

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Etude du rôle des lysosomes et du cholestérol au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques

Jans, Ralph

Award date:
2004

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

FACULTE DE MEDECINE



Etude du rôle des lysosomes et du cholestérol au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques

Dissertation présentée par

Ralph Jans

en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales

Composition du jury

Prof. M. Garmyn	(Leuven, KUL, Dermatologie)
Prof. M. Jadot	(Co-Promoteur, Namur, URΦM, Chimie Physiologique)
Dr. F. Mainferme	(Namur, URΦM, Chimie Physiologique)
Dr. C. Michiels	(Namur, URBC)
Prof. A. Piront	(Namur, Physiologie Cellulaire)
Prof. Y. Poumay	(Promoteur, Namur, Histologie-Embryologie)
Dr. F. Van den Brûle	(Liège, ULg, Laboratoire de Recherche sur les Métastases)

© Presses Universitaires de Namur & Ralph Jans
Rempart de la Vierge, 13
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,
hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,
est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique

ISBN: 2-87037-453-4

Dépôt légal: D / 2004 / 1881 / 27

Etude du rôle des lysosomes et du cholestérol au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques (par Ralph Jans)

La majorité des rôles protecteurs de l'épiderme, couche superficielle de la peau, sont garantis par les kératinocytes qui se différencient de manière progressive et terminale dans les couches suprabasales de ce tissu, dont le renouvellement est assuré par la prolifération de cellules-souches dans la couche basale. Toute perturbation des mécanismes qui contrôlent la prolifération et/ou la différenciation des kératinocytes conduit à des dysfonctionnements. Comprendre ces mécanismes reste donc un défi majeur pour la biologie cutanée.

Plusieurs types cellulaires subissent l'exocytose de lysosomes quand il y a entrée d'ions calcium dans les cellules. Puisque les kératinocytes subissent une entrée de calcium au cours de leur différenciation, ces cellules pourraient exocytter des lysosomes dans ces circonstances. Un traitement de kératinocytes avec un ionophore induit en effet une sécrétion de la forme mature lysosomale de la cathepsine D, une libération de l'activité des enzymes lysosomales solubles cathepsine C et β -galactosidase, ainsi que l'apparition des protéines lysosomales membranaires Lamp-1 et Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique. L'exocytose de lysosomes peut donc faire partie de la différenciation des kératinocytes, mais permet aussi à ces cellules de réparer des ruptures de la membrane plasmique.

Puisque le cholestérol pourrait contrôler certaines voies de signalisation au cours de la différenciation des kératinocytes, nous avons analysé les effets d'une déplétion en cholestérol induite par un traitement avec la méthyl- β -cyclodextrine sur le phénotype et la signalisation du kératinocyte. Cette déplétion induit une augmentation de l'expression de l'involucrine, marqueur de différenciation tardive, et une répression de l'expression de la kératine 10, marqueur de la différenciation précoce, et de la kératine 14, marqueur des kératinocytes non-différenciés. Ce traitement active le récepteur de l'EGF et HER2, ainsi que la MAP kinase p38 dont l'activation (en particulier l'activation de p38 α) est responsable de l'augmentation de l'expression de l'involucrine.

En résumé, nos observations suggèrent un nouveau rôle pour les lysosomes au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques, mais suggèrent surtout un rôle critique du cholestérol dans la régulation de ce processus.

Role of lysosomes and cholesterol during the differentiation process of epidermal keratinocytes (by Ralph Jans)

A major part of the protective role of the epidermis, superficial layer of the skin, is guaranteed by the keratinocytes that differentiate progressively and terminally in the suprabasal layers of this tissue. The renewal of the epidermis is performed by proliferating stem cells in the basal layer. Perturbation of the mechanisms that regulate the proliferation and/or the differentiation of keratinocytes leads to an invalid barrier function. Therefore, elucidating these mechanisms is a major challenge for skin researchers.

In several cell types, lysosomes undergo exocytosis upon entry of calcium into the cells. Since keratinocytes are subjected to an entry of calcium during their differentiation *in vivo*, these cells could exhibit an exocytosis of lysosomes under these circumstances. The results presented in this work show that an incubation of keratinocytes with the calcium ionophore ionomycin triggers the secretion of the enzymatic activities of the lysosomal enzymes cathepsin C and β -galactosidase as well as the release of the lysosomal form of cathepsin D. This treatment also induces the appearance of the lysosomal membrane proteins Lamp-1 and Lamp-2 at the plasma membrane of keratinocytes. Exocytosis of lysosomes could be part of the keratinocyte differentiation process, but could also allow these cells to repair their plasma membrane upon disruption due to mechanical stresses.

Since cholesterol could be involved in the regulation of several signal transduction pathways during keratinocyte differentiation, we have investigated the effects of a depletion of cholesterol on the keratinocyte phenotype and on selected signaling pathways. Cholesterol depletion was induced by incubating the cells with methyl- β -cyclodextrin. This treatment, followed by an inhibition of cholesterol neosynthesis using lovastatin, triggers an upregulation of the expression of involucrin, a late differentiation marker, and a downregulation of keratin 10 and keratin 14, which, respectively, are markers of early-differentiating and undifferentiated keratinocytes. Cholesterol depletion activates the membrane receptors EGFR and HER2 and the MAP kinase p38. Using the specific inhibitor PD169316, we demonstrate that the p38 α isoform is responsible for the upregulation of involucrin during cholesterol depletion. In summary, our observations suggest a novel role for lysosomes during keratinocyte differentiation and indicate a critical role for cholesterol in the regulation of this process.

Remerciements

Arrivé au terme de mon aventure au pays du merveilleux kératinocyte, je tiens à remercier vivement tous ceux sans qui ce parcours aurait été impossible (et beaucoup moins agréable).

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le Professeur Yves Poumay pour m'avoir accueilli dans le Département Histologie-Embryologie et pour m'avoir guidé et formé dans le domaine de la biologie cutanée. Je le remercie pour toutes les idées qui ont permis l'avancement du travail, mais aussi pour tout le temps qu'il a consacré à ma formation, y inclus les innombrables corrections de rapports, d'articles et de la thèse.

J'adresse également ma reconnaissance au Professeur Michel Jadot pour avoir partagé ses connaissances sur les lysosomes et pour sa rigueur scientifique exemplaire.

Merci aux membres de mon jury de thèse pour avoir évalué ce travail, particulièrement au Dr Frédéric Van den Brûle pour avoir partagé son savoir sur les galectines.

Je voudrais remercier le Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accordant son soutien financier pendant quatre ans. Je remercie également les Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix qui m'ont accordé une bourse de six mois pour pouvoir terminer ce travail.

Merci à tout le staff du Département Histologie-Embryologie pour l'ambiance de travail extrêmement agréable, particulièrement à Françoise Herphelin pour son aide technique, mais aussi son soutien dans les moments difficiles. Merci aussi à Marc Sartor et à Ganka Atanasova pour leur aide technique. Merci au Dr Isabelle De Potter et à Frédéric Dupont pour les discussions scientifiques et autres, souvent moins sérieuses. Merci au Dr Annie Degen, à Raphaël Déom, à Patrick Glesner, au Prof. Michel Hérin, au Dr Michèle Leclercq-Smekens, à Ariane Messinne, à Conny Mathay, à Pascal Van Bel et à Daniel Van Vlaender pour leur sympathie, leur disponibilité et leur conseils.

Merci aux membres du département de Chimie Physiologique, aux membres de l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire, aux membres du département de Physiologie et Pharmacologie, et aux membres de l'Unité de Recherche en Biologie Moléculaire pour leur gentillesse et leur aide technique.

Un tout grand merci au Dr Virginie Santilman pour toutes les discussions scientifiques, orthographiques, grammaticales (*lingua franca difficilis est*) et autres, pour tous les moments inoubliables passés au labo et autre part, ainsi que pour tout le soutien, la patience et l'amour.

Take my hand
'Cause we're walking out of here
Oh, right out of here
Love is all we need here

The Space Between
What's wrong and right
Is where you'll find me hiding, waiting for you
The Space Between
Your heart and mine
Is the space we'll fill with time

Dave Matthews Band, *The Space Between*

Je tiens également à citer toutes les personnes étrangères aux Facultés qui m'ont aidé à réaliser ce travail, particulièrement les membres de Peenuts! (Jean-Claude, Sandy, Tosch, Sam, Luc et Patrick) pour m'avoir permis de me changer les idées et pour tous les moments musicaux splendides et autres que j'ai pu vivre avec eux. Merci aux copains luxembourgeois avec qui j'ai passé des instants mémorables à Namur, particulièrement Jean-Marc, Tom, Patrick, Fuuss et Richard. Merci aux amis que je vois trop rarement *in real life*, mais qui par ICQ ou IRC m'ont souvent apporté leur aide, particulièrement Marc et Josiane.

Je remercie également toute ma famille, particulièrement mes parents Annette et Guy, mes grand-parents Agnès, Lucie, Camille, et Jean (), et ma tante Eliane pour le soutien et l'affection sans lesquels je n'aurais pas pu réaliser ce travail.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	13
1 La peau	13
1.1 L'épiderme	14
1.1.1 Le kératinocyte épidermique	14
1.1.2 Le mélanocyte	17
1.1.3 La cellule de Langerhans	18
1.1.4 La cellule de Merkel	18
1.1.5 Les annexes épidermiques et le derme	18
1.1.6 La jonction épidermo-dermique.....	19
1.1.7 L'hypoderme	19
2 La différenciation épidermique.....	20
2.1 Définition	20
2.2 Etapes-clé de la différenciation épidermique	20
2.2.1 La prolifération et la différenciation précoce	20
2.2.2 La différenciation épidermique tardive et terminale	23
2.2.3 Caractérisation du phénotype des kératinocytes épidermiques à l'aide de l'expression de marqueurs de différenciation	26
2.3 Intervention des lysosomes et de composants lysosomaux au cours de la différenciation épidermique.....	27
2.3.1 Les lysosomes	27
2.3.2 Les protéines lysosomales.....	27
2.3.2.1 Les protéines lysosomales solubles	27
2.3.2.2 Les protéines lysosomales membranaires.....	31
2.3.3 Mécanismes de transport du matériel à dégrader vers les lysosomes	34
2.3.4 Exocytose de lysosomes.....	35
2.3.5 Implication des lysosomes au cours de la différenciation épidermique	36
3 La régulation de la différenciation épidermique par les ions calcium extracellulaires et par la signalisation dépendant des mitogen-activated protein kinases (MAPK)	41
3.1 Les modèles de culture des kératinocytes pour étudier la différenciation épidermique	41
3.1.1 Le modèle de culture de Rheinwald et Green (1975)	42
3.1.2 Le modèle de culture de Boyce et Ham (1983).....	43
3.1.3 Le modèle de culture en conditions autocrines (1991)	43
3.2 La régulation du phénotype des kératinocytes au cours de la différenciation épidermique	44
3.2.1 Intervention du calcium extracellulaire dans la régulation du phénotype des kératinocytes	44
3.2.2 Intervention des MAPK activées par les récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF et leurs ligands dans la régulation du phénotype des kératinocytes ..	47
3.2.2.1 Les récepteurs HER et leurs ligands	47
3.2.2.2 Mécanisme d'activation des récepteurs HER et transduction du signal ..	49
3.2.2.2.1 Liaison du ligand et oligomérisation	49
3.2.2.2.2 Transphosphorylation et propagation du signal	50
3.2.2.2.3 Activation des récepteurs HER sans intervention d'un ligand	51
3.2.2.3 Les récepteurs HER et la différenciation épidermique.....	52
3.2.2.3.1 Expression des récepteurs HER au cours de la différenciation épidermique ..	52
3.2.2.3.2 Effets de la signalisation liée aux récepteurs HER sur le phénotype des kératinocytes	53
3.2.2.3.2.1 Effets de la signalisation liée au récepteur de l'EGF	53
3.2.2.3.2.2 Effets de la signalisation liée à HER2 et HER3	55
3.2.2.4 Intervention des <i>mitogen-activated protein kinases</i> (MAPK) dans la régulation du phénotype des kératinocytes	55
3.2.2.4.1 Mécanismes d'activation des ERK	56

3.2.2.4.2	Intervention des ERK dans la régulation du phénotype des kératinocytes	58
3.2.2.4.3	Les MAP kinases p38 et leur intervention dans la régulation du phénotype des kératinocytes	58
3.2.3	Intervention du cholestérol dans la régulation du phénotype des kératinocytes	60
3.2.3.1	Les rafts lipidiques et la signalisation associée aux rafts	61
3.2.3.2	Implication des rafts au cours de la différenciation des kératinocytes	61
3.2.3.3	Utilisation de la méthyl- β -cyclodextrine pour étudier le rôle du cholestérol dans la physiologie du kératinocyte	62
3.2.3.3.1	Propriétés structurales et chimiques de la méthyl- β -cyclodextrine	62
3.2.3.3.2	Effets d'une incubation en présence de méthyl- β -cyclodextrine sur la signalisation cellulaire	63
4	Objectifs du travail	64
Matériel et Méthodes		66
1	Culture cellulaire	66
2	Analyse de la maturation et de la sécrétion de la cathepsine D et de la maturation de Lamp-1	68
2.1	Marquage métabolique	68
2.2	Immunoprécipitation et visualisation des protéines immunoprécipitées	68
3	Traitement des kératinocytes par l'ionomycine	69
4	Mesure de la cytotoxicité exercée par le traitement avec l'ionomycine	70
5	Détection de la formation d'enveloppes cornées	70
6	Etude des effets d'une entrée de calcium dans les kératinocytes sur la sécrétion de la cathepsine D	71
7	Dosage d'activités enzymatiques	71
8	Analyse de l'apparition de Lamp-1 et de Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique	72
8.1	Biotinylation de Lamp-1, Lamp-2 ou CD9 et précipitation des protéines biotinylées par la streptavidine-agarose	72
8.2	Détection par immunofluorescence de Lamp-1 ou de la kinésine au niveau de la membrane plasmique	76
9	Déplétion des kératinocytes en cholestérol	76
10	Mesure de la cytotoxicité exercée par le traitement avec la méthyl- β -cyclodextrine	77
11	Dosage du cholestérol	78
12	Détection morphologique du cholestérol	78
13	Détection des cellules apoptotiques	78
14	Détection des rafts lipidiques	78
15	Isolement des ARN poly-A et analyse de l'expression des ARN poly-A par Northern blot	79
16	Analyse de la phosphorylation des résidus tyrosine de protéines par Western blot	80
17	Analyse de la phosphorylation de HER3, de p38 α , de p38 β et de p38 δ	81
Chapitre 1 : Biosynthèse et sécrétion de la cathepsine D au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques. Effets d'une entrée de calcium sur le comportement des lysosomes dans les kératinocytes		83
1	Introduction	85
2	Résultats	85
2.1	Maturation et sécrétion de la cathepsine D dans les kératinocytes	85
2.2	Effets d'une incubation des kératinocytes en présence de chlorure d'ammonium sur la sécrétion de cathepsine D	88
2.3	Effet de l'ionomycine sur la production d'enveloppes cornées par les kératinocytes	90
2.4	Effets d'un traitement par l'ionomycine sur la morphologie des kératinocytes	91
2.5	Effets d'un traitement avec l'ionomycine sur la libération d'enzymes lysosomales solubles par les kératinocytes	93
2.5.1	Cathepsine C et β -galactosidase	93
2.5.2	Cathepsine D	98

2.6	Effets d'un traitement avec l'ionomycine sur l'apparition de protéines lysosomales membranaires au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes	100
3	Discussion.....	107
Chapitre 2	: Effets d'une déplétion en cholestérol sur la physiologie des kératinocytes.....	114
1	Introduction	116
2	Résultats.....	116
2.1	L'incubation de kératinocytes en présence de M β CD induit une déplétion en cholestérol.....	116
2.2	Effets d'une déplétion en cholestérol sur les rafts lipidiques	118
2.3	Effets d'une déplétion en cholestérol sur la différenciation des kératinocytes.....	121
2.4	Effets d'une déplétion en cholestérol sur l'état d'activation de récepteurs de la famille des HER	131
2.4.1	Effets de l'activation du récepteur de l'EGF sur l'expression de la kératine 10 et de l'involucrine	132
2.4.2	Activation du récepteur de l'EGF par une déplétion en cholestérol	132
2.4.3	Activation de HER2, mais pas de HER3 par une déplétion en cholestérol..	138
2.5	Effets d'une déplétion en cholestérol sur l'état d'activation de la MAP kinase p38	142
3	Discussion.....	150
Discussion générale et Perspectives	162	162
1	L'exocytose des lysosomes induite par l'entrée d'ions calcium dans les kératinocytes ..	162
1.1	Le calcium et l'exocytose de lysosomes au cours de la différenciation épidermique	163
1.2	Fonctions éventuelles des enzymes lysosomales sécrétées lors de l'exocytose de lysosomes.....	164
1.3	Fonctions éventuelles de Lamp-1 et Lamp-2 dans les kératinocytes	165
1.4	Le calcium et l'exocytose des corps lamellaires : absence de corrélation avec l'exocytose des lysosomes	166
1.5	L'exocytose de lysosomes et la réparation de la membrane plasmique.....	167
1.6	Implication possible du cholestérol dans l'exocytose de lysosomes.....	169
2	Le cholestérol et la physiologie des kératinocytes.....	169
2.1	Effets éventuels de l'activation du récepteur de l'EGF induite par une déplétion en cholestérol.....	172
2.2	L'activation de p38 suite à une déplétion en cholestérol et les protéines éventuellement associées à cette réponse.....	172
2.3	Implication éventuelle du cholestérol au cours de la différenciation épidermique .	174
2.4	Implication éventuelle du cholestérol dans le psoriasis, pathologie épidermique..	175
Publications.....	178	178
Bibliographie	180	180

Liste des abréviations

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

BSA : *bovine serum albumin*, albumine sérique bovine

DMSO : diméthylsulfoxyde

DTT : dithiothréitol

EDTA : éthylènediamine tétraacétate de sodium

EGTA : éthylèneglycol-0,0'-bis(aminoéthyl)-N,N,N',N' tétraacétate de sodium

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

GTP : guanosine tri-phosphate

HRP : *horseradish peroxidase*, peroxydase de raifort

kb : kilobases

kDa : kiloDalton

Lamp : *lysosome-associated membrane protein*, protéine associée à la membrane des lysosomes

Man 6-P : mannose 6-phosphate

PBS : *phosphate-buffered saline*, solution saline tamponnée au phosphate

RER : réticulum endoplasmique rugueux

RT-PCR : *reverse transcription-polymerase chain reaction*

SDS : dodécylsulfate de sodium

SDS-PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

SKALP : *skin-derived anti-leukoprotease*, inhibiteur de protéase de leukocytes dérivé de la peau

SPR : *small proline-rich proteins*, petites protéines riches en proline

TPA : 12-O-tétradecanoyl-phorbol-13-acétate

Introduction générale

1 *La peau*

La peau constitue un des plus grands organes du corps humain, présentant en moyenne une surface de 1,7 m² chez un individu adulte. La peau est constituée de trois zones: de l'extérieur vers l'intérieur, elle comporte l'**épiderme**, le **derme** et l'**hypoderme** (pour des revues sur le sujet, voir Eckert, 1989; Goldsmith, 1991; Eckert et al., 1997; Kanitakis, 2002).

L'épiderme, d'origine ectodermique, est constitué majoritairement de kératinocytes qui s'organisent en couches jointives. Le derme est un tissu conjonctif richement vascularisé et innervé. Il est caractérisé par une matrice extracellulaire élastique. Au sein de cette matrice sont ancrées les **annexes cutanées** dérivées de l'épiderme, notamment les glandes sudoripares, les follicules pileux et les glandes sébacées. L'hypoderme comporte des lobules adipeux entravés de tissu conjonctif. Les composants de la peau confèrent quatre fonctions essentielles à cet organe :

- établir une **barrière de protection** entre l'organisme et son environnement notamment par la couche épidermique, qui résiste contre les agressions physiques, chimiques et biologiques ;
- établir une **sensibilité** de l'organisme vis-à-vis de son environnement par la présence de terminaisons nerveuses;
- réguler la **température** corporelle par l'intermédiaire du tissu adipeux sous-cutané (isolation thermique) et des glandes sudoripares (perte de calories) ;

- participer au **métabolisme**, notamment par la synthèse de vitamine D au niveau de l'épiderme ou le stockage de triglycérides au niveau de l'hypoderme.

1.1 L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (EPSK). Représentant environ 90% de la population cellulaire, le kératinocyte est le type cellulaire majoritaire de l'épiderme. D'autres types cellulaires sont présents dans ce tissu, comme des cellules dendritiques (cellules de Langerhans), des cellules associées au système nerveux (cellules de Merkel) et des cellules pigmentaires (mélanocytes). L'épiderme est classé en deux types différents en fonction de son épaisseur. Le corps humain est majoritairement recouvert d'un EPSK de type B (ou mince) dont l'épaisseur varie entre 75 et 150 μm . Les endroits qui subissent des forces de friction importantes comme la paume des mains et la plante des pieds sont recouvertes par un EPSK de type A (ou épais) qui présente une épaisseur comprise entre 400 et 600 μm .

1.1.1 Le kératinocyte épidermique

En partant de la couche qui repose sur le derme vers la couche la plus externe, les kératinocytes subissent un processus de **différenciation** qui permet la distinction morphologique de quatre couches superposées, les couches basale, épineuse, granuleuse et cornée (fig. I-1).

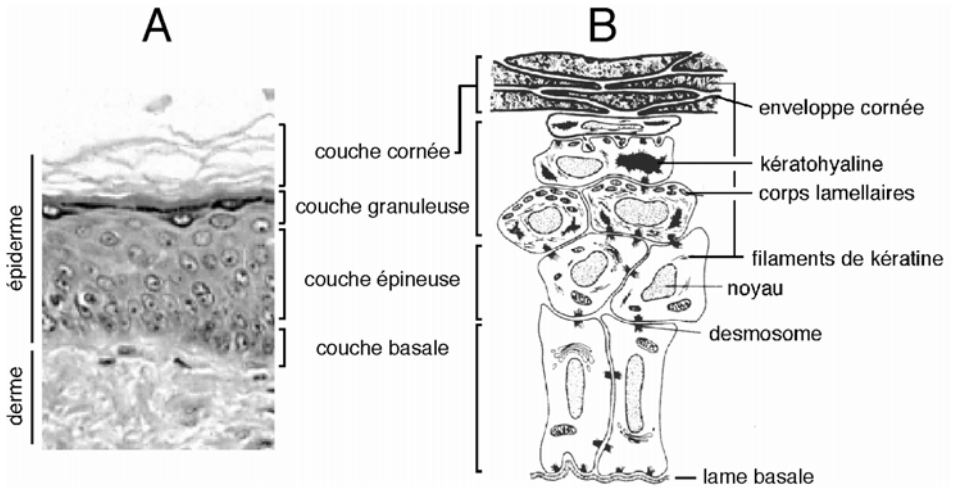


Fig. I-1 : (A) Observation en microscopie optique d'une coupe de peau humaine normale après coloration hématoxyline-érythrosine-safran ; (B) représentation schématique des kératinocytes au sein de l'épiderme d'après Eckert, 1989.

La **couche épidermique basale** contient des kératinocytes cylindriques non différenciés attachés au derme au niveau de la jonction épidermo-dermique par des jonctions d'ancrage nommées hémidesmosomes et contacts focaux (Burgeson & Christiano, 1997). Les cellules basales adjacentes sont reliées au niveau de jonctions membranaires appelées jonctions *adherens* (Ishiko et al., 2003) et desmosomes (Ishii & Green, 2001) (fig. I-2).

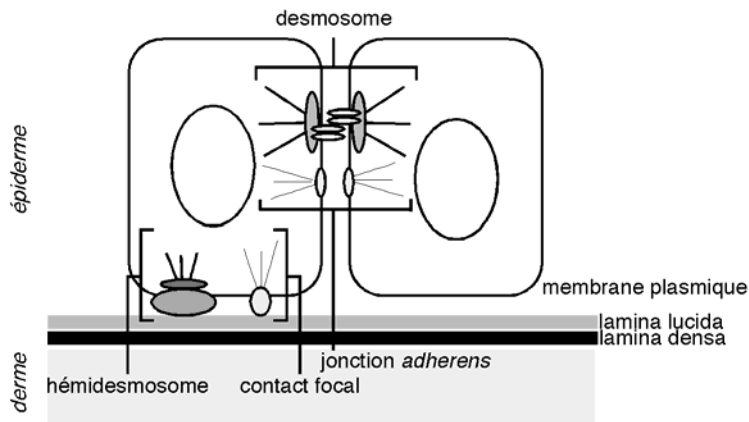


Fig. I-2 : Schéma représentant les structures d'attache intercellulaires des kératinocytes de la couche épidermique basale ainsi que les structures d'attache au derme sous-jacent.

Les kératinocytes de la **couche épineuse** forment 3 à 5 assises. Ces cellules sont plus grandes que les cellules de la couche basale et contiennent des faisceaux denses de filaments intermédiaires de kératine. En observant des coupes histologiques, l'abondance de desmosomes entre les kératinocytes donne lieu à une morphologie en épine des contours cellulaires, d'où le nom de couche épineuse. Les kératinocytes s'aplatissent au fur et à mesure qu'ils montent vers la couche granuleuse. Formée par 1 à 2 assises de kératinocytes aplatis, la **couche granuleuse** doit son nom au contenu des cellules en grains de kératohyaline. Les kératinocytes de la couche granuleuse contiennent également des corps lamellaires ou corps d'Odland, qui sont des vésicules d'origine golgienne remplies de lamelles lipidiques composées majoritairement de glucosylcéramides et de sulfate de cholestérol, mais aussi d'un mélange d'hydrolases lysosomales comme par exemple la lipase acide (Freinkel & Traczyk, 1985; Menon et al., 1992b; Vielhaber et al., 2001).

A ce niveau, les membranes plasmiques des kératinocytes contiennent des jonctions étanches de type *tight* (pour une revue, voir Morita & Miyachi,

2003). Avant de parvenir à la couche cornée, les kératinocytes subissent des modifications importantes. Les cellules s'aplatissent davantage, les organites cellulaires sont détruits par action enzymatique et le noyau devient pycnotique. Les filaments de kératine sont agrégés dans le cytosol par la filaggrine issue des grains de kératohyaline, tandis que d'autres protéines comme l'involucrine (Warhol et al., 1985) ou la loricrine et bien d'autres (Steinert & Marekov, 1995) sont conjuguées par la transglutaminase 1 pour former une enveloppe cornée sous-jacente à la membrane plasmique (Rice & Green, 1979; Michel & Demarchez, 1988). Les corps lamellaires fusionnent avec la membrane plasmique et déversent leur contenu dans l'espace extracellulaire. L'épaisseur de la **couche cornée** est variable selon la région corporelle. Au niveau de cette couche, les kératinocytes sont morts et appelés cornéocytes. 80% du contenu des cornéocytes est constitué par des kératines agrégées qui sont entourés par l'enveloppe cornée. A la surface du tissu, les cornéocytes perdent leurs liaisons intercellulaires et se détachent progressivement du tissu, donnant lieu au phénomène de **desquamation**.

1.1.2 Le mélanocyte

Les mélanocytes sont des cellules issues des crêtes neurales et qui se localisent dans la couche basale de l'épiderme au cours du développement. Ces cellules sont responsables de la synthèse et de la maturation de la mélanine à l'intérieur des mélanosomes, qui sont des organites spécialisés apparentés aux lysosomes (Orlow, 1995). Ces mélanosomes sont transférés aux kératinocytes voisins où ils sont dispersés dans le cytoplasme, afin de garantir la photoprotection du tissu épidermique (pour une revue, voir Seiberg, 2001).

1.1.3 La cellule de Langerhans

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques localisées au niveau des couches épidermiques basale et épineuse. Elles forment un réseau de cellules immunitaires chargées de présenter des antigènes exogènes au système lymphocytaire. Les cellules de Langerhans constituent ainsi la surveillance immunitaire de l'épiderme (pour une revue, voir Jakob et al., 2001).

1.1.4 La cellule de Merkel

Les cellules de Merkel sont originaires de la crête neurale et localisées au niveau de la couche épidermique basale. Ces cellules constituent des récepteurs qui, suite à une stimulation mécanique, transmettent ce signal à des fibres nerveuses (pour une revue, voir Halata et al., 2003).

1.1.5 Les annexes épidermiques et le derme

Les annexes épidermiques, c'est-à-dire les ongles, les follicules pileux, les glandes sudoripares et sébacées sont ancrées dans le derme. Le derme est un tissu conjonctif composé de fibroblastes et d'une matrice extracellulaire abondante, contenant des fibres de collagène, des fibres élastiques ainsi que des glycoprotéines et des protéoglycanes. Le derme est parcouru par de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que par des fibres nerveuses.

Le derme s'organise en deux structures différentes. Le **derme superficiel** ou papillaire, qui suit les circonvolutions de la couche basale épidermique, est un tissu conjonctif lâche riche en fibroblastes, en terminaisons nerveuses et en vaisseaux sanguins. Les cellules épidermiques sont nourries par diffusion de nutriments à partir des vaisseaux sanguins de ce tissu. Situé entre le

derme superficiel et l'hypoderme, le **derme profond** ou réticulaire est un tissu conjonctif dense pauvre en cellules et constitué d'épaisses fibres de collagène et de fibres élastiques.

1.1.6 La jonction épidermo-dermique

Au niveau des kératinocytes de la couche basale, l'épiderme est ancré au derme par la **jonction épidermo-dermique** ou **lame basale** (pour une revue, voir Burgeson & Christiano, 1997). Cette structure d'environ 100 nm d'épaisseur comporte quatre régions différentes. En partant de l'épiderme vers le derme, le **pôle basal des kératinocytes** contient les hémidesmosomes et les contacts focaux. Ces complexes protéiques constituent les points d'attache respectivement des filaments intermédiaires de kératine et des filaments d'actine avec les molécules de laminines de la **lamina lucida** sous-jacente. La **lamina densa** est une région qui relie ces laminines au collagène IV. Au niveau du derme superficiel, la lamina densa est attachée à des **plaques d'ancrage** composés de collagène VII. La jonction épidermo-dermique est d'une importance capitale pour la physiologie des kératinocytes épidermiques. Cette structure définit en effet la polarité de ces cellules, mais régule aussi la prolifération et de ce fait la migration et la différenciation des kératinocytes.

Au niveau de la jonction épidermo-dermique, la **laminine 5** (synonymes : épiligrine, nicéine, kalinine) participe à l'attachement de l'épiderme sur le derme par la liaison aux intégrines $\alpha3\beta1$ et $\alpha6\beta4$ des kératinocytes basaux (Rousselle et al., 1991; Nishiyama et al., 2000).

1.1.7 L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif cellulaire adipeux situé sous le derme. Ce tissu richement vascularisé contient en effet des lobules adipeux séparés

par des travées conjonctives. L'hypoderme intervient dans le stockage énergétique sous forme de triglycérides et assure également une protection thermique et mécanique.

2 La différenciation épidermique

2.1 Définition

Le terme 'différenciation' possède plusieurs significations lorsqu'il est appliqué aux kératinocytes épidermiques, pouvant mener à confusion (Watt, 1989). Dans le contexte du développement embryonnaire, la différenciation épidermique indique le processus du développement de la monocouche ectodermique en un épiderme fonctionnel à plusieurs couches. Dès le développement complet de l'épiderme, ce tissu est soumis à un renouvellement constant. La desquamation des kératinocytes au niveau de la couche cornée exige en effet le renouvellement de la population cellulaire de l'épiderme pour garantir l'homéostasie du tissu. Cette homéostasie est garantie par la prolifération de cellules souches au niveau de la couche basale épidermique. En passant par les couches suprabasales, les cellules-filles de ces cellules souches suivent le programme de différenciation épidermique.

2.2 Etapes-clé de la différenciation épidermique

2.2.1 La prolifération et la différenciation précoce

Les **kératinocytes de la couche basale** de l'épiderme sont morphologiquement homogènes, mais fonctionnellement hétérogènes. Les cellules souches sont caractérisées par une expression élevée d'intégrines de type $\beta 1$, mais aussi de type $\alpha 6$, et par un potentiel de division lent, mais illimité, ce qui les rend responsables du renouvellement continu de

l'épiderme au cours de la vie (Kaur & Li, 2000; Lavker & Sun, 2000; Watt & Hogan, 2000; Watt, 2001). Ces cellules souches donnent naissance aux **cellules amplificatrices transitoires** montrant une plus faible expression d'intégrines $\beta 1$ et $\alpha 6$. Ces cellules sont dotées d'une capacité mitotique rapide mais limitée (Jensen et al., 1999). Le détachement de la lame basale des cellules amplificatrices transitoires marque le début du processus de différenciation de ces cellules dans les couches suprabasales (Hotchin et al., 1995).

Les **intégrines** sont des protéines-récepteurs transmembranaires composées de sous-unités α et β . La coopération entre les deux sous-unités permet aux intégrines de se lier à différents ligands, dont certaines protéines de la matrice extracellulaire. Dans l'épiderme normal, l'expression des intégrines est réservée à la couche basale (pour une revue, voir Watt, 2002a). A ce niveau, les intégrines $\alpha 6 \beta 4$ sont des composants des **hémidesmosomes** et lient les kératinocytes à la laminine 5 au niveau de la jonction épidermo-dermique. Les autres intégrines les plus exprimées par les kératinocytes sont l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$, qui se lie au collagène IV, et l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$, qui se lie comme l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ à la laminine 5. Lors de l'entrée en contact avec leurs ligands, les intégrines de type $\beta 1$ s'agrègent en structures nommées **contacts focaux**. Ces structures sont composées des intégrines, leurs ligands et de plusieurs protéines cytoplasmiques, dont une partie permettent l'ancrage des filaments d'actine sur les contacts focaux (Wehrle-Haller & Imhof, 2002). D'autres protéines associées aux contacts focaux sont des protéines de signalisation, qui permettent aux intégrines de communiquer l'état de l'adhérence à la matrice extracellulaire au kératinocyte (Schaller et al., 1992). Lorsque les kératinocytes de la couche épidermique basale se

détachent de la lame basale, les intégrines de type $\beta 1$ sont endocytées et dégradées dans les lysosomes des kératinocytes (Hotchin et al., 1995).

En plus de l'expression d'intégrines spécifiques, les kératinocytes de la couche basale se caractérisent par l'expression d'une paire spécifique de **filaments intermédiaires de kératine**, notamment les kératines 5 et 14 (Moll et al., 1982). Les kératines sont des protéines fibreuses formées d'hélices α et classées en kératines acides, ou de type I (1 à 8) et en kératines basiques, ou de type II (9 à 20) (Steinert et al., 1985; Albers & Fuchs, 1992). Une kératine acide et une kératine basique forment une unité de base hétérodimérique qui résulte de l'enroulement de la région en hélice α des deux kératines. Deux dimères s'alignent en position tête-bêche pour former une unité tétramérique de 70 nm de longueur. L'assemblage de tétramères forme de manière successive le protofilament, dont l'assemblage forme les protofibrilles, qui à leur tour forme le filament intermédiaire d'une épaisseur de 10 nm (Steven et al., 1983; Coulombe & Fuchs, 1990; Steinert et al., 1993). Selon le stade de différenciation des kératinocytes, les **kératines épidermiques** peuvent représenter de 30% à 85% des protéines cellulaires. Au niveau de la couche basale, les filaments intermédiaires de kératine sont attachés aux hémidesmosomes des kératinocytes pour assurer l'adhérence à la matrice extracellulaire au niveau de la jonction épidermo-dermique, par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$. Dans toutes les couches épidermiques, les filaments intermédiaires sont reliés aux desmosomes pour assurer la cohésion intercellulaire. Les différentes kératines épidermiques montrent un profil d'expression qui permet de classer les kératinocytes selon la localisation histologique et l'état de différenciation (Moll et al., 1982). En effet, une fois que les kératinocytes amplificateurs transitoires migrent dans la **couche épineuse** épidermique, l'expression des kératines 5 et 14 est arrêtée en faveur de l'expression des kératines suprabasales 1 et 10.

Les kératinocytes de la couche épineuse contiennent de nombreux **desmosomes** (fig. I-3), garantissant la cohésion intercellulaire de cette couche.

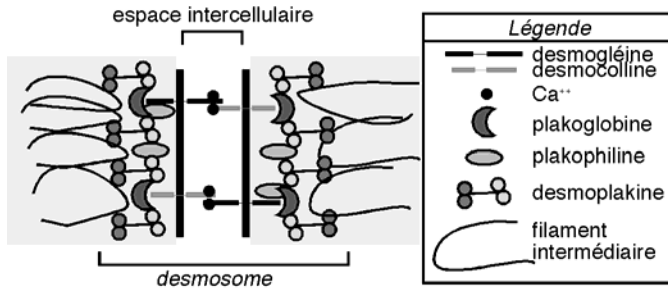


Fig. I-3 : Représentation schématique des principaux constituants d'un desmosome.

Les desmosomes sont des structures symétriques reliant les filaments intermédiaires de kératine de kératinocytes adjacents. Ces filaments s'attachent aux protéines desmogléine et desmocolline, appelées cadhérines, par l'intermédiaire de la desmoplakine, de la plakophiline et de la plakoglobine. L'interaction des cadhérines dans l'espace intercellulaire dépend de la présence d'ions calcium (Ishii & Green, 2001).

2.2.2 La différenciation épidermique tardive et terminale

Au niveau de la **couche granuleuse**, les kératinocytes s'aplatissent et se disposent de manière parallèle à la surface cutanée. Les cellules de la couche granuleuse produisent de nombreux **grains de kératohyaline**, composés principalement de la profilaggrine d'environ 300 kDa, qui est une protéine phosphorylée riche en résidus histidine et représente le précurseur de la filaggrine (Ishida-Yamamoto et al., 1999). Les cellules contiennent également des vésicules d'origine golgienne nommées **corps lamellaires** ou corps d'Odland, apparaissant dans la couche épineuse supérieure. Ces organites spécialisés contiennent des lamelles lipidiques composées majoritairement de glucosylcéramides et de sulfate de cholestérol, mais aussi un mélange d'hydrolases lysosomales (Freinkel & Traczyk, 1985; Menon et

al., 1992b; Vielhaber et al., 2001). Grâce à cette dernière propriété, les corps lamellaires ont été considérés comme des lysosomes spécialisés. Au niveau de la couche granuleuse, les cellules expriment les **protéines précurseurs de l'enveloppe cornée**, comme l'involucrine (Warhol et al., 1985), la loricrine, les protéines *small proline-rich* (SPR), la cystatine α et la *skin-derived anti-leukoprotease* (SKALP), aussi appelée élafine (Steinert & Marekov, 1995). La transglutaminase 1 qui constitue l'enzyme de conjugaison de ces protéines au niveau de la transition entre les couches granuleuse et cornée est également exprimée à ce niveau.

L'involucrine est une protéine possédant un poids moléculaire de 68 kDa. La structure de la protéine comporte un domaine central riche en résidus glutamine (Eckert & Green, 1986), qui sont impliqués dans la formation de liaisons covalentes avec d'autres protéines précurseurs de l'enveloppe cornée par l'intermédiaire de la transglutaminase épidermique (Steinert & Marekov, 1995). Le gène de l'involucrine a été localisé sur le chromosome 1q21. En plus de l'involucrine, cette région comporte plusieurs gènes dont les produits sont associés avec les étapes tardives de la différenciation épidermique, comme par exemple la loricrine ou la filaggrine (Volz et al., 1993).

Le promoteur de l'involucrine a été caractérisé en détail. Plusieurs auteurs ont notamment identifié les éléments de réponse qui induisent l'expression génique de l'involucrine suite à un traitement de kératinocytes avec des esters de phorbol (Takahashi & Iizuka, 1993; Efimova & Eckert, 2000; Dashti et al., 2001a; Crish et al., 2002; Efimova et al., 2002; Efimova et al., 2003), avec des concentrations élevées (2 mM) en calcium (Lopez-Bayghen et al., 1996; Bikle et al., 2001) ou avec la vitamine D (Bikle et al., 2002). L'AP-1 est un facteur de transcription formé par la dimérisation de produits

de la famille des oncogènes *fos* et *jun* (Rauscher et al., 1988). Le promoteur de l'involucrine possède cinq sites de reconnaissance pour l'AP-1, mais seulement les sites proximal et distal répondent aux esters de phorbol (Welter et al., 1995) tandis que seul le site distal répond à une élévation de la concentration en calcium (Ng et al., 2000). Le site AP-1 situé dans la région régulatoire distale du promoteur de l'involucrine est nécessaire pour l'expression épidermique normale de cette protéine (Crish et al., 1998; Crish et al., 2002).

A l'**interface entre les couches granuleuse et cornée**, les kératinocytes subissent d'importantes modifications. Les cellules suivent un programme de mort cellulaire progressive, caractérisé par la pycnose du noyau ainsi que la lyse des organites subcellulaires. L'entrée d'ions calcium dans les cellules induit l'activation de la transglutaminase 1, provoquant la **synthèse d'enveloppes cornées** en conjuguant des protéines comme l'involucrine, la loricrine et les protéines SPR en-dessous de la membrane plasmique. Il y a également **déphosphorylation et clivage de la profilaggrine** pour former la filaggrine, dont la forme mature a un poids moléculaire de 37 kDa. Cette filaggrine catalyse la formation de ponts disulfure entre les filaments intermédiaires, engendrant un réseau dense de filaments de kératine. La filaggrine est ensuite dégradée en peptides et acides aminés qui sont impliqués dans l'hydratation des couches épidermiques supérieures (Presland et al., 2000). Les kératinocytes de la couche cornée sont des cellules mortes constituées à 95% de protéines complexées et pouvant être comparées à des briques. En microscopie électronique, on peut observer **l'exocytose de corps lamellaires** à l'interface entre les couches granuleuse et cornée, libérant les lamelles lipidiques et les enzymes lysosomales dans l'espace extracellulaire. A ce niveau, le pH épidermique est acide (± 5) (Ohman & Vahlquist, 1994), constituant un environnement dans lequel

l'activité des enzymes lysosomales est optimale. Les glucosylcéramides sont transformés en céramides par la β -glucocérébrosidase (Takagi et al., 1999; Hamanaka et al., 2002). Cette transformation des lipides est nécessaire pour garantir la **formation d'une barrière lipidique imperméable**. Les lipides sécrétés et transformés s'attachent de manière covalente à l'involucrine de l'enveloppe cornée, formant ainsi le ciment entre les briques constituées par les kératinocytes de la couche cornée (Lazo & Downing, 1999). D'autres enzymes lysosomales, comme par exemple la cathepsine D (Horikoshi et al., 1999), peuvent se retrouver dans l'espace intercellulaire de la couche cornée et dégrader les desmosomes, favorisant dès lors la **desquamation des kératinocytes à la surface de l'épiderme**.

2.2.3 Caractérisation du phénotype des kératinocytes épidermiques à l'aide de l'expression de marqueurs de différenciation

Comme décrit dans les deux paragraphes précédents, le phénotype des kératinocytes est modifié de manière importante au cours de la différenciation épidermique. Le phénotype des kératinocytes peut être classé selon l'expression de certains gènes, permettant d'identifier des cellules non différenciées, des cellules en différenciation précoce ainsi que des cellules en différenciation tardive. Les cellules non différenciées de la couche épidermique basale expriment les kératines 5 et 14 (Moll et al., 1982). L'expression de ces kératines est éteinte en faveur des kératines 1 et 10 lors de l'entrée des kératinocytes en différenciation au niveau de la couche épineuse (fig. I-4). Les étapes tardives de ce processus sont notamment caractérisées au niveau de la couche épineuse supérieure et au niveau de la couche granuleuse par l'induction de l'expression de l'involucrine (Eckert & Green, 1986).

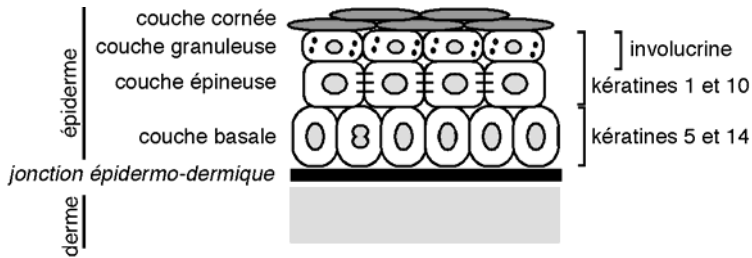


Fig. I-4 : Représentation schématique de la régulation de l'expression des kératines 5 et 14, des kératines 1 et 10 et de l'involucrine au cours de la différenciation épidermique.

2.3 Intervention des lysosomes et de composants lysosomaux au cours de la différenciation épidermique

Dans cette section, nous présentons les lysosomes et nous précisons les rôles évoqués pour ces organites au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques.

2.3.1 Les lysosomes

Les lysosomes constituent le principal compartiment de dégradation des cellules eucaryotes (pour des revues, voir Kornfeld & Mellman, 1989). Ces organites sont limités par une membrane à bicouche phospholipidique dans laquelle sont insérées plusieurs protéines membranaires spécifiques. La fonction de dégradation est assurée par les enzymes contenues dans la lumière des lysosomes. Ces enzymes sont regroupées sous le terme d'hydrolases acides.

2.3.2 Les protéines lysosomales

2.3.2.1 Les protéines lysosomales solubles

Une cinquantaine d'hydrolases lysosomales ont été identifiées (pour une revue, voir von Figura & Hasilik, 1986). Ces enzymes sont capables de

dégrader la majorité des macromolécules biologiques. Les acides nucléiques sont dégradés par des nucléases, les lipides par des lipases, les polysaccharides par des glycosidases, et les protéines par des protéases (voir tableau I-I pour une classification des hydrolases citées dans cette étude). Les enzymes lysosomales sont toutes solubles sauf la β -glucocérébrosidase qui est ancrée dans la membrane.

Protéases	Glycosidases	Lipases
cathepsine B	β -galactosidase	β -glucocérébrosidase
cathepsine C	β -glucocérébrosidase	
cathepsine D	hyaluronidase	
cathepsine L		
cathepsine S		

Tableau I-I : Hydrolases lysosomales citées dans notre travail.

La β -glucocérébrosidase est classée dans les glycosidases et les lipases parce qu'elle hydrolyse la liaison entre glucose et céramide des glucosylcéramides.

Au cours de la **biosynthèse** des enzymes lysosomales solubles, le transport des enzymes vers les lysosomes peut être effectué par l'intermédiaire de deux mécanismes différents (pour des revues, voir Erickson, 1989; Kornfeld & Mellman, 1989). Le mécanisme le mieux caractérisé implique la **voie dépendante du mannose 6-phosphate** (Man 6-P), mais certaines enzymes semblent être capable de suivre une **voie indépendante du mannose 6-phosphate** pour atteindre les lysosomes. Les enzymes qui suivent la voie dépendante du Man 6-P sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, et subissent l'ajout d'oligosaccharides N-liés de façon cotranslationnelle. Les chaînes oligosaccharidiques de type haut-mannose ou hybride sont modifiées dans l'appareil de Golgi par l'action d'une phosphotransférase (UDP-GlcNAc, enzyme lysosomale N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase), qui effectue le transfert d'un groupement N-acétylglucosamine-1-phosphate sur le carbone en position 6 des résidus mannose des oligosaccharides N-liés (Bao et al., 1996). Dans le réseau transgolgien, une enzyme de démasquage

(N-acétylglucosamine-1-phosphodiester-N-acétylglucosaminidase) rompt la liaison entre la N-acétylglucosamine et le phosphate, dévoilant ainsi les résidus Man 6-P (Rohrer & Kornfeld, 2001).

Au niveau du réseau transgolgien, le signal Man 6-P est reconnu par deux récepteurs du Man 6-P, le CI-MPR (*cation-independent Man 6-P receptor*) et le CD-MPR (*cation-dependent Man 6-P receptor*) (pour une revue, voir Dahms & Hancock, 2002). Les enzymes lysosomales liées aux MPR quittent le réseau transgolgien dans des vésicules recouvertes de clathrine, protéine fibreuse établissant un réseau autour de la vésicule. Auparavant, on pensait que les interactions entre les queues cytoplasmiques des MPRs et le complexe de protéines adaptatrices AP-1 permettaient l'assemblage des couvertures de clathrine sur les vésicules bourgeonnant à partir du réseau transgolgien (Dell'Angelica & Payne, 2001). Bien qu'un rôle d'AP-1 ne puisse être exclu, des études récentes suggèrent que des membres de la famille des protéines GGA (*Golgi-localized, γ ear-containing, ARF-binding*) plutôt que l'AP-1 constituent la liaison entre MPRs et clathrine (pour une revue, voir Bonifacino, 2004). Lorsque les MPRs parviennent aux endosomes, la liaison entre les enzymes et les récepteurs du Man 6-P est rompue par le pH acide qui règne dans ces vésicules. Les récepteurs du Man 6-P sont recyclés vers le réseau transgolgien, tandis que les enzymes continuent leur acheminement vers les lysosomes.

Signalons qu'une augmentation du pH intravésiculaire par l'intermédiaire de molécules comme par exemple le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) empêche la rupture de la liaison du récepteur du Man 6-P à l'enzyme lysosomale, induisant progressivement une saturation des récepteurs et l'arrêt du recyclage des récepteurs vers le réseau transgolgien (Gonzalez-Noriega et al., 1980; Maxfield, 1982). Dans ce cas, les enzymes destinées au transport

par la voie dépendante du Man 6-P ne sont plus pris en charge par les récepteurs du Man 6-P. Ces enzymes peuvent alors suivre la voie de la sécrétion classique pour être sécrétées dans l'espace extracellulaire ou suivre une voie indépendante du Man 6-P pour être transportées aux lysosomes (Capony et al., 1989; Capony et al., 1994).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le transport des enzymes vers les lysosomes (pour une revue, voir Mullins & Bonifacino, 2001). A partir des vésicules de transport émergeant du Golgi, des organites faisant partie des voies d'endocytose et de sécrétion (endosomes précoces, vésicules de transport endosomales ou corps multivésiculaires, endosomes tardifs) peuvent intervenir dans la biogénèse des lysosomes. Lors du processus hypothétique de maturation, les endosomes précoces sont transformés en endosomes tardifs, puis en lysosomes par l'intermédiaire d'un échange vésiculaire avec l'appareil de Golgi. La seconde hypothèse met en jeu un transport vésiculaire entre les endosomes, les lysosomes et des compartiments stables comme l'appareil de Golgi, par l'intermédiaire de vésicules de transport endosomales. La troisième hypothèse est appelée *kiss-and-run* et propose l'existence de fusions et de fissions répétées entre endosomes et lysosomes pour l'échange de matériel. La quatrième hypothèse étend l'hypothèse précédente en proposant l'existence d'organites hybrides issus de la fusion entre endosomes et lysosomes. Ces organites hybrides reformeraient ensuite des lysosomes suite à un processus de condensation.

L'existence d'une ou plusieurs **voies indépendantes du Man 6-P** a été proposée lorsqu'il a été trouvé que certaines enzymes lysosomales peuvent être correctement ciblées vers les lysosomes quand les enzymes ne peuvent pas suivre la voie dépendante du Man 6-P (Sly, 2000). Les mécanismes des voies indépendantes du Man 6-P sont encore mal connus, mais le transport

via ces voies pourrait faire intervenir une association membranaire transitoire indépendante du Man 6-P. Une telle association a en effet été mise en évidence au cours du transport de la cathepsine C (Burge et al., 1991) et de la cathepsine D (Diment et al., 1988; Rijnboutt et al., 1991a; Rijnboutt et al., 1991b; Capony et al., 1994) vers les lysosomes.

2.3.2.2 Les protéines lysosomales membranaires

Plusieurs protéines membranaires ont été identifiées spécifiquement au niveau de la membrane lysosomale (pour des revues, voir Fukuda, 1991; Fukuda, 1994; Eskelinen et al., 2003). L'acidité des lysosomes est générée par une H^+ /ATPase située au niveau de la membrane lysosomale. Cette enzyme promeut la translocation de protons dans la lumière lysosomale par l'intermédiaire du clivage d'une molécule d'ATP. Le transport de métabolites de la lumière lysosomale vers le cytosol est assuré par plusieurs transporteurs membranaires.

Plus de la moitié des protéines lysosomales membranaires est constituée par des glycoprotéines d'un poids moléculaire situé entre 90 et 120 kDa qui présentent un petit domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un grand domaine luminal portant un nombre important de chaînes oligosaccharidiques, dont majoritairement des chaînes de N-acétyllactosamine. Les représentants majeurs de ce type de protéines sont les *lysosome-associated membrane proteins* (Lamp) 1 et 2 (Mane et al., 1989) (voir tableau I-II pour un résumé des glycoprotéines lysosomales membranaires identifiées jusqu'à présent).

Nom	Synonymes
Lamp-1	CD107a, Limp III, lgp120, lgp107, LEP100
Lamp-2	CD107b, lgp110, lgp96, Limp IV
CD63	Lamp-3, Limp I, ME491
Limp 2	lgp85, Limp II

Tableau I-II : Glycoprotéines de la membrane lysosomale (Fukuda, 1991; Fukuda, 1994; Eskelinen et al., 2003)

Des noms différents ont été attribués aux glycoprotéines lysosomales membranaires en fonction de l'espèce dans laquelle elles ont été identifiées. Par exemple, Lamp-1 désigne la protéine humaine tandis que lgp120 désigne la protéine homologue de rat (Lewis et al., 1985) (Lamp=lysosome-associated membrane protein, CD=cluster of differentiation, Limp=lysosomal integral membrane protein, lgp=lysosomal glycoprotein, LEP=lysosomal, endosomal, plasma membrane protein, ME=melanoma-associated antigen)

Biosynthèse des Lamps. Les Lamps sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique, où elles sont cotraductionnellement glycosylées et insérées en membrane. Ensuite, ces protéines traversent l'appareil de Golgi et sont transportées aux lysosomes. Il est relativement bien établi que le transport lysosomal des Lamps dépend de la séquence et de l'emplacement d'un motif peptidique basé sur la présence d'une tyrosine dans le domaine cytoplasmique (Williams & Fukuda, 1990; Guarnieri et al., 1993; Honing et al., 1996; Hunziker & Geuze, 1996; Rohrer et al., 1996). Les Lamps peuvent être transportés directement à partir du réseau transgolgien vers les lysosomes dans des vésicules recouvertes de clathrine du même type que les vésicules servant à transporter des enzymes lysosomales solubles (Honing et al., 1996; Ohno et al., 1996). Plus récemment, un type de vésicules différent pouvant transporter les Lamps vers les lysosomes a été identifié (Karlsson & Carlsson, 1998). Le complexe adaptateur AP-3 peut médier le transport lysosomal des Lamps (Le Borgne et al., 1998). Il manque cependant plusieurs informations pour établir des hypothèses plus concrètes sur le transport lysosomal intracellulaire des Lamps.

Le transport indirect des Lamps vers les lysosomes fait intervenir le transport des protéines à partir du réseau transgolgien vers la membrane plasmique, suivi d'un transport de la membrane plasmique vers le compartiment endolysosomal par endocytose (Lippincott-Schwartz & Fambrough, 1987; Williams & Fukuda, 1990; Nabi et al., 1991; Mathews et al., 1992). Ce transport indirect vers les lysosomes ne s'applique aux Lamps que dans des conditions inhabituelles, par exemple lorsque les Lamps sont surexprimées ou lorsque le motif peptidique responsable du ciblage lysosomal a été muté. Dans ces cas, une certaine proportion des Lamps apparaît au niveau de la membrane plasmique et suit ensuite la voie de l'endocytose pour aboutir aux lysosomes (Harter & Mellman, 1992; Honing & Hunziker, 1995). Une apparition de Lamp-1 au niveau de la membrane plasmique a également été détectée dans des phénotypes cellulaires particuliers, par exemple dans des plaquettes sanguines activées (Febbraio & Silverstein, 1990), mais aussi dans des cellules de carcinome embryonnaire murin suite à l'induction de la différenciation (Amos & Lotan, 1990).

L'expression des Lamps est ubiquitaire (Eskelinen et al., 2003). Dans notre travail de mémoire de licence, nous avons montré que les kératinocytes épidermiques expriment Lamp-1 et Lamp-2 (Jans, 1999).

Fonctions des Lamps. Depuis la découverte des Lamps, l'opinion générale a été que les Lamps pourraient protéger la membrane lysosomale contre la dégradation enzymatique grâce aux chaînes oligosaccharidiques, puisque les chaînes oligosaccharidiques portées par Lamp-1 et Lamp-2 les protègent contre l'hydrolyse intralysosomale (Kundra & Kornfeld, 1999; Eskelinen et al., 2003). Lamp-2 peut jouer un rôle de récepteur pour médier l'autophagie, c'est-à-dire le transport de protéines endogènes aux lysosomes (voir § 2.3.3 et Cuervo & Dice, 1998). Tandis que des souris *knock-out* pour le gène de

Lamp-1 sont viables et fertiles (Andrejewski et al., 1999), des souris *knock-out* pour le gène de Lamp-2 présentent une mortalité élevée et des anomalies sévères dues à l'accumulation de vacuoles d'autophagie dans les cellules musculaires striées et cardiaques (Tanaka et al., 2000). De manière similaire à ces souris, on a observé une accumulation de vésicules d'autophagie dans les cellules musculaires striées et cardiaques de sujets atteints par la maladie de Danon. Cette pathologie héréditaire humaine est liée à des mutations dans le gène de Lamp-2 (Nishino et al., 2000). Notons que dans le rat normal, une activité autophagique a été détectée dans les tissus musculaires (Bahro et al., 1992). Il est dès lors possible que l'autophagie médiée par Lamp-2 soit nécessaire pour le bon fonctionnement des cellules musculaires striées et cardiaques en conditions normales (Eskelinen et al., 2002).

2.3.3 Mécanismes de transport du matériel à dégrader vers les lysosomes

L'endocytose permet le transport de matériel extracellulaire et de composants de la membrane plasmique aux lysosomes. L'endocytose dépendante de la clathrine par l'intermédiaire de récepteurs membranaires est le mécanisme le mieux caractérisé parmi les multiples mécanismes endocytotiques identifiés jusqu'à présent (pour une revue, voir Gruenberg, 2001). Au niveau de la membrane plasmique, les complexes ligand-récepteur sont endocytés dans des vésicules recouvertes de clathrine. Ces vésicules sont transportées aux endosomes précoces, situés à proximité de la membrane plasmique. Le pH acide au sein de ces organites permet généralement la dissociation des complexes ligand-récepteur. Les molécules endocytées dans les endosomes précoces sont recyclées vers la membrane plasmique ou transportées vers les endosomes tardifs et les lysosomes pour être dégradées.

Grâce à l'**autophagie**, les cellules peuvent dégrader des macromolécules endogènes, mais aussi des organites subcellulaires. La dégradation de ces organites peut avoir lieu lorsqu'ils ont été endommagés ou lorsque la cellule subit un remodelage important, par exemple lors d'un processus de différenciation. Parmi les mécanismes d'autophagie identifiés jusqu'à présent (pour une revue, voir Cuervo, 2004), évoquons l'autophagie par l'intermédiaire de protéines chaperonnes, qui permet de dégrader de manière sélective des protéines cytosoliques. Ces protéines destinées à la dégradation lysosomale contiennent un motif de liaison pentapeptidique (KFERQ) par lequel elles se lient à la queue cytoplasmique de Lamp-2, qui semble jouer un rôle de récepteur. Ce processus nécessite la liaison de protéines chaperonnes (telles que la protéine *heat shock cognate* hsc73, et les protéines *heat shock* hsp90 et hsp40) à la protéine destinée à l'autophagie (Cuervo & Dice, 1996; Cuervo, 2004).

2.3.4 Exocytose de lysosomes

Les lysosomes ont été longtemps considérés comme un compartiment terminal, mais des études récentes suggèrent que les cellules eucaryotes possèdent une machinerie qui permet l'exocytose de lysosomes. Des fibroblastes et des cellules épithéliales réalisent l'exocytose d'une proportion de leurs lysosomes, plus précisément les lysosomes proches de la membrane plasmique (Jaiswal et al., 2002), suite à une entrée d'ions calcium extracellulaires (Rodriguez et al., 1997; Andrews, 2000; Reddy et al., 2001; Andrews, 2002; Jaiswal et al., 2002). La synaptotagmine VII est une protéine de la membrane lysosomale possédant deux domaines de liaison aux ions calcium. Cette protéine régule l'exocytose de lysosomes suite à une entrée d'ions calcium dans des cellules épithéliales (Martinez et al., 2000). Au niveau de la membrane plasmique, la synaptotagmine VII interagit avec

les protéines adaptatrices SNAP(*synaptosome-associated protein*)-23 et syntaxine 4 (Rao et al., 2004).

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour comprendre le rôle physiologique qui peut être joué par l'exocytose des lysosomes suite à une entrée d'ions calcium dans les cellules. Ce phénomène pourrait être nécessaire pour que la cellule puisse excréter du matériel non-digéré dans ces organites et ainsi s'en débarrasser dans le milieu extracellulaire. Une autre possibilité supportée par un nombre croissant d'études serait que l'exocytose des lysosomes périphériques assure la **réparation de la membrane plasmique** lorsque celle-ci a été endommagée. En effet, des microruptures au niveau de la membrane plasmique induisent une entrée d'ions calcium dans les cellules. Les membranes lysosomales incorporées dans la membrane plasmique lors de l'exocytose apportent probablement les phospholipides et autres composants membranaires nécessaires à la reconstitution d'une barrière membranaire complète (Reddy et al., 2001; Jaiswal et al., 2002; McNeil, 2002; McNeil & Steinhardt, 2003; Meldolesi, 2003; Miyake & McNeil, 2003).

2.3.5 Implication des lysosomes au cours de la différenciation épidermique

On sait depuis longtemps que les kératinocytes épidermiques contiennent des lysosomes à tous les stades de différenciation (Rowden, 1975). Bien sûr, certains rôles de dégradation intracellulaire ont été attribués aux lysosomes des kératinocytes en différenciation. Ces organites sont par exemple responsables de la dégradation intracellulaire des intégrines $\beta 1$ dans les kératinocytes qui quittent la couche basale (Hotchin et al., 1995). Dans les kératinocytes en culture, l'hyaluronan subit une endocytose rapide après sa sécrétion et est transporté aux lysosomes pour être dégradé par

l'**hyaluronidase**, ce qui permet aux kératinocytes de réguler l'expression de ce protéoglycan (Tammi et al., 2001). Des souris, dont le gène de la **cathepsine L** est muté de façon telle que l'activité de l'enzyme est perturbée, montrent une perte du pelage correspondant aux phénotypes *furless* ou *nackt*, ainsi qu'une hyperplasie épidermique. La cathepsine L semble jouer un rôle critique dans la morphogenèse du follicule pileux et pourrait être impliquée dans la régulation de la différenciation des kératinocytes (Roth et al., 2000; Benavides et al., 2002; Tobin et al., 2002). Par l'intermédiaire de la protéase **cathepsine S**, les kératinocytes sont capables d'assumer un rôle immunitaire dans des conditions inflammatoires. La cathepsine S clive des antigènes endocytés afin de présenter les fragments d'antigènes aux cellules du système immunitaire par l'intermédiaire des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (Schwarz et al., 2002). Au niveau de la transition entre les couches granuleuse et cornée, la **β -glucocérébrosidase** hydrolyse les glucosylcéramides en céramides, contribuant ainsi à la formation de la barrière lipidique cutanée (Takagi et al., 1999).

D'autres rôles de dégradation lysosomale au cours de la différenciation des kératinocytes restent à être élucidés. Récemment, des chercheurs ont identifié des mutations dans le gène de la **cathepsine C** qui sont à l'origine d'une pathologie épidermique, le syndrome de Papillon-Lefèvre (Lefevre et al., 2001; Nakano et al., 2001). Cette pathologie est caractérisée par des hyperkératoses, c'est-à-dire des épaissements anormaux de l'épiderme, situées majoritairement au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds. Ces symptômes cutanés suggèrent que la cathepsine C est impliquée par un mécanisme encore inconnu dans la régulation de la différenciation épidermique (Nakano et al., 2001).

L'activité de la **β -galactosidase** au sein de l'épiderme a été décrite comme étant de loin supérieure à l'activité d'autres glycosidases épidermiques (Mier & van den Hurk, 1975b) ainsi qu'à l'activité de la β -galactosidase dans d'autres épithéliums (Chang et al., 1991). Une activité de la β -galactosidase accrue par rapport à la normale a été détectée dans les kératinocytes en sénescence (Dimri et al., 1995; Bregegere et al., 2003). Ces observations suggèrent une implication particulière de la β -galactosidase dans la physiologie des kératinocytes épidermiques, peut-être au niveau de la régulation du phénotype sénescence.

La **cathepsine D** est une protéase lysosomale soluble (Barrett, 1977). Au cours de sa **biosynthèse**, la cathepsine D subit un processus de maturation protéolytique bien caractérisé. Cette enzyme est synthétisée dans le réticulum endoplasmique sous une forme précurseur de 52 kDa. Au cours du transport vers les lysosomes, cette forme est clivée dans un compartiment prélysosomal pour donner lieu à une forme intermédiaire de 48 kDa. Une proportion variable de forme précurseur peut échapper au ciblage vers les lysosomes et être sécrétée (Gieselmann et al., 1983; Hasilik, 1992). La forme intermédiaire est clivée en une forme mature lysosomale de 31 kDa et un fragment de 14 kDa (Gieselmann et al., 1983; Hasilik, 1992; Rijnbout et al., 1992). Bien que la forme précurseur n'exerce pas d'activité protéolytique (Hasilik et al., 1982; Capony et al., 1987), elle peut subir un phénomène d'autoactivation à pH acide (Hasilik et al., 1982; Smarel et al., 1986; Capony et al., 1987; Conner & Richo, 1992). La forme intermédiaire et la forme mature seraient les formes constitutivement actives (Huang et al., 1979; Conner & Richo, 1992).

Transport de la cathepsine D. La cathepsine D peut acquérir le signal Man 6-P sur des résidus mannose se trouvant dans les deux chaînes

saccharidiques portées par le précurseur de l'enzyme. Ce signal permet à la cathepsine D de suivre la voie dépendante du Man 6-P pour atteindre les lysosomes (Erickson, 1989; Kornfeld & Mellman, 1989). Dans plusieurs types cellulaires, cette enzyme peut également suivre une voie indépendante du Man 6-P par l'intermédiaire d'une association membranaire transitoire indépendante des récepteurs du Man 6-P (Diment et al., 1988; Rijnbout et al., 1991a; Rijnbout et al., 1991b; Capony et al., 1994). Cette association peut être liée à une liaison de l'enzyme à une protéine membranaire, la prosaposine (Zhu & Conner, 1994).

Pour rappel, l'incubation de cellules en présence de chlorure d'ammonium induit une augmentation du pH intravésiculaire et perturbe le transport des enzymes lysosomales par la voie dépendante du Man 6-P (Gonzalez-Noriega et al., 1980; Maxfield, 1982). Une incubation en présence de chlorure d'ammonium induit une sécrétion abondante de la forme précurseur de la cathepsine D dans des types cellulaires qui sécrètent une proportion faible de cette forme (fibroblastes, promyélocytes, cellules épithéliales mammaires et certaines lignées tumorales). Au contraire, la sécrétion de la forme précurseur de la cathepsine D n'est pas influencée par un tel traitement dans des cellules de carcinome mammaire et d'autres lignées tumorales qui sécrètent une proportion importante de cette forme de manière constitutive (Hasilik et al., 1984; Capony et al., 1989; Capony et al., 1994; Isidoro et al., 1997).

La **localisation épidermique** de la cathepsine D a été étudiée, cependant avec des résultats divergents dépendant apparemment des procédures expérimentales. La cathepsine D a été localisée dans la couche basale (Lazarus & Poole, 1975), mais aussi dans la couche granuleuse (Mier & van den Hurk, 1975a). Plus récemment, l'enzyme a été localisée dans les

couches épineuse supérieure et granuleuse (Kawada et al., 1996; Kawada et al., 1997), ainsi que dans les couches granuleuse et cornée (Horikoshi et al., 1998). L'activité de la cathepsine D a été détectée à la surface de la peau de cochons d'Inde et de rats (Wormser et al., 1997).

Plusieurs **rôles** ont été suggérés pour la cathepsine D **au cours de la différenciation épidermique**. La cathepsine D peut dégrader la profilaggrine en filaggrine (Kashima et al., 1988) et ainsi favoriser l'agrégation du réseau de filaments intermédiaires. Cette enzyme peut également augmenter l'activité de la transglutaminase par un mécanisme non encore défini (Negi et al., 1981) et ainsi contribuer à la formation de l'enveloppe cornée. Comme la cathepsine D peut dégrader les desmosomes des kératinocytes de la couche cornée, cette enzyme pourrait favoriser la desquamation (Horikoshi et al., 1999). Ce rôle hypothétique nécessite cependant la sécrétion de la cathepsine D dans le milieu extracellulaire des kératinocytes (Horikoshi et al., 1999). Les kératinocytes semblent être capables de sécréter la cathepsine D, puisqu'elle a été identifiée dans les sécrétions de tissus épidermiques reconstruits *in vitro* (Katz & Taichman, 1999). Puisqu'il n'existe donc que peu d'informations sur la biosynthèse et la sécrétion de la cathepsine D épidermique, nous avons suivi ces propriétés de cette enzyme dans des kératinocytes en culture, à différents stades de différenciation des cellules.

3 La régulation de la différenciation épidermique par les ions calcium extracellulaires et par la signalisation dépendant des mitogen-activated protein kinases (MAPK).

L'homéostasie du tissu épidermique nécessite le maintien d'un équilibre entre le taux de prolifération des kératinocytes de la couche basale, la progression de la différenciation des kératinocytes au niveau des couches suprabasales ainsi que le taux de desquamation des cellules au niveau de la couche cornée. Pour garantir cette homéostasie, le phénotype des kératinocytes est soumis à plusieurs mécanismes de régulation, faisant intervenir divers facteurs environnementaux comme les ions calcium du milieu extracellulaire, des facteurs de croissance protéiques ou même certains lipides qui affectent la signalisation par l'intermédiaire des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (pour des revues, voir Eckert et al., 1997; Bikle et al., 2001; Watt, 2002a).

3.1 Les modèles de culture des kératinocytes pour étudier la différenciation épidermique

L'étude de ces mécanismes de régulation est facilitée par l'utilisation de modèles de culture des kératinocytes épidermiques. En effet, contrairement à la majorité des autres types cellulaires humains normaux, les kératinocytes peuvent être propagés au-delà du stade de la culture primaire en disposant de conditions de culture adéquates (Watt, 1989).

In vivo, l'épiderme est un tissu complexe où plusieurs phénotypes de kératinocytes coexistent, représentant différents stades de différenciation. Les kératinocytes sont soumis à l'influence des autres types cellulaires épidermiques, mais aussi à l'influence des cellules dermiques. Les

kératinocytes basaux sont influencés par leur ancrage à la jonction épidermo-dermique. *In vivo*, cette complexité du tissu épidermique rend difficile l'investigation d'un phénomène précis de la différenciation ou de l'effet éventuel de l'un ou l'autre facteur particulier sur le phénotype des kératinocytes.

Dès les années 1970, la mise au point de modèles de culture des kératinocytes a facilité l'étude de la différenciation épidermique et de ses mécanismes de régulation. Idéalement, un modèle de culture de kératinocytes doit maintenir la prolifération, puis permettre la différenciation. Ces modèles *in vitro* permettent de mieux cibler l'étude d'étapes précises de la différenciation ou de l'effet éventuel de facteurs exogènes. Nous avons ici utilisé un modèle de culture des kératinocytes en milieu sans sérum qui permet la culture autocrine.

3.1.1 Le modèle de culture de Rheinwald et Green (1975)

Dans le premier modèle, les cultures de kératinocytes prolifèrent sur un lit de fibroblastes nourriciers (Rheinwald & Green, 1975). Ces fibroblastes fournissent des facteurs de croissance nécessaires pour induire la prolifération des kératinocytes. D'autres facteurs de croissance sont fournis par le milieu de culture qui contient 10% de sérum de veau foetal, ainsi que divers facteurs comme l'insuline, l'*epidermal growth factor* (EGF) ou la toxine cholérique. Lors de la prolifération des kératinocytes, les fibroblastes sont détachés de la surface de la culture. Ce modèle est approprié pour la génération d'un feuillet stratifié de kératinocytes pouvant être utilisé pour greffer aux grands brûlés (Compton et al., 1989). Cependant, il est impossible de contrôler la composition exacte du milieu de culture vu la présence initiale de fibroblastes nourriciers ainsi que de sérum de veau foetal. De plus, le programme de différenciation y est perturbé, montrant une

expression précoce de l'involucrine et une inhibition de l'expression des kératines suprabasales. Bien que ce modèle ait néanmoins permis l'étude de certaines phases de la différenciation épidermique, ses caractéristiques le rendent peu approprié à l'étude des mécanismes régulateurs de la différenciation, en particulier lorsqu'il s'agit d'analyser l'implication de facteurs solubles sur ce processus.

3.1.2 Le modèle de culture de Boyce et Ham (1983)

Suite aux découvertes portant sur le rôle du calcium extracellulaire pour induire la différenciation de kératinocytes murins (Hennings et al., 1980), d'autres chercheurs ont observé que les kératinocytes humains peuvent également proliférer en culture sans fibroblastes nourriciers ni sérum de veau foetal si le milieu de culture contient du calcium 0,1 mM (Boyce & Ham, 1983). Dans ce modèle, la capacité mitotique des kératinocytes reste cependant dépendante d'un extrait pituitaire bovin, mais aussi de facteurs de croissance comme l'insuline et l'EGF. Malgré l'absence de sérum de veau foetal, l'ajout d'extrait pituitaire bovin apporte une autre inconnue dans la composition du milieu de culture. L'augmentation éventuelle de la concentration en calcium du milieu de culture de Boyce et Ham permet d'induire la différenciation des kératinocytes, suggérée par la stratification des cultures, la formation de grains de kératohyaline et d'enveloppes cornées (Boyce & Ham, 1983).

3.1.3 Le modèle de culture en conditions autocrines (1991)

L'ajout de facteurs de croissance exogènes, comme l'insuline, l'EGF ou l'extrait pituitaire bovin, n'est nécessaire que pour initier le développement clonal des cultures de kératinocytes (Cook et al., 1991b). En effet, dès que les kératinocytes couvrent environ 40% à 50% de la surface de culture, ces

cellules sont capables d'une croissance clonale autonome en synthétisant leurs propres facteurs de croissance, comme l'amphiréguline (Cook et al., 1991a). Dans ces circonstances, les kératinocytes se trouvent dans des conditions de culture autocrine où leurs propres facteurs de croissance stimulent le récepteur de l'EGF nécessaire à la croissance clonale (Pittelkow et al., 1993).

Dès l'atteinte de la densité cellulaire suffisante, ce modèle de culture autocrine permet d'analyser les effets éventuels de facteurs exogènes sur le comportement prolifératif des kératinocytes. De plus, le passage en conditions de culture autocrine permet aux kératinocytes d'entamer un processus de différenciation précoce qui démarre dès que les cellules recouvrent l'entièreté de la surface de culture (Poumay & Pittelkow, 1995). Si cette culture est prolongée au-delà de la confluence, une différenciation plus tardive est même possible (Poumay et al., 1999).

3.2 La régulation du phénotype des kératinocytes au cours de la différenciation épidermique

3.2.1 Intervention du calcium extracellulaire dans la régulation du phénotype des kératinocytes

Depuis plus de vingt ans, un nombre élevé d'études indiquant un rôle critique du calcium dans la régulation de la différenciation des kératinocytes épidermiques a été publié (pour une revue, voir Bikle et al., 2001). Au début des années 1980, Hennings et ses collaborateurs ont montré que des **kératinocytes murins** en culture prolifèrent davantage si la concentration en calcium du milieu de culture est en-dessous de 0,07 mM. Dès que la concentration en calcium dépasse 0,1 mM, ces kératinocytes entament la différenciation terminale (Hennings et al., 1980). Hennings et ses collaborateurs ont suggéré ensuite que l'élévation de la concentration

extracellulaire en calcium induit la redistribution de protéines associées aux desmosomes, comme par exemple les protéines d'adhérence de la famille des cadhérines, depuis le cytoplasme vers la surface cellulaire pour former ces jonctions d'ancrage intercellulaire (Hennings & Holbrook, 1983; Hennings et al., 1983).

L'incubation de **kératinocytes humains** en culture en présence d'un milieu contenant du calcium 0,07 mM favorise aussi la prolifération cellulaire (Boyce & Ham, 1983). Cependant, l'augmentation de la concentration en calcium du milieu de culture doit aller au-delà de 1 mM pour engendrer la synthèse de transglutaminase et d'involucrine ainsi que la capacité de synthétiser l'enveloppe cornée, c'est-à-dire pour induire la différenciation terminale dans ces cellules (Pillai et al., 1990; Schmidt et al., 2000). Cette induction de la différenciation semble de plus liée à une augmentation de la concentration cytosolique en calcium (Pillai & Bikle, 1991). Clairement, les kératinocytes de souris et les kératinocytes humains n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis du calcium extracellulaire.

Des études récentes suggèrent que les kératinocytes murins peuvent réagir à des variations de la concentration extracellulaire en calcium par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire, le *calcium-sensing receptor* (CaR). Les kératinocytes provenant de souris dont l'expression du gène de ce récepteur a été éteinte ne sont plus capables de réagir à de telles variations (Oda et al., 2000). Chez ces souris, la morphologie épidermique et l'expression de la filaggrine et de la loricrine sont sérieusement altérées (Oda et al., 2000; Komuves et al., 2002).

In vivo, des études de détection microscopique des ions calcium ont montré depuis longtemps que **l'épiderme humain** contient un gradient de concentration en calcium, montrant des concentrations croissantes en

montant vers la surface tissulaire (Menon et al., 1985). La présence de ce gradient est étroitement liée à la présence d'une barrière lipidique fonctionnelle à la surface épidermique. Une diminution de l'efficacité de cette barrière induit, en plus d'une grande perte d'eau, la disparition du gradient de calcium épidermique. Inversément, la restauration d'une barrière efficace est accompagnée d'une reformation de ce gradient de calcium (Menon et al., 1992a). Cette reformation se produirait de manière passive par diffusion d'ions calcium à partir des couches épidermiques inférieures. En effet, Elias et al. (2002) ont avancé l'hypothèse que la faible perte d'eau transépidermique observée lorsque la barrière lipidique est fonctionnelle pourrait s'accompagner d'un mouvement d'ions vers la surface du tissu. Ainsi, une perte d'humidité continue, mais faible, combinée à une restriction du mouvement des ions sous la barrière, pourraient expliquer la formation du gradient de calcium dans les couches vivantes de l'épiderme.

Par ailleurs, une entrée d'ions calcium extracellulaires au niveau de la couche épidermique granuleuse active la transglutaminase 1, qui conjugue alors des protéines de structure comme l'involucrine et la loricrine pour former l'enveloppe cornée (Rice & Green, 1979; Michel & Demarchez, 1988). Chez la souris aussi, les ions calcium sont impliqués dans la régulation de la différenciation de l'épiderme *in vivo*, puisque des perturbations de la concentration épidermique en calcium résultent en une variation de l'expression de protéines comme la loricrine, la filaggrine ou l'involucrine (Elias et al., 2002). Quelques travaux récents indiquent cependant qu'une diminution de la concentration en calcium au niveau des kératinocytes de la couche granuleuse provoque l'exocytose de corps lamellaires, tandis qu'une augmentation de cette concentration ralentit l'exocytose de ces organites (Menon et al., 1994; Lee et al., 1998; Elias et al., 2002; Denda et al., 2003).

3.2.2 Intervention des MAPK activées par les récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF et leurs ligands dans la régulation du phénotype des kératinocytes

3.2.2.1 Les récepteurs HER et leurs ligands

Depuis le début des années 1990, plusieurs travaux ont suggéré que l'*epidermal growth factor* (EGF) et les facteurs protéiques apparentés à l'EGF et leurs récepteurs associés pourraient intervenir dans la régulation du phénotype des kératinocytes (pour des revues, voir Mitev & Miteva, 1999; Jost et al., 2000). Les protéines de la famille du récepteur de l'EGF sont des glycoprotéines membranaires à activité tyrosine kinase (pour une revue, voir Yarden & Sliwkowski, 2001). Au début des années 1980, le récepteur de l'EGF a été le premier membre de la famille à être identifié en raison de la similitude de son gène avec l'oncogène *v-erbB* du virus de l'érythroblastose aviaire (Ullrich et al., 1984). C'est pourquoi le gène codant le récepteur de l'EGF a été nommé *c-erbB1*. Dans les tissus humains, le récepteur encodé par ce gène est appelé *human EGF receptor 1* (HER1). La famille des récepteurs HER comprend trois autres membres en plus du récepteur de l'EGF, dont HER2, HER3 et HER4. Ces récepteurs partagent une structure similaire (fig. I-5) et présentent une homologie de séquence élevée au niveau du domaine tyrosine kinase (Ullrich & Schlessinger, 1990). Le poids moléculaire des récepteurs HER avoisine 180 kDa. La structure des quatre membres de la famille des récepteurs HER comporte deux domaines riches en cystéine dans la partie extracellulaire des protéines, définissant une région de liaison au ligand, ainsi qu'un domaine kinase cytosolique flanqué par une extrémité carboxy-terminale qui présente des résidus tyrosine susceptibles à l'autophosphorylation (Lax et al., 1991). Signalons que HER2 n'a pas de ligand connu (Yarden & Sliwkowski, 2001), que le domaine tyrosine kinase du récepteur HER3 possède une activité enzymatique réduite (Guy et al.,

1994), et que HER4 n'est pas exprimé par les kératinocytes épidermiques (De Potter et al., 2001).

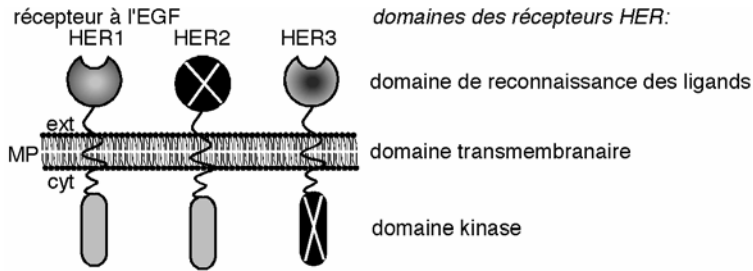


Fig. I-5 : Représentation schématique de la structure des récepteurs HER exprimés par les kératinocytes épidermiques (*ext*=espace extracellulaire ; *cyt*=cytoplasme, *MP*=membrane plasmique).

Les ligands des récepteurs HER peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur affinité pour les différents récepteurs HER. Les **facteurs apparentés à l'EGF**, dont l'EGF lui-même (Mroczkowski et al., 1989), le TGF- α (Salomon et al., 1990), l'amphiréguline (Shoyab et al., 1989), ou la protéine *heparin-binding EGF-like* (HB-EGF) (Higashiyama et al., 1991) partagent une affinité importante pour le récepteur de l'EGF, tandis que les **neurégulines** ou **herégulines** (Peles & Yarden, 1993) montrent une affinité particulière pour les récepteurs HER3 ou HER4 (Dougall et al., 1994; Yarden & Sliwkowski, 2001). Tous ces facteurs sont synthétisés sous une forme précurseur comme protéine transmembranaire dont la région extracellulaire est clivée pour donner lieu à une forme mature soluble. Cette forme mature contient un ou plusieurs domaine(s) *EGF-like* qui sert de point de liaison aux récepteurs HER.

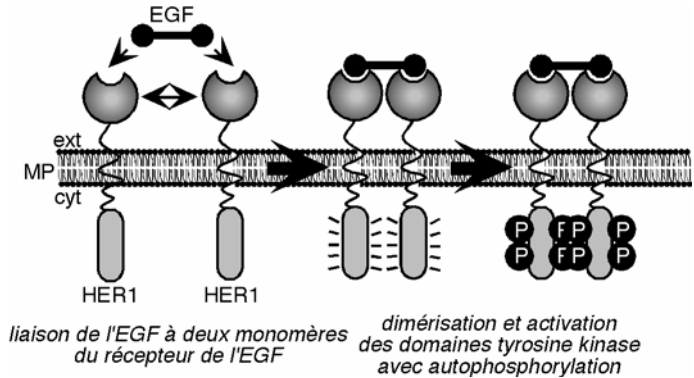
3.2.2.2 Mécanisme d'activation des récepteurs HER et transduction du signal

3.2.2.2.1 Liaison du ligand et oligomérisation

Les récepteurs HER se trouvent sous une forme monomérique inactive au niveau de la membrane plasmique. Lors de la liaison d'un ligand à un récepteur HER, ce récepteur subit une dimérisation ou une oligomérisation avec d'autres récepteurs HER, dont l'identité dépend de la nature du ligand (fig. I-6 : représentation schématique du mécanisme d'activation des récepteurs HER) (pour des revues, voir Schlessinger, 2000; Schlessinger, 2002). Les récepteurs HER peuvent dès lors subir une di- ou oligomérisation avec d'autres récepteurs du même type, ce qui est nommé homodimérisation, ou avec d'autres protéines de la famille des récepteurs HER, donnant lieu à une hétérodimérisation. Signalons que le récepteur HER2 est le partenaire d'hétérodimérisation préférentiel du récepteur de l'EGF et de HER3, et que cette hétérodimérisation se réalise préférentiellement à l'homodimérisation de ces récepteurs (Graus-Porta et al., 1997). Au niveau du récepteur de l'EGF, le mécanisme qui contrôle cette di- ou oligomérisation implique un domaine de dimérisation qui n'est exposé qu'après la liaison du ligand (pour une revue, voir Burgess et al., 2003). Ce domaine de dimérisation est exposé de manière constitutive chez le récepteur HER2 qui n'a pas de ligand connu.

Fig. I-6 :

Représentation schématique de l'activation du récepteur de l'EGF/HER1 suite à la liaison de l'EGF (ext=espace extracellulaire, cyt=cytoplasme, MP=membrane plasmique, P=groupement phosphate).



3.2.2.2 Transphosphorylation et propagation du signal

L'oligomérisation des récepteurs HER induit l'activation des domaines tyrosine kinase et la transphosphorylation des récepteurs. Cette activation pourrait être liée à un rapprochement des domaines tyrosine kinase lors de l'oligomérisation, induisant la transphosphorylation efficace de résidus tyrosine présents dans l'extrémité carboxy-terminale des récepteurs (pour une revue, voir Hubbard, 2002). Cette transphosphorylation produit des sites de reconnaissance pour des molécules portant un domaine *Src homology 2* (SH2), initiant ainsi des cascades d'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires (Ullrich & Schlessinger, 1990; Hunter, 2000). L'identité des protéines adaptatrices dépend du ligand ainsi que de la composition des oligomères de récepteurs HER (Olayioye et al., 1998). Un réseau d'interaction est formé par les nombreuses protéines de signalisation qui peuvent interagir (Yarden & Sliwkowski, 2001). Parmi les protéines adaptatrices, la protéine Grb2 peut se lier à tous les récepteurs HER suite à leur activation. La cascade qui démarre à partir de Grb2 aboutit à la voie des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Passant par la phosphorylation des *extracellular signal-regulated kinases* 1 et 2 (ERK1/2), cette voie aboutit à l'activation des facteurs de transcription c-fos et c-jun, intervenant

notamment dans le contrôle de la prolifération cellulaire (pour une revue, voir Chang et al., 2003). Suite à son activation, le récepteur de l'EGF peut également recruter d'autres protéines de signalisation comme la phospholipase C γ (PLC γ), qui hydrolyse le lipide phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate, produisant l'1,2-diacylglycérol dans la membrane plasmique (qui active la protéine kinase C) et libérant l'inositol-(1,4,5)-trisphosphate dans le cytoplasme (qui stimule la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique) (pour des revues, voir Schlessinger, 2000; Schlessinger, 2002). La phosphoinositide 3'-kinase (PI3K) est la troisième protéine de signalisation dont l'activité peut être stimulée suite à l'activation du récepteur de l'EGF. La voie de signalisation démarrante à partir de la PI3K peut recruter la kinase Akt et promouvoir ainsi la survie cellulaire (Wang et al., 2003).

3.2.2.2.3 Activation des récepteurs HER sans intervention d'un ligand

Le récepteur de l'EGF peut être activé par des stimuli qui n'impliquent probablement pas la liaison directe d'un ligand au récepteur (pour une revue, voir Carpenter, 1999). Par exemple, l'irradiation de kératinocytes par des rayons UVB active le récepteur de l'EGF (Miller et al., 1994) et la voie de signalisation impliquant la PI3K et Akt (Wan et al., 2001). Cette voie exerce une activité anti-apoptotique en inhibant les caspases 3, 8 et 9 (Wang et al., 2003). Le mécanisme par lequel une irradiation aux rayons UV induit l'activation du récepteur de l'EGF n'est pas encore clairement identifié, mais cette activation induit aussi l'activation de MAPK (Assefa et al., 1997). Des radicaux oxygène générés par l'irradiation qui inactiveraient une phosphatase semblent être responsables de ce phénomène (Peus et al., 1999; Meves et al., 2001).

Plusieurs travaux publiés pendant la dernière décennie suggèrent que l'activité du récepteur de l'EGF et de HER2 peuvent être modulées par certains lipides, notamment par le **cholestérol**, au niveau de la membrane plasmique des cellules de mammifère (Chen & Resh, 2002; Nagy et al., 2002; Pike & Casey, 2002; Ringerike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002). Les rôles physiologiques du cholestérol de la membrane plasmique peuvent être étudiés en analysant les conséquences d'une extraction de ce cholestérol. Une telle extraction peut être induite dans des cellules en culture par un traitement avec le polysaccharide cyclique méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) (Klein et al., 1995). Dans plusieurs types cellulaires, un tel traitement active le récepteur de l'EGF (Chen & Resh, 2002; Pike & Casey, 2002) et affecte aussi l'activité de HER2 (Nagy et al., 2002). La membrane plasmique de cellules de mammifère contient des structures lipidiques particulières, appelées **rafts lipidiques**. Ces structures sont caractérisés par une teneur élevée en cholestérol et en sphingolipides (pour des revues, voir Simons & Toomre, 2000; Lai, 2003). En extrayant le cholestérol, un traitement par la M β CD détruit la structure des rafts lipidiques (Hooper, 1999; Ostermeyer et al., 1999; Kabouridis et al., 2000), et l'activation du récepteur de l'EGF (Ringerike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002) ou celle de HER2 (Nagy et al., 2002) observées lors d'un tel traitement sont apparemment liées à la destruction de la structure des rafts lipidiques.

3.2.2.3 Les récepteurs HER et la différenciation épidermique

3.2.2.3.1 Expression des récepteurs HER au cours de la différenciation épidermique

Le récepteur de l'EGF, HER2 et HER3 sont exprimés dans les kératinocytes épidermiques. *In vivo*, l'expression du récepteur de l'EGF est plus importante au niveau de la couche épidermique basale qu'au niveau des

autres couches, tandis que l'expression des récepteurs HER2 et HER3 est plus importante dans les couches suprabasales (De Potter et al., 2001; Piepkorn et al., 2003). HER2 est localisé dans le cytoplasme des kératinocytes de la couche basale, mais présente une localisation membranaire dans les couches suprabasales (Stoll et al., 2001). En conditions de culture autocrine, les kératinocytes augmentent l'expression de HER2 mais aussi de HER3 dès le début de la différenciation, c'est-à-dire dès la confluence des cultures (De Potter et al., 2001).

3.2.2.3.2 Effets de la signalisation liée aux récepteurs HER sur le phénotype des kératinocytes

La signalisation issue des récepteurs HER peut affecter le phénotype des kératinocytes épidermiques de manière importante (Mitev & Miteva, 1999; Jost et al., 2000).

3.2.2.3.2.1 Effets de la signalisation liée au récepteur de l'EGF

En conditions de culture autocrine (Cook et al., 1991b), les kératinocytes ne prolifèrent de manière autonome que lorsque le récepteur de l'EGF est occupé par un ligand (Pittelkow et al., 1993). Dans ces conditions de culture, l'incubation des kératinocytes en présence d'EGF n'affecte pas leur potentiel clonogénique, mais l'incubation en présence d'EGF de cultures confluentes, lors de l'initiation de la différenciation, réprime l'expression des kératines suprabasales 1 et 10 (Poumay & Pittelkow, 1995). De même, l'inhibition de l'activité du récepteur de l'EGF par une incubation de kératinocytes en présence de la molécule PD153035 diminue le taux de prolifération des cellules sous-confluentes et induit l'expression des kératines 1 et 10 (Peus et al., 1997). L'EGF inhibe donc la différenciation précoce des kératinocytes en activant son récepteur.

Par contre, l'EGF peut favoriser la différenciation épidermique dans certaines circonstances. La mise en culture de kératinocytes sur un substrat de culture recouvert de poly-hydroxyéthylméthacrylate, qui est une molécule empêchant l'adhérence des cellules sur la matrice extracellulaire mais autorisant les interactions intercellulaires, induit l'expression de la kératine 10. Dans ces conditions de culture, les kératinocytes réagissent d'une manière particulière à un traitement avec l'EGF car bien qu'ils présentent une diminution de l'expression de la kératine 10, ils montrent dans ces conditions une augmentation de l'expression de gènes caractéristiques des étapes tardives de la différenciation épidermique, comme la profilaggrine et la transglutaminase (Wakita & Takigawa, 1999).

L'irradiation de kératinocytes avec des **rayons UVB** induit l'apoptose des cellules, mais le récepteur de l'EGF peut contrecarrer ce processus apoptotique. L'irradiation de kératinocytes en culture par des rayons UVB induit l'activation du récepteur de l'EGF par l'intermédiaire de la production de radicaux oxygène (Peus et al., 1999; Meves et al., 2001). Dans ces circonstances, l'inhibition du récepteur de l'EGF par la molécule PD153035 promeut l'apoptose (Peus et al., 2000). Lors d'une irradiation des kératinocytes par des rayons UVB, le récepteur de l'EGF activé empêche l'entrée des cellules en apoptose en inhibant l'action de certaines caspases (Wang et al., 2003). **La culture en suspension** engendre également l'apoptose des kératinocytes. Le récepteur de l'EGF est activé dans ces conditions et engendre une cascade de transduction du signal aboutissant à l'induction de l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-X(L) (Jost et al., 2001). L'activation du récepteur de l'EGF semble donc favoriser la survie des kératinocytes lors de stimuli apoptotiques.

3.2.2.3.2.2 Effets de la signalisation liée à HER2 et HER3

Dans les kératinocytes en culture, le récepteur HER2 est recruté pour l'hétérodimérisation avec le récepteur de l'EGF lors d'une incubation des cellules en présence d'EGF. Lorsque les cellules sont incubées en présence d'heréguline, HER2 est recruté pour l'hétérodimérisation avec HER3. La cascade de transduction du signal impliquant les hétérodimères HER2-HER3 semble responsable de la diminution de l'expression des kératines 1 et 10 observée lors d'un traitement de kératinocytes avec l'heréguline. Cet effet déjà démontré après activation du récepteur de l'EGF suggère une signalisation commune en aval des récepteurs HER activés (De Potter et al., 2001).

3.2.2.4 Intervention des mitogen-activated protein kinases (MAPK) dans la régulation du phénotype des kératinocytes

Les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) constituent une famille de protéines kinases intracellulaires qui assurent la transduction d'un signal perçu par la cellule. Il existe au moins trois voies de transduction du signal mettant en jeu des MAPK différentes, dont les *extracellular signal-regulated kinases* (ERK), *c-jun N-terminal kinases* (JNK) et les protéines p38 (pour des revues sur le sujet, voir Paul et al., 1997; Ichijo, 1999; Kyriakis & Avruch, 2001; Chang et al., 2003). D'une manière générale, chacune de ces voies de transduction du signal implique des MAPK/ERK kinase kinases (MEKK), qui activent une MAPK/ERK kinase (MEK), qui active une MAPK. Le degré de complexité des cascades impliquant les MAPK est énorme, vu que le nombre de combinaisons possibles entre les différentes MEKK, MEK et MAPK est élevé, mais aussi parce que les différentes membres d'une cascade peuvent interagir avec les membres d'autres cascades.

3.2.2.4.1 Mécanismes d'activation des ERK

Les MAP kinases ERK existent sous deux formes connues jusqu'à présent, dont ERK1 (44 kDa) et ERK2 (42 kDa) (Boulton et al., 1991). Vu que la majorité des études publiées sur le sujet contiennent des résultats obtenus grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés simultanément contre ERK1 et ERK2, les deux formes sont généralement reprises sous l'appellation ERK1/2. Les protéines ERK1/2 sont impliquées dans des cascades de transduction qui démarrent par l'activation de récepteurs HER (fig. I-7 : représentation schématique d'une cascade de transduction du signal généré par un récepteur HER et impliquant les MAPK ERK) (Schlessinger, 2000; Schlessinger, 2002). Suite à l'oligomérisation et la transphosphorylation de ces récepteurs, la protéine Grb2 peut se lier par son domaine SH2 aux résidus tyrosine phosphorylés. Grb2 contient deux domaines SH3 auxquels se lie la protéine Sos. Cette liaison active Sos, qui fonctionne comme facteur d'échange du GTP (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF). Grâce à cette fonction, Sos induit la liaison de la GTPase Ras à la membrane plasmique et active Ras en provoquant la liaison de Ras à un nucléotide GTP. Ras recrute la protéine Raf, qui, dès sa liaison à Ras va induire la phosphorylation d'une MEK, qui va phosphoryler ERK1/2 et induire leur translocation dans le noyau cellulaire pour y phosphoryler différents facteurs de transcription, résultant en une expression génique modifiée.

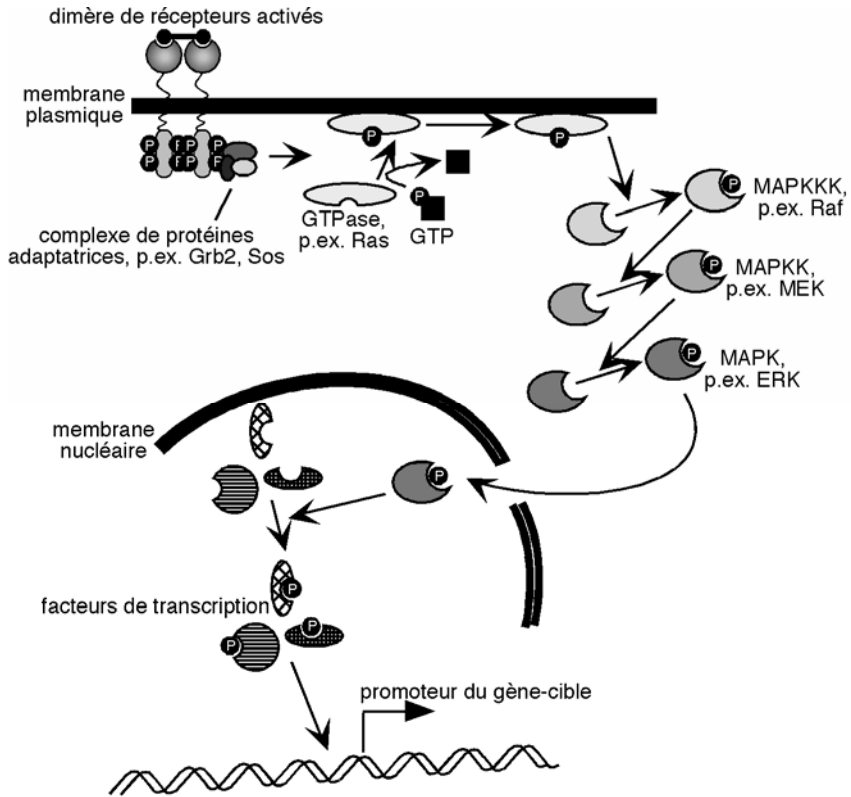


Fig. I-7 : Représentation schématique d'une cascade de transduction du signal généré par la liaison d'un ligand de la famille de l'EGF à des récepteurs HER, impliquant des MAPK. Ce schéma montre l'exemple de la cascade impliquant les MAPK ERK.

Des études récentes ont montré qu'une extraction du **cholestérol** induit une activation de ERK1/2 dans plusieurs types cellulaires (Furuchi & Anderson, 1998; Kabouridis et al., 2000; Chen & Resh, 2001; Chen & Resh, 2002). Chen et Resh (2002) ont relié cette activation à l'activation du récepteur de l'EGF induit par l'extraction de cholestérol.

3.2.2.4.2 Intervention des ERK dans la régulation du phénotype des kératinocytes

Dans les kératinocytes, les MAP kinases ERK sont activées par l'activation des récepteurs HER (Peus et al., 1999; De Potter et al., 2001). Les ERK peuvent également être activées d'une manière indépendante des récepteurs HER, puisque l'incubation de kératinocytes en présence d'ions **calcium** à une concentration supérieure à 1 mM induit l'activation des ERK d'une manière indépendante de Ras (Schmidt et al., 2000). Une fois activées, les MAP kinases ERK favorisent la prolifération des kératinocytes (Mainiero et al., 1997; Eckert et al., 2002), mais peuvent aussi promouvoir la survie cellulaire en perturbant l'entrée en apoptose stimulée par la culture en suspension (Jost et al., 2001) ou par une irradiation aux rayons UVB (Assefa et al., 1997; Jost et al., 1999; Peus et al., 2000). L'incubation de kératinocytes en présence d'ions calcium à une concentration supérieure à 1 mM induit la différenciation des cellules, détectable par une induction de l'expression de l'involucrine (Schmidt et al., 2000) mais aussi par la formation de l'enveloppe cornée (Pillai et al., 1990; Pillai & Bikle, 1991). L'inhibition par la molécule PD98059, qui inhibe la MEK, de la voie de transduction impliquant les ERK perturbe cette induction de l'expression de l'involucrine (Schmidt et al., 2000).

3.2.2.4.3 Les MAP kinases p38 et leur intervention dans la régulation du phénotype des kératinocytes

Les MAP kinases p38 sont souvent activées lorsque des cellules eucaryotes se trouvent dans des conditions stressantes (Kyriakis & Avruch, 2001). Jusqu'à présent, plusieurs formes de p38 ont été identifiées dans les kératinocytes épidermiques, dont p38 α , p38 β et p38 δ (Efimova et al., 1998; Efimova et al., 2003). De manière similaire aux ERK, les MAP kinases p38

font partie de cascades de transduction du signal impliquant en amont des MEK kinases et des MEK (voir fig. I-8 pour un schéma représentant les membres de cascades pouvant activer p38 dans les kératinocytes). Dans les kératinocytes en culture, les protéines p38 sont activées par exemple lors d'une irradiation aux rayons UVB (Chen et al., 2001) ou lors d'une incubation en conditions hyperosmotiques (Garmyn et al., 2001; Cheng et al., 2002). Dans ces conditions, les protéines p38 peuvent réguler l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans la réaction des cellules face au stress, dont les protéines *heat shock* hsp27 et hsp70 (Garmyn et al., 2001).

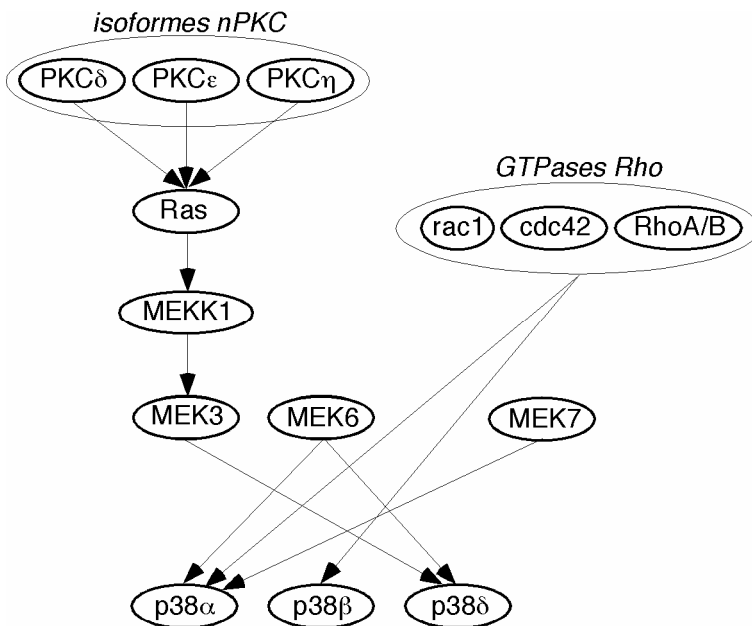


Fig. I-8 : Schéma représentant les membres de cascades pouvant activer les MAP kinases p38 dans les kératinocytes (nPKC= novel PKC ; d'après Efimova et al., 1998; Efimova & Eckert, 2000; Dashti et al., 2001a; Dashti et al., 2001b; Balasubramanian et al., 2002; Cheng et al., 2002; Efimova et al., 2002).

Plusieurs études publiées par l'équipe de R. Eckert suggèrent une implication des protéines p38 dans les cascades de transduction du signal qui régulent **l'expression de l'involucrine** dans les kératinocytes en culture (pour des revues, voir Eckert et al., 2002; Eckert et al., 2003). Quelques composants de ces cascades ont été identifiés, dont la MEK kinase 1, qui transmet le signal en phosphorylant des MEK situées en aval (MEK3, MEK6 et/ou MEK7), qui à leur tour phosphorylent les protéines p38 (Efimova et al., 1998; Dashti et al., 2001a; Dashti et al., 2001b). Efimova et Dashti ont suggéré que l'expression de l'involucrine peut être régulée par les protéines p38 α et p38 δ . Des résultats récents suggèrent qu'en particulier la protéine p38 δ peut réguler l'expression épidermique de l'involucrine, peut-être en interagissant directement avec ERK1/2 (Efimova et al., 2003).

3.2.3 Intervention du cholestérol dans la régulation du phénotype des kératinocytes

Le cholestérol, qui est un lipide polaire, est synthétisé par les kératinocytes et sa synthèse semble augmenter avec la progression de la différenciation de ces cellules (Ponec et al., 1985). Le cholestérol semble intervenir pendant les phases tardives de la différenciation épidermique, puisqu'il promeut la formation des enveloppes cornées (Schmidt et al., 1991) et est un composant vital de la barrière lipidique (Menon et al., 1992a). Le rôle crucial du cholestérol dans la différenciation terminale est renforcé par les symptômes épidermiques observés chez des patients souffrant d'ichtyose liée au sexe. Chez ces patients, le gène de l'enzyme stéroïde sulfatase est muté, résultant en une accumulation de sulfate de cholestérol dans la couche cornée et en une desquamation perturbée, signalée par la présence de plaques brunes épaisses sur la surface cutanée (DiGiovanna & Robinson-Bostom, 2003).

3.2.3.1 Les rafts lipidiques et la signalisation associée aux rafts

Au cours de la dernière décennie, des domaines particuliers nommés « rafts lipidiques » ont été identifiés dans la membrane plasmique des cellules de mammifères. Ces rafts sont caractérisés d'une part par une teneur élevée en cholestérol et en sphingolipides, et d'autre part par l'affinité particulière que partagent plusieurs protéines de signalisation pour ces domaines membranaires (Simons & Toomre, 2000; Lai, 2003; Munro, 2003). La localisation de certaines protéines de signalisation au sein des rafts influence leur activité. Par exemple, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ (Gagnoux-Palacios et al., 2003), le récepteur de l'EGF (Ringerike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002) ou HER2 (Nagy et al., 2002) font partie de ces protéines. Les rafts lipidiques sont dès lors considérés comme plateformes de signalisation.

3.2.3.2 Implication des rafts au cours de la différenciation des kératinocytes

Des rafts lipidiques ont été identifiés dans les kératinocytes (Gniadecki et al., 2002). Au niveau de la couche épidermique basale, les kératinocytes amplificateurs transitoires sont enrichis en rafts par rapport aux cellules souches, suggérant que les rafts pourraient intervenir dans la régulation du phénotype des kératinocytes par un mécanisme encore à découvrir (Gniadecki & Bang, 2003).

D'autre part, les cavéoles sont une sous-famille de rafts lipidiques (pour des revues, voir Smart et al., 1999; Fielding & Fielding, 2003; van Deurs et al., 2003) qui peuvent notamment former des invaginations au niveau de la membrane plasmique de la plupart des cellules, et qui sont surtout caractérisées par la présence de cavéolines. Les cavéolines sont des protéines qui montrent une affinité particulière pour le cholestérol et qui stabilisent la

structure des cavéoles. L'étude récente de l'expression et de la localisation des cavéolines dans des kératinocytes en différenciation tardive suggère un rôle de ces protéines dans la biogénèse des corps lamellaires (Sando et al., 2003). La littérature indique donc que les rafts lipidiques et par conséquent le cholestérol qui leur est associé pourraient intervenir au cours de la différenciation des kératinocytes.

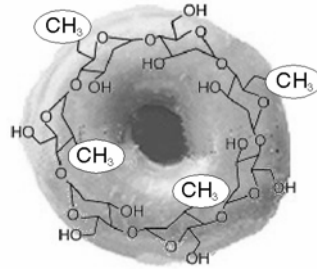
3.2.3.3 Utilisation de la méthyl- β -cyclodextrine pour étudier le rôle du cholestérol dans la physiologie du kératinocyte

3.2.3.3.1 Propriétés structurales et chimiques de la méthyl- β -cyclodextrine

Les rôles physiologiques du cholestérol de la membrane plasmique peuvent être étudiés en analysant les effets d'une extraction de ce cholestérol. Une telle extraction peut être induite dans des cellules en culture par un traitement par le polysaccharide cyclique méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) (Klein et al., 1995). Cette molécule est composée d'un cycle de 7 résidus glucose reliés par des liaisons glycosidiques α -1,4 et portant un nombre variable de groupements méthyle (fig. I-9). Ce cycle de résidus glucose forme une cavité centrale hydrophobe dans laquelle peut se loger une molécule de cholestérol. La M β CD peut ainsi extraire le cholestérol membranaire de façon assez spécifique sans s'incorporer dans la membrane biologique (Pitha et al., 1988). En extrayant le cholestérol, un traitement par la M β CD désorganise la structure des rafts lipidiques (Hooper, 1999; Ostermeyer et al., 1999; Kabouridis et al., 2000) et des cavéoles (Parpal et al., 2001).

Fig. I-9 : Représentation schématique d'une molécule de méthyl- β -cyclodextrine.

Une molécule de méthyl- β -cyclodextrine peut être comparée à un beignet, possédant une cavité centrale dans laquelle peut se loger une molécule de cholestérol, et porte un nombre aléatoire de groupements méthyl (ici quatre).



3.2.3.3.2 Effets d'une incubation en présence de méthyl- β -cyclodextrine sur la signalisation cellulaire

Comme nous l'avons précisé plus haut, la littérature nous apprend que dans plusieurs types cellulaires, un traitement avec la M β CD active le récepteur de l'EGF (Chen & Resh, 2002; Pike & Casey, 2002) et HER2 (Nagy et al., 2002). L'activation de ces récepteurs est apparemment liée à leur localisation habituelle dans les rafts lipidiques dont la structure est détruite lors d'un traitement par la M β CD (Nagy et al., 2002; Ringerike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002). Ce traitement va également activer ERK (Furuchi & Anderson, 1998; Kabouridis et al., 2000; Chen & Resh, 2001) par l'intermédiaire du récepteur de l'EGF (Chen & Resh, 2002), mais il a aussi été démontré que l'activité des MAP kinases p38 est altérée par une déplétion en cholestérol (Hossain et al., 2000; Iwabuchi & Nagaoka, 2002).

4 Objectifs du travail

Afin de maintenir l'homéostasie tissulaire, l'épiderme doit contrôler l'équilibre entre prolifération et différenciation des kératinocytes, mais aussi réguler la différenciation terminale qui mène à la formation de la couche cornée et à la desquamation. Toute perturbation des mécanismes de régulation peut induire des pathologies cutanées, comme par exemple le psoriasis. Dès lors, connaître les mécanismes qui contrôlent l'homéostasie de l'épiderme présente un intérêt majeur pour la biologie cutanée.

Puisque le rôle du compartiment lysosomal au cours de la différenciation épidermique n'est pas encore entièrement précisé, nous avons étudié l'implication de certains constituants lysosomaux au cours de ce processus. La protéase lysosomale soluble cathepsine D peut intervenir au cours de la différenciation épidermique en favorisant la desquamation des kératinocytes à la surface du tissu (Horikoshi et al., 1999). Puisque ce rôle hypothétique (ou d'autres rôles qu'il reste à identifier) nécessite la sécrétion de cette enzyme par les kératinocytes, nous avons étudié certaines propriétés biosynthétiques de la cathepsine D dans ces cellules afin de préciser l'implication éventuelle de cette enzyme au cours de la différenciation épidermique.

Au cours de la différenciation épidermique *in vivo*, une entrée de calcium dans les kératinocytes active la transglutaminase 1, qui conjugue des protéines de structure comme l'involucrine et la loricrine pour former l'enveloppe cornée des kératinocytes différenciés (Rice & Green, 1979; Menon et al., 1985; Michel & Demarchez, 1988). Or, dans plusieurs types cellulaires, une entrée de calcium induit l'exocytose de lysosomes (pour des revues, voir Andrews, 2002; McNeil & Steinhardt, 2003). En plus d'une

apparition de protéines lysosomales membranaires au niveau de la membrane plasmique des cellules, cet évènement est caractérisé par la libération d'enzymes lysosomales solubles dans l'espace extracellulaire, parmi lesquelles figure la cathepsine D (Rodriguez et al., 1997 ; Gardella et al., 2001). Afin de préciser l'implication éventuelle de certains constituants des lysosomes au cours de la différenciation épidermique, nous avons étudié si les kératinocytes sont susceptibles de répondre à une entrée de calcium par l'exocytose de lysosomes.

Pendant les phases tardives de la différenciation épidermique, le cholestérol joue des rôles importants puisqu'il est impliqué dans la formation des enveloppes cornées (Schmidt et al., 1991) et est un composant crucial de la barrière lipidique (Menon et al., 1992a). Par l'intermédiaire des rafts lipidiques, qui sont des structures membranaires riches en cholestérol, ce lipide peut intervenir dans la physiologie des kératinocytes (Gniadecki & Bang, 2003 ; Gniadecki et al., 2002). Des protéines de signalisation comme les récepteurs de la famille des HER (De Potter et al., 2001 ; Jost et al., 2000 ; Mitev & Miteva, 1999) ou les MAP kinases ERK et p38 (Eckert et al., 2002) peuvent réguler le phénotype des kératinocytes. Plusieurs études récentes ont montré que le cholestérol peut influencer l'activité de ces protéines de signalisation (Chen et al., 2001, 2002 ; Furuchi & Anderson, 1998 ; Kabouridis et al., 2001 ; Nagy et al., 2002 ; Pike & Casey, 2002 ; Ringerike et al., 2002 ; Roepstorff et al., 2002). Nous avons dès lors étudié si le cholestérol peut être impliqué dans la régulation du phénotype des kératinocytes, éventuellement en contrôlant l'activité de certaines protéines de signalisation dont l'intervention dans la régulation du phénotype des kératinocytes est connue.

Matériel et Méthodes

1 Culture cellulaire

Des échantillons de peau humaine normale d'abdomen sont obtenus après consentement éclairé lors d'opérations de chirurgie plastique pratiquées par le Dr B. Bienfait (Clinique St-Luc, Bouge). Ces échantillons de peau sont découpés en morceaux d'environ 1 cm² et incubés, face épidermique vers le haut, flottant sur une solution contenant 0,17% de trypsine (Sigma) pendant une nuit à 4°C (Wille et al., 1984). Le lendemain, l'épiderme est détaché du derme à l'aide de pinces et les cellules épidermiques sont séparées les unes des autres par action mécanique. Les cellules différenciées formant notamment la couche cornée sont séparées des cellules moins différenciées par un passage à travers un filtre en nylon de 70 µm (*Cell Strainer*, Falcon). Les cellules récupérées sont ensemencées à raison de 8000 cellules/cm² dans du milieu KBM-2 contenant du calcium 0,15 mM (Clonetics) et 0,1% de sérum de veau fœtal (Sigma), ainsi que les additifs décrits dans le tableau M-I. Avant utilisation, un volume de sérum de veau foetal a été dialysé contre une solution saline sans calcium tamponnée par du phosphate (PBS ; chlorure de sodium 137 mM, phosphate 10 mM, chlorure de potassium 2,7 mM, pH 7,4) afin d'éliminer les ions calcium du sérum.

Additifs	Concentrations finales
extrait pituitaire bovin	50 µg/ml
EGF	5 ng/ml
insuline	5 µg/ml
hydrocortisone	5x10 ⁻⁷ M
transferrine	5 µg/ml
épinéphrine	non communiquée par le fabricant
pénicilline	50 U/ml
streptomycine	50 µg/ml

Tableau M-I : Facteurs additionnés au milieu KBM-2 (Clonetics) afin de constituer le milieu de culture primaire des kératinocytes.

La population cellulaire en culture primaire est ensuite amplifiée en milieu de culture complet sans sérum. Les kératinocytes provenant de cultures primaires sous-confluentes prolifératives sont détachés de leur substrat par une solution contenant 0,025% de trypsine et de l'EDTA 10 mM. Les cellules sont ensemencées en culture secondaire à 6000 cellules/cm² dans du milieu Epilife® contenant du calcium 0,06 mM (Cascade) afin d'amplifier davantage la population cellulaire. Des résultats obtenus dans notre

laboratoire indiquent en effet que l'incubation en présence du milieu Epilife® est plus propice à la prolifération des kératinocytes que le milieu KGM-2. Le milieu Epilife® est supplémenté par les additifs du tableau M-II.

Facteur	Concentration finale
extrait pituitaire bovin	0,2%
EGF	0,2 ng/ml
hydrocortisone	0,18 µg/ml
insuline	5 µg/ml
transferrine	5 µg/ml
pénicilline	50 U/ml
streptomycine	50 µg/ml

Tableau M-II : Facteurs additionnés au milieu Epilife® (Cascade) afin de constituer le milieu de culture secondaire ou tertiaire.

Les kératinocytes provenant de cultures secondaires ou tertiaires prolifératives sont à nouveau détachés et congelés afin de constituer un stock de cellules qui pourront être utilisées pour les différentes expériences. Les expériences ont été réalisées en utilisant des cultures tertiaires ou quaternaires en conditions de culture autocrine. Les kératinocytes sont décongelés etensemencés à 6000 cellules/cm² dans du milieu KBM-2 additionnés des facteurs décrits dans le tableau 1-I. Lorsque la population cellulaire recouvre environ 40% à 50% de la surface de culture, le milieu KBM-2 est utilisé sans addition de facteurs exogènes, à l'exception de l'hydrocortisone, la pénicilline et la streptomycine et d'un mélange d'acides aminés repris dans le tableau M-III. Le milieu autocrine est renouvelé tous les deux jours pour générer des cultures sous-confluentes, confluentes et post-confluentes (Poumay & Pittelkow, 1995; Poumay et al., 1999).

Acide aminé	Concentration finale
L-histidine	2,4x10 ⁻⁴ M
L-isoleucine	7,5x10 ⁻⁴ M
L-méthionine	9x10 ⁻⁵ M
L-phénylalanine	9x10 ⁻⁵ M
L-tryptophane	4,5x10 ⁻⁵ M
L-tyrosine	7,5x10 ⁻⁵ M

Tableau M-III : Acides aminés additionnés au milieu KBM-2 pour constituer le milieu autocrine.

Les cellules tumorales humaines MDA-MB-231 isolées à partir d'un carcinome mammaire (Cailleau et al., 1974) ont été obtenues de l'ATCC, tandis que les fibroblastes normaux humains ont été isolés dans notre laboratoire à partir de derme provenant d'échantillons de peau normale. Les cellules MDA-MB-231 et les fibroblastes ont été mis en culture avec du

milieu DMEM (Cambrex) contenant 10% de sérum de veau fœtal, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine (Sigma).

2 Analyse de la maturation et de la sécrétion de la cathepsine D et de la maturation de Lamp-1

2.1 Marquage métabolique

Les kératinocytes sont mis en culture dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre (TPP) et amenés à sous-confluence, confluence ou post-confluence en conditions autocrines. L'étude de la maturation de la cathepsine D et de Lamp-1 est réalisée par un marquage métabolique *pulse-chase*. Pour ce faire, les cellules sont incubées en présence de milieu sans méthionine ni cystéine (KBLM-2, Clonetics) pendant 1h, puis incubées en présence de milieu KBLM-2 contenant un mélange de méthionine et de cystéine radioactive (Tran³⁵S-Label™, ICN, 5,5 MBq par boîte de Pétri) pendant 30 min (cathepsine D) ou 1h (Lamp-1), ce qui permet de marquer les protéines néosynthétisées. Ensuite, les cellules sont lavées et incubées en présence de milieu autocrine froid pendant des laps de temps variables. L'étude de la sécrétion de la cathepsine D est réalisée par un marquage métabolique long, en incubant les cellules en présence de milieu KBLM-2 contenant un mélange de méthionine et de cystéine radioactive (Tran³⁵S-Label™, 5,5 MBq par boîte de Pétri) pendant 16h.

Après le marquage métabolique, l'incorporation d'acides aminés radioactifs par les cellules est vérifiée afin de normaliser les lysats. Pour ce faire, les cpm émis par 20 µl de lysat et 20 µl du milieu de marquage correspondant sont comptés en utilisant un compteur à scintillation (Beckman). Les résultats de ces comptages sont comparés. Nous n'avons pas observé une variation significative des cpm incorporés par les cellules après avoir réalisé les premières expériences de marquage métabolique. Nous avons considéré par la suite que, du moins au sein d'une expérience, l'incorporation d'acides aminés radioactifs est homogène et nous n'avons plus effectué ce contrôle.

2.2 Immunoprécipitation et visualisation des protéines immunoprécipitées

Après le temps d'incubation requis, les milieux sont récoltés et les kératinocytes sont lavés et lysés dans 1 ml de tampon de lyse (PBS, 1% Triton X-100, 5 µg/ml pepstatine A, 1 µg/ml leupeptine, 0,02 mg/ml aprotinine). Les milieux sont centrifugés à 1000 g pendant 5 min et les lysats

sont centrifugés à 13000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants sont récoltés, préabsorbés en présence de protéine A-agarose (cathepsine D) ou protéine G-agarose (Lamp-1) pendant 1h sur un agitateur rotatif et incubés en présence de 2 µl d'anticorps spécifiques de la cathepsine D ou de Lamp-1 (voir tableau M-IV) pendant 1h à 4°C. Les complexes immuns sont captés par une incubation en présence de protéine A-agarose (cathepsine D) ou protéine G-agarose (Lamp-1) pendant 1h à 4°C. Les billes d'agarose sont lavées 5 fois avec un tampon PBS contenant 0,5% de déoxycholate de sodium, 1% de Triton X-100 et 0,1% de SDS. Les protéines immunoprécipitées sont détachées par une incubation dans du tampon riche en détergent et en agent réducteur (Tris-HCl 0,125 M, 0,2% de glycérol, 4% de SDS, dithiothreitol/DTT 0,4 M, 0,1% de bleu de bromophénol, pH 6,8) pendant 5 min à 100°C et séparées par électrophorèse dans un gel à 12,5% de polyacrylamide en présence de 0,01% de SDS (Laemmli, 1970). Le gel d'électrophorèse est séché et les protéines marquées aux acides aminés radioactifs sont visualisées au moyen d'un appareil *Cyclone*TM (Packard) en utilisant des écrans à stockage de phosphore.

Anticorps	Firme/Institution	Isotype	Clone	Source
cathepsine D	DAKO	polyclonal		lapin
Lamp-1	DSHB	monoclonal	H4A3	souris
Lamp-2	DSHB	monoclonal	H4B4	souris
CD9	Inserm U268	monoclonal	Syb-1	souris

Tableau M-IV : Anticorps primaires utilisés pour l'immunoprécipitation de la cathepsine D, de Lamp-1, de Lamp-2 et de CD9.

Selon le fabricant, l'anticorps dirigé contre la cathepsine D a été obtenu en immunisant des lapins contre une forme active de 46 kDa de la cathepsine D purifiée à partir de foie humain. Les anticorps dirigés contre Lamp-1 et Lamp-2 ont été fournis par la *Developmental Studies Hybridoma Bank* (DSHB), développée par J.T. August et J.E.K. Hildreth sous les auspices de la NICHD et maintenue par l'Université de l'Iowa, Département des Sciences Biologiques, Iowa City, IA 52242, Etats-Unis. Les anticorps dirigés contre CD9 nous ont été aimablement fournis par le Dr E. Rubinstein de l'INSERM U268, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France.

3 Traitement des kératinocytes par l'ionomycine

Des cultures de kératinocytes sont produites en conditions autocrines et traitées à confluence par l'ionomycine (Sigma). Une solution stock d'ionomycine 10 mM est préparée dans du DMSO. Le milieu de culture contenant de l'ionomycine 10 ou 30 µM est préparé en diluant la solution stock dans le milieu de culture autocrine qui contient normalement du calcium 0,15 mM. Eventuellement, la concentration en calcium du milieu de culture est augmentée à 1 mM pour analyser l'implication de la concentration extracellulaire en calcium sur les effets induits par une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine. Comme condition

contrôle, la concentration en DMSO des milieux de culture des cellules non traitées est ajustée à la concentration de DMSO introduite dans les milieux contenant de l'ionomycine.

4 Mesure de la cytotoxicité exercée par le traitement avec l'ionomycine

La cytotoxicité éventuelle exercée par un traitement avec l'ionomycine sur des cultures de kératinocytes à confluence est évaluée grâce à un marquage avec l'acridine orange et le bromure d'éthidium. Ce double marquage permet de visualiser les cellules vivantes marquées par l'acridine orange et les cellules mortes marquées par le bromure d'éthidium (Brice et al., 1988). Les cellules sont incubées en présence d'une solution contenant 0,003 mg/ml d'acridine orange et 0,01 mg/ml de bromure d'éthidium et observées immédiatement au moyen d'un microscope à épifluorescence équipé d'un filtre spécifique pour le FITC. Les cellules vivantes marquées par l'acridine orange émettent une fluorescence verte tandis que les cellules mortes marquées par le bromure d'éthidium émettent une fluorescence orange. A un grossissement de 200x, les cellules vivantes et mortes sont comptées dans trois champs visuels différents. Pour chaque champ visuel, le nombre des cellules mortes est rapporté au nombre du total des cellules afin de donner une estimation de la cytotoxicité induite par le traitement avec l'ionomycine. Les résultats de trois expériences indépendantes sont comparées au moyen du test *t* de Student.

5 Détection de la formation d'enveloppes cornées

La formation d'enveloppes cornées lors d'un traitement de kératinocytes avec l'ionomycine est analysée selon Leigh & Watt, 1994. Des cultures postconfluentes sont incubées en présence d'ionomycine 10 μ M pendant 5h. Ensuite, les cellules sont lysées dans une solution aqueuse contenant 2% de SDS et du DTT 20 mM pendant 20 min à 37°C. Les enveloppes cornées sont insolubles et peuvent être visualisées au moyen d'un microscope inversé à contraste de phase. Des photos ont été prises avec un appareil numérique Olympus.

6 Etude des effets d'une entrée de calcium dans les kératinocytes sur la sécrétion de la cathepsine D

Les effets éventuels d'un traitement de kératinocytes avec l'ionomycine sur la sécrétion de la cathepsine D sont analysés par la technique du marquage métabolique et l'immunoprécipitation décrite dans le § 2. Brièvement, les kératinocytes sont marqués au Tran³⁵S-Label™ pendant 1h, lavés et laissés pendant 17h en présence de milieu de culture autocrine. Ensuite, les cellules sont incubées en présence d'ionomycine pendant une 1h. La cathepsine D est immunoprécipitée à partir des milieux d'incubation et des lysats cellulaires correspondants et visualisée comme décrit dans le § 2.

7 Dosage d'activités enzymatiques

Les kératinocytes sont mis en culture dans des boîtes à 6 puits, amenés à confluence en conditions de culture autocrine et incubés en présence d'ionomycine pendant maximum 1h. L'activité de la cathepsine C, de la β -galactosidase et de la dipeptidylpeptidase III (DPP III) est mesurée dans les milieux d'incubation et les lysats cellulaires correspondants. Les activités enzymatiques sont mesurées dans 200 μ l de milieu d'incubation ou 20 μ l de lysat cellulaire, incubés à 37°C dans des volumes de 500 μ l contenant les substrats et les tampons repris dans les tableau M-V. La réaction est arrêtée après 30 min en ajoutant 1 ml de tampon glycine 50 mM à pH 10,5 contenant de l'EDTA 50 mM et 0,5% de Triton X-100. La fluorescence émise par le groupement libéré est mesurée dans un spectrofluorimètre SPF Aminco (SLM Instruments) et l'activité enzymatique est exprimée en unités arbitraires de fluorescence. Le pourcentage d'activité sécrétée est calculé par rapport à l'activité totale, c'est-à-dire par rapport à la somme de l'activité mesurée dans les milieux et de l'activité mesurée dans les lysats cellulaires.

Enzyme	Substrat	Firme	Tampon	Fluorescence	Référence
cathepsine C	glycyl-arginyl-7-amido-4-méthylcoumarine 0,25 mM	Bachem	acétate 50 mM à pH 5,5, chlorhydrate de thioéthylamine 1 mM, 0,05% de Triton X-100	Exc. :365 nm Em. : 450 nm	Jadot et al., 1984
β -galactosidase	4-méthylumbelliféryl- β -D-galactopyranoside 0,5 mM	Sigma	acétate 50 mM à pH 4,5, NaCl 50 mM, 0,05% de Triton X-100	Exc. :365 nm Em. : 450 nm	Wattiaux et al., 1997
DPP III	argynyl-argynyl-naphtylamide 0,25 mM	Bachem	Tris 0,125 M à pH 8, 0,05% de Triton X-100	Exc. :335 nm Em. : 415 nm	Yamamoto et al., 2000

Tableau M-V : Récapitulatif des réactifs et des protocoles expérimentaux employés pour le dosage des activités enzymatiques de la cathepsine C, de la β -galactosidase et de la DPP III.

L'activité de l'**adénylate kinase** est mesurée en utilisant le kit *ToxiLight* (Cambrex) selon les instructions fournies par le fabricant. Ce kit est basé sur la détection par bioluminescence de l'adénylate kinase (Crouch et al., 1993). L'adénylate kinase présente dans le milieu d'incubation phosphoryle l'adénosine-diphosphate (ADP) en adénosine-triphosphate (ATP). La luciférase également présente dans le milieu d'incubation catalyse la formation d'oxyluciférine à partir de luciférine, d'ATP et d'oxygène, engendrant la libération de lumière détectable au luminomètre.

8 Analyse de l'apparition de Lamp-1 et de Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique

Les effets éventuels d'un traitement de kératinocytes avec l'ionomycine sur l'apparition de Lamp-1 et Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique ont été étudiés par une approche biochimique et une approche morphologique.

8.1 Biotinylation de Lamp-1, Lamp-2 ou CD9 et précipitation des protéines biotinylées par la streptavidine-agarose

L'étude par approche biochimique a été réalisée selon une procédure basée sur la méthode de Rohrer et al., 1996. La fig. M-1 montre une représentation

schématique de la procédure expérimentale utilisée pour la détection biochimique de la localisation de Lamp-1 au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes. Les kératinocytes sont mis en culture dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre et amenés à confluence en conditions de culture autocrine. Les cellules sont marquées à 37°C en présence de Tran³⁵S-Label™ pendant 1h, lavées et incubées pendant 2h dans du milieu de culture autocrine. Ensuite, les kératinocytes sont incubés à 37°C pendant 1h en présence d'ionomycine 30 µM ou d'ionomycine 30 µM et d'EGTA 5 mM. Les cellules sont lavées cinq fois avec du tampon PBS à 4°C et incubés sur la glace dans du tampon PBS contenant 2 mg/ml de NHS-SS-biotine (Pierce) pendant 45 min. La biotinylation est arrêtée par quatre lavages avec du tampon PBS contenant de la glycine 50 mM. Les cellules sont lysées et Lamp-1, Lamp-2 ou CD9 sont immunoprécipités selon la procédure décrite dans le § 2 en utilisant les anticorps décrits dans le tableau M-IV. Les protéines immunoprécipitées sont détachées par une incubation avec 100 µl d'une solution aqueuse contenant 0,5% de SDS à 95°C pendant 10 min. L'échantillon est vortexé et centrifugé à 13000 g pendant 20 s. Le surnageant est dilué dans 900 µl de tampon de lyse et les protéines biotinylées sont précipitées par une incubation en présence de streptavidine-agarose (Pierce) pendant minimum 4h à 4°C. Les billes d'agarose sont sédimentées et les protéines contenues dans la moitié du surnageant sont précipitées en mélangeant les 500 µl de milieu avec 500 µl d'une solution contenant 2 volumes de méthanol pour 1 volume de chloroforme. Après une centrifugation à 13000 g pendant 1 min, la phase aqueuse est écartée et la phase organique est lavée avec 400 µl de méthanol. Après une nouvelle centrifugation à 13000 g pendant 1 min, le surnageant est écarté et le culot protéique est séché et resuspendu dans du tampon riche en détergent et en agent réducteur (Tris-HCl 0,125 M, 0,2% de glycérol, 4% de SDS, dithiothreitol/DTT 0,4 M, 0,1% de bleu de bromophénol, pH 6,8). Les billes de streptavidine-agarose sont lavées 3 fois avec du tampon PBS contenant 0,5% de déoxycholate de sodium, 1% de Triton X-100 et 0,1% de SDS et les protéines biotinylées sont détachées par une incubation avec du tampon riche en détergent et en agent réducteur pendant 5 min à 100°C. Les protéines biotinylées et non-biotinylées sont séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS. Un gel avec une concentration de 7,5% de polyacrylamide est utilisé pour la détection de Lamp-1 et de Lamp-2 (110-120 kDa) et un gel avec une concentration de 15% de polyacrylamide est utilisé pour la détection de CD9 (24 kDa). Le gel d'électrophorèse est séché et les protéines marquées aux acides aminés radioactifs sont visualisés par un appareil *Cyclone* (Packard) en utilisant des écrans de stockage au phosphore.

La détection de Lamp-2 est réalisée par Western blot. Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF, Amersham) par une technique d'électro-blotting en immersion (Bio-Rad) selon les instructions du fabricant. Les sites non spécifiques de la membrane sont ensuite bloqués par une incubation en présence d'une solution saline tamponnée par du tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane (Tris) (TBS; chlorure de sodium 137 mM, Tris 10 mM, pH 7,4) contenant 0,1% de Tween-20 et 5% de lait écrémé (TBST) pendant 1h à température ambiante. La membrane est ensuite incubée en présence d'anticorps primaires spécifiques de Lamp-2 dilués dans du tampon TBST, suivi, après quelques lavages, d'une incubation en présence d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (DAKO). Lamp-2 est révélé par chimiluminescence (kit POD, Roche).

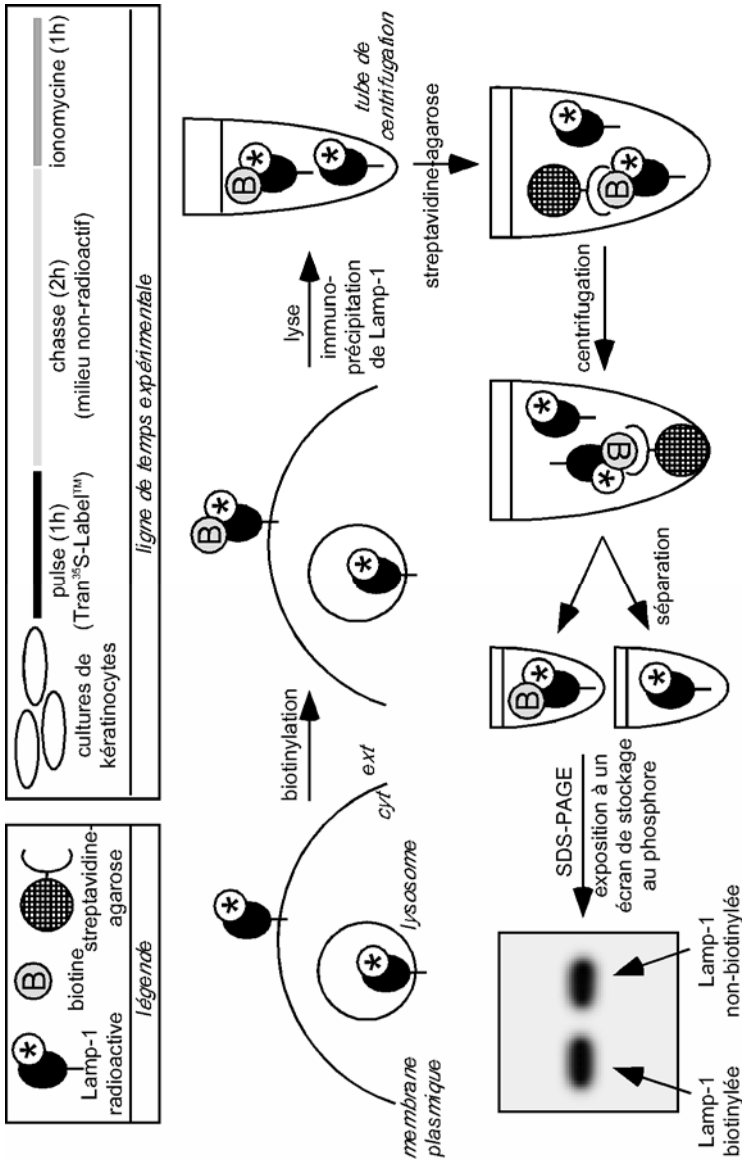


Fig. M-1 : Représentation schématique de la procédure expérimentale utilisée pour la détection biochimique de la localisation de Lamp-1 au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes suite à une incubation en présence d'ionomycine (ext=espace extracellulaire ; cyt=cytoplasme)

8.2 Détection par immunofluorescence de Lamp-1 ou de la kinésine au niveau de la membrane plasmique

L'approche morphologique pour étudier les effets éventuels d'un traitement de kératinocytes avec l'ionomycine sur l'apparition de Lamp-1 et Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique est basée sur la méthode de Amos & Lotan, 1990. Les kératinocytes sont mis en culture sur des lames couvre-objets en verre, sont amenés à confluence et incubés en présence d'ionomycine 30 μ M pendant 1h. Ensuite, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS à 4°C et incubées pendant 30 min à 4°C avec des anticorps monoclonaux de souris spécifiques de Lamp-1 (voir tableau M-IV) ou de la kinésine (clone KN-01, Exbio) dilués 1 :20 dans du tampon PBS contenant 1% de BSA. Après quelques lavages, les anticorps primaires sont détectés par une incubation pendant 30 min à 4°C avec des anticorps secondaires couplés à l'Alexa 488™ (Molecular Probes) dilués 1 :200 dans du tampon PBS contenant 1% de BSA. Les cellules sont lavées, fixées pendant 30 min à température ambiante au moyen de tampon PBS contenant 4% de formaldéhyde et montées sur des lames avec du milieu de montage Mowiol (Molecular Probes).

La localisation intracellulaire de Lamp-1 et de la kinésine est visualisée par une procédure de marquage en immunofluorescence basée sur la méthode décrite par Baudoux et al., 2000. Les kératinocytes sont fixés au moyen de tampon PBS contenant 4% de formaldéhyde, lavés, perméabilisés au moyen de tampon PBS contenant 1% de BSA et 0,1% de Triton X-100 pendant 30 min. Les cellules sont ensuite incubées en présence de tampon PBS/BSA/Triton X-100 contenant des anticorps spécifiques de Lamp-1 ou de la kinésine dilués 1 :20. Après quelques lavages, les anticorps primaires sont détectés par une incubation pendant 30 min avec des anticorps secondaires couplés à l'Alexa 488™ dilués 1 :200 dans du tampon PBS/BSA/Triton X-100.

Après le marquage, les cellules sont observés en utilisant un microscope à épifluorescence Olympus AX70 équipé des filtres spécifiques pour l'observation du FITC. Des photos sont prises au moyen d'une caméra numérique AxioCam et le logiciel AxioVision (Zeiss).

9 Déplétion des kératinocytes en cholestérol.

Des cultures de kératinocytes sont préparées en conditions autocrines comme décrit dans le § 1 jusqu'à sous-confluence, confluence ou post-confluence.

Les cultures sont alors incubées en présence de méthyl- β -cyclodextrine (M β CD, Sigma) dans le but de dépléter les membranes cellulaires en cholestérol (Klein et al., 1995). La M β CD est utilisée à une concentration de 1% (poids/volume), correspondant approximativement à 7.5 mM. Une telle concentration a été classiquement utilisée pour traiter des cellules en culture avec la M β CD, dont les kératinocytes (Gniadecki et al., 2002).

Pour contrôler que les effets de la M β CD sont bien dus à l'extraction du cholestérol, des complexes M β CD-cholestérol sont préparés selon Klein et al. (1995) : 1 g de M β CD est dissous dans de l'eau distillée et 30 mg de cholestérol (Sigma) sont dissous dans une solution contenant 2 volumes de méthanol pour 1 volume de chloroforme. La solution de M β CD est chauffée à 80°C et la solution de cholestérol est ajoutée goutte par goutte. Les solutions sont mélangées par un agitateur magnétique jusqu'à la dissolution complète du cholestérol. La solution de M β CD-cholestérol est séchée sous une atmosphère d'azote.

Avant leur ajout sur les kératinocytes, les réactifs sont dissous extemporanément dans du milieu de culture et ces milieux sont restérilisés par filtration à travers un filtre 0,2 μ m (Millex GP, Millipore).

L'analyse de l'effet d'une déplétion en cholestérol sur l'expression génique nécessite une incubation prolongée. En nous inspirant d'une procédure mise au point pour la déplétion en cholestérol de fibroblastes (Cooper et al., 2003), les kératinocytes sont incubés en présence de M β CD pendant 1h pour extraire le cholestérol membranaire. La M β CD est alors enlevée du milieu de culture, mais la néosynthèse de cholestérol est inhibée par un traitement avec de la lovastatine 10 μ M (Sigma) pendant 17h pour empêcher les cellules de réapprovisionner leur stock en cholestérol membranaire. La lovastatine inhibe la hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, qui est une enzyme-clé dans la voie de synthèse du cholestérol (Kita et al., 1980).

10 Mesure de la cytotoxicité exercée par le traitement avec la méthyl- β -cyclodextrine

La cytotoxicité éventuelle que la déplétion en cholestérol exerce sur les cultures de kératinocytes est analysée en utilisant le kit *ToxiLight*TM (Cambrex), basé sur la libération de l'enzyme cytosolique adénylate kinase par les cellules, selon les instructions fournies par le fabricant (cf. § 7).

11 Dosage du cholestérol

Les kératinocytes sont lysés dans un tampon PBS à 1% de Triton X-100 et le cholestérol cellulaire est dosé dans les lysats au moyen du kit Cholestérol RTU (bioMérieux) selon les instructions du fabricant. Le cholestérol est dosé en utilisant la séquence cholestérol estérase-cholestérol oxydase-peroxydase-chromogène (Allain et al., 1974). La concentration en cholestérol mesurée dans les lysats est rapportée à la concentration en protéines mesurée en utilisant le kit Dc (Bio-Rad), dont la méthode de détection est basée sur la méthode de Lowry, 1951.

12 Détection morphologique du cholestérol

Le cholestérol cellulaire peut être visualisé en incubant les cellules en présence de filipine, qui est une molécule fluorescente se fixant au cholestérol (Porn & Slotte, 1995). Des kératinocytes mis en culture sur des lamelles couvre-objets sont lavés avec du PBS, fixés avec une solution contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 30 min à température ambiante, relavés avec du PBS et incubés en présence de 50 µg/ml de filipine (Sigma) pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont lavées et montées sur des lames porte-objets en utilisant le milieu de montage Mowiol (Molecular Probes). Le marquage avec la filipine est visualisé en fluorescence au moyen d'un microscope Olympus AX70 équipé des filtres adéquats pour une excitation en lumière UV. Des photos numériques sont prises grâce à une caméra numérique AxioCam et le logiciel AxioVision (Zeiss).

13 Détection des cellules apoptotiques

La population de cellules apoptotiques est détectée dans des cultures de kératinocytes en utilisant le *In Situ Cell Death Detection* kit (Roche) selon les instructions fournies par le fabricant.

14 Détection des rafts lipidiques

Le marquage de cellules avec la sous-unité B de la toxine cholérique couplée à une molécule fluorescente est une méthode bien établie pour visualiser les rafts lipidiques (Harder et al., 1998), parce que cette sous-unité est un ligand du ganglioside G_{M1} qui est spécifique des rafts. Cette méthode a été utilisée pour détecter les rafts dans la membrane plasmique des kératinocytes (Gniadecki et al., 2002). Des cultures de kératinocytes sontensemencées sur des couvre-objets et poursuivies jusqu'à confluence. Les cellules sont lavées

avec du PBS et incubées à 4°C pendant 30 min en présence de PBS contenant 1% de BSA et 8 µg/ml de sous-unité B de la toxine cholérique couplée à l'*Alexa Fluor® 488* (Molecular Probes). Cette incubation peut aussi être réalisée à 12°C. A cette température, la sous-unité B de toxine cholérique induit la formation de pentamères de ganglioside G_{M1} (Merritt et al., 1994), ce qui induit la formation d'agrégats de rafts lipidiques (Harder et al., 1998). Les cellules sont lavées avec du PBS et fixées par une incubation en présence de PBS contenant 4% de formaldéhyde pendant 30 min. Après quelques lavages supplémentaires, les lamelles sont montées sur des lames porte-objets en utilisant le milieu de montage Mowiol (Molecular Probes). Les cellules sont observées en épifluorescence au moyen d'un microscope Olympus AX70 équipé des filtres spécifiques pour l'observation du FITC. Des photos numériques sont prises grâce à une caméra numérique AxioCam et le logiciel AxioVision (Zeiss).

15 Isolement des ARN poly-A et analyse de l'expression des ARN poly-A par Northern blot

Des kératinocytes sont mis en culture dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre (Falcon). L'isolation d'ARN poly-A débute par la lyse des cellules à l'aide d'une solution riche en détergent et en sels (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM, 1% de dodécylsulfate de sodium (SDS)). Des molécules d'oligo-dT-cellulose (Invitrogen) sont préparées dans une solution à concentration saline élevée (Tris-HCl 10 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, 0,2% de SDS). A raison de 25 mg d'oligo-dT-cellulose par lysat provenant d'une boîte, les ARN poly-A sont captés par les molécules d'oligo-dT-cellulose pendant une nuit à température ambiante. Les complexes oligo-dT-cellulose-ARN poly-A sont récupérés par filtration et lavés avec une solution moins concentrée en sels (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 0,2% de SDS). Les ARN poly-A sont ensuite détachés par une solution sans sel à 55°C (Tris-HCl 5 mM, EDTA 1 mM, 0,5% de SDS). Les ARN poly-A sont ensuite précipités en ajustant la concentration en NaCl à 0,5 M et en ajoutant 2 volumes d'une solution de 95% d'éthanol. Après une nuit à -20°C, les ARN poly-A précipités sont concentrés par centrifugation à 13000g et dissous dans du tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) (Schwab et al., 1983).

Les échantillons d'ARN poly-A sont séparés dans un gel d'agarose (1,2% d'agarose, 6,6% de formaldéhyde, 3-(n-morpholino)-propane acide sulfonique (MOPS ; Sigma) 0,2 M, acétate de sodium 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7) par une électrophorèse à 75V durant 3h, transférés sur une membrane *Zeta-Probe GT* (Bio-Rad) et fixés de manière covalente sur la

membrane par une irradiation aux rayons UV de 150 mJ/cm². Une sonde d'ADN complémentaire est marquée en utilisant un kit de *random priming* (Invitrogen) avec des nucléotides radioactifs [α -³²P]dCTP (ICN). Les différentes sondes utilisées sont reprises dans le tableau M-VI. La membrane portant les ARN poly-A est hybridée avec la sonde marquée pendant une nuit à 43°C dans un tampon d'hybridation préparé selon les instructions du fabricant (Na₂HPO₄ 0,12 M, NaCl 0,25 M, SDS 0,24 M, 50% (v/v) formamide, pH 7,2). La membrane hybridée est ensuite lavée en utilisant les dilutions progressives d'un tampon SSC concentré 20x (chlorure de sodium 3 M, citrate de sodium 0,3 M, pH 7) de façon à incuber la membrane dans des conditions de stringence croissante. Les incubations sont réalisées successivement avec un tampon SSC concentré 2x en présence de 0,1% de SDS à 25°C et avec un tampon SSC concentré 0,5x en présence de 0,1% de SDS à 43°C, puis à 65°C pour toutes les sondes, sauf les sondes spécifiques des ARN des kératines. L'hybridation de la membrane avec ces dernières sondes est suivie par des lavages avec des solutions aboutissant à 0,1x SSC et 0,1% de SDS à 65°C. La membrane est emballée dans du cellophane et exposée sur un écran à stockage de phosphore. L'expression des ARN poly-A est visualisée au moyen d'un appareil *Cyclone*TM (Packard). Ensuite, la sonde marquée est détachée de la membrane par une incubation avec une solution bouillante à 0,1x SSC et 0,5% de SDS et la membrane est réhybridée avec une autre sonde. Afin de vérifier l'homogénéité du chargement du gel d'agarose et du transfert des ARN poly-A, la membrane est également hybridée avec la sonde spécifique des ARN de la phosphoprotéine ribosomale 36B4 (Laborda, 1991).

Sondes d'ADN complémentaire	Références
kératine 14, kératine 10	Roop et al., 1988
involucrine	Eckert & Green, 1986
36B4	Laborda, 1991

Tableau M-VI : Sondes d'ADN complémentaire utilisées pour hybrider des membranes de Northern blot.

16 Analyse de la phosphorylation des résidus tyrosine de protéines par Western blot

Des cultures autocrines de kératinocytes sont mis en culture dans des boîtes de Pétri à 6 cm de diamètre (TPP). A confluence, les cellules subissent une déplétion en cholestérol, puis sont lysés dans 150 μ l de tampon riche en détergent et en agent réducteur (Tris-HCl 0,125 M, 0,2% de glycérol, 4% de SDS, dithiothreitol/DTT 0,4 M, 0,1% de bleu de bromophénol, pH 6,8). Les lysats sont chauffés à 100°C pendant 5 min. Pour l'analyse de la phosphorylation du récepteur de l'EGF, 100 μ l de lysat sont chargés sur un

gel à 7,5% de polyacrylamide en présence de SDS, tandis que 40 µl de lysat sont chargés pour l'analyse de la phosphorylation du récepteur HER2 (gel à 7,5% de polyacrylamide en présence de SDS), de ERK1/2 et de p38 (gel à 12,5% de polyacrylamide en présence de SDS). Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane en PVDF et les sites non-spécifiques de la membrane sont bloqués. L'immunodétection de la protéine phosphorylée est réalisée en incubant les membranes en présence d'anticorps primaires spécifiques, qui sont détectés ensuite par des anticorps secondaires couplés à la peroxidase de raifort révélés en chimioluminescence. Les différents anticorps sont repris dans le tableau M-VII. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide en protéines est analysée par immunodétection de ERK1/2 (Schmidt et al., 2000) et/ou de l' α -tubuline (Mottet et al., 2003). Après l'analyse de la phosphorylation de p38, l'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide en p38 est analysée par immunodétection de p38. Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins deux expériences répétées en utilisant des souches de kératinocytes provenant de différents donneurs.

Anticorps	Firme	Dilution	Isotype	Source
EGFR phosphorylé	BioSource	1 :500	polyclonal	lapin
HER2 phosphorylé	Upstate	1 :1000	polyclonal	lapin
ERK1/2 phosphorylé	Upstate	1 :1000	monoclonal	souris
p38 phosphorylé	BioSource	1 :1000	polyclonal	lapin
ERK1/2 total	Upstate	1 :2500	polyclonal	lapin
p38 total	Cell Signaling	1 :500	polyclonal	lapin
α -tubuline	Sigma	1 :2000	monoclonal	souris

Tableau M-VII : Anticorps primaires utilisés pour la détection de protéines phosphorylées par Western blot.

17 Analyse de la phosphorylation de HER3, de p38 α , de p38 β et de p38 δ

Des cultures de kératinocytes réalisées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre (TPP) subissent une déplétion en cholestérol et sont lysées dans 1 ml de tampon de lyse (PBS, 1% Triton X-100, 5 µg/ml pepstatine A, 1 µg/ml leupeptine, 0,02 mg/ml aprotinine, orthovanadate de sodium 10 µM). Les lysats sont centrifugés à 13000 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants sont récoltés, préabsorbés en présence de protéine A-agarose (HER3) ou protéine G-agarose (p38 α , p38 β , p38 δ) pendant 1h sur un agitateur rotatif et incubés en présence de 5 µl d'anticorps spécifiques de HER3, de p38 α , de p38 β ou de p38 δ (voir tableau M-VIII) pendant 1h à 4°C.

Anticorps	Firme	Isotype	Source
HER3	Novocastra	polyclonal	lapin

p38 α	Zymed	monoclonal	souris
p38 β	Santa Cruz	polyclonal	chèvre
p38 δ	Santa Cruz	polyclonal	chèvre
phosphotyrosine	BioSource	monoclonal	souris
p38 phosphorylé	BioSource	polyclonal	lapin

Tableau M-VIII : Anticorps utilisés pour la détection de la phosphorylation de HER3, de p38 α , de p38 β et de p38 δ .

Les complexes immuns sont captés par une incubation en présence de protéine A-agarose (HER3) ou protéine G-agarose (p38 α , p38 β , p38 δ) pendant 1h à 4°C. Les billes d'agarose sont lavées 5 fois avec un tampon RIPA (PBS, 0,5% de déoxycholate de sodium, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS). Les protéines immunoprécipitées sont détachées par une incubation dans du tampon riche en détergent et en agent réducteur pendant 5 min à 100°C, séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS et transférées sur une membrane PVDF. L'immunodétection des protéines HER3 phosphorylées est réalisée par une incubation en présence d'anticorps spécifiques de résidus phosphotyrosine (dilution 1 :500), détectés ensuite par des anticorps secondaires couplés à la peroxidase de raifort révélés en chémiluminescence. Afin de vérifier la quantité de protéine immunoprécipitée, les complexes immuns sont détachés de la membrane par une incubation avec un tampon de stripping (Re-Blot, Chemicon) et la quantité totale de HER3 est révélée par une immunodétection en utilisant les anticorps spécifiques de HER3 décrits ci-dessus. L'immunodétection des protéines p38 α , p38 β ou p38 δ phosphorylées est réalisée par une incubation en présence d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la protéine p38 phosphorylée (dilution 1 :500), détectés ensuite par des anticorps secondaires couplés à la peroxidase de raifort révélés en chémiluminescence. La vérification de la quantité immunoprécipitée de protéine est réalisée après incubation avec un tampon de stripping par une immunodétection de la quantité totale de p38 α , de p38 β ou de p38 δ en utilisant les anticorps spécifiques des différentes isoformes de p38 décrits dans le tableau M-VIII.

**Chapitre 1 : Biosynthèse et sécrétion de
la cathepsine D au cours de la
différenciation des kératinocytes
épidermiques. Effets d'une entrée de
calcium sur le comportement des
lysosomes dans les kératinocytes.**

1 Introduction

Pour analyser la biosynthèse et la sécrétion de la cathepsine D en fonction de la différenciation des kératinocytes, nous avons utilisé le modèle de culture autocrine des kératinocytes afin d'obtenir une différenciation lors de différentes densités cellulaires de la culture (sous-confluence, confluence, post-confluence). Nous avons aussi traité certaines cultures avec le chlorure d'ammonium pour analyser les voies de transport de la cathepsine D vers sa destination lysosomale ou vers sa sécrétion.

Afin d'analyser si une entrée de calcium dans le cytosol des kératinocytes induit l'exocytose de lysosomes, nous avons incubé des kératinocytes en présence de l'ionophore ionomycine (Liu & Hermann, 1978) et analysé l'effet éventuel de ce traitement sur la sécrétion d'enzymes lysosomales solubles (cathepsine D, cathepsine C, β -galactosidase) et sur l'apparition de protéines lysosomales membranaires (Lamp-1 et Lamp-2) au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes.

2 Résultats

2.1 Maturation et sécrétion de la cathepsine D dans les kératinocytes

Rappelons que dans plusieurs types cellulaires, la cathepsine D présente un processus de maturation protéolytique caractéristique au cours de sa biosynthèse : l'enzyme est synthétisée sous une forme précurseur de 52 kDa clivée en une forme intermédiaire de 48 kDa. Cette forme intermédiaire est clivée dans les lysosomes en une forme mature de 31 kDa (Hasilik, 1992). Puisque la biosynthèse de la cathepsine D est peu connue dans les kératinocytes, nous avons étudié la maturation de cette enzyme (fig. 1-1A).

30 minutes après le marquage métabolique, la cathepsine D néosynthétisée est présente dans les kératinocytes sous sa forme précurseur de 52 kDa. La quantité de forme précurseur détectée dans les cellules diminue fortement entre 0h et 8h après le marquage métabolique. La forme précurseur est transformée en une forme intermédiaire de 48 kDa. La quantité de forme intermédiaire détectée dans les cellules présente un pic entre 2h et 4h après le marquage métabolique. La forme intermédiaire est ensuite transformée en forme mature de 31 kDa. La quantité de forme mature présente dans les cellules augmente fortement entre 0h et 8h après le marquage métabolique et atteint un plateau entre 8h et 24h après le marquage métabolique.

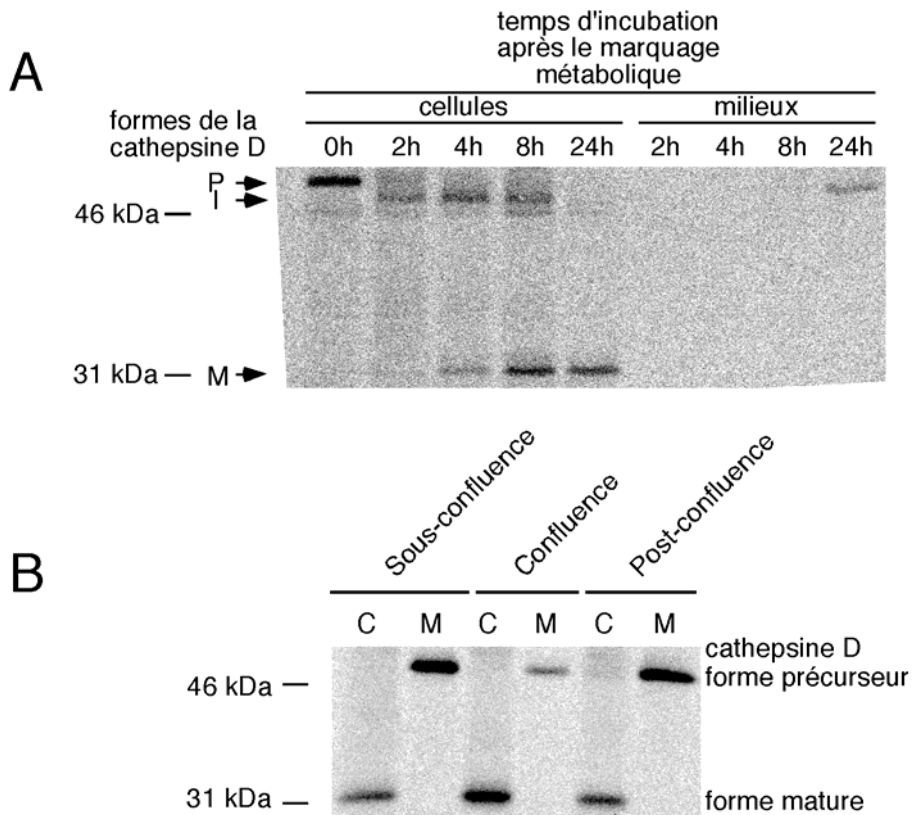


Fig. 1-1 : (A) Cinétique de maturation et de sécrétion de la cathepsine D dans les kératinocytes. (B) Sécrétion de la cathepsine D par les kératinocytes à différents stades de différenciation.

(A) Des cultures de kératinocytes sous-confluentes ont été marquées pendant 30 min en présence de Tran³⁵S-Label™ et ont été soumises aux différents temps de chasse indiqués. Les différentes formes de la cathepsine D (P=forme précurseur, I=forme intermédiaire, M=forme mature) ont été immunoprécipitées à partir des lysats cellulaires et des milieux d'incubation à l'aide d'un anticorps dirigé contre la cathepsine D. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et visualisées sur un appareil Cyclone™ (Packard) en utilisant des écrans de storage au phosphore. Cette expérience a été répétée en utilisant des cultures de kératinocytes confluentes, mais aussi sous-confluentes et post-confluentes et a donné lieu à des résultats similaires. (B) Des cultures de kératinocytes sous-confluentes, confluentes et post-confluentes ont été marquées pendant 16h en présence de Tran³⁵S-Label™. Les différentes formes de la cathepsine D ont été immunoprécipitées à partir des lysats cellulaires et des milieux d'incubation à l'aide d'un anticorps dirigé contre la cathepsine D. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et visualisées sur un appareil Cyclone™ (Packard) en utilisant des écrans de storage au phosphore. Afin de quantifier la proportion de la forme précurseur sécrétée par les kératinocytes, les unités d'intensité (*digital light units*/DLU) des bandes correspondant à la forme précurseur sécrétée et la forme mature intracellulaire ont été obtenues en utilisant le programme OptiQuant™ (Packard). Le pourcentage des DLU correspondant à la forme précurseur sécrétée a été calculé par rapport à la somme des DLU correspondant à la forme précurseur sécrétée et à la forme mature intracellulaire.

Au cours de la biosynthèse de la cathepsine D dans les fibroblastes et dans les cellules de carcinome hépatique HepG2, une proportion variable de forme précurseur peut échapper au ciblage vers les lysosomes et être sécrétée (Gieselmann et al., 1983; Delbruck et al., 1994). Nous avons analysé si les kératinocytes sécrètent également la cathepsine D sous sa forme précurseur. 24h après un marquage métabolique de 30 min, une proportion de forme précurseur est détectable dans le milieu d'incubation (fig. 1-1A). Après 16h de marquage métabolique, les kératinocytes contiennent de la forme mature et ont sécrété de la forme précurseur dans le milieu de culture à tous les stades de différenciation analysés (fig. 1-1B). Par rapport à la quantité totale de cathepsine D synthétisée pendant les 16h de marquage métabolique, la proportion de la forme précurseur sécrétée varie entre $53\pm 22\%$ (n=7) à sous-confluence, $31\pm 14\%$ (n=6) à confluence et $53\pm 26\%$ à post-confluence (n=4). L'application du test de Student montre qu'il n'y pas de différence statistiquement significative entre ces valeurs, suggérant que la sécrétion de la forme précurseur n'est pas régulée en fonction du stade de

différenciation des kératinocytes. En ne tenant pas compte du stade de différenciation, la quantification de la forme précurseur sécrétée par rapport à la quantité totale de cathepsine D synthétisée pendant les 16h de marquage métabolique révèle que les kératinocytes sécrètent en moyenne $45\pm 22\%$ (n=17) de la cathepsine D sous la forme précurseur.

2.2 Effets d'une incubation des kératinocytes en présence de chlorure d'ammonium sur la sécrétion de cathepsine D

Dans les kératinocytes, les voies utilisées pour le transport lysosomal de la cathepsine D sont inconnues. Pour investiguer ces voies de transport, nous avons analysé l'effet d'une incubation des kératinocytes en présence de chlorure d'ammonium 10 mM (n=1), 15 mM (n=3) ou 20 mM (n=1) sur la sécrétion de la cathepsine D (fig. 1-2A). Ce traitement ne semble pas augmenter la sécrétion de la forme précurseur de la cathepsine D par rapport aux cellules non traitées, indépendamment de la concentration en chlorure d'ammonium utilisée (fig. 1-2A). Ce traitement provoque aussi l'accumulation intracellulaire de la forme précurseur et de la forme intermédiaire au dépens de la forme mature à toutes les concentrations de chlorure d'ammonium utilisées, suggérant que ce traitement perturbe la maturation protéolytique de la cathepsine D.

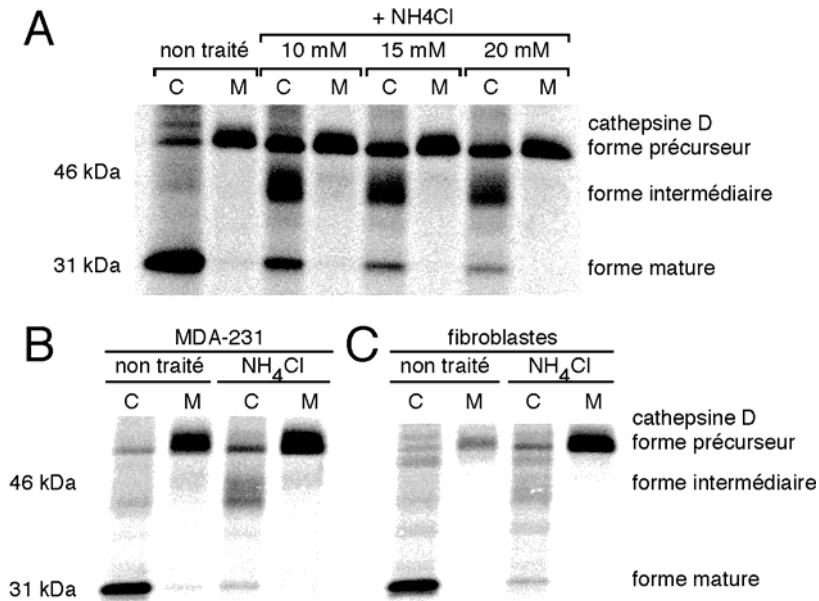


Fig. 1-2 : Effets d'une incubation des kératinocytes (A), des cellules MDA-MB-231 (B) et des fibroblastes (C) en présence de chlorure d'ammonium sur la sécrétion de cathepsine D.

Des cultures de kératinocytes, de cellules MDA-MB-231 ou de fibroblastes confluentes ont été marquées pendant 16h en présence de Tran³⁵S-Label™ et en présence de chlorure d'ammonium (MDA-MB-231 et fibroblastes : chlorure d'ammonium 15 mM). Les différentes formes de la cathepsine D ont été immunoprécipitées à partir des lysats cellulaires (C) et des milieux d'incubation (M) à l'aide d'un anticorps dirigé contre la cathepsine D. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et visualisées sur un appareil Cyclone™ (Packard) en utilisant des écrans de storage au phosphore.

Afin de vérifier l'efficacité de ce traitement avec le chlorure d'ammonium, nous avons analysé la sécrétion de la cathepsine D par des cellules MDA-MB-231 et des fibroblastes. Les cellules MDA-MB-231 qui ont subi un marquage métabolique long exhibent une sécrétion importante de la forme précurseur de la cathepsine D (fig. 1-2B). L'incubation en présence de chlorure d'ammonium 15 mM semble un peu augmenter cette proportion de forme précurseur sécrétée. Au contraire, l'analyse de la sécrétion de la cathepsine D par des fibroblastes dans nos conditions expérimentales montrent que ces cellules ne sécrètent qu'une faible proportion de la forme

précurseur de la cathepsine D (fig. 1-2C). Cette proportion est augmentée de manière importante lors d'une incubation des fibroblastes en présence de chlorure d'ammonium 15 mM. Le traitement par le chlorure d'ammonium induit également une diminution importante de la forme mature et une accumulation intracellulaire des formes précurseur et intermédiaire dans les cellules MDA-MB-231 et les fibroblastes.

2.3 Effet de l'ionomycine sur la production d'enveloppes cornées par les kératinocytes

L'incubation de kératinocytes en présence d'ionophores de calcium provoque la formation d'enveloppes cornées, parce que l'entrée de calcium induite par l'ionophore active la transglutaminase épidermique (Rice & Green, 1979; Leigh & Watt, 1994). Pour vérifier de manière indirecte qu'une incubation en présence d'ionomycine induit une entrée de calcium dans les kératinocytes, nous avons étudié l'effet de ce traitement sur la formation d'enveloppes cornées. Comme le montre la fig. 1-3b, l'incubation en présence d'ionomycine induit la formation abondante d'enveloppes cornées, tandis que ces enveloppes ne sont pas détectées dans des cultures non traitées (fig. 1-3a). Des enveloppes cornées ne sont pas non plus détectées dans des cultures incubées pendant 5h en présence d'ionomycine 10 μ M et d'EGTA 5 mM (fig. 1-3c), c'est-à-dire dans des conditions où les ions calcium présents dans le milieu d'incubation ont été chélatés par l'EGTA. Vu qu'une entrée d'ions calcium est nécessaire pour stimuler la formation d'enveloppes cornées dans les kératinocytes (Rice & Green, 1979), ce résultat montre qu'une incubation en présence d'ionomycine induit effectivement une entrée d'ions calcium dans ces cellules.

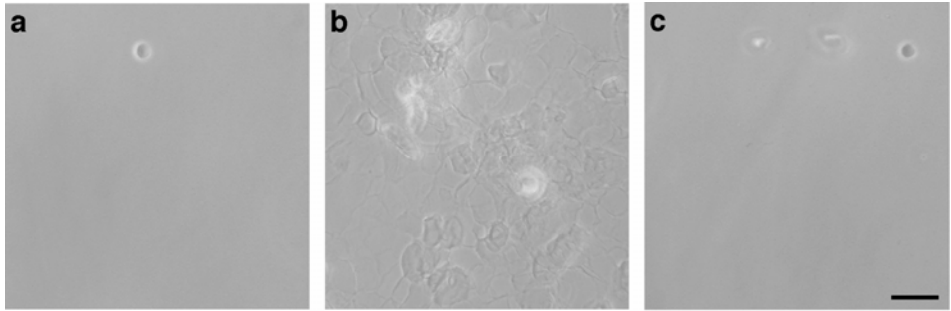


Fig. 1-3 : Effets d'une incubation en présence d'ionomycine sur la formation d'enveloppes cornées dans les kératinocytes.

Des cultures post-confluentes de kératinocytes ont été incubées pendant 5h en présence d'ionomycine 10 μ M (b) ou en présence d'ionomycine 10 μ M et d'EGTA 5 mM (c). D'autres cultures n'ont pas été traitées (a). Ensuite, les enveloppes cornées présentes dans les cultures ont été révélées comme décrit dans *Matériel et Méthodes*, observées en microscopie optique et photographiées (barre=100 μ m).

2.4 Effets d'un traitement par l'ionomycine sur la morphologie des kératinocytes

Afin d'analyser l'effet d'une entrée de calcium sur la morphologie des kératinocytes, nous avons observé des cultures en microscopie à contraste de phase après une incubation en présence d'ionomycine. Les kératinocytes confluents non traités présentent une morphologie polyédrique typique (fig. 1-4a). Une incubation en présence d'ionomycine 30 μ M induit la formation de blebs membranaires après 15 min de traitement (fig. 1-4c). 30 min après l'incubation en présence de l'ionomycine, ces blebs sont toujours visibles (fig. 1-4d). Après 60 min d'incubation, les kératinocytes ont adapté une forme arrondie et les blebs ne sont plus observés (fig. 1-4e). Ces altérations de la morphologie des kératinocytes sont dépendantes du calcium puisqu'elles ne sont pas observées pendant une incubation en présence d'ionomycine 30 μ M et d'EGTA 5 mM (fig. 1-4b).

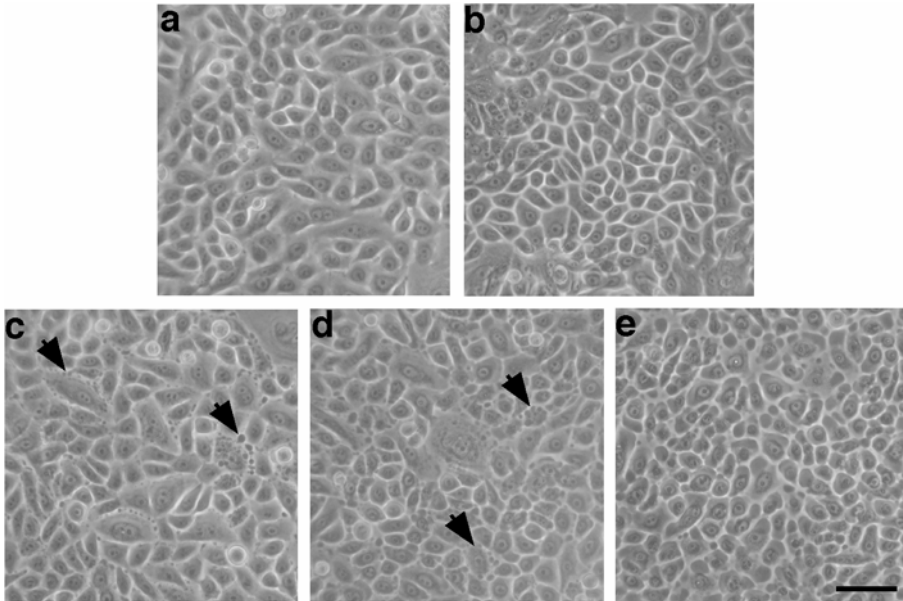


Fig. 1-4 : Effets d'une incubation en présence d'ionomycine sur la morphologie des kératinocytes.

Des cultures de kératinocytes confluentes ont été incubées en présence de 0,3% de DMSO pendant 60 min (a), en présence d'ionomycine 30 μM et d'EGTA 5 mM pendant 60 min (b), ou en présence d'ionomycine 30 μM pendant 15 min (c), 30 min (d) et 60 min (e). Après ces traitements, les cultures ont été observées en utilisant un microscope inversé à contraste de phase et photographiées en utilisant un appareil numérique Olympus. Les blebs membranaires apparaissant lors du traitement par l'ionomycine sont indiqués par des flèches (barre=100 μm).

Afin d'examiner si l'ionomycine utilisée dans nos conditions expérimentales exerce un effet cytotoxique sur les kératinocytes, nous avons incubé des cultures confluentes en présence d'ionomycine 30 μM pendant 1h et analysé la cytotoxicité de ce traitement comme décrit dans *Matériel et Méthodes*. Les cultures incubées en présence d'ionomycine exhibent $99,3\% \pm 0,5\%$ de cellules viables (n=3). Les cultures non traitées exhibent un taux de viabilité cellulaire de $99,8\% \pm 0,3\%$ (n=3). La différence entre ces deux taux de viabilité n'est pas significative ($p > 0,05$), ce qui indique que cette incubation

en présence d'ionomycine 30 μM n'exerce pas d'effet cytotoxique sur les kératinocytes.

2.5 Effets d'un traitement avec l'ionomycine sur la libération d'enzymes lysosomales solubles par les kératinocytes

Dans cette section, nous avons analysé la sécrétion d'enzymes lysosomales solubles (cathepsine C, β -galactosidase et cathepsine D) suite à une incubation des cellules en présence d'ionomycine.

2.5.1 Cathepsine C et β -galactosidase

Les kératinocytes non traités libèrent $1,0\% \pm 0,3\%$ de l'activité totale de la cathepsine C pendant 60 min d'incubation ($n=6$, fig. 1-5A). En présence d'ionomycine 10 μM , les cellules sécrètent $1,0\% \pm 0,4\%$ pendant 60 min d'incubation ($n=3$). Ce traitement ne semble donc pas induire une libération de l'activité de la cathepsine C, alors que l'incubation de fibroblastes et de certaines cellules épithéliales en présence d'ionomycine 10 μM induit une exocytose de lysosomes évidente (Rodriguez et al., 1997).

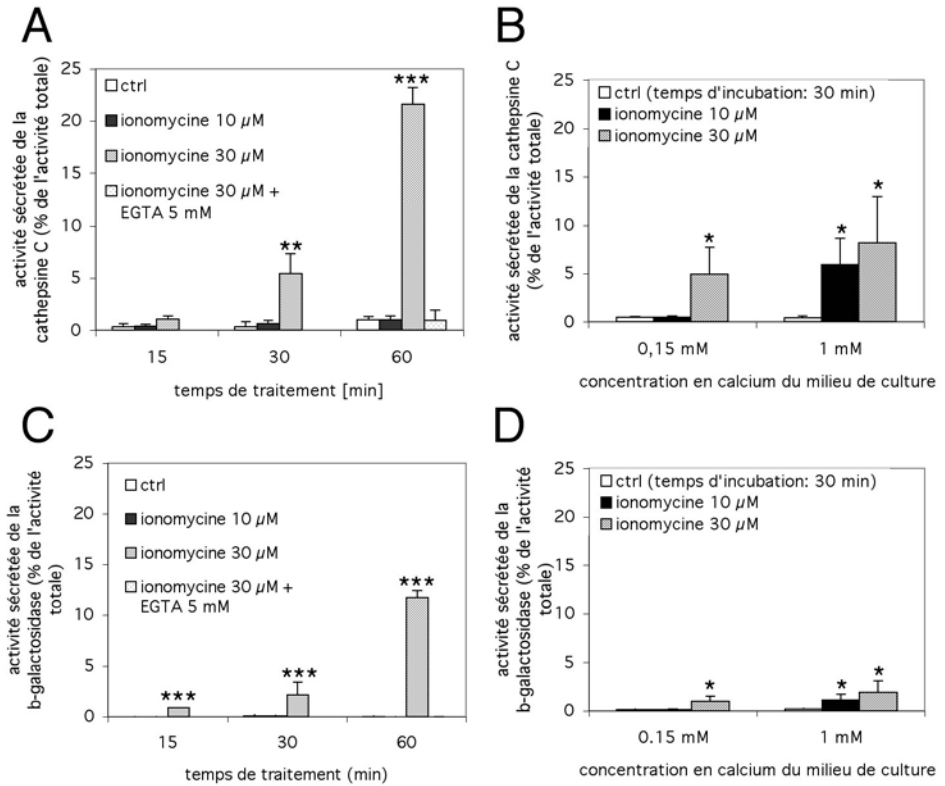


Fig. 1-5 : Effets d'une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine sur la libération d'activité de la cathepsine C (A, B) et de la β -galactosidase (C, D).

(A) et (C) Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées pendant 15, 30 ou 60 min en présence de calcium 0,15 mM et d'ionomycine 10 μ M ou 30 μ M. D'autres cultures ont été incubées pendant 15, 30 ou 60 en présence de calcium 0,15 mM ou pendant 60 min en présence de calcium 0,15 mM, d'ionomycine 30 μ M et d'EGTA 5 mM. (B) et (D) Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées pendant 30 min en présence de calcium 1 mM, ou en présence de calcium 1 mM et d'ionomycine 10 μ M ou 30 μ M.

Les activités de la cathepsine C et de la β -galactosidase ont été mesurées dans les milieux récoltés et dans les lysats cellulaires correspondants. Le pourcentage de l'activité de la cathepsine C ou de la β -galactosidase mesurée dans les milieux est calculé par rapport à l'activité totale, c'est-à-dire la somme de l'activité mesurée dans les milieux et de l'activité mesurée dans les lysats cellulaires. La figure représente les moyennes et l'écart-type des pourcentages de l'activité de la cathepsine C ou de la β -galactosidase sécrétée. Les moyennes ont été comparées en utilisant le test de Student ($p < 0,05$ est représenté par *, $p < 0,01$ est représenté par ** ; et $p < 0,001$ est représenté par ***).

Il est possible que cette concentration d'ionomycine ne soit pas assez élevée pour induire l'exocytose de lysosomes dans les kératinocytes, peut-être parce que la concentration en calcium du milieu de culture utilisé pour ces cellules (0,15 mM) est inférieure à la concentration en calcium dans le milieu utilisé pour traiter les autres types cellulaires (1 mM). C'est pourquoi nous avons analysé l'effet d'une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine 30 μ M. L'incubation des cellules pendant 15 min en présence d'ionomycine 30 μ M résulte en la libération de $1,1\% \pm 0,3\%$ de l'activité de la cathepsine C totale (n=3). L'incubation des cellules pendant 30 min ou 60 min en présence d'ionomycine 30 μ M induit la libération de respectivement $5,4\% \pm 1,9\%$ (n=6) et $21,6\% \pm 1,6\%$ (n=6) de l'activité totale de la cathepsine C. La différence entre l'activité de la cathepsine C libérée pendant 30 et 60 min d'incubation en présence d'ionomycine est significativement différente de l'activité de la cathepsine C libérée par les cellules non traitées sur ces mêmes laps de temps (respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,001$). Signalons que l'incubation de kératinocytes pendant 60 min en présence d'ionomycine 30 μ M et d'EGTA 5 mM inhibe la libération d'activité de la cathepsine C ($0,9\% \pm 1,0\%$, n=3), montrant bien la dépendance de l'exocytose de lysosomes sur la présence de calcium pouvant pénétrer dans les kératinocytes.

Pour examiner l'implication de la concentration extracellulaire en calcium sur la nécessité d'ajuster la concentration d'ionomycine afin d'obtenir une libération d'activité de la cathepsine C, nous avons incubé des kératinocytes pendant 30 min en présence de calcium 0,15 mM ou 1 mM et analysé l'effet d'un traitement avec de l'ionomycine 10 μ M ou 30 μ M (fig. 1-5B). En présence de calcium 0,15 mM, ce traitement induit la libération de respectivement $0,5\% \pm 0,1\%$ (n=3) et $4,9\% \pm 2,8\%$ (n=3) de l'activité totale de

la cathepsine C. Par contre, en présence de calcium 1 mM, ce traitement induit la libération de respectivement $5,9\% \pm 2,7$ ($n=3$) et $8,2\% \pm 4,7\%$ ($n=3$). Les cellules incubées pendant 30 min en présence de calcium 0,15 mM ou 1 mM libèrent respectivement $0,4\% \pm 0,1\%$ ($n=3$) et $0,4\% \pm 0,2\%$ ($n=3$) d'activité de la cathepsine C. En résumé, ces résultats montrent que l'incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine 30 μ M induit une libération significative d'activité de la cathepsine C si le calcium extracellulaire est de 0,15 mM, mais que cette libération est déjà induite par l'ionomycine 10 μ M si la concentration en calcium extracellulaire est de 1 mM. Ce résultat suggère que l'effet de l'ionomycine peut dépendre de la concentration en calcium extracellulaire.

De même que les cellules non traitées, les kératinocytes incubés en présence d'ionomycine 10 μ M libèrent une proportion d'activité de la **β -galactosidase** pratiquement indétectable ($<0,1\%$; fig. 1-5C). L'incubation des cellules pendant 15 min en présence d'ionomycine 30 μ M induit la libération de $0,9\% \pm 0,0\%$ ($n=3$) d'activité de la β -galactosidase, tandis qu'une incubation pendant 30 min et 60 min en présence de cette concentration d'ionomycine résulte en la libération de respectivement $2,1\% \pm 1,2\%$ ($n=6$) et $11,8\% \pm 0,7\%$ ($n=3$) d'activité de la β -galactosidase. L'incubation des cellules pendant 60 min en présence d'ionomycine 30 μ M et d'EGTA 5 mM empêche la libération d'activité de la β -galactosidase ($<0,1\%$). L'analyse de l'implication de la concentration extracellulaire en calcium sur l'effet de l'ionomycine sur la libération d'activité de la β -galactosidase révèle qu'en présence de calcium 0,15 mM, l'incubation de kératinocytes en présence d'ionomycine 10 μ M induit la libération de respectivement $0,1\% \pm 0,0\%$ ($n=3$) et $1,0\% \pm 0,5\%$ ($n=3$) de l'activité totale de la β -galactosidase (fig. 1-5D). Par contre, en présence de calcium 1 mM, ce traitement induit la

libération de respectivement $1,1\% \pm 0,5\%$ ($n=3$) et $1,9\% \pm 1,2\%$ ($n=3$). Les cellules incubées pendant 30 min en présence de calcium 0,15 mM ou 1 mM libèrent respectivement $0,1\% \pm 0,1\%$ ($n=3$) et $0,1\% \pm 0,0\%$ ($n=3$) d'activité de la β -galactosidase. De manière similaire à la cathepsine C, ces résultats montrent que l'incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine 10 μ M (calcium extracellulaire 1 mM) et 30 μ M (calcium extracellulaire 0,15 mM) induit la libération significative d'activité de la β -galactosidase.

Pour vérifier si le traitement avec l'ionomycine affecte la perméabilité de la membrane plasmique, nous avons incubé des kératinocytes en présence d'ionomycine et analysé la libération d'enzymes cytosoliques solubles dans le milieu d'incubation. Nous avons choisi d'analyser la libération de trois enzymes cytosoliques : la lactate déshydrogénase (E.C. 1.1.1.27), l'adénylate kinase (E.C. 2.7.4.3) et la dipeptidylpeptidase III (E.C. 3.4.14.4). Comme le montre le tableau 1-I, une incubation des kératinocytes pendant 60 min en présence d'ionomycine 30 μ M n'affecte pas le pourcentage d'activité de la lactate déshydrogénase, de l'adénylate kinase et de la dipeptidylpeptidase III libérée pendant le même laps de temps par des cellules non traitées. Ce résultat indique que l'incubation de kératinocytes en présence d'ionomycine n'affecte pas la perméabilité de la membrane plasmique.

enzyme	traitement		différence
	ctrl (n=3)	ionomycine 30 μ M (n=3)	
lactate déshydrogénase	26,4% \pm 10,3%	25,3% \pm 4,2%	NS
adénylate kinase	1,0% \pm 0,9%	0,6% \pm 0,3%	NS
dipeptidylpeptidase III	1,8% \pm 1,7%	2,4% \pm 3,4%	NS

Tableau 1-I : Effets d'une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine sur la libération de l'activité de la lactate déshydrogénase, de l'adénylate kinase et de la dipeptidylpeptidase III.

Des cultures de kératinocytes ont été incubées en présence de milieu de culture ou en présence d'ionomycine 30 μ M pendant 60 min. L'activité de la lactate déshydrogénase, de l'adénylate

kinase et de la dipeptidylpeptidase III a été mesurée dans les milieux récoltés et dans les lysats cellulaires correspondants. Le pourcentage de l'activité de ces enzymes mesurée dans les milieux est calculé par rapport à l'activité totale, c'est-à-dire la somme de l'activité mesurée dans les milieux et de l'activité mesurée dans les lysats cellulaires. Le tableau représente la moyenne et l'écart-type du pourcentage de l'activité sécrétée de la lactate déshydrogénase, de l'adénylate kinase et de la dipeptidylpeptidase III. Les moyennes ont été comparées en utilisant le test de Student (NS=différence non significative).

Notons que la proportion de LDH libérée dans le milieu de culture des kératinocytes varie entre $25,3\% \pm 4,2\%$ et $26,4\% \pm 10,3\%$. Cette proportion est très importante par rapport aux deux autres enzymes analysées. Une proportion comparable de LDH a été libérée par des kératinocytes humains normaux en culture lors d'une autre étude (Tebbe et al., 1997). Les auteurs de cette étude n'ont pas discuté ce résultat, mais nous ne pouvons pas exclure que cette libération importante de LDH soit une propriété particulière des kératinocytes.

2.5.2 Cathepsine D

Pendant 60 min d'incubation, les kératinocytes non traités secrètent une faible proportion de la forme précurseur de la cathepsine D, mais pas de forme intermédiaire ni de forme mature (fig. 1-6A). Par contre, un traitement pendant 15, 30 et 60 min avec de l'ionomycine $30 \mu\text{M}$ induit une sécrétion de la forme mature de la cathepsine D, suggérant que ce traitement induit l'exocytose de lysosomes. Le traitement par l'ionomycine induit également la sécrétion inattendue de forme précurseur et de forme mature. Signalons que les bandes situées à environ 37 kDa et 45 kDa correspondent probablement à des peptides immunoprécipités de manière non-spécifique par l'anticorps dirigé contre la cathepsine D.

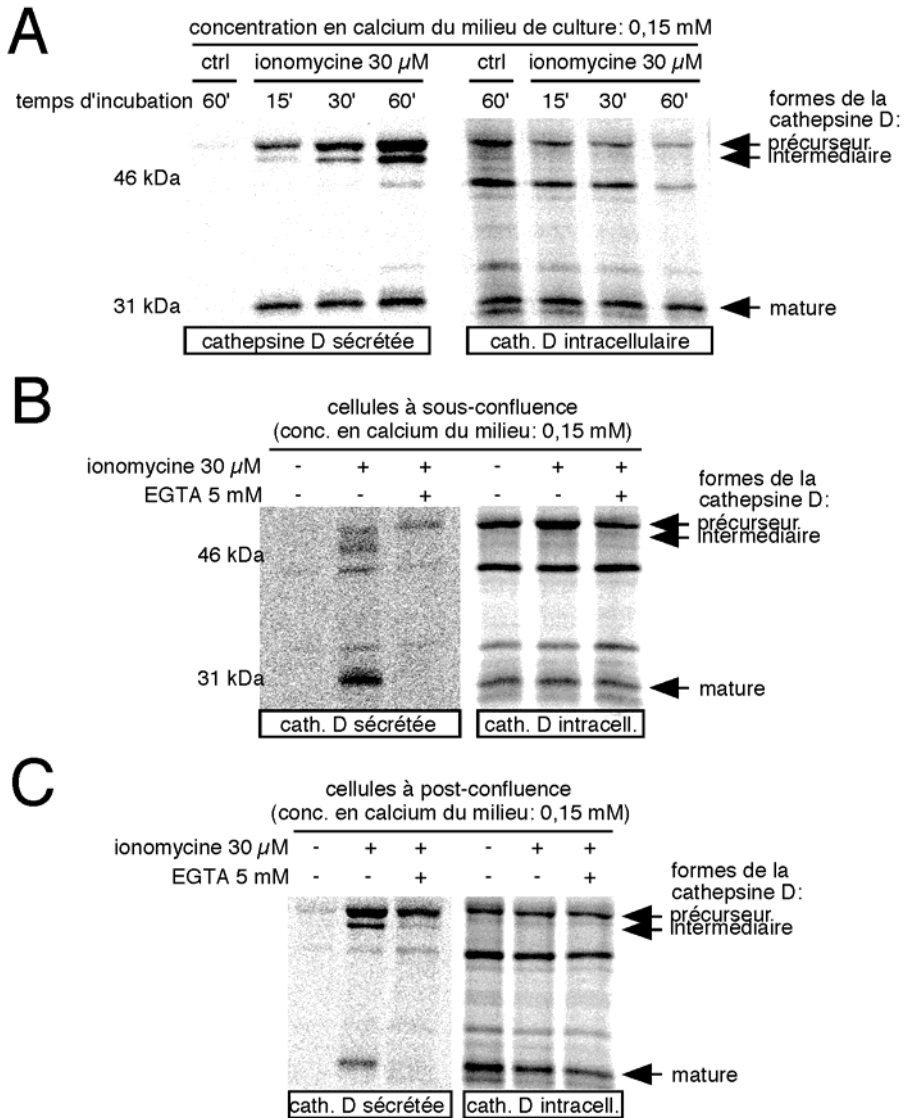


Fig. 1-6 : Effets d'une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine sur la libération de la cathepsine D.

Des cultures de kératinocytes confluentes (A), sous-confluentes (B) ou post-confluentes (C) ont été marquées pendant 30 min en présence de Tran³⁵S-Label™ et ont été soumises à un temps de chasse de 18h. (A) Les cellules ont été incubées pendant 1h en présence de milieu de culture, ou pendant 15, 30 ou 60 min en présence d'ionomycine 30 μ M. (B, C) Les cellules ont été incubées pendant 1h en présence de milieu de culture, ou en présence d'ionomycine 30 μ M ou en présence d'ionomycine 30 μ M et d'EGTA 5 mM. Les différentes formes de la cathepsine D ont été immunoprécipitées à partir des milieux d'incubation et des lysats

cellulaires à l'aide d'un anticorps dirigé contre la cathepsine D. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et visualisées sur un appareil Cyclone™ (Packard) en utilisant des écrans de storage au phosphore.

Ensuite, nous avons examiné si la sécrétion de la cathepsine D induite par un traitement avec l'ionomycine est liée à la densité cellulaire des cultures. Dans les cultures sous-confluentes (fig. 1-6B) et post-confluentes (fig. 1-6C), ce traitement induit la sécrétion de la forme mature, intermédiaire et précurseur de la cathepsine D. Lorsque les ions calcium sont chélatés par l'EGTA pendant un traitement par l'ionomycine, nous observons une diminution de la sécrétion des formes mature et intermédiaire de la cathepsine D, tandis que la sécrétion de forme précurseur n'est pas diminuée par la présence d'EGTA.

2.6 Effets d'un traitement avec l'ionomycine sur l'apparition de protéines lysosomales membranaires au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes

Pour étudier la présence de Lamp-1 et de Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes, nous avons employé d'abord une approche biochimique qui consiste à marquer par biotinylation les protéines exposées au niveau de la membrane plasmique des cellules. Afin de vérifier si cette méthode est efficace pour la détection de protéines localisées au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes, nous l'avons utilisée pour analyser la localisation de CD9 dans les kératinocytes. La tétraspanine CD9 est en effet exprimée de manière constitutive au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes (Baudoux et al., 2000). Nous avons choisi de marquer radioactivement la protéine CD9 lors de sa biosynthèse dans les kératinocytes et de suivre son apparition au niveau de la membrane plasmique en fonction du temps (fig. 1-7). Déjà 30 min après le marquage

métabolique, une proportion de CD9 biotinylée est détectable. 120 min après le marquage métabolique, cette proportion a augmenté et semble être aussi intense 240 min après le marquage métabolique. Une proportion de CD9 non-biotinylée est détectable 30 min après le marquage métabolique, mais cette proportion est presque indétectable 120 min ou 240 min après le marquage métabolique. Ce résultat montre que la protéine CD9 néosynthétisée apparaît progressivement au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes. En corollaire, ce résultat indique que la technique utilisée pour réaliser cette analyse est adaptée pour détecter l'apparition d'une protéine au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes.

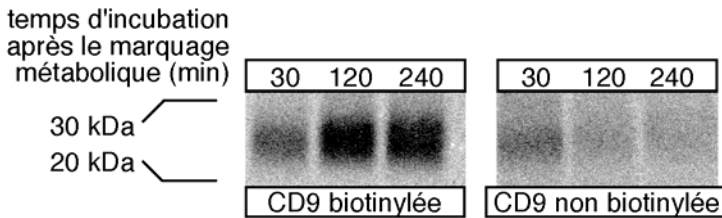


Fig. 1-7 : Apparition de CD9 néosynthétisée au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes.

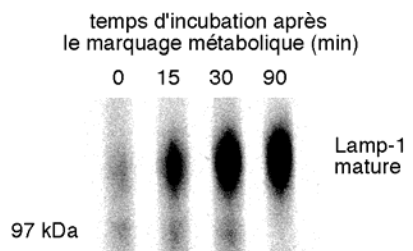
L'apparition de CD9 au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes a été analysée en utilisant la méthode de Rohrer et al., 1996. Des cultures de kératinocytes ont été incubées pendant 60 min en présence de Tran³⁵S-Label™ et ont été soumises à des temps de chasse croissants (30, 120 et 240 min). Ensuite, les protéines exposées au niveau de la membrane plasmique ont été biotinylées et les cellules ont été lysées. CD9 a été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires en utilisant un anticorps dirigé contre CD9 et les protéines CD9 biotinylées ont été précipitées par une incubation en présence de streptavidine-agarose. Les protéines CD9 biotinylées et non-biotinylées ont été séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et visualisées sur un appareil Cyclone™ en utilisant des écrans de stockage au phosphore.

Afin de pouvoir utiliser la technique décrite ci-dessus pour analyser l'apparition éventuelle de Lamp-1 au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes incubés en présence d'ionomycine, nous avons besoin de certaines informations sur la biosynthèse de Lamp-1 dans ces cellules.

Lamp-1 est synthétisée dans des lymphocytes sous une forme précurseur qui est progressivement transformée en une forme mature d'une taille entre 110 et 120 kDa (Carlsson et al., 1988; Mane et al., 1989). Pour connaître le temps nécessaire pour que la protéine Lamp-1 néosynthétisée soit détectable sous sa forme mature dans les kératinocytes, nous avons analysé la biosynthèse de Lamp-1 dans ces cellules. La fig. 1-8 montre que la forme mature de Lamp-1 est détectable 15 min après un marquage métabolique de 30 min. Une quantité plus importante de la forme mature de Lamp-1 semble être détectable 30 et 90 min après le marquage métabolique. Un temps d'incubation minimal de 30 min après un marquage métabolique est donc adéquat pour détecter la forme mature de Lamp-1 dans les kératinocytes.

Fig. 1-8 : Apparition de la forme mature néosynthétisée de Lamp-1 dans les kératinocytes.

Des cultures de kératinocytes ont été incubées pendant 30 min en présence de Tran³⁵S-Label™ et ont été soumises à des temps de chasse croissants (15, 30 et 90 min). Ensuite, Lamp-1 a été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires en utilisant un anticorps dirigé contre Lamp-1. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et visualisées sur un appareil *Cyclone*™ en utilisant des écrans de stockage au phosphore.



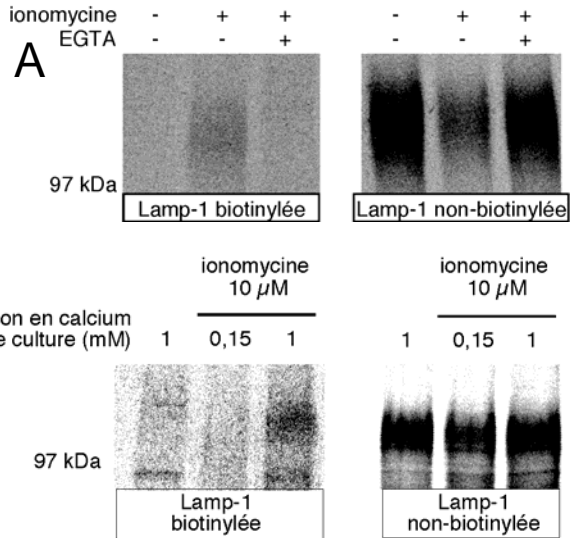
Après l'incubation de kératinocytes en présence d'ionomycine 30 μ M pendant 1h, une faible proportion de Lamp-1 biotinylée est détectée, contrairement à des cellules non traitées ou incubées pendant 1h en présence d'ionomycine 30 μ M et d'EGTA 5 mM (fig. 1-9A).

Fig. 1-9 : Effet d'une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine sur l'apparition de Lamp-1 au niveau de la membrane plasmique.

L'apparition de Lamp-1 au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes a été analysée en utilisant la méthode de Rohrer et al., 1996.

(A) Des cultures de kératinocytes ont été incubées pendant 1h en présence de Tran³⁵S-LabelTM et ont été

soumises à un temps de chasse de 2h. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 1h en présence d'ionomycine 30 μ M ou en présence d'ionomycine 30 μ M et d'EGTA 5 mM. (B) Des cultures de kératinocytes ont été incubées pendant 1h en présence de Tran³⁵S-LabelTM et ont été soumises à un temps de chasse de 2h. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 1h en présence de calcium 0,15 mM ou 1 mM et en présence d'ionomycine 10 μ M. Les protéines exposées au niveau de la membrane plasmique ont été biotinylées et les cellules ont été lysées. Lamp-1 a été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires en utilisant un anticorps dirigé contre Lamp-1 et les protéines Lamp-1 biotinylées ont été précipitées par une incubation en présence de streptavidine-agarose. Les protéines Lamp-1 biotinylées et non-biotinylées ont été séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et visualisées sur un appareil CycloneTM en utilisant des écrans de stockage au phosphore.



Pour investiguer l'implication éventuelle de la concentration extracellulaire en calcium sur la relocalisation de Lamp-1 à la membrane plasmique lors d'un traitement par l'ionomycine, nous avons incubé des kératinocytes en présence de calcium 0,15 mM ou 1 mM et en présence d'ionomycine 10 μ M. Comme le montre la fig. 1-9B, une faible proportion de Lamp-1 biotinylée est détectée dans les cellules incubées en présence de calcium 1 mM et d'ionomycine 10 μ M, mais pas dans les cellules incubées en présence de calcium 0,15 mM et d'ionomycine 10 μ M.

Suite à un traitement par l'ionomycine, les protéines Lamp-2 éventuellement biotinylées ont été détectées par Western blot. Comme le montre la fig. 1-10, l'incubation de kératinocytes pendant 1h en présence d'ionomycine 30 μM induit clairement l'apparition de Lamp-2 biotinylée, contrairement aux cellules non traitées ou incubées pendant 1h en présence d'ionomycine 30 μM et d'EGTA 5 mM. En résumé, ces résultats indiquent que l'incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine induit l'apparition de Lamp-1 et de Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique.

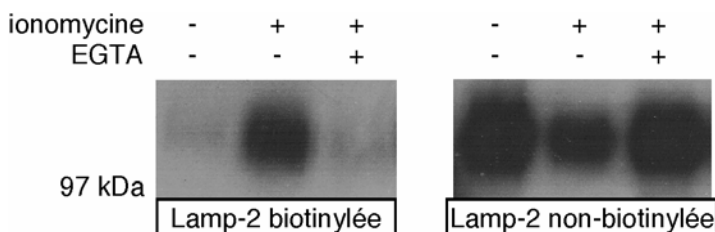


Fig. 1-10 : Effet d'une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine sur l'apparition de Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique.

Des cultures de kératinocytes ont été incubées pendant 1h en présence d'ionomycine 30 μM ou en présence d'ionomycine 30 μM et d'EGTA 5 mM. Les protéines exposées au niveau de la membrane plasmique ont été biotinylées et les cellules ont été lysées. Lamp-2 a été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires en utilisant un anticorps dirigé contre Lamp-2 et les protéines Lamp-2 biotinylées ont été précipitées par une incubation en présence de streptavidine-agarose. Les protéines Lamp-2 biotinylées et non-biotinylées ont été séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, transférées sur une membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF) par Western blot. Les protéines Lamp-2 ont été détectées en utilisant un anticorps spécifique de Lamp-2 comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*.

Pour analyser l'expression de Lamp-1 au niveau de la membrane plasmique de cellules de carcinome embryonnaire, Amos & Lotan (1990) ont employé une technique morphologique en utilisant un marquage de Lamp-1 en immunofluorescence réalisé sur des cellules non perméabilisées. Nous avons utilisé cette approche comme outil supplémentaire à l'approche biochimique décrite ci-dessus afin d'analyser l'effet d'une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine sur l'apparition de Lamp-1 au niveau de la

membrane plasmique. Pour ce faire, des kératinocytes incubés pendant 1h en présence d'ionomycine 30 μ M ont été soumis à un marquage en immunofluorescence à froid, en utilisant un anticorps primaire dirigé contre le domaine intralysosomal de Lamp-1 (Mane et al., 1989). Comparé aux cellules non traitées (fig. 1-11a), le traitement par l'ionomycine induit l'apparition d'une immunofluorescence ponctuée au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes non-perméabilisés (fig. 1-11b), suggérant l'apparition de Lamp-1 au niveau de la membrane plasmique. Les kératinocytes perméabilisés présentent un marquage périnucléaire (fig. 1-11c) typiquement lysosomal (Chen et al., 1985).

Nous avons vérifié si la technique utilisée ci-dessus pour détecter l'apparition de Lamp-1 au niveau de la membrane plasmique se limite à ce niveau et ne permet pas la détection de protéines intracellulaires. Dans ce but, nous avons analysé la localisation de la kinésine, qui est une protéine intracellulaire associée aux microtubules (Neighbors et al., 1988), dans les kératinocytes non-perméabilisés. Nous n'avons pas détecté d'immunofluorescence dans les kératinocytes incubés en présence d'ionomycine 30 μ M pendant 1h (fig. 1-11e) ni dans les cellules non traitées (fig. 1-11d). Au contraire, des kératinocytes perméabilisés exhibent un marquage typique autour du centrosome (fig. 1-11f) (Neighbors et al., 1988).

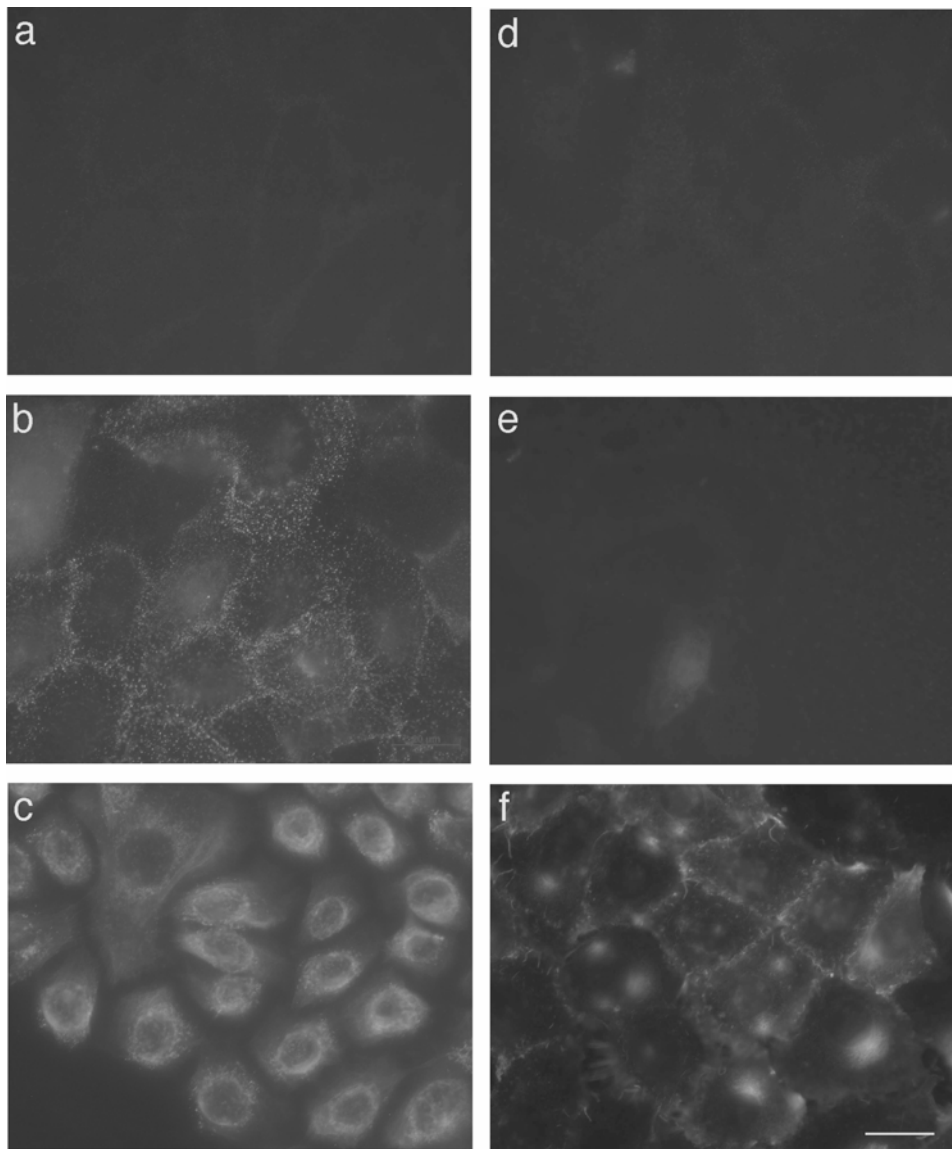


Fig. 1-11 : Effet d'une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine sur l'apparition de Lamp-1 au niveau de la membrane plasmique en utilisant une approche morphologique.

Des cultures de kératinocytes ont été ensemencées sur des couvre-objets et poursuivies jusqu'à l'atteinte de la confluence. Les cellules ont été incubées pendant 1h en présence de milieu de culture (a, d) ou en présence d'ionomycine 30 μ M (b, e). Lamp-1 (a, b) ou la kinésine (d, e) ont été détectées par un marquage en immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre Lamp-1 ou la kinésine. D'autres cultures ont été fixées et

perméabilisées et ont subi un marquage en immunofluorescence pour détecter Lamp-1 (a) ou la kinésine (d). Les cellules ont été observées en utilisant un microscope à épifluorescence équipé d'un filtre spécifique du FITC. Des photos ont été prises en utilisant une caméra numérique AxioCam et le logiciel AxioVision (Zeiss). Le même temps d'exposition a été utilisé pour toutes les prises d'images (barre=10 μm).

3 Discussion

En résumé, nos résultats suggèrent qu'une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine induit l'exocytose de lysosomes. Cette exocytose semble être induite par l'entrée d'ions calcium dans les cellules et pourrait être caractérisée par une fusion de la membrane lysosomale avec la membrane plasmique. Cette fusion engendrerait l'apparition de Lamp-1 et de Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes. Le contenu des lysosomes serait déversé dans l'espace extracellulaire, ce qui induirait la libération de cathepsine C, de β -galactosidase et de cathepsine D.

Les lysosomes peuvent assurer plusieurs rôles de dégradation intracellulaires au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques. D'autres rôles, probablement extracellulaires, aussi peuvent être attribués aux lysosomes si les kératinocytes peuvent sécréter des enzymes lysosomales, comme par exemple la cathepsine D, au cours de la biosynthèse de ces enzymes ou réagir à un stimulus par l'exocytose des lysosomes. Ce stimulus peut être une augmentation de la concentration cytosolique en ions calcium (Rodriguez et al., 1997; Reddy et al., 2001). L'incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine pour induire une entrée d'ions calcium (Liu & Hermann, 1978) induit la formation d'enveloppes cornées, ce qui indique une activation de la transglutaminase 1 par une entrée d'ions calcium dans les cellules (Rice & Green, 1979; Michel & Demarchez, 1988). Nos résultats montrent que ce stimulus peut également induire l'exocytose de lysosomes dans les kératinocytes.

Apparition de blebs membranaires induits par l'ionomycine.

L'incubation de kératinocytes en présence d'ionomycine induit la formation transitoire de blebs membranaires. De manière similaire, un traitement par l'ionomycine peut induire la formation de blebs membranaires dans des cellules épithéliales rénales (Phelps et al., 1989), des neurones corticaux (Takei & Endo, 1994) et des cellules de carcinome pulmonaire (Gil-Parrado et al., 2002). Cette formation de blebs est un signe de mort cellulaire par apoptose (Phelps et al., 1989; Takei & Endo, 1994; Gil-Parrado et al., 2002). Bien que l'ionomycine n'exerce pas d'effet cytotoxique immédiat sur les kératinocytes, il est possible que ce stimulus induise l'apoptose également dans ce type cellulaire. Pour étudier cette question, il serait intéressant d'étudier l'effet d'un traitement par l'ionomycine sur l'apparition de marqueurs apoptotiques dans les kératinocytes, comme par exemple l'activation de la caspase 3 ou le clivage de l'enzyme poly(ADP)-ribose polymérase (PARP).

Sécrétion de la cathepsine D par les kératinocytes. Aux stades de différenciation analysés, les kératinocytes sécrètent la cathepsine D sous sa forme précurseur sans variation significative de la proportion sécrétée. Katz & Taichman (1999) ont montré que des épidermes reconstitués *in vitro* sécrètent la cathepsine D dans leur milieu de culture sous une forme de 44 kDa. Le poids moléculaire de cette forme de la cathepsine D semble être inférieur au poids moléculaire de la forme précurseur de 52 kDa que les kératinocytes sécrètent dans les conditions de cultures utilisés pour notre étude. Il est possible que les épidermes reconstitués sécrètent la cathepsine D sous sa forme précurseur de 52 kDa, qui pourrait être clivée dans le milieu de culture (par un mécanisme inconnu jusqu'à présent) pour donner une forme intermédiaire de 44 kDa. Rappelons que les kératinocytes sécrètent en moyenne $45\pm 22\%$ (n=17) de la forme précurseur de la cathepsine D

néosynthétisée. La sécrétion d'une certaine proportion de la forme précurseur de la cathepsine D a été détectée chez d'autres types cellulaires en culture. Cette proportion est variable selon le type cellulaire étudié, puisque les fibroblastes et les cellules épithéliales mammaires peuvent sécréter entre 2% et 20% de forme précurseur dans le milieu de culture (Gieselmann et al., 1983; Capony et al., 1989; Capony et al., 1994), tandis que les hépatocytes, les cellules épithéliales rénales, les cellules endothéliales ainsi que diverses lignées cellulaires issues de carcinomes mammaires peuvent sécréter une proportion importante, c'est-à-dire plus de 50% de forme précurseur (Erickson et al., 1981; Hasilik et al., 1981; Rosenfeld et al., 1982; Capony et al., 1994). Les kératinocytes semblent faire partie de ce deuxième groupe de cellules.

Effets du chlorure d'ammonium sur le transport de la cathepsine D.

L'investigation du mécanisme de transport de la cathepsine D vers les lysosomes des kératinocytes a révélé que la sécrétion de la forme précurseur de cette enzyme n'est guère affectée par l'incubation de kératinocytes en présence de chlorure d'ammonium. Parallèlement, nous avons observé une accumulation intracellulaire de forme précurseur et intermédiaire au dépens de la forme mature, suggérant une perturbation du transport et/ou de la maturation protéolytique de la cathepsine D.

Nous avons vérifié dans nos conditions expérimentales que la réaction des kératinocytes à un traitement avec le chlorure d'ammonium est comparable à celle des cellules MDA-MB-231 (Capony et al., 1994). L'inefficacité du chlorure d'ammonium à induire une augmentation de la sécrétion de la cathepsine D peut indiquer que cette enzyme suit une voie de transport indépendante du Man 6-P (Capony et al., 1994; Isidoro et al., 1997). Au contraire, la perturbation de la maturation protéolytique de la cathepsine D

par un traitement avec le chlorure d'ammonium suggère que cette enzyme suit la voie de transport lysosomal dépendante du Man 6-P (communication personnelle, F. Mainferme). D'autres approches sont donc nécessaires pour élucider le transport de la cathepsine D dans les kératinocytes, qui pourrait par exemple être étudié suite à un blocage des récepteurs Man 6-P par une incubation des cellules avec du Man 6-P après une perméabilisation par la saponine (Zhu & Conner, 1994).

En accord avec les résultats de Capony et al. (1994), nos résultats montrent que, contrairement aux fibroblastes, les cellules MDA-MB-231 présentent une sécrétion importante du précurseur de la cathepsine D ainsi qu'une insensibilité de cette sécrétion au chlorure d'ammonium, ce qui est une propriété observée chez certains types cellulaires transformés caractérisés par un degré de malignité élevé (Erickson et al., 1981; Hasilik et al., 1981; Rosenfeld et al., 1982; Capony et al., 1994; Isidoro et al., 1997; Rochefort et al., 2000). Il est intéressant d'observer que les kératinocytes normaux partagent cette propriété avec des cellules tumorales malignes.

Effets de l'ionomycine sur la sécrétion de la cathepsine D. Nos résultats montrent que l'incubation de kératinocytes en présence d'ionomycine, induit la sécrétion de la forme mature de la cathepsine D, essentiellement localisée dans les lysosomes (Gieselmann et al., 1983 ; Hasilik et al., 1992). Suite à une stimulation par l'ionomycine, les fibroblastes IMR-90 (Rodriguez et al., 1997) et les cellules dendritiques (Gardella et al., 2001) sécrètent aussi une certaine proportion de la forme mature de la cathepsine D. L'ajout d'EGTA au milieu bloque la sécrétion de la forme mature de la cathepsine D, ce qui est similaire aux observations de Gardella et al. (2001) chez les cellules dendritiques, et suggère l'importance de l'entrée de calcium dans ce processus d'exocytose. L'ionomycine entraîne aussi la libération d'une

certaine proportion de la forme intermédiaire de la cathepsine D. Le clivage de la forme intermédiaire, qui donne naissance à la forme mature, se passe dans un compartiment lysosomal (Hasilik, 1992). Il est dès lors possible que ce compartiment contienne une certaine proportion de la forme intermédiaire qui se retrouve sécrétée lors de l'incubation des kératinocytes avec l'ionomycine. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que ce traitement affecte des compartiments prélysosomaux contenant la forme intermédiaire de la cathepsine D. Rodriguez et al. (1997) ont proposé qu'il est possible que, au moins dans les fibroblastes, l'incubation en présence d'ionomycine induise l'exocytose d'endosomes en même temps que des lysosomes.

Signalons qu'une incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine entraîne aussi la libération d'une certaine proportion de la forme précurseur de la cathepsine D. Cette libération est également observée lors d'une incubation des cellules en présence d'ionomycine et d'EGTA, suggérant que la sécrétion de la forme précurseur de la cathepsine D par les kératinocytes est indépendante du calcium. En accord avec nos résultats, Gardella et al. (2001) ont observé une augmentation de la sécrétion de la forme précurseur par les cellules dendritiques suite à un traitement par l'ionomycine. Cette sécrétion est aussi observée en présence d'ionomycine et d'EGTA.

La forme précurseur de la cathepsine D n'est pas associée avec le compartiment lysosomal et suit généralement la voie de sécrétion classique lorsqu'elle est sécrétée (Erickson, 1989; Hasilik, 1992). L'ionomycine pourrait dès lors induire la sécrétion de la forme précurseur de la cathepsine D en agissant sur la voie de sécrétion classique ou sur des compartiments impliqués dans le transport de la cathepsine D vers les lysosomes, comme par exemple les endosomes. Dans plusieurs types cellulaires, un traitement par l'ionomycine affecte le pH intracellulaire (Hendey et al., 1989; Grant &

Acosta, 1996; Yamamoto et al., 1998; Cabado et al., 2000; Moor et al., 2000). L'augmentation du pH de vésicules intracellulaires acides grâce à un traitement par le chlorure d'ammonium inhibe la dissociation endosomale d'enzymes lysosomales des récepteurs au Man 6-P (Gonzalez-Noriega et al., 1980; Maxfield, 1982), induisant la sécrétion de la forme précurseur de la cathepsine D dans plusieurs types cellulaires (Imort et al., 1983; Capony et al., 1994), mais pas dans les kératinocytes, selon nos résultats. Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'une incubation en présence d'ionomycine pourrait provoquer la libération de la forme précurseur de la cathepsine D en induisant rapidement une alcalinisation des endosomes.

Sécrétion de la cathepsine C et de la β -galactosidase suite à une entrée d'ions calcium dans les kératinocytes. Nos résultats montrent d'abord qu'en présence de calcium 0,15 mM, une concentration d'ionomycine 10 μ M n'induit pas l'exocytose des lysosomes, contrairement à une concentration d'ionomycine 30 μ M. L'utilisation d'ionomycine 10 μ M, plus classiquement utilisée dans la littérature (p.ex. Leigh & Watt, 1994; Rodriguez et al., 1997; Sawyer & Hamilton, 2000), peut néanmoins induire l'exocytose des lysosomes, pour autant que la concentration en calcium extracellulaire soit portée à 1 mM, c'est-à-dire une concentration classiquement utilisée dans la plupart des milieux de culture. D'un point de vue quantitatif, la sécrétion d'entre 10% et 20% seulement des activités d'enzymes lysosomales solubles suggère que ce traitement engendre l'exocytose d'une faible proportion seulement de lysosomes. Ces lysosomes sont peut-être proches de la membrane plasmique, puisque, dans plusieurs types cellulaires, ce sont ces lysosomes dont l'exocytose est induite par une entrée de calcium (Jaiswal et al., 2002). Nos résultats sont comparables à la sécrétion d'un faible pourcentage d'activité enzymatique de

l'hexosaminidase par les fibroblastes, où l'exocytose de lysosomes est également induite par l'ionomycine (Rodriguez et al., 1997).

Apparition de protéines membranaires lysosomales au niveau de la membrane plasmique lors d'une entrée d'ions calcium dans les kératinocytes. Nous avons aussi analysé la présence de Lamp-1 et Lamp-2, protéines lysosomales membranaires, au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes afin d'examiner si la sécrétion de la cathepsine D, de la cathepsine C et de la β -galactosidase résulte en effet de l'exocytose de lysosomes. Les résultats obtenus en utilisant une approche biochimique ainsi qu'une approche morphologique suggèrent que l'incubation des kératinocytes en présence d'ionomycine induit l'exposition de Lamp-1 et de Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique. Lamp-1 est aussi détectable au niveau de la membrane plasmique de fibroblastes et de cellules épithéliales en réponse à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Rodriguez et al., 1997; Reddy et al., 2001). Une telle augmentation induit également l'exposition d'une autre protéine de la membrane lysosomale, la tétraspanine CD63, au niveau de la membrane plasmique des fibroblastes (Jaiswal et al., 2002).

L'entrée d'ions calcium dans les kératinocytes induit donc une exocytose de lysosomes. Les enzymes lysosomales déversées dans l'espace extracellulaire ainsi que les protéines membranaires lysosomales exposées au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes peuvent intervenir au cours de la différenciation épidermique. Cet évènement peut aussi être impliqué dans la réparation de ruptures au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes, ruptures notamment infligées par les forces mécaniques auquel l'épiderme est constamment soumis en surface de l'organisme.

Chapitre 2 : Effets d'une déplétion en cholestérol sur la physiologie des kératinocytes.

1 Introduction

Au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques, le cholestérol pourrait réguler, peut-être par l'intermédiaire des rafts lipidiques, l'activité de protéines de signalisation qui contrôlent le phénotype des kératinocytes, comme le récepteur de l'EGF, HER2, HER3, ERK et p38. Dans ce chapitre, nous avons investigué cette hypothèse en recherchant les effets d'une déplétion en cholestérol induite par un traitement par la M β CD sur le phénotype des kératinocytes. Nous avons analysé les effets d'un tel traitement sur l'état de différenciation de kératinocytes en culture et sur l'activité des protéines de signalisation mentionnées ci-dessus.

2 Résultats

2.1 L'incubation de kératinocytes en présence de M β CD induit une déplétion en cholestérol.

L'incubation en présence de M β CD induit l'extraction de cholestérol de la membrane plasmique de divers types cellulaires, tels que les adipocytes 3T3-L1 (Parpal et al., 2001) ainsi que les cellules myométriales (Klein et al., 1995) et les cellules HeLa (Roepstorff et al., 2002). Bien que la littérature mentionne que les kératinocytes épidermiques en culture ont déjà fait l'objet d'un traitement en présence de M β CD (Gniadecki et al., 2002), des informations concernant les effets d'un tel traitement sur la quantité et la localisation du cholestérol font défaut. Pour déterminer les effets d'un traitement par la M β CD sur la quantité de cholestérol, nous avons incubé des kératinocytes pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM, puis dosé le cholestérol cellulaire. Des cellules soumises à ce traitement (n=7) contiennent $0,96 \pm 0,18$ nmol de cholestérol par μ g de protéines. Comparé aux cellules non traitées qui contiennent $1,26 \pm 0,18$ nmol de cholestérol par μ g de

protéines (n=7), ce traitement induit une réduction faible, mais significative (test de Student, $p < 0,01$) de la quantité en cholestérol.

Pour localiser le cholestérol affecté par un traitement par la M β CD, nous avons incubé des kératinocytes en présence de M β CD et marqué le cholestérol par la filipine. Comme le montre la fig. 2-1b, le traitement avec la M β CD 7,5 mM pendant 1h résulte en une diminution importante du marquage de la membrane plasmique observable dans les cellules non traitées (fig. 2-1a). Ce marquage membranaire diminue en faveur d'un marquage intracellulaire périnucléaire. La complexation de la M β CD avec du cholestérol supprime sa capacité à extraire le cholestérol (Klein et al., 1995). Puisqu'un traitement par les complexes M β CD-cholestérol résulte en un marquage membranaire de la filipine (fig. 2-1c), la M β CD complexée au cholestérol n'extrait en effet pas ce lipide de la membrane des kératinocytes.

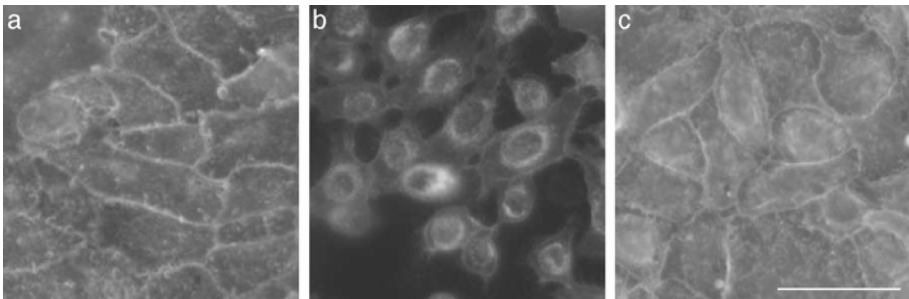


Fig. 2-1 : Effets d'une incubation en présence de M β CD sur la localisation du cholestérol dans les kératinocytes.

Des cultures de kératinocytes confluentes ont été marquées en utilisant la filipine après avoir été incubées pendant 1h en présence de milieu autocrine (a), en présence de milieu contenant de la M β CD 7,5 mM (b), ou de la M β CD 7,5 mM complexée au cholestérol (c). Les cellules sont ensuite observées en utilisant un microscope à épifluorescence équipé d'un filtre UV et photographiées en utilisant le même temps d'exposition pour toutes les conditions analysées (barre=20 μ m).

L'exposition de cellules en culture à des cyclodextrines est cytotoxique pour les érythrocytes (Irie et al., 1982) et les fibroblastes (Pitha et al., 1988). Cet

effet peut être lié à l'extraction de cholestérol membranaire dans le cas des β -cyclodextrines (Irie et al., 1992). Pour analyser la cytotoxicité éventuelle d'un traitement par la M β CD sur les kératinocytes, nous avons utilisé le kit ToxiLight™ (Cambrex). Ce kit permet de mesurer la libération de l'enzyme cytoplasmique adénylate kinase par les cellules dans le milieu extracellulaire, et permet ainsi d'estimer le degré de cytotoxicité du traitement en question en fonction de la proportion d'enzyme libérée. Une incubation de kératinocytes en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h induit la libération de $7,4\% \pm 4,3\%$ ($n=3$) d'activité adénylate kinase dans le milieu de culture, tandis que les cellules non traitées libèrent $1,9\% \pm 0,6\%$ ($n=3$) de cette activité et les cellules traitées avec la M β CD complexée libèrent $2,5\% \pm 1,4\%$ ($n=3$) de cette activité. L'application du test de Student montre que le traitement par la M β CD résulte en une libération d'activité adénylate kinase significativement différente ($p < 0,05$) de l'activité de cette enzyme libérée par les cellules contrôle. Ce traitement semble donc légèrement augmenter la perméabilité de la membrane plasmique des kératinocytes pour l'adénylate kinase, suggérant qu'il exerce une faible cytotoxicité.

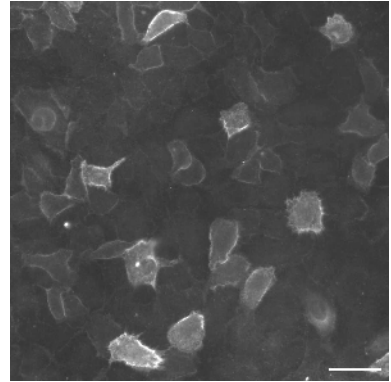
2.2 Effets d'une déplétion en cholestérol sur les rafts lipidiques

Puisqu'un traitement par la M β CD pourrait affecter la structure des rafts lipidiques, nous avons visualisé ces rafts au moyen de la sous-unité B de la toxine cholérique couplée à un fluorochrome (Harder et al., 1998). Dans les kératinocytes, l'intensité d'un marquage avec la toxine cholérique fluorescente dépend du phénotype cellulaire (Gniadecki & Bang, 2003). En effet, les kératinocytes confluents présentent un marquage hétérogène de la toxine cholérique fluorescente (fig. 2-2): une majorité des cellules sont peu fluorescentes tandis qu'une minorité des cellules montrent une fluorescence

plus importante, suggérant que les cultures confluentes sont constituées par des kératinocytes minoritaires riches en rafts lipidiques et une population majoritaire pauvre en rafts.

Fig. 2-2 : Fluorescence émise par des kératinocytes confluent marqués avec la sous-unité B de la toxine cholérique couplée au fluorochrome Alexa 488™.

A l'atteinte de la confluence, des cultures de kératinocytesensemencés sur des couvre-objets ont été incubées pendant 30 min à 4°C en présence d'une solution contenant 8 µg/ml de sous-unité B de la toxine cholérique couplée au fluorochrome *Alexa 488™*, fixées et montées sur une lame. Les cellules ont été observées avec un microscope à épifluorescence en utilisant un filtre spécifique du FITC et des photos ont été prises en utilisant une caméra numérique (barre=10 µm).



Ensuite, nous avons voulu analyser les effets d'un traitement par la M β CD sur les rafts lipidiques présents dans la membrane plasmique des kératinocytes. Or, le pouvoir de résolution des microscopes optiques est trop faible pour permettre la visualisation de rafts lipidiques isolés (Harder et al., 1998). En effet, l'incubation à 4°C en présence de toxine cholérique fluorescente résulte en un marquage homogène de la membrane plasmique des kératinocytes, ne permettant pas de distinguer des rafts isolés (fig. 2-3a). Un traitement par la M β CD 7,5 mM pendant 1h suivi d'une incubation en présence de toxine cholérique fluorescente induit un marquage qui suggère un léger chiffonnement de la membrane plasmique (fig. 2-3c). Ce marquage n'est pas visible si les cellules ont été traitées à la M β CD complexée au cholestérol (fig. 2-3e).

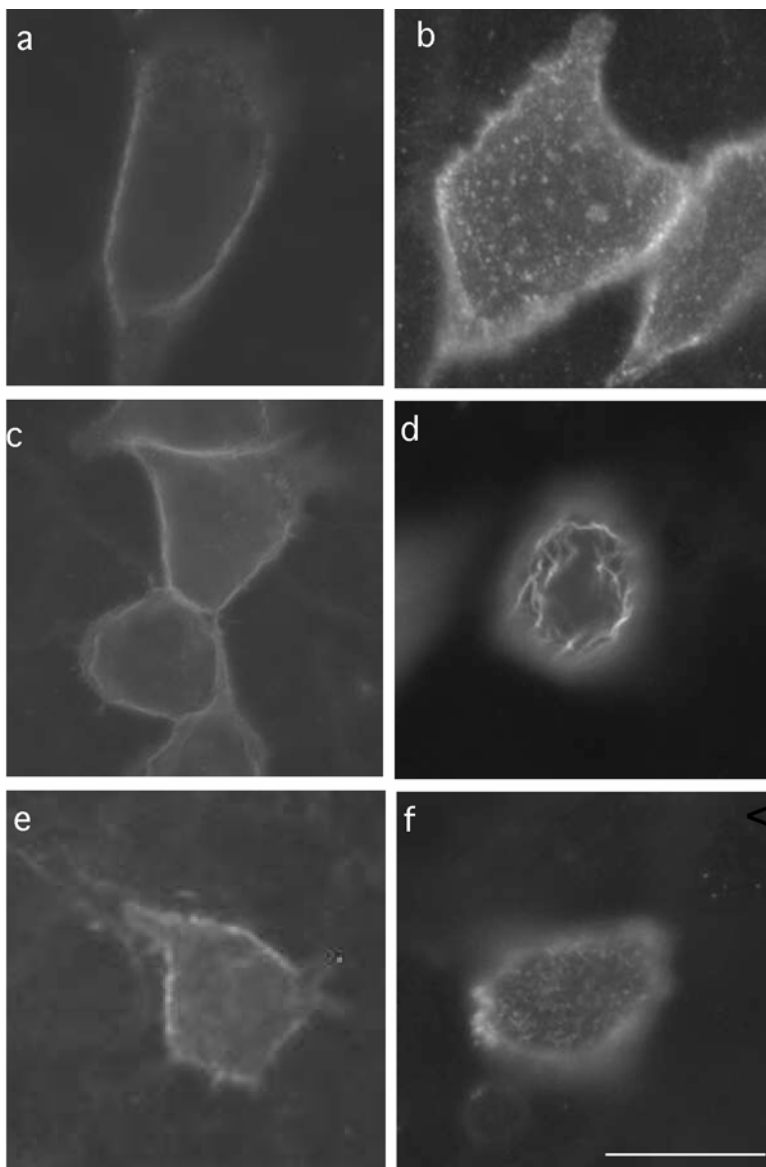


Fig. 2-3 : Effets d'un traitement par la M β CD sur un marquage des kératinocytes avec la sous-unité B de la toxine cholérique couplée à l'Alexa 488TM.

A l'atteinte de la confluence, des cultures de kératinocytes ensemencés sur des couvre-objets ont été incubées pendant 1h en présence de milieu autocrine (a, b), en présence de M β CD 7,5 mM (c, d) ou en présence de M β CD 7,5 mM complexée au cholestérol (e, f). Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 30 min en présence d'une solution contenant 8 μ g/ml de sous-unité B de la toxine cholérique couplée au fluorochrome *Alexa 488TM*, fixées et montées

sur une lame. L'incubation des cellules en présence de la sous-unité de toxine cholérique a été effectuée à 4°C (a, c, e) ou à 12°C (b, d, f). Les cellules ont été observées avec un microscope à épifluorescence en utilisant un filtre spécifique du FITC. Les photographies montrent des cellules exhibant une fluorescence élevée afin de bien discerner les effets du traitement par la M β CD (barre=10 μ m).

Pour rechercher l'effet éventuel d'un traitement par la M β CD sur les rafts lipidiques, nous avons dû contourner le problème de détection des rafts en microscopie optique puisque l'incubation des kératinocytes avec la toxine cholérique à 4°C ne permet pas l'observation de rafts isolés (fig. 2-3a). Pour résoudre ce problème, nous avons employé l'approche de Harder et al. (1998) en incubant des cellules en culture à 12°C en présence de toxine cholérique, ce qui induit la formation d'agrégats de rafts. Les kératinocytes ayant subi ce traitement présentent en effet des agrégats de rafts observables en microscopie optique sous forme de points fluorescents (fig. 2-3b). Lorsque le marquage avec la toxine cholérique fluorescente est précédé d'un traitement par la M β CD 7,5 mM pendant 1h, les rafts sont agrégés d'une manière filiforme (fig. 2-3d). Au contraire, un traitement pendant 1h avec la M β CD 7,5 mM complexée au cholestérol ne modifie pas l'agrégation des rafts induite par la toxine cholérique (fig. 2-3f). Ce résultat suggère qu'une extraction de cholestérol induite par un traitement par la M β CD perturbe la structure des rafts lipidiques présents dans la membrane plasmique des kératinocytes de manière à altérer l'agrégation des rafts par la toxine cholérique.

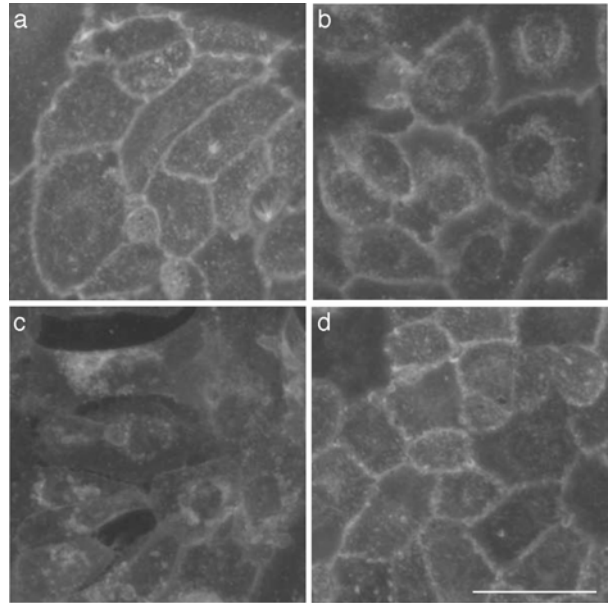
2.3 Effets d'une déplétion en cholestérol sur la différenciation des kératinocytes

Pour observer les effets sur l'expression génique d'un traitement par la M β CD, les kératinocytes en culture doivent subir une incubation prolongée avant que l'on ne puisse observer des effets. Par exemple, un traitement en présence d'EGF nécessite entre 8h et 24h d'incubation pour induire des

changements d'expression observables (Poumay & Pittelkow, 1995). C'est pourquoi les kératinocytes sont analysés après une déplétion prolongée de cholestérol. Cependant, une incubation de fibroblastes pendant 8h en présence de M β CD 2 mM ou 10 mM est cytotoxique pour 20% ou 40% des cellules traitées (Kilsdonk et al., 1995). Puisqu'un tel effet cytotoxique de la M β CD n'est pas désirable dans le cadre de notre étude, nous nous sommes inspirés de l'étude de Cooper et al. (2003). Ces auteurs ont utilisé un traitement court (30 min) en présence de M β CD suivi par un traitement de longue durée en présence d'une statine (molécule inhibant la néosynthèse de cholestérol) afin d'empêcher les fibroblastes de synthétiser du cholestérol endogène. Comme inhibiteur de la néosynthèse du cholestérol, nous avons choisi la lovastatine, qui inhibe la hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, enzyme-clé dans la biosynthèse du cholestérol (Kita et al., 1980). Les cultures de kératinocytes sont incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h, lavées, et traitées ensuite en présence de lovastatine 10 μ M pendant 17h. Afin de vérifier si ce traitement par la M β CD et la lovastatine résulte bel et bien en une déplétion prolongée de cholestérol, nous avons réalisé un marquage en utilisant la filipine. La fig. 2-4 montre que les kératinocytes incubés en présence de M β CD et de lovastatine exhibent un très faible marquage de la membrane plasmique des kératinocytes (2-4c), suggérant une déplétion en cholestérol. Au contraire, les cellules qui sont incubées en présence de M β CD seule (2-4b) ou de lovastatine seule (2-4d) exhibent un marquage de la membrane plasmique similaire aux cellules non traitées (2-4a).

Fig. 2-4 : Effets d'un traitement par la M β CD et la lovastatine sur le cholestérol contenu dans les kératinocytes.

Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées pendant 18h en présence de milieu autocrine (a), 1h en présence de M β CD 7,5 mM et 17h en présence de milieu autocrine (b), 1h en présence de M β CD 7,5 mM et 17h en présence de lovastatine 10 μ M (c), ou incubés pendant 18h en présence de lovastatine 10 μ M (d). Les cellules ont ensuite été marquées en utilisant la filipine, observées au moyen d'un microscope à épifluorescence équipé d'un filtre UV et photographiées en utilisant le même temps d'exposition pour toutes les conditions analysées. (barre=20 μ m).



Simultanément, nous avons estimé les effets cytotoxiques exercés par la déplétion prolongée en cholestérol sur les kératinocytes. L'analyse du relargage de l'adénylate kinase au moyen du kit ToxiLight nous montre une différence significative ($p < 0,01$) de la moyenne de l'activité adénylate kinase relarguée pendant un traitement en présence de M β CD et de lovastatine par rapport au contrôle. Une déplétion en cholestérol induit en effet la sécrétion de $12,9\% \pm 3,5\%$ ($n=3$) de l'activité totale de l'adénylate kinase vis-à-vis de $1,8\% \pm 0,6\%$ ($n=3$) d'activité adénylate kinase relarguée par les cellules contrôle. Ce traitement augmente donc la perméabilité membranaire à cette enzyme d'environ 10%, signalant un léger effet cytotoxique. Une libération d'activité adénylate kinase peut révéler la mort cellulaire. Puisqu'une possibilité de mort cellulaire est la mort par apoptose, nous avons analysé la formation de cellules apoptotiques au sein de cultures de kératinocytes qui ont subi une déplétion en cholestérol. Une incubation de

kératinocytes pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM et pendant 17h en présence de lovastatine 10 μ M induit une augmentation faible de la proportion de cellules apoptotiques ($5,3\% \pm 2,6\%$, n=3) par rapport au contrôle ($1,4\% \pm 0,5\%$, n=3). Cette variation n'est pourtant pas statistiquement significative (test de Student, $p > 0,05$), suggérant que la libération d'adénylate kinase par des kératinocytes ayant subi une déplétion en cholestérol ne reflète pas nécessairement pour les cellules concernées un effet pro-apoptotique. Il est toutefois possible que cette libération d'adénylate kinase soit indicatrice d'un autre processus de mort cellulaire, comme par exemple la nécrose. Puisque le cholestérol est un composant essentiel des membranes biologiques, il est possible que la déplétion en cholestérol résulte en une modification des propriétés structurales de la membrane plasmique des kératinocytes. Cette modification pourrait peut-être se traduire par une augmentation de la perméabilité membranaire, permettant le relargage d'éléments cytoplasmiques dont l'adénylate kinase.

En résumé, une incubation de kératinocytes en présence de M β CD et de lovastatine résulte en une déplétion en cholestérol et exerce une légère cytotoxicité sans pour autant induire l'apoptose. Ce traitement nous a dès lors paru adéquat pour étudier les effets d'une déplétion en cholestérol sur le processus de différenciation des kératinocytes. Rappelons qu'en conditions de culture autocrine, le stade de différenciation des kératinocytes est régulé par la densité cellulaire (Poumay & Pittelkow, 1995; Poumay et al., 1999). Cette régulation se manifeste par une induction de l'expression de marqueurs de différenciation en fonction de la progression de la culture. Par exemple, les kératines suprabasales 1 et 10 ne sont exprimées que par des cultures confluentes et post-confluentes. Un marqueur de la différenciation tardive comme l'involucrine n'est détectable que dans des cultures post-confluentes.

La kératine basale 14 est exprimée par des cultures sous-confluentes, confluentes et post-confluentes, indiquant la présence de cellules de phénotype basal à tous les stades de confluence. Afin d'investiguer les effets d'une déplétion en cholestérol sur le processus de différenciation des kératinocytes, des cultures sous-confluentes, confluentes et post-confluentes ont été incubées pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM et pendant 17h en présence de lovastatine 10 μ M. Puis, nous avons analysé l'expression génique de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine. Uniquement à confluence, la déplétion en cholestérol provoque une répression importante de l'expression de la kératine 14 et de la kératine 10, et en même temps une induction importante de l'expression de l'involucrine (fig. 2-5).

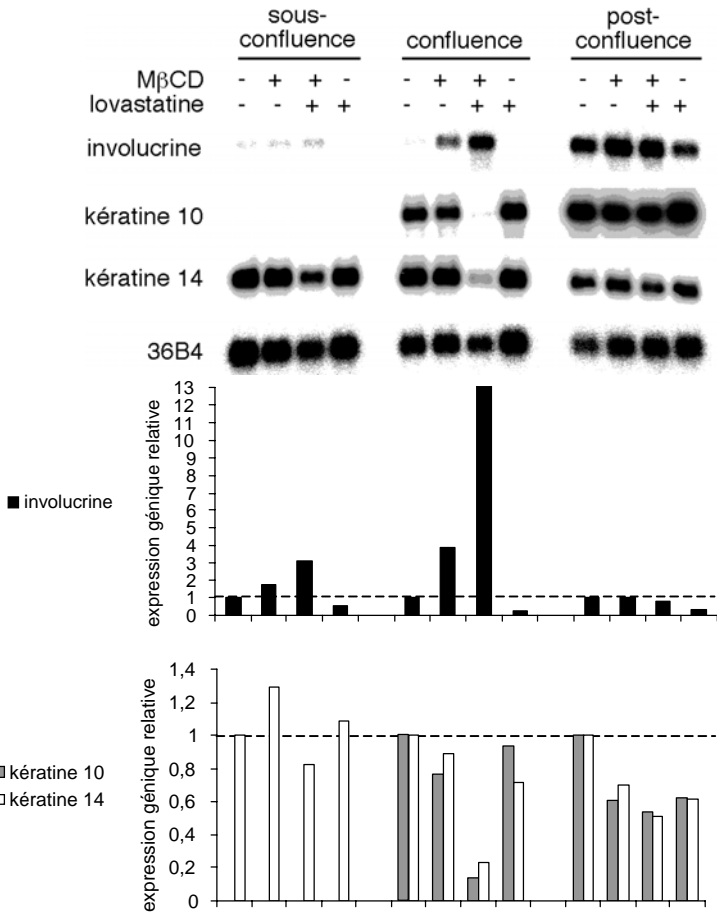


Fig. 2-5 : Effets d'une déplétion en cholestérol sur l'expression génique de la kératine 14 et de la kératine 10 dans des kératinocytes à sous-confluence, confluence et post-confluence.

Des cultures de kératinocytes ont été amenées à sous-confluence, confluence ou post-confluence en conditions de culture autocrine. Les cellules ont été incubées pendant 1h en présence de MβCD 7,5 mM et 17h en présence de milieu autocrine, ou bien pendant 1h en présence de MβCD 7,5 mM et 17h en présence de lovastatine 10 μM, ou bien pendant 18h en présence de lovastatine 10 μM. Après les traitements, les ARNm ont été extraits des cellules et transférés sur une membrane par Northern blot. La membrane a été hybridée de manière séquentielle avec des sondes d'ADNc marquées au ³²P spécifiques des ARNm de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine. L'exposition de la membrane à un écran de stockage au phosphore et la révélation de l'écran au moyen d'un appareil Cyclone™ (Packard) ont permis d'analyser l'expression génique de ces protéines. L'hybridation de la membrane avec la sonde d'ADNc spécifique de 36B4 donne des indications sur les quantités totales d'ARN poly-A déposées sur le gel et transférées sur la membrane. L'expression génique de la kératine 14, de la kératine 10, de l'involucrine et de 36B4 a été quantifiée en utilisant le programme OptiQuant (Packard). L'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de

l'involucrine relative à l'expression de 36B4 a été fixée arbitrairement à 1 dans l'échantillon contrôle.

Afin de vérifier ce résultat, nous avons répété cette expérience (n=11) et montré qu'une déplétion en cholestérol augmente en moyenne 25 fois l'expression génique de l'involucrine. Par contre, ce traitement diminue l'expression de la kératine 14 et de la kératine 10 environ de moitié.

Pour examiner si cette altération de l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine est liée spécifiquement à la déplétion en cholestérol, nous avons employé plusieurs approches. Premièrement, l' α -cyclodextrine est un polysaccharide cyclique de structure assez semblable à la M β CD. Cependant, l' α -cyclodextrine est constituée par l'agencement cyclique de 6 résidus glucose alors que la M β CD possède 7 résidus glucose. Cette différence structurale entre α -cyclodextrine et M β CD explique que la M β CD, mais non l' α -cyclodextrine, est efficace pour extraire le cholestérol de membranes biologiques (Ohtani et al., 1989; Nakanishi et al., 1992). Le traitement de kératinocytes en présence d' α -cyclodextrine 7,5 mM pendant 1h et de lovastatine 10 μ M pendant 17h n'induit aucune altération de l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 ou de l'involucrine (fig. 2-6A). L'altération de l'expression de ces gènes est donc liée spécifiquement à un traitement par la M β CD.

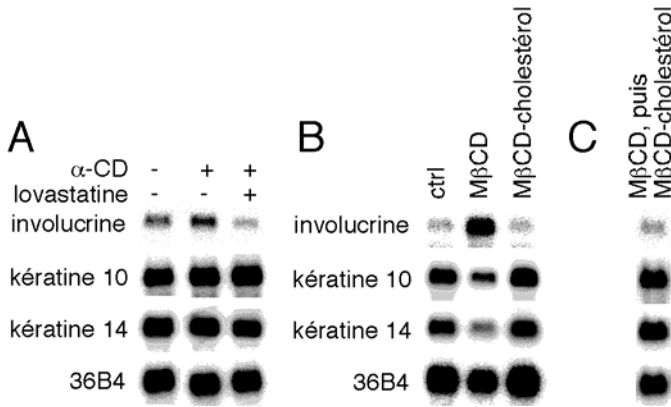


Fig. 2-6 : Effets de traitements par l'α-cyclodextrine (A) et par la MβCD complexée au cholestérol (B) sur l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine par les kératinocytes. Effets d'un traitement par la MβCD complexée au cholestérol suite à un traitement par la MβCD sur l'expression de ces gènes (C).

- (A) Les cellules ont été incubées pendant 1h en présence d'α-cyclodextrine 7,5 mM ou bien pendant 1h en présence d'α-cyclodextrine et 17h en présence de lovastatine.
- (B) Les cellules ont été incubées pendant 1h en présence de MβCD 7,5 mM et 17h en présence de lovastatine 10 μM, ou bien pendant 1h en présence de MβCD 7,5 mM complexée au cholestérol et 17h en présence de lovastatine.
- (C) Les cellules ont été incubées pendant 1h en présence de MβCD, puis pendant 1h en présence de MβCD complexée au cholestérol et 16h en présence de lovastatine.

Après les traitements, les ARNm ont été extraits des cellules et transférés sur une membrane par Northern blot. La membrane a été hybridée de manière séquentielle avec des sondes d'ADNc marquées au ³²P spécifiques des ARNm de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine. L'exposition de la membrane à un écran de stockage au phosphore et la révélation de l'écran au moyen d'un appareil Cyclone™ (Packard) ont permis d'analyser l'expression génique de ces protéines. L'hybridation de la membrane avec la sonde d'ADNc spécifique de 36B4 donne des indications sur les quantités totales d'ARN poly-A déposées sur le gel et transférées sur la membrane.

Deuxièmement, puisque nous avons montré que la MβCD complexée au cholestérol n'extrait pas le cholestérol membranaire des kératinocytes (fig. 2-1), nous avons incubé des kératinocytes pendant 1h en présence de MβCD 7,5 mM complexée au cholestérol et pendant 17h en présence de lovastatine 10 μM. Ce traitement n'induit aucune altération de l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 ou de l'involucrine (fig. 2-6B). Dès lors,

l'extraction du cholestérol membranaire par la M β CD est probablement à la base de l'altération de l'expression de ces gènes. Troisièmement, si l'extraction de cholestérol membranaire par un traitement en présence de M β CD est suivie par une incubation en présence de M β CD complexée avec ce lipide, du cholestérol est retransféré vers les membranes biologiques (Klein et al., 1995). Nous avons dès lors incubé des kératinocytes confluents en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h, puis en présence de M β CD 7,5 mM complexée au cholestérol pendant 1h et finalement pendant 16h en présence de lovastatine 10 μ M. La fig. 2-6C montre que ce traitement n'induit pas l'altération de l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 ou de l'involucrine, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle l'extraction spécifique de cholestérol par la M β CD est à la base de l'altération de l'expression de ces gènes.

Plusieurs auteurs ont suggéré que les effets d'un traitement de cellules à la M β CD sont liés au temps d'incubation en présence de cette molécule (Park et al., 1998; Lai, 2003). Afin d'investiguer l'influence du temps d'incubation en présence de M β CD sur le processus de différenciation des kératinocytes, l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine a été analysée dans des cultures confluentes incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 15 min, 30 min ou 60 min, puis pendant 17h en présence de lovastatine 10 μ M. Comme le montre la fig. 2-7, l'expression de la kératine 14 et de la kératine 10 diminuent progressivement après 15 min d'incubation en présence de M β CD, tandis que l'expression de l'involucrine n'augmente qu'à partir de 30 min de traitement par la M β CD. Ce résultat montre donc que l'altération de l'expression de ces gènes requiert un temps d'incubation suffisant en présence de M β CD, et suggère que l'expression des kératines 14

et 10 est plus sensible à une déplétion en cholestérol que l'expression de l'involucrine.

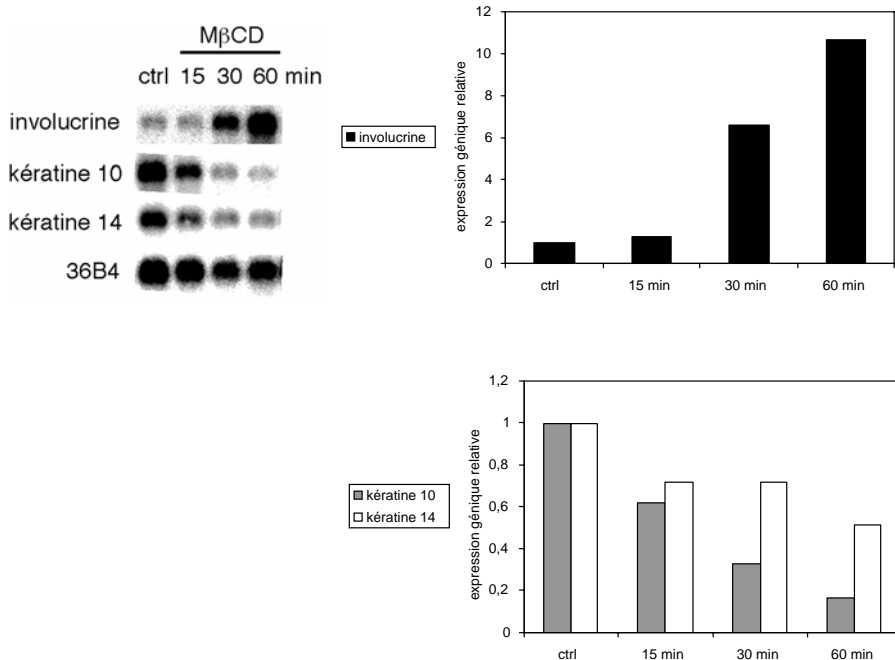


Fig. 2-7 : Effets dépendants du temps d'incubation en présence de MβCD sur l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine par les kératinocytes à confluence.

Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées pendant 15 min, 30 min ou 60 min en présence de MβCD 7,5 mM et pendant 17h en présence de lovastatine 10 μM. Après les traitements, les ARNm ont été extraits des cellules et transférés sur une membrane par Northern blot. La membrane a été hybridée de manière séquentielle avec des sondes d'ADNc marquées au ³²P spécifiques des ARNm des kératines K14 et K10 et de l'involucrine. L'exposition de la membrane à un écran de stockage au phosphore et la révélation de l'écran au moyen d'un appareil Cyclone™ (Packard) ont permis d'analyser l'expression génique de ces protéines. L'hybridation de la membrane avec la sonde d'ADNc spécifique de 36B4 donne des indications sur les quantités totales d'ARN poly-A déposées sur le gel et transférées sur la membrane. L'expression génique de la kératine 14, de la kératine 10, de l'involucrine et de 36B4 a été quantifiée en utilisant le programme OptiQuant (Packard). L'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine relative à l'expression de 36B4 a été fixée arbitrairement à 1 dans l'échantillon contrôlé.

En résumé, nos résultats montrent qu'une déplétion en cholestérol de kératinocytes induit une altération de l'expression de la kératine 14, de la

kératine 10 et de l'involucrine. Comme l'expression de ces gènes est strictement régulée au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques, nos résultats suggèrent que le cholestérol est un éventuel élément régulateur de l'expression de ces gènes au cours de ce processus. Le mécanisme par lequel le cholestérol exerce cette éventuelle fonction régulatoire est inconnu jusqu'à présent, mais il est possible que le cholestérol soit lié à une ou plusieurs cascades de transduction du signal qui, lors d'une déplétion en cholestérol, sont activées et modifient l'expression de la kératine 14, la kératine 10 et l'involucrine.

2.4 Effets d'une déplétion en cholestérol sur l'état d'activation de récepteurs de la famille des HER

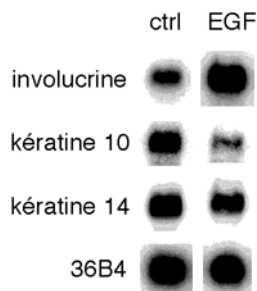
Dans les kératinocytes, l'expression de la kératine 10 ou de l'involucrine peut être régulée par les récepteurs de la famille des HER. En particulier, l'activation du récepteur de l'EGF (HER1) résulte en une répression de l'expression de la kératine 10 (Poumay & Pittelkow, 1995; Wakita & Takigawa, 1999). L'inhibition du récepteur de l'EGF induit par contre une augmentation de l'expression de la kératine 10 (Peus et al., 1997). L'activation de ce récepteur induit également l'expression de la profilaggrine, qui est un marqueur de la différenciation tardive des kératinocytes (Wakita & Takigawa, 1999) et l'expression de l'involucrine (Poumay & Pittelkow, résultats non publiés). L'activation du récepteur de l'EGF par un traitement par l'EGF de tissus épidermiques reconstruits en culture induit l'expression précoce de l'involucrine dans la couche épineuse (Gibbs et al., 1998; Gibbs et al., 2000). Par ailleurs, une déplétion en cholestérol active le récepteur de l'EGF dans des cellules 3T3 ou COS-1 (Chen & Resh, 2002; Pike & Casey, 2002). Il est dès lors possible qu'une déplétion en cholestérol des kératinocytes résulte en une activation du

récepteur de l'EGF qui mène à son tour à une répression de l'expression de la kératine 10 et à une induction de l'expression de l'involucrine.

2.4.1 Effets de l'activation du récepteur de l'EGF sur l'expression de la kératine 10 et de l'involucrine

Afin de vérifier les effets que le récepteur de l'EGF exerce sur l'expression de la kératine 10 et de l'involucrine, l'expression de ces gènes a été analysée suite à un traitement de kératinocytes avec l'EGF, qui active ce récepteur. Comme le montre la fig. 2-8, l'incubation de kératinocytes pendant 18h en présence de 10 ng/ml EGF mène en effet à une répression de l'expression de la kératine 10 et à une induction de l'expression de l'involucrine. Dans ces conditions, l'expression de la kératine 14 n'est que très faiblement réprimée.

Fig. 2-8 : Effets d'un traitement par l'EGF sur l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine dans les kératinocytes à confluence.



Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées en présence de 10 ng/ml EGF pendant 18h. Après les traitements, les ARNm ont été extraits des cellules et transférés sur une membrane par Northern blot. La membrane a été hybridée de manière séquentielle avec des sondes d'ADNc marquées au ³²P spécifiques des ARNm des kératines K14 et K10 et de l'involucrine. L'exposition de la membrane à un écran de stockage au phosphore et la révélation de l'écran au moyen d'un appareil Cyclone™ (Packard) ont permis d'analyser l'expression génique de ces protéines. L'hybridation de la membrane avec la sonde d'ADNc spécifique de 36B4 donne des indications sur les quantités totales d'ARN poly-A déposées sur le gel et transférées sur la membrane.

2.4.2 Activation du récepteur de l'EGF par une déplétion en cholestérol

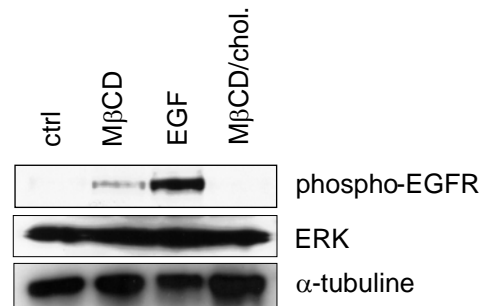
L'activation du récepteur de l'EGF induit des changements d'expression de la kératine 10 et de l'involucrine. Il est possible que l'état d'activation du récepteur de l'EGF soit affecté par une déplétion en cholestérol, ce qui pourrait expliquer les effets observés de ce traitement sur l'expression des marqueurs de différenciation épidermique. Pour examiner cette hypothèse,

nous avons analysé la phosphorylation du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes confluents suite à une incubation en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h. Contrairement aux cellules non traitées, les cellules ayant subi une déplétion en cholestérol exhibent une quantité clairement détectable du récepteur de l'EGF phosphorylé (fig. 2-9). Cette quantité est toutefois moins importante que la quantité de récepteur de l'EGF phosphorylé détectable après une stimulation par l'EGF (fig. 2-9). Notons que l'augmentation de la quantité de récepteur de l'EGF phosphorylé suite à un traitement par la M β CD semble être effectivement liée à une extraction de cholestérol puisqu'une incubation des cellules en présence de M β CD complexée au cholestérol ne résulte pas en une quantité détectable de récepteur de l'EGF phosphorylé.

Fig. 2-9 : Effets d'un traitement par la M β CD sur la phosphorylation du récepteur de l'EGF.

Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h, en présence de 10 ng/ml EGF pendant 10 min ou en présence de M β CD 7,5 mM complexée au cholestérol 7,5 mM pendant 1h. Ensuite,

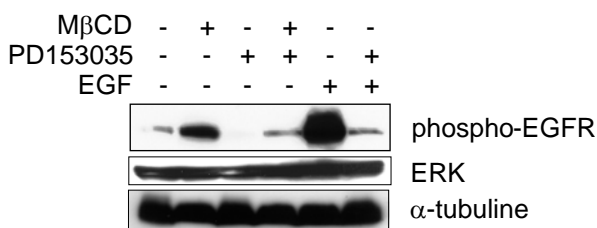
les cellules ont été lysées et les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par électrophorèse dans un gel à polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) et transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) par Western blot. Les récepteurs de l'EGF phosphorylés ont été détectés dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-EGFR) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection des *extracellular signal-regulated kinases* 1 et 2 (ERK) et de l' α -tubuline.



Il est bien établi que l'activation de récepteurs de la famille des HER s'accompagne d'une homo- ou hétérodimérisation et d'une transphosphorylation grâce à leur domaine tyrosine kinase (Schlessinger, 2000). La molécule PD153035 inhibe spécifiquement l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF (Fry et al., 1994). Pour savoir si l'activation du

récepteur de l'EGF par une déplétion en cholestérol nécessite l'activité tyrosine kinase du récepteur, nous avons incubé des kératinocytes pendant 30 min en présence de PD153035 500 nM avant de les incuber pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM. Comme le montre la fig. 2-10, un pré-traitement des cellules par le PD153035 inhibe presque complètement l'augmentation de la quantité du récepteur de l'EGF phosphorylé induite par le traitement par la M β CD. Ce résultat suggère qu'une déplétion en cholestérol provoque l'autophosphorylation d'une certaine proportion des récepteurs à l'EGF présents dans les kératinocytes.

Fig. 2-10 : Effets d'une inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF sur la quantité de récepteur de l'EGF phosphorylé détectable dans les kératinocytes suite à une déplétion en cholestérol.



Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées pendant 30 min en présence de PD153035 500 nM avant d'être incubées pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM ou en présence de 10 ng/ml EGF. Ensuite, les cellules ont été lysées et les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF par Western blot. Les récepteurs à l'EGF phosphorylés ont été détectés dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-EGFR) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection de ERK1/2 et de l' α -tubuline.

L'activation du récepteur de l'EGF résulte en l'activation de plusieurs protéines kinases situées en aval de ce récepteur, notamment en l'activation de la MAP kinase *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) (Schlessinger, 2000). Dans plusieurs types cellulaires, une déplétion en cholestérol induit l'activation de ERK (Furuchi & Anderson, 1998; Chen & Resh, 2001) probablement par l'intermédiaire du récepteur de l'EGF (Chen & Resh, 2002). Il est dès lors possible qu'une déplétion en cholestérol résulte chez les kératinocytes en une activation de ERK. ERK est impliquée

dans la prolifération et la survie des kératinocytes épidermiques (Eckert et al., 2002). En conditions de culture autocrine, le phénotype des kératinocytes dépend de la densité cellulaire des cultures : les cultures sous-confluentes sont en prolifération intense, tandis que les cultures confluentes et post-confluentes sont en différenciation (Poumay & Pittelkow, 1995; Poumay et al., 1999). Nous n'avons pas d'informations concernant l'activité de ERK en fonction du phénotype des kératinocytes. Notons que ERK existe sous plusieurs isoformes différentes, dont ERK1 et ERK2, qui ont respectivement un poids moléculaire de 44 ou 42 kDa (Boulton et al., 1991). Grâce à un anticorps spécifique des formes phosphorylées de ERK1 et de ERK2, nous avons analysé l'état de phosphorylation de ces kinases dans des kératinocytes à différents stades de confluence en culture autocrine. La quantité de ERK1/2 phosphorylée varie en fonction du phénotype cellulaire : le jour après l'incubation en présence de milieu autocrine, les kératinocytes contiennent une certaine quantité de ERK1/2 phosphorylée (fig. 2-11A). Cette quantité est diminuée 2 jours après le passage en milieu autocrine, mais réaugmente 3 jours après ce passage. 4 jours après le passage en milieu autocrine, c'est-à-dire à confluence de la culture, une quantité maximale de ERK1/2 phosphorylée est détectée. Les deux jours qui suivent la confluence sont caractérisés par une quantité faible de ERK1/2 phosphorylée.

Afin de rechercher si l'activité de ERK1/2 est affectée par une déplétion en cholestérol, nous avons incubé des kératinocytes en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h et analysé la quantité de ERK1/2 phosphorylée présente dans les cellules. Les kératinocytes sous-confluentes qui sont incubés depuis 2 jours en présence de milieu autocrine réagissent à un traitement par la M β CD par une augmentation de ce taux (fig. 2-11B). Par contre, un traitement par la M β CD n'affecte pas la quantité de ERK1/2 phosphorylée dans les kératinocytes confluentes. Ces résultats suggèrent qu'une déplétion

en cholestérol n'affecte le taux d'activation de ERK1/2 qu'à un phénotype particulier de kératinocytes sous-confluents.

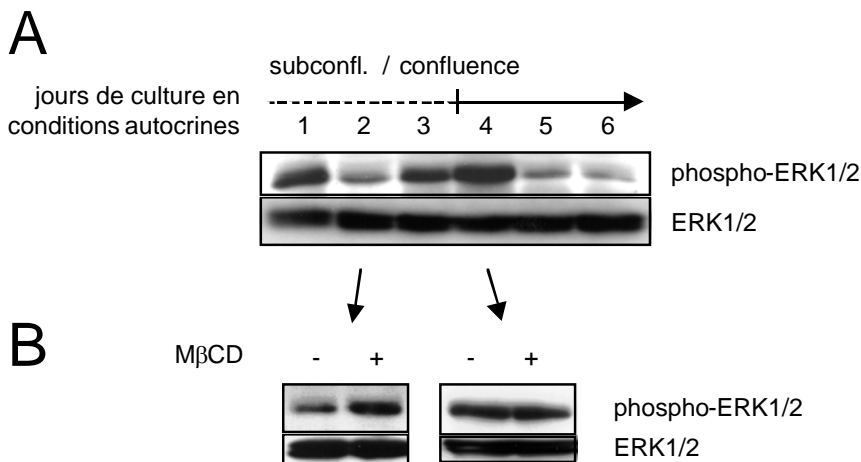


Fig. 2-11 : (A) Estimation de la quantité de extracellular signal-regulated kinase 1 et 2 (ERK1/2) phosphorylée présente dans les kératinocytes en fonction de la durée des conditions de culture autocrine. (B) Effet d'une déplétion en cholestérol sur la quantité de ERK1/2 présente dans les kératinocytes 2 jours resp. 4 jours après le changement en conditions de culture autocrine.

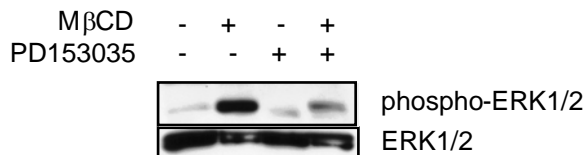
(A) Des kératinocytes ont été mis en culture en utilisant les conditions de culture autocrine. Des lysats cellulaires ont été préparés tous les jours dès le lendemain de la première incubation en présence de milieu autocrine. Les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF par Western blot. Les protéines ERK1/2 phosphorylées ont été détectés dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-ERK1/2) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection de ERK1/2.

(B) Des kératinocytes ont été mis en culture en utilisant les conditions de culture autocrine. 2 jours resp. 4 jours après la première incubation en présence de milieu autocrine, les cellules ont été traitées en présence de MβCD 7,5 mM pendant 1h. Ensuite, les cellules ont été lysées et les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF par Western blot. Les protéines ERK1/2 phosphorylées ont été détectés dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-ERK1/2) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection de ERK1/2.

Afin de rechercher si l'activation du récepteur de l'EGF est responsable de l'activation de ERK lors d'une déplétion en cholestérol, nous avons incubé des kératinocytes en présence d'un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du

récepteur de l'EGF et de M β CD. Dans des kératinocytes qui sont incubés en présence de milieu autocrine depuis 2 jours, un pré-traitement par le PD153035 500 nM pendant 30 min et un traitement par le PD153035 et la M β CD 7,5 mM pendant 1h résulte en une quantité diminuée de ERK1/2 phosphorylée par rapport aux cellules traitées uniquement par la M β CD (fig. 2-12). Ce résultat suggère qu'une déplétion en cholestérol peut induire l'activation de ERK1/2 dans les kératinocytes par l'intermédiaire de l'activation du récepteur de l'EGF.

Fig. 2-12 : Effets d'une inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF parallèlement à une déplétion en



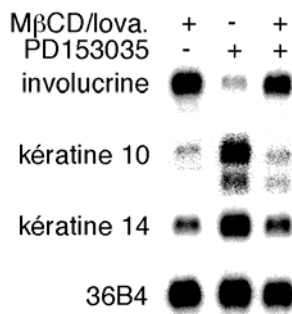
cholestérol sur la quantité de ERK1/2 phosphorylée présente dans les kératinocytes 2 jours après avoir mis les cellules en présence de milieu autocrine.

Des kératinocytes ont été mis en culture en utilisant les conditions de culture autocrine. 2 jours après la première incubation en présence de milieu autocrine, les cellules ont été traitées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h. D'autres cellules ont été incubées en présence PD153035 500 nM pendant 90 min ou en présence de PD153035 pendant 30 min et en présence de PD153035 et de M β CD pendant 60 min. Ensuite, les cellules ont été lysées et les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF par Western blot. Les protéines ERK1/2 phosphorylées ont été détectés dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-ERK1/2) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection de ERK1/2.

Ensuite, nous avons voulu déterminer s'il existe une relation entre l'activation du récepteur de l'EGF et l'altération de l'expression de la kératine 10 et de l'involucrine suite à une déplétion en cholestérol. Cette hypothèse a été testée en inhibant l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF avant de dépléter les kératinocytes en cholestérol et d'analyser l'expression génique de la kératine 10 et de l'involucrine. Des kératinocytes confluents ont dès lors été incubés pendant 30 min en présence de PD153035

500 nM avant de les traiter pendant 1h à la M β CD 7,5 mM et pendant 17h à la lovastatine 10 μ M. La fig. 2-13 montre que ce traitement résulte en une répression de l'expression de la kératine 10 et une induction de l'expression de l'involucrine similaire aux effets d'un traitement par la M β CD et la lovastatine. Ce résultat suggère donc que l'activation du récepteur de l'EGF n'est pas responsable de l'altération de l'expression de la kératine 10 et de l'involucrine suite à une déplétion des kératinocytes en cholestérol.

Fig. 2-13 : Effets d'une inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF parallèlement à une déplétion en cholestérol sur l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine par les kératinocytes à confluence.



Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h et en présence de lovastatine 10 μ M pendant 17h (M β CD/lova.). D'autres cultures ont été incubées en présence de PD153035 500 nM pendant 18h (PD153035) ou pendant 30 min avant d'être incubées en présence de M β CD et de lovastatine. Après les traitements, les ARNm ont été extraits des cellules et transférés sur une membrane par Northern blot. La membrane a été hybridée de manière séquentielle avec des sondes d'ADNc marquées au 32 P spécifiques des ARNm des kératines K14 et K10 et de l'involucrine. L'exposition de la membrane à un écran de stockage au phosphore et la révélation de l'écran au moyen d'un appareil Cyclone™ (Packard) ont permis d'analyser l'expression génique de ces protéines. L'hybridation de la membrane avec la sonde d'ADNc spécifique de 36B4 donne des indications sur les quantités totales d'ARN poly-A déposées sur le gel et transférées sur la membrane.

2.4.3 Activation de HER2, mais pas de HER3 par une déplétion en cholestérol

Comme le récepteur de l'EGF ne paraît pas être impliqué dans la régulation de l'expression de la kératine 10 ou de l'involucrine suite à une déplétion des kératinocytes en cholestérol, d'autres protéines de signalisation sont peut-être activées lors de ce traitement et affectent l'expression de ces marqueurs de différenciation. Parmi la famille des récepteurs HER, les protéines HER2 et HER3 participent à la régulation de la différenciation des kératinocytes (De Potter et al., 2001; Stoll et al., 2001; Piepkorn et al., 2003). Plus

précisément, l'activation de HER3 et de HER2 par un traitement avec l'heréguline β induit une cascade de transduction du signal qui aboutit à la diminution de l'expression de la kératine 10 dans des kératinocytes confluents (De Potter et al., 2001). Une déplétion en cholestérol pourrait dès lors résulter en l'activation de HER3 et de HER2 et réduire l'expression de la kératine 10 par l'intermédiaire de ces récepteurs. Afin d'investiguer cette hypothèse, nous avons analysé les effets d'une déplétion en cholestérol sur les quantités de HER3 phosphorylé et de HER2 phosphorylé détectables dans les kératinocytes. Comme le montre la fig. 2-14A, un traitement par la M β CD 7,5 mM pendant 1h n'affecte pas la quantité de HER3 phosphorylé détectable dans des kératinocytes confluents par rapport à la faible quantité détectable dans les cellules non traitées. A l'inverse, un traitement par 100 ng/ml de heréguline β (HRG β) est capable d'induire une augmentation importante de la quantité de HER3 phosphorylé.

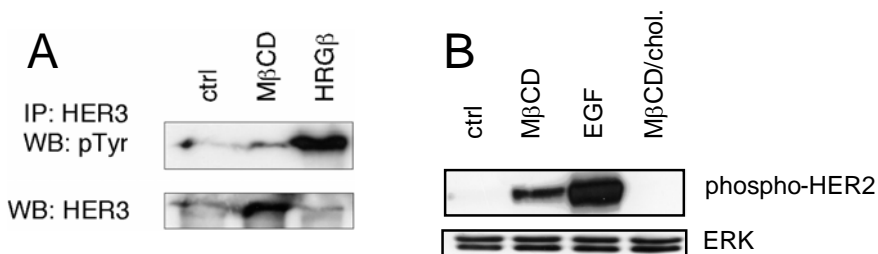


Fig. 2-14 : Effets d'une déplétion en cholestérol sur la quantité de HER3 phosphorylé (A) ou de HER2 phosphorylé (B) présente dans les kératinocytes à confluence.

(A) Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM ou en présence de 100 ng/ml d'heréguline β (HRG β). Ensuite, les cellules ont été lysées et HER3 a été isolé à partir des lysats par immunoprécipitation (IP) comme décrit dans *Matériels et Méthodes*. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par migration dans SDS-PAGE et ont été transférées sur une membrane de PVDF par Western blot. HER3 phosphorylé a été révélé par immunodétection avec des anticorps spécifiques de résidus phosphotyrosine (WB pTyr) comme décrit dans *Matériels et Méthodes*. Les complexes immuns sont détachés de la membrane par une incubation avec un tampon de stripping (Re-Blot, Chemicon) et HER3 est révélé par une immunodétection en utilisant des anticorps spécifiques de HER3 (WB HER3) pour estimer la quantité totale d'HER3 immunoprécipité.

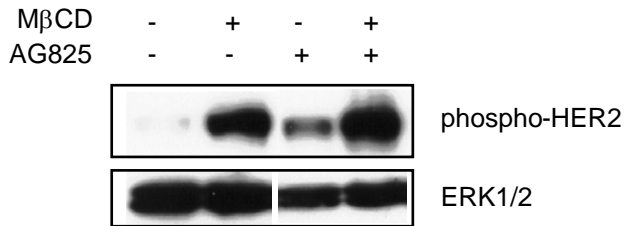
(B) Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h, en présence de 10 ng/ml EGF pendant 10 min ou en présence de M β CD 7,5 mM complexée au cholestérol pendant 1h. Ensuite, les cellules ont été lysées et les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de PVDF par Western blot. Les récepteurs HER2 phosphorylés ont été détectés dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-HER2) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection de ERK1/2.

Cependant, lorsque les kératinocytes sont incubés pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM, la quantité de HER2 phosphorylé est augmentée par rapport à la quantité détectable dans les cellules non traitées (fig. 2-14B). Notons que la quantité de HER2 phosphorylé induite par un traitement par la M β CD est moins importante que la quantité détectée après une incubation en présence de 10 ng/ml EGF. L'augmentation de la quantité de HER2 phosphorylé suite à un traitement par la M β CD est liée à une extraction de cholestérol puisqu'une telle augmentation n'est pas détectable dans des cellules incubées en présence de M β CD complexée au cholestérol. Nos résultats indiquent donc qu'une déplétion en cholestérol augmente la phosphorylation de HER2, mais n'affecte pas la phosphorylation de HER3 dans les kératinocytes confluentes. Il est par conséquent probable que HER3 n'intervienne pas dans l'altération de l'expression de la kératine induite par une déplétion en cholestérol, mais il est possible que HER2 intervienne dans ce phénomène.

L'activité tyrosine kinase de HER2 peut être inhibée spécifiquement par la molécule AG825 (Levitzki & Gazit, 1995). Afin d'analyser le mécanisme par lequel une déplétion en cholestérol active HER2, nous avons incubé des kératinocytes pendant 30 min en présence d'AG825 5 μ M et pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM. Comme le montre la fig. 2-15, ce traitement résulte en une augmentation de la quantité de HER2 phosphorylé comparable à la quantité détectée dans des cellules traitées exclusivement

pendant 1h à la M β CD 7,5 mM. Ce résultat indique qu'une déplétion en cholestérol n'induit pas l'autophosphorylation de HER2. Il est dès lors probable que HER2 soit affecté par une autre protéine kinase lors d'une déplétion en cholestérol.

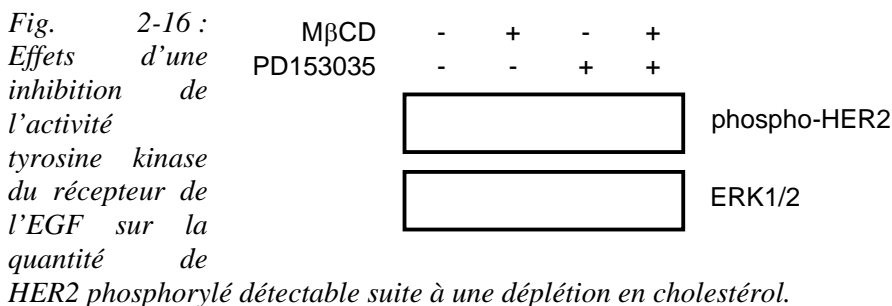
Fig. 2-15 : Effets d'une inhibition de l'activité tyrosine kinase de HER2 parallèlement à une déplétion en cholestérol sur la quantité de HER2 phosphorylé.



Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées pendant 30 min en présence d'AG825 5 μ M avant d'être incubées pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM. Ensuite, les cellules ont été lysées et les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF par Western blot. Les récepteurs HER2 phosphorylés ont été détectés dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-HER2) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection de ERK1/2.

Le récepteur de l'EGF est un récepteur à activité tyrosine kinase qui peut subir une hétérodimérisation avec HER2 suivi d'une transphosphorylation, par exemple suite à une incubation de kératinocytes immortalisés de la lignée HaCaT en présence d'EGF (Marques et al., 1999). Nous avons montré qu'une déplétion en cholestérol induit une certaine activation du récepteur de l'EGF dans les kératinocytes (fig. 2-9). Il est par conséquent possible qu'une déplétion en cholestérol active le récepteur de l'EGF, qui à son tour recrute HER2 pour l'hétérodimérisation et la transphosphorylation. Afin d'examiner cette hypothèse, des kératinocytes ont été incubés pendant 30 min en présence de PD153035 500 nM (inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF), puis pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM pour extraire le cholestérol membranaire. Puisque ce traitement résulte en une quantité de HER2 phosphorylé similaire à la quantité détectable dans les

cellules non traitées (fig. 2-16), ce résultat suggère qu'une déplétion en cholestérol induit la phosphorylation de HER2 par l'intermédiaire du récepteur de l'EGF.



Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées pendant 30 min en présence de PD153035 500 nM avant d'être incubées pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM. Ensuite, les cellules ont été lysées et les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF par Western blot. Les récepteurs HER2 phosphorylés ont été détectés dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-HER2) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection de ERK1/2.

Puisqu'une déplétion en cholestérol active HER2 par l'intermédiaire du récepteur de l'EGF, et comme le récepteur de l'EGF n'intervient pas dans la répression de l'expression de la kératine 10 lors d'une déplétion en cholestérol, il est probable que HER2 n'intervienne pas non plus dans la régulation de l'expression de la kératine 10 dans ces conditions.

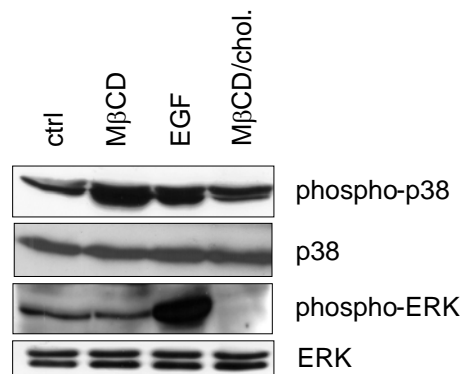
2.5 Effets d'une déplétion en cholestérol sur l'état d'activation de la MAP kinase p38

Récemment, Efimova et al. (2003) ont montré que l'expression de l'involucrine au cours de la différenciation tardive des kératinocytes épidermiques est régulée par p38. Il est donc possible qu'une déplétion des kératinocytes en cholestérol active p38 et induise l'expression de l'involucrine. Pour étudier cette hypothèse, nous avons recherché les effets d'une déplétion en cholestérol sur la quantité de p38 phosphorylée présente

dans les kératinocytes à confluence. L'incubation pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM conduit à une augmentation importante de la quantité de p38 phosphorylée (mais pas de ERK phosphorylée) par rapport à la quantité détectable dans les cellules non traitées (fig. 2-17). Ce résultat suggère donc qu'une déplétion en cholestérol induit l'activation de p38 dans les kératinocytes. Notons que l'augmentation de la quantité de p38 phosphorylée suite à un traitement par la M β CD semble être effectivement liée à une extraction de cholestérol puisqu'une telle augmentation n'est pas détectée dans des cellules incubées en présence de M β CD complexée au cholestérol. Une incubation des kératinocytes pendant 10 min en présence de 10 ng/ml d'EGF induit également une augmentation de la quantité de p38 phosphorylée, ce qui est en accord avec les résultats publiés par Cheng (Cheng et al., 2002) et Huang (Huang et al., 2002). Cette augmentation est néanmoins plus faible que l'augmentation détectée suite à un traitement par la M β CD. Par contre, le traitement par l'EGF induit une augmentation importante de la quantité de ERK phosphorylée.

Fig. 2-17 : Effets d'une déplétion en cholestérol sur la quantité de p38 phosphorylée présente dans les kératinocytes à confluence.

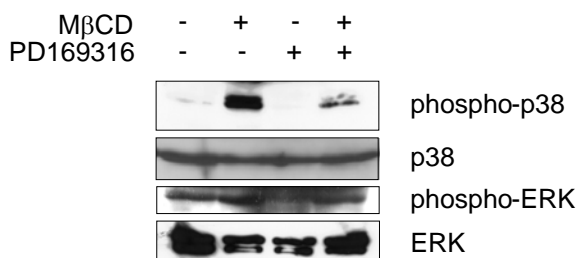
Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h, en présence de 10 ng/ml EGF pendant 10 min ou en présence de M β CD 7,5 mM complexée au cholestérol pendant 1h. Ensuite, les cellules ont été lysées et les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une



membrane de PVDF par Western blot. Les protéines p38 et ERK phosphorylées ont été détectées dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-p38, phospho-ERK) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection de p38 et de ERK1/2.

L'activité protéine kinase de p38 peut être inhibée par la molécule PD169316 (Kummer et al., 1997). Afin de rechercher si l'activation de p38 lors d'une déplétion en cholestérol fait intervenir une autoactivation de cette MAP kinase, nous avons incubé des kératinocytes en présence de PD169316 15 μ M pendant 30 min avant de mettre les cellules en présence de M β CD 7,5 mM et de PD169316 pendant 1h. Comme le montre la fig. 2-18, l'inhibition de p38 perturbe l'induction de la phosphorylation de p38 par le traitement par la M β CD, suggérant que l'activation de p38 par une déplétion en cholestérol implique l'autoactivation de p38.

Fig. 2-18 : Effets d'une inhibition de l'activité protéine kinase de p38 sur la quantité de p38 phosphorylée présente dans les kératinocytes à confluence après une déplétion en cholestérol.

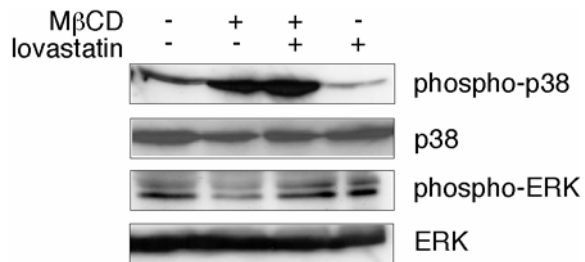


Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h ou en présence de PD169316 15 μ M pendant 90 min. D'autres cultures ont été incubées pendant 30 min en présence de PD169316 et en présence de PD169316 et de M β CD pendant 1h. Ensuite, les cellules ont été lysées et les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de PVDF par Western blot. Les protéines p38 phosphorylées et ERK phosphorylées ont été détectées dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-p38, phospho-ERK) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection de p38 et de ERK1/2.

Nous avons montré dans la fig. 2-5 qu'une déplétion en cholestérol prolongée affecte l'expression de l'involucrine par les kératinocytes. Afin de rechercher si un tel traitement affecte également le taux de phosphorylation de p38, nous avons incubé des kératinocytes pendant 1h en présence de M β CD 7,5 mM et pendant 17h en présence de lovastatine 10 μ M avant d'analyser la quantité de p38 phosphorylée. Ce traitement induit un quantité élevée de p38 phosphorylée (mais pas de ERK phosphorylée) par rapport aux cellules non traitées (fig. 2-19). Signalons aussi que 17h après un

traitement par la M β CD sans présence de lovastatine, une augmentation du taux de p38 phosphorylé est détectable, tandis que ce taux n'est pas affecté par un traitement par la lovastatine pendant 17h. Ce résultat suggère qu'une déplétion en cholestérol induit une activation prolongée de p38.

Fig. 2-19 : Effets d'une déplétion en cholestérol prolongée sur la quantité de p38 phosphorylée présente dans les kératinocytes à confluence.



Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h, en présence de M β CD pendant 1h et en présence de lovastatine 10 μ M pendant 17h ou en présence de lovastatine pendant 18h. Ensuite, les cellules ont été lysées et les protéines contenues dans les lysats ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de PVDF par Western blot. Les protéines p38 phosphorylées et ERK phosphorylées ont été détectées dans les lysats par des anticorps spécifiques (phospho-p38, phospho-ERK) comme décrit dans la section *Matériels & Méthodes*. L'homogénéité du chargement du gel de polyacrylamide et du transfert a été vérifiée par la détection de p38 et de ERK1/2.

Afin d'identifier les isoformes de p38 activées, nous avons analysé l'effet d'une déplétion en cholestérol sur la phosphorylation de p38 α , de p38 β et de p38 δ . L'incubation de kératinocytes en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h et de lovastatine 10 μ M pendant 17h induit une faible augmentation la phosphorylation de p38 α sans affecter la phosphorylation de p38 β ou de p38 δ (fig. 2-20). De manière similaire à des observations publiées par Efimova et al. (2002), le traitement par 10 ng/ml de TPA pendant 18h induit par contre de façon évidente la phosphorylation de p38 δ .

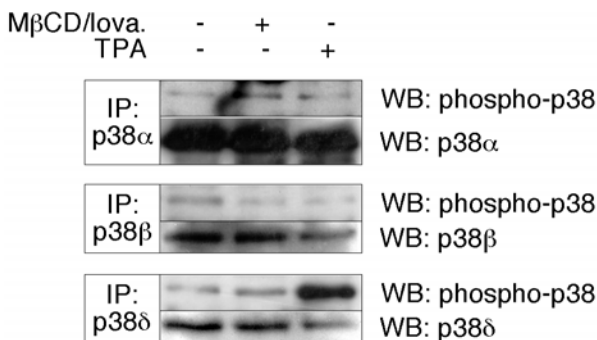


Fig. 2-20 : Effets d'une déplétion en cholestérol sur la quantité de p38 α phosphorylée, de p38 β phosphorylée et de p38 δ phosphorylée présente dans les kératinocytes.

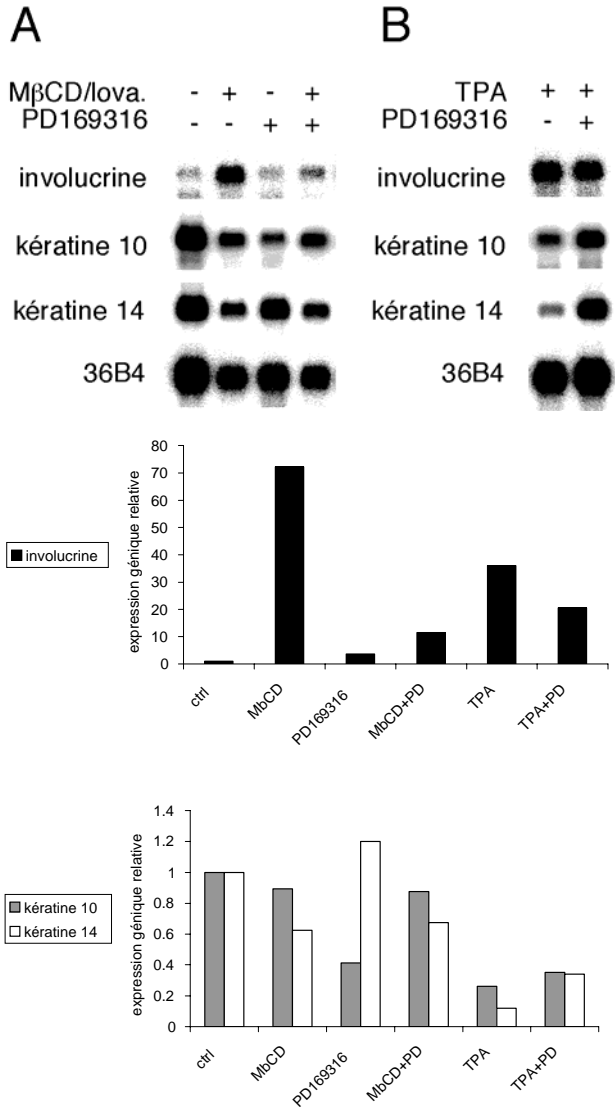
Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h et en présence de lovastatine 10 μ M pendant 17h, ou en présence de 10 ng/ml de TPA pendant 18h. Ensuite, les cellules ont été lysées et p38 α , p38 β ou p38 δ a été isolé à partir des lysats par immunoprécipitation (IP) comme décrit dans *Matériels et Méthodes*. Les protéines immunoprécipitées ont été séparées par migration dans SDS-PAGE et ont été transférées sur une membrane de PVDF par Western blot. Les protéines p38 α phosphorylées, p38 β phosphorylées ou p38 δ phosphorylées ont été révélées par immunodétection avec des anticorps spécifiques de p38 phosphorylée (WB phospho-p38) comme décrit dans *Matériels et Méthodes*. Les complexes immuns ont ensuite été détachés de la membrane par une incubation avec un tampon de stripping (Re-Blot, Chemicon) et p38 α , p38 β ou p38 δ ont été révélées par une immunodétection en utilisant des anticorps spécifiques de ces protéines (WB p38 α , WB p38 β ou WB p38 δ) pour estimer la quantité totale de p38 α , de p38 β ou de p38 δ immunoprécipitée.

Ensuite, nous avons recherché si une déplétion en cholestérol résulte en une augmentation de l'expression de l'involucrine par l'intermédiaire d'une activation de p38. Pour ce faire, nous avons analysé l'effet d'une déplétion en cholestérol sur l'expression de l'involucrine lors d'une inhibition de l'activité protéine kinase de p38. Des kératinocytes ont été incubés en présence de PD169316 15 μ M pendant 30 min, puis ont été traités avec la M β CD 7,5 mM pendant 1h et avec la lovastatine 10 μ M pendant 17h toujours en présence de PD169316. Ce traitement ne résulte qu'en une induction de l'expression de l'involucrine qui est très faible par rapport à l'effet d'un traitement par la M β CD et la lovastatine seules (fig. 2-21), ce qui suggère que l'activité kinase de p38 a une importance majeure dans

l'induction de l'expression de l'involucrine par une déplétion en cholestérol. Cependant, une déplétion en cholestérol induit même une diminution de l'expression de la kératine 14 et de la kératine 10 lorsque l'activité protéine kinase de p38 est inhibée, suggérant l'intervention de protéines de signalisation autres que p38 dans la régulation de l'expression de ces gènes lors d'une déplétion en cholestérol. Notons pourtant qu'une incubation en présence de PD169316 induit une diminution de l'expression de la kératine 10, ce qui pourrait indiquer que p38 est impliquée dans la régulation de l'expression constitutive de cette kératine dans les kératinocytes.

Fig. 2-21 : Effets d'une inhibition de l'activité tyrosine kinase sur l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine par des kératinocytes qui ont subi une déplétion en cholestérol.

Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h et en présence de lovastatine 10 μ M pendant 17h (M β CD/lova.). D'autres cultures ont été incubées en présence de PD169316 15 μ M pendant 18h (PD169316) ou pendant 30 min avant d'être incubées en présence de M β CD et de lovastatine. D'autres cultures ont été incubées en présence de 10 ng/ml de TPA pendant 18h ou pendant 30 min en présence de PD169316 15 μ M avant d'être incubées en présence de TPA. Après les traitements, les ARNm ont été extraits des cellules et transférés sur une membrane par Northern blot. La membrane a été hybridée de manière séquentielle avec des sondes d'ADNc marquées au ³²P spécifiques des ARNm des kératines K14 et K10 et de l'involucrine. L'exposition de la membrane à un écran de stockage au phosphore et la révélation de l'écran au moyen d'un appareil Cyclone™ (Packard) ont permis d'analyser l'expression génique de ces protéines. L'hybridation de la membrane avec la sonde d'ADNc spécifique de 36B4 donne des indications sur les quantités totales d'ARN poly-A déposées sur le gel et transférées sur la membrane. L'expression génique de la kératine 14, de la kératine 10, de l'involucrine et de 36B4 a été quantifiée en utilisant le programme OptiQuant (Packard). L'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine relative à l'expression de 36B4 a été fixée arbitrairement à 1 dans l'échantillon contrôle.



La molécule PD169316 appartient à la famille des inhibiteurs possédant une structure pyridinyl imidazole (Young et al., 1997) et a été suggérée comme étant un inhibiteur spécifique de p38 α et de p38 β (Eckert et al., 2003; Hendrickx et al., 2003). L'observation que la présence de PD169316 inhibe l'induction de l'expression de l'involucrine lors d'une déplétion en cholestérol (cf. ci-dessus) suggère dès lors l'implication de p38 α et/ou de p38 β dans ce phénomène.

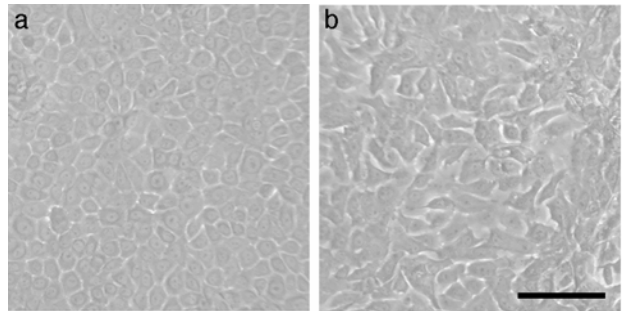
Il a été suggéré que PD169316 n'inhibe que p38 α et p38 β (Eckert et al., 2003). Un traitement de kératinocytes par le TPA induit une augmentation de l'expression de l'involucrine qui n'est pas inhibée par le SB203580, un autre inhibiteur de p38 α et de p38 β (Efimova et al., 1998; Efimova et al., 2002). Des observations supplémentaires réalisées par Efimova et al. (1998, 2002) ont permis d'attribuer un rôle majeur de p38 δ dans cet effet du TPA. Nous avons vérifié l'effet d'un traitement par le TPA et observons en effet une induction de l'expression de l'involucrine (fig. 2-21B). La présence de PD169316 n'inhibe que faiblement cet effet du TPA, suggérant que PD169316 n'exerce qu'un faible effet inhibiteur sur p38 δ (fig. 2-21B). Par contre, comme la présence de PD169316 exerce une inhibition importante de l'induction de l'expression de l'involucrine lors d'une déplétion en cholestérol (fig. 2-21A), ce traitement implique probablement p38 α ou p38 β . Comme la fig. 3-20 montre qu'une déplétion en cholestérol induit la phosphorylation de p38 α , mais pas de p38 β ou de p38 δ , il est probable que l'activation de p38 α soit responsable de l'altération de l'expression de l'involucrine lors de ce traitement.

La culture de kératinocytes en suspension induit la perte de l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire, ce qui provoque leur différenciation, détectable entre autres par une induction de l'expression de l'involucrine

(Focroul, 2003; McMullan et al., 2003). L'induction de l'expression de l'involucrine par une déplétion en cholestérol pourrait dès lors être liée à un effet de ce traitement sur l'adhérence des kératinocytes à la matrice extracellulaire. Pour analyser cette possibilité, nous avons observé en microscopie à contraste de phase des kératinocytes soumis à une incubation en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h et de lovastatine 10 μ M pendant 17h. Comparé aux cellules non traitées qui montrent une morphologie aplatie et étroitement jointive (fig. 2-22a), les cellules déplétées en cholestérol montrent une morphologie altérée (fig. 2-22b). Ce traitement semble en effet augmenter la réfringence des cellules et induire un aspect effilé, suggérant des remaniements du cytosquelette et/ou une perturbation de leur liaison au substrat de culture.

Fig. 2-22 : Effet d'une déplétion en cholestérol sur la morphologie des kératinocytes.

Des cultures confluentes de kératinocytes ont été incubées en présence de M β CD 7,5 mM pendant 1h et de lovastatine 10 μ M pendant 17h. Ensuite, les cultures ont été observées en utilisant un microscope à contraste de phase inversé et ont été photographiées en utilisant un appareil numérique Olympus (barre=20 μ m).



3 Discussion

Afin d'investiguer le rôle du cholestérol au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques, nous avons étudié les effets d'une déplétion en cholestérol sur ce processus. Nos résultats obtenus en mesurant la concentration cellulaire en cholestérol et en marquant le cholestérol par la filipine montrent que l'incubation de kératinocytes en culture en présence de méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) induit une légère déplétion en cholestérol

au niveau de la membrane plasmique. En accord avec nos résultats, une incubation en présence de M β CD a cet effet dans plusieurs autres types cellulaires, tels que les adipocytes (Parpal et al., 2001), les fibroblastes (Kilsdonk et al., 1995), les cellules endothéliales (Ilangumaran & Hoessli, 1998; Park et al., 1998), neuronales (Shogomori & Futerman, 2001), musculaires lisses (Ushio-Fukai et al., 2001), ovariennes de hamster chinois (Subtil et al., 1999), HeLa, A431 et HEp2 (Roepstorff et al., 2002).

Le traitement de kératinocytes par la M β CD induit un marquage intracellulaire périnucléaire de la filipine, qui peut traduire une certaine perméation de la membrane plasmique induite par la M β CD. La filipine, qui exhibe un faible poids moléculaire (654,8 g/mol) pourrait pénétrer dans les cellules, se lier au cholestérol intracellulaire, et induire ce marquage périnucléaire. Nous avons aussi observé qu'une déplétion en cholestérol médiée par un traitement par la M β CD exerce un léger effet cytotoxique signalé par la libération accrue d'activité adénylate kinase. Cet effet cytotoxique n'est apparemment pas accompagné par une formation significativement accrue de cellules apoptotiques, ce qui suggère qu'un traitement par la M β CD induit une légère perméation de la membrane plasmique, permettant la libération d'activité adénylate et l'entrée de filipine. Notons que le marquage intracellulaire de la filipine rappelle les résultats de McGookey et al., 1983, qui associe un tel marquage avec le cholestérol présent dans le système endolysosomal.

L'incubation en présence de méthyl- β -cyclodextrine perturbe la structure des rafts lipidiques. Les rafts lipidiques, enrichis en cholestérol, sont des domaines particuliers de la membrane plasmique et constituent des plateformes de signalisation cellulaire (Simons & Toomre, 2000). Les rafts sont enrichis dans les kératinocytes qui constituent la population

amplificatrice transitoire située au niveau de la couche basale de l'épiderme (Gniadecki & Bang, 2003). Après prolifération, ces cellules amplificatrices transitoires se différencient rapidement pour exprimer la kératine 10 (Jensen et al., 1999), qui est exprimée dans les couches suprabasales de l'épiderme et associée à la différenciation précoce des kératinocytes (Fuchs, 1990). Un traitement par la M β CD détruit la structure des rafts lipidiques dans plusieurs types cellulaires (Hooper, 1999; Ostermeyer et al., 1999; Kabouridis et al., 2000) et les rafts lipidiques semblent jouer un rôle régulateur dans la différenciation des kératinocytes. Un traitement par la M β CD perturbe probablement la structure des rafts lipidiques des kératinocytes, altère la signalisation cellulaire et altère ainsi l'expression de gènes dont les produits sont associés avec la différenciation.

Hétérogénéité des kératinocytes présents dans les cultures confluentes au niveau de l'intensité du marquage des rafts lipidiques. Comme nous ne disposons pas d'informations concernant la présence de rafts lipidiques dans les kératinocytes en culture autocrine, nous avons visualisé les rafts dans les kératinocytes en utilisant un marquage avec la sous-unité B de la toxine cholérique couplée à un fluorochrome (Harder et al., 1998). Nous avons analysé l'intensité d'un marquage avec cette molécule observé dans des cultures confluentes de kératinocytes et nos résultats indiquent que ces cultures sont constituées par une population minoritaire de kératinocytes riches en rafts lipidiques et une population majoritaire pauvre en rafts. Gniadecki & Bang (2003) ont suggéré que les cellules transitoires amplificatrices, qui dérivent des cellules souches épidermiques et montrent une capacité mitotique élevée (Niemann & Watt, 2002; Watt, 2002b), seraient enrichies en rafts lipidiques. Dans nos conditions de culture, les kératinocytes enrichis en rafts pourraient donc correspondre à des cellules de ce type. En conditions de culture autocrine, les cultures sous-confluentes de

kératinocytes exhibent un taux de prolifération important (Poumay & Pittelkow, 1995), typique de cellules transitoires amplificatrices (Watt, 2002b), qui diminue fortement vers l'atteinte de la confluence. La confluence des cultures détermine le recrutement massif des kératinocytes vers la différenciation terminale (Poumay & Pittelkow, 1995). Il est cependant possible que les cultures confluentes contiennent une population minoritaire de cellules transitoires amplificatrices, détectées par un marquage intense des rafts, à côté de la population majoritaire des kératinocytes en arrêt de croissance, recrutés pour la différenciation et pauvres en rafts lipidiques.

L'incubation en présence de méthyl- β -cyclodextrine altère la structure des rafts lipidiques dans les kératinocytes. Ensuite, nous avons étudié les effets d'un traitement par la M β CD sur les rafts lipidiques des kératinocytes. Les rafts isolés n'ont pas pu être visualisés parce que le pouvoir de résolution du microscope optique est trop faible. La formation d'agrégats de rafts médiée par une incubation à 12°C en présence de sous-unité B de la toxine cholérique couplée à un fluorochrome nous a néanmoins permis d'observer que les agrégats de rafts formés après un traitement par la M β CD ont un aspect différent des rafts formés dans des cellules non traitées. Ce résultat montre qu'une extraction de cholestérol perturbe la formation d'agrégats de rafts dans les kératinocytes. En accord avec nos résultats, une extraction de cholestérol par un traitement par la M β CD perturbe la structure des rafts marqués par la toxine cholérique fluorescente dans des cellules COS-7 (Nichols, 2003) et des cellules épithéliales (Wolf et al., 2002). Cette perturbation se manifesterait, entre autres, par des altérations au niveau de la signalisation intracellulaire provenant des rafts. Dans les kératinocytes, nous avons dès lors émis l'hypothèse que la perturbation de la structure des rafts

par la M β CD induit des perturbations de la signalisation intracellulaire qui altèrent le phénotype des kératinocytes traités.

Effets d'une incubation en présence de méthyl- β -cyclodextrine sur la différenciation des kératinocytes. Afin d'investiguer le rôle du cholestérol au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques, nous avons étudié les effets d'une déplétion en cholestérol sur l'expression génique de marqueurs de différenciation. L'incubation des kératinocytes en présence de M β CD et de lovastatine exerce une faible cytotoxicité sur les kératinocytes mais n'induit pas la mort cellulaire par apoptose. Etant conscient de la possibilité d'une induction de la mort cellulaire par un autre mécanisme (comme la nécrose), ce traitement nous a paru adéquat pour analyser les effets d'une déplétion en cholestérol sur le processus de différenciation des kératinocytes.

L'incubation en présence de méthyl- β -cyclodextrine altère l'expression de protéines associées avec la différenciation. Notre travail montre qu'une déplétion en cholestérol résulte en une diminution de l'expression de la kératine 14 et de la kératine 10 et une augmentation de l'expression de l'involucrine dans des cultures confluentes de kératinocytes, c'est-à-dire dans des cellules recrutées pour les étapes précoces de la différenciation (Poumay & Pittelkow, 1995). Ces résultats ont suggéré que le cholestérol est un élément régulateur de l'expression de ces gènes. Comme nous n'avons pas disposé d'informations sur le mécanisme par lequel le cholestérol joue ce rôle, nous avons émis l'hypothèse que le cholestérol est lié à une ou plusieurs cascades de transduction du signal qui, lors d'une déplétion en cholestérol, sont activées et modifient l'expression de la kératine 14, la kératine 10 et l'involucrine.

L'incubation en présence de méthyl- β -cyclodextrine active des protéines de signalisation qui régulent la différenciation. L'activation du récepteur de l'EGF par un traitement avec l'EGF affecte l'expression de la kératine 10 et de l'involucrine dans les kératinocytes (Poumay & Pittelkow, 1995). L'expression de ces gènes est également altérée lors d'une déplétion en cholestérol. Nos résultats montrent qu'une incubation en présence de M β CD induit la phosphorylation du récepteur de l'EGF dans les kératinocytes. Un traitement par la M β CD induit également la phosphorylation de ce récepteur dans les cellules 3T3 ou COS-1 (Chen & Resh, 2002; Pike & Casey, 2002). Il est bien établi que l'activation du récepteur de l'EGF induit l'activation de la MAP kinase ERK (Schlessinger, 2000). Nos résultats montrent que les kératinocytes exhibent des quantités variables de ERK phosphorylée au cours de leur différenciation en conditions de culture autocrine. Une explication serait que la phosphorylation accrue de ERK détectée juste après la mise en conditions de culture autocrine pourrait être liée aux facteurs de croissance présents dans le milieu de culture complet qui a servi pour démarrer les cultures et qui contient notamment de l'EGF. La phosphorylation de ERK diminue ensuite vu l'absence de facteur exogène pour réaugmenter aux alentours de la confluence des cultures. Suite à la mise en présence de milieu autocrine ne contenant aucun facteur exogène, les kératinocytes produisent en effet des facteurs de croissance autocrines comme l'amphiréguline ou le *transforming growth factor* (TGF) α qui se lie au récepteur de l'EGF (Cook et al., 1991b; Pittelkow et al., 1993). ERK pourrait dès lors être moins activée avant la sécrétion de ces facteurs et la stimulation du récepteur de l'EGF par ces facteurs, ce qui pourrait résulter en une réactivation de ERK qui augmente jusqu'à la confluence de la culture. Signalons que ERK montre un taux d'activation élevé dans des kératinocytes incubés en présence de milieu de culture EpiLife® ne contenant pas de

facteurs de croissance exogènes (Iordanov et al., 2002). Iordanov et al. ont suggéré que cette activation de ERK résulte d'une stimulation auto- ou paracrine du récepteur de l'EGF, ce qui est en accord avec notre hypothèse. Dans les kératinocytes qui exhibent une moindre phosphorylation de ERK, un traitement par la M β CD induit une augmentation de la phosphorylation de cette MAP kinase, tandis que ce traitement n'affecte pas la phosphorylation de ERK dans les kératinocytes confluent. Comme la phosphorylation de ERK est élevée dans les kératinocytes ayant ce phénotype, le mécanisme par lequel un traitement avec la M β CD affecte la phosphorylation de ERK pourrait ne pas être assez puissant pour augmenter davantage cette phosphorylation. Signalons qu'en accord avec nos résultats, un traitement par la M β CD induit l'activation de ERK dans des cellules Rat-1 (Furuchi & Anderson, 1998) et CHO-1 (Chen & Resh, 2001). Lors d'un traitement de kératinocytes par la M β CD, l'activation du récepteur de l'EGF est responsable de l'activation de ERK. De façon similaire, ce traitement active le récepteur de l'EGF et ERK dans les cellules CHO-1 (Chen & Resh, 2002).

Dans les kératinocytes, le mécanisme par lequel un traitement par la M β CD active le récepteur de l'EGF demeure inconnu, mais la littérature donne quelques pistes sur ce mécanisme. Au lieu d'interactions directes entre le cholestérol et le récepteur de l'EGF, le cholestérol semble influencer la fonction de ce récepteur par les effets que le cholestérol exerce sur les propriétés de la membrane plasmique (Westover et al., 2003). La phosphorylation du récepteur de l'EGF serait influencée par la localisation de ce récepteur au sein de rafts lipidiques (Pike & Casey, 2002; Ringerike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002) : ces rafts lipidiques sont désorganisés par un traitement avec la M β CD (Hooper, 1999; Ostermeyer et al., 1999;

Kabouridis et al., 2000), ce qui résulte en une activation du récepteur de l'EGF (Chen & Resh, 2002; Pike & Casey, 2002; Ringerike et al., 2002). La membrane plasmique des kératinocytes exhibe des rafts lipidiques (Gniadecki et al., 2002). Dans les kératinocytes, un traitement par la M β CD pourrait dès lors désorganiser ces rafts et activer le récepteur de l'EGF.

Comme nous avons montré qu'un traitement par la M β CD induit l'activation de HER2 par l'intermédiaire de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF, cette disruption des rafts pourrait induire l'activation du récepteur de l'EGF et la transactivation de HER2 par le récepteur de l'EGF. Comme un traitement par la M β CD n'affecte pas la phosphorylation de HER3, le mécanisme d'activation (c'est-à-dire l'hétérodimérisation) de ce récepteur semble être indépendant du cholestérol membranaire et des rafts lipidiques.

La signalisation à partir du récepteur de l'EGF n'intervient pas dans l'altération induite par la M β CD de l'expression des gènes associés avec la différenciation. Nous avons recherché si le traitement par la M β CD altère l'expression de la kératine 10 ou de l'involucrine par l'intermédiaire du récepteur de l'EGF. Cependant, l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de ce récepteur n'empêche pas cette altération. Ce résultat suggère que la signalisation à partir du récepteur de l'EGF n'est pas impliquée dans ce phénomène, ce qui est à l'opposé d'autres observations où l'activation du récepteur de l'EGF perturbe l'expression de ces gènes, notamment lors d'un traitement par l'EGF (Poumay & Pittelkow, 1995 et résultats non publiés ; Peus et al., 1997 ; Wakita et al., 1999).

Activation de p38 et altération de l'expression de l'involucrine par l'intermédiaire de l'activation de p38. Comme le récepteur de l'EGF ne semble pas être impliqué dans l'altération de l'expression de la kératine 10

ou de l'involucrine, nous avons tourné notre attention vers d'autres protéines de signalisation qui pourraient être impliquées dans ce phénomène. Les MAP kinases p38 peuvent induire une augmentation de l'expression de l'involucrine dans les kératinocytes, en particulier p38 α et p38 δ (Dashti et al., 2001 ; Efimova et al., 2002 ; Efimova et al., 2003). Nos résultats montrent qu'un traitement par la M β CD induit la phosphorylation prolongée de p38. De plus, toujours lors d'un traitement par la M β CD, l'inhibition de l'activité protéine kinase de p38 perturbe l'induction de l'expression de l'involucrine, ce qui suggère que le traitement par la M β CD induit l'expression de l'involucrine par l'intermédiaire de p38. Nous avons observé qu'un traitement par la M β CD induit la phosphorylation de p38 α . De plus, l'augmentation de l'expression de l'involucrin induite par le traitement avec la M β CD est inhibée par la présence de PD169316. Or, cette molécule n'inhibe pas l'augmentation de l'expression de l'involucrine induite par un traitement avec le TPA, qui exerce cet effet en activant p38 δ (Efimova et al., 2002 ; Efimova et al., 2003). Il est dès lors probable qu'une déplétion en cholestérol n'altère pas l'expression de l'involucrine par l'intermédiaire de p38 δ , mais plutôt par p38 α , qui est activée par ce traitement et inhibée par la présence de PD169316 (Hendrickx et al., 2003).

Protéines éventuellement impliquées dans l'activation de p38 et l'altération de l'expression de l'involucrine lors d'une déplétion en cholestérol. Actuellement, nous ne disposons pas d'informations concernant le mécanisme par lequel un traitement par la M β CD peut induire la phosphorylation de p38 dans les kératinocytes. En réponse à un choc hyperosmotique, p38 est phosphorylée dans les kératinocytes par l'intermédiaire de GTPases Rho (Cheng et al., 2002). Des observations récentes montrent qu'un choc hyperosmotique active p38 par l'intermédiaire

d'une cascade Rac (qui fait partie de la famille des GTPases Rho)-MEKK3-MEK3 (Uhlik et al., 2003). Dans les fibroblastes, l'efflux de cholestérol à partir de la membrane plasmique induit par l'apolipoprotéine A I résulte en une activation de la GTPase cdc42 (qui appartient à la famille des GTPases Rho), qui active p38 (Nofer et al., 2003). Dans les kératinocytes, l'activation de p38 induite par une déplétion en cholestérol membranaire pourrait dès lors résulter de l'activation de GTPases Rho.

Nous avons observé que les kératinocytes déplétés en cholestérol montrent une morphologie altérée, suggérant que ce traitement induit des remaniements du cytosquelette et/ou des perturbations de l'adhérence des cellules au substrat de culture. L'adhérence des kératinocytes à la matrice extracellulaire est assurée par les intégrines $\beta 1$ (contacts focaux) et $\alpha 6\beta 4$ (hémidesmosomes), et une perte d'adhérence des cellules provoque une internalisation de ces intégrines (Poumay et al., 1993; Poumay et al., 1994; Hotchin et al., 1995). Or, les intégrines informent la cellule sur leur état d'adhérence à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de la *focal adhesion kinase* (FAK) mais aussi de GTPases Rho. La signalisation dépendante des intégrines peut induire entre autres une réorganisation du cytosquelette (pour des revues, voir Sahai & Marshall, 2002; Schwartz & Ginsberg, 2002). Dans les kératinocytes, la signalisation dépendante de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ passe par les rafts lipidiques (Gagnoux-Palacios et al., 2003). Récemment, on a découvert que chez les fibroblastes, la destruction des rafts lipidiques par une déplétion en cholestérol perturbe la signalisation dépendante des intégrines $\beta 1$ qui implique Rho (del Pozo et al., 2004). La signalisation dépendante des intégrines semble en effet contrôler l'activité de Rho par l'intermédiaire des rafts (Palazzo et al., 2004).

Les effets de la perte de l'adhérence des kératinocytes à la matrice extracellulaire peuvent être étudiés en plaçant les cellules en culture en suspension. Ce traitement induit leur différenciation, qui est détectable entre autres par une induction de l'expression de l'involucrine (Focroul, 2003; McMullan et al., 2003). McMullan et al. (2003) ont suggéré que lors de la mise en suspension, la GTPase RhoA et son effecteur Rho-associated kinase (ROCK) sont recrutées pour induire l'expression de l'involucrine. D'une manière similaire, RhoA et/ou ROCK pourraient être impliquées dans l'augmentation de l'expression de l'involucrine induite par une déplétion en cholestérol. Comme discuté ci-dessus, la littérature récente suggère qu'il existe une relation entre les rafts lipidiques, détruits par une déplétion en cholestérol, Rho et les intégrines. Dès lors, une déplétion en cholestérol des kératinocytes pourrait influencer la signalisation impliquant les rafts, Rho et les intégrines et altérer le phénotype des kératinocytes par l'intermédiaire de cette signalisation.

Dans les kératinocytes, p38 α et/ou p38 β interviennent dans la réponse cellulaire à différents traitements stressants, comme par exemple l'irradiation par des rayons UVB, l'incubation en présence de peroxyde d'hydrogène, de TNF α (*tumor necrosis factor* α), d'interleukine 1 β (Zhang et al., 2001) ou encore le choc osmotique (Garmyn et al., 2001). Il est dès lors possible que l'altération du phénotype des kératinocytes induite par une déplétion en cholestérol fasse partie d'une réaction de type réponse au stress cellulaire provoquée par ce traitement.

Discussion générale et Perspectives

1 L'exocytose des lysosomes induite par l'entrée d'ions calcium dans les kératinocytes

Au cours de leur différenciation, les kératinocytes subissent une entrée d'ions calcium (Rice & Green, 1979; Michel & Demarchez, 1988), mais subissent également des microruptures mécaniques de la membrane plasmique chez chaque individu lorsqu'il se trouve en mouvement (McNeil & Ito, 1990). Dans plusieurs types cellulaires, ces microruptures induisent une entrée d'ions calcium et déclenchent de ce fait l'exocytose de lysosomes périphériques pour réparer la membrane (Miyake & McNeil, 1995; Togo et al., 1999; Reddy et al., 2001; Jaiswal et al., 2002). Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les kératinocytes sont également capables de répondre à une entrée d'ions calcium par une exocytose de lysosomes. Selon nos résultats, les kératinocytes libèrent des enzymes lysosomales solubles telles que la cathepsine C, la β -galactosidase ou la forme mature de la cathepsine D suite à une entrée d'ions calcium provoquée par l'ionophore ionomycine. Simultanément, cette libération s'accompagne d'une relocalisation des protéines lysosomales membranaires Lamp-1 et Lamp-2 vers la membrane plasmique, ajoutant une preuve supplémentaire de l'exocytose de lysosomes (fig. C-1).

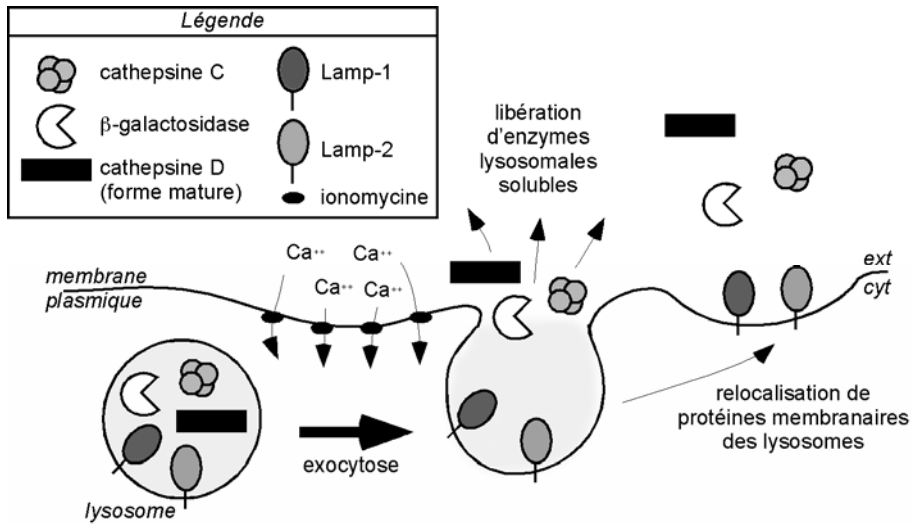


Fig. C-1 : Représentation schématique des effets d'une entrée d'ions calcium sur le comportement de lysosomes dans les kératinocytes (ext=espace extracellulaire, cyt=cytoplasme).

1.1 Le calcium et l'exocytose de lysosomes au cours de la différenciation épidermique

Il existe un gradient d'ions calcium dans l'épiderme, qui exhibe une concentration faible en ions calcium dans les couches inférieures et une concentration plus élevée dans les couches supérieures. La concentration en ions calcium est la plus importante au niveau de la couche granuleuse (Menon et al., 1985; Mauro et al., 1998). A ce niveau, l'entrée d'ions calcium dans les cellules engendre l'activation de la transglutaminase 1, qui conjugue les composants de l'enveloppe cornée (Rice & Green, 1979; Michel & Demarchez, 1988). L'exocytose de lysosomes suite à une entrée d'ions calcium dans les kératinocytes pourrait donc être un phénomène concomitant avec la formation de l'enveloppe cornée. Toutefois, toute entrée de calcium dans une couche de kératinocytes vivants sera susceptible de déclencher une exocytose de lysosomes.

1.2 Fonctions éventuelles des enzymes lysosomales sécrétées lors de l'exocytose de lysosomes

Nous ne disposons pas d'informations concernant des rôles extracellulaires éventuels de l'exopeptidase cathepsine C ou de la glycosidase β -galactosidase. Notons cependant que des mutations dans le gène de la **cathepsine C** sont à l'origine d'une pathologie épidermique, le syndrome de Papillon-Lefèvre (Lefevre et al., 2001; Nakano et al., 2001), caractérisé par des hyperkératoses, c'est-à-dire des épaisissements importants de l'épiderme, situées majoritairement au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds, signalant éventuellement un problème de desquamation dans ces régions. D'autres rôles épidermiques éventuels de la cathepsine C, qu'ils soient intra- ou extracellulaires, sont encore à élucider. A ce propos, il est intéressant à signaler que des résultats non publiés obtenus dans notre laboratoire suggèrent que la cathepsine C est exprimée dans les kératinocytes en prolifération, mais pas dans les cellules en différenciation. Cette enzyme pourrait dès lors être impliquée dans la régulation de la différenciation épidermique (Lefevre et al., 2001; Nakano et al., 2001).

L'activité de la **β -galactosidase** au sein de l'épiderme a été décrite comme étant de loin supérieure à l'activité d'autres glycosidases épidermiques (Mier & van den Hurk, 1975b), ainsi qu'à l'activité de la β -galactosidase dans d'autres tissus épithéliaux (Chang et al., 1991). Une activité de la β -galactosidase accrue par rapport à la normale a été détectée dans les kératinocytes en sénescence (Dimri et al., 1995; Breggere et al., 2003). Ces observations suggèrent une implication particulière de la β -galactosidase dans la physiologie des kératinocytes épidermiques, peut-être au niveau de la régulation du phénotype sénescence. Les rôles épidermiques éventuels de la β -galactosidase peuvent être intra- ou extracellulaires, puisque nos résultats

indiquent que les kératinocytes sont capables de sécréter la β -galactosidase suite à une entrée d'ions calcium, ce qui laisse penser que cette enzyme peut assumer une fonction extracellulaire dans l'épiderme.

Horikoshi et al. (1999) ont proposé que la **cathepsine D** sécrétée pourrait intervenir dans la desquamation des kératinocytes de la couche cornée en dégradant les desmosomes. Puisque les kératinocytes de la couche cornée sont morts et dépourvus d'organites, cette sécrétion doit être assurée par les kératinocytes des couches vivantes. La cathepsine D pourrait être sécrétée sous forme de précurseur de manière constitutive ou sous sa forme mature quand survient une entrée d'ions calcium. Tandis que la forme précurseur nécessite une activation, peut-être par l'intermédiaire du pH acide de la couche cornée (Ohman & Vahlquist, 1994), la forme mature est active dès que le pH du milieu extracellulaire épidermique devient acide (Horikoshi et al., 1998; Horikoshi et al., 1999).

Bien sûr, les autres enzymes lysosomales sont probablement sécrétées simultanément avec les enzymes que nous avons étudiées dans ce travail. Leurs fonctions éventuelles dans l'épiderme restent encore à préciser.

1.3 Fonctions éventuelles de Lamp-1 et Lamp-2 dans les kératinocytes

Lamp-1 et Lamp-2 portent des chaînes oligosaccharidiques caractéristiques, composées de résidus N-acétyllactosamine (Fukuda, 1991; Fukuda, 1994). Les galectines constituent une famille de protéines solubles, sécrétées selon un mécanisme non classique, qui se lie spécifiquement à ces motifs saccharidiques (Hughes, 2001). Les kératinocytes épidermiques expriment les galectines 1, 3 et 7 (Wollenberg et al., 1993; Konstantinov et al., 1994; Akimoto et al., 1995; Magnaldo et al., 1998 ; résultats non publiés obtenus

dans notre laboratoire) et sécrètent la galectine 3 (Wollenberg et al., 1993, résultats non publiés obtenus dans notre laboratoire). Lorsque Lamp-1 et Lamp-2 apparaissent au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes suite à une entrée d'ions calcium, il est dès lors possible qu'ils interagissent avec des galectines sécrétées, comme par exemple la galectine 3. Dans certaines cellules tumorales qui ciblent Lamp-1 et Lamp-2 de manière constitutive au niveau de la membrane plasmique, une telle interaction module l'adhérence de ces cellules (Sarafian et al., 1998). L'interaction éventuelle entre Lamp-1 ou Lamp-2 et la galectine 3 pourrait également influencer les propriétés adhésives des kératinocytes. Des recherches plus ciblées seront nécessaires pour élucider ce rôle éventuel de Lamp-1 et de Lamp-2 au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes.

1.4 Le calcium et l'exocytose des corps lamellaires : absence de corrélation avec l'exocytose des lysosomes

Au niveau de la couche granuleuse, les kératinocytes contiennent des corps lamellaires, qui sont des vésicules contenant un mélange de lamelles lipidiques et d'enzymes lysosomales (Freinkel & Traczyk, 1985; Menon et al., 1992b). Les corps lamellaires subissent une exocytose au niveau de la transition entre la couche granuleuse et la couche cornée. Cette exocytose serait induite par une diminution de la concentration cellulaire en ions calcium au niveau des kératinocytes de la couche granuleuse (Menon et al., 1994; Elias et al., 1998). Récemment, il a été montré qu'une entrée de calcium induite par l'ionomycine, engendre une diminution de l'exocytose des corps lamellaires dans les kératinocytes de la couche granuleuse (Denda et al., 2003). Nos résultats suggèrent qu'une telle entrée d'ions calcium dans les kératinocytes en culture entraîne l'exocytose de lysosomes. L'exocytose de ces organites semble dès lors être régulée par la concentration

intracellulaire en calcium, mais de manière opposée aux corps lamellaires. Bien qu'il existe une certaine analogie entre le contenu enzymatique des corps lamellaires et des lysosomes (Freinkel & Traczyk, 1985; Menon et al., 1992b), le contrôle de l'exocytose de ces organites n'est probablement pas le même dans les kératinocytes. Signalons que le modèle de culture utilisé dans notre étude ne comprend pas des kératinocytes possédant des corps lamellaires. Dès lors, l'étude éventuelle des mécanismes impliqués dans l'exocytose de ces vésicules doit impérativement être réalisée dans un autre modèle de culture permettant une différenciation plus poussée.

1.5 L'exocytose de lysosomes et la réparation de la membrane plasmique

Dans les kératinocytes épidermiques, l'exocytose de lysosomes pourrait également être une réponse à une lésion de la membrane plasmique. En effet, une rupture de l'intégrité de la membrane plasmique de plusieurs types cellulaires semble systématiquement induire une entrée d'ions calcium, qui provoque la fusion de lysosomes périphériques avec cette membrane afin de restaurer son intégrité (Miyake & McNeil, 1995; Togo et al., 1999; Reddy et al., 2001; Jaiswal et al., 2002). Ce phénomène peut être d'une importance primordiale pour les kératinocytes, puisqu'au niveau de l'épiderme, les cellules sont fréquemment soumises à des stress mécaniques. En effet, chez le rat en mouvement, les cellules cutanées subissent constamment des ruptures de la membrane plasmique, en particulier les kératinocytes de la couche basale qui garantissent l'ancrage du tissu épidermique avec le derme par l'attachement à la lame basale (McNeil & Ito, 1990).

La synaptotagmine VII est une protéine de la membrane lysosomale possédant deux domaines de liaison aux ions calcium (Ullrich & Sudhof, 1995). Dans des cellules épithéliales, cette protéine régule l'exocytose de

lysosomes suite à une entrée d'ions calcium (Martinez et al., 2000). Nous ne disposons pas d'informations concernant l'expression de la synaptotagmine VII par les kératinocytes épidermiques, mais cette protéine est vraisemblablement impliquée dans l'exocytose de lysosomes suite à une entrée d'ions calcium également dans ce type cellulaire particulier. Signalons que des souris déficientes en synaptotagmine VII souffrent d'une myopathie autoimmune, similaire à la dermatomyosite humaine (Chakrabarti et al., 2003). Cette maladie est caractérisée par une inflammation autoimmune des fibres musculaires, mais aussi par une inflammation et une fibrose cutanée (pour une revue, voir Mastaglia et al., 2003). Ces symptômes se situent au niveau de cellules qui sont soumises à des forces mécaniques importantes, induisant des fréquentes ruptures de la membrane plasmique (McNeil & Ito, 1990). Chakrabarti et al. (2003) ont suggéré que le déficit en synaptotagmine VII affecte le processus de réparation de la membrane plasmique en perturbant l'exocytose de lysosomes. Ces informations témoignent en faveur de l'importance physiologique de l'exocytose de lysosomes suite à une entrée d'ions calcium dans les kératinocytes épidermiques. Afin de mieux comprendre ce mécanisme et sa portée physiologique, il serait intéressant de disséquer la machinerie intracellulaire qui est recrutée lors d'une entrée de calcium dans les kératinocytes. Une première approche pour étudier cette question pourrait concerner le rôle de la synaptotagmine VII au cours de l'exocytose de lysosomes dans les kératinocytes. Des résultats récents suggèrent l'association des protéines adaptatrices SNAP-23 et syntaxine 4, situées au niveau de la membrane plasmique, et VAMP-7, située au niveau de la membrane lysosomale, à la synaptotagmine VII au cours de l'exocytose de lysosomes (Rao et al., 2004). Ces protéines pourraient également intervenir au cours de l'exocytose de lysosomes dans les kératinocytes.

1.6 Implication possible du cholestérol dans l'exocytose de lysosomes

Dans plusieurs types cellulaires, le cholestérol est impliqué dans des phénomènes d'exocytose. En effet, une déplétion en cholestérol membranaire perturbe l'exocytose de vésicules spécialisées induite par un stimulus approprié, par exemple dans les cellules pancréatiques (Schmidt et al., 2001), les cellules nerveuses PC12 (Lang et al., 2001) ou les basophiles RBL-2H3 (Kato et al., 2003). Comme nous montrons que dans les kératinocytes, l'exocytose de lysosomes est induite par une entrée de calcium, il est possible que ce phénomène exocytotique soit affecté par une déplétion en cholestérol. Dans les cellules neuronales PC12, l'exocytose de vésicules sécrétoires implique une machinerie protéique relativement bien caractérisée, qui se trouve au niveau de la face interne de la membrane plasmique (Lang et al., 2001). Selon ces auteurs, une déplétion en cholestérol perturbe la structure de cette machinerie, engendrant ainsi une réduction de l'exocytose des vésicules sécrétoires normalement induite par une entrée d'ions calcium dans ces cellules. Il serait intéressant d'analyser si la machinerie qui régule l'exocytose de lysosomes dans les kératinocytes partage des propriétés comme la sensibilité à une déplétion en cholestérol avec la machinerie permettant l'exocytose des vésicules sécrétoires des cellules PC12.

2 *Le cholestérol et la physiologie des kératinocytes*

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons étudié les implications éventuelles du cholestérol dans la physiologie des kératinocytes épidermiques en analysant l'effet d'une déplétion en cholestérol (induite par un traitement avec la méthyl- β -cyclodextrine) sur le phénotype cellulaire. En

résumé (fig. C-2), nos résultats indiquent qu'une déplétion en cholestérol active des cascades de signalisation dans les kératinocytes en induisant la phosphorylation du récepteur de l'EGF, de HER2 (mais pas de HER3) et des MAP kinases ERK et p38. L'activation des MAP kinases p38 dans les kératinocytes semble être responsable d'une augmentation de l'expression de l'involucrine induite par une déplétion prolongée en cholestérol. Ce traitement provoque également une diminution de l'expression de la kératine 14 et de la kératine 10, mais les cascades de transduction éventuellement impliquées dans cette réponse restent à être déterminées.

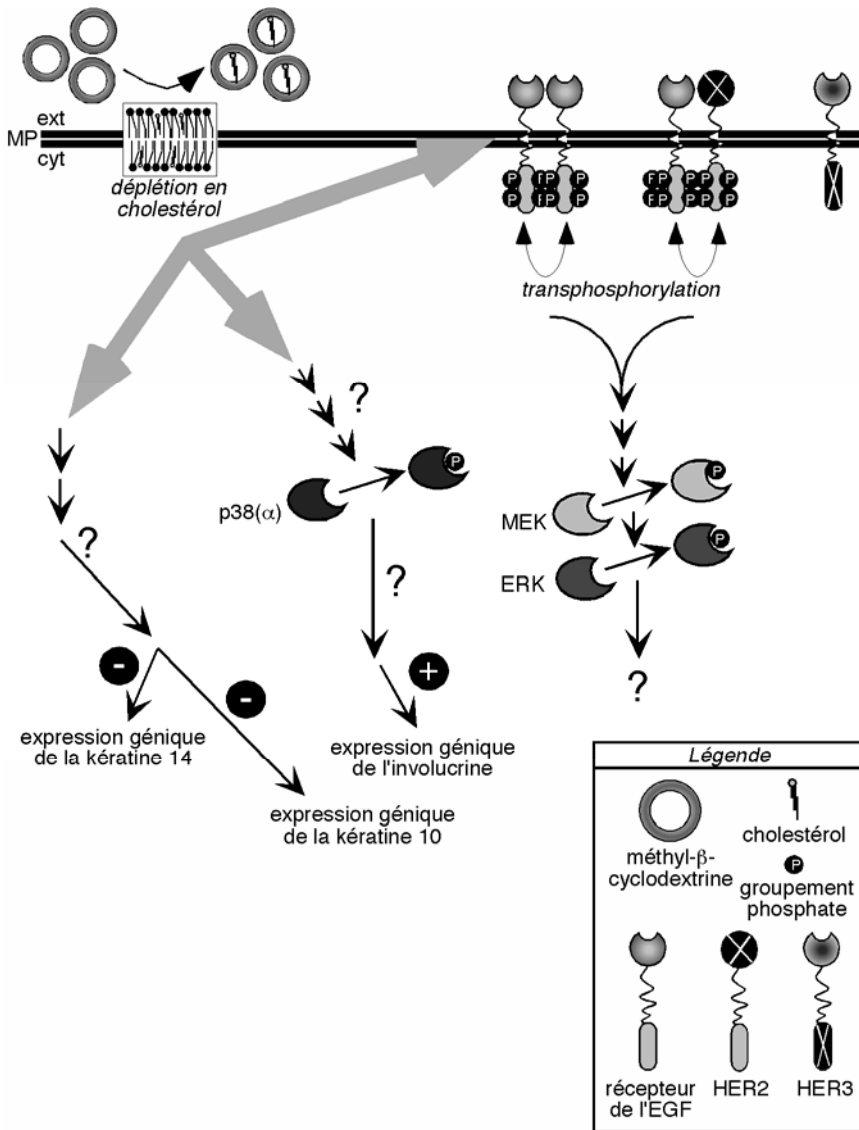


Fig. C-2 : Représentation schématique des effets d'une déplétion en cholestérol sur l'activation des récepteurs HER et des MAP kinases ERK et p38 dans les kératinocytes ainsi que sur l'expression de marqueurs de différenciation (MP=membrane plasmique, ext=espace extracellulaire, cyt=cytoplasme).

2.1 Effets éventuels de l'activation du récepteur de l'EGF induite par une déplétion en cholestérol

Nos résultats indiquent qu'une déplétion en cholestérol induit l'activation du récepteur de l'EGF, qui est elle-même responsable de l'activation de HER2 et ERK (fig. C-2). Les rôles des cascades de signalisation activées par l'intermédiaire du récepteur de l'EGF lors d'une déplétion en cholestérol sur le phénotype des kératinocytes restent à être déterminés. Les MAP kinases ERK peuvent favoriser la survie des kératinocytes suite à une irradiation aux rayons UVB (Jost et al., 1999; Peus et al., 2000). Cette activation pourrait éventuellement jouer un rôle analogue lors d'une déplétion en cholestérol.

Dans les kératinocytes, l'activation du récepteur de l'EGF par un traitement avec l'EGF induit l'expression de la hydroxyméthylglutaryl(HMG)-coenzyme A(CoA) synthase et de la HMG-CoA réductase (Harris et al., 2000), qui sont des enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol (Goldstein & Brown, 1990). L'activation du récepteur de l'EGF par une déplétion en cholestérol est bien sûr susceptible d'affecter l'expression de ces gènes. Grâce à cette fonction, l'activation du récepteur de l'EGF pourrait éventuellement constituer un signal sensible au taux de cholestérol membranaire pouvant induire la synthèse de cholestérol dans le cas d'une diminution de ce taux.

2.2 L'activation de p38 suite à une déplétion en cholestérol et les protéines éventuellement associées à cette réponse

Afin de disséquer la cascade de transduction du signal qui aboutit à l'induction de l'expression de l'involucrine suite à une déplétion en cholestérol, nous avons utilisé une approche pharmacologique pour démontrer l'implication de p38 dans cette cascade. Il serait intéressant

d'utiliser une approche complémentaire pour apporter des arguments supplémentaires en faveur de cette implication de p38. Par exemple, parallèlement à une déplétion de kératinocytes en cholestérol, la transfection des cellules avec un plasmide d'expression contenant une protéine p38 dominante négative pourrait servir à étudier le rôle direct de p38 dans l'induction de l'expression de l'involucrine.

Nous ne disposons guère d'informations quant au mécanisme éventuel qui induit la phosphorylation de p38 lors d'un traitement par la M β CD. Dans les kératinocytes, p38 peut être phosphorylée par des GTPases de la famille Rho (Cheng et al., 2002), mais aussi par plusieurs protéines kinases de la famille des MAPK kinases comme MEK6 (Dashti et al., 2001a), MEK7 (Dashti et al., 2001b) ou MEK3 (Balasubramanian et al., 2002; Efimova et al., 2002). Dans les fibroblastes, une extraction de cholestérol de la membrane plasmique médiée par une apolipoprotéine active des GTPases Rho et p38 par l'intermédiaire des GTPases Rho (Nofer et al., 2003). Dans les kératinocytes, nos résultats montrent qu'un traitement par la M β CD extrait du cholestérol de la membrane plasmique. Ce traitement pourrait dès lors activer des GTPases Rho et induire la phosphorylation de p38 par l'intermédiaire de ces GTPases.

Nous avons recherché si une déplétion en cholestérol des kératinocytes active une ou plusieurs isoforme(s) de p38 de manière spécifique, et nos résultats suggèrent que p38 α semble être impliquée dans l'induction de l'expression de l'involucrine par ce traitement. Notons que l'expression de l'involucrine est induite par l'intermédiaire de p38 δ lorsque les kératinocytes sont incubés en présence de TPA (Efimova et al., 2002), de polyphénols du thé vert (Balasubramanian et al., 2002) ou d'acide okadaïque (Efimova et al., 2002; Efimova et al., 2003). L'ensemble de ces observations parle en faveur

de l'hypothèse avancée par Dashti et al. (2001), selon laquelle l'expression de l'involucrine dans les kératinocytes est essentiellement régulée par p38 α ou p38 δ .

Le mécanisme par lequel le TPA peut induire l'expression de l'involucrine est très bien caractérisé. Ce mécanisme fait intervenir la protéine kinase C (PKC) (Efimova et al., 1998), dont les isoformes particulières impliquées dans ce mécanisme (PKC δ , PKC ϵ et PKC η) ont été identifiées plus tard (Efimova & Eckert, 2000). Comme les mécanismes par lesquels le TPA régule l'expression de l'involucrine sont relativement bien connus, il serait intéressant de comparer ces mécanismes avec les mécanismes régulateurs de l'involucrine mis en cause par une déplétion en cholestérol. Il pourrait s'avérer très intéressant d'investiguer les isoformes de PKC éventuellement activées lors d'une déplétion en cholestérol.

2.3 Implication éventuelle du cholestérol au cours de la différenciation épidermique

Au niveau épidermique, la présence de cholestérol est nécessaire pour la formation des enveloppes cornées (Schmidt et al., 1991). Ce lipide est un constituant important de la barrière lipidique (Menon et al., 1992a). Le cholestérol est donc clairement impliqué dans les étapes terminales de la différenciation des kératinocytes épidermiques, mais les mécanismes de son implication restent à être identifiés. Nos résultats montrent qu'une déplétion en cholestérol altère l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans la différenciation des kératinocytes. Ce traitement réprime en effet l'expression de la kératine 14 et de la kératine 10 et induit l'expression de l'involucrine, ce qui sont des changements de l'expression génique des kératinocytes qui accompagnent la transition des cellules de la couche épineuse vers la couche granuleuse dans l'épiderme (Dlugosz & Yuspa,

1993). Une perte du cholestérol membranaire à ce niveau pourrait dès lors favoriser la différenciation des kératinocytes épineux en kératinocytes granuleux.

2.4 Implication éventuelle du cholestérol dans le psoriasis, pathologie épidermique

Le psoriasis est une pathologie épidermique manifestée par une altération de l'expression de marqueurs de différenciation dans les zones de peau affectées : un anticorps spécifique de la kératine 14 ne marque qu'une faible proportion des kératinocytes de la couche basale (Parent et al., 1994). L'épiderme psoriatique exhibe une expression diminuée de la kératine 10 dans les couches suprabasales (van Erp et al., 1989; Bernerd et al., 1992). L'involucrine par contre est exprimée de manière précoce et est présente dans toutes les couches suprabasales (Bernard et al., 1985; Bernard et al., 1986; Dover & Watt, 1987; Watanabe et al., 1991). Ces altérations de l'expression de la kératine 14, de la kératine 10 et de l'involucrine dans l'épiderme psoriatique ressemblent aux altérations de l'expression de ces gènes induites par une déplétion en cholestérol dans les kératinocytes en culture. Le phénotype des kératinocytes psoriatiques pourrait donc ressembler au phénotype de kératinocytes ayant subi une déplétion en cholestérol, ce qui pourrait suggérer une relation entre le phénotype psoriatique et le taux en cholestérol des kératinocytes. Signalons d'ailleurs à ce sujet que le psoriasis pourrait être plus fréquent chez des patients dont le profil lipidique du sérum sanguin présente des anomalies (Rocha-Pereira et al., 2001; Piskin et al., 2003; Reynoso-von Drateln et al., 2003).

Nos résultats montrent pour la première fois qu'un traitement par la M β CD induit l'activation de p38 dans les kératinocytes, mais plusieurs auteurs ont déjà suggéré une implication de p38 dans la pathogénèse du psoriasis. Par

exemple, l'expression de la protéine élafine est augmentée dans les kératinocytes psoriatiques (Kuijpers et al., 1997) par l'intermédiaire d'une activation de p38 (Pfundt et al., 2000; Pol et al., 2003). Les kératinocytes psoriatiques exhibent également une phosphorylation accrue de certaines kératines qui est dépendante de p38 (Toivola et al., 2002). Par conséquent, des inhibiteurs de l'activité protéine kinase de p38 sont déjà en phase d'étude clinique pour le traitement du psoriasis (Lee et al., 2000). Une autre observation intéressante révèle que l'expression d'une isoforme de l'EGF se liant à l'héparine, *heparin-binding EGF* (HB-EGF), est augmentée dans l'épiderme psoriatique (Stoll & Elder, 1998). Or, nos résultats préliminaires montrent qu'un traitement par la M β CD induit une augmentation de l'expression de HB-EGF qui est provoquée par l'intermédiaire de p38 (résultats non publiés) et qui pourrait aussi contribuer à l'altération du phénotype cellulaire dans ces conditions.

Dans ce travail, nous avons utilisé un modèle de culture immergée des kératinocytes pour étudier l'implication du cholestérol dans la physiologie de ce type cellulaire. Ce modèle a été choisi parce qu'il est bien caractérisé et peu complexe par rapport à l'épiderme. Or, afin d'étudier davantage l'implication du cholestérol au cours de la différenciation épidermique normale, mais aussi dans la pathogenèse du psoriasis, il s'impose d'analyser le rôle du cholestérol dans des conditions plus proches de l'épiderme *in vivo*. Dans ce but, il serait intéressant d'étudier les effets d'une déplétion en cholestérol sur la physiologie des kératinocytes au sein d'épidermes reconstitués *in vitro*, technique maîtrisée dans notre laboratoire (Dupont et al., publication soumise à *Arch Dermatol Res*). A plus long terme, on pourrait songer à analyser les effets d'une déplétion en cholestérol sur le phénotype des kératinocytes au sein d'échantillons de peau normale maintenus en culture. Puisque le phénotype de kératinocytes ayant subi une

déplétion en cholestérol semble se rapprocher d'un phénotype psoriasique (cf. ci-dessus), il serait très intéressant d'analyser les effets d'un apport de cholestérol, médié par exemple par une incubation en présence de M β CD complexée au cholestérol, sur le phénotype des kératinocytes au sein d'échantillons de peau psoriasique.

Publications

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes :

Articles publiés dans des journaux scientifiques avec comité de lecture:

Calcium entry into keratinocytes induces exocytosis of lysosomes.

Ralph Jans, Marc Sartor, Michel Jadot et Yves Poumay

Arch Dermatol Res 2004 (article accepté pour publication)

Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38.

Ralph Jans, Ganka Atanasova, Michel Jadot et Yves Poumay

J Invest Dermatol 2004 (article accepté pour publication)

Présentations sous forme de poster:

Biosynthesis and secretion of cathepsin D in proliferating and differentiating normal human epidermal keratinocytes. Jans, R., Jadot, M., and Poumay, Y. *Arch Physiol Biochem* 110 (2002), abstract B20

Biosynthesis of cathepsin D in human epidermal keratinocytes. Jans, R., Jadot, M. Marcoux, S., Hérin, M., and Poumay, Y. *J Invest Dermatol* 119 (2002), abstract 297

Calcium entry into keratinocytes induces cell surface expression of lysosomal membrane proteins.

Jans, R., Jadot, M., and Poumay, Y. *J Invest Dermatol* 121 (2003), abstract 515

Cholesterol depletion activates p38, EGFR and ERK in epidermal keratinocytes and alters differentiation gene expression partially through activation of p38. Jans, R., Atanasova, G., Jadot, M., and Poumay, Y. Accepted for publication in *Arch Physiol Biochem*

Cholesterol depletion alters involucrin gene expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. Jans, R., Atanasova, G., Jadot, M., and Poumay, Y. Accepted for poster presentation at the *Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology*, Providence, RI (May 2004)

Bibliographie

- Akimoto, Y., J. Hirabayashi, K. Kasai, and H. Hirano. 1995. Expression of the endogenous 14-kDa beta-galactoside-binding lectin galectin in normal human skin. *Cell Tissue Res.* 280:1-10.
- Albers, K., and E. Fuchs. 1992. The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int Rev Cytol.* 134:243-79.
- Allain, C.C., L.S. Poon, C.S. Chan, W. Richmond, and P.C. Fu. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 20:470-5.
- Amos, B., and R. Lotan. 1990. Modulation of lysosomal-associated membrane glycoproteins during retinoic acid-induced embryonal carcinoma cell differentiation. *J Biol Chem.* 265:19192-8.
- Andrejewski, N., E.L. Punnonen, G. Guhde, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, K. von Figura, and P. Saftig. 1999. Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J Biol Chem.* 274:12692-701.
- Andrews, N.W. 2000. Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol.* 10:316-21.
- Andrews, N.W. 2002. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *J Cell Biol.* 158:389-94.
- Assefa, Z., M. Garmyn, R. Bouillon, W. Merlevede, J.R. Vandenheede, and P. Agostinis. 1997. Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 108:886-91.
- Bahro, M., U. Pfeifer, and J. Dammrich. 1992. Involvement of autophagic degradation in ACTH-induced skeletal muscle atrophy. *Clin Neuropathol.* 11:64-70.
- Balasubramanian, S., T. Efimova, and R.L. Eckert. 2002. Green tea polyphenol stimulates a Ras, MEK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes. *J Biol Chem.* 277:1828-36.
- Bao, M., J.L. Booth, B.J. Elmendorf, and W.M. Canfield. 1996. Bovine UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal-enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. I. Purification and subunit structure. *J Biol Chem.* 271:31437-45.
- Barrett, A.J. 1977. Human cathepsin D. *Adv Exp Med Biol.* 95:291-300.
- Baudoux, B., D. Castanares-Zapatero, M. Leclercq-Smekens, N. Berna, and Y. Poumay. 2000. The tetraspanin CD9 associates with the integrin alpha6beta4 in cultured human epidermal keratinocytes and is involved in cell motility. *Eur J Cell Biol.* 79:41-51.
- Benavides, F., M.F. Starost, M. Flores, I.B. Gimenez-Conti, J.L. Guenet, and C.J. Conti. 2002. Impaired hair follicle morphogenesis and cycling with abnormal epidermal differentiation in naked mice, a cathepsin L-deficient mutation. *Am J Pathol.* 161:693-703.
- Bernard, B.A., A. Reano, Y.M. Darmon, and J. Thivolet. 1986. Precocious appearance of involucrin and epidermal transglutaminase during differentiation of psoriatic skin. *Br J Dermatol.* 114:279-83.
- Bernard, B.A., S.M. Robinson, S. Vandaele, J.N. Mansbridge, and M. Darmon. 1985. Abnormal maturation pathway of keratinocytes in psoriatic skin. *Br J Dermatol.* 112:647-53.
- Berner, F., T. Magnaldo, and M. Darmon. 1992. Delayed onset of epidermal differentiation in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 98:902-10.
- Bikle, D.D., D. Ng, Y. Oda, K. Hanley, K. Feingold, and Z. Xie. 2002. The vitamin D response element of the involucrin gene mediates its regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Invest Dermatol.* 119:1109-13.

- Bikle, D.D., D. Ng, C.L. Tu, Y. Oda, and Z. Xie. 2001. Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 177:161-71.
- Bonifacino, J.S. 2004. The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:23-32.
- Boulton, T.G., S.H. Nye, D.J. Robbins, N.Y. Ip, E. Radziejewska, S.D. Morgenbesser, R.A. DePinho, N. Panayotatos, M.H. Cobb, and G.D. Yancopoulos. 1991. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* 65:663-75.
- Boyce, S.T., and R.G. Ham. 1983. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol.* 81:33s-40s.
- Bregegere, F., Y. Soroka, J. Bismuth, B. Friguet, and Y. Milner. 2003. Cellular senescence in human keratinocytes: unchanged proteolytic capacity and increased protein load. *Exp Gerontol.* 38:619-29.
- Brice, S.L., D.A. Norris, W.L. Weston, D.G. Tedder, M.B. Lyons, F. Furukawa, and J.C. Huff. 1988. Development of an in vitro keratinocyte model for use in the study of HSV specific cytotoxicity. *J Invest Dermatol.* 90:629-33.
- Burge, V., F. Mainferme, and R. Wattiaux. 1991. Transient membrane association of the precursors of cathepsin C during their transfer into lysosomes. *Biochem J.* 275 (Pt 3):797-800.
- Burgeson, R.E., and A.M. Christiano. 1997. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol.* 9:651-8.
- Burgess, A.W., H.S. Cho, C. Eigenbrot, K.M. Ferguson, T.P. Garrett, D.J. Leahy, M.A. Lemmon, M.X. Sliwkowski, C.W. Ward, and S. Yokoyama. 2003. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 12:541-52.
- Cabado, A.G., A. Alfonso, M.R. Veytes, M. Gonzalez, M.A. Botana, and L.M. Botana. 2000. Crosstalk between cytosolic pH and intracellular calcium in human lymphocytes: effect of 4-aminopyridin, ammonium chloride and ionomycin. *Cell Signal.* 12:573-81.
- Cailleau, R., R. Young, M. Olive, and W.J. Reeves, Jr. 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 53:661-74.
- Capony, F., T. Braulke, C. Rougeot, S. Roux, P. Montcourrier, and H. Rochefort. 1994. Specific mannose-6-phosphate receptor-independent sorting of pro-cathepsin D in breast cancer cells. *Exp Cell Res.* 215:154-63.
- Capony, F., M. Morisset, A.J. Barrett, J.P. Capony, P. Broquet, F. Vignon, M. Chambon, P. Louisot, and H. Rochefort. 1987. Phosphorylation, glycosylation, and proteolytic activity of the 52-kD estrogen-induced protein secreted by MCF7 cells. *J Cell Biol.* 104:253-62.
- Capony, F., C. Rougeot, P. Montcourrier, V. Cavaillès, G. Salazar, and H. Rochefort. 1989. Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res.* 49:3904-9.
- Carlsson, S.R., J. Roth, F. Piller, and M. Fukuda. 1988. Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying poly-lactosaminoglycan. *J Biol Chem.* 263:18911-9.
- Carpenter, G. 1999. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol.* 146:697-702.
- Chakrabarti, S., K.S. Kobayashi, R.A. Flavell, C.B. Marks, K. Miyake, D.R. Liston, K.T. Fowler, F.S. Gorelick, and N.W. Andrews. 2003. Impaired membrane resealing and autoimmune myositis in synaptotagmin VII-deficient mice. *J Cell Biol.* 162:543-9.
- Chang, F., L.S. Steelman, J.T. Lee, J.G. Shelton, P.M. Navolanic, W.L. Blalock, R.A. Franklin, and J.A. McCubrey. 2003. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from

-
- cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*. 17:1263-93.
- Chang, F., P.W. Wertz, and C.A. Squier. 1991. Comparison of glycosidase activities in epidermis, palatal epithelium and buccal epithelium. *Comp Biochem Physiol B*. 100:137-9.
- Chen, J.W., T.L. Murphy, M.C. Willingham, I. Pastan, and J.T. August. 1985. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J Cell Biol*. 101:85-95.
- Chen, W., Q. Tang, M.S. Gonzales, and G.T. Bowden. 2001. Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*. 20:3921-6.
- Chen, X., and M.D. Resh. 2001. Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization. *J Biol Chem*. 276:34617-23.
- Chen, X., and M.D. Resh. 2002. Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. 277:49631-7.
- Cheng, H., J. Kartenbeck, K. Kabsch, X. Mao, M. Marques, and A. Alonso. 2002. Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol. *J Cell Physiol*. 192:234-43.
- Compton, C.C., J.M. Gill, D.A. Bradford, S. Regauer, G.G. Gallico, and N.E. O'Connor. 1989. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. *Lab Invest*. 60:600-12.
- Conner, G.E., and G. Richo. 1992. Isolation and characterization of a stable activation intermediate of the lysosomal aspartyl protease cathepsin D. *Biochemistry*. 31:1142-7.
- Cook, P.W., P.A. Mattox, W.W. Keeble, M.R. Pittelkow, G.D. Plowman, M. Shoyab, J.P. Adelman, and G.D. Shipley. 1991a. A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol*. 11:2547-57.
- Cook, P.W., M.R. Pittelkow, and G.D. Shipley. 1991b. Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors. *J Cell Physiol*. 146:277-89.
- Cooper, M.K., C.A. Wassif, P.A. Krakowiak, J. Taipale, R. Gong, R.I. Kelley, F.D. Porter, and P.A. Beachy. 2003. A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet*. 33:508-13.
- Coulombe, P.A., and E. Fuchs. 1990. Elucidating the early stages of keratin filament assembly. *J Cell Biol*. 111:153-69.
- Crish, J.F., F. Bone, E.B. Banks, and R.L. Eckert. 2002. The human involucrin gene contains spatially distinct regulatory elements that regulate expression during early versus late epidermal differentiation. *Oncogene*. 21:738-47.
- Crish, J.F., T.M. Zaim, and R.L. Eckert. 1998. The distal regulatory region of the human involucrin promoter is required for expression in epidermis. *J Biol Chem*. 273:30460-5.
- Crouch, S.P., R. Kozlowski, K.J. Slater, and J. Fletcher. 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 160:81-8.
- Cuervo, A.M. 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in Cell Biology*. 14:70-7.
- Cuervo, A.M., and J.F. Dice. 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*. 273:501-3.
- Cuervo, A.M., and J.F. Dice. 1998. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med*. 76:6-12.
- Dahms, N.M., and M.K. Hancock. 2002. P-type lectins. *Biochim Biophys Acta*. 1572:317-40.

- Dashti, S.R., T. Efimova, and R.L. Eckert. 2001a. MEK6 regulates human involucrin gene expression via a p38alpha- and p38delta- dependent mechanism. *J Biol Chem.* 276:27214-20.
- Dashti, S.R., T. Efimova, and R.L. Eckert. 2001b. MEK7-dependent activation of p38 MAP kinase in keratinocytes. *J Biol Chem.* 276:8059-63.
- De Potter, I.Y., Y. Poumay, K.A. Squillace, and M.R. Pittelkow. 2001. Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation. *Exp Cell Res.* 271:315-28.
- del Pozo, M.A., N.B. Alderson, W.B. Kiosses, H.H. Chiang, R.G. Anderson, and M.A. Schwartz. 2004. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science.* 303:839-42.
- Delbruck, R., C. Desel, K. von Figura, and A. Hille-Rehfeld. 1994. Proteolytic processing of cathepsin D in prelysosomal organelles. *Eur J Cell Biol.* 64:7-14.
- Dell'Angelica, E.C., and G.S. Payne. 2001. Intracellular cycling of lysosomal enzyme receptors: cytoplasmic tails' tales. *Cell.* 106:395-8.
- Denda, M., S. Fuziwara, and K. Inoue. 2003. Influx of calcium and chloride ions into epidermal keratinocytes regulates exocytosis of epidermal lamellar bodies and skin permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol.* 121:362-7.
- DiGiovanna, J.J., and L. Robinson-Bostom. 2003. Ichthyosis: etiology, diagnosis, and management. *Am J Clin Dermatol.* 4:81-95.
- Diment, S., M.S. Leech, and P.D. Stahl. 1988. Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J Biol Chem.* 263:6901-7.
- Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9363-7.
- Dlugosz, A.A., and S.H. Yuspa. 1993. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 120:217-25.
- Dougall, W.C., X. Qian, N.C. Peterson, M.J. Miller, A. Samanta, and M.I. Greene. 1994. The neuro-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. *Oncogene.* 9:2109-23.
- Dover, R., and F.M. Watt. 1987. Measurement of the rate of epidermal terminal differentiation: expression of involucrin by S-phase keratinocytes in culture and in psoriatic plaques. *J Invest Dermatol.* 89:349-52.
- Eckert, R.L. 1989. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev.* 69:1316-46.
- Eckert, R.L., J.F. Crish, and N.A. Robinson. 1997. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev.* 77:397-424.
- Eckert, R.L., T. Efimova, S. Balasubramanian, J.F. Crish, F. Bone, and S. Dashti. 2003. p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface--a function for p38 delta. *J Invest Dermatol.* 120:823-8.
- Eckert, R.L., T. Efimova, S.R. Dashti, S. Balasubramanian, A. Deucher, J.F. Crish, M. Sturniolo, and F. Bone. 2002. Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen-activated protein kinase. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 7:36-40.
- Eckert, R.L., and H. Green. 1986. Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell.* 46:583-9.
- Efimova, T., A.M. Broome, and R.L. Eckert. 2003. A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J Biol Chem.* 278:34277-85.
- Efimova, T., A. Deucher, T. Kuroki, M. Ohba, and R.L. Eckert. 2002. Novel protein kinase C isoforms regulate human keratinocyte differentiation by activating a p38 delta mitogen-activated protein

-
- kinase cascade that targets CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem.* 277:31753-60.
- Efimova, T., and R.L. Eckert. 2000. Regulation of human involucrin promoter activity by novel protein kinase C isoforms. *J Biol Chem.* 275:1601-7.
- Efimova, T., P. LaCelle, J.F. Welter, and R.L. Eckert. 1998. Regulation of human involucrin promoter activity by a protein kinase C, Ras, MEKK1, MEK3, p38/RK, AP1 signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 273:24387-95.
- Elias, P.M., S.K. Ahn, M. Denda, B.E. Brown, D. Crumrine, L.K. Kimutai, L. Komuves, S.H. Lee, and K.R. Feingold. 2002. Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *J Invest Dermatol.* 119:1128-36.
- Elias, P.M., P. Nau, K. Hanley, C. Cullander, D. Crumrine, G. Bench, E. Sideras-Haddad, T. Mauro, M.L. Williams, and K.R. Feingold. 1998. Formation of the epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. *J Invest Dermatol.* 110:399-404.
- Erickson, A.H. 1989. Biosynthesis of lysosomal endopeptidases. *J Cell Biochem.* 40:31-41.
- Erickson, A.H., G.E. Conner, and G. Blobel. 1981. Biosynthesis of a lysosomal enzyme. Partial structure of two transient and functionally distinct NH₂-terminal sequences in cathepsin D. *J Biol Chem.* 256:11224-31.
- Eskelinen, E.L., A.L. Illert, Y. Tanaka, G. Schwarzmann, J. Blanz, K. Von Figura, and P. Saftig. 2002. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell.* 13:3355-68.
- Eskelinen, E.L., Y. Tanaka, and P. Saftig. 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13:137-45.
- Febbraio, M., and R.L. Silverstein. 1990. Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *J Biol Chem.* 265:18531-7.
- Fielding, C.J., and P.E. Fielding. 2003. Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochim Biophys Acta.* 1610:219-28.
- Focroul, C. 2003. Etude du contrôle de la différenciation épidermique dans des kératinocytes cultivés en suspension: rôle du récepteur de l'EGF et des récepteurs de sa famille. In Département Histologie-Embryologie. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.
- Freinkel, R.K., and T.N. Traczyk. 1985. Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J Invest Dermatol.* 85:295-8.
- Fry, D.W., A.J. Kraker, A. McMichael, L.A. Ambroso, J.M. Nelson, W.R. Leopold, R.W. Connors, and A.J. Bridges. 1994. A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science.* 265:1093-5.
- Fuchs, E. 1990. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol.* 111:2807-14.
- Fukuda, M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem.* 266:21327-30.
- Fukuda, M. 1994. Biogenesis of the lysosomal membrane. *Subcell Biochem.* 22:199-230.
- Furuchi, T., and R.G. Anderson. 1998. Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK). *J Biol Chem.* 273:21099-104.
- Gagnoux-Palacios, L., M. Dans, W. van't Hof, A. Mariotti, A. Pepe, G. Meneguzzi, M.D. Resh, and F.G. Giancotti. 2003. Compartmentalization of integrin $\alpha 6 \beta 4$ signaling in lipid rafts. *J Cell Biol.* 162:1189-1196.
- Gardella, S., C. Andrei, L.V. Lotti, A. Poggi, M.R. Torrisi, M.R. Zocchi, and A. Rubartelli. 2001. CD8(+) T lymphocytes induce polarized exocytosis of secretory lysosomes by dendritic cells with release of interleukin-1 β and cathepsin D. *Blood.* 98:2152-9.

- Garmyn, M., T. Mammone, A. Pupe, D. Gan, L. Declercq, and D. Maes. 2001. Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27. *J Invest Dermatol.* 117:1290-5.
- Gibbs, S., E. Boelsma, J. Kempenaar, and M. Ponc. 1998. Temperature-sensitive regulation of epidermal morphogenesis and the expression of cornified envelope precursors by EGF and TGF alpha. *Cell Tissue Res.* 292:107-14.
- Gibbs, S., A.N. Silva Pinto, S. Murli, M. Huber, D. Hohl, and M. Ponc. 2000. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair Regen.* 8:192-203.
- Gieselmann, V., R. Pohlmann, A. Hasilik, and K. Von Figura. 1983. Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol.* 97:1-5.
- Gil-Parrado, S., A. Fernandez-Montalvan, I. Assfalg-Machleidt, O. Popp, F. Bestvater, A. Holloschi, T.A. Knoch, E.A. Auerswald, K. Welsh, J.C. Reed, H. Fritz, P. Fuentes-Prior, E. Spiess, G.S. Salvesen, and W. Machleidt. 2002. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem.* 277:27217-26.
- Gniadecki, R., and B. Bang. 2003. Flotillas of lipid rafts in transit amplifying cell-like keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 121:522-8.
- Gniadecki, R., N. Christoffersen, and H.C. Wulf. 2002. Cholesterol-rich plasma membrane domains (lipid rafts) in keratinocytes: importance in the baseline and UVA-induced generation of reactive oxygen species. *J Invest Dermatol.* 118:582-8.
- Goldsmith, L.A. 1991. *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin.* Oxford University Press.
- Goldstein, J.L., and M.S. Brown. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343:425-30.
- Gonzalez-Noriega, A., J.H. Grubb, V. Talkad, and W.S. Sly. 1980. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J Cell Biol.* 85:839-52.
- Grant, R.L., and D. Acosta. 1996. Interactions of intracellular pH and intracellular calcium in primary cultures of rabbit corneal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 32:38-45.
- Graus-Porta, D., R.R. Beerli, J.M. Daly, and N.E. Hynes. 1997. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J.* 16:1647-55.
- Gruenberg, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:721-30.
- Guarnieri, F.G., L.M. Arterburn, M.B. Penno, Y. Cha, and J.T. August. 1993. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J Biol Chem.* 268:1941-6.
- Guy, P.M., J.V. Platko, L.C. Cantley, R.A. Cerione, and K.L. Carraway, 3rd. 1994. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8132-6.
- Halata, Z., M. Grim, and K.I. Bauman. 2003. Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec.* 271A:225-39.
- Hamanaka, S., M. Hara, H. Nishio, F. Otsuka, A. Suzuki, and Y. Uchida. 2002. Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J Invest Dermatol.* 119:416-23.
- Harder, T., P. Scheiffele, P. Verkade, and K. Simons. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol.* 141:929-42.
- Harris, I.R., H. Hoppner, W. Siefken, A.M. Farrell, and K.P. Wittern. 2000. Regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase by insulin and epidermal growth factor in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 114:83-7.

-
- Harter, C., and I. Mellman. 1992. Transport of the lysosomal membrane glycoprotein lgp120 (Igp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J Cell Biol.* 117:311-25.
- Hasilik, A. 1992. The early and late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation. *Experientia.* 48:130-51.
- Hasilik, A., R. Pohlmann, R.L. Olsen, and K. von Figura. 1984. Myeloperoxidase is synthesized as larger phosphorylated precursor. *Embo J.* 3:2671-6.
- Hasilik, A., K. von Figura, E. Conzelmann, H. Nehr Korn, and K. Sandhoff. 1982. Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts. Activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of beta-hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM2. *Eur J Biochem.* 125:317-21.
- Hasilik, A., B. Voss, and K. Von Figura. 1981. Transport and processing of lysosomal enzymes by smooth muscle cells and endothelial cells. *Exp Cell Res.* 133:23-30.
- Hendey, B., M.D. Mamrack, and R.W. Putnam. 1989. Thrombin induces a calcium transient that mediates an activation of the Na⁺/H⁺ exchanger in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 264:19540-7.
- Hendrickx, N., C. Volanti, U. Moens, O.M. Seternes, P. de Witte, J.R. Vandenheede, J. Piette, and P. Agostinis. 2003. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. *J Biol Chem.* 278:52231-9.
- Hennings, H., and K.A. Holbrook. 1983. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res.* 143:127-42.
- Hennings, H., K.A. Holbrook, and S.H. Yuspa. 1983. Factors influencing calcium-induced terminal differentiation in cultured mouse epidermal cells. *J Cell Physiol.* 116:265-81.
- Hennings, H., D. Michael, C. Cheng, P. Steinert, K. Holbrook, and S.H. Yuspa. 1980. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell.* 19:245-54.
- Higashiyama, S., J.A. Abraham, J. Miller, J.C. Fiddes, and M. Klagsbrun. 1991. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science.* 251:936-9.
- Honing, S., J. Griffith, H.J. Geuze, and W. Hunziker. 1996. The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *Embo J.* 15:5230-9.
- Honing, S., and W. Hunziker. 1995. Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat lgp120 (lamp-I) in MDCK cells. *J Cell Biol.* 128:321-32.
- Hooper, N.M. 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol Membr Biol.* 16:145-56.
- Horikoshi, T., I. Arany, S. Rajaraman, S.H. Chen, H. Brysk, G. Lei, S.K. Tying, and M.M. Brysk. 1998. Isoforms of cathepsin D and human epidermal differentiation. *Biochimie.* 80:605-12.
- Horikoshi, T., S. Igarashi, H. Uchiwa, H. Brysk, and M.M. Brysk. 1999. Role of endogenous cathepsin D-like and chymotrypsin-like proteolysis in human epidermal desquamation. *Br J Dermatol.* 141:453-9.
- Hossain, K., A.A. Akhand, M. Kato, J. Du, K. Takeda, J. Wu, K. Takeuchi, W. Liu, H. Suzuki, and I. Nakashima. 2000. Arsenite induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane raft-linked signaling for activation of c-Jun amino-terminal kinase. *J Immunol.* 165:4290-7.
- Hotchin, N.A., A. Gandarillas, and F.M. Watt. 1995. Regulation of cell surface beta 1 integrin levels during keratinocyte terminal differentiation. *J Cell Biol.* 128:1209-19.
- Huang, J.S., S.S. Huang, and J. Tang. 1979. Cathepsin D isozymes from porcine spleens. Large scale purification and polypeptide chain arrangements. *J Biol Chem.* 254:11405-17.
- Huang, X.L., R. Pawliczak, M.J. Cowan, M.T. Gladwin, P. Madara, C. Logun, and J.H. Shelhamer. 2002. Epidermal growth factor induces p11 gene and protein expression and down-regulates calcium

- ionophore-induced arachidonic acid release in human epithelial cells. *J Biol Chem.* 277:38431-40.
- Hubbard, S.R. 2002. Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. *Curr Opin Struct Biol.* 12:735-41.
- Hughes, R.C. 2001. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie.* 83:667-76.
- Hunter, T. 2000. Signaling--2000 and beyond. *Cell.* 100:113-27.
- Hunziker, W., and H.J. Geuze. 1996. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays.* 18:379-89.
- Ichijo, H. 1999. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene.* 18:6087-93.
- Ilangumaran, S., and D.C. Hoessli. 1998. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J.* 335 (Pt 2):433-40.
- Imort, M., M. Zuhlsdorf, U. Feige, A. Hasilik, and K. von Figura. 1983. Biosynthesis and transport of lysosomal enzymes in human monocytes and macrophages. Effects of ammonium chloride, zymosan and tunicamycin. *Biochem J.* 214:671-8.
- Iordanov, M.S., R.J. Choi, O.P. Ryabinina, T.H. Dinh, R.K. Bright, and B.E. Magun. 2002. The UV (Ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol.* 22:5380-94.
- Irie, T., K. Fukunaga, and J. Pitha. 1992. Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. I: Lipid dissolution and effects on lipid transfers in vitro. *J Pharm Sci.* 81:521-3.
- Irie, T., M. Otagiri, M. Sunada, K. Uekama, Y. Ohtani, Y. Yamada, and Y. Sugiyama. 1982. Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes of human erythrocytes in vitro. *J Pharmacobiodyn.* 5:741-4.
- Ishida-Yamamoto, A., H. Tanaka, H. Nakane, H. Takahashi, Y. Hashimoto, and H. Iizuka. 1999. Programmed cell death in normal epidermis and lorincrin keratoderma. Multiple functions of profilaggrin in keratinization. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 4:145-9.
- Ishii, K., and K.J. Green. 2001. Cadherin function: breaking the barrier. *Curr Biol.* 11:R569-72.
- Ishiko, A., Y. Matsunaga, T. Masunaga, S. Aiso, T. Nishikawa, and H. Shimizu. 2003. Immunomolecular mapping of adherens junction and desmosomal components in normal human epidermis. *Exp Dermatol.* 12:747-54.
- Isidoro, C., F.M. Baccino, and A. Hasilik. 1997. Mis-sorting of procathepsin D in metastogenic tumor cells is not due to impaired synthesis of the phosphomannosyl signal. *Int J Cancer.* 70:561-6.
- Iwabuchi, K., and I. Nagaoka. 2002. Lactosylceramide-enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils. *Blood.* 100:1454-64.
- Jadot, M., C. Colmant, S. Wattiaux-De Coninck, and R. Wattiaux. 1984. Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide. *Biochem J.* 219:965-70.
- Jaiswal, J.K., N.W. Andrews, and S.M. Simon. 2002. Membrane proximal lysosomes are the major vesicles responsible for calcium-dependent exocytosis in nonsecretory cells. *J Cell Biol.* 159:625-35.
- Jakob, T., J. Ring, and M.C. Udey. 2001. Multistep navigation of Langerhans/dendritic cells in and out of the skin. *J Allergy Clin Immunol.* 108:688-96.
- Jans, R. 1999. Expression des galectines 1 et 3 et des lysosome-associated membrane proteins (LAMP) 1 et 2 au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques. In Département Histologie-Embryologie. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur.

-
- Jensen, U.B., S. Lowell, and F.M. Watt. 1999. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development*. 126:2409-18.
- Jost, M., R. Class, C. Kari, P.J. Jensen, and U. Rodeck. 1999. A central role of Bcl-X(L) in the regulation of keratinocyte survival by autocrine EGFR ligands. *J Invest Dermatol*. 112:443-9.
- Jost, M., T.M. Huggett, C. Kari, and U. Rodeck. 2001. Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Mol Biol Cell*. 12:1519-27.
- Jost, M., C. Kari, and U. Rodeck. 2000. The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol*. 10:505-10.
- Kabouridis, P.S., J. Janzen, A.L. Magee, and S.C. Ley. 2000. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 30:954-63.
- Kanitakis, J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 12:390-9; quiz 400-1.
- Karlsson, K., and S.R. Carlsson. 1998. Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose 6-phosphate receptor/gamma-adaptin vesicles at the trans-Golgi network. *J Biol Chem*. 273:18966-73.
- Kashima, M., K. Fukuyama, M. Kikuchi, and W.L. Epstein. 1988. Limited proteolysis of high molecular weight histidine-rich protein of rat epidermis by epidermal proteinases. *J Invest Dermatol*. 90:829-33.
- Kato, N., M. Nakanishi, and N. Hirashima. 2003. Cholesterol depletion inhibits store-operated calcium currents and exocytotic membrane fusion in RBL-2H3 cells. *Biochemistry*. 42:11808-14.
- Katz, A.B., and L.B. Taichman. 1999. A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol*. 112:818-21.
- Kaur, P., and A. Li. 2000. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J Invest Dermatol*. 114:413-20.
- Kawada, A., K. Hara, E. Kominami, M. Hiruma, H. Noguchi, and A. Ishibashi. 1997. Processing of cathepsins L, B and D in psoriatic epidermis. *Arch Dermatol Res*. 289:87-93.
- Kawada, A., K. Hara, E. Kominami, T. Kobayashi, M. Hiruma, and A. Ishibashi. 1996. Cathepsin B and D expression in squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 135:905-10.
- Kilsdonk, E.P., P.G. Yancey, G.W. Stoudt, F.W. Bangerter, W.J. Johnson, M.C. Phillips, and G.H. Rothblat. 1995. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem*. 270:17250-6.
- Kita, T., M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 1980. Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in livers of mice treated with mevinolin, a competitive inhibitor of the reductase. *J Clin Invest*. 66:1094-100.
- Klein, U., G. Gimpl, and F. Fahrenholz. 1995. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry*. 34:13784-93.
- Komuves, L., Y. Oda, C.L. Tu, W.H. Chang, C.L. Ho-Pao, T. Mauro, and D.D. Bikle. 2002. Epidermal expression of the full-length extracellular calcium-sensing receptor is required for normal keratinocyte differentiation. *J Cell Physiol*. 192:45-54.
- Konstantinov, K.N., B. Shames, G. Izuno, and F.T. Liu. 1994. Expression of epsilon BP, a beta-galactoside-binding soluble lectin, in normal and neoplastic epidermis. *Exp Dermatol*. 3:9-16.
- Kornfeld, S., and I. Mellman. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol*. 5:483-525.

- Kuijpers, A.L., M. Bergers, G. Siegenthaler, P.L. Zeeuwen, P.C. van de Kerkhof, and J. Schalkwijk. 1997. Skin-derived antileukoproteinase (SKALP) and epidermal fatty acid-binding protein (E-FABP): two novel markers of the psoriatic phenotype that respond differentially to topical steroid. *Acta Derm Venereol.* 77:14-9.
- Kummer, J.L., P.K. Rao, and K.A. Heidenreich. 1997. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 272:20490-4.
- Kundra, R., and S. Kornfeld. 1999. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem.* 274:31039-46.
- Kyriakis, J.M., and J. Avruch. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 81:807-69.
- Laborda, J. 1991. 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. *Nucleic Acids Res.* 19:3998.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lai, E.C. 2003. Lipid rafts make for slippery platforms. *J Cell Biol.* 162:365-70.
- Lang, T., D. Bruns, D. Wenzel, D. Riedel, P. Holroyd, C. Thiele, and R. Jahn. 2001. SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J.* 20:2202-13.
- Lavker, R.M., and T.T. Sun. 2000. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13473-5.
- Lax, I., R. Fischer, C. Ng, J. Segre, A. Ullrich, D. Givol, and J. Schlessinger. 1991. Noncontiguous regions in the extracellular domain of EGF receptor define ligand-binding specificity. *Cell Regul.* 2:337-45.
- Lazarus, G.S., and A.R. Poole. 1975. Immunocytochemical localization of cathepsin D in rabbit skin. *Arch Dermatol.* 111:1150-3.
- Lazo, N.D., and D.T. Downing. 1999. A mixture of alpha-helical and 3(10)-helical conformations for involucrin in the human epidermal corneocyte envelope provides a scaffold for the attachment of both lipids and proteins. *J Biol Chem.* 274:37340-4.
- Le Borgne, R., A. Alconada, U. Bauer, and B. Hoflack. 1998. The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* 273:29451-61.
- Lee, J.C., S. Kumar, D.E. Griswold, D.C. Underwood, B.J. Votta, and J.L. Adams. 2000. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology.* 47:185-201.
- Lee, S.H., E.H. Choi, K.R. Feingold, S. Jiang, and S.K. Ahn. 1998. Iontophoresis itself on hairless mouse skin induces the loss of the epidermal calcium gradient without skin barrier impairment. *J Invest Dermatol.* 111:39-43.
- Lefevre, C., C. Blanchet-Bardon, F. Jobard, B. Bouadjar, J.F. Stalder, S. Cure, A. Hoffmann, J.F. Prud'Homme, and J. Fischer. 2001. Novel point mutations, deletions, and polymorphisms in the cathepsin C gene in nine families from Europe and North Africa with Papillon-Lefevre syndrome. *J Invest Dermatol.* 117:1657-61.
- Leigh, I.M., and F.M. Watt. 1994. Keratinocyte methods. Cambridge University Press.
- Levitzi, A., and A. Gazit. 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* 267:1782-8.
- Lewis, V., S.A. Green, M. Marsh, P. Vihko, A. Helenius, and I. Mellman. 1985. Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J Cell Biol.* 100:1839-47.

-
- Lippincott-Schwartz, J., and D.M. Fambrough. 1987. Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: kinetic and morphological analysis. *Cell*. 49:669-77.
- Liu, C., and T.E. Hermann. 1978. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem*. 253:5892-4.
- Lopez-Bayghen, E., A. Vega, A. Cadena, S.E. Granados, L.F. Jave, P. Gariglio, and L.M. Alvarez-Salas. 1996. Transcriptional analysis of the 5'-noncoding region of the human involucrin gene. *J Biol Chem*. 271:512-20.
- Lowry, O.H. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 193:265-75.
- Magnaldo, T., D. Fowles, and M. Darmon. 1998. Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation*. 63:159-68.
- Mainiero, F., C. Murgia, K.K. Wary, A.M. Curatola, A. Pepe, M. Blumemberg, J.K. Westwick, C.J. Der, and F.G. Giancotti. 1997. The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *Embo J*. 16:2365-75.
- Mane, S.M., L. Marzella, D.F. Bainton, V.K. Holt, Y. Cha, J.E. Hildreth, and J.T. August. 1989. Purification and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins. *Arch Biochem Biophys*. 268:360-78.
- Marques, M.M., N. Martinez, I. Rodriguez-Garcia, and A. Alonso. 1999. EGFR family-mediated signal transduction in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Exp Cell Res*. 252:432-8.
- Martinez, I., S. Chakrabarti, T. Hellevik, J. Morehead, K. Fowler, and N.W. Andrews. 2000. Synaptotagmin VII regulates Ca(2+)-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Cell Biol*. 148:1141-49.
- Mastaglia, F.L., M.J. Garlepp, B.A. Phillips, and P.J. Zilko. 2003. Inflammatory myopathies: clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Muscle Nerve*. 27:407-25.
- Mathews, P.M., J.B. Martinie, and D.M. Fambrough. 1992. The pathway and targeting signal for delivery of the integral membrane glycoprotein LEP100 to lysosomes. *J Cell Biol*. 118:1027-40.
- Mauro, T., G. Bench, E. Sidderas-Haddad, K. Feingold, P. Elias, and C. Cullander. 1998. Acute barrier perturbation abolishes the Ca²⁺ and K⁺ gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. *J Invest Dermatol*. 111:1198-201.
- Maxfield, F.R. 1982. Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts. *J Cell Biol*. 95:676-81.
- McGookey, D.J., K. Fagerberg, and R.G. Anderson. 1983. Filipin-cholesterol complexes form in uncoated vesicle membrane derived from coated vesicles during receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein. *J Cell Biol*. 96:1273-8.
- McMullan, R., S. Lax, V.H. Robertson, D.J. Radford, S. Broad, F.M. Watt, A. Rowles, D.R. Croft, M.F. Olson, and N.A. Hotchin. 2003. Keratinocyte differentiation is regulated by the Rho and ROCK signaling pathway. *Curr Biol*. 13:2185-9.
- McNeil, P.L. 2002. Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. *J Cell Sci*. 115:873-9.
- McNeil, P.L., and S. Ito. 1990. Molecular traffic through plasma membrane disruptions of cells in vivo. *J Cell Sci*. 96 (Pt 3):549-56.
- McNeil, P.L., and R.A. Steinhardt. 2003. Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 19:697-731.
- Meldolesi, J. 2003. Surface wound healing: a new, general function of eukaryotic cells. *J Cell Mol Med*. 7:197-203.

- Menon, G.K., K.R. Feingold, M. Mao-Qiang, M. Schaudé, and P.M. Elias. 1992a. Structural basis for the barrier abnormality following inhibition of HMG CoA reductase in murine epidermis. *J Invest Dermatol.* 98:209-19.
- Menon, G.K., R. Ghadially, M.L. Williams, and P.M. Elias. 1992b. Lamellar bodies as delivery systems of hydrolytic enzymes: implications for normal and abnormal desquamation. *Br J Dermatol.* 126:337-45.
- Menon, G.K., S. Grayson, and P.M. Elias. 1985. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol.* 84:508-12.
- Menon, G.K., L.F. Price, B. Bommannan, P.M. Elias, and K.R. Feingold. 1994. Selective obliteration of the epidermal calcium gradient leads to enhanced lamellar body secretion. *J Invest Dermatol.* 102:789-95.
- Merritt, E.A., S. Sarfaty, F. van den Akker, C. L'Hoir, J.A. Martial, and W.G. Hol. 1994. Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide. *Protein Sci.* 3:166-75.
- Meves, A., S.N. Stock, A. Beyerle, M.R. Pittelkow, and D. Peus. 2001. H(2)O(2) mediates oxidative stress-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. *Toxicol Lett.* 122:205-14.
- Michel, S., and M. Demarchez. 1988. Localization and in vivo activity of epidermal transglutaminase. *J Invest Dermatol.* 90:472-4.
- Mier, P.D., and J.J. van den Hurk. 1975a. Lysosomal hydrolases of the epidermis. 3. Peptide hydrolases. *Br J Dermatol.* 93:509-17.
- Mier, P.D., and J.J. van den Hurk. 1975b. Lysosomal hydrolases of the epidermis. I. Glycosidases. *Br J Dermatol.* 93:1-10.
- Miller, C.C., P. Hale, and A.P. Pentland. 1994. Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway. Evidence for UVB-induced epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem.* 269:3529-33.
- Mitev, V., and L. Miteva. 1999. Signal transduction in keratinocytes. *Exp Dermatol.* 8:96-108.
- Miyake, K., and P.L. McNeil. 1995. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *J Cell Biol.* 131:1737-45.
- Miyake, K., and P.L. McNeil. 2003. Mechanical injury and repair of cells. *Crit Care Med.* 31:S496-501.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler. 1982. The catalog of human cykeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31:11-24.
- Moor, A.N., R. Murtazina, and L. Fliegel. 2000. Calcium and osmotic regulation of the Na⁺/H⁺ exchanger in neonatal ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 32:925-36.
- Morita, K., and Y. Miyachi. 2003. Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci.* 31:81-9.
- Mottet, D., V. Dumont, Y. Deccache, C. Demazy, N. Ninane, M. Raes, and C. Michiels. 2003. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 278:31277-85.
- Mroczkowski, B., M. Reich, K. Chen, G.I. Bell, and S. Cohen. 1989. Recombinant human epidermal growth factor precursor is a glycosylated membrane protein with biological activity. *Mol Cell Biol.* 9:2771-8.
- Mullins, C., and J.S. Bonifacino. 2001. The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays.* 23:333-43.
- Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell.* 115:377-88.

-
- Nabi, I.R., A. Le Bivic, D. Fambrough, and E. Rodriguez-Boulan. 1991. An endogenous MDCK lysosomal membrane glycoprotein is targeted basolaterally before delivery to lysosomes. *J Cell Biol.* 115:1573-84.
- Nagy, P., G. Vereb, Z. Sebestyen, G. Horvath, S.J. Lockett, S. Damjanovich, J.W. Park, T.M. Jovin, and J. Szollosi. 2002. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J Cell Sci.* 115:4251-62.
- Nakanishi, K., T. Nadai, M. Masada, and K. Miyajima. 1992. Effect of cyclodextrins on biological membrane. II. Mechanism of enhancement on the intestinal absorption of non-absorbable drug by cyclodextrins. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 40:1252-6.
- Nakano, A., K. Nomura, H. Nakano, Y. Ono, S. LaForgia, L. Pulkkinen, I. Hashimoto, and J. Uitto. 2001. Papillon-Lefevre syndrome: mutations and polymorphisms in the cathepsin C gene. *J Invest Dermatol.* 116:339-43.
- Negi, M., T. Matsui, and H. Ogawa. 1981. Mechanism of regulation of human epidermal transglutaminase. *J Invest Dermatol.* 77:389-92.
- Neighbors, B.W., R.C. Williams, Jr., and J.R. McIntosh. 1988. Localization of kinesin in cultured cells. *J Cell Biol.* 106:1193-204.
- Ng, D.C., S. Shafae, D. Lee, and D.D. Bikle. 2000. Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. *J Biol Chem.* 275:24080-8.
- Nichols, B.J. 2003. GM1-Containing Lipid Rafts Are Depleted within Clathrin-Coated Pits. *Curr Biol.* 13:686-90.
- Niemann, C., and F.M. Watt. 2002. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends Cell Biol.* 12:185-92.
- Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J.E. Riggs, S.J. Oh, Y. Koga, C.M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro, and M. Hirano. 2000. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature.* 406:906-10.
- Nishiyama, T., S. Amano, M. Tsunenaga, K. Kadoya, A. Takeda, E. Adachi, and R.E. Burgeson. 2000. The importance of laminin 5 in the dermal-epidermal basement membrane. *J Dermatol Sci.* 24 Suppl 1:S51-9.
- Nofer, J.R., R. Feuerborn, B. Levkau, A. Sokoll, U. Seedorf, and G. Assmann. 2003. Involvement of Cdc42 signaling in apo A-I-induced cholesterol efflux. *J Biol Chem.*
- Oda, Y., C.L. Tu, W. Chang, D. Crumrine, L. Komuves, T. Mauro, P.M. Elias, and D.D. Bikle. 2000. The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in murine epidermal differentiation. *J Biol Chem.* 275:1183-90.
- Ohman, H., and A. Vahlquist. 1994. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm Venereol.* 74:375-9.
- Ohno, H., M.C. Fournier, G. Poy, and J.S. Bonifacino. 1996. Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J Biol Chem.* 271:29009-15.
- Ohtani, Y., T. Irie, K. Uekama, K. Fukunaga, and J. Pitha. 1989. Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem.* 186:17-22.
- Olayioye, M.A., D. Graus-Porta, R.R. Beerli, J. Rohrer, B. Gay, and N.E. Hynes. 1998. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol.* 18:5042-51.
- Orlow, S.J. 1995. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol.* 105:3-7.
- Ostermeyer, A.G., B.T. Beckrich, K.A. Ivarson, K.E. Grove, and D.A. Brown. 1999. Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells.

- methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein. *J Biol Chem.* 274:34459-66.
- Palazzo, A.F., C.H. Eng, D.D. Schlaepfer, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 2004. Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science.* 303:836-9.
- Parent, D., J. Golstein, N. Mairese, F. Bernerd, D. Faverly, H. Robben, F. Ramaekers, and M. Heenen. 1994. FB1, a monoclonal antibody reacting with a keratin 14 epitope, stains only a small subset of psoriatic basal keratinocytes. *Cell Prolif.* 27:165-76.
- Park, H., Y.M. Go, P.L. St John, M.C. Maland, M.P. Lisanti, D.R. Abrahamson, and H. Jo. 1998. Plasma membrane cholesterol is a key molecule in shear stress-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem.* 273:32304-11.
- Parpal, S., M. Karlsson, H. Thorn, and P. Stralfors. 2001. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J Biol Chem.* 276:9670-8.
- Paul, A., S. Wilson, C.M. Belham, C.J. Robinson, P.H. Scott, G.W. Gould, and R. Plevin. 1997. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal.* 9:403-10.
- Peles, E., and Y. Yarden. 1993. Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays.* 15:815-24.
- Peus, D., L. Hamacher, and M.R. Pittelkow. 1997. EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation. *J Invest Dermatol.* 109:751-6.
- Peus, D., A. Meves, R.A. Vasa, A. Beyerle, T. O'Brien, and M.R. Pittelkow. 1999. H2O2 is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation. *Free Radic Biol Med.* 27:1197-202.
- Peus, D., R.A. Vasa, A. Meves, A. Beyerle, and M.R. Pittelkow. 2000. UVB-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation is critical for downstream signaling and keratinocyte survival. *Photochem Photobiol.* 72:135-40.
- Pfundt, R., M. Wingens, M. Bergers, M. Zweers, M. Frenken, and J. Schalkwijk. 2000. TNF-alpha and serum induce SKALP/elafin gene expression in human keratinocytes by a p38 MAP kinase-dependent pathway. *Arch Dermatol Res.* 292:180-7.
- Phelps, P.C., M.W. Smith, and B.F. Trump. 1989. Cytosolic ionized calcium and bleb formation after acute cell injury of cultured rabbit renal tubule cells. *Lab Invest.* 60:630-42.
- Piepkorn, M., H. Predd, R. Underwood, and P. Cook. 2003. Proliferation-differentiation relationships in the expression of heparin-binding epidermal growth factor-related factors and erbB receptors by normal and psoriatic human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 295:93-101.
- Pike, L.J., and L. Casey. 2002. Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry.* 41:10315-22.
- Pillai, S., and D.D. Bikle. 1991. Role of intracellular-free calcium in the cornified envelope formation of keratinocytes: differences in the mode of action of extracellular calcium and 1,25 dihydroxyvitamin D3. *J Cell Physiol.* 146:94-100.
- Pillai, S., D.D. Bikle, M.L. Mancianti, P. Cline, and M. Hincenbergs. 1990. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol.* 143:294-302.
- Piskin, S., F. Gurkok, G. Ekuklu, and M. Senol. 2003. Serum lipid levels in psoriasis. *Yonsei Med J.* 44:24-6.
- Pitha, J., T. Irie, P.B. Sklar, and J.S. Nye. 1988. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.* 43:493-502.

-
- Pittelkow, M.R., P.W. Cook, G.D. Shipley, R. Derynck, and R.J. Coffey, Jr. 1993. Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Differ.* 4:513-21.
- Pol, A., R. Pfundt, P. Zeeuwen, H. Molhuizen, and J. Schalkwijk. 2003. Transcriptional regulation of the elafin gene in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 120:301-7.
- Ponec, M., L. Havekes, J. Kempenaar, S. Lavrijsen, M. Wijsman, J. Boonstra, and B.J. Vermeer. 1985. Calcium-mediated regulation of the low density lipoprotein receptor and intracellular cholesterol synthesis in human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol.* 125:98-106.
- Porn, M.I., and J.P. Slotte. 1995. Localization of cholesterol in sphingomyelinase-treated fibroblasts. *Biochem J.* 308 (Pt 1):269-74.
- Poumay, Y., F. Herphelin, P. Smits, I.Y. De Potter, and M.R. Pittelkow. 1999. High-cell-density phorbol ester and retinoic acid upregulate involucrin and downregulate suprabasal keratin 10 in autocrine cultures of human epidermal keratinocytes. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2:138-44.
- Poumay, Y., M. Leclercq-Smekens, S. Grailly, A. Degen, and R. Leloup. 1993. Specific internalization of basal membrane domains containing the integrin alpha 6 beta 4 in disperse-detached cultured human keratinocytes. *Eur J Cell Biol.* 60:12-20.
- Poumay, Y., and M.R. Pittelkow. 1995. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol.* 104:271-6.
- Poumay, Y., I.H. Roland, M. Leclercq-Smekens, and R. Leloup. 1994. Basal detachment of the epidermis using disperse: tissue spatial organization and fate of integrin alpha 6 beta 4 and hemidesmosomes. *J Invest Dermatol.* 102:111-7.
- Presland, R.B., D. Boggess, S.P. Lewis, C. Hull, P. Fleckman, and J.P. Sundberg. 2000. Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris. *J Invest Dermatol.* 115:1072-81.
- Rao, S.K., C. Huynh, V. Proux-Gillardeaux, T. Galli, and N.W. Andrews. 2004. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem.*
- Rauscher, F.J., 3rd, D.R. Cohen, T. Curran, T.J. Bos, P.K. Vogt, D. Bohmann, R. Tjian, and B.R. Franza, Jr. 1988. Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science.* 240:1010-6.
- Reddy, A., E.V. Caler, and N.W. Andrews. 2001. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell.* 106:157-69.
- Reynoso-von Drateln, C., E. Martinez-Abundis, B.R. Balcazar-Munoz, R. Bustos-Saldana, and M. Gonzalez-Ortiz. 2003. Lipid profile, insulin secretion, and insulin sensitivity in psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 48:882-5.
- Rheinwald, J.G., and H. Green. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 6:331-43.
- Rice, R.H., and H. Green. 1979. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell.* 18:681-94.
- Rijnboutt, S., H.M. Aerts, H.J. Geuze, J.M. Tager, and G.J. Strous. 1991a. Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D, glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 266:4862-8.
- Rijnboutt, S., A.J. Kal, H.J. Geuze, H. Aerts, and G.J. Strous. 1991b. Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 266:23586-92.
- Rijnboutt, S., W. Stoorvogel, H.J. Geuze, and G.J. Strous. 1992. Identification of subcellular compartments involved in biosynthetic processing of cathepsin D. *J Biol Chem.* 267:15665-72.

- Ringerike, T., F.D. Blystad, F.O. Levy, I.H. Madshus, and E. Stang. 2002. Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *J Cell Sci.* 115:1331-40.
- Rocha-Pereira, P., A. Santos-Silva, I. Rebelo, A. Figueiredo, A. Quintanilha, and F. Teixeira. 2001. Dislipidemia and oxidative stress in mild and in severe psoriasis as a risk for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta.* 303:33-9.
- Rochefort, H., M. Garcia, M. Glondu, V. Laurent, E. Liaudet, J.M. Rey, and P. Roger. 2000. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clin Chim Acta.* 291:157-70.
- Rodriguez, A., P. Webster, J. Ortego, and N.W. Andrews. 1997. Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol.* 137:93-104.
- Roepstorff, K., P. Thomsen, K. Sandvig, and B. van Deurs. 2002. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem.* 277:18954-60.
- Rohrer, J., and R. Kornfeld. 2001. Lysosomal hydrolase mannose 6-phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell.* 12:1623-31.
- Rohrer, J., A. Schweizer, D. Russell, and S. Kornfeld. 1996. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol.* 132.
- Roop, D.R., T.M. Krieg, T. Mehrel, C.K. Cheng, and S.H. Yuspa. 1988. Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 48:3245-52.
- Rosenfeld, M.G., G. Kreibich, D. Popov, K. Kato, and D.D. Sabatini. 1982. Biosynthesis of lysosomal hydrolases: their synthesis in bound polysomes and the role of co- and post-translational processing in determining their subcellular distribution. *J Cell Biol.* 93:135-43.
- Roth, W., J. Deussing, V.A. Botchkarev, M. Pauly-Evers, P. Saftig, A. Hafner, P. Schmidt, W. Schmahl, J. Scherer, I. Anton-Lamprecht, K. Von Figura, R. Paus, and C. Peters. 2000. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *Faseb J.* 14:2075-86.
- Rousselle, P., G.P. Lunstrum, D.R. Keene, and R.E. Burgeson. 1991. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol.* 114:567-76.
- Rowden, G. 1975. Ultrastructural studies of keratinized epithelia of the mouse. IV. Quantitative studies of lysosomes. *J Invest Dermatol.* 64:4-8.
- Sahai, E., and C.J. Marshall. 2002. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2:133-42.
- Salomon, D.S., N. Kim, T. Saeki, and F. Ciardiello. 1990. Transforming growth factor-alpha: an oncogene developmental growth factor. *Cancer Cells.* 2:389-97.
- Sando, G.N., H. Zhu, J.M. Weis, J.T. Richman, P.W. Wertz, and K.C. Madison. 2003. Caveolin expression and localization in human keratinocytes suggest a role in lamellar granule biogenesis. *J Invest Dermatol.* 120:531-41.
- Sarafian, V., M. Jadot, J.M. Foidart, J.J. Letesson, F. Van den Brule, V. Castronovo, R. Wattiaux, and S.W. Coninck. 1998. Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. *Int J Cancer.* 75:105-11.
- Sawyer, T.W., and M.G. Hamilton. 2000. Effect of intracellular calcium modulation on sulfur mustard cytotoxicity in cultured human neonatal keratinocytes. *Toxicol In Vitro.* 14:149-57.
- Schaller, M.D., C.A. Borgman, B.S. Cobb, R.R. Vines, A.B. Reynolds, and J.T. Parsons. 1992. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:5192-6.

-
- Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 103:211-25.
- Schlessinger, J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*. 110:669-72.
- Schmidt, K., M. Schrader, H.F. Kern, and R. Kleene. 2001. Regulated apical secretion of zymogens in rat pancreas. Involvement of the glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein GP-2, the lectin ZG16p, and cholesterol-glycosphingolipid-enriched microdomains. *J Biol Chem*. 276:14315-23.
- Schmidt, M., M. Goebeler, G. Posern, S.M. Feller, C.S. Seitz, E.B. Brocker, U.R. Rapp, and S. Ludwig. 2000. Ras-independent activation of the Raf/MEK/ERK pathway upon calcium-induced differentiation of keratinocytes. *J Biol Chem*. 275:41011-7.
- Schmidt, R., E.J. Parish, V. Dionisius, C. Cathelineau, S. Michel, B. Shroot, A. Rolland, A. Brzokewicz, and U. Reichert. 1991. Modulation of cellular cholesterol and its effect on cornified envelope formation in cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 97:771-5.
- Schwab, M., K. Alitalo, H.E. Varmus, J.M. Bishop, and D. George. 1983. A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells. *Nature*. 303:497-501.
- Schwartz, M.A., and M.H. Ginsberg. 2002. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol*. 4:E65-8.
- Schwarz, G., W.H. Boehncke, M. Braun, C.J. Schroter, T. Burster, T. Flad, D. Dressel, E. Weber, H. Schmid, and H. Kalbacher. 2002. Cathepsin S activity is detectable in human keratinocytes and is selectively upregulated upon stimulation with interferon-gamma. *J Invest Dermatol*. 119:44-9.
- Seiberg, M. 2001. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res*. 14:236-42.
- Shogomori, H., and A.H. Futerman. 2001. Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin blocks cholera toxin transport from endosomes to the Golgi apparatus in hippocampal neurons. *J Neurochem*. 78:991-9.
- Shoyab, M., G.D. Plowman, V.L. McDonald, J.G. Bradley, and G.J. Todaro. 1989. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science*. 243:1074-6.
- Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:31-9.
- Sly, W.S. 2000. The missing link in lysosomal enzyme targeting. *J Clin Invest*. 105:563-4.
- Smarel, A.M., S.W. Worobec, A.G. Ferguson, R.S. Decker, and M. Lesch. 1986. Limited proteolysis of rabbit cardiac procathepsin D in a cell-free system. *Am J Physiol*. 250:C589-96.
- Smart, E.J., G.A. Graf, M.A. McNiven, W.C. Sessa, J.A. Engelman, P.E. Scherer, T. Okamoto, and M.P. Lisanti. 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*. 19:7289-304.
- Steinert, P.M., and L.N. Marekov. 1995. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*. 270:17702-11.
- Steinert, P.M., L.N. Marekov, R.D. Fraser, and D.A. Parry. 1993. Keratin intermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly. *J Mol Biol*. 230:436-52.
- Steinert, P.M., A.C. Steven, and D.R. Roop. 1985. The molecular biology of intermediate filaments. *Cell*. 42:411-20.
- Steven, A.C., J.F. Hainfeld, B.L. Trus, J.S. Wall, and P.M. Steinert. 1983. Epidermal keratin filaments assembled in vitro have masses-per-unit-length that scale according to average subunit mass:

- structural basis for homologous packing of subunits in intermediate filaments. *J Cell Biol.* 97:1939-44.
- Stoll, S.W., and J.T. Elder. 1998. Retinoid regulation of heparin-binding EGF-like growth factor gene expression in human keratinocytes and skin. *Exp Dermatol.* 7:391-7.
- Stoll, S.W., S. Kansra, S. Peshick, D.W. Fry, W.R. Leopold, J.F. Wiesen, M. Sibilica, T. Zhang, Z. Werb, R. Derynck, E.F. Wagner, and J.T. Elder. 2001. Differential utilization and localization of ErbB receptor tyrosine kinases in skin compared to normal and malignant keratinocytes. *Neoplasia.* 3:339-50.
- Subtil, A., I. Gaidarov, K. Kobylarz, M.A. Lampson, J.H. Keen, and T.E. McGraw. 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:6775-80.
- Takagi, Y., E. Kriehuber, G. Imokawa, P.M. Elias, and W.M. Holleran. 1999. Beta-glucocerebrosidase activity in mammalian stratum corneum. *J Lipid Res.* 40:861-9.
- Takahashi, H., and H. Iizuka. 1993. Analysis of the 5'-upstream promoter region of human involucrin gene: activation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *J Invest Dermatol.* 100:10-5.
- Takei, N., and Y. Endo. 1994. Ca²⁺ ionophore-induced apoptosis on cultured embryonic rat cortical neurons. *Brain Res.* 652:65-70.
- Tammi, R., K. Rilla, J.P. Pienimäki, D.K. MacCallum, M. Hogg, M. Luukkonen, V.C. Hascall, and M. Tammi. 2001. Hyaluronan enters keratinocytes by a novel endocytic route for catabolism. *J Biol Chem.* 276:35111-22.
- Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E.L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lullmann-Rauch, P.M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura, and P. Saftig. 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature.* 406:902-6.
- Tebbe, B., S. Wu, C.C. Geilen, J. Eberle, V. Kodelja, and C.E. Orfanos. 1997. L-ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1 α and IL-6 in cultured human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol.* 108:302-6.
- Tobin, D.J., K. Foitzik, T. Reinheckel, L. Mecklenburg, V.A. Botchkarev, C. Peters, and R. Paus. 2002. The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol.* 160:1807-21.
- Togo, T., J.M. Alderton, G.Q. Bi, and R.A. Steinhardt. 1999. The mechanism of facilitated cell membrane resealing. *J Cell Sci.* 112 (Pt 5):719-31.
- Toivola, D.M., Q. Zhou, L.S. English, and M.B. Omary. 2002. Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells. *Mol Biol Cell.* 13:1857-70.
- Uhlik, M.T., A.N. Abell, N.L. Johnson, W. Sun, B.D. Cuevas, K.E. Lobel-Rice, E.A. Horne, M.L. Dell'Acqua, and G.L. Johnson. 2003. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol.* 5:1104-10.
- Ullrich, A., L. Coussens, J.S. Hayflick, T.J. Dull, A. Gray, A.W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T.A. Libermann, J. Schlessinger, and et al. 1984. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature.* 309:418-25.
- Ullrich, A., and J. Schlessinger. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61:203-12.
- Ullrich, B., and T.C. Sudhof. 1995. Differential distributions of novel synaptotagmins: comparison to synapsins. *Neuropharmacology.* 34:1371-7.
- Ushio-Fukai, M., L. Hilenski, N. Santanam, P.L. Becker, Y. Ma, K.K. Griendling, and R.W. Alexander. 2001. Cholesterol depletion inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by

-
- angiotensin II in vascular smooth muscle cells: role of cholesterol-rich microdomains and focal adhesions in angiotensin II signaling. *J Biol Chem.* 276:48269-75.
- van Deurs, B., K. Roepstorff, A.M. Hommelgaard, and K. Sandvig. 2003. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol.* 13:92-100.
- van Erp, P.E., J.J. Rijzewijk, J.B. Boezeman, J. Leenders, S. de Mare, J. Schalkwijk, P.C. van de Kerkhof, F.C. Ramaekers, and F.W. Bauer. 1989. Flow cytometric analysis of epidermal subpopulations from normal and psoriatic skin using monoclonal antibodies against intermediate filaments. *Am J Pathol.* 135:865-70.
- Vielhaber, G., S. Pfeiffer, L. Brade, B. Lindner, T. Goldmann, E. Vollmer, U. Hintze, K.P. Wittner, and R. Wepf. 2001. Localization of ceramide and glucosylceramide in human epidermis by immunogold electron microscopy. *J Invest Dermatol.* 117:1126-36.
- Volz, A., B.P. Korge, J.G. Compton, A. Ziegler, P.M. Steinert, and D. Mischke. 1993. Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics.* 18:92-9.
- von Figura, K., and A. Hasilik. 1986. Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem.* 55:167-93.
- Wakita, H., and M. Takigawa. 1999. Activation of epidermal growth factor receptor promotes late terminal differentiation of cell-matrix interaction-disrupted keratinocytes. *J Biol Chem.* 274:37285-91.
- Wan, Y.S., Z.Q. Wang, Y. Shao, J.J. Voorhees, and G.J. Fisher. 2001. Ultraviolet irradiation activates PI 3-kinase/AKT survival pathway via EGF receptors in human skin in vivo. *Int J Oncol.* 18:461-6.
- Wang, H.Q., T. Quan, T. He, T.F. Franke, J.J. Voorhees, and G.J. Fisher. 2003. Epidermal growth factor receptor-dependent, NF-kappaB-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases-3, -8, and -9 in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 278:45737-45.
- Warhol, M.J., J. Roth, J.M. Lucocq, G.S. Pinkus, and R.H. Rice. 1985. Immuno-ultrastructural localization of involucrin in squamous epithelium and cultured keratinocytes. *J Histochem Cytochem.* 33:141-9.
- Watanabe, S., K. Wagatsuma, E. Ichikawa, and H. Takahashi. 1991. Abnormal distribution of epidermal protein antigens in psoriatic epidermis. *J Dermatol.* 18:143-51.
- Watt, F.M. 1989. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr Opin Cell Biol.* 1:1107-15.
- Watt, F.M. 2001. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr Opin Genet Dev.* 11:410-7.
- Watt, F.M. 2002a. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J.* 21:3919-26.
- Watt, F.M. 2002b. The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *J Dermatol Sci.* 28:173-80.
- Watt, F.M., and B.L. Hogan. 2000. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 287:1427-30.
- Wattiaux, R., M. Jadot, M.T. Warnier-Pirotte, and S. Wattiaux-De Coninck. 1997. Cationic lipids destabilize lysosomal membrane in vitro. *FEBS Lett.* 417:199-202.
- Wehrle-Haller, B., and B. Imhof. 2002. The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol.* 12:382-9.
- Welter, J.F., J.F. Crish, C. Agarwal, and R.L. Eckert. 1995. Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity. *J Biol Chem.* 270:12614-22.

- Westover, E.J., D.F. Covey, H.L. Brockman, R.E. Brown, and L.J. Pike. 2003. Cholesterol depletion results in site-specific increases in EGF receptor phosphorylation due to membrane level effects: Studies with cholesterol enantiomers. *J Biol Chem*.
- Wille, J.J., Jr., M.R. Pittelkow, G.D. Shipley, and R.E. Scott. 1984. Integrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium: clonal analyses, growth kinetics, and cell cycle studies. *J Cell Physiol*. 121:31-44.
- Williams, M.A., and M. Fukuda. 1990. Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J Cell Biol*. 111:955-66.
- Wolf, A.A., Y. Fujinaga, and W.I. Lencer. 2002. Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *J Biol Chem*. 277:16249-56.
- Wollenberg, A., H. de la Salle, D. Hanau, F.T. Liu, and T. Bieber. 1993. Human keratinocytes release the endogenous beta-galactoside-binding soluble lectin immunoglobulin E (IgE-binding protein) which binds to Langerhans cells where it modulates their binding capacity for IgE glycoforms. *J Exp Med*. 178:777-85.
- Wormser, U., R. Kohen, E.V. Moor, A. Eldad, R. Gal, A. Nyska, and B. Brodsky. 1997. Noninvasive procedure for in situ determination of skin surface aspartic proteinase activity in animals; implications for human skin. *Arch Dermatol Res*. 289:686-91.
- Yamamoto, M., T. Kawanishi, T. Kiuchi, M. Ohta, I. Yokota, H. Ohata, K. Momose, K. Inoue, and T. Hayakawa. 1998. Discrepant intracellular pH changes following intracellular Ca²⁺ increases induced by glutamate and Ca²⁺ ionophores in rat hippocampal neurons. *Life Sci*. 63:55-63.
- Yamamoto, Y., J. Hashimoto, M. Shimamura, T. Yamaguchi, and T. Hazato. 2000. Characterization of tynorphin, a potent endogenous inhibitor of dipeptidyl peptidaseIII. *Peptides*. 21:503-8.
- Yarden, Y., and M.X. Sliwkowski. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:127-37.
- Young, P.R., M.M. McLaughlin, S. Kumar, S. Kassis, M.L. Doyle, D. McNulty, T.F. Gallagher, S. Fisher, P.C. McDonnell, S.A. Carr, M.J. Huddleston, G. Seibel, T.G. Porter, G.P. Livi, J.L. Adams, and J.C. Lee. 1997. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem*. 272:12116-21.
- Zhang, Q.S., D.A. Maddock, J.P. Chen, S. Heo, C. Chiu, D. Lai, K. Souza, S. Mehta, and Y.S. Wan. 2001. Cytokine-induced p38 activation feedback regulates the prolonged activation of AKT cell survival pathway initiated by reactive oxygen species in response to UV irradiation in human keratinocytes. *Int J Oncol*. 19:1057-61.
- Zhu, Y., and G.E. Conner. 1994. Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. *J Biol Chem*. 269:3846-51.

