillissement cutané prédominent au niveau du derme. Elles se caractérisent par trois aspects majeurs : la survenue d'altérations des macromolécules dermiques, l'appauvrissement de la microcirculation, et l'aplatissement de la jonction dermo-épidermique.

Les modifications histologiques sont illustrées par le graphe ci-dessous :



Grappe 1 : Modifications histologiques de la peau au cours du temps⁶³

.III DEMARCHE EXPERIMENTALE

Comme nous l'avons dit en introduction de cette deuxième partie, le but de nos travaux expérimentaux était d'essayer de mettre en évidence des paramètres fluorimétriques et biophysiques liés au vieillissement intrinsèque ou aux facteurs extrinsèques, notamment à la photoexposition.

En effet, Leffell⁴ et son équipe ont montré en 1988 que des rapports de pics de fluorescence semblaient être reliés au photovieillissement. Puis Odetti⁵ et coll. ont travaillé *ex-vivo* sur la fluorescence du collagène et ont mis en évidence une augmentation de l'intensité de fluorescence avec l'âge. Ces premières observations nous ont donc mené à réaliser nos propres expériences et à soulever d'autres problèmes comme l'interaction de la lumière avec les tissus cutanés.

En effet, nous avons vu dans la première partie l'importance des propriétés optiques et de la couleur de la peau dans l'absorption des rayons lumineux. De nombreuses équipes⁴⁶ de recherche travaillant sur l'autofluorescence se sont intéressées à l'étude de ces propriétés, afin d'optimiser l'évaluation de la photoluminescence et de sélectionner uniquement la fluorescence intrinsèque. Les équipes de Zeng et Mac Aulay^{11,18} ont beaucoup étudié le problème et ont modélisé la propagation de la lumière dans la peau afin d'essayer d'obtenir des spectres de fluorescence pure. Ils ont montré que la réflexion diffuse pouvait être utilisée en première approximation, comme facteur de correction des spectres d'autofluorescence *in vivo*. Nous avons repris la correction,

- dans un premier temps, en travaillant *in vitro*, sur un modèle incomplet de peau reconstruite, l'Episkin. Cette expérience nous a permis d'analyser la fluorescence du modèle couche par couche et de vérifier le bien-fondé des corrections proposées.
- dans un deuxième temps, *in vivo* afin d'analyser la fluorescence intrinsèque de la peau chez l'homme et de déterminer des paramètres biophysiques, marqueurs du vieillissement et/ou du photovieillissement.

In vivo, nous avons aussi pris en compte les différences de phototypes et d'exposition solaire afin d'essayer de comprendre le photovieillissement. Pour cela, nous avons effectué des mesures de couleur de la peau pour chaque individu, et confronté statistiquement les paramètres de couleur de peau aux paramètres de fluorimétrie.

.IV MATERIELS ET METHODES

Nous présentons ici la liste et les caractéristiques du matériel utilisé pour la mise au point de la méthode ainsi que pour l'étude *in vivo*. Nous expliquons aussi les méthodes et les conditions de mesures employées.

.IV.1 Appareils d'éclairage

Sources lumineuses

Une **lampe Xénon 75 W** (Osram) est couplée à un monochromateur HR 250 (Jobin et Yvon) équipé d'un réseau 1200 traits/mm, blazé à 330 nm. La résolution et le flux lumineux sont réglés par la largeur des fentes d'entrée et de sortie du monochromateur.

Un **laser Hélium-Cadmium** Omnichrome (séries 56, modèle 2056-8M/25M) émettant à deux longueurs d'onde, 325 nm et 442 nm a été utilisé en complément. L'émission dans le visible est coupée à l'aide d'un filtre interférentiel Oriel centré à 327.4 nm avec une largeur de bande de 9,5 nm d'une transmission maximale de 35 %. La puissance du laser est de 14 mW en UVA.

Fibres optiques et tête de mesure

Le flux lumineux est guidé par des **fibres optiques silice/silice** Schott. Les câbles sont constitués de brins de 100 microns de diamètre de coeur. Une première fibre (diamètre 4 mm) est utilisée pour l'éclairage et relie la source d'excitation à la tête de mesure. Du côté du monochromateur, son extrémité est rectangulaire (2*6 mm).

La deuxième fibre optique (3 mm de diamètre) détecte l'émission lumineuse et la guide jusqu'à l'OFA (Optical Fiber Adapter).

La tête de mesure est donc constituée par ces deux fibres optiques fixées à un support métallique imposant un éclairage normal à la peau et une détection à 30° par rapport à la normale afin d'éliminer la réflexion spéculaire. La fibre d'éclairage irradie une zone circulaire de 1 cm². L'extrémité des fibres d'éclairage et de détection sont à environ 1 cm de la surface cutanée.

.IV.2 Détecteur

L'OMA (Optical Multichannel Analyser, Princeton Instruments Inc.) est constitué d'un OFA équipé d'un porte filtre, d'un spectrographe Chromex 250 IS/SM et d'une caméra TEA/CCD (Coupled Charged Detector, Princeton Instruments Inc.). L'ensemble est piloté par un P.C. et un logiciel spécifique (Winspec 4.2, Princeton Instruments, Inc.).

L'OFA collecte la lumière et optimise le couplage entre la fibre optique et le spectrographe. Il a été modifié pour recevoir des filtres.

Le **spectrographe** possède une fente d'entrée réglable et est équipé d'une tourelle à 3 réseaux interchangeables. Après divers essais menés dans les conditions de notre étude, le réseau 300 traits a été retenu et la résolution est alors de 0.2 nm.

La **caméra CCD** est refroidie à - 40°C par effet Peltier, afin de réduire le bruit électronique de la caméra. Une pression d'environ 10 mTorr est nécessaire pour empêcher la condensation sur la fenêtre de détection. Celle-ci, d'une surface de 1100*350 pixels est recouverte d'une couche de lumogène qui la protège d'une exposition excessive aux radiations UV.

Deux **filtres UV passe-haut (Cokin et Alpha)** éliminent la «lumière parasite» due aux «stray light» du spectrographe.

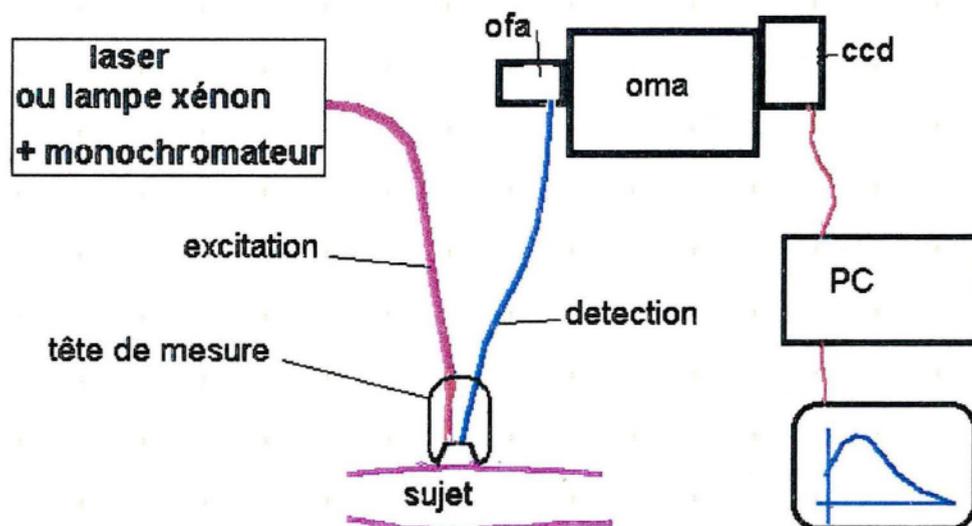


Figure 26 : Schéma de l'appareillage

.IV.3 Méthodes de mesure de la fluorescence et de la réflexion diffuse

Conditions générales de mesure

La caméra CCD analyse la lumière émise sur la totalité de la fenêtre de détection. Le réseau (300 traits) est centré à des longueurs d'onde différentes selon les conditions d'éclairage : à 510 nm pour les longueurs d'onde d'excitation allant de 325 à 355 nm et 530 nm pour l'excitation à 360 et 370 nm.

- Les fentes d'entrée et de sortie du **monochromateur** associé à la lampe Xénon sont fixées à 0,7 mm, assurant une largeur spectrale de 2 nm.
- Nous avons soustrait automatiquement le **bruit de fond électronique** du système sur chaque spectre.

La réflexion diffuse

La réflexion diffuse des tissus est analysée de 275 à 700 nm. Ces mesures sont effectuées avec les deux centrages du réseau retenus, la même lampe Xénon et la même tête de mesure afin de pouvoir corriger les spectres de fluorescence à partir de données enregistrées dans les mêmes conditions.

Le temps d'acquisition a été fixé à 40 ms et la largeur de la fente du spectrographe à 20 μm (résolution 0.2 nm)

La fluorescence

Pour les mesures *in vitro* sur Episkin comme pour les mesures *in vivo*, les mêmes longueurs d'onde d'excitation (λ_{exc}) ont été explorées : 325, 340, 345, 350, 355, 360 et 370 nm. Ce choix correspond aux longueurs d'onde d'absorption des macromolécules présentes dans le derme. Les paramètres mesurés sont les intensités maximales (I en nombre de coups) et les longueurs d'onde correspondants au maximum d'intensité (L en nm) pour chaque λ_{exc} (I325...I370 et L325...L370).

Le temps d'acquisition est de 5 secondes et la largeur de la fente d'entrée de 300 μm . En effet, *In vivo* comme *in vitro*, l'émission de fluorescence est très faible et requiert des conditions de détection optimales afin d'améliorer le rapport signal sur bruit.

Cette étude a nécessité l'utilisation de filtres UV passe-haut, du filtre Alpa pour des longueurs d'onde d'éclairage de 325 à 355 nm et du filtre Cokin pour 360 et 370 nm.

.IV.4 Le chromamètre® Minolta CR200

Le chromamètre® CR200 Minolta permet de mesurer la luminosité (L^*), la rougeur (a^*) et la pigmentation (b^*) cutanées, exprimées en unités arbitraires selon les normes C.I.E. (Commission Internationale de l'Eclairage). La lumière réfléchiée est analysée selon trois axes de couleurs qui définissent un système de coordonnées tridimensionnelles normalisé, le système $L^*a^*b^*$ ou «volume de couleur».

Le colorimètre enregistre trois mesures consécutives de la couleur de la peau. La mesure est répétée trois fois sur chaque zone afin d'obtenir une valeur moyenne.

Les valeurs de L^* et b^* reportées sur le graphe $L^* = f(b^*)$ permettent de calculer l'angle de classe appelé ITA (Angle de Typologie Individuel) :

$$ITA = [\arctan ((L^* - 50) / b^*)] 180 / \pi .$$

Il détermine la classe typologique à laquelle appartient le sujet : $ITA > 55^\circ$: peau très claire ; $41^\circ < ITA < 55^\circ$: peau claire ; $28^\circ < ITA < 41^\circ$: peau intermédiaire; $10^\circ < ITA < 28^\circ$: peau mate ; $-30^\circ < ITA < 10^\circ$: peau brune ; et $ITA < -30^\circ$: peau noire.

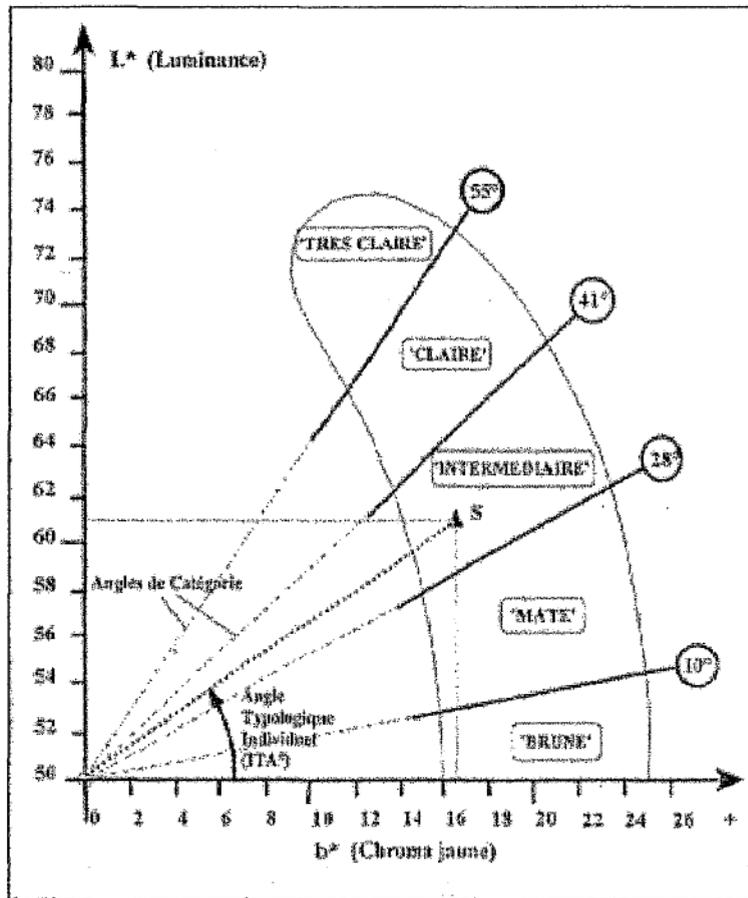


Figure 27 : Typologie de couleur de peau : plan L^*b^{*58}

.V ETUDE IN VITRO

.V.1 Matériel biologique

L'Episkin est un épiderme humain reconstitué reposant sur une matrice de collagène humain, l'ensemble est fixé au fond d'une nacelle à l'aide d'un joint torique (procédé IMEDEX).

La matrice de collagène tient lieu de substitut dermique : il s'agit d'une sous-couche fibreuse et poreuse de collagène de type I et III qui joue le rôle de support physiologique et permet la diffusion des éléments nutritifs jusqu'aux cellules. Elle est recouverte par un film de collagène de type IV plus dense, qui favorise l'ancrage des kératinocytes, la formation de la membrane basale, la croissance et la différenciation cellulaire. La culture de kératinocytes humains sur le substrat collagénique permet d'obtenir *in vitro*, à l'interface air-liquide, un épiderme stratifié et différencié. A la jonction dermo-épidermique, on observe une couche de cellules basales orientées, puis en remontant, plusieurs assises de cellules épineuses et granuleuses et enfin un S.C. bien développé assurant une fonction barrière. Les kératinocytes sont issus d'une peau d'adulte et ensemencés au 2ème passage⁵⁹. Le développement de l'Episkin nécessite 13 jours de culture.

Pour les mesures, l'unité d'Episkin est démontée, la nacelle et le joint torique retirés afin d'effectuer les mesures dans les conditions de l'étude *in vivo*, la culture analysée est donc positionnée directement sur la tête de mesure. Nous avons mesuré et enregistré les spectres de fluorescence de 5 episkins dans leur intégralité, de 5 matrices de collagène seules et de 2 épidermes seuls. La séparation a été effectuée par simple décollement des deux couches à l'aide d'une lame de rasoir.

.V.2 Résultats et discussion

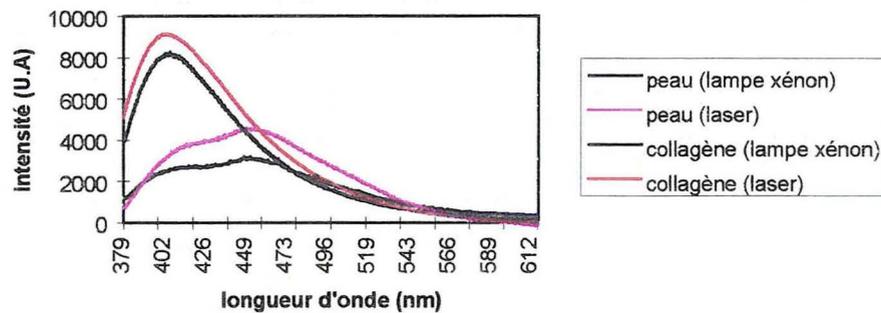
.V.2.1 Importance des conditions d'excitation

Il est nécessaire que l'énergie de l'excitation soit suffisante pour pouvoir exciter la totalité des constituants absorbant pour ces longueurs d'onde et ne pas être absorbée uniquement par l'épiderme. L'excitation avec le laser est environ 200 fois plus énergétique qu'avec la lampe xénon. De ce fait, nous avons comparé les spectres de

fluorescence pour le collagène et la peau (Cf. Etude *in vivo*) à 325 nm. Le graphe 2 ne tient pas compte des intensités réelles d'émission, de plus les conditions d'acquisition (temps et ouverture de la fente) étaient nécessairement différentes. Malgré cela, le graphe montre bien la similitude de la forme des spectres et de la position des maximums d'émission.

Ceci justifie l'utilisation par la suite de la lampe xénon comme source lumineuse et valide le choix de la résolution à l'excitation (2 nm). La faible énergie procurée par cette source est suffisante pour atteindre le derme.

Spectres de fluorescence obtenus par excitation à 325 nm à l'aide de la lampe xénon et du laser



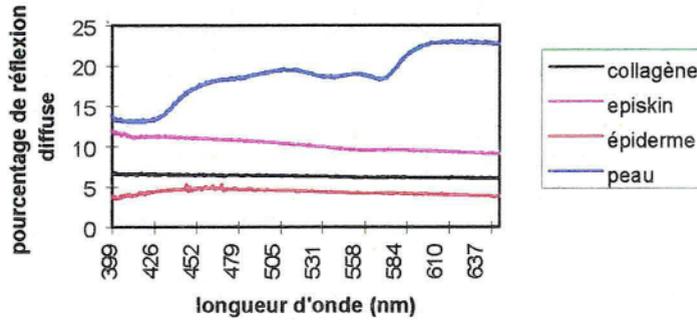
Graphe 2

V.2.2 Etude de la réflexion diffuse

Cette étude a été réalisée à partir du collagène et de l'épiderme issus du même échantillon d'Episkin. Les faibles variations des spectres de réflexion diffuse de l'Episkin et de l'épiderme ne modifient que peu leur spectre de fluorescence (Cf. graphes 3,4,5). Le collagène possède un spectre de réflexion diffuse plat n'entraînant pas de modification de la courbe d'émission de fluorescence (graphe 4).

Le pourcentage de réflexion est lié au volume de diffusion : les constituants de l'épiderme provoquent principalement une diffusion de MIE, car les cornéocytes ont une taille proche de la longueur d'onde alors que les macromolécules du derme sont surtout à l'origine de la diffusion de Rayleigh. Cette remarque est surtout bien illustrée par la réflexion *In vivo* où la présence de tissus profonds jouent un grand rôle.

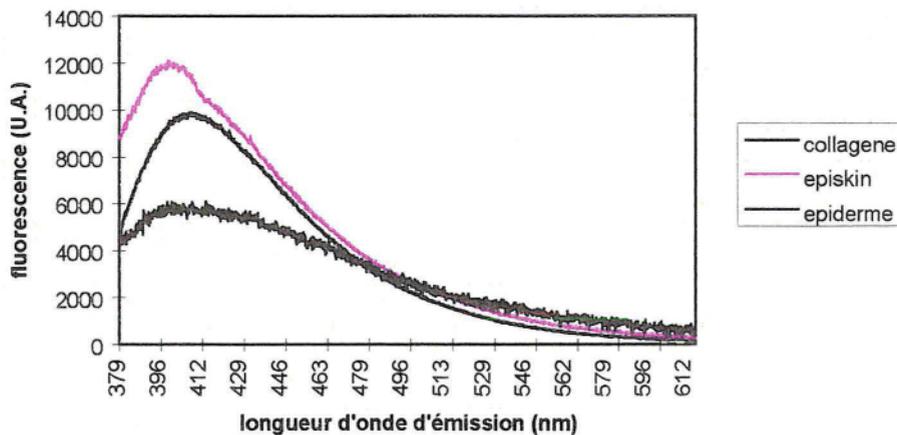
Spectres de réflexion diffuse



Grappe 3

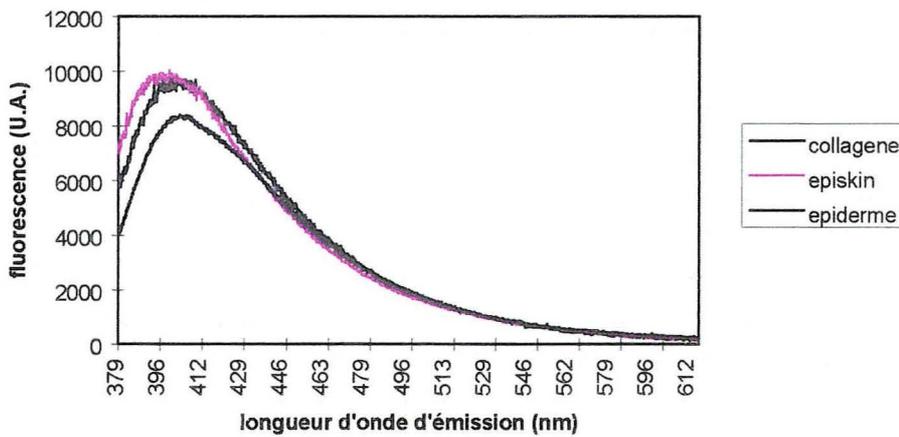
Les graphes 4 et 5 représentent la fluorescence en surface (épiderme) et en profondeur (collagène) des constituants de l'Episkin. Les intensités sont normées de façon à pouvoir comparer les formes des différents spectres. En réalité, la fluorescence de l'épiderme est deux fois plus faible. Avant correction, l'episkin et l'épiderme fluorescent à la même longueur d'onde et ont une courbe spectrale large due à la réflexion diffuse provoquée par l'épiderme. La contribution du derme n'apparaît que comme un épaulement sur le spectre d'Episkin. Après correction par la réflexion diffuse, le spectre de l'Episkin se rapproche de celui du collagène corrigé ou non alors que l'épiderme garde un épaulement. Nous pouvons supposer que lors de la séparation du collagène de l'épiderme, des traces de collagène IV sont restées accrochées à l'épiderme expliquant ainsi l'allure générale du spectre de fluorescence de l'épiderme malgré la correction.

Spectres de fluorescence non corrigés : $\lambda_{exc}=325$ nm



Grappe 4

Spectres de fluorescence corrigés : $\lambda_{exc}=325$ nm

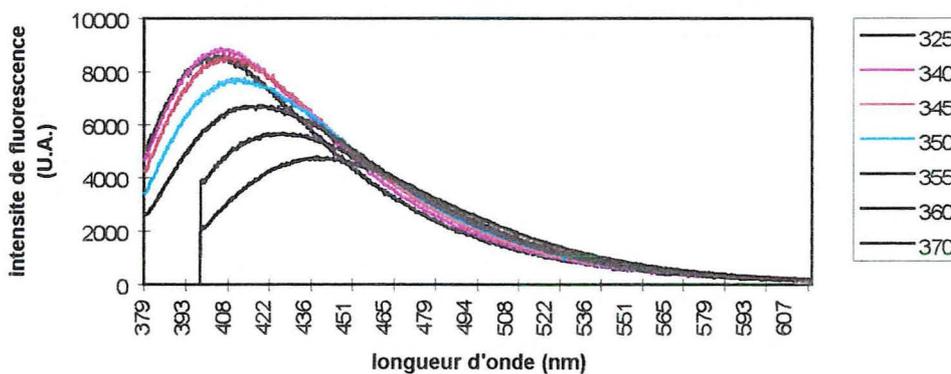


Grappe 5

.V.2.3 Etude de la fluorescence

Ces spectres sont ici présentés normés uniquement par rapport à l'énergie d'excitation. Pour des excitations variant de 325 à 345 nm, la position et l'intensité maximale de la fluorescence ne varient guère. A partir de 350 nm, l'intensité de l'émission décroît et la fluorescence se décale vers les grandes longueurs d'onde suggérant la sollicitation d'autres molécules chimiques fluorescent à de plus grande longueur d'onde. Nous constatons que l'émission maximale du collagène en milieu solide se situe beaucoup plus loin dans le spectre vers 405 nm (Grappe 6) alors que le collagène en solution fluoresce vers 390 nm^{4,60}.

Fluorescence du collagène pour plusieurs longueurs d'onde d'excitation



Grappe 6

En conclusion, ces premiers résultats bien qu'obtenus sur un modèle de peau incomplet démontrent :

- la validité de la correction à partir du spectre de réflexion diffuse appliquée au spectre de fluorescence,
- le poids de l'épiderme dans la réponse en fluorescence des couches profondes,
- la variabilité des molécules sollicitées et la variabilité des environnements d'une même molécule.

.VI ETUDE IN VIVO

.VI.1 Méthode

L'étude a été réalisée sur un panel de 48 sujets caucasiens des deux sexes, volontaires et exempts de toute pathologie cutanée :

- un groupe de 24 personnes d'âge moyen 23,7 +/- 1,8 ans, dit «jeune»,
- un groupe de 24 personnes d'âge moyen 55,5 +/- 2,4 ans, dit «âgé».

Toutes les mesures sont effectuées au niveau de trois zones planes, de couleur homogène, sans nevis, éphélides, acné ou cicatrices. Chaque zone est nettoyée à l'alcool avant les mesures :

- z1 = face interne de l'avant-bras droit,
- z2 = face externe de l'avant bras droit,
- z3 = face interne du biceps droit.

Un support spécial, sur lequel s'emboîtent les têtes de mesures assure un repositionnement parfait. Il est retiré lors de l'évaluation de la couleur de la peau.

Tests statistiques :

Nous avons réalisé des tests statistiques sur l'ensemble des paramètres biophysiques :

- l'intensité maximale pour chaque longueur d'onde d'excitation (I325,..., I340)
- la longueur d'onde d'émission au maximum d'intensité (L325,..., L370)
- la largeur à mi-hauteur du pic de fluorescence en nm (D325,..., D370)
- les rapports d'intensités maximales (I325340, I325345,..., I360370)
- les rapports des largeurs à mi-hauteur (D325340,..., D360370)
- les paramètres représentatifs de la couleurs de peau (L, a, b, ITA)

Seules les paramètres présentant des différences statistiquement significatives seront citées dans la ligne «conclusion» des divers tableaux qui suivent.

Remarque : les spectres non corrigés de 325 à 350 nm présentent deux «bosses», nous avons relevé la position et l'intensité de l'épaule (L3251 ; I3251 ...etc.) et du maximum (L3252 ; I3252 ...etc.) et fait le rapport des intensités maximales (I325/I340 ...) (Cf. graphe 8).

Dans un premier temps, une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (âge et zone) a été effectuée sur tous les paramètres biophysiques. L'âge est un facteur à deux niveaux (j = jeunes, v = vieux) tandis que la zone est à trois niveaux (z1, z2, z3). Le facteur sujet est un facteur emboîté et est considéré comme une variable à effet aléatoire. De plus cette analyse a pris en compte les interactions âge*zone. Le test effectué après l'ANOVA est un test de contrastes.

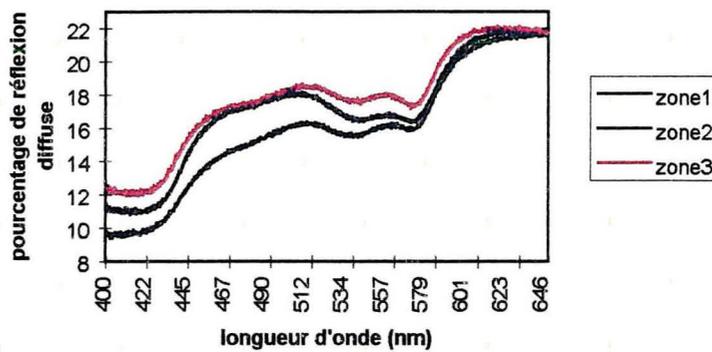
Dans un second temps, une analyse en composantes principales (ACP) a été menée sur l'ensemble des variables quantitatives dans le but de sélectionner les paramètres les plus pertinents pour chaque zone. C'est une méthode statistique essentiellement descriptive. Afin d'essayer de modéliser le facteur âge mais aussi l'ITA en fonction des autres paramètres biophysiques, nous avons utilisé une PLS (Partial Least Square).

.VI.2 Résultats

.VI.2.1 Illustrations spectrales : mesure de réflexion diffuse

Les spectres représentés ci-dessous ont été mesurés sur un sujet jeune. La zone exposée au soleil possède une réflexion diffuse plus faible due à la présence plus importante de mélanine. La forme de ces courbes est aussi marquée par l'absorption de l'hémoglobine de 520 à 580 nm et autour de 430 nm (absorption de Soret).

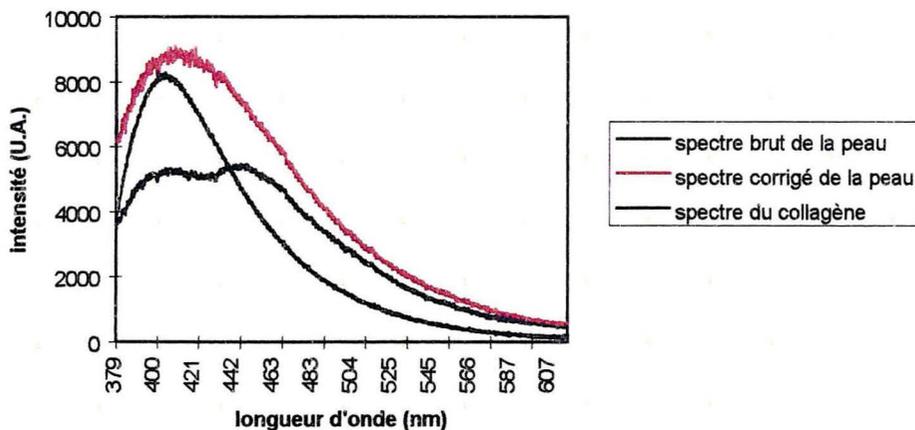
Réflexion diffuse de la peau



Graphe 7

Le spectre de fluorescence de la peau (Cf. graphe 8) possède une allure large avec un creux situé à 430 nm. Cette allure est identique à celle observée par Lefell⁴. La correction par le spectre de réflexion diffuse modifie le spectre et sa forme se rapproche de celle obtenue sur le collagène d'Episkin ; sa largeur reste toute fois plus importante.

Spectres à 325 nm d'excitation

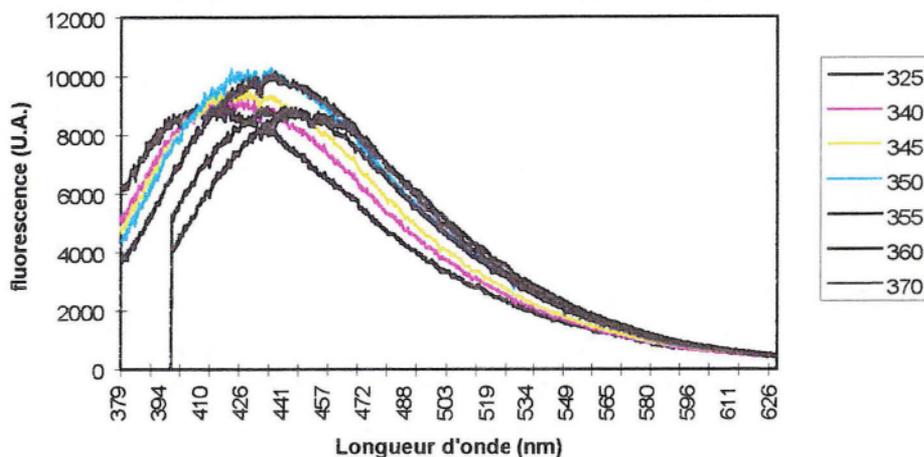


Graphe 8

La correction apportée par la réflexion diffuse permet de lisser les courbes spectrales et de diminuer l'effet du sang et de la pigmentation sans les déplacer.

Le graphe 9 montre que la forme des spectres de fluorescence corrigés est indépendante de la longueur d'onde d'excitation mais que ceux-ci se décalent progressivement vers les grandes longueurs d'onde avec l'émission, de la même façon que pour le collagène *in vitro*.

Spectres de fluorescence de la peau corrigés pour plusieurs longueurs d'onde d'excitation



Graphe 9

.VI.2.2 Analyse des paramètres biophysiques

.VI.2.2.1 Spectres corrigés de la réflexion diffuse

Les spectres présentés ainsi que les valeurs étudiées résultent de la correction des spectres bruts enregistrés par deux autres spectres selon le principe suivant :
spectre brut / spectre de réflexion diffuse / spectre de transmission du filtre.

Les paramètres ne présentant pas d'interaction âge*zone sont les suivants :

- effet de la zone

variable	325	340	345	350	355	370	D325350	
	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)	(U.A.)	(nm)	(nm)	
moyenne z1	8481 ± 342	8165 ± 358	8649 ± 353	8702 ± 371	8638 ± 370	448.1 ± 0.8	1.016 ± 0.009	
± sem z2	5939 ± 194	5756 ± 259	5865 ± 233	6087 ± 235	6104 ± 243	446.2 ± 0.9	1.021 ± 0.009	
z3	10858 ± 670	11338 ± 766	11255 ± 852	11309 ± 819	11196 ± 819	447.9 ± 0.8	1.000 ± 0.009	
Pr	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.039	
conclusion	z1≠z2 ≠z3		z1≠z2 ≠z3		z1≠z2 ≠z3		z1≠z2 ≠z3	z1≠z3; z2≠z3; z2≠z3; z1=z3; z1=z3

Tableau 5 : Moyenne, écart à la moyenne (sem), risque d'erreur (Pr) et interprétation des paramètres ayant un effet significatif sur le facteur zone

Les intensités maximales, pour les excitations allant de 325 nm à 355 nm, présentent systématiquement des différences entre les trois zones. Ces valeurs sont d'autant plus importantes (forte intensité de fluorescence) que les zones sont claires donc moins exposées au soleil ($I_{z3} > I_{z1} > I_{z2}$) et ceci malgré les corrections d'absorption faites. La position du maximum d'émission L370 est difficilement exploitable en raison de sa faible variation et de l'incertitude d'environ 1 nm sur son évaluation.

• effet de l'âge

variable	L325	L345	L350	L355	D345350	D345355	D345360
	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)			
moyenne jeune	414.7±0.6	426.5±0.8	432.6±0.7	436.7±0.6	0.997±0.009	1.006±0.007	1.019±0.007
±sem «âgé»	416.8±0.9	432.0±1.0	435.9±0.8	438.9±0.8	1.017±0.007	1.019±0.007	1.042±0.01
Pr	0.016	0.000	0.001	0.014	0.006	0.030	0.013

Tableau 6 : Moyenne, écart à la moyenne (sem) et risque d'erreur (Pr) des paramètres ayant un effet significatif sur le facteur âge

Le tableau 6 nous montre que le groupe dit «âgé», quelque soit le paramètre, présente des valeurs plus élevées que le groupe des jeunes. Les maxima d'intensité de fluorescence sont décalés vers les grandes longueurs d'onde avec l'âge (≈ 3 nm), même si cette différence n'est pas toujours significative (L340, L360 et L370), mais aussi avec la longueur d'onde d'excitation. Les largeurs à mi-hauteur sont plus faibles vers les grandes longueurs d'onde (D350 à D370), ce qui explique l'augmentation des rapports de ces mêmes largeurs à D345. De plus, leur évolution n'est pas semblable dans les deux groupes : le groupe dit «âgé» présente des diminutions de largeur plus importantes (Figure 28).

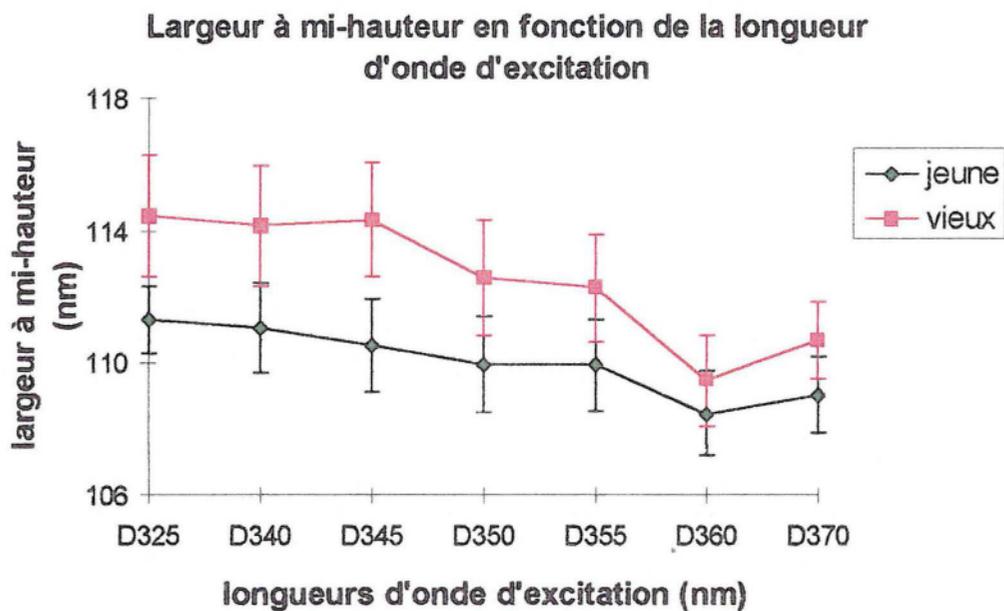


Figure 28

Ces paramètres présentent une interaction âge*zone :

moyenne ± sem				moyenne ± sem			
variable	zone	jeune	«âgé»	variable	zone	jeune	«âgé»
L340 (nm)	z1	421.7 ± 0.9	428.4 ± 1.0	D355 (nm)	z1	108.7 ± 1.1	114.0 ± 1.4
	z2	422.6 ± 1.0	426.9 ± 1.2		z2	110.6 ± 1.5	110.4 ± 1.8
	z3	421.9 ± 0.9	425.3 ± 1.0		z3	110.6 ± 1.5	112.4 ± 1.7
D350 (nm)	z1	109.9 ± 1.2	114.3 ± 1.5	D355360	z1	0.996 ± 0.006	1.029 ± 0.010
	z2	111.7 ± 1.4	109.9 ± 2.1		z2	1.014 ± 0.005	1.018 ± 0.011
	z3	111.3 ± 1.8	113.5 ± 1.6		z3	1.032 ± 0.009	1.022 ± 0.008

Tableau 7 : Moyenne et écart à la moyenne des paramètres présentant une interaction âge*zone

Chez les jeunes, aucune variation n'est notée en fonction de la zone et donc de la photoexposition (Cf. Tableau 8). En ce qui concerne le groupe dit "âgé", L340 est plus élevé au niveau de la zone 1 de 3 nm par rapport à la zone 3, mais z2 est équivalent à z1 et z3. L'observation de telles différences est difficilement interprétable compte tenu du faible écart et de l'incertitude sur la détermination des paramètres. Par contre, les

largeurs à mi-hauteur se distinguent bien entre z1 et z2 alors que pour z3, elles prennent des valeurs intermédiaires.

variable	L340 (nm)	D350 (nm)	D355 (nm)	D355360 (nm)
Pr	0.045	0.008	0.005	0.038
conclusion jeune	NS	NS	NS	$z1 \neq z3; z1 = z2; z2 = z3$
«âgé»	$z1 \neq z3; z1 = z2; z2 = z3$	$z1 \neq z2; z1 = z3; z2 = z3$		NS
conclusion z1	$j \neq v$	NS	NS	NS

Tableau 8 : Probabilité du risque d'erreur et interprétation des résultats de l'interaction âge*zone

.VI.2.2.2 Spectres non corrigés de la réflexion diffuse

Il s'agit ici des spectres dits «sans correction» (spectres bruts /spectre de transmission du filtre). Nous avons étudié les mêmes paramètres dans le but d'essayer de caractériser le photovieillessement ou le vieillissement de l'épiderme et surtout de vérifier si les résultats obtenus sur ces spectres ne s'interprétaient que par la réflexion diffuse sans qu'aucun autre paramètre ne puisse être utilisé.

Les paramètres ne présentant pas d'interaction âge*zone sont les suivants :

- effet de la zone

variable	L3251 (nm)	L3451 (nm)	L3452 (nm)	L3501 (nm)	L3502 (nm)	L370 (nm)	13501 (U.A.)
moyenne z1	411.8 ± 0.4	415.1 ± 0.3	453.2 ± 0.4	415.8 ± 0.4	453.9 ± 0.5	462.0 ± 0.4	3500 ± 184
± sem z2	413.5 ± 0.3	416.2 ± 0.3	452.4 ± 0.7	416.4 ± 0.4	453.8 ± 0.7	461.7 ± 0.8	1930 ± 137
z3	411.6 ± 0.4	415.2 ± 0.2	451.9 ± 0.5	415.2 ± 0.3	452.6 ± 0.5	460.6 ± 0.6	4598 ± 283
Pr	0.000	0.000	0.030	0.008	0.018	0.024	0.000
conclusion	$z1 < z2; z3 < z2$	$z1 < z2; z3 < z2$	$z1 > z3$	$z2 > z3$	$z1 > z3; z2 > z3$	$z1 > z3; z2 > z3$	$z3 > z1 > z2$

Tableau 9 : Paramètres biophysiques non corrigés de la réflexion diffuse ayant un effet zone

Au niveau de l'épaule, les maxima d'émission pour les zones 1 et 3 se situent en général en dessous des maxima pour la zone 2. Par contre, seuls les paramètres L3452 et L3502 différencient les zones 1 et 2 de la zone 3 (décalage vers les grandes λ avec la photoexposition).

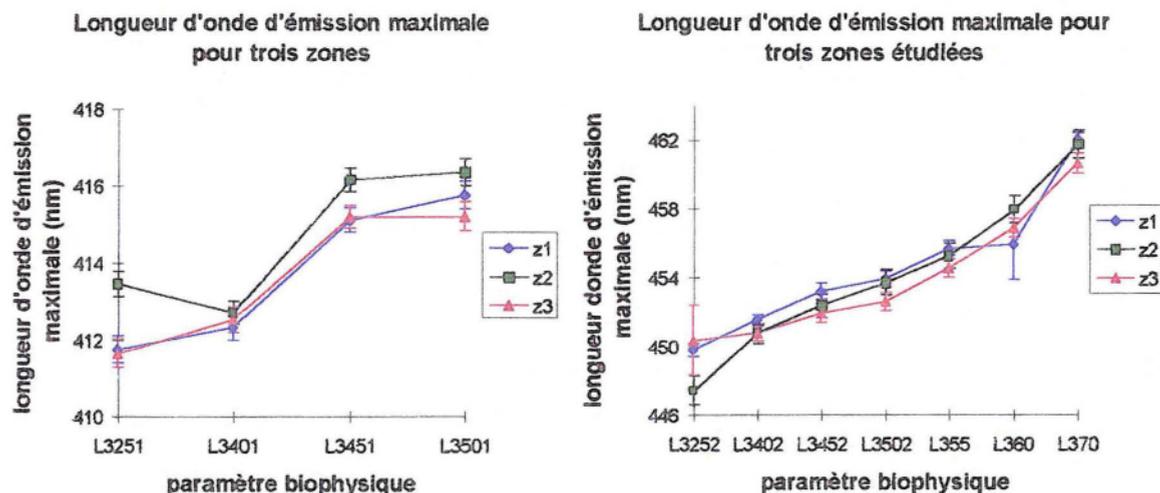


Figure 29

Logiquement, nous retrouvons comme pour les spectres corrigés des intensités maximales supérieures sur z3, z1 puis z2 (Cf. Tableau 14).

variable	l325340	l325345	l325370	l340350	l340360	l340370	l345350	l345360	l345370	l360370
moyenne z1	0.936 ± 0.009	0.886 ± 0.010	0.931 ± 0.101	0.919 ± 0.008	1.051 ± 0.129	1.004 ± 0.118	0.971 ± 0.005	1.112 ± 0.138	1.062 ± 0.126	0.962 ± 0.009
± sem z2	0.977 ± 0.009	0.929 ± 0.013	0.898 ± 0.114	0.888 ± 0.013	0.998 ± 0.128	0.928 ± 0.126	0.936 ± 0.014	1.053 ± 0.136	0.979 ± 0.134	0.923 ± 0.012
z3	0.938 ± 0.009	0.905 ± 0.016	0.977 ± 0.117	0.938 ± 0.014	1.052 ± 0.117	1.044 ± 0.127	0.975 ± 0.009	1.102 ± 0.126	1.092 ± 0.137	0.991 ± 0.021
Pr	0.000	0.033	0.002	0.003	0.024	0.000	0.004	0.032	0.000	0.002
conclusion	z1 < z2 ; z2 > z3		z1 < z3 ; z2 < z3		z1 > z2 ; z3 > z2		z1 > z2 ; z3 > z2		z1 > z2 ; z3 > z2	

Tableau 10 : Paramètres biophysiques non corrigés de la réflexion diffuse ayant un effet zone

Les rapports ci-dessus sont calculés sur les maxima d'intensité de fluorescence. De 325 à 350 nm, la valeur du maximum est prise sur le pic principal et non sur l'épaulement. Ils traduisent l'évolution des courbes pour les trois zones.

Ces paramètres semblent avoir une meilleure sensibilité pour les longueurs d'onde 325, 340 et 345 nm (Cf. Figure 29). Malgré l'effet zone observé sur ces paramètres issus de spectres non corrigés, nous ne pouvons pas en tirer des informations plus précises. Nous constatons que la plupart de ces rapports ont une valeur non différente de 1, sauf pour les rapports d'intensité de fluorescence de pics possédant chacun un épaulement. Ceci traduit simplement le déplacement du creux d'absorbance de l'hémoglobine dans la bande de fluorescence du chromophore sollicité. Le seul rapport à faire exception est celui concernant les pics à 360 et 370 nm.

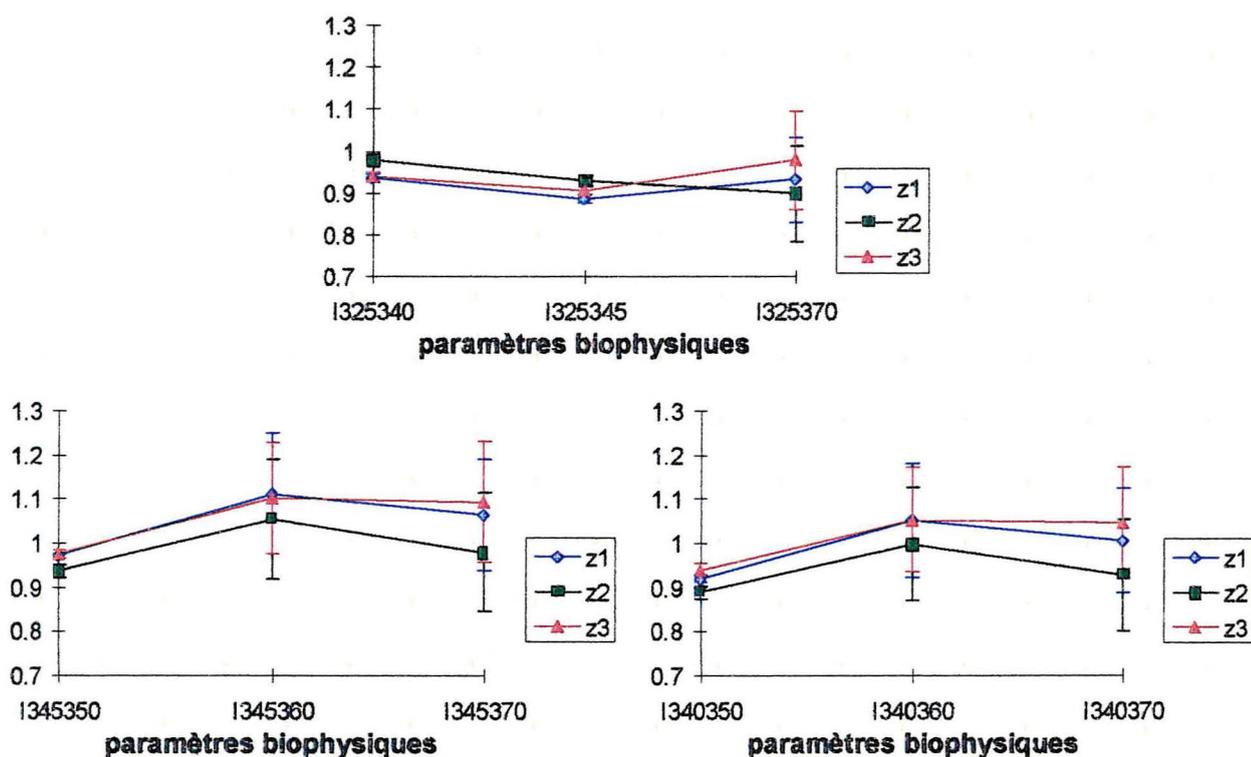


Figure 30 : Rapports des intensités maximales

Par ailleurs, ces rapports ne ressortent pas significatifs pour les spectres corrigés, nous confirmant bien le rôle de l'épiderme et de la mélanine dans la correction faite.

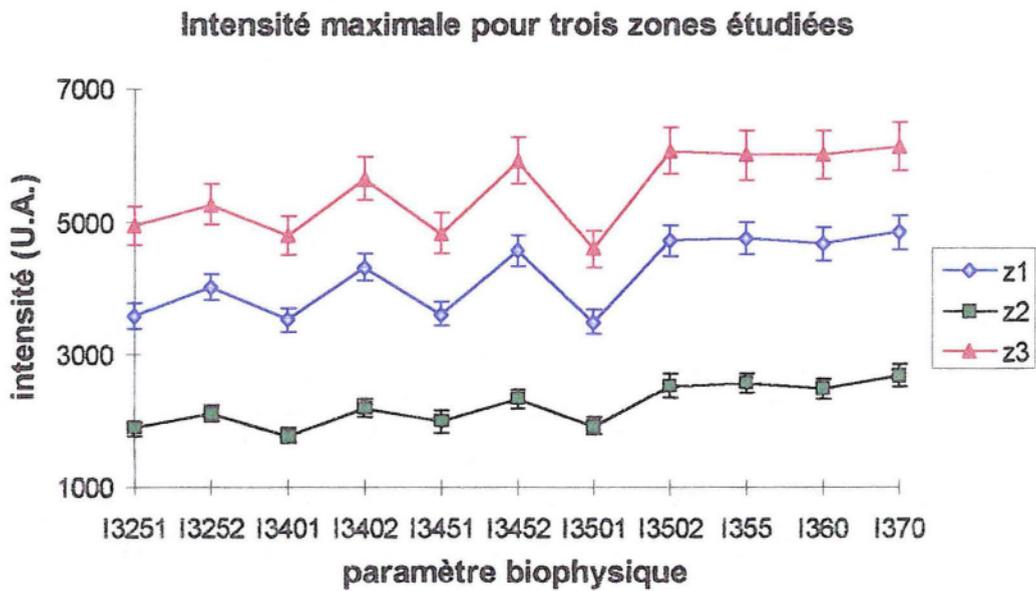


Figure 31

variable	D325 (nm)	D350 (nm)	D355 (nm)	D360 (nm)	D370 (nm)
moyenne z1	134.8 ± 0.8	120.8 ± 0.7	116.4 ± 0.5	111.8 ± 0.3	107.8 ± 2.0
± sem z2	135.4 ± 1.1	120.7 ± 1.0	118.2 ± 0.8	114.0 ± 0.6	110.6 ± 0.7
z3	133.0 ± 1.1	118.6 ± 0.9	115.2 ± 0.7	111.6 ± 0.6	107.6 ± 0.6
Pr	0.009	0.021	0.000	0.000	0.000
conclusion	z3 < z1 ; z3 < z2 z3 < z1 ; z3 < z2 z1 < z2 ; z3 < z2 z1 < z2 ; z3 < z2 z1 < z2 ; z3 < z2				

Tableau 11 : Paramètres biophysiques non corrigés de la réflexion diffuse ayant un effet zone

La zone 3 est significativement moins large que les deux autres alors que la zone 1 suit la zone 2 jusqu'à 350 nm puis diminue pour rejoindre la zone 3. Ces résultats diffèrent de ceux des spectres corrigés (Cf. Tableau 7), où seuls D350 et D355 montrent un effet zone ($z1 \neq z2$) chez les sujets dits « âgés ».

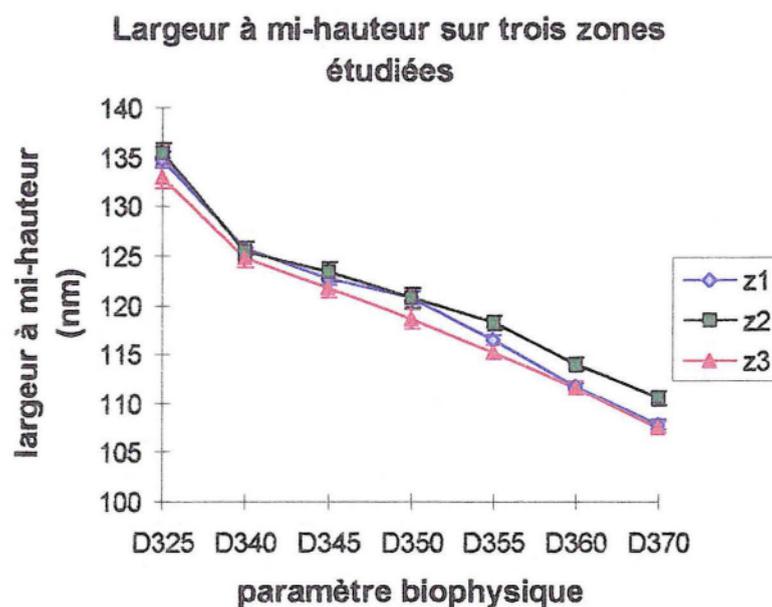


Figure 32

variable	D325360	D325370	D340355	D340360	D340370	D345355	D350360	D350370
moyenne z1	1.206 ± 0.007	1.252 ± 0.009	1.080 ± 0.004	1.126 ± 0.005	1.168 ± 0.008	1.054 ± 0.005	1.081 ± 0.005	1.121 ± 0.008
± sem z2	1.188 ± 0.008	1.227 ± 0.013	1.061 ± 0.005	1.100 ± 0.007	1.137 ± 0.012	1.043 ± 0.004	1.059 ± 0.006	1.093 ± 0.010
z3	1.192 ± 0.008	1.237 ± 0.010	1.083 ± 0.004	1.083 ± 0.004	1.161 ± 0.009	1.057 ± 0.004	1.062 ± 0.006	1.103 ± 0.008
Pr	0.013	0.044	0.000	0.000	0.007	0.028	0.004	0.015
conclusion	z1>z2 ; z1>z3		z1>z2 ; z3>z2		z1>z2 ; z3>z2		z1>z2 ; z1>z3	

Tableau 12 : Paramètres biophysiques non corrigés de la réflexion diffuse ayant un effet zone

De même que pour les rapports des intensités maximales, les rapports des largeurs à mi-hauteur dépendent de l'évolution de ces mêmes largeurs mais ne nous renseignent pas plus. Les résultats se distinguent entre eux aux différentes longueurs d'onde comme au niveau des zones. Aucune conclusion ne peut être tirée.

• effet âge

variable	L3402	L3452	L3502	L355	1380370
	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	
moyenne jeune	450.4 ± 0.5	451.4 ± 0.6	452.4 ± 0.6	454.1 ± 0.6	0.994 ± 0.018
± sem «âgé»	451.7 ± 0.7	453.6 ± 0.8	454.5 ± 0.9	456.3 ± 0.9	0.923 ± 0.016
Pr	0.030	0.021	0.036	0.029	0.000

Tableau 13 : Paramètres biophysiques non corrigés de la réflexion diffuse ayant un effet âge

Comme pour les spectres corrigés, un décalage des longueurs d'onde d'émission maximale montrent un effet âge. L345, L350 et L355 ressortent à la fois sur les spectres corrigés et non corrigés ; ils sont plus élevés de ≈ 2.0 nm pour le groupe dit «âgé». Ce décalage est légèrement moins marqué sur les spectres non corrigés que sur les spectres corrigés. Ceci montre l'influence de l'épaule qui décale le maximum vers les basses longueurs d'onde.

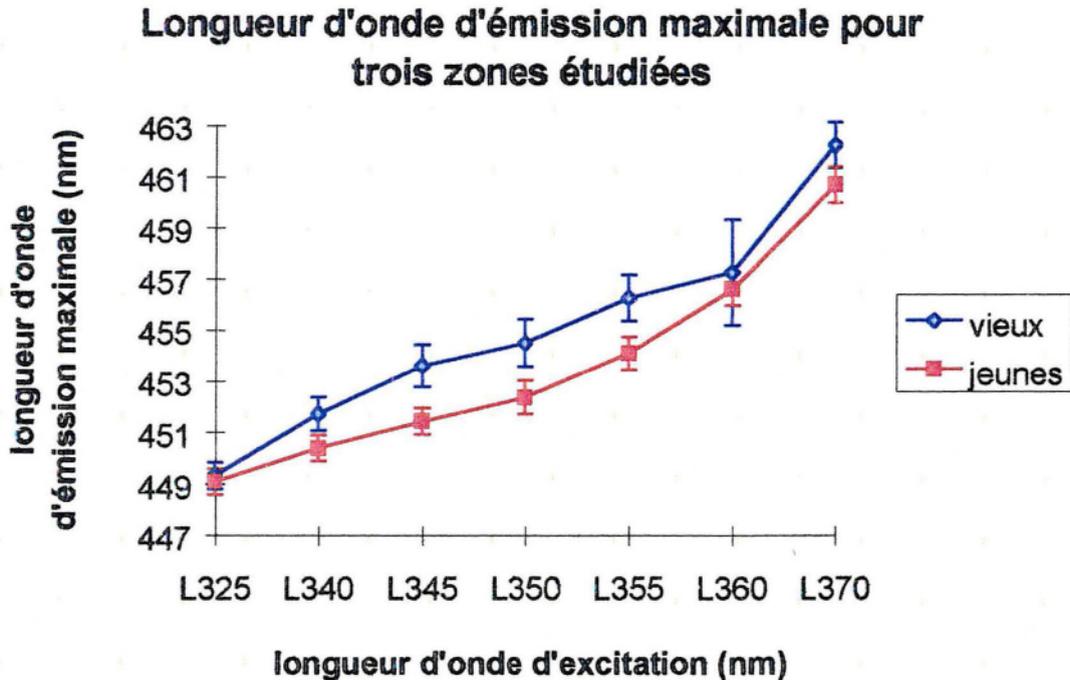


Figure 33

Toutes les intensités présentent une interaction zone*groupe

variable	I3251	I3252	I3401	I3402	I3451	I3452	I3502	I355	I360	I370	D325345
Pr	0.011	0.003	0.025	0.011	0.015	0.012	0.039	0.009	0.035	0.018	0.030
conclusion jeune	z3>z1 >z2	NS									
«âgé»	z3>z1 >z2	z1>z3 ; z2>z3									
conclusion z3	j≠v	NS									

*Tableau 14 : Paramètres biophysiques non corrigés de la réflexion diffuse présentant une interaction âge*zone*

Comme nous l'avons noté sur les spectres corrigés, plus la peau est claire et plus l'intensité maximale est élevée. Ceci est vrai aussi bien pour le groupe dit «âgé» que pour le groupe jeune. Nous notons ici en plus un effet âge pour la zone 3 : le groupe dit «âgé» possèdent des intensités maximales supérieures aux jeunes.

moyenne ± sem				moyenne ± sem			
variable	zone	jeune	«âgé»	variable	zone	jeune	«âgé»
I3251 (U.A.)	z1	3466 ± 268	3725 ± 368	I3252 (U.A.)	z1	3807 ± 245	4225 ± 290
	z2	1908 ± 140	1872 ± 164		z2	2109 ± 151	2117 ± 185
	z3	4359 ± 327	5522 ± 454		z3	4594 ± 317	5942 ± 469
I3401 (U.A.)	z1	3553 ± 271	3512 ± 259	I3402 (U.A.)	z1	4193 ± 297	4457 ± 314
	z2	1822 ± 144	1747 ± 167		z2	2191 ± 172	2196 ± 206
	z3	4339 ± 361	5244 ± 430		z3	5020 ± 394	6294 ± 490
I3451 (U.A.)	z1	3635 ± 277	3606 ± 258	I3452 (U.A.)	z1	4430 ± 320	4713 ± 327
	z2	2142 ± 314	1842 ± 179		z2	2310 ± 189	2342 ± 227
	z3	4327 ± 389	5334 ± 430		z3	5218 ± 439	6625 ± 518
I3502 (U.A.)	z1	4546 ± 335	4889 ± 338	I355 (U.A.)	z1	4496 ± 340	5012 ± 338
	z2	2474 ± 207	2594 ± 299		z2	2587 ± 208	2558 ± 238
	z3	5406 ± 465	6722 ± 508		z3	5205 ± 506	6794 ± 518
I360 (U.A.)	z1	4351 ± 374	4989 ± 332	I370 (U.A.)	z1	4389 ± 360	5289 ± 337
	z2	2419 ± 239	2567 ± 226		z2	2484 ± 234	2888 ± 239
	z3	5306 ± 463	6712 ± 509		z3	5240 ± 477	7007 ± 503
D325345	z1	1.097 ± 0.009	1.102 ± 0.011				
	z2	1.093 ± 0.008	1.104 ± 0.008				
	z3	1.103 ± 0.009	1.083 ± 0.007				

Tableau 15 : Paramètres biophysiques non corrigés de la réflexion diffuse présentant une interaction âge*zone

.VI.2.2.3 Récapitulatif des paramètres de fluorescence

L'intérêt d'étudier les rapports des intensités maximales et des largeurs à mi-hauteur étant faible, nous n'exposons ci-dessous que la comparaison des paramètres L, I et D des spectres corrigés et non corrigés, et qui à notre avis sont les plus pertinents.

• Longueurs d'onde du maximum d'émission

	Correction totale	Sans correction	effets communs
L3251		zone	
L3252	âge		
L3402	âge (z1)	âge	âge (z1)
L3451		zone	
L3452	âge	zone + âge	âge
L3501		zone	
L3502	âge	zone + âge	âge
L355	âge	âge	âge
L370	zone (z1=z3)	zone (z1=z2)	zone (z2 ≠ z3)

Tableau 16

L'effet âge apparaît sur le pic principal de fluorescence dans les deux cas et ceci aux longueurs d'onde d'émission du collagène et de l'élastine, entre 340 et 355 nm.

L'effet zone se manifeste surtout lorsque les spectres ne sont pas corrigés de la réflexion diffuse. Pour L370, l'effet se traduit différemment selon la zone : lorsque la correction est faite, la zone 1 se rapproche de la zone 3 alors qu'en absence de correction, elle s'identifie à la zone 2 photoexposée. Par contre, la zone du biceps, à l'abri des rayons du soleil, se distingue très nettement de la zone bronzée.

• Intensités maximales

	Correction totale	Sans correction	effets communs
I3251		zone + âge (z3)	
I3252	zone	zone + âge (z3)	zone (z3 > z1 > z2)
I3401		zone + âge (z3)	
I3402	zone	zone + âge (z3)	zone (z3 > z1 > z2)
I3451		zone + âge (z3)	
I3452	zone	zone + âge (z3)	zone (z3 > z1 > z2)
I3501		zone	
I3502	zone	zone + âge (z3)	zone (z3 > z1 > z2)
I355	zone	zone + âge (z3)	zone (z3 > z1 > z2)
I360		zone + âge (z3)	
I370		zone + âge (z3)	

Tableau 17

L'intensité maximale est le seul paramètre biophysique à montrer une homogénéité dans l'ensemble des résultats quelque soit la longueur d'onde d'excitation. L'effet âge sur la zone 3 sera discuté au paragraphe VI.3 (Discussion).

• Largeurs à mi-hauteur

	<i>Correction totale</i>	<i>Sans correction</i>	<i>effets communs</i>
D325		zone (z1=z2)	
D350	zone («âgés» : z1≠z2)	zone (z1=z2)	
D355	zone («âgés» : z1≠z2)	zone (z1=z3)	zone («âgés» : z1≠z2)
D360		zone (z1=z3)	
D370		zone (z1=z3)	

Tableau 18

Il semblerait y avoir une transition vers 350-360 nm. La zone 2 diffère de la zone 1 au delà de 355 nm.

.VI.2.3 Etude de la couleur de la peau

Les paramètres ne présentant pas d'interaction âge*zone sont les suivants :

• effet de la zone

variable		L*	b ^a	ITA
moyenne	z1	67.12 ± 0.41	12.63 ± 0.28	53.21 ± 1.17
+ sem	z2	61.35 ± 0.60	16.28 ± 0.24	33.921 ± 1.68
	z3	68.54 ± 0.36	12.39 ± 0.32	56.04 ± 1.09
Pr		0.000	0.000	0.000
conclusion		z1≠z2 ≠z3	z1≠z2;z2≠z3;z1=z3	z1≠z2 ≠z3

Tableau 19: Moyenne et écart à la moyenne (sem) et risque d'erreur des différents paramètres ayant un effet significatif sur le facteur zone

Quelque soit l'âge, la zone 2 apparaît comme la zone la plus bronzée avec un ITA de 33,9° et des valeurs faibles de luminosité et d'intensité dans le jaune.

Seule la rougeur a* présente une interaction âge*zone :

variable	Pr	conclusion			conclusion		
		jeune	«âgé»	z1	z2	z3	
a*	0.007	z1=z2;z2=z3;z1=z	z1=z2≠z3	NS	NS	NS	

3

Tableau 20: Probabilité du risque d'erreur (Pr) et interprétation des résultats

La rougeur ne présente pas de différence significative entre les sujets jeunes et les sujets dits «âgés». La zone 2 possède néanmoins chez les jeunes, des valeurs de a* plus faibles par rapport aux deux autres zones qui sont identiques entre elles, alors que le groupe dit «âgé» présente des différences sur les trois zones.

.VI.2.4 Analyse en composante principale

L'ACP a été réalisée indépendamment pour chaque zone mais nous présentons ici uniquement les résultats obtenus sur les spectres corrigés. Elle nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de critères en commun avec l'ANOVA. Les résultats sont les suivants :

- pour la **zone 1**, deux axes principaux sont ressortis et expliquent environ 40 % de l'information. Un axe est représentatif de l'âge et est caractérisé par des valeurs élevées pour les longueurs d'onde maximales, pour toutes les largeurs et pour les rapports de ces largeurs aux grandes longueurs d'onde. Le deuxième axe correspond à la couleur de la peau. Toutes les intensités maximales présentent une corrélation positive avec l'ITA et la luminosité alors que de fortes valeurs de ces paramètres s'opposent à de fortes valeurs de a* et b*.
- pour la **zone 2**, les deux axes principaux fournissent un peu moins de 40 % de l'information, mais nous observons une répartition beaucoup plus dispersée des sujets dits «âgés», plus sensibles à de fortes valeurs de L345 à L370, de D345 à D370 et à de faibles valeurs de certains rapports d'intensités.
- pour la **zone 3**, aucune conclusion n'a pu être tirée.

.VI.2.5 Analyse PLS

Nous avons modélisé nos résultats en essayant de calculer l'âge et l'ITA en fonction des paramètres biophysiques. Cette analyse a montré de nouveau une meilleure réponse sur la zone 1 ; pour les deux autres zones, aucun modèle n'est significatif. Sur la zone 1, deux axes se dégagent, portant pour les X (paramètres biophysiques) 33 % de l'information et les Y (âge et ITA) 50 %. La direction donnée par l'âge est complètement indépendante de celle de l'ITA (Cf. figure 33). Les longueurs d'onde maximales (L340...) ainsi que les largeurs à mi-hauteur (D...) apparaissent de nouveau corrélées positivement au «grand» âge. I345355 ainsi que I345370 varient en sens inverse des L et D. La couleur de peau (ITA) présente les mêmes caractéristiques que l'ACP, les intensités maximales (I325...).

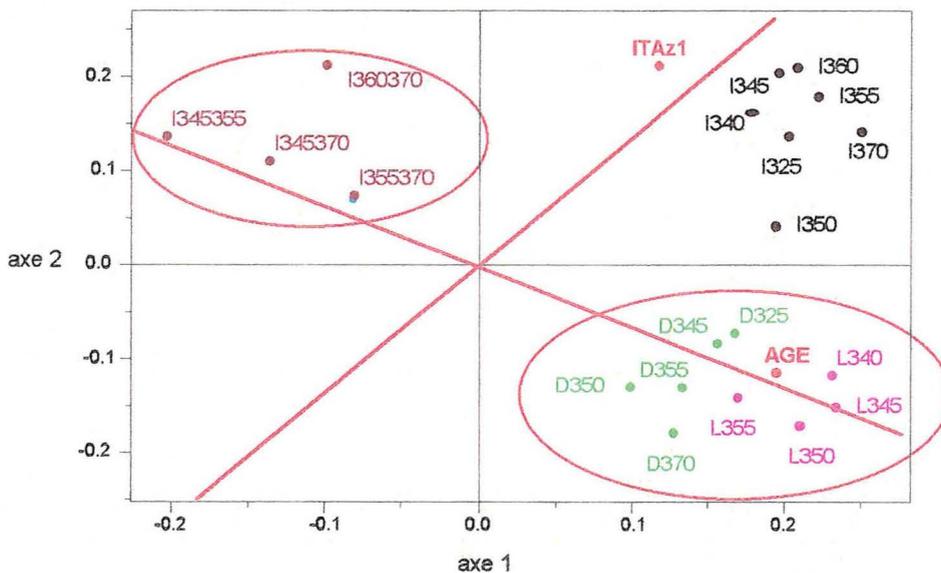


Figure 34 : PLS sur la zone 1 : âge, ITA = F (paramètres biophysiques corrigés)

.VI.3 Discussion

Le vieillissement de la peau humaine est une situation complexe et atteint chaque composant de cet organe. Les macromolécules du derme acquièrent des altérations quantitatives et qualitatives importantes au cours du temps et certains paramètres biophysiques sembleraient témoigner de ces changements.

Les variations de la largeur à mi-hauteur des pics, accompagnées d'un décalage des maxima d'émission vers les grandes longueurs d'onde, traduisent ces changements. L'émission chez le groupe dit "âgé" se décale d'environ + 2-3 nm par rapport à celle du

groupe jeune. Par ailleurs, les rapports de ces largeurs sont plus grands pour les sujets dits "âgés", résultant d'une diminution plus rapide de la largeur des pics d'émission entre 350 et 360 nm. Ce phénomène apparaît dans la zone d'émission du collagène et de l'élastine mais n'est pas retrouvé pour les spectres non corrigée. Les propriétés d'absorption de l'épiderme masquent ce phénomène. De faibles valeurs de D sont aussi remarquées sur la zone photoexposée des sujets dits «âgés». Le rapprochement apparent de l'épaulement vers le pic principal met en évidence l'accentuation des effets du soleil au niveau du derme (diminution plus importante de la circulation sanguine). Cependant nous ne pouvons pas faire la même conclusion en ce qui concerne le groupe des jeunes.

Ces phénomènes peuvent aussi s'expliquer par :

- les pontages du collagène ; les peptides⁶¹ et sucres responsables de ces réactions sont progressivement réduits ou oxydés. Certains "cross-links" non enzymatiques présents dans les tissus connectifs tels que l'histidinoalanine et les produits de glycation avancée^{62,63} augmentent la rigidité de la peau. De plus, certains produits de la réaction de Maillard produisent des radicaux libres. L'environnement chimique et la géométrie du réseau de la matrice intercellulaire sont modulés.
- l'augmentation du rapport collagène de type IV / collagènes de types I + III.
- l'élastine qui subit aussi beaucoup de perturbations ; au contact des lipides par exemple, les fibres d'élastine deviennent plus sensibles aux élastases et perdent de leur élasticité.

Ces modifications peuvent induire le décalage vers les grandes longueurs d'onde et l'élargissement des pics.

Toutes ces réactions sont contrôlées par des facteurs génomiques et leur participation au "chronométrage" du vieillissement est propre à chaque individu. Par contre, l'influence de facteurs extrinsèques sur la peau est plus particulièrement mis en évidence par l'étude de différentes zones du corps. En effet, l'exposition solaire joue un rôle conséquent sur le vieillissement en temps qu'agent physique externe. L'analyse de ces phénomènes passe par la mesure des intensités de fluorescence.

L'ANOVA et l'ACP arrivent aux mêmes conclusions : seules les intensités maximales pour presque toutes les longueurs d'onde d'excitation, L*, et b* décrivent des différences entre les zones. Des caractéristiques surtout liées à l'épiderme semblent

expliquer en partie ces variations : des concentrations en mélanine et autres chromophores, une épaisseur plus grande, un relief cutané différent... Mais l'analyse statistique a aussi fait ressortir que les intensités maximales des spectres d'émission non corrigés sont corrélées à l'ITA, ce qui est logique (peau claire = fluorescence élevée). Si ces paramètres sont corrélés à l'ITA, la correction par la réflexion diffuse, reflet des caractéristiques de l'épiderme, aurait dû faire disparaître le lien à la couleur de la peau pour les paramètres 1325 à 1370 (intensités corrigées). Nous pouvons donc penser que notre correction n'est pas encore parfaite ou que les 1325 à 370 sont des descripteurs réellement pertinents et restent influencés par l'épiderme pour d'autres raisons qui n'ont pas pu être mises en évidence.

D'autre part, la majorité des sujets possèdent un ITA et une luminosité (L^*) caractéristiques d'une peau claire pour la zone 1, intermédiaire pour la zone 2 et très claire pour la zone 3. Cela signifie que ces sujets ont surtout des phototypes clairs et sont donc sensibles aux effets du soleil. La tentative de modélisation sur la zone 2 et la zone 3 à la fois en fonction de l'âge et du bronzage a échoué. C'est pourtant sur la zone 3 totalement photoprotégée que la modélisation aurait dû être la plus facile et sur la zone 2 photoexposée que le photovieillissement aurait dû être caractérisé. Le processus de vieillissement des parties photoexposées est très dissemblable de celui des parties protégées⁶⁴. Par exemple, des changements histopathologiques tels que l'élastose, la dégénération basophile du collagène et l'accumulation de glycosaminoglycannes sont prononcés dans le derme papillaire⁶⁵. Une augmentation en collagène III relativement au collagène a été montrée par Plastow and al⁶⁶, mais ce changement de rapport n'a pas été confirmé par Kligman⁶⁷. Seules les intensités maximales de la zone 3 font ressortir un effet âge sur les spectres non corrigés. Nous pouvons penser qu'il s'agit du vieillissement physiologique de l'épiderme puisque nous ne retrouvons pas ces résultats sur les spectres corrigés. Sur la zone 2, les grandes différences inter-individuelles d'exposition solaire et de bronzage masquent peut-être les effets. Néanmoins, sur les spectres corrigés, l'intensité maximale est liée au niveau de bronzage.

Alors que Leffell⁴ ou encore Sauermann⁶⁸ ont mis en évidence le photovieillissement de certaines zones plus exposées par la fluorescence, nous ne sommes pas parvenus à comprendre la totalité des résultats ressortis comme significatifs. Les différences observées entre les trois zones étudiées et qui ne peuvent être actuellement expliquées logiquement par les effets solaires, sont peut-être d'origine anatomique.

Les résultats obtenus sur les spectres non corrigés ne nous renseignent pas plus. Les modifications induites par le photovieillissement dépendent de la dose de soleil reçue au cours de la vie, de facteurs génomiques, et varient donc d'un individu à l'autre. Du fait de l'importance de cette variabilité individuelle (Cf. écart-type), les effets du photovieillissement pourraient être masqués alors que nous nous attendions à les voir apparaître sur ces spectres au niveau de la zone 2 (effet âge sur les D et les rapports des I).

Il faut noter que les paramètres L issus des mesures effectuées selon la méthode de Leffell⁴ (spectres non corrigés) sont bien corrélés avec l'âge alors que nous avons montré que le chromophore qui fluoresce est le collagène et non deux chromophores comme il l'affirme. Par contre, le rapport d'intensité de l'épaulement sur le pic principal ne nous a pas procuré de renseignements sur le photovieillissement comme l'avait montré Leffell, peut-être pour des raisons liées aux différences d'appareil. Seul le rapprochement des deux sommets nous montrent une diminution de l'absorption de la fluorescence par l'hémoglobine, c'est à dire une diminution de la microcirculation et par conséquent un effet solaire éventuel, croisé avec un effet âge.

.VII CONCLUSION

Ces résultats très préliminaires montrent que la méthode de correction du spectre de fluorescence par la réflexion diffuse permet de retrouver les spectres d'émission du collagène. Ils confortent les commentaires de R. Anderson⁶⁹ sur les travaux de Leffell⁴, discutant l'interprétation des deux pics de fluorescence. Cette méthode reste encore imparfaite et nécessite une amélioration. Elle a permis néanmoins de dégager des paramètres liés à la fluorescence intrinsèque du derme et à l'âge. Il semble clair que l'intensité de fluorescence soit un marqueur du niveau d'exposition solaire et que par contre les phénomènes de vieillissement se caractérisent plus par la position du maximum de fluorescence. En complément de cette étude, la détermination des spectres d'absorbance et l'application de méthodes de décomposition de pics devront être envisagées afin de mieux préciser quels sont les fluorophores sollicités.

D'autres part, les modifications cutanées liées à l'âge augmentent considérablement au delà de 60 ans. Une étude sur une telle population apporterait certainement des informations importantes.

Des méthodes de mesure *in vitro* du vieillissement, de l'action des rayonnements solaires ou encore l'isolation chimique des fluorophores à partir du tissu biologique aideraient aussi à comprendre ces changements. Nous concluons donc que l'étude des effets du temps sur la peau requiert la collaboration d'équipes scientifiques de disciplines variées.

. CONCLUSION

Ce travail a suivi **deux axes** très différents :

- **l'un bibliographique** portant sur les applications pratiques de l'autofluorescence de la peau en dermatologie. La lampe de Wood est utilisée pour effectuer des diagnostics rapides, notamment des troubles de la pigmentation qui sont difficiles à détecter pendant l'hiver. En pratique, le diagnostic des infections fongiques se fait rarement en lumière noire ; les dermatologues préfèrent s'appuyer sur l'évaluation clinique et les résultats des analyses microbiologiques. Seul l'examen des teignes tondantes en lampe de Wood reste courant lorsque les lésions ne sont pas visibles à l'œil nu ou qu'il s'agit d'une épidémie scolaire (dépistage scolaire).

Par conséquent, l'utilisation de la lampe de Wood n'est pas systématique. Cette approche de la peau est très intéressante pour la science et dans le sens où elle nous permet de voir des éléments invisibles à l'œil nu, de faire un diagnostic rapide et de suivre l'évolution spontanée de la pathologie de façon non-invasive.

En ce qui concerne l'application aux écrans solaires de la fluorescence de la peau, cette méthode est actuellement utilisée par les Laboratoires Biotherme pour la détermination de l'indice de protection d'un écran solaire. Elle permet d'éviter l'irradiation de zones cutanées pour déterminer la DEM.

De plus, de nombreux axes de recherche sont en cours de développement depuis une dizaine d'années. Nous avons vu que les cancers cutanés, l'érythème et les troubles de la pigmentation restent les axes les plus étudiés avec la distribution des chromophores dans la peau.

- **l'autre expérimental** et plus fondamental sur la caractérisation du vieillissement cutané. Les physiciens et médecins utilisent aussi ces émissions lumineuses afin d'essayer de comprendre certains processus biologiques. Notre travail expérimental a permis de confirmer certains travaux concernant la fluorescence intrinsèque de la peau, et de montrer le lien que pouvaient avoir certains paramètres fluorimétriques avec le vieillissement cutané tels que la largeur à mi-hauteur, la longueur d'onde ou encore l'intensité d'émission maximale.

Ces données sont encore incomplètes mais constituent un pas en avant vers de nouvelles perspectives. La décomposition des spectres de fluorescence et l'études sur des modèles de peau simplifiés pourraient à l'avenir nous aider à interpréter certains

résultats et nous renseigner plus précisément sur l'origine et la nature précise des chromophores.

Comme nous l'avons vu tout au long de ce mémoire, les récents progrès en optique, électronique, et modélisation mathématique ont contribué au développement de l'utilisation de l'autofluorescence *in vivo*. Dans un proche avenir, nous pouvons penser que l'imagerie optique sera un moyen sûr, non-invasif et procurera des mesures précises de l'épaisseur de la peau, de la structure et de l'état de l'épiderme et du derme, afin d'aider à l'interprétation des phénomènes de fluorescence. Nous pensons en particulier à l'utilisation de microscopes confocaux en fluorescence.

. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Lohmann W. Nilles M. and Bödeker R.H. (1991) In situ differentiation between nevi and malignant melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften* **78** : 456-457.
- 2 Sterenborg H.J., Motamedi M., Wagner R.F., Thomsen S., Jacques S.L. (1995) In vivo fluorescence spectroscopy for the diagnosis of skin diseases. *SPIE* **2324** : 32-37.
- 3 Zeng H., Lui H., McLean D.I., MacAulay C., Palcic B. (1996) Optical spectroscopy studies of diseased skin - preliminary results. *SPIE* **2628** : 281-285.
- 4 Leffell D. J., Stetz M.L., Milstone L.M. and Deckelbaum L.I. (1988) In vivo fluorescence of human skin - a potential marker of photoaging. *Arch. Dermatol.* **124** : 14-1548.
- 5 Odetti P.R., Borgoglio A. and Rolandi R. (1992) Age-related increase of collagen fluorescence in human subcutaneous tissue. *Metabolism*, **41** (6) : 655-658.
- 6 Sinichkin Y.P., Utz S.R., Yudin P.M., Pilipenko H.A. (1994) Investigation of formation and dynamics of human skin erythema and pigmentation by *In vivo* fluorescence spectroscopy. *Europto series-SPIE* **2324** : 259-268.
- 7 Césarini J.P. (1981) *La peau. Que sais-je ?* Presses Universitaires de France - Paris.
- 8 de Gravinsky P. (1972) *Physiologie de la peau. Dans Dermatologie ; Syphilis. La pathologie médicale.* Flammarion - Paris : 5-8.
- 9 Geras A.J. (1990) Synoptic view of cutaneous architecture. In *Dermatology - A medical artist's interpretation - SANDOZ illustrated* : 16.
- 10 Holbrook K.A. and Wolff K. (1993) The structure and development of skin. In *Dermatology in general medicine, 4è Ed., Mc Graw-Hill - London.* **1** (Chap. 8) : p 97-130.
- 11 Lamirand J., Joyal M. (1958) *Optique, principes fondamentaux. In Physique : unités et mesures, statique des fluides, optique géométrique, chaleur.* Masson - Paris : 83-94.

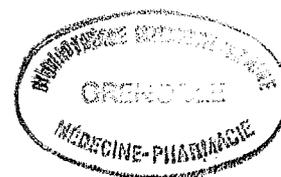
-
- 12 Anderson R.R. (1991) Polarized light examination and photography of the skin. Arch. Dermatol. **127** : 1000-1005.
- 13 Zeng H., MacAulay C., Palcic B. and McLean D.I. (1993) A computerized autofluorescence and diffuse reflectance spectroanalyser system for *in vivo* skin studies. Phys. Med. Biol. **38** : 231-240.
- 14 Anderson R.R (1993) Optics of the skin. In Clinical Photomedecine, Eds. H.W. Lim and N.A. Soter. Dekker M. - NY : 19-35.
- 15 Kohen E., Santus R., Hirschberg J.G. (1995) Optical properties of the skin. In Photobiology, Eds Academic Press - London : 308.
- 16 Agache P., Girardot I., Bernengo J.C. (1989) Optical properties of the skin. In Cutaneous investigation in health and disease - Non invasive methods and instrumentation. Lévèque J.L. Dekker M. - New York : 241-248.
- 17 Anderson R.R, Parrish J.A. (1981) The optics of the human skin. J. Invest. Dermatol. **77** : 13-19.
- 18 Sandritter WZ., (1953) Pathol., **64** : 520-530.
- 19 Solan J.L., Laden K. (1977) Factors affecting the penetration of light through stratum corneum. J. Soc. Cosm. Chem., (28) : 125-137.
- 20 Zeng H., MacAulay C., McLean D.I. and Palcic B. (1995) Spectroscopic and microscopic characteristics of human skin autofluorescence emission. Photochem. and Photobiol. **61** (6) : 9-645.
- 21 Tinet E and Avrillier S. (1993) Monte Carlo modelisation of laser induced fluorescence signals in turbid media : determination of original fluorescence spectra. SPIE Proc. **1887** : 69-76.
- 22 Mathieu J.P., Kastler A., Fleury P. (1991) Dans Dictionnaire de physique 3è Ed. Masson - Paris : 69.

-
- 23 Kochevar I.E., Pathak M.A. and Parrish J.A. (1993) Photophysics, Photochemistry, and Photobiology. In *Dermatology in general medicine*. 4^e Ed., Mc Graw-Hill, London. 1 (Section 22, Chap. 131 : 1627-38.
- 24 Kohen E., Santus R. and Hirschberg J.G. (1995) In *Photobiology* by Academic Press - NY (Chap. 2) : 23-42.
- 25 Jillson O.F. (1981) Wood's light : an incredibly important diagnostic tool. *CUTIS* 28 : 620-626.
- 26 Gilrest B.A., Fitzpatrick T.B., Anderson R.R. and Parrish J. (1977) Localization of melanin pigmentation in the skin with Wood's lamp. *British J. Dermatol.* 96 : 245-248.
- 27 Dorosz P. (1995) *Guide pratique des médicaments*. 15^{ème} Ed. Maloine, Paris : 163.
- 28 Fitzpatrick T.B.(1993) Diagnosis of abnormalities of the melanin pigmentation system. In *Dermatology in general medicine* 4^e Ed., Mc Graw-Hill, London. 1 (Section 12, Chap.80) : 905-906.
- 29 Kopf AW, Salopek TG., Slade J., Marghoob AA., Bart RS. (1994) Techniques of cutaneous examination for the detection of skin cancer. *Cancer supplement.* 75 (2) : 684-690.
- 30 Koh HK., Sober AJ., Nakagawa H., Albert DM., Mihm M., Fitzpatrick TB (1983) Malignant melanoma and vitiligo-like leukoderma : an electron microscopic study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 9 (5) : 696-708.
- 31 Rezabek G.H. and Frieman A.D. (1992) Superficial fungal infections of the skin. *Drugs.* 43 (5) : 674-682.
- 32 Prevost E. (1979) Nonfluorescent Tinea Capitis in Charleston, SC. A diagnostic problem. *JAMA* 242 (16) : 1765-1767.
- 33 Krull E.A., Babel D.E. (1976) Diagnostic procedures of the skin. *The J. Family Pract.* 3 (3) : 309-312.
- 34 Tschen J.A., Ramsdell W.M. (1983) Disciform erythrasma. *CUTIS* 31 : 541-547.

-
- 35 Ward CG, Clarkson JG, Taplin D. et al. (1967) Wood's light fluorescence and *Pseudomonas* burn wound infection. *JAMA* **202** : 1039-40.
- 36 Lucchina C.L, Kollias N., Gillies R., Drake L.A. (1996) Fluorescence photography in the evaluation of acne. *J. Am. Acad. Dermatol.* **35** (1) : 58-63.
- 37 Martin R.J., Kahn G., Gooding J.W., Brown G. (1973) Cutaneous porphyrin fluorescence as an indicator of antibiotic absorption and effectiveness. *CUTIS* **12** : 758-764.
- 38 Lewis V.L., Bert Myers M., Griffith B.H. (1978) Early diagnosis of crepitant gangrene caused by *Bacteroides melaninogenicus*. *Plastic and Reconstructive Surgery.* **62** (2) : 276-279.
- 39 Combettes C., Garson JC., Guiolet A., Anthoine P., Aubert L., Lévêque JL. (1990) In vivo measurement of skin autofluorescence : application to the study of sunscreen behaviour. 16th IFSCC Congress New York : 242-255.
- 40 Utz SR., Bart J., Knuschke P. (1995) Fluorescence spectroscopy in dermatology. *Bull Russian Acad. Sc. Phys.* **59** (6) : 1082-1085.
- 41 Lohmann W., Paul E. (1988) In situ detection of melanomas by fluorescence measurements. *Naturwissenschaften* **75** : 201-202.
- 42 Lohmann W., Paul E. (1989) Native fluorescence of unstained cryo-sections of the skin with melanomas and nevi. *Naturwissenschaften* **76** : 424-426.
- 43 Sterenborg HJ., Thomsen S., Jacques SL., Motamedi M. (1995) *In vivo* autofluorescence of an unpigmented melanoma in mice. Correlation of spectroscopic properties to microscopic structure. *Melanoma Research* **5** : 211-216.
- 44 Lohmann W., Dreyer T., Nilles M., Bohle RM., Schill WB., Glanz H., Fryen A., Horn G., Pollich B. (1995) Tissue diagnosis by means of endogenous fluorophores. *SPIE Proc.* **2324** : 64-75.
- 45 Lin S., Jacques SL., Tittel FK., Wang LH. (1996) Determining optical properties with fiber-optic oblique incidence reflectometry. *Advances in optical imaging and photon migration. Congress in Orlando-March 96 Optical Society of America BThA17* : 98-100.

-
- 46 Utz SR., Sinichkin YP., Meglinsky IV., Pilipenko HA. (1995) Fluorescence spectroscopy in combine with reflectance measurements in human skin examination : what for and how ? Europto series-SPIE Proc. **2324** : 125-136.
- 47 König K., Meyer H., Schneckenburger H., Rück A. (1993) The study of endogenous porphyrins in human skin and their potential for photodynamic therapy by laser induced fluorescence spectroscopy. *Lasers in Medical Science* **8** : 127-132.
- 48 Tinker D.H., Tappel A.L. (1983) A partial characterization of the major fluorophore of bovine ligamentum elastine. *Connect. Tissue Res.* **11** : 309-319.
- 49 Deyl Z. (1970) A fluorescent compound in collagen and its relation to the age of the animal. *Exp. Gerontol.* **5** : 57-62.
- 50 Oimomi M., Kitamura Y., Nishimoto S. and al. (1986) Age-related acceleration of glycation of tissue proteins in rats. *J. Gerontol.* **41** : 695-698.
- 51 Hayflick L. (1979) The cell biology of aging. *J. Invest. Dermatol.* **73** : 8-14.
- 52 De Lacharrière O. (1987) Vieillessement cutané - Aspects morphologiques et physiologiques. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale - Paris* **12235 E10 - 4** : 1-8.
- 53 Gilrest B.A. (1989) Skin aging and photoaging : an overview. *J. Am. Acad. Derm.* **21** : 610-613.
- 54 Meunier L., Michel B., Duntze F., Meynadier J. (1990) Vieillessement cutané. *Sauramps médical. Vigot - Paris* : pp 27-34.
- 55 Sauder D.N., Stanulis-Praeger B.M., Gilrest B.A. (1988) Autocrine growth stimulation of human keratinocytes by epidermal cell-derived thymocyte-activating factor : implications for skin aging. *Arch. Dermatol. Res.*, **280** : 71-76.
- 56 Kligman L.H. (1989) The ultraviolet-irradiated hairless mouse : a model for photo-aging. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21** : 623-631.
- 57 Thomas P., Amblard P. (1988) Vieillessement solaire. Dans *Photodermatologie et photothérapie. Masson - Paris* : 17-19.

- 58 Chardon A, Hourseau C., Poret J., Masson Ph., Mérot F. et Dahinger Broomer A. (1995) La méthode FPS Colipa : un soleil unique pour l'Europe. *Cosmétologie* (4) : 51.
- 59 Tinois E., Gaetani Q., Gayraud B., Dupont D., Rougier A. and Pouradier Duteil X. (1994) The Episkin model : successful reconstruction of human epidermis *in vitro*. *In vitro skin toxicology- Alterations methods in toxicology*. **10** : 133-140.
- 60 Katz A. and Alfano R.R. (1996) Optical Biopsy-Detecting cancer with light. *Leos newsletter* : 6-7.
- 61 Miyahara T. Shiozawa S., Murai A. (1978) The effect of age on amino acid composition of human skin collagen. *J. Gerontol.* **33** (4) : 498-503.
- 62 Monnier V.M. (1990) Nonenzymatic glycolisation, the Maillard reaction and the aging process. *J. Gerontol. : biological sciences*. **45** (4) : B105-111.
- 63 Gilchrest B.A. (1993) Aging of skin. In *Dermatology in general medicine*. 4è Ed., Mc Graw-Hill, London. **1** (Section 3, Chap.10) : 150.
- 64 Kligman A.M. and Kligman L.H. (1993) Photoaging. In *Dermatology in general medicine* 4è Ed., Mc Graw-Hill, London. **2** (Section 41, Chap. 240) : 2972-2979.
- 65 Uitto J. (1986) Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-related alterations in collagen and elastin. *Dermatology Clinics*, **4**(3) : 433-446.
- 66 Plastow SR and al (1988) Early changes in dermal collagen of mice exposed to chronic UVB irradiation and the effects of a UVB sunscreen. *J. Invest. Dermatol.* **91** : 590.
- 67 Kligman LH and al (1989) Collagen metabolism in ultraviolet irradiated hair-less mouse skin and its correlation to histologic observations. *J. Invest. Dermatol.* **93** : 210.
- 68 Sauermann G. Langreder W. and Proske O. (Sept 1993) The determination of photoaging indicating pigments by fluorescence *in vivo*. *IFSCC-International conferences* : 165.
- 69 Anderson Rox (1989) *In vivo* fluorescence of human skin, Comments and opinions. *Arch. Dermatol.* **125** : 999-1000.



AUTORISATION D'IMPRESSION
ET DE
SOUTENANCE

De la Thèse dont l'intitulé est :

Autofluorescence de la peau - Application en Dermatologie.
Cas particulier : le vieillissement cutané

CANDIDAT : Mlle Sophie DELORNE

Vu

GRENOBLE, le 18 septembre 1996 Le Président du Jury

Mariotte

Vu

GRENOBLE, le 30/09/96 P/ Le Président de l'Université
Joseph FOURIER - GRENOBLE I
Sciences. Technologie. Médecine

Le Directeur de l'U.F.R.
Pharmacie



[Signature]

**TITRE : AUTOFLUORESCENCE DE LA PEAU ET APPLICATION EN
DERMATOLOGIE
CAS PARTICULIER : LE VIEILLISSEMENT CUTANE**

RESUME :

L'autofluorescence de la peau a été observée pour la première fois en 1908. Depuis, le développement de la spectrofluorimétrie basée sur l'autofluorescence de la peau a permis le diagnostic de pathologies cutanées, de façon rapide et non-invasive. De nos jours, le phénomène d'autofluorescence de la peau est surtout utilisé pour le diagnostic des troubles de la pigmentation en mélanine par la lampe de Wood. Parfois, les dermatologues s'en servent pour détecter les infections fongiques superficielles, les infections à pseudomonas, l'acné ou encore l'érythrasma. Une autre utilisation de ce phénomène est la détermination de l'indice de protection d'un écran solaire. Il ne s'agit pas de la méthode officielle, mais certains laboratoires cosmétiques utilisent l'intensité de fluorescence pour la mise au point des produits solaires.

Les axes de recherche actuels sur ce phénomène sont nombreux. Depuis longtemps, les chercheurs étudient les chromophores de la peau afin de mieux connaître leur distribution dans le tissu. Les recherches portent aussi sur les cancers cutanés, la pigmentation en mélanine, l'érythème et l'efficacité des traitements acnéiques.

La deuxième partie de ce travail est expérimentale et porte sur un autre axe de recherche, le vieillissement cutané. C'est dans le but d'essayer de mieux comprendre l'évolution des constituants de la peau au cours du temps que nous avons étudié leur fluorescence. Nous avons travaillé *in vitro* sur un modèle incomplet de peau reconstruite, puis *in vivo* sur deux groupes de population d'âge éloigné.

Ces expériences nous ont montrés l'utilité d'une correction des spectres de fluorescence par un phénomène optique majeur, la réflexion diffuse. Puis l'analyse *in vivo* de paramètres biophysiques tels que la largeur à mi-hauteur, les déplacements des longueurs d'ondes des pics d'émission, les rapports des intensités et largeurs a montré des différences significatives entre le groupe dit «jeune» et celui dit «âgé». Ces observations s'expliqueraient en partie par l'apparition de modifications physico-chimiques des chromophores de la peau au cours du temps. Par contre, aucun paramètre n'a pu mettre en évidence le photovieillissement.

MOTS CLES : autofluorescence, peau, vieillissement, lumière noire, réflexion diffuse, chromophore, *in vitro*, *in vivo*.