Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Etude du récepteur de l'EGF dans les kératinocytes épidermiques en réponse au stress induit par la méthyl-bêta-cyclodextrine

Lambert, Sylviane

Award date:
2009

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.

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

FACULTE DE MEDECINE

Etude du récepteur de l'EGF dans les kératinocytes épidermiques en réponse au stress induit par la méthyl-β-cyclodextrine

Dissertation présentée par

Sylviane Lambert

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

Composition du jury :

Prof. P. Courtoy (Unité de Biologie Cellulaire, UCL)

Dr. R. Gniadecki (Bispebjerg Hospital, Copenhague, Danemark)

Dr. I. Hamer (FUNDP, URψM, Chimie Physiologique)

Prof. M. Hérin (FUNDP, URψM, Laboratoire Cellules et Tissus)

Prof. M. Jadot (FUNDP, URψM, Chimie Physiologique)

Dr. C. Michiels (FUNDP, URBC)

Prof. Y. Poumay (Promoteur, FUNDP, URψM, Laboratoire Cellules et Tissus)

Etude du récepteur de l'EGF dans les kératinocytes épidermiques en réponse au stress induit par la méthyl-β-cyclodextrine

L'épiderme constitue une des protections les plus importantes de l'organisme face à l'environnement extérieur. L'homéostasie de cette couche, constituée essentiellement de kératinocytes et localisée en surface de la peau, est maintenue par la balance entre la prolifération des kératinocytes de la couche basale et la desquamation des cellules mortes de la couche cornée. Parmi les éléments régulant cette homéostasie, le récepteur de l'EGF active de nombreuses voies de signalisation induisant tant la survie cellulaire que la prolifération ou encore la migration des cellules. Sa régulation par des régions membranaires particulièrement denses et riches en cholestérol nommées *lipid rafts*, en font un sujet d'étude crucial dans la physiologie du kératinocyte épidermique. En effet, la séquestration du cholestérol membranaire par la molécule heptasaccharidique méthyl-β-cyclodextrine induit l'activation du récepteur de l'EGF.

Nos résultats indiquent que le retrait du cholestérol suite à un traitement d'une heure en présence de MβCD résulte en l'activation/désactivation de nombreuses voies de signalisation (EGFR, p38, Akt). La récupération des signalisations normales est cependant possible si les cellules peuvent re-synthétiser cet élément essentiel de la membrane plasmique lors de périodes de récupération.

Nous nous sommes également intéressés aux évènements régulant l'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol membranaire ainsi qu'à son *processing* suivant son activation. Nos résultats indiquent que l'activation de ce récepteur de l'EGF dépend du clivage et de la libération de l'amphiréguline dans le milieu extracellulaire mais également de processus indépendant de ligand. De plus, la sécrétion d'amphiréguline, plus importante suite au retrait du cholestérol membranaire, pourrait être due à l'activation successive d'une Src kinase et d'une métallo-protéase encore non-identifiées.

Une fois le récepteur de l'EGF activé dans ces conditions, il forme des dimères et est internalisé suivant une cinétique relativement lente lors de la récupération qui suit la déplétion du cholestérol. Cette internalisation semble de plus être dépendante de l'activation de la MAPK p38 et se produit également lorsque les kératinocytes sont soumis à des stress relevant d'un point de vue physiologique pour l'épiderme comme des *scratch* ou une incubation en présence de DNFB, une molécule sensibilisante.

Nos résultats suggèrent donc un double processus d'activation du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol (indépendant ou dépendant d'un ligand) ainsi qu'une éventuelle participation de ces régions membranaires dans la mise en place des réponses développées par les kératinocytes en situation de stress résultant notamment en l'internalisation du récepteur de l'EGF.

Et voilà, ainsi s'achèvent quatre (courtes) années de recherche dans le pays des kératinocytes et du récepteur de l'EGF. Comme le veut la tradition, je vais donc tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements.

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma gratitude envers le Professeur Yves Poumay. Merci d'avoir osé me laisser tenter cette aventure et de m'y avoir guidée en m'inculquant l'ordre, la précision et la pédagogie. Merci pour toutes les discussions, idées et corrections. A ce propos, si vous dites que votre métier est ingrat, c'est sûrement que vous le faites bien.

Que tous les membres du LabCeti reçoivent mes plus vifs remerciements. Merci à Michèle Leclercq-Smekens, Annie Degen, Michel Hérin, Patrick Glesner, Caroline Canon et Frédéric Minner pour leurs discussions concernant les sujets les plus variés le temps de midi, leur aide (informatique, didactique,…).

Un énorme merci aux « filles du labo » : Conny, Séverine, Aurélie et Ganka. Merci de m'avoir fait découvrir les joies de la cuisine, d'avoir tenté de me faire grandir et d'avoir rempli le labo de chromosomes X.

Merci à Sophie d'avoir accepté de faire son mémoire avec moi. Les voies d'Akt sont impénétrables et la recherche reste surprenante.

Un merci particulier à Françoise pour son aide, ses avis, ses réponses à mes nombreuses « bêtes questions » et les nombreuses séances de « psychothérapie ». Merci également à Valérie pour son aide dans les dernières manip'.

Mes remerciements s'adressent également à Raphaël et Daniel. Merci pour vos bonjours de chaque matin, vos gentilles moqueries concernant ma maladresse légendaire (je n'ai pas encore osé faire le compte de toute la casse accomplie durant mon passage au labo). Mais surtout merci pour vos connaissances incollables dans l'art de la coupe à congélation et du marquage histochimique.

Toute ma reconnaissance va également à Noëlle et Catherine pour les heures passées au confocal à observer des choses déjà vues (répétition = sûreté) ou parfois inattendues.

Merci également à toutes les personnes que je n'ai pas citées mais qui à un moment ou un autre m'ont aidée, conseillée ou écoutée.

Je remercie évidemment ma famille pour son irremplaçable et inconditionnel soutien. Ils ont été présents tout au long de mes études pour m'écouter raconter des choses qu'ils ne comprenaient pas toujours, mais aussi pour écarter les doutes et partager les nombreux moments de stress ainsi que les joies.

Je tiens également à remercier les membres du jury de prendre la peine et le temps de lire ce "tapuscrit" ainsi que le Fond pour formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture pour le soutien financier de ces quatre années.

Un merci particulier à Robert Gniadecki sans qui l'idée de tenter cette aventure ne m'aurait jamais effleuré l'esprit. Je confirme, d'une certaine façon, la recherche est un jeu…


I THINK WE'VE GOT ENOUGH INFORMATION NOW, DON'T YOU?
ALL WE HAVE IS ONE "FACT" YOU MADE UP.
THAT'S PLENTY. BY THE TIME WE ADD AN INTRODUCTION, A FEW ILLUSTRATIONS, AND A CONCLUSION, IT WILL LOOK LIKE A GRADUATE THESIS.

INTRODUCTION 9

1 LA PEAU 10

1.1 STRUCTURE 10
1.2 L'EPIDERME 11
1.3 LES MARQUEURS EPIDERMIQUES 15

2 EVOLUTION DE MODELES DE CULTURE DES KERATINOCYTES 21

3 LES "LIPID RAFTS" OU RADEAUX LIPIDIQUES 23

3.1 L'HYPOTHESE 23
3.2 LE CONCEPT DES LIPID RAFTS 24

4 LA FAMILLE HER/ERBB 27

4.1 LES DIFFERENTS LIGANDS 27
4.2 LE RECEPTEUR DE L'EGF 29
4.2.1 STRUCTURE DU RECEPTEUR DE L'EGF 29
4.2.2 LOCALISATION DU RECEPTEUR DE L'EGF DANS LA MEMBRANE PLASMIQUE 31
4.2.3 ACTIVATION DU RÉCEPTEUR DE L'EGF 32
4.2.4 SIGNALISATIONS ACTIVEES PAR LE RECEPTEUR DE L'EGF 38
4.2.5 ENDOCYTOSE DU RECEPTEUR DE L'EGF 44
4.2.6 ET APRES L'ENDOCYTOSE… 46
4.2.7 ACTIVATION INDEPENDANTE DE LIGAND 49
4.3 LES AUTRES MEMBRES DE LA FAMILLE DU RECEPTEUR DE L'EGF 49
a. HER2 49
b. HER3 50
c. HER4 51

5 ACTIVATION DU RECEPTEUR DE L'EGF LORS DU STRESS CELLULAIRE 52

OBJECTIFS DU TRAVAIL 54

MATERIEL ET METHODES 55

1 CULTURE CELLULAIRE 56

1.1 KERATINOCYTES HUMAINS NORMAUX 56
1.1.1 MISE EN CULTURE PRIMAIRE 56
1.1.2 MISE EN CULTURE SECONDAIRE 57
1.1.3 MISE EN CULTURE TERTIAIRE 57
1.2 FIBROBLASTES HUMAINS NORMAUX 58
1.3 CELLULES IMMORTALISEES 59

2 DIFFERENTS STRESS CELLULAIRES ET TRAITEMENTS 59

2.1 DEPLETION DU CHOLESTEROL MEMBRANAIRE 59
2.2 STRESS OXYDATIF 60
2.3 SCRATCH 60
2.4 STRESS AVEC UN SENSIBILISANT : LE DNFB 60

2.5 TRAITEMENTS AVEC DES INHIBITEURS 60

3 ETUDE DES LIPID RAFTS 61

3.1 EXTRACTION ET DOSAGE DU CHOLESTEROL 61
3.2 DETECTION DES LIPID RAFTS 62
3.3 CENTRIFUGATION SUR GRADIENTS DE DENSITE 62

4 ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES CELLULES ET DE LA LOCALISATION DU RECEPTEUR DE L'EGF 63

4.1 PREPARATION POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE 63
4.2 MARQUAGE DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE 63
4.3 MARQUAGE POUR LA MICROSCOPIE CONFOCALE OU POUR L'EPIFLUORESCENCE 63

5 ANALYSE EN WESTERN BLOT 65

5.1 PREPARATION DES LYSATS CELLULAIRES ET ANALYSE PAR WESTERN BLOT 65
5.2 ANALYSE DE LA PHOSPHORYLATION DES DIFFERENTES TYROSINES DU RECEPTEUR DE L'EGF 66
5.3 DIMERISATION DU RECEPTEUR DE L'EGF 67

6 ANALYSE DE LA LOCALISATION DU RECEPTEUR DE L'EGF 67

6.1 TEST DE LIAISON DE ^{125}I-EGF 67
6.2 BIOTINYLATION DE EGFR 67

7 SURVIE ET MIGRATION CELLULAIRE 68

7.1 ACCUMULATION DE BRDU 68
7.2 TEST DE MIGRATION 69

8 ETUDE DE LA LIBERATION DE L'AMPHIREGULINE 69

9 NEUTRALISATION DU RECEPTEUR DE L'EGF OU NEUTRALISATION DE L'AMPHIREGULINE 69

RESULTATS 70

1 DESORGANISATION ET REORGANISATION DES LIPID RAFTS 71

1.1 INTRODUCTION 71
1.2 EFFETS DE LA M□CD SUR LE CONTENU EN CHOLESTEROL ET LA MORPHOLOGIE DES KERATINOCYTES 71
1.3 EFFETS DE LA DEPLETION DU CHOLESTEROL SUR LA SIGNALISATION 75
1.4 LES KERATINOCYTES RECUPERENT SUITE A LA DEPLETION DU CHOLESTEROL MEMBRANAIRE 76

2 PROCESSING DU RECEPTEUR DE L'EGF EN REPONSE A LA DEPLETION DU CHOLESTEROL 83

2.1 INTRODUCTION 83
2.2 ACTIVATION INDEPENDANTE DE LIGAND DU RECEPTEUR DE L'EGF DANS LES CELLULES HACAT 84
2.3 EFFET DE LA DEPLETION DU CHOLESTEROL SUR LA SIGNALISATION ET LA LOCALISATION DU RECEPTEUR DE L'EGF DANS DES KERATINOCYTES NORMAUX 88
2.4 ETAT D'ACTIVATION ET LOCALISATION DU RECEPTEUR DE L'EGF DANS DES KERATINOCYTES TRANSFORMES 96
2.5 ETAT D'ACTIVATION ET LOCALISATION DU RECEPTEUR DE L'EGF DANS D'AUTRES TYPES CELLULAIRES 99
2.6 DEGRADATION PROTEASOMALE DU RECEPTEUR DE L'EGF SUITE A SON INTERNALISATION 104
2.7 INTERNALISATION DU RECEPTEUR DE L'EGF DEPENDANT DE L'ACTIVATION DE LA MAPK P38 106

2.8 INTERNALISATION P38-DEPENDANTE DU RECEPTEUR DE L'EGF DANS D'AUTRES CIRCONSTANCES PATHOPHYSIOLOGIQUES 109

3 ROLE DE L'AMPHIREGULINE DANS L'ACTIVATION DU RECEPTEUR DE L'EGF EN REPONSE A LA DESORGANISATION DES LIPID RAFTS 113

3.1 INTRODUCTION 113
3.2 ACTIVATION PARTIELLEMENT LIGAND-DÉPENDANTE 113

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 122

a. Importance du cholestérol dans la formation des lipid rafts 123
b. Rôle de l'activation de la MAPK p38 126
- ***DANS LA PHOSPHORYLATION ET L'INTERNALISATION DU RÉCEPTEUR DE L'EGF*** 126
- ***DANS LE PHÉNOMÈNE DE MIGRATION ET D'ATTACHEMENT*** 127

c. Comment le récepteur de l'EGF est-il activé en réponse à la déplétion du cholestérol ? 128
d. Rôle de l'amphiréguline dans l'activation du récepteur de l'EGF 130
e. Pourquoi le récepteur de l'EGF est-il activé lors de la déplétion du cholestérol ? 133
f. Le récepteur de l'EGF lors d'autres stress patho-physiologiques 135
g. En conclusion 137

BIBLIOGRAPHIE 138

ANNEXES ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

Liste des abbréviations

ADAM	a disintegrin and metallopeptidase domain
ADAM17/TACE	17/TNFα converting enzyme
AIP4/Itch	itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)
Akt	thymoma viral proto-oncogene
AP-1	activator protein-1
AP2	adaptator protein 2
AR	amphiregulin
Arp2/3	actin related protein 2/3 complex
ATF2	Activated Transcription Factor 2
ATP	adénosine tri-phosphate
Bad	Bcl2-antagonist of cell death
BrdU	Bromodeoxy Uridine
BS3	Bis(sulfosuccinimidyl)suberate
BSA	bovin serum albumin
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulin Kinase II
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
CCD	Charge-Coupled Device
CCP	clathrin coated pit
CCV	clathrin coated vesicule
CD2AP	CD2 associated protein
CIE	clathrin independent endocytosis
CIN85	85-kD CBL-interacting protein
CK2	Casein Kinase 2
CREB	cAMP response element-binding
CTx-B	Cholera toxine B subunit
DAG	diacyl glycerol
DIG	detergent-insoluble glycolipid-enriched domain
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	diméthyl sulfoxide
DNFB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzène
DRM	detergent resistant membrane
EDTA	acide éthylène diamine tetra acétique
EEA1	early endosome antigen 1
EGF (R)	epidermal growth factor (receptor)
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
Elk1	member of ETS oncogene family
EPSK (A ou B)	Epithélium pavimenteux stratifié kératinisé
ErbB	Erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogen homolog (avian)
ERK1/2	Extracellular Regulated MAP Kinase 1/2
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
GAB1	Grb2-associated binding protein 1
GM1/GM3	Ganglioside monosyalidé 1/3
GPI	glycosil phosphatidyle inositol
Grb2	growth factor receptor bound protein 2
GTP	guanosine-5'-triphosphate
HaCaT	Human adult/ Calcium/Temperature
HB-EGF	Heparin Binding-Epidermal Growth Factor
HeLa	Henrietta Lacks
HER	Human EGF Receptor
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A
HRP	horse radish peroxidase
IKKα	Nuclear factor NF-kappa-B inhibitor kinase α
IL-8	Interleukine-8
IRdye	InfaRed dye
JMa/JMb	Juxta Membrane a/b
JNK	Jun N-terminal kinase
KGM	keratinoyte growth medium
LAMP2b	lysosomal-associated membrane protein 2b
LET-23	lethal
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MβCD	methyl-beta-cyclodextrin
MDM2	Mdm2 (transformed mouse 3T3 cell double minute 2) p53 binding protein homolog (mouse)
MEK1/2	MAP kinase-ERK kinase
MKK	MAP kinase kinase
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC	mammalian Target of Rapamycin Complexe
NHF	normal human fibroblast
NHS	N-hydroxysulfosuccinimide
p34cdc2	p34 cell division cycle 2
PBS	phosphate buffer salin
PBS-T	phospate buffer salin-Tween20
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF-R	Platelet-derived growth factor (receptor)
PDK1	phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PFA	paraformaldéhyde
PH	plectrin homology
PHLPP	PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PIP3	phosphatidylinositol 1,4,5 tris phosphate
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PLCγ	phospholipase C gamma
PP2A	protein phosphatase 2A
PTB	phosphotyrosine binding domain
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTP-B1	protein tyrosine phosphatase-B1
PVDF	polyfluorure de vinylidène
Raf	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog
Ras	rat sarcoma virus oncogene
RE	reticulum endoplasmique
RSK2	ribosomal protein S6 kinase 2
RTK	receptor tyrosine kinase
SH2/SH3	Src homology 2/3
Shc	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein
SHP-1/SHP-2	Src homology phosphatase-1/2
Si RNA	Small interfering RNA
Sos	Son of sevenless
Sp1	Specificity protein 1
SPR	Small proline-rich protein
Src	v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
SREBP	Steroïd responsive element binding protein
Stat5b	signal transducer and activator of transcription 5b
TCA	acide trichloroacétique
TGFα-like LIN23	TGFβ-like-Lin23 abnormal cell lineage
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
UV	Ultra-violet

Introduction

1 La peau

La peau est l'organe le plus grand (entre 1,5 et 2 m^2 de surface pour un adulte) mais également le plus externe de notre organisme. Etant un des organes les plus susceptibles à être exposés à des stress, la peau est la première ligne de défense de notre organisme en cas de nuisance et se doit de maintenir son homéostasie en assurant quatre fonctions :

- Maintenir une barrière de protection permettant de garder le milieu corporel intérieur isolé et de limiter les pertes d'eau tout en restant semi-perméable face aux substances extérieures.
- Permettre la thermorégulation de l'organisme en réduisant la perte de chaleur, grâce à la présence des tissus adipeux, tout en éliminant les excès de chaleur par le phénomène de sudation au niveau des glandes sudoripares.
- Etablir une sensibilité de l'organisme vis-à-vis de l'environnement par la présence de terminaisons nerveuses.
- Participer au métabolisme général de l'organisme en synthétisant la vitamine D à partir de dérivés du cholestérol.

1.1 Structure

D'un point de vue histologique, mais également anatomique, la peau est constituée de trois zones :

- une couche profonde d'origine mésodermique, l'hypoderme. L'hypoderme est essentiellement composé de réserves de graisse stockée sous forme de triglycérides et d'acides gras dans les adipocytes. C'est dans cette couche, qui assure la jonction avec les structures anatomiques sous-cutanées et joue un rôle de protection thermique et mécanique, que cheminent les réseaux vasculaires et nerveux sous-cutanés.
- une partie interne plus épaisse (de 10 à 40 fois l'épaisseur de l'épiderme): le derme, également d'origine mésodermique, constitue une couche essentielle de la peau et lui confère sa résistance et son élasticité de par sa grande richesse en fibres conjonctives (75% de la structure). Il constitue le tissu de soutien de la peau et s'organise en deux structures superposées:

- le derme profond (ou réticulaire) représente la majeure partie du derme. Il est presque uniquement composé de fibres de collagène et de fibres élastiques disposées de façon multidirectionnelle et synthétisées par les fibroblastes présents dans ce tissu.

- le derme superficiel (ou papillaire), qui doit son nom à sa surface supérieure vallonnée en forme de papilles ancrées sous l'épiderme. Il est composé de fibres réticuliniques et de fibres élastiques orientées principalement perpendiculairement à la surface de la peau. Elles jouent un rôle dans la résistance mécanique de la peau. Le derme papillaire est également riche en fibroblastes (responsables de la synthèse des macromolécules formant le tissu conjonctif du derme) et on y trouve les récepteurs des divers modes de la sensibilité extéroceptive, les capillaires sanguins permettant la nutrition de l'épiderme par diffusion ainsi que les divers annexes épidermiques (ongles, follicules pileux, glandes sudoripares et sébacées).

- et enfin une partie superficielle d'origine ectodermique, nommée épiderme (dont nous allons expliquer la structure de façon plus détaillée dans le point qui suit), qui est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (quatre couches). La permanence de cette partie de la peau est assurée par la prolifération des cellules souches localisées dans sa couche basale.

1.2 L'épiderme

L'épiderme est donc la couche la plus externe de la peau recouvrant l'organisme. C'est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (EPSK) dont l'épaisseur varie de 0,05 à 1,6 mm en fonction de sa localisation. Quatre populations cellulaires différentes entrent dans sa composition : les kératinocytes (représentant 90% de la population cellulaire), les mélanocytes (cellules pigmentaires produisant la mélanine, importante pour la photoprotection du tissu) (Goding 2007), les cellules de Langerhans (cellules dendritiques participant à la réponse immunitaire) (Berger *et al.* 2006) et les cellules de Merkel (associées au système nerveux et jouant le rôle de mécanorécepteurs) (Boulais & Misery 2007).

Les kératinocytes constituent la population majoritaire de l'épiderme et suivent un programme de différenciation appelé kératinisation au cours d'un parcours qui s'effectue de la profondeur de l'épiderme vers sa surface. En condition non pathologique, ce parcours s'effectue en +/- 30 jours et l'évolution de la morphologie du kératinocyte va permettre la distinction des 4 couches formant l'épiderme (schématisé à la figure I-1).

a. La couche basale

Le trajet du kératinocyte commence lors de sa "production" au niveau de la première assise cellulaire formant l'épiderme : la couche basale, également appelée couche germinative. Cette couche, constituée d'une assise unique principalement de kératinocytes, assure par la multiplication lente de ses cellules souches la production de cellules à amplification transitoire dont la division rapide permet le renouvellement de l'épiderme et sa stratification (Figure I-2). En effet, ces cellules effectuent quelques divisions rapides avant de s'engager dans le processus de différenciation. A ce stade, les kératinocytes sont caractérisés par une morphologie cubique ou prismatique avec un noyau volumineux et un cytoplasme basophile. Leur cytosquelette renferme des filaments intermédiaires de kératines, principalement les types 5 et 14, organisés en tonofilaments autour du noyau. Dans cette couche, les kératinocytes sont ancrés à la membrane basale sous-jacente grâce aux hémidesmosomes et aux kératinocytes voisins par les desmosomes.

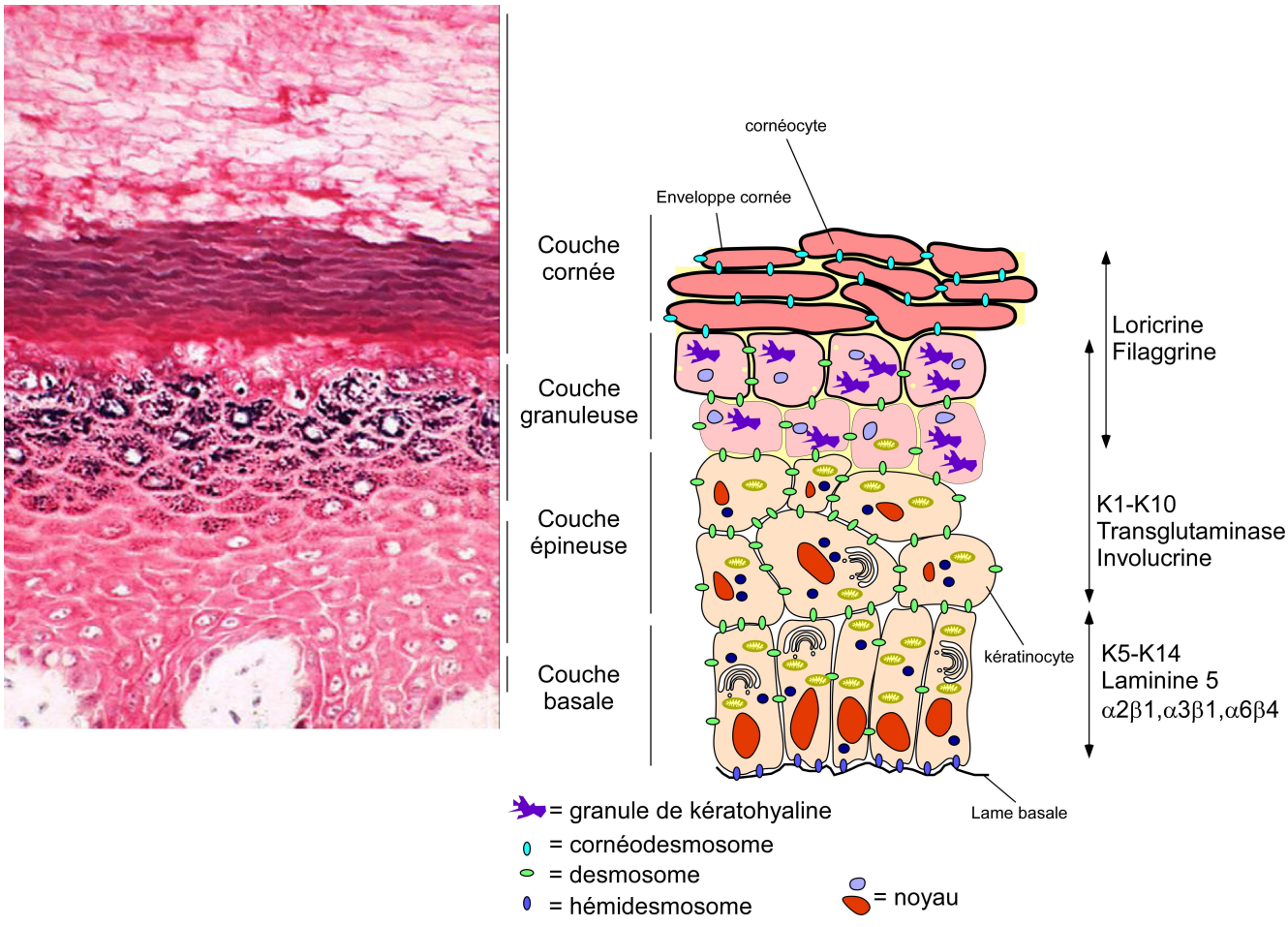


Figure I-1 : Structure de l'épiderme.

Les cellules de la couche basale renferment de nombreux organites qui seront progressivement remplacés par des grains de kératohyaline lors de la différenciation des kératinocytes.

Il est à noter que seuls les kératinocytes souches de la couche basale ont la capacité de proliférer. Ces cellules sont donc détentrices du pouvoir de régénération de l'épiderme durant toute la période de vie de l'organisme qu'il recouvre. Il est donc très important de protéger le bagage génétique de ces cellules, par exemple contre les rayonnements ultraviolets, ce qui est principalement effectué par la mélanine produite au niveau des mélanocytes. Ceux-ci possèdent de nombreuses dendrites qui s'insinuent entre les cellules, leur permettant d'être en contact avec une trentaine de kératinocytes de la couche basale. Leur fonction est de synthétiser les mélanines, pigments photoprotecteurs dérivés de la tyrosine qui donneront sa pigmentation à la peau, et de les transférer dans les kératinocytes par un processus d'exocytose-phagocytose appelé cytocrinie. Les mélanines sont contenues dans des structures dérivées du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi des mélanocytes nommées mélanosomes. Ces derniers s'agrègent au voisinage du noyau des kératinocytes afin d'absorber les rayons UV et de minimiser leurs effets néfastes. Pour une revue, voir Costin & Hearing, 2007.

b. La couche épineuse

Dans la couche épineuse, les kératinocytes, stratifiés sur 5 à 10 assises, commencent à s'aplatir et adoptent une forme polyédrique. Les filaments intermédiaires de kératine, formant le cytosquelette, sont groupés en faisceaux denses et les nombreux desmosomes, maintenant l'unité du tissu, sont responsables de l'aspect épineux observé en microscopie optique. Poussés vers la surface par les cellules proliférant dans la couche basale, les kératinocytes vont poursuivre leur migration tout en se spécialisant de plus en plus. On retrouve également dans cette couche les cellules de Langerhans. Découvertes en 1868, les cellules de Langerhans (2-5% des cellules de l'épiderme) sont dérivées de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Comme les mélanocytes, les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques mais s'en différencient par la présence dans leur cytoplasme d'organelles spécifiques, les granules de Birbeck, dont la fonction reste encore indéterminée. Les cellules de Langerhans constituent des éléments essentiels du système de défense de l'organisme puisqu'elles sont chargées de détecter les corps étrangers ayant pénétré dans l'épiderme avant de rejoindre les ganglions lymphatiques et engendrer une réponse du système immunitaire.

c. La couche granuleuse

Formée de 1 à 3 assises de kératinocytes aplatis dont le noyau devient pycnotique, la couche granuleuse doit son nom aux nombreux grains de kératohyaline (composés principalement de profilagrine dont nous reparlerons plus loin). Les kératinocytes contiennent également à ce stade des petits organites sécrétoires provenant de l'appareil de Golgi : les corps lamellaires ou d'Odland. Ceux-ci contiennent des glycosylcéramides, du sulfate de cholestérol ainsi que des hydrolases lysosomales. En fusionnant avec la membrane plasmique, les corps d'Odland déversent leur contenu dans l'espace intercellulaire, ce qui constitue le ciment (que nous développerons dans le paragraphe suivant).

d. La couche cornée

Les kératinocytes arrivent en surface et leur différenciation aboutit à la formation de la couche cornée imperméable. Les kératinocytes y sont complètement aplatis, le noyau et les organites cytoplasmiques ont totalement disparu et le cytoplasme est rempli de structures fibrillaires formées à partir de filaments de kératines et du contenu des grains de kératohyaline. Les membranes plasmiques sont devenues très épaisses, doublées d'une enveloppe cornée (pour des revues voir Candi *et al.* 2005 et Elias 2005), qui est constituée de plusieurs couches de protéines dont l'involucrine et la loricrine (nous en reparlerons au point 1.3.b). Le contenu des corps d'Odland est sécrété dans l'espace intercellulaire, formant le ciment participant au maintien de l'unité des cellules de la couche cornée. Ce ciment est essentiellement formé de céramides. Dans cette couche, l'activité métabolique a la particularité d'être extracellulaire puisque due à l'action des diverses hydrolases (glycosidases, phospholipases, sphingomyélinases, phosphatases, estérases, sulfatases et protéases) contenues dans les corps d'Odland et sécrétées lors de l'exocytose de ces derniers (pour une revue voir Forestier 1992). Le kératinocyte, n'étant plus qu'un amas de kératines entouré d'une enveloppe cornée, est alors nommé cornéocyte.

La couche cornée est organisée en plusieurs assises de cellules dont le nombre varie selon la région du corps observée et définit les EPSK de type A ou épais et B ou mince. On compte en moyenne 15 à 20 assises cellulaires au niveau de la peau du dos ou de l'abdomen (EPSK B) et plusieurs centaines au niveau de la plante des pieds et de la paume des mains (EPSK A).

En surface de la couche cornée, les cornéocytes se détachent de l'épiderme lors d'un phénomène appelé desquamation. La couche épidermique superficielle se détache par petits lambeaux, ou squames, suite à la lyse du ciment intercellulaire et des cornéodesmosomes par les hydrolases acides sécrétées par les corps d'Odland.

Les cornéocytes peuvent aussi augmenter l'épaisseur de la couche cornée sous l'action de traumatismes répétés, formant des callosités.

1.3 Les marqueurs épidermiques

La prolifération cellulaire ainsi que la différenciation sont des processus séquentiels caractérisés par l'expression contrôlée de protéines spécifiques que nous allons décrire dans ce paragraphe et qui sont représentés à la figure I-3.

a. Marqueurs de prolifération

Les cellules souches pourvoient au renouvellement continuel de l'épiderme grâce à leur capacité d'engendrer des cellules filles, d'abord prolifératives puis différenciées. Il est à noter que parmi les cellules filles se trouvent les cellules amplificatrices transitoires, possédant elles aussi une certaine capacité de prolifération. Ces deux populations de cellules en prolifération se différencient par leur potentiel de division, lent et illimité pour les cellules souches, rapide mais limité pour les cellules amplificatrices transitoires (Watt 1998)(voir figure I-2). Ces deux populations cellulaires correspondent aux cellules détectées au sein de la couche basale par l'incorporation de ^{3}H-thymidine ou la détection des antigènes Ki67 et PCNA, marqueurs des cellules en prolifération.

L'expression des intégrines épidermiques ou des kératines basales 5 et 14 permet d'identifier les kératinocytes de la couche basale d'un épiderme normal.

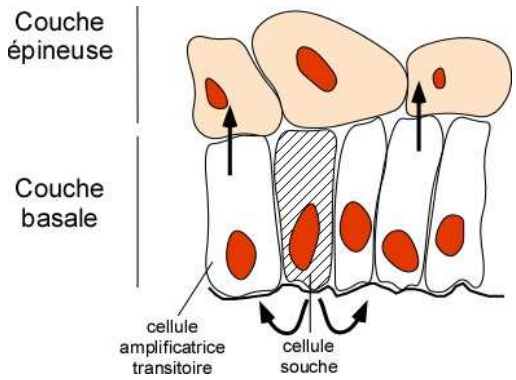


Figure I-2 : Différence de prolifération entre les cellules souches et les cellules amplificatrices transitoires.

Les intégrines

Les intégrines sont des protéines-récepteurs transmembranaires dont l'expression, dans les kératinocytes épidermiques, est réservée à la couche basale (Watt 2002). Elles sont composées de deux sous-unités, α et β, dont la combinaison donne la spécificité de l'intégrine pour son ligand (repris dans le tableau I-1) (Takada *et al.* 2007). S'il existe 18 chaînes α et 8 chaînes β différentes, c'est principalement les intégrines des types α2β1, α3β1, α6β4 et αvβ5 qui sont exprimées dans les kératinocytes tandis que l'expression des intégrines de types α5β1 et αvβ6 est induite dans les kératinocytes en culture ou lors de blessures (Watt 2002).

Les sous-unités α sont caractérisées par leur capacité à fixer les ions bivalents comme le Ca^{++}, ou le Mg^{++}, tandis que les sous-unités β sont responsables des propriétés de dimérisation (grâce à la présence de quatre répétitions d'une séquence riche en cystéine). De façon générale, le domaine C-terminal cytoplasmique est court (entre 40 et 70 acides aminés) et relié au cytosquelette d'actine. Sauf pour la sous-unité β4 qui possède un domaine cytoplasmique de 1088 acides aminés qui se lie aux filaments intermédiaires composés des kératines 5 et 14. L'association des deux sous-unités induit les propriétés d'adhérence à la matrice extracellulaire de par la reconnaissance d'un substrat particulier.

Intégrine	ligand
α2β1	collagène IV
α3β1	laminine 332
α5β1	fibronectine
α6β4	laminine 332
αvβ5	vitronectine
αvβ6	fibronectin et tenascine

Tableau I-1 reprenant les différents types d'intégrines épidermiques ainsi que leurs principaux substrats.

Les intégrines de types β1, exprimées en combinaison avec les sous-unités α2, α3 et α5 dans les kératinocytes (Larjava 1991), sont essentiellement impliquées dans les plaques d'adhésion focale, tandis que l'intégrine de type α6β4 est essentiellement décrite pour participer à la formation des hémidesmosomes attachant les kératinocytes à la lame basale de la jonction épidermo-dermique (Jones *et al.* 1991; Dans *et al.* 2001). Les cellules souches exprimeraient d'avantage les intégrines α2β1 et α3β1 (Jones *et al.* 1995) ou α6β4 (Kaur 2006), ce qui servirait à les identifier et pourrait expliquer leur adhérence plus rapide lors de la mise en culture.

Lorsque les kératinocytes basaux entament le processus de migration vers les couches supérieures, la synthèse des intégrines est arretée, tandis que les intégrines membranaires sont notamment endocytées, permettant (ou induisant) ainsi la migration du kératinocyte vers les couches supra-basales (Hotchin *et al.* 1995).

Les kératines

Les kératines sont une famille de protéines fibreuses qui s'expriment par paires et s'assemblent en tétramères afin de former les filaments intermédiaires des cellules épithéliales. Elles sont classées en kératines acides/de type I (K1 à 8) ou basiques/de type II (K9 à 20) et chaque paire de kératines contient une molécule de chaque type (Moll *et al.* 2008).

Une kératine acide et une kératine basique s'alignent tête bêche afin de former une spire enroulée, conséquence de leur structure en hélice α. Ces unités de base vont ensuite s'assembler en tétramères de 70 nm de long. L'assemblage de ces unités tétramériques forme les protofilaments de 3 mm de diamètre dont l'agglomération forme à son tour les filaments intermédiaires d'une épaisseur de 10 nm. Ces filaments s'allongent depuis les desmosomes ou les hémidesmosomes jusqu'à l'enveloppe nucléaire et forment, avec les microtubules et les microfilaments d'actine, le cytosquelette des kératinocytes. Comme les kératines présentent un taux élevé en acides aminés de type soufré, la formation de ponts disulfures intermoléculaires confère sa rigidité à l'ensemble. Lors du processus de différenciation, les kératinocytes vont successivement exprimer différentes paires de kératines qui pourront servir de marqueurs.

Le cytosquelette des cellules prolifératives de la couche basale est formé par des filaments intermédiaires de kératines 5 et 14 (K5/K14) qui sont surtout organisés en tonofilaments autour du noyau.

Les filaments de kératines 5 et 14 sont également reliés aux desmosomes et hémidesmosomes, solidifiant ainsi l'ancrage des cellules à la jonction épidermo-dermique ainsi que leur adhérence entre elles.

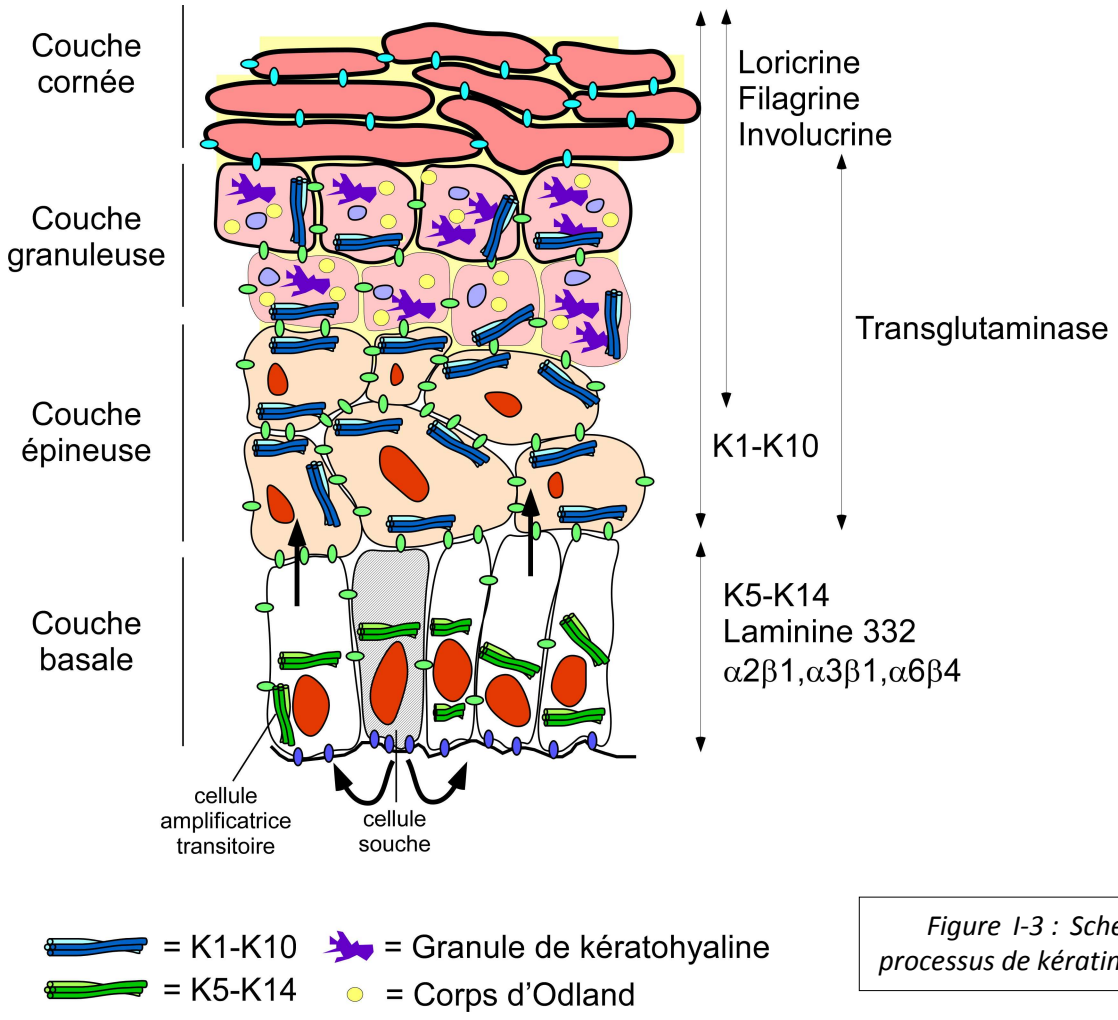


Figure I-3 : Schématisation du processus de kératinisation.

L'importance fonctionnelle de ces filaments a été montrée quand les kératines 5 et 14 sont mutées, causant la maladie connue sous le nom d'épidermolyse bulleuse simplex : la peau présente un aspect de cloque dû au déchirement des kératinocytes au niveau de la jonction épidermo-dermique, du fait que le cytosquelette des cellules à ce niveau est fragilisé (Fuchs *et al.* 1994).

Dans la couche épineuse, les cellules synthétisent d'autres filaments intermédiaires et vont remplacer la paire K5/K14 par la paire K1/K10 (Figures I-3 et I-3bis). Ces filaments, plus abondants et mieux organisés, entourent également le noyau et s'attachent aux desmosomes, procurant à la cellule une grande résistance à l'abrasion. De plus, l'expression de la kératine 10 pourrait être liée à l'arrêt de prolifération des kératinocytes puisque la sur-expression de cette kératine inhibe la prolifération de kératinocytes en culture (Paramio *et al.* 1999).

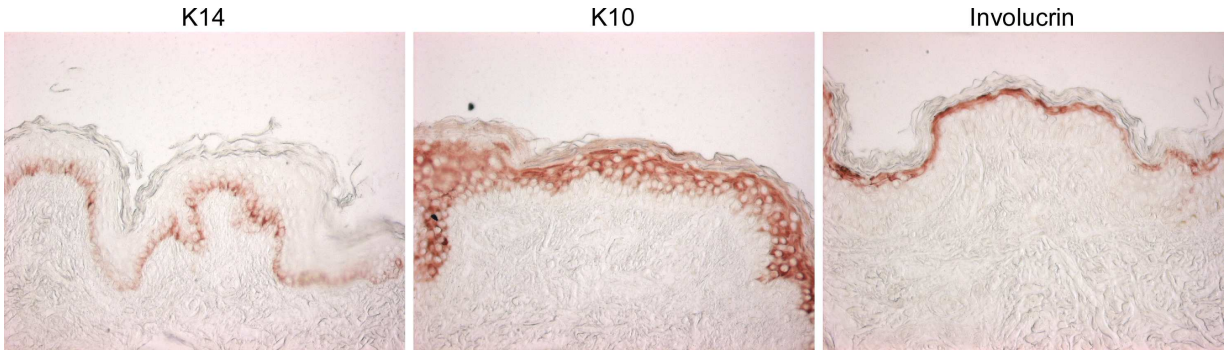


Figure I-3 bis : Marquage en immunohistochimie de différents marqueurs de différenciation.

Il est à noter que d'autres kératines peuvent être exprimées dans des sites spécifiques de l'épiderme comme par exemple K9 au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds, ou encore K2e/K11 dans les zones fines (Moll *et al.* 2008).

b. Marqueurs de différenciation

L'induction de la différenciation, associée à la stratification, ne s'avère pas être un processus passif où la cellule serait uniquement repoussée par celles en prolifération et où la perte de contact avec la membrane basale constituerait le signal initial. Il s'agirait plutôt d'un processus programmé qui requiert la participation de plusieurs facteurs comme la sortie du cycle cellulaire, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et l'activation de la PKC, ou encore la dégradation des intégrines.

Les transglutaminases

La résistance et l'insolubilité de l'enveloppe cornée (schématisée à la figure I-4) sont des caractéristiques basées sur la formation de liens isopeptides covalents très stables catalysés par les transglutaminases (dont 4 des 9 transglutaminases mammaliennes sont exprimées dans l'épiderme). Ces enzymes Ca^{++}-dépendantes permettent la formation de ponts N^{ε}-(γ-glutamyl) lysine entre les différentes protéines (i.e. loricrine, involucrine,…) formant l'enveloppe cornée (pour une revue voir Eckert *et al.* 2005).

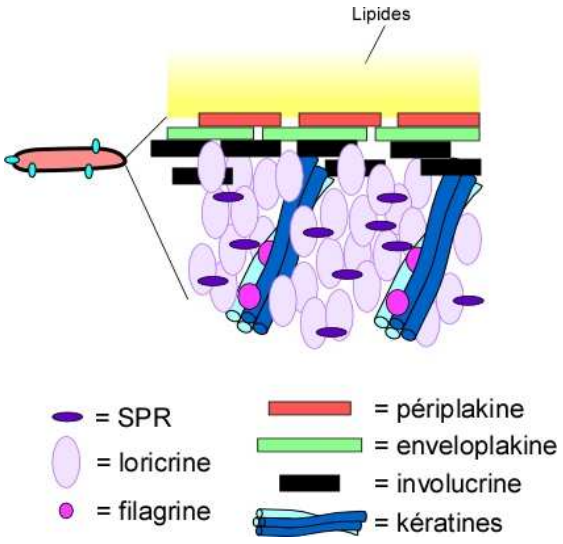


Figure I-4 : Schématisation de l'enveloppe cornée.

L'involucrine

Même si elle n'est présente qu'à 2% dans la couche cornée, l'involucrine est un composé obligatoire de l'enveloppe cornée. Cette protéine est riche en résidus glycine et aspartate et sa structure consiste en une répétition d'unités arrangée en hélice α. L'involucrine est exprimée de façon précoce (couche épineuse) et produit, avec la périplakine et l'enveloplakine, un échafaudage moléculaire adjacent à la membrane plasmique auquel les autres protéines de l'enveloppe cornée s'attacheront.

La loricrine

L'expression de la loricrine commence dans la couche granuleuse et atteint entre 70 et 85 % de la masse protéique totale dans la couche cornée. Protéine inhabituellement riche en résidus glycine, sérine et cystéine, les modèles informatiques prédisent une structure non-organisée, permettant à la loricrine de contribuer à l'élasticité de l'enveloppe cornée tout en la renforçant sur sa face cytoplasmique.

La profilagrine et la filagrine

Localisée dans les grains de kératohyaline, la profilagrine est une protéine volumineuse (~500 kDa) et massivement phosphorylée. La filagrine, c'est-à-dire le produit déphosphorylé de la profilagrine, organise les filaments de kératines. En effet, les changements morphologiques des cellules de la couche cornée

seraient dus à l'action de la filagrine qui, en faisant s'agréger le cytosquelette de kératine, induit le passage d'une forme cellulaire ellipsoïdale à une forme aplatie dans laquelle les filaments de kératines sont alignés parallèlement à la surface de l'épiderme. En plus de sa fonction structurale, la filagrine participe au maintien de la texture de la couche cornée par sa dégradation en acides aminés libres dont la haute concentration en résidus hydrophobes est essentielle pour la rétention d'eau et le maintien de l'osmolarité (et donc la flexibilité) de la couche cornée.

Les SPR's et autres

Enfin, d'autres protéines telles que les SPR (anciennement dénommées cornifines ou pancornulines), l'élafine ou la cystatine α complètent la structure de l'enveloppe cornée.

En résumé, les changements subis par le kératinocyte au cours de sa différenciation sont très diversifiés : la synthèse et la modification de protéines de structure, la réorganisation puis la perte d'organelles, l'augmentation de la taille et l'aplatissement des cellules, le changement d'un métabolisme général vers un métabolisme spécialisé en relation avec la kératinisation, la modification des propriétés de la membrane cytoplasmique, et la déshydratation progressive du cytoplasme.

En se différenciant, le kératinocyte devient de plus en plus spécialisé et limité dans ses structures et ses fonctions. Au terme de la différenciation, il est devenu un amas de kératines pratiquement inerte. Cette propriété de kératinisation qu'ont les kératinocytes, associée à celle d'être des cellules très jointives grâce à leurs nombreuses jonctions cellulaires, procure à l'épiderme une résistance élevée face aux attaques de l'environnement. Les cellules de la couche cornée, certes mortes mais protectrices, desquament et sont remplacées par d'autres grâce à la prolifération des cellules basales de telle sorte que la perte et la multiplication cellulaire soient bien équilibrées.

2 Evolution de modèles de culture des kératinocytes

Comme nous l'avons vu au cours du premier chapitre, l'épiderme est un tissu complexe mêlant quatre types cellulaires et subdivisé en quatre couches de kératinocytes se trouvant dans des états de différenciation variés. Il a donc rapidement été admis que, pour étudier la physiologie des kératinocytes épidermiques, il fallait l'isoler de l'environnement complexe que constitue l'épiderme et obtenir un modèle de culture qui permet la prolifération des kératinocytes puis leur différenciation. C'est dans cette optique que Rheinwald et Green ont développé un premier modèle de culture dans lequel les kératinocytes, isolés de l'épiderme, sont ensemencés sur un lit de fibroblastes irradiés (servant de couche nourricière puisque toujours capables de synthétiser divers facteurs non définis), tandis que le milieu de culture contient du sérum de veau fœtal ainsi que de l'EGF, de l'insuline et de la toxine cholérique (pour son effet bénéfique sur la production d'AMP cyclique)(Rheinwald & Green 1975). Au cours de la culture, les kératinocytes vont entrer en compétition avec les fibroblastes afin de coloniser le substrat en plastique de la boîte de culture et certaines cellules vont quitter l'ancrage basal afin de migrer et produire une stratification qui accompagnera (ou sera induite par) la différenciation de la cellule.

Cependant, au vu de la présence des fibroblastes et du sérum de veau fœtal dans ce modèle, tous les facteurs de croissance ne sont pas connus et donc ne sont pas contrôlés, générant une culture au cours de laquelle les kératinocytes expriment de façon précoce les marqueurs de différenciation comme l'involucrine et répriment les kératines suprabasales, démontrant une perturbation du programme de différenciation dans ces conditions de culture. Bien que ce modèle ait été utilisé dans de nombreuses études, il présente certaines limitations, expliquant vraisemblablement l'émergence de nouveaux modèles.

En 1983, Boyce et Ham ont développé un milieu de culture (le MCDB 153) permettant la culture des kératinocytes en absence de couche nourricière, de sérum de veau fœtal et contenant une concentration en calcium de 0,3 mM. Ce type de culture reste également dépendant de l'apport d'EGF et d'extrait pituitaire bovin, apportant toujours des facteurs de croissance inconnus dans la composition du milieu (Boyce & Ham 1983). Des études ayant montré que l'augmentation de la concentration en calcium extracellulaire était accompagnée de la différenciation des kératinocytes murins (Yuspa *et al.* 1989), cet ion a donc été supposé être un élément régulateur de la différenciation épidermique. En effet, le calcium est impliqué de façon très nette dans les changements architecturaux (tels que l'assemblage des desmosomes ou la stratification) qui accompagnent le processus de différenciation (Hennings *et al.* 1980; Watt 1984). Cependant son implication dans le contrôle des gènes régulant la différenciation n'était pas très claire.

Il a ensuite été montré que l'extrait pituitaire bovin ainsi que les apports en EGF et insuline n'étaient indispensables que lors de l'initiation de la croissance des colonies clonales de kératinocytes. En effet, dès que les cellules atteignent une densité suffisante (entre 40 et 60% de la surface de culture), elles deviennent capables de proliférer sans ajout de facteurs exogènes en raison de leur capacité à synthétiser l'amphiréguline (Cook *et al.* 1991). Ce ligand active le récepteur de l'EGF, responsable de la croissance autocrine des kératinocytes dans ces conditions (Pittelkow *et al.* 1993). A partir de ce moment, les kératinocytes sont dans des conditions de culture où tous les facteurs sont contrôlés et qui permettent la mise en place du processus de différenciation équivalent à celui développé par les cellules *in vivo* sans ajout de calcium. En effet, une fois le stade de confluence atteint, la prolifération est inhibée et les kératinocytes exhibent les marqueurs de différenciation précoce comme l'involucrine ou la kératine 10 de façon indépendante de la concentration en calcium (Poumay & Pittelkow 1995). Si la culture est prolongée au-delà de la confluence, les kératinocytes développent un phénotype différencié (Poumay *et al.* 1999; Minner *et al.* 2009).

Le modèle de culture employé actuellement au laboratoire pour la culture des kératinocytes humains normaux utilise le milieu de culture Epilife® développé par la firme Cascade Biologics et distribué par Invitrogen. Tous les facteurs présents dans ce milieu sont contrôlés. Il est donc possible d'étudier les effets spécifiques d'un élément ajouté au milieu de culture, mais également d'étudier les facteurs sécrétés par les kératinocytes dans certaines circonstances.

3 Les "lipid rafts" ou radeaux lipidiques

3.1 L'hypothèse

La description de la membrane plasmique des cellules eukaryotes a largement évolué depuis la "mosaïque fluide" de Singer et Nicolson en 1972 (Singer & Nicolson 1972). Dans ce modèle, la membrane est décrite comme étant organisée en bicouche et les têtes polaires des phospholipides sont directement en contact avec le milieu extracellulaire (et non couvertes d'une couche de protéines comme proposé par Davson et Danielli) tandis que les protéines membranaires "flottent " dans ou en surface des lipides. Le terme fluide reflète d'une part, le fait que la membrane est parfaitement déformable, c'est-à-dire que les phospholipides peuvent exécuter quatre mouvements: diffusion latérale, rotation, battement des queues hydrophobes et, plus rarement, flip-flop et d'autre part, le fait que les protéines intégrales ont la possibilité de se déplacer latéralement dans le plan de la membrane.

Plus tard, l'observation de cellules épithéliales, dont la membrane plasmique est polarisée en domaines apical et basolatéral, a révélé une distribution asymétrique des protéines à ancre GPI avec une préférence pour la partie apicale de la cellule. Afin d'expliquer cette distribution préférentielle, il a été proposé que des agglomérats de glycosphingolipides se formaient dans les feuillets exoplasmiques de l'appareil de Golgi, représentant des centres de triage pour les protéines destinées à être délivrées au pôle apical de la cellule.

Proposée en 1997 par Simons et Ikonen, l'hypothèse des *lipid rafts* suppose donc l'organisation de la membrane en micro-domaines membranaires dynamiques dont les protéines peuvent être sélectivement inclues ou exclues. Cette ségrégation de lipides et de protéines est importante dans le contrôle de fonctions cellulaires cruciales, comme le trafic vésiculaire ou encore la signalisation (Simons & Ikonen 1997).

Parce que le cholestérol est une molécule rigide et qu'il enrichit les *lipid rafts*, il a été proposé que ces régions soient plus ordonnées et structurées que la membrane environnante. Par conséquent, les molécules se trouvant dans les *lipid rafts* ont une mobilité réduite par rapport aux phospholipides et autres molécules désordonnées les entourant (Brown & London 1998). Ce rôle crucial du cholestérol dans la structure des *lipid rafts* est attesté par le fait, d'une part qu'il a un effet condenseur sur les phospholipides (un mélange de cholestérol et de phospholipides occupe une surface moindre que la surface attendue pour la somme de ses constituants) et d'autre part, parce que des liposomes contenant du cholestérol génèrent des domaines résistants aux détergents équivalents aux *lipid rafts* (Schroeder *et al.* 1994).

3.2 Le concept des lipid rafts

Les *lipid rafts* sont des micro-domaines membranaires et leur capacité de recruter/exclure des lipides/protéines spécifiques est à l'origine de leur implication dans de nombreux processus cellulaires comme la transduction des signaux, le trafic membranaire, l'organisation du cytosquelette, mais également l'entrée de certains pathogènes (Rosenberger *et al.* 2000; van der Goot & Harder 2001). Ces domaines membranaires sont enrichis en stérols, sphingolipides et phospholipides, mais contiennent également des protéines telles que la flotilline, les Src kinases ou encore certains récepteurs membranaires tels que le récepteur du PDGF, le récepteur de l'insuline ou encore le récepteur de l'EGF (pour une revue, voir de Laurentiis *et al.* 2007).

Les *lipid rafts* peuvent être isolés grâce à leur insolubilité face à certains détergents à 4°C, ils ont donc également été nommés "domaines membranaires résistants aux détergents" (DRM), mais également "membranes enrichies en glycolipides", et le fait que ces domaines soient relativement ordonnés par rapport à la membrane environnante leur a également valu l'appellation *liquid-ordered phase*. Mais plus les expériences sont devenues performantes, plus les chercheurs se sont rendu compte que ce qu'ils nommaient DRM, DIG,…étaient plus ou moins la même chose, que Simons et Ikonen conceptualisèrent sous le nom de *lipid rafts* (Simons & Ikonen 1997).

La diversité des noms donnés à ces domaines reflète l'hétérogénéité des moyens utilisés lors de leur analyse. De plus, le fait que la définition et la composition des *rafts* soient encore vagues, l'impossibilité de réaliser des observations directes de ces structures ainsi que les méthodes de travail variables et incertaines expliquent le scepticisme de certains chercheurs à l'égard de l'existence de tels domaines (Shaw 2006). De plus, certaines régions membranaires comme les cavéoles ont posé problème concernant leur appartenance ou non aux *lipid rafts*. Nous allons donc préciser quelles sont les distinctions, mais également les similitudes de ces régions membranaires.

Les *lipid rafts* non cavéolaires sont des domaines dynamiques contenant des complexes moléculaires définis par Lai comme des "objets flottants non identifiés" (Lai 2003) car, comme nous le verrons par la suite, les chercheurs n'ont pas encore atteint le stade où ils peuvent définir clairement ce que sont les *lipid rafts* et quelles protéines s'y trouvent. D'une part à cause de la taille de ces domaines : ils apparaissent petits et instables dans les cellules au repos, tandis qu'en réponse à une stimulation, ils se rassemblent et coalescent afin de former des structures plus grandes et stables (Kusumi *et al.* 2004). D'autre part, si différentes techniques ont été développées afin d'étudier les *lipid rafts*, chacune possède des désavantages, essentiellement au niveau de la création d'artéfact. En effet, la visualisation en microscopie nécessite la fixation des échantillons avec des aldéhydes et/ou l'utilisation de sondes (anticorps, toxine cholérique) qui auront pour effet d'induire le regroupement des molécules contenues dans les *lipid rafts*

au lieu de les fixer dans leur configuration originale. Tandis que les techniques de centrifugation peuvent induire des faux négatifs : des protéines restent attachées au cytosquelette et donc ne flottent pas après la solubilisation; ou encore des protéines dont l'association avec les *lipid rafts* est si faible qu'elle ne résiste pas à la solubilisation (Simons & Toomre 2000). De plus, l'utilisation de détergents semble également interférer avec la composition des *lipid rafts*, rendant l'identification de leurs composants variable suivant le type de détergent utilisé (Heerklotz 2002; Pike *et al.* 2005).

Le cholestérol paraissant être un des composants principaux des *lipid rafts*, la chélation de ce composé par des molécules comme la méthyl-β-cyclodextrine (MβCD) ou bien sa séquestration par la filipine III ou la nystatine sont largement utilisées afin d'étudier la composition protéique des *rafts*. Ces études peuvent évidemment être contestables du fait que la séquestration du cholestérol induit forcément une perturbation de la structure initiale des *lipid rafts*. Dans notre étude, nous allons principalement utiliser la MβCD afin de diminuer le cholestérol membranaire nécessaire au fonctionnement cellulaire normal.

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique de 50-70 nm. Elles sont impliquées dans des processus cellulaires comme le trafic des lipides (Smart *et al.* 1996) ou encore la transduction du signal (Lisanti *et al.* 1995). Les cavéoles contiennent une protéine de 22 kDa : la cavéoline, mais dépourvues d'un manteau de clathrine, à l'instar des puits couverts de clathrine (CCP). La cavéoline est une protéine palmitoylée du côté N-terminal et pouvant être phosphorylée sur la Tyr 14, dont la structure en épingle à cheveux permet la formation d'oligomères, la liaison du cholestérol (Murata *et al.* 1995) et la stabilisation des invaginations membranaires que sont les cavéoles (Fra *et al.* 1995). Le fait de détecter la cavéoline dans ce que l'on qualifiait de DRM a conduit à l'idée que ces dernières sont issues des cavéoles. Cependant, on trouve des DRM dans des cellules n'exprimant pas la cavéoline, et si la fraction des DRM peut être significativement importante, celle contenant la cavéoline est mineure (Fra *et al.* 1994). Il semblerait donc que les cavéoles ne soient qu'une catégorie de rafts membranaires.

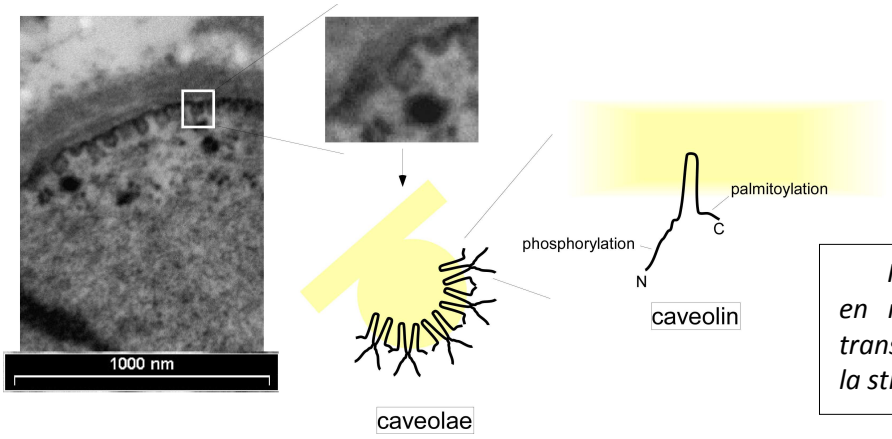


Figure I-5 : Représentations en microscopie électronique à transmission et schématique de la structure des cavéoles.

Le fait que les cavéoles contiennent également des agrégats de glycosphingolipides, aient besoin du cholestérol pour être fonctionnelles et soient impliquées dans des processus d'endocytose et de transcytose, rendit la fonction putative des *rafts* plausible puisqu'ils forment des structures partageant la plupart des caractéristiques des cavéoles (à l'exception de la présence de cavéoline).

Le terme *lipid rafts* a donc longtemps servi (et sert encore) à englober toutes les régions membranaires correspondant à divers critères tels que "riche en cholestérol", "*liquid-ordered phase*",… et la définition à apporter à ces régions a été récemment déterminée. Ainsi, le terme de *lipid rafts* devrait être abandonné au profit de *membrane rafts*. Ceux-ci ont été définis comme étant : "Des petites structures (10-200 nm), hétérogènes et hautement dynamiques, enrichies en stérols et sphingolipides, qui compartimentent les processus cellulaires. Les petits radeaux peuvent se stabiliser afin de former des plates-formes plus larges par des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides" (Pike 2006).

Cette définition reste cependant conceptuelle puisqu'elle ne donne aucune indication quant à la détermination pratique des protéines présentes dans ou hors des *lipid rafts*. Une définition fonctionnelle semble impliquer la dépendance des *lipid rafts* au cholestérol (Foster *et al.* 2003). Les moyens utilisés afin d'étudier la structure des *lipid rafts* ainsi que leur composition en protéines restent également un problème à l'heure actuelle, puisque les études visent soit à étudier les *lipid rafts* dans un contexte particulier (tissu, type cellulaire), soit à étudier leur réaction en réponse à un stimulus particulier.

A l'heure actuelle, si la définition apportée aux *lipid rafts* est physique (un domaine membranaire) et est imprégnée de fonctions spécifiques (signalisation et trafic intracellulaire), la définition de travail est biochimique : les protéines sont nécessairement localisées dans les *lipid rafts* (incluant les cavéoles) si elles sont insolubles dans les détergents non-ioniques à faible température (par exemple le Triton X-100 à 4°C) et flottent dans des gradients de saccharose (déterminé par la présence de cavéoline ou de flotilline). Ce sont ces critères biochimiques qui servent actuellement le plus souvent à isoler et identifier les *lipid rafts*.

Quoiqu'il en soit, les scientifiques essayent de trouver une conclusion non ambiguë concernant l'origine, la composition en lipides et protéines, la taille et la durée de vie de ces domaines membranaires. Tout au long de ce travail, nous nommerons *lipid rafts* les régions membranaires riches en cholestérol, donc déstabilisables par le retrait de ce composant.

4 La famille HER/ErbB

Le récepteur de l'EGF fut le premier récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) à être découvert (Carpenter & Cohen 1978). Il fut nommé ErbB en raison de l'homologie de sa portion intracellulaire avec l'oncogène de l'*avian erythroblastosis virus*, induisant les érythroblastoses chez le poulet (Downward *et al.* 1984). Après son identification, trois membres additionnels de la famille HER (Human EGF Receptor) ont été identifiés de par leurs similarités de structure et de fonction (Coussens *et al.* 1985; Kraus *et al.* 1989; Plowman *et al.* 1990). Malgré la conservation d'une structure générale commune, les différences observées dans la partie C-terminale des quatre membres de la famille HER résultent en une modification des molécules de signalisation interagissant avec la partie cytoplasmique des récepteurs, ce qui a pour conséquence d'augmenter le nombre de voies de signalisation induites par un seul ligand, ou un seul récepteur (Yarden & Sliwkowski 2001).

Cette diversification des voies de signalisation dépendant des membres de la famille HER s'est développée au cours de l'évolution. En effet, le module de signalisation EGFR s'est complexifié, passant d'un module simple et linéaire chez *Caenorhabditis elegans* (un récepteur LET-23 et un ligand TGFα-like LIN-3) (Aroian *et al.* 1990; Chang & Sternberg 1999), à une diversification des ligands (un récepteur DER, trois ligands stimulateurs Spitz, Vein et Gurken et un ligand inhibiteur Argos pour *Drosophila melanogaster*) (Schweitzer & Shilo 1997; Stein & Staros 2000), puis vers un système complexe, comportant quatre récepteurs et plus de dix ligands chez les mammifères (Harris *et al.* 2003).

4.1 Les différents ligands

L'intérêt au sujet de l'activation du récepteur de l'EGF par des ligands a été généré suite aux observations de Stanley Cohen dans les années 1960 : l'administration d'EGF à des souriceaux nouveau-nés induisait des effets tels qu'une ouverture précoce des yeux suggérant une croissance épidermique accélérée, ou encore l'éruption prématurée des dents (Cohen 1965). L'activation des récepteurs HER est donc contrôlée par la régulation spatiale et temporelle de leurs ligands, au nombre de onze (repris dans le tableau I-2) (Yarden & Sliwkowski 2001)

Ces peptides sont produits sous forme de précurseurs ancrés en membrane par leur portion C-terminale. Les ligands solubles sont obtenus suite au clivage protéolytique de l'ectodomaine, constituant le facteur de croissance. Typiquement, un ligand peut interagir avec les récepteurs de sa cellule d'origine (stimulation autocrine si le ligand est clivé) ou des cellules voisines (juxtacrine s'il reste ancré en membrane) ou encore peut être relâché dans le milieu extra-cellulaire où il interagira avec les récepteurs de surface d'autres cellules en se répandant dans le tissu (stimulation paracrine) (revu dans Singh & Harris 2005).

Ligand	Récepteur			
	EGFR	HER2/ErbB2	HER3/ErbB3	HER4/ErbB4
EGF	+	-	-	-
TGFα	+	-	-	-
HB-EGF	+	-	-	+
Amphiregulin	+	-	-	-
Betacellulin	+	-	-	+
Epigen	+	-	-	-
Epiregulin	+	-	-	+
Neuregulin-1	-	-	+	+
Neuregulin-2	-	-	+	+
Neuregulin-3	-	-	-	+
Neuregulin-4	-	-	-	+

Tableau I-2 reprenant les différents ligands interagissant avec les membres de la famille HER.

Tous les ligands des récepteurs HER contiennent une séquence consensus d'une quarantaine d'acides aminés connue comme étant le motif EGF. Ce motif inclut 6 résidus cystéines permettant la formation de trois ponts disulfures responsables de la structure en feuillet β caractérisant les membres de la famille EGF et leur conférant leur spécificité de liaison (revu dans Harris *et al.* 2003; Schneider & Wolf 2009)(voir figure I-6).

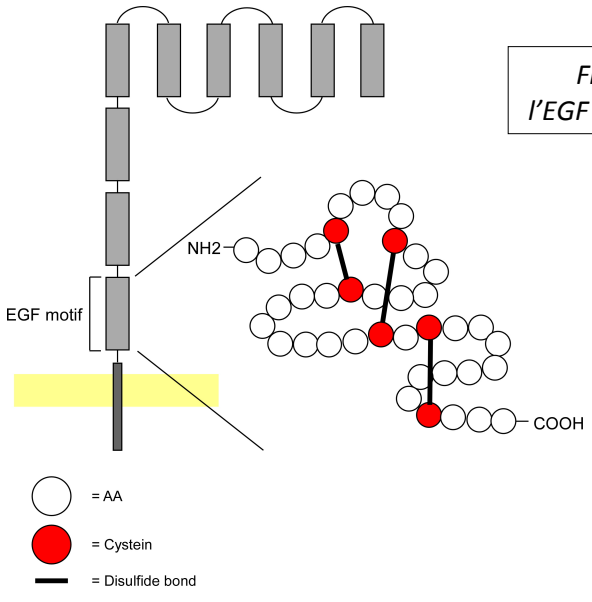


Figure I-6 reprenant la structure du précurseur de l'EGF ainsi que du motif EGF (d'après Harris, 2003).

Bien que plusieurs ligands puissent se lier à un même récepteur ou que chaque récepteur (à l'exception de HER2) puisse lier différents ligands, les effets de l'activation des récepteurs HER ne sont pas redondants. En effet, les résidus phosphorylés en réponse à la liaison d'un ligand sont fonctions du ligand ainsi que de l'identité des partenaires d'hétérodimérisation (Olayioye *et al.* 1998).

Il est à noter que les kératinocytes épidermiques ne produisent pas d'EGF (Byyny *et al.* 1972). Dans ces cellules, l'activation du récepteur de l'EGF est donc principalement tributaire de la production de TGFα, d'amphiréguline ou encore d'HB-EGF (Coffey *et al.* 1987; Hashimoto *et al.* 1994; Piepkorn *et al.* 1994). Ces facteurs de croissance possèdent une homologie de séquence relativement faible (~25%) et diffèrent également par la distribution des sites de glycosylation et la présence (dans le cas de l'amphiréguline et d'HB-EGF) d'un domaine liant l'héparine (Harris *et al.* 2003).

4.2 Le récepteur de l'EGF

Le récepteur de l'EGF régule certaines fonctions fondamentales des cellules (surtout épithéliales), notamment la survie, la migration et la prolifération. Son importance au niveau de la peau a été démontrée dans les années 1980 où les premières observations établissaient une relation entre la croissance épidermique et la localisation du récepteur de l'EGF chez le rat (Green *et al.* 1983; Green & Couchman 1984). De plus, des études réalisées avec des souris *knockout* pour le gène EGFR indiquent que ces dernières présentent une atrophie épidermique ainsi que de sérieuses perturbations au niveau du développement de la peau (Miettinen *et al.* 1995). Le récepteur de l'EGF est donc impliqué de façon cruciale dans le maintien de l'homéostasie du tissu épidermique.

4.2.1 Structure du récepteur de l'EGF

Le récepteur de l'EGF est synthétisé sous forme d'un précurseur de 1210 résidus. Le peptide signal N-terminal de 24 acides aminés est ensuite clivé afin de produire la forme finale de 1186 acides aminés (Gullick *et al.* 1985) (voir figure I-5) laquelle forme une glycoprotéine de 170 kDa localisée dans la membrane plasmique. La structure du récepteur de l'EGF comporte un domaine extracellulaire de 621 acides aminés contenant un domaine de liaison au ligand ainsi que deux régions riches en cystéines, permettant la formation de dimères. Suivent un domaine transmembranaire simple de 23 acides aminés et un domaine intracellulaire de 542 acides aminés contenant le module tyrosine kinase et la queue C-terminale, incluant les résidus tyrosines phosphorylables.

Domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire du récepteur de l'EGF est divisé en quatre sous-domaines notés de I à IV, également connus sous l'appellation L1, S1, L2 et S2. Les domaines I et III (L1 et L2) partagent 37% d'identité et forment le site de liaison du ligand, tandis que les domaines II/S1 et IV/S2 sont homologues pour un domaine riche en cystéines (CR1 et CR2) formé de trois répétitions de huit cystéines et partagent 17% d'identité (Ferguson *et al.* 2003) (voir figure I-7). Ces régions permettent la formation de ponts disulfures nécessaires à la dimérisation des récepteurs (Abe *et al.* 1998). Le domaine II/S1 agit comme échafaudage afin de positionner les domaines I/L1 et III/L2 dans une orientation générant la formation d'une poche de liaison pour le ligand.

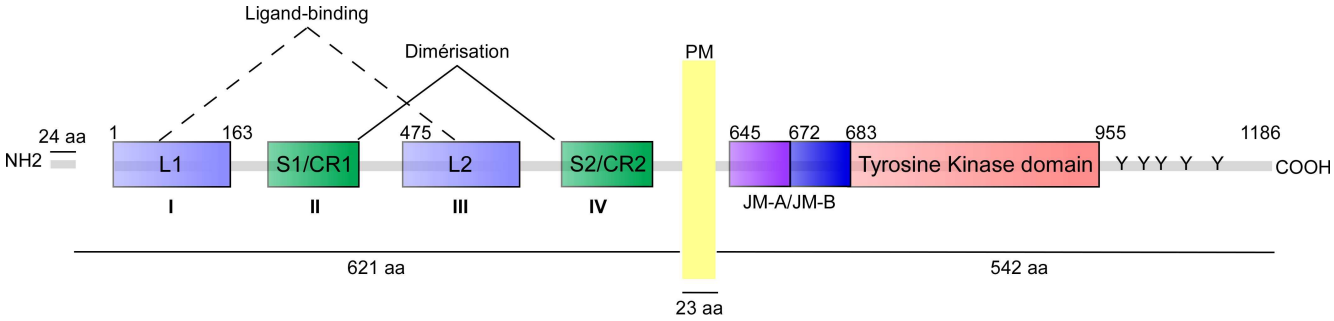


Figure I-7 : Représentation schématisée des principaux domaines du récepteur de l'EGF.

Cependant, si le rôle des domaines I/L1, II/S1 et III/L2 lors de la liaison du ligand et de la formation des dimères est relativement bien compris à l'heure actuelle, la fonction du domaine IV/S2 reste trouble, soit parce que les études sont réalisées avec un mutant présentant une délétion pour cette portion du récepteur (Garrett *et al.* 2002), soit parce que la structure obtenue par cristallographie est désordonnée (Ogiso *et al.* 2002). Néanmoins, des études de la structure d'HER3 tendent à indiquer un rôle de ce domaine IV/S2 dans la régulation de l'affinité de liaison du récepteur pour un ligand. Cette régulation serait opérée par des interactions entre les domaines II/S1 et IV/S2 contraignant une réorientation des domaines I/L1 et III/L2, résultant en une affinité réduite du récepteur pour son ligand (Cho & Leahy 2002). Cette fonction putative du domaine IV/S2 est confirmée par l'étude du récepteur de l'EGF ne comportant que la partie 1-501. Ce mutant présente une affinité très forte pour l'EGF et le TGFα et joue le rôle d'inhibiteur compétitif du récepteur intact (Elleman *et al.* 2001). Après la liaison du ligand, le domaine IV/S2 pourrait agir en tant qu'écarteur en contrôlant l'orientation de domaine extracellulaire par rapport au domaine transmembranaire, mais forme également un site additionnel de stabilisation de l'interaction récepteur-récepteur.

Domaine cytoplasmique

Le domaine cytoplasmique englobe une région juxtamembranaire (dont les deux segments sont nommés JM-A et JM-B), une région possédant une activité tyrosine kinase et une queue C-terminale contenant cinq motifs d'autophosphorylation (Tyr 992, 1068, 1086, 1148 et 1173) et trois motifs d'internalisation (aa 973, 996 et 1149).

De façon générale, la fonction principale de la partie cytoplasmique du récepteur de l'EGF est contenue dans le module tyrosine kinase. En effet, la stimulation du récepteur induit la dimérisation du récepteur suivie d'une transphosphorylation rapide des résidus tyrosines contenus dans la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase. La phosphorylation des tyrosines déclenche d'une part l'activation de la fonction tyrosine kinase du récepteur, et d'autre part permet la formation d'un contexte spécifique fournissant les sites d'interactions avec des protéines adaptatrices ou de signalisation possédant un domaine SH2 ou PTB (Pawson & Schlessingert 1993).

En absence de ligand, la partie C-terminale du récepteur fonctionne comme un substrat auto-inhibiteur de l'activité tyrosine kinase (Zhang *et al.* 2006). Cette inhibition est probablement due à des torsions induites par le domaine extracellulaire, puisqu'en absence de ce domaine, le module tyrosine kinase est constitutivement actif. La liaison d'un ligand permet donc la formation d'une configuration "dimère actif", même si le récepteur de l'EGF ne requiert pas nécessairement un domaine tyrosine kinase catalytiquement compétent pour dimériser (Chantry 1995).

4.2.2 Localisation du récepteur de l'EGF dans la membrane plasmique

Tous les récepteurs sont synthétisés et amenés du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique ou recyclés depuis les endosomes. La distribution du récepteur en membrane pourrait donc être aléatoire ou être plus ciblée en confinant le récepteur de l'EGF dans des régions spécialisées comme les *lipid rafts* ou les cavéoles.

Si Mineo *et al.* ont montré qu'une population significative (40-60%) du récepteur de l'EGF non stimulé semble être localisée dans des fractions de membrane enrichies en cavéoline (Mineo *et al.* 1999), d'autres études indiquent cependant un emplacement plus aléatoire de EGFR au sein de la membrane plasmique (Ringerike *et al.* 2002; Roepstorff *et al.* 2002; Pike *et al.* 2005). L'étude de Mineo *et al.* ayant été réalisée par fractionnement d'un gradient de densité, les résultats obtenus pourraient être dus au fait qu'une telle méthode ne permet pas de dissocier les protéines purement cavéolaires des protéines contenues dans les *lipid rafts* non cavéolaires, car la flottabilité des cavéoles et des *lipid rafts* est semblable.

Quoiqu'il en soit, et bien que la localisation exacte du récepteur de l'EGF soit encore incertaine, il est clair que le cholestérol ou les régions de la membrane contrôlées par le cholestérol affectent le

fonctionnement du récepteur de l'EGF (Chen & Resh 2002; Pike & Casey 2002; Orr *et al.* 2005), la localisation de EGFR pouvant être dynamique et l'interaction entre le récepteur de l'EGF et d'autres protéines de la membrane étant affectée par leur microenvironnement membranaire.

De plus, si la localisation membranaire du récepteur de l'EGF est baso-latérale dans les cellules épithéliales polarisées (Kuwada *et al.* 1998), dans les kératinocytes, aucune asymmétrie spatiale n'est observée dans les kératinocytes des couches basales. En effet, ce n'est qu'à partir de la couche granuleuse que les claudines et les occludines sont synthétisées de façon concomitante, permettant la formation des jonctions serrées responsables à ce niveau de la polarisation des kératinocytes dans l'épiderme (Tsukita & Furuse 2002; Morita & Miyachi 2003).

4.2.3 Activation du récepteur de l'EGF

Liaison du ligand et changement de conformation

Les complexes ligand-récepteur sont arrangés en forme de "C" dans laquelle le ligand est coincé entre les domaines I/L1 et III/L2 du récepteur. Cette liaison va imposer des contraintes d'arrangement impliquant un déploiement de la partie extracellulaire. La conséquence la plus notable de ce déploiement est l'exposition d'une boucle du domaine II/S1 : une région d'une vingtaine de résidus (appelé bras de dimérisation), formant une épingle à cheveux saillant du domaine II de chaque récepteur, va ainsi dévoiler les sept résidus extrêmes de la boucle servant de "main" qui pourront ainsi interagir avec l'autre membre du dimère en formant des ponts disulfures et qui peuvent donc stabiliser la conformation déployée (Ogiso *et al.* 2002) (voir figure I-8).

Deux populations de récepteurs co-existent : elles sont reconnues par leurs constantes de dissociation reflétant leurs affinités pour le ligand. Une minorité des récepteurs (2-5%) ont une affinité très forte (0,1 nM), tandis que la majorité des récepteurs ont une affinité plus faible, ne leur permettant de lier l'EGF qu'à des concentrations de 10 nM (Ozcan *et al.* 2006).

Dimérisation

Comme expliqué précédemment, la liaison d'un ligand au récepteur de l'EGF induit la stabilisation de la dimérisation des récepteurs de l'EGF. Cette dimérisation pourrait être due à trois possibilités topologiques:

- Une interaction avec deux molécules d'EGF.
- la "bivalence du ligand" (c'est-à-dire la possibilité pour chaque ligand de lier deux récepteurs) (Gullick 1994).
- un mécanisme induit par le récepteur durant lequel la liaison du ligand induit des changements de conformation induisant l'exposition d'une surface de dimérisation.

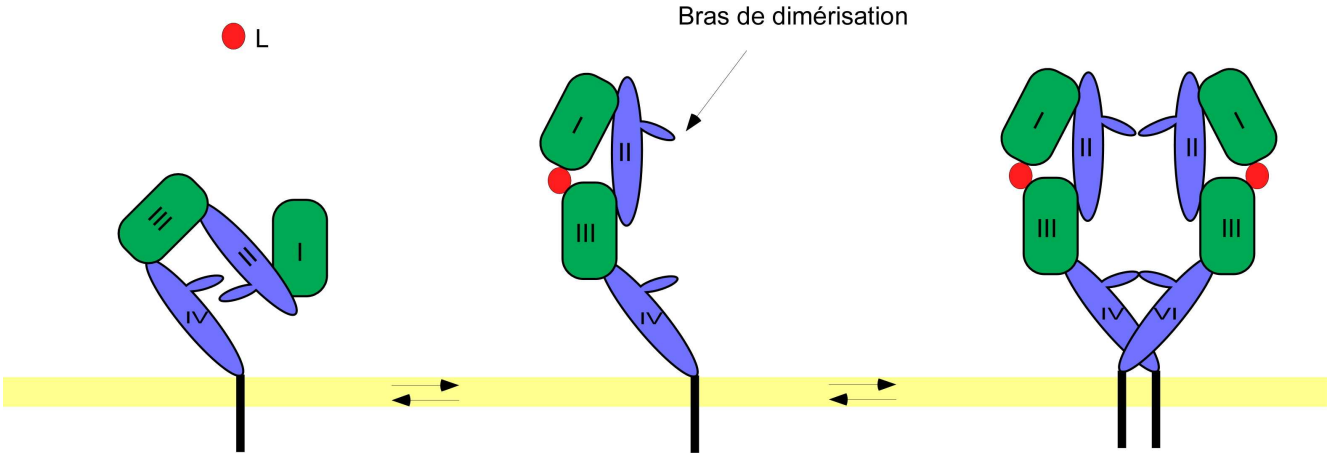


Figure I-8 : Représentation schématique de la séquence de dimérisation du récepteur de l'EGF (adapté de Linggi & Carpenter 2006).Une fois le ligand présent, sa liaison à son site (entre les domaines II et III) induit un déploiement du récepteur, exposant les bras de dimérisation.

L'étude par cristallographie de molécules d'EGF complexées au récepteur a permis de réfuter certaines de ces hypothèses et montrer que l'interaction ligand récepteur est de type 2:2 (deux molécules de ligand pour deux récepteurs), chaque ligand interagissant avec les domaines I/L1 et III/L2 d'un récepteur (Lemmon *et al.* 1997). Il est intéressant de noter que tous les contacts intermoléculaires sont médiés par le récepteur de l'EGF lui-même et non par le ligand comme c'est le cas pour d'autres récepteurs comme le récepteur de l'IFN γ (Fountoulakis *et al.* 1990).

Malgré l'importance de son rôle dans l'activation du récepteur de l'EGF, il semblerait que la dimérisation du récepteur de l'EGF soit un événement mécanistiquement dissociable de son activation étant donné qu'on trouve des dimères pré-formés en membrane (Yu *et al.* 2002; Tao & Maruyama 2008). Ces dimères se forment dans le réticulum endoplasmique et restent inactifs puisque le ligand est nécessaire dans l'induction d'une torsion de la partie transmembranaire du récepteur. Cette rotation cause la dissociation des domaines intracellulaires, permettant à la partie catalytique du domaine tyrosine kinase d'être accessible pour ses substrats tyrosines (Moriki *et al.* 2001) (Figure I-9). Le rôle de la dimérisation reste cependant difficile à analyser de façon indépendante de l'activité kinase du récepteur puisqu'on ne dispose pas à l'heure actuelle d'inhibiteur spécifique de la dimérisation (qui donc n'affecterait pas l'activité kinase).

Activation du module tyrosine kinase

Il est généralement accepté que l'activation du récepteur de l'EGF de façon dépendante d'un ligand est suivie par l'activation du domaine catalytique du module tyrosine kinase et de la transphosphorylation intermoléculaire de résidus tyrosine clés. Le module tyrosine kinase est constitutivement inactif du fait que la boucle d'autophosphorylation adopte une configuration qui entrave son accès à l'ATP ainsi qu'aux

substrats tyrosines. Après liaison du ligand, la boucle acquiert une "configuration ouverte" permettant l'accès de l'ATP et des substrats, résultant en une augmentation de l'activité tyrosine kinase du récepteur (Zhang *et al.* 2006).

Les deux domaines tyrosine kinases forment un dimère asymétrique où le lobe C du récepteur receveur interagit avec le lobe N du récepteur activateur. Cette interaction active le domaine tyrosine kinase du récepteur activateur qui pourra alors phosphoryler les tyrosines de la queue C-terminale du récepteur receveur (voir figure I-9).

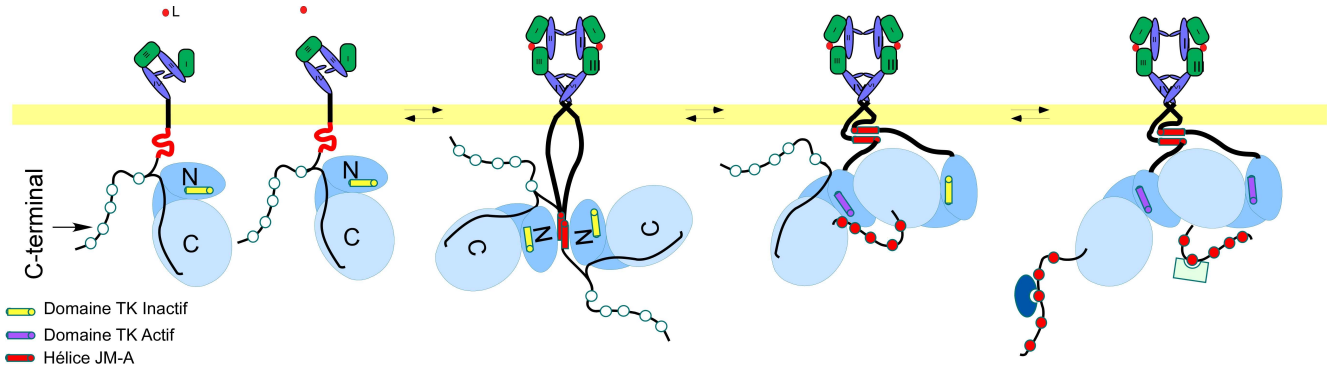


Figure I-9 : Schématisation des changements de conformation induisant l'activation du module tyrosine kinase.

Il est à noter que le domaine transmembranaire du récepteur de l'EGF contient également un point de dimérisation (Duneau *et al.* 2007) et que les segments juxtamembranaires JM-A des récepteurs activateur et receveur forment également des dimères hélicoïdaux rassemblés de façon parallèle ou anti-parallèle (Jura *et al.* 2009; Red Brewer *et al.* 2009). Ces segments juxtamembranaires sont par ailleurs requis lors de l'activation du domaine tyrosine kinase du récepteur de l'EGF puisque la délétion de ces régions résulte en la perte de l'activité kinase du récepteur (Thiel & Carpenter 2007).

Beaucoup de protéines à activité tyrosine kinase ne catalysent pas uniquement la phosphorylation de substrats exogènes, elles peuvent également être l'objet de leur propre autophosphorylation sur de multiples sites endogènes. La perte de ces sites de phosphorylation suite à la délétion de la partie C-terminale semble être la marque de nombreux oncogènes dérivés de ces protéines à activité tyrosine kinase (revu par Yarden & Ullrich 1988). Il a donc été suggéré que de telles délétions pouvaient jouer un rôle dans la transformation oncogénique et les différents sites, tant d'autophosphorylation (tyrosines) que de phosphorylation (sérines/thréonines) du récepteur de l'EGF ont été investigués. Nous ne décrirons ici que les sites les plus importants.

- ***Phosphorylation des tyrosines***

Tous les sites de transphosphorylation des tyrosines du récepteur de l'EGF ont été conservés chez les mammifères et sont localisés en aval du domaine tyrosine kinase. Trois de ces sites sont dits majeurs (Tyr 1068, 1148, 1173) et deux sont mineurs (Tyr 992 et Tyr 1086).

Toutes les tyrosines, une fois phosphorylées, vont former un contexte de liaison pour des protéines contenant des domaines SH2 ou PTB. Certaines de ces protéines sont des adaptatrices comme:

- la protéine Shc, qui possède des sites de liaison au niveau des pTyr 1148 et 1173, la pTyr 1148 étant le site majeur de liaison permettant la transduction du signal entre le récepteur de l'EGF et Ras (Okabayashi *et al.* 1994).

- Grb2, jouant un rôle important dans la signalisation dépendant de Ras. Sa structure contenant un domaine SH2 flanqué de deux domaines SH3 lui permet de se lier directement au récepteur ou avec la molécule adaptatrice Shc. Le site majeur de liaison directe de Grb2 sur le récepteur de l'EGF est la pTyr 1068, bien que la pTyr 1086 soit un site mineur de liaison et que la pTyr 1173 permette la liaison du complexe Grb2/Shc (Batzer *et al.* 1994).

D'autres sont des enzymes qui seront activées suite à la phosphorylation de leurs tyrosines par le récepteur de l'EGF :

- la PLCγ est recrutée majoritairement par la pTyr 992, et plus faiblement par la pTyr 1173 (Vega *et al.* 1992)

- l'ubiquitine ligase Cbl lie la pTyr 1045 (Levkowitz *et al.* 1999; Waterman *et al.* 2002), menant à l'ubiquitinylation du récepteur et sa dégradation subséquente dans les lysosomes (Grovdal *et al.* 2004). Mais Cbl peut également jouer le rôle de molécule d'échafaudage en faisant le lien entre les pTyr 1068/1086, Grb2 et la voie PI3K/Akt (Okutani *et al.* 1994).

- les phosphatases PTP-1B, interagissant avec les pTyr 992 et 1148 (Milarski *et al.* 1993), SHP-1, qui reconnait la Tyr 1173 (Keilhack *et al.* 1998), et SHP-2 pour la pTyr 992 (Agazie & Hayman 2003).

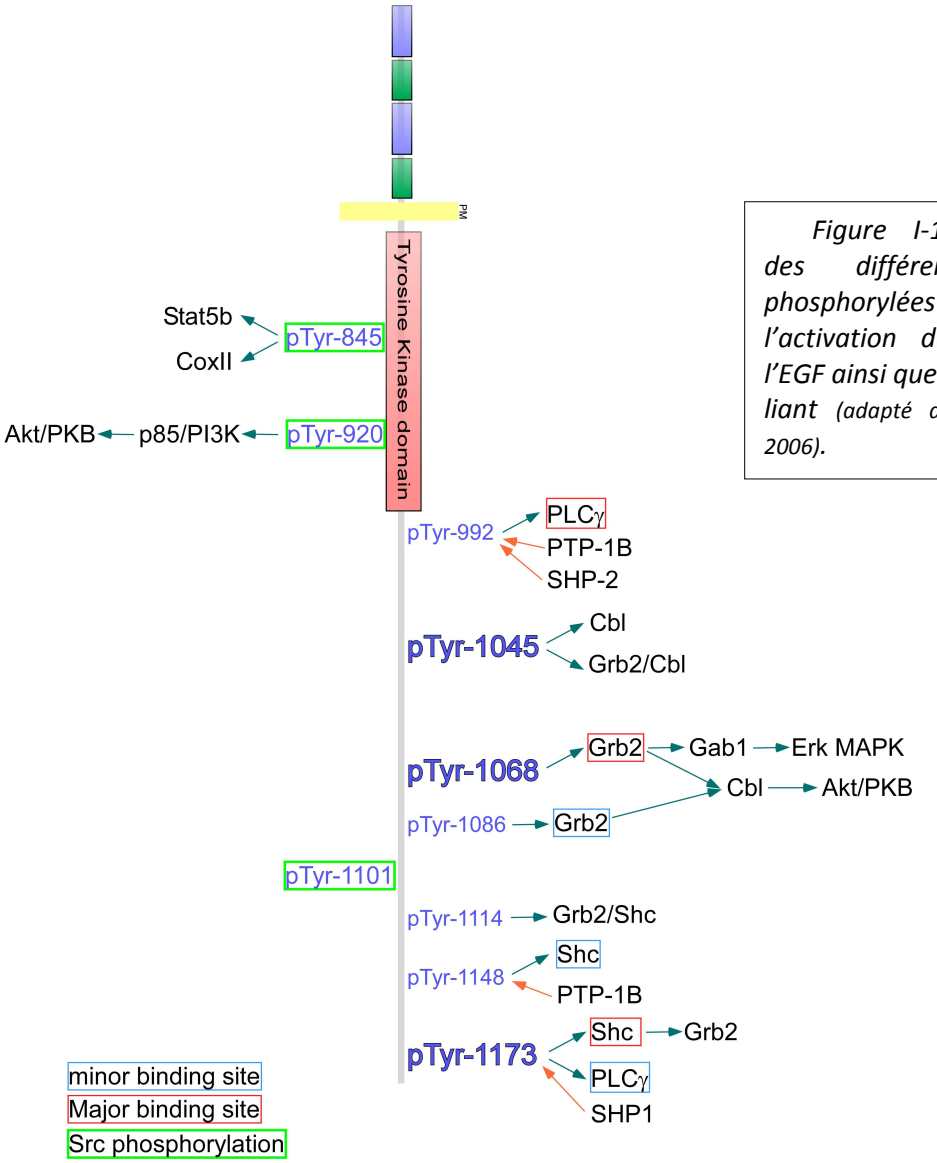


Figure I-10 : Localisation des différentes tyrosines phosphorylées lors de l'activation du récepteur de l'EGF ainsi que des protéines les liant (adapté de Sebastian et al. 2006).

Comme nous l'avons indiqué précédemment, une protéine à activité kinase peut phosphoryler, mais elle peut également se faire phosphoryler par d'autres kinases. Au niveau des tyrosines, la phosphorylation des Tyr 845, 920 et 1101 est due à l'activité des Src kinases (Stover *et al.* 1995; Biscardi *et al.* 1999). Dans le cas de la Tyr 845, sa phosphorylation conduit à une synthèse d'ADN dépendant de l'activation transcriptionnelle du facteur Stat5b (Kloth *et al.* 2003), mais également à la liaison de la sous-unité II de la cytochrome c oxidase mitochondriale (coxII), pouvant jouer un rôle dans la régulation du processus apoptotique (Boerner *et al.* 2004). De plus, la phosphorylation de la Tyr 845 par les Src kinases pourrait induire une activation du domaine kinase du récepteur de l'EGF indépendamment de la présence d'EGF, suggérant sa participation à des processus d'activation indépendamment du ligand (Donepudi & Resh 2008). La phosphorylation de la pTyr 920 permet le recrutement de la PI3K (Stover *et al.* 1995).

- ***Phosphorylation des Thréonines***

En plus des résidus tyrosine, le domaine cytoplasmique du récepteur de l'EGF renferme des résidus sérine et thréonine dont la phosphorylation peut également jouer un rôle dans le *processing* du récepteur de l'EGF. Par exemple, la phosphorylation de la Thr 654 par la PKC va réduire le taux d'internalisation du récepteur (Lund *et al.* 1990) et induire préférentiellement un recyclage de ce dernier suite à son internalisation (Bao *et al.* 2000). Mais la Thr 654 peut également être liée par la calmoduline (CaM), ce qui a pour conséquence de prévenir sa phosphorylation par la PKC (Martin-Nieto & Villalobo 1998; Li *et al.* 2004) et de stabiliser le récepteur sous forme monomérique pour l'empêcher de dimériser (Aifa *et al.* 2006).

D'autres résidus sont phosphorylés, principalement par la MAPK p38, en situation de stress. Les thréonines 669 et 693 sont des sites de phosphorylation du récepteur de l'EGF qui participent à l'endocytose du récepteur lorsqu'il est activé par un ligand (Heisermann *et al.* 1990), mais qui peuvent également être phosphorylés par la MAPK p38 en réponse à la cisplatine (Winograd-Katz & Levitzki 2006). Le segment 1002-1022 contient de nombreux résidus Ser/Thr qui pourraient être phosphorylés par p38 lors de stress tels qu'une exposition aux UV (Zwang & Yarden 2006).

- ***Phosphorylation des Sérines***

Quelques résidus sérine du récepteur sont la cible de phosphorylations. La CaMKII est impliquée dans la phosphorylation des sérines 1046/1047 (Countaway *et al.* 1992; Theroux *et al.* 1992) et 1057/1142 (Feinmesser *et al.* 1999), résultant en une diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur. Il est à noter que cette activité du récepteur est également régulée par la phosphorylation de la Ser 1002 par p34cdc2 (Kuppuswamy *et al.* 1993) et que la MAPK p38 peut phosphoryler les résidus Ser 1046/1047 (Adachi *et al.* 2009).

La serine 671 est phosphorylée par la CK2 (casein kinase 2) et intervient dans l'internalisation du récepteur de l'EGF (Heisermann *et al.* 1990), tandis que la Ser 967 semble être constitutivement phosphorylée (Heisermann & Gill 1988).

La phosphorylation des résidus Ser/Thr du récepteur de l'EGF en réponse au ligand a donc essentiellement pour conséquence d'atténuer les réactions de signalisation engendrées par la phosphorylation des résidus tyrosine en induisant l'internalisation du récepteur.

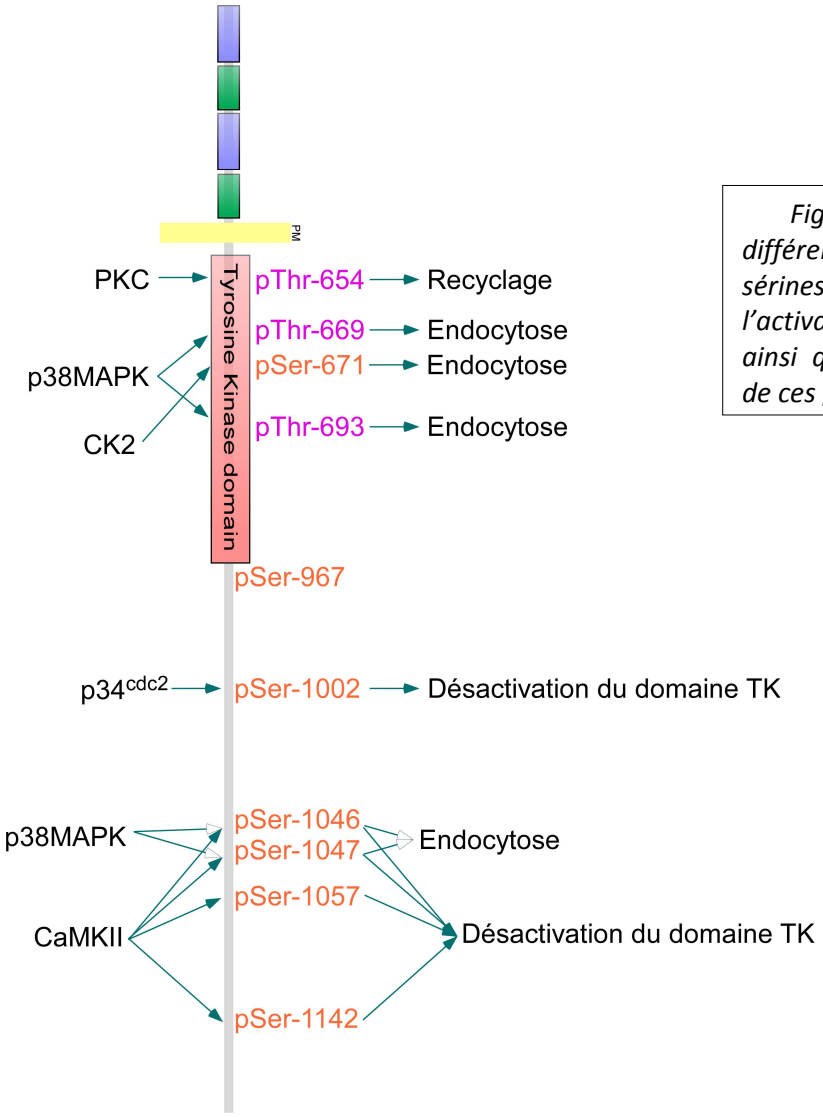


Figure I-11 : Localisation des différents résidus thréonines et sérines phosphorylés lors de l'activation du récepteur de l'EGF ainsi que des kinases responsables de ces phosphorylations.

4.2.4 Signalisations activées par le récepteur de l'EGF

L'activation du récepteur de l'EGF permet le recrutement de protéines adaptatrices. Celles-ci vont permettre la transmission de signaux donnant lieu à l'accomplissement d'une réponse cellulaire adaptée au stimulus. Parmi toutes les réponses déclenchées par l'activation du récepteur de l'EGF, nous ne décrirons ici que les plus importantes, la totalité des voies de signalisation étant parfaitement décrite sur le site : http://www.reactome.org.

Pour donner quelques chiffres, les signalisations activées en réponse à la liaison d'un ligand sur le récepteur de l'EGF comptent environ 211 réactions entre 322 entités incluant 32 kinases, 10 facteurs de transcription et 22 protéines adaptatrices (Oda *et al.* 2005). Ces réactions peuvent être regroupées selon leur implication dans des fonctions spécifiques comme l'endocytose, la dégradation, le recyclage ou encore les différentes voies de signalisation que nous allons brièvement décrire dans les paragraphes qui suivent et qui sont schématisées à la figure I-12.

Activation de la voie Ras/MAPK

De nombreuses tyrosines phosphorylées du récepteur de l'EGF fournissent un site d'ancrage à la protéine Grb2 par son domaine SH2. Grb2 possède également deux domaines SH3 qui vont lui permettre, entre autre, de recruter et d'activer la protéine membranaire Sos. Une fois activé, Sos va jouer le rôle de facteur d'échange de nucléotides guanyliques (Guanine Exchange Factor) et convertir la protéine membranaire Ras en forme active chargée de GTP. L'activation de Ras va permettre l'attachement de la protéine Raf à son domaine N-terminal et son activation par phosphorylation de la Ser 338. Raf activé va ensuite phosphoryler les Ser 217 et 221 de MEK1 et MEK2 respectivement. Le complexe MEK1/2 phosphorylé va se dissocier de Raf et catalyser la phosphorylation de ERK1/2 sur leur thréonine 202 et tyrosine 204. Les complexes ERK1/2 phosphorylés vont ensuite dimériser avant de transloquer dans le noyau où ils pourront phosphoryler et activer diverses protéines nucléaires dont des facteurs de transcription comme Sp1, E2F, Elk-1, et AP1 (Figure I-12/1).

L'échangeur de nucléotide Sos (Son of Sevenless) a été identifié comme une protéine agissant en aval du produit du gène Sevenless de *Drosophila melanogaster* (d'où son appellation) dans la voie Ras/MAPK. Le complexe qu'il forme avec Grb2 peut être dissocié (et donc désactivé) suite à sa phosphorylation par ERK1, ERK2 ou encore RSK2 (Dong *et al.* 1996; Frodin & Gammeltoft 1999), désactivant ainsi les signalisations de la voie Ras/MAPK.

Activation de la Phospholipase Cγ et de la Protein Kinase C

Une fois la Tyr 992 phosphorylée, la PLCγ va être recrutée du cytosol vers la membrane plasmique et être activée suite à la phosphorylation de ses tyrosines 771 et 783. L'activation de la PLCγ va induire le clivage des PI(4,5)P2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) présent dans la membrane plasmique, générant deux fragments ayant une activité biologique : l'IP3 (inositol triphosphate) qui pourra activer les canaux à Ca^{++} du réticulum endoplasmique (Choi *et al.* 2007) et le DAG (diacyl glycérol) qui reste ancré en membrane et permet la liaison de la région riche en cystéine de la PKC, menant à un changement conformationnel qui résulte en la levée de l'auto-inhibition de l'activité kinase de la PKC (Figure I-12/2).

Cette voie d'activation est contrôlée par la phosphatase PTP1B qui entre en compétition avec la PLCγ pour leur site de liaison commun (la pTyr 992) et déphosphoryle le récepteur de l'EGF (pour une revue, voir Rebecchi & Pentyala 2000).

Un deuxième contrôle de l'activation de ce système est dû à l'augmentation de la concentration cytosolique en Ca^{++}. En effet, la CaMKII, activée par le Ca^{++} libéré du RE, inhibe le domaine tyrosine kinase du récepteur de l'EGF en phosphorylant les Ser 1046 et 1047 du domaine catalytique de ce dernier (Tebar *et al.* 2002).

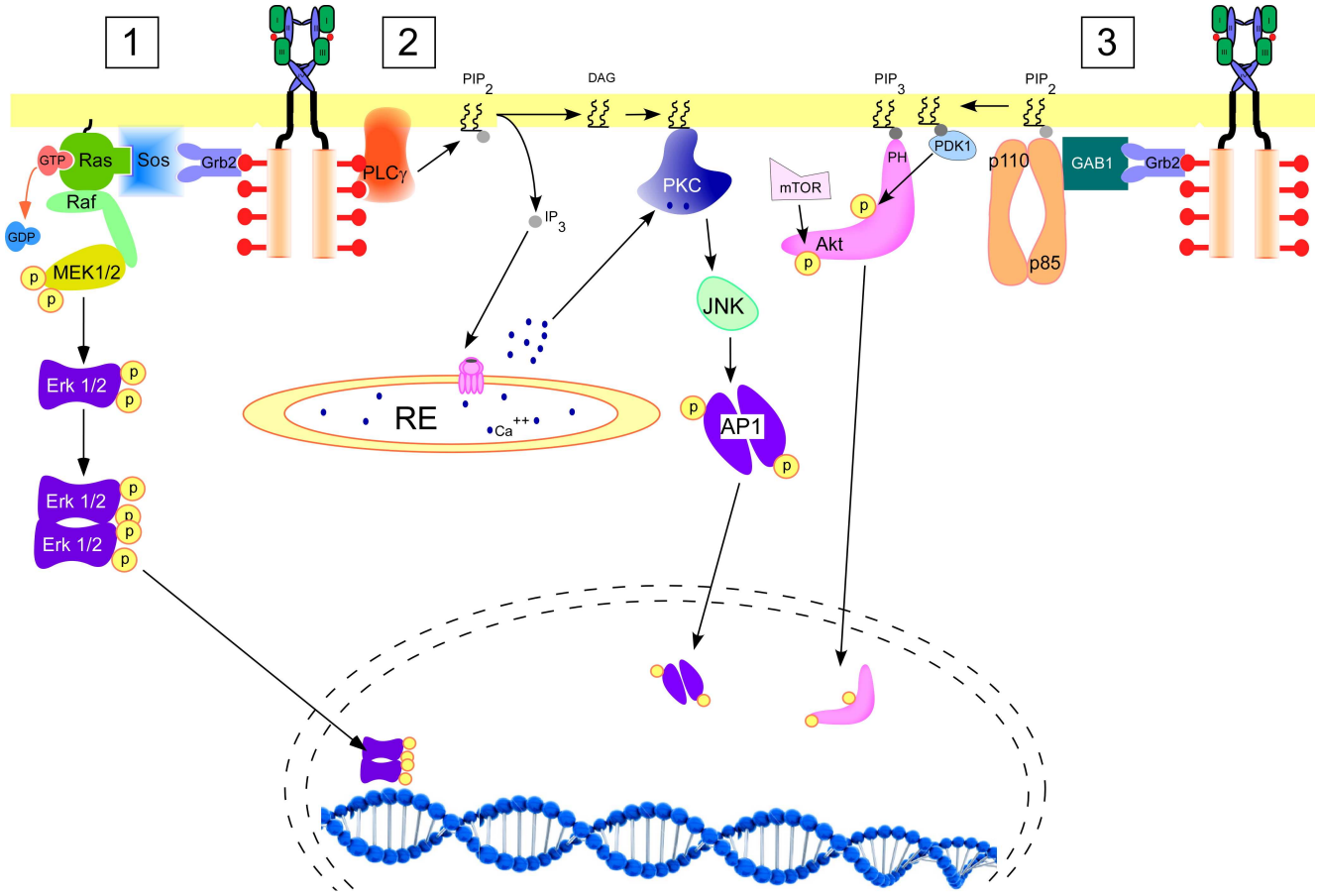


Figure I-12 : Représentation des différentes voies de signalisation activées en réponse à l'activation du récepteur de l'EGF.
1 : voie des MAPK, 2 : voie de la PLCγ/PKC, 3 : voie de la PI3K.
Il est à noter que les voies de signalisation ont été simplifiées pour une meilleure compréhension du schéma.

La PKC active phosphoryle également les JNK (Jun N-terminal kinases) sur leur résidu Ser 129, permettant l'augmentation de leur activation par les MKK 4 et 7 suite à la phosphorylation des résidus Thr 183 et Thr 185 des JNK. L'activation des JNK permet la mise en place d'une réponse au stress suite à la phosphorylation de substrats comme les facteurs de transcription AP-1 (formés par l'interaction des motifs tirette à leucine de c-Jun et c-Fos) et ATF2, p53 ou encore la protéine pro-apoptotique Bad.

Activation de la voie de signalisation PI3K/Akt

La liaison de Grb2 au récepteur de l'EGF peut également induire l'activation de la voie de la PI3K par le recrutement de GAB1. La sous-unité régulatrice de la PI3K (p85) reconnait GAB1 (de façon indépendante de sa phosphorylation) et la sous-unité p110 vient compléter le complexe formant la PI3K (Onishi-Haraikawa *et al.* 2001). Une fois la PI3K active, elle convertit les PIP2 membranaires en PI(3,4,5)P3 qui recrutent alors PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1) et Akt (également connue sous le nom de protéine kinase B) par leur domaine PH (pleckstrin homology) au niveau de la membrane (Leevers *et al.* 1999), cette étape constituant l'étape limitative dans l'activation de Akt. Une fois Akt localisée en membrane, sa phosphorylation sur deux résidus est critique pour compléter son activation.

La kinase PDK1, constitutivement active, phosphoryle la thréonine 308, résidu localisé dans la boucle d'activation du domaine catalytique de Akt (Alessi *et al.* 1997), tandis que le complexe mTORC2 exerce son activité kinase sur la sérine 473 située dans la partie non catalytique de la queue C-terminale de Akt. Une fois activée, Akt se détache de la membrane et phosphoryle ses cibles cytoplasmiques (Bad, Caspase 9, MDM2, IKKα,…) ainsi que nucléaires (les facteurs de transcription de la famille forkhead et CREB) afin de maintenir la cellule vivante (Figure I-12/3).

Il est à noter que cette voie est automatiquement régulée lorsque le récepteur de l'EGF phosphoryle GAB1, induisant le recrutement et l'activation de la phosphatase SHP-2 qui, en déphosphorylant GAB1 donne lieu à la libération de la PI3K dans le cytosol et la dissociation de ses deux sous-unités. La SHP-2 déphosphoryle également la Tyr 992, éteignant de cette façon les signalisations dues à l'activation de la PLCγ. De plus, l'activation du suppresseur de tumeur PTEN reconvertit le PI(3,4,5)P3 en PI(4,5)P2, supprimant ainsi l'activation de Akt en réduisant son recrutement en membrane. L'activation de Akt peut également être régulée par l'activation des phosphatases PP2A (pour la Thr 303) et PHLPP (pour la Ser 473).

Nous pouvons donc constater, à ce niveau-ci, que les voies de signalisation dépendantes de l'activation du récepteur de l'EGF sont interconnectées et agissent les unes sur les autres, tout en partageant des phosphatases ou des messagers secondaires, ce qui ne simplifie pas la compréhension du système complexe que représente les signalisations induites par le récepteur de l'EGF.

Voie Cbl-Ubiquitine

Comme nous l'avons exposé précédemment, il est important que les signalisations issues du récepteur de l'EGF soient régulées négativement afin de ne pas entraîner une sur-activation de la réponse aux facteurs de croissance. En effet, cette sur-activation pourrait éventuellement entraîner le développement de tumeurs. En plus d'être déphosphorylé, le récepteur de l'EGF est donc délocalisé de la membrane plasmique par un mécanisme d'endocytose menant soit au recyclage du récepteur, soit à sa dégradation.

Le proto-oncogène Cbl fait partie des systèmes de régulation négative et peut être recruté de deux manières différentes suite à l'activation du récepteur de l'EGF : tout d'abord par son interaction avec la phosphotyrosine 1045 du récepteur qui constitue son site majeur de liaison (Levkowitz *et al.* 1999; Grovdal *et al.* 2004), mais aussi par sa liaison avec la protéine adaptatrice Grb2. Cbl participe donc autant aux événements amorçant l'endocytose du récepteur qu'au mécanisme assurant le routage de EGFR vers les lysosomes (Schmidt & Dikic 2005).

- ***Rôle de Cbl dans l'endocytose de EGFR***

Cbl peut tout d'abord promouvoir l'endocytose du récepteur de l'EGF suite à son interaction avec la protéine adaptatrice CIN85. La liaison de CIN85 à Cbl est augmentée par la phosphorylation de ce dernier par EGFR. CIN85 interagit de façon constitutive avec l'endophiline, le composant régulateur des puits couverts de clathrine, créant une courbure négative de la membrane plasmique (Soubeyran *et al.* 2002).

Cbl interagit également avec CD2AP dont l'association avec la cortactine permet leur liaison au complexe régulateur Arp2/3 et induit le remodelage du cytosquelette d'actine (Schmidt & Dikic 2005). CIN85 et CD2AP peuvent également lier la protéine adaptatrice AP2, une autre protéine intervenant dans l'endocytose médiée par la clathrine (Figure I-13). L'ubiquitinylation du récepteur de l'EGF par Cbl permet le recrutement de protéines liant l'ubiquitine comme l'epsine ou EPS15, ce qui permet de recruter l'endophiline et d'assurer l'internalisation du récepteur par un routage indépendant de la clathrine. De plus, Cbl, en inhibant la PLCγ, empêche le clivage du PI(4,5)P2 en DAG et IP3. Cette action mène à une augmentation de la concentration locale en PI(4,5)P2, qui est un prérequis à la formation des puits couverts de clathrine (Raucher *et al.* 2000). Cette enrichissement local en PI(4,5)P2 a également pour effet de recruter l'epsine, responsable de la courbure de la membrane (Itoh *et al.* 2001). Ce système en double permet d'assurer l'endocytose du récepteur, même au cas où certains membres des complexes sont absents ou lorsque le système dépendant de la clathrine est saturé, comme nous le verrons plus loin.

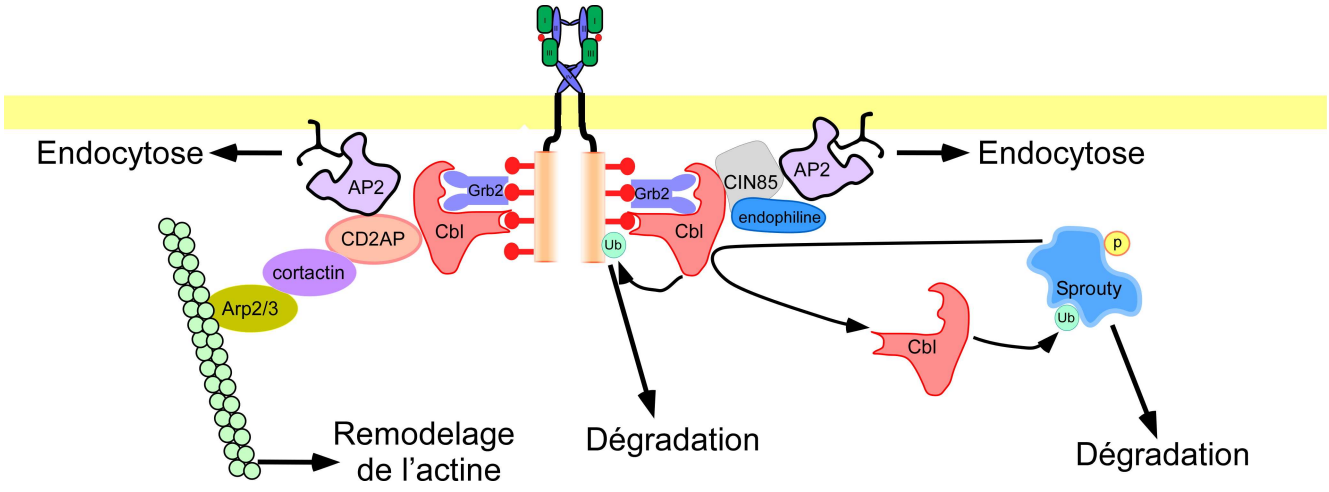


Figure I-13 : Représentation des différentes voies de signalisation activées suite à la liaison de Cbl

- ***Rôle de Cbl dans la dégradation de EGFR***

Cbl est recruté par Grb2 et, suite à l'activation de EGFR, peut également se lier à son deuxième site d'ancrage : la pTyr 1045. Une fois lié au récepteur de l'EGF, Cbl peut remplir trois fonctions : être, d'une certaine façon, inhibiteur de la voie Ras/MAPK en entrant en compétition avec Sos pour se lier à Grb2; servir de protéine adaptatrice pour CIN85 ou CD2AP, impliqués dans l'endocytose ; et enfin fonctionner en tant qu'E3 ligase. C'est cette fonction de Cbl qui nous intéresse ici puisque menant à l'ubiquitinylation de EGFR. Il est à noter que l'ubiquitinylation du récepteur de l'EGF ne se produit pas uniquement lorsque le celui-ci est localisé en membrane, mais a également lieu au cours de son endocytose (de Melker *et al.* 2001).

La liaison de Cbl au récepteur de l'EGF va conduire à la phosphorylation de Cbl, notamment par Src pour la Tyr 371, permettant la stimulation de son activité ligase (Kassenbrock & Anderson 2004) et donc l'ubiquitinylation du récepteur de l'EGF sur ses résidus lysines. De façon générale, la poly-ubiquitinylation conduit à la dégradation de la protéine ciblée par le protéasome 26S. Si la dégradation du récepteur de l'EGF est bien décrite quant à sa protéolyse dans les lysosomes, il semblerait néanmoins que le protéasome puisse également participer à la dégradation du récepteur. En effet, inhiber l'activité protéasomale par l'utilisation d'un inhibiteur comme le MG132 résulte en une accumulation de récepteurs non dégradés (Longva *et al.* 2002). Cependant les effets des inhibiteurs protéasomals sont indirects puisqu'ils peuvent également interférer avec les lysosomes ou encore réduire la disponibilité en ubiquitine libre nécessaire au trafic du récepteur de l'EGF. Quoiqu'il en soit, actuellement le rôle du protéasome dans la dégradation du récepteur de l'EGF n'est pas entièrement expliqué, il semblerait cependant que le récepteur de l'EGF soit dé-ubiquitinylé par le protéasome avant son entrée dans les lysosomes (Alwan *et al.* 2003), mais aucune explication concernant ce processus n'a encore été proposée.

La liaison de Cbl au récepteur de l'EGF est régulée de différentes manières : tout d'abord les tyrosines cruciales dans l'activation de Cbl peuvent être déphosphorylées par la phosphatase SHP-1, ensuite Cbl peut être elle-même ubiquitinylée par la E3 ligase AIP4, conduisant à sa dégradation par le protéasome. En réponse au facteur de croissance, la production de la protéine Sprouty est induite. Cette dernière agit comme un leurre suite à la phosphorylation de sa Tyr 55 par Src, imitant le motif de reconnaissance de Cbl sur EGFR (i.e. la pTyr 1045). Ceci a pour conséquence de décrocher Cbl du récepteur de l'EGF pour se lier à Sprouty et l'ubiquitinyler, détournant l'activité de Cbl de EGFR vers Sprouty (Figure I-13). D'autres systèmes de régulation existent et sont décrits par Schmidt & Dikic (2005).

4.2.5 Endocytose du récepteur de l'EGF

Le trafic intracellulaire du récepteur de l'EGF a été étudié de façon intensive, d'une part parce qu'il est considéré comme modèle du comportement des autres récepteurs à activité tyrosine kinase, et d'autre part parce qu'un des mécanismes d'autorégulation du récepteur de l'EGF implique son internalisation et son acheminement vers les lysosomes où il sera dégradé (Wiley 2003). En absence de stimulation, le récepteur de l'EGF possède un *turn over* dont le t1/2 est de 6-10 heures (Sorkin & Goh 2008). Suite à la liaison d'un ligand, le taux d'endocytose de EGFR va être multiplié de 5 à 10 fois afin d'éviter la saturation de la réponse à l'exposition au facteur de croissance (Waterman *et al.* 1998). Il est à noter que les autres membres de la famille HER ne sont pas internalisés de façon plus importante en réponse à un ligand (Baulida *et al.* 1996).

L'internalisation du récepteur de l'EGF ne semble cependant pas être régulée par l'activité tyrosine kinase du récepteur puisque l'inhibition de cette activité par des molécules pharmacologiques comme l'AG1473 (Wang *et al.* 2002b) ou le PD153039 (observation personnelle) ne bloque pas l'internalisation de EGFR, mais induit plutôt une dimérisation du récepteur, conduisant à l'idée que la dimérisation participe au contrôle de l'endocytose du récepteur de l'EGF (Wang *et al.* 2005).

Cependant, beaucoup d'études de la régulation de l'endocytose présentent des résultats divergents dû au fait que les types de lignée cellulaire ainsi que les méthodes utilisées afin d'étudier ce phénomène varient beaucoup d'un laboratoire à l'autre. De plus, l'activité kinase du récepteur, bien que ne paraissant pas nécessaire dans l'internalisation, pourrait malgré tout y jouer un rôle subtil puisque, lors d'internalisation indépendante de ligand (avec de l'H_2O_2 par exemple), le récepteur de l'EGF est activé et internalisé sans avoir dimérisé (Kamata *et al.* 2000).

Mécanismes d'endocytose

- ***Endocytose dépendante de la clathrine***

L'endocytose médiée par la clathrine est responsable de l'internalisation de récepteurs, de nutriments, de pathogènes et de facteurs de croissance. C'est le mécanisme d'entrée dans la cellule le mieux caractérisé d'un point de vue général, mais également afin d'expliquer l'endocytose du récepteur de l'EGF (pour une revue, voir Zwang & Yarden 2009). Certaines études montrent en effet que l'internalisation des complexes récepteur/ligand se produit essentiellement par les "puits couverts de clathrine" (CCP). En effet, on retrouve ces complexes concentrés dans les CCP lors de son endocytose (Mineo *et al.* 1999). De plus, le taux d'endocytose du récepteur de l'EGF correspond à celui calculé pour d'autres récepteurs utilisant ce mode d'endocytose (ex : le récepteur de la transferrine) (Sorkin & Goh 2008). Enfin, l'inhibition par un

dominant négatif de la dynamine (Vieira *et al.* 1996) ou la déplétion de la chaîne lourde de la clathrine par siRNA (Huang *et al.* 2004) bloquent l'endocytose des complexes EGFR/EGF.

D'un point de vue pratique, le recrutement de Grb2 et de Cbl va permettre l'endocytose médiée par la clathrine du récepteur. En effet, une fois Grb2-Cbl liés au récepteur, Cbl va être phosphorylé par Src et le récepteur de l'EGF, déclenchant son activité de E3 ligase (permettant le transfert d'ubiquitine d'une E2 conjugase vers le récepteur de l'EGF) ainsi que sa reconnaissance par diverses protéines impliquées dans la formation de CCP. Par exemple, Cbl phosphorylée va être reconnue par CIN85, constitutivement liée aux endophilines. Ces dernières possèdent une activité "*lysophosphatidic acid acyl transferase*" responsable de la modification des phospholipides membranaires en catalysant la formation d'acide phosphatidique à partir d'acide lysophosphatidique et donc de modifier la courbure de la membrane à cet endroit en créant une invagination (Scales & Scheller 1999; Schmidt *et al.* 1999).

L'ubiquitinylation de EGFR par Cbl va mener à sa reconnaissance par diverses protéines impliquées dans la formation des CCP dont AP2. Le récepteur de l'EGF est capable de se lier directement à la sous-unité µ2 de AP2 grâce à un motif Y974RAL (Sorkin *et al.* 1993; Sorkin *et al.* 1996). Ce complexe comporte quatre sous-unités se structurant en "tête de Mickey" dont la fonction est de stimuler l'assemblage de la clathrine mais également de lier les protéines cargos.

Les CCP sont formés suite au recrutement des triskèles de clathrine en membrane et à leur assemblage en un treillis polygonal, formant le puits couvert de clathrine. Ce puits va ensuite bourgeonner et se détacher de la membrane par un processus impliquant la dynamine. Cette GTPase va former un collier hélicoïdal autour du cou de l'invagination du CCP et l'hydrolyse du GTP sera couplée à la scission de la vésicule, devenant indépendante de la membrane plasmique et donnant naissance à une vésicule couverte de clathrine (CCV).

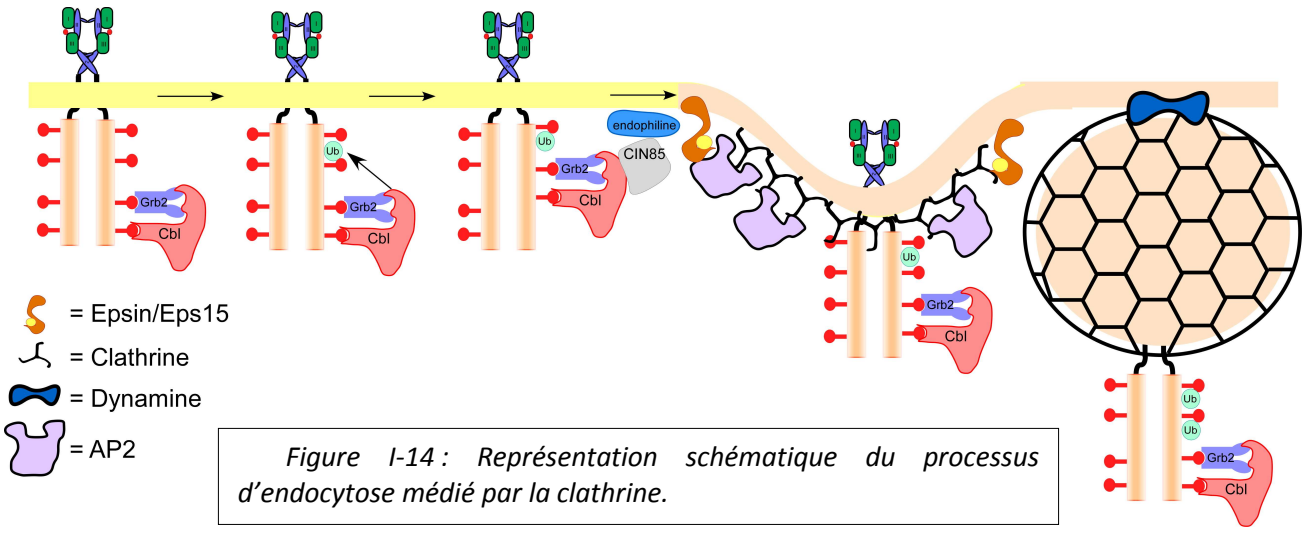


Figure I-14 : Représentation schématique du processus d'endocytose médié par la clathrine.

Nous avons présenté ici la formation des CCP de façon linéaire. Il semblerait cependant que cet évènement soit initié suite à la stabilisation d'un groupe de protéines par leur liaison au PI(4,5)P2 (abondant dans les CCP) ou à leurs protéines cargos (le récepteur de l'EGF dans notre cas), cette reconnaissance, la liaison et les autres stabilisations se réalisant de manière plus ou moins concomitante.

De façon générale, l'endocytose médiée par la clathrine est la voie d'entrée la plus rapide et la mieux régulée pour l'internalisation des récepteurs de surface. Il est intéressant de constater que cette voie d'entrée n'est utilisée qu'en présence de concentrations physiologiques de ligand (≤ 1-2 ng/ml) et que des concentrations plus importantes induisent un ralentissement de l'internalisation du récepteur, probablement en raison d'une saturation du système d'entrée (Wiley 1988; Sigismund *et al.* 2005). C'est pourquoi d'autres systèmes, moins rapides et indépendants de la clathrine, permettent l'internalisation massive du récepteur de l'EGF.

- ***Endocytose indépendante de la clathrine***

  Des autres voies d'endocytose du récepteur de l'EGF furent mises au jour dans les cellules A431 (qui, précisons-le, surexpriment EGFR) lorsque des incubations avec des concentrations importantes en EGF induisaient un plissement de la membrane plasmique et la formation de vésicules de micro- et macro-pinocytose contenant le récepteur de l'EGF mais n'étant pas couvertes du manteau de clathrine spécifique des CCP (Chinkers *et al.* 1979; Haigler *et al.* 1979).

  Depuis lors, ces mécanismes d'endocytose ont été décrits dans d'autres types cellulaires exprimant le récepteur de l'EGF de façon plus physiologique. Ces modes d'endocytose indépendants de la clathrine (CIE) dépendent généralement des régions riches en cholestérol (i.e. cavéoles et lipid rafts) (Mayor & Pagano 2007) mais la machinerie moléculaire engagée dans ce type d'endocytose reste encore peu décrite. Par ailleurs, si ces voies sont toutes indépendantes de la clathrine, une partie d'entre elles nécessite la GTPase dynamine pour réaliser la scission membranaire, tandis qu'une autre partie en est indépendante (pour une revue, voir Mayor & Pagano 2007).

4.2.6 Et après l'endocytose…

Continuité des signalisations

De façon surprenante, l'internalisation du récepteur de l'EGF dans la cellule n'interrompt pas immédiatement les signalisations initiées lors de son activation. En effet, une étude réalisée par l'ajout d'une dose physiologique d'EGF à des rats a montré que les récepteurs endocytés restent enzymatiquement actifs et hyperphosphorylés (Balbis *et al.* 2007), suggérant une régulation non seulement temporelle, mais également spatiale du récepteur de l'EGF.

De plus, les études du récepteur de l'EGF localisé dans les endosomes ont révélé le maintien de son association avec toutes les molécules régulant l'activité de Ras, Shc ou Grb2 en plus d'une signalisation provenant des endosomes (Wang *et al.* 2002b). C'est lors de la formation des corps multivésiculaires que les signalisations provenant encore du récepteur de l'EGF ne seront plus poursuivies puisque ce dernier n'est plus en contact avec le cytosol (voir figure I-15).

Trafic du récepteur de l'EGF

L'accélération de l'internalisation et de la dégradation du récepteur de l'EGF suite à son activation mène à la diminution du nombre de récepteurs localisés en surface de la cellule. Par conséquent, cette dégradation désensibilise les cellules exposées aux facteurs de croissance et diminue le signal prolifératif puisque les cellules doivent d'une certaine manière attendre que la membrane soit repeuplée en récepteur suite à sa synthèse pour être à nouveau sensible aux facteurs de croissance. La dégradation constitue donc le mécanisme de régulation négative le plus important du récepteur de l'EGF. Néanmoins, la stimulation du récepteur de l'EGF par différents ligands conduit à un ciblage différent du récepteur dans la cellule. Nous allons donc décrire le routage du récepteur de l'EGF lorsqu'il est lié par l'EGF en précisant par après les variations possibles.

Il faut savoir qu'à l'état non stimulé, 2 à 3 % des récepteurs de l'EGF sont internalisés chaque minute et rapidement recyclés (Herbst *et al.* 1994). L'étude de récepteurs ne comportant pas la partie cytoplasmique montre que ce trafic continu entre la membrane plasmique et le cytoplasme est modifié suite à l'occupation du récepteur par un ligand, probablement suite à la présence de signaux dans la partie cytoplasmique, dirigeant le récepteur de l'EGF vers les lysosomes (Herbst *et al.* 1994). De façon générale, les puits couverts de clathrine contenant les couples EGFR/ligand maturent en vésicules couvertes de clathrine, lesquelles fusionnent avec les endosomes précoces. De là, les récepteurs libres sont recyclés en membrane tandis que la membrane contenant les récepteurs encore liés à un ligand est invaginée au sein des endosomes, formant les vésicules des corps multivésiculaires. Ces récepteurs encore liés sont dirigés vers les lysosomes par les protéines ESCRT qui reconnaissent les protéines cargo ubiquitinylées (Raiborg & Stenmark 2009). Ce processus empêche les éventuelles interactions des récepteurs avec les composants de la membrane plasmique puisque, si le domaine C-terminal du récepteur est toujours cytoplasmique lorsque ce dernier se trouve dans les membranes de l'endosome, il devient intra-endosomal (et donc n'est plus en contact avec le cytoplasme) lorsqu'il se trouve dans les corps multivésiculaires (Figure I-15). La maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs est accompagnée d'une accumulation des couples EGFR/EGF dans les corps multivésiculaires. Les endosomes tardifs "fusionnent" *in fine* avec les lysosomes présents dans le cytoplasme (Futter *et al.* 1996), résultant en la dégradation de leur contenu par les hydrolases lysosomales.

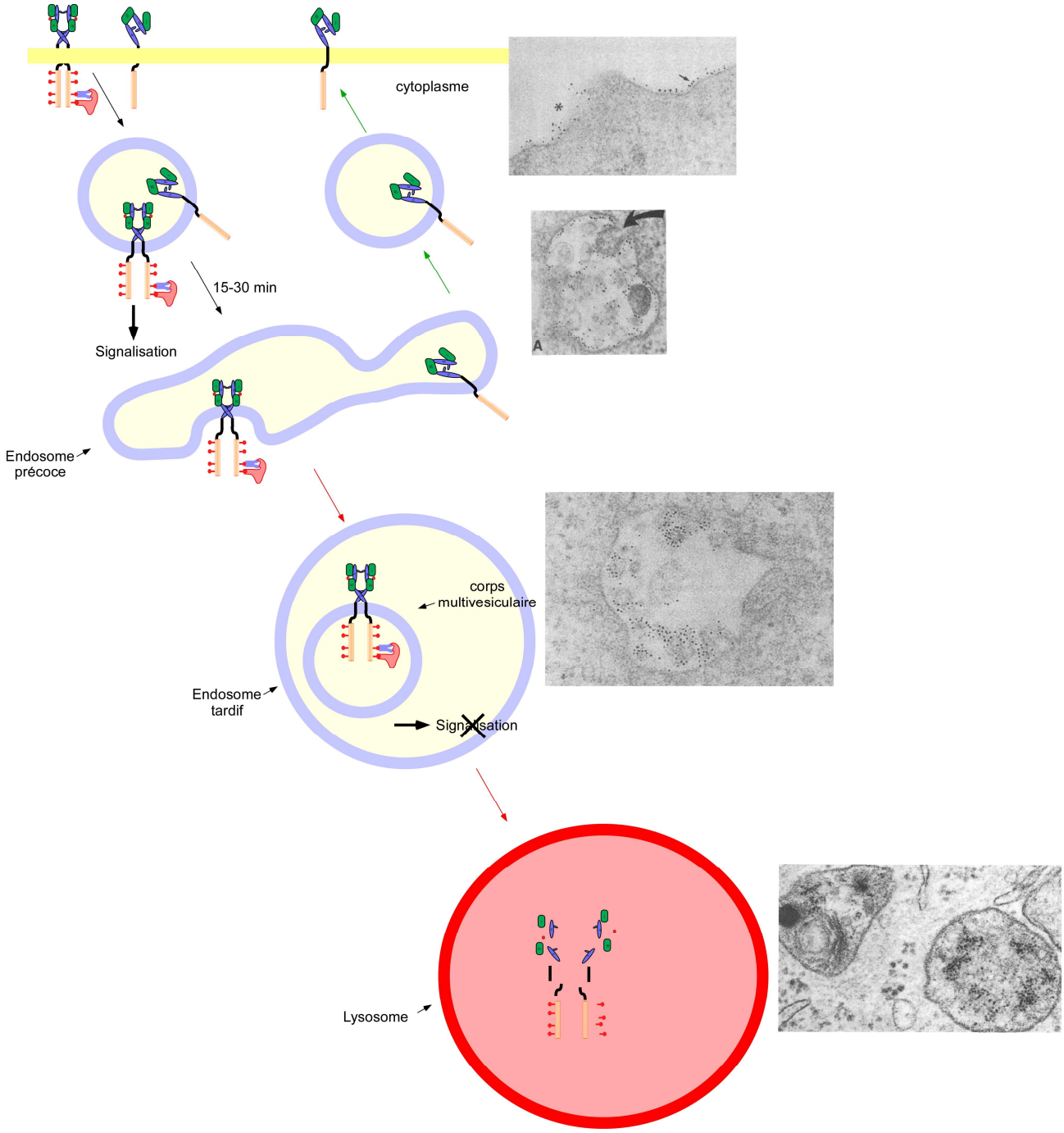


Figure I-15 : Représentations schématisée ou en microscopie électronique à transmission (MET) du trafic intracellulaire du récepteur de l'EGF.

Suite à la liaison d'un ligand, le récepteur de l'EGF est internalisé et conduit au lysosome afin d'y être dégradé ou recyclé en membrane (McKanna et al. 1979; Roepstorff et al. 2008).

Les images en MET (provenant de l'article publié par l'équipe de Cohen) montrent le trafic du récepteur de l'EGF lorsqu'il est lié par de l'EGF couplé à la ferritine. Ces images reflètent le fait que lors de la formation des vésicules des CMV, les complexes EGF-ferritine se trouvent sur la face externe des vesicules

Comme nous l'avons dit, la liaison des différents ligands du récepteur de l'EGF conduit à un trafic différent. En effet, si la liaison de l'EGF, d'HB-EGF ou de la betacelluline conduit à la dégradation lysosomale du récepteur, le TGFα ou l'épireguline induisent le recyclage complet du récepteur de l'EGF et ce, même si celui-ci est ubiquitinylé en présence de tous les ligands (Roepstorff *et al.* 2009). De plus, il est à noter que si le pH de la lumière de ces compartiments d'endocytose diminue au cours de la route les menant aux lysosomes, le couple EGFR/EGF résiste au pH acide et arrive donc "intact" au lysosome (Alexander 1998), tandis que cette diminution de pH permet la séparation des couple TGFα/EGFR (French *et al.* 1995).

Il semblerait donc que la dégradation du récepteur de l'EGF suite à la liaison d'un de ces ligand soit corrélée avec une phosphorylation et une ubiquitinylation persistante ainsi qu'une "non"-sensibilité du couple ligand-récepteur au pH acide.

4.2.7 Activation indépendante de ligand

En dehors de son activation par un ligand, le récepteur de l'EGF semble pouvoir être activé de façon indépendante d'un ligand. En effet, l'activation du récepteur de l'EGF par les rayons ultraviolets ou le peroxyde d'hydrogène (ajouté aux cellules ou résultant des radiations UV) est relativement bien étudiée et a été proposée comme étant due à l'inhibition de la déphosphorylation du récepteur suite à l'inhibition des tyrosine phosphatases (Knebel *et al.* 1996; Kamata *et al.* 2000). Cependant, l'activation de c-Src pourrait également être impliquée dans des activations indépendantes de ligand (Donepudi & Resh 2008).

L'activation du récepteur de l'EGF dans les jonctions de type "adherens" a été montrée comme indépendante de ligand et probablement due au regroupement et à la formation de complexes E-cadhérine/EGFR (Shen & Kramer 2004). Et enfin, lors de la désorganisation des lipid rafts, le récepteur de l'EGF est également activé de façon indépendante de ligand (Chen & Resh 2002), mais à l'heure actuelle, aucun mécanisme déclenchant cette activation n'est encore connu.

4.3 Les autres membres de la famille du récepteur de l'EGF

a. HER2

A l'origine, le récepteur HER2 a été identifié lors de l'étude d'un neuroblastome induit par l'éthyl-nitroso-urée chez le rat (Padhy *et al.* 1982). En dépit de sa grande ressemblance avec le récepteur de l'EGF, aucun ligand ayant une grande affinité pour HER2 n'a été identifié à ce jour (d'où son surnom de *deaf receptor*) (Citri *et al.* 2003). Cependant, malgré cette absence de ligand, l'activité du domaine tyrosine kinase ne semble pas être affectée. Il est donc tout à fait envisageable que ce récepteur n'ait pas de ligand propre et qu'il fonctionne uniquement par hétéro-dimérisation avec un des autres membres de la famille HER (Graus-Porta *et al.* 1997). HER2 a par ailleurs été proposé comme le partenaire d'hétéro-dimérisation

préféré des membres de la famille HER, probablement en raison de sa configuration maintenue constitutionnellement active. En cas d'hétéro-dimérisation, cette préférence des récepteurs HER pour HER2 a pour conséquence de ralentir le taux d'endocytose du dimère. En effet, des études réalisées avec une protéine chimérique constituée du domaine extracellulaire de EGFR et de la partie cytoplasmique de HER2 présente un taux d'endocytose beaucoup plus lent, probablement dû à une altération des motifs d'internalisation (Sorkin *et al.* 1993). L'hétéro-dimérisation avec HER2 induit également une augmentation du taux de recyclage de son partenaire (Lenferink *et al.* 1998; Worthylake *et al.* 1999), mais également une augmentation de l'affinité du partenaire pour ses ligands (Sliwkowski *et al.* 1994).

Il est à noter que si HER2 est exprimé dans la peau au niveau de l'épiderme (Maguire *et al.* 1989), on ne le détecte pas ou peu dans les cellules basales. Il est cependant davantage exprimé dans les kératinocytes lors du processus de différenciation (De Potter *et al.* 2001) et se trouve sous forme d'amas dans les *lipid rafts* (Nagy *et al.* 2002).

b. HER3

Identifié à partir de lignées cancéreuses humaines par hybridation à faible astringence avec des sondes provenant des deux membres déjà identifiés de la famille HER (Kraus *et al.* 1989; Plowman *et al.* 1990), le troisième membre de la famille HER possède un domaine tyrosine kinase dont l'activité est déficiente en raison de la mutation de l'asparagine 834 en acide aspartique, résidu localisé dans le site actif du domaine tyrosine kinase (Guy *et al.* 1994). De cette inactivité du domaine tyrosine kinase lui vient son surnom de *dumb receptor* (Citri *et al.* 2003; Poumay 2007).

Le fait de ne pouvoir s'auto-phosphoryler n'empêche pas HER3 de participer aux signalisations intracellulaires puisque d'une part il peut hétéro-dimériser avec les autres HER et d'autre part, la présence de sept motifs Tyr-X-X-Met dans sa partie C-terminale lui permet d'activer directement la PI3K (Soltoff *et al.* 1994), ce que les autres récepteurs HER ne font pas. De plus, HER3 n'est pas conduit de façon efficiente vers les lysosomes, probablement en raison d'un manque d'information de ciblage dans sa partie C-terminale. Il est donc majoritairement recyclé (Waterman *et al.* 1998; Waterman *et al.* 1999).

Le récepteur HER3 est également exprimé dans la peau (Prigent *et al.* 1992) et comme HER2, il semble être davantage exprimé dans les kératinocytes en différenciation, suggérant un rôle pour HER2 et HER3 dans le processus de différenciation (De Potter *et al.* 2001).

c. HER4

Identifié plus tardivement par une technique de clonage homologue (Plowman *et al.* 1993), le quatrième membre de la famille HER possède une structure relativement semblable à celle du récepteur de l'EGF mais est présent sous quatre isoformes dissemblables au niveau de la partie juxtamembranaire extracellulaire (JM-a et JM-b) et de la partie C-terminale (CYT-1 et CYT-2) et probablement généré par *splicing* alternatif (Junttila *et al.* 2000).

Comme expliqué précédemment, un des mécanismes de régulation de l'activité de membres de la famille HER est l'endocytose du récepteur, permettant une atténuation de la réponse biologique développée par la cellule en réponse aux facteurs de croissance. HER4 a la particularité de n'être pas sujet à une endocytose rapide. Des études ont montré, dans ces circonstances, le clivage de la partie extracellulaire de HER4 par ADAM-17/TACE, libérant un fragment extracellulaire de 120 kDa comportant le domaine de liaison au ligand et laissant en membrane un fragment cytoplasmique de 80 kDa (Vecchi *et al.* 1996; Vecchi & Carpenter 1997). Ce fragment sera à son tour clivé par le complexe γ-secrétase/préséniline, conduisant à la libération du fragment C-terminal cytosolique de HER4 adressé au noyau où il active la transcription de gènes encore inconnus (Vidal *et al.* 2005). Cette voie alterne permet de contourner la cascade de signalisation des Ras/Raf/MAPK.

Au niveau de sa localisation en membrane, il semblerait que HER4 soit recruté dans les *lipid rafts* suite à son activation par les neurégulines dans les neurones (Ma *et al.* 2003). Cependant, si le récepteur HER4 est exprimé dans de nombreux tissus humains (Srinivasan *et al.* 1998), il n'est apparemment pas exprimé dans l'épiderme et n'interviendrait donc pas dans la physiologie des kératinocytes épidermiques (De Potter *et al.* 2001).

5 Activation du récepteur de l'EGF lors du stress cellulaire

Le comportement d'une cellule est en permanence contrôlé par les informations qu'elle échange avec son environnement. Les variations dans la nature et l'importance des signaux qu'elle reçoit permettent une régulation fine de l'activité cellulaire. Lorsque ces signaux sortent des limites physiologiques, la cellule doit gérer un déséquilibre de régulation appelé stress cellulaire et va déclencher des mécanismes de défense permettant un retour à l'état d'équilibre originel. Le programme de défense aboutit soit à une réponse de la cellule qui contrecarre l'attaque environnementale, soit, en cas d'échec, à la mise en place du processus apoptotique. Le stress cellulaire intervient dans la plupart des situations pathologiques et concerne toutes les cellules de l'organisme. Nous nous focaliserons ici sur les stress pouvant toucher l'épiderme humain, puisque comme nous l'avons vu dans cette introduction, la peau confère une protection importante à l'organisme.

De nombreuses études présentent le récepteur de l'EGF comme un médiateur critique de la réponse développée par les cellules en situation de stress puisqu'il est activé lors de traitements avec des cytokines inflammatoires (Rosette & Karin 1996; Wan *et al.* 2001), lors de stress oxidatifs (Peus *et al.* 1998; Meves *et al.* 2001) ou encore lors d'exposition aux rayons UV (Sachsenmaier *et al.* 1994; Xu *et al.* 2006). L'activation du récepteur de l'EGF suite à une exposition aux UV (A ou B) semble par ailleurs induire la survie cellulaire par l'activation d'un axe de signalisation impliquant ADAM17, le récepteur de l'EGF et la cycline D1 (He *et al.* 2008; Han & He 2009). De plus, l'activation de la voie PI3K/Akt dans ces circonstances semble protéger les cellules contre l'apoptose induite par les UV (Wang *et al.* 2003), mais en contrepartie semble également permettre le développement de tumeurs (Li *et al.* 2006a).

En tant qu'enveloppe externe de l'organisme, la peau est soumise à de nombreux stress physiques. Ainsi, lors de blessure (par coupure,…), brûlure (par la chaleur, les engelures,…) ou irritation/sensibilisation (suite à un contact avec des molécules irritantes/sensibilisantes), toute la zone entourant la région mutilée adapte son métabolisme afin de redonner une intégrité à la barrière cutanée. On observe donc dans les zones blessées une production accrue de facteurs de croissance, comme HB-EGF (Mathay *et al.* 2008), mais également la migration des cellules afin de ré-épithélialiser les régions endommagées (Cavani *et al.* 1993). D'autres stress comme les "*stretches*" mécaniques ou les stress osmotiques induisent également l'activation du récepteur de l'EGF (Rosette & Karin 1996; Kippenberger *et al.* 2005).

Il est également à noter que la sur-expression de l'amphiréguline, un ligand du récepteur de l'EGF, induit la formation de lésions semblables à celles observées dans le psoriasis, ainsi qu'une hyperkératinisation de l'épiderme chez les souris (Cook *et al.* 1997). Le rôle du récepteur de l'EGF ainsi que de ses ligands (principalement HB-EGF et l'amphiréguline) dans cette pathologie épidermique est actuellement un sujet de recherche important (Stoll *et al.* 2009).

De même, la suppression du récepteur de l'EGF induit de nombreuses anomalies épithéliales chez les souris *knock out* pour le gène de ErbB1 (Miettinen *et al.* 1995; Threadgill *et al.* 1995), lorsque le système de contrôle de la prolifération est défectueux les cellules se multiplient de façon anarchique, résultant en la formation de tumeurs. La sur-expression (suite à la réplication du gène ou à une augmentation de la transcription) ainsi que l'activation du récepteur de l'EGF participent au développement de nombreux cancers épithéliaux (notamment les cancers du sein ou du poumon). Il n'a cependant pas encore été déterminé à l'heure actuelle si la sur-expression et/ou l'activation observée dans ces circonstances est une des causes du développement du cancer ou apparaît secondairement afin de permettre la progression de la tumeur (pour une revue, voir Sebastian *et al.* 2006).

Il est également important de savoir que l'activation du récepteur de l'EGF lorsque les *lipid rafts* sont désorganisés suite à la déplétion du cholestérol a précédemment été décrite dans des types cellulaires autres que les kératinocytes comme les cellules A431 (Ringerike *et al.* 2002), les cellules Cos-1 (Chen & Resh 2002) ou les fibroblastes NIH 3T3 (Pike & Casey 2002). En revanche, si ces études proposent un mécanisme d'activation du récepteur de l'EGF impliquant les Src kinases et menant à l'activation de la voie des MAPK ERK1/2, aucune information concernant la signification biologique de ces activations n'est suggérée.

Tous ces exemples démontrent le rôle certain des voies de signalisation dépendant du récepteur de l'EGF en situation de stress dans le maintien, intempestif ou non, de la survie cellulaire. Néanmoins, le mécanisme par lequel le récepteur de l'EGF est activé en situation de stress, ainsi que la cause de cette activation ne sont pas encore connus puisqu'il semble participer tant à la survie du kératinocyte qu'à sa transformation en cellule différenciée, peut-être afin de participer d'une manière ou d'une autre à la protection des cellules.

Objectifs du travail

La peau recouvre l'entièreté de l'organisme, le protégeant des agressions de l'environnement et délimitant le milieu corporel, essentiellement aqueux. Pour ce faire, les cellules formant l'épiderme suivent un processus de kératinisation résultant en la formation de la couche cornée, couche superficielle de l'épiderme constituée de cellules mortes entièrement remplies de kératine la rendant étanche. Afin de maintenir de façon continuelle cette protection de l'organisme, il est nécessaire de maintenir une balance entre la prolifération des cellules basales et la desquamation régulière des cellules de la couche cornée. Afin de maintenir cette balance, le contrôle de la prolifération est essentiel. Celui-ci dépend largement du fonctionnement du récepteur de l'EGF.

Comme d'autres types cellulaires, les kératinocytes sont caractérisés par la présence de *lipid rafts* dans leur membrane plasmique, c'est-à-dire de régions membranaires enrichies en cholestérol et non invaginées. Parce que ces zones riches en cholestérol contiennent de nombreuses protéines de signalisation et sont impliquées dans une myriade d'évènements jalonnant la vie des cellules, nous nous sommes particulièrement intéressés au *processing* du récepteur de l'EGF lors de son activation induite par la désorganisation de ces zones suite à la déplétion du cholestérol membranaire.

Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord caractérisé les changements morphologiques qui s'effectuent lors du retrait du cholestérol membranaire par la MβCD, mais également lors des périodes de récupération suivant cette déplétion. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'état d'activation ainsi qu'au *processing* du récepteur de l'EGF, dont on sait qu'ils dépendent de l'intégrité de la membrane.

Ayant montré une internalisation du récepteur de l'EGF dépendante de l'activation de la MAPK p38 lors du stress induit par le retrait du cholestérol membranaire, nous nous sommes intéressés à l'activation du récepteur de l'EGF dans ces circonstances. Nous avons montré que si un ligand (l'amphiréguline) intervient partiellement dans l'activation du récepteur, un autre mécanisme encore indéterminé, et ne dépendant pas de la présence d'un ligand, participe également à l'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol. Ce mécanisme d'internalisation du récepteur de l'EGF sous le contrôle de la MAPK p38 semble constituer un mécanisme induit de manière générale lors d'un stress pour l'épiderme.

Matériel et Méthodes

1 Culture cellulaire

1.1 Kératinocytes humains normaux

1.1.1 Mise en culture primaire

Les kératinocytes humains normaux sont isolés selon la technique de Wille à partir de peau abdominale récupérée lors d'interventions de chirurgie esthétique réalisées par le Docteur B. Bienfait (Clinique St Luc, Bouge) (Wille *et al.* 1984). Les échantillons de peau sont découpés en morceaux d'environ 1 cm^2 et incubés toute la nuit à 4°C, face dermique vers le bas, sur une solution de trypsine à 0,17% (Sigma). L'épiderme est ensuite détaché du derme par traction à l'aide de pinces et les kératinocytes sont séparés les uns des autres par frottement. La suspension cellulaire est ensuite tamisée sur un filtre en nylon de 70 µm (Cell strainer, Falcon) afin de récolter les cellules isolées du tissu qui seront ensemencées à une densité de 8000 cellules/cm^2 dans du milieu complet (KGM2, Keratinocyte Growth Medium, Lonza) additionné de 0,1% de sérum de veau fœtal (Gibco) préalablement dialysé dans une solution saline sans calcium tamponnée par du phosphate (NaCl 137 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 4 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) afin d'éliminer les ions calcium du sérum. La population cellulaire en culture primaire est alors amplifiée en milieu complet KGM2 contenant tous les additifs cités dans le tableau M-1.

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

Tableau M-1 : Facteurs ajoutés au milieu de culture KGM2, formant le milieu complet de culture primaire des kératinocytes

1.1.2 Mise en culture secondaire

Afin d'amplifier la population de kératinocytes et éliminer les cellules contaminantes (fibroblastes et mélanocytes essentiellement), les cellules en sous-confluence proliférative sont détachées par trypsinisation avec une solution contenant 0,025% de trypsine et 10 mM d'EDTA. La réaction de trypsinisation est stoppée par l'ajout de milieu contenant 2% de sérum dialysé comme décrit au point 1.1.1 (et donc ne contenant pas de calcium). Les kératinocytes sont ensuite mis en culture secondaire à une densité de 6000 cellules/cm^2 dans du milieu Epilife® (Cascade Biologics, Invitrogen) contenant les facteurs exogènes cités dans le tableau M-2 afin d'amplifier davantage la population cellulaire. Les kératinocytes sous-confluents en phase proliférative sont détachés avec de la trypsine (0,025% et 10 mM EDTA) puis congelés dans du milieu complet Epilife® contenant 10% de DMSO et 10% de sérum de veau fœtal dialysé dans le but de constituer un stock de cellules qui seront utilisées lors des différentes expériences.

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

Tableau M-2 : Facteurs ajoutés au milieu de culture Epilife®, formant le milieu complet de culture secondaire des kératinocytes.

1.1.3 Mise en culture tertiaire

Les kératinocytes sont rapidement décongelés dans un bain-marie à 37°C et comptés dans une cellule de comptage Thoma (Marienfeld) avant d'être mis en culture dans des boîtes de Petri de 3 cm de diamètre ou dans des boîtes de 12 puits contenant des couvre-objets dans du milieu KGM2 à une densité de 8000 cellules par cm^2. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu Epilife® complet. Ce renouvellement de milieu sera ensuite réalisé tous les deux jours. Lorsque la population cellulaire atteint 60%, le milieu de culture est remplacé par un milieu Epilife® ne contenant pas de facteurs exogènes, mais de l'hydrocortisone, de la pénicilline et de la streptomycine ainsi qu'un mélange d'acides aminés (Tableau M-3). A ce stade de la culture, les cellules sont en croissance autocrine, c'est-à-dire qu'elles sont capables de produire elles-même les facteurs de croissance nécessaires à leur prolifération (Cook *et al.* 1991). Le milieu

de culture est renouvelé tous les deux jours jusqu'à ce que les cellules atteignent un stade de confluence défini comme étant un état d'arrêt prolifératif (donc plus de mitose observable) où les cellules se disposent les unes contre les autres (donc perte de la réfringence entre les cellules). Toutes les expériences ont été menées sur des cultures cellulaires en croissance autocrine dont la culture est décrite par Minner *et al*. 2009.

Acide aminé (Sigma)	Concentration finale
L-isoleucine	$7{,}5x10^{-4}$ M
L-tryptophane	$4{,}5x10^{-5}$ M
L-tyrosine	$7{,}5x10^{-5}$ M
L-histidine	$2{,}4x10^{-4}$ M
L-phénylalanine	$9x10^{-5}$ M
L-méthionine	$9x10^{-5}$ M

Tableau M2-3 : Liste des acides aminés ajoutés au milieu de culture Epilife®, formant le milieu de culture tertiaire des kératinocytes.

1.2 Fibroblastes humains normaux

Les fibroblastes humains normaux ont été isolés à partir de derme provenant d'échantillons de peau normale : la peau est découpée en morceaux de maximum 3 mm de côté qui sont mis en culture dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Lonza) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Gibco). Deux semaines plus tard, les morceaux de peau sont enlevés et les fibroblastes sont laissés à proliférer encore une semaine avant d'être détachés avec une solution de trypsine (0,025%) puis congelés dans du milieu DMEM contenant 10% de DMSO et 10% de sérum de veau fœtal.

Les cellules sont décongelées et mises en culture dans du DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal. Une fois arrivées au stade de confluence les cellules sont rincées et placées une ou deux heures dans du milieu DMEM sans sérum afin d'enlever les facteurs exogènes. Les expériences sont réalisées avec des cultures cellulaires confluentes et dans du milieu ne contenant pas de sérum.

1.3 Cellules immortalisées

Les kératinocytes HaCaT immortalisés naturellement, provenant de la région distale d'un mélanome dorsal (Boukamp *et al.* 1988) ont été généreusement donnés par le Prof. Fusenig (Heidelberg, Allemagne), les cellules hTert (qui sont des kératinocytes humains provenant de la lignée POE9n, c'est-à-dire des kératinocytes buccaux issus d'une lésion dysplasique précancéreuse infecté avec un vecteur rétroviral encodant la sous-unité hTert de la télomérase et n'exprimant plus $p16INK^{4a}$ (Dickson *et al.* 2000)) proviennent du laboratoire du Prof. Rheinwald (Boston, USA), les cellules HeLa provenant d'un cancer du col de l'utérus ont été gracieusement données par le Prof. Jadot (FUNDP, URPhyM), les cellules épithéliales cancéreuses humaines A431 proviennent du laboratoire du Dr. Colige (Ulg, Laboratoire des tissus conjonctifs) et les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 ont été obtenues de l'American Type Culture Collection. Tous ces types cellulaires ont été maintenus en culture dans du milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau fœtal. Avant les expériences, les cellules sont rincées et placées une ou deux heure(s) dans du milieu DMEM sans sérum afin d'enlever les facteurs exogènes. Les expériences sont réalisées avec des cultures cellulaires confluentes et dans du milieu ne contenant pas de sérum.

2 Différents stress cellulaires et traitements

Afin d'étudier le processus d'activation du récepteur de l'EGF en condition de stress, nous avons soumis des cultures de kératinocytes à différents types de stress.

2.1 Déplétion du cholestérol membranaire

Les cultures cellulaires confluentes sont incubées pendant une heure en présence de méthyl-β-cyclodextrine (MβCD, Sigma) à une concentration de 7,5 mM (=1%) dans le but de diminuer la concentration du cholestérol membranaire (Klein *et al.* 1995; Jans *et al.* 2004) et donc de désorganiser les *lipid rafts*. Les cellules sont ensuite rincées et laissées récupérer pendant différentes périodes de temps dans du milieu de culture Epilife® ne contenant pas de facteurs exogènes avant d'être lysées selon la méthode décrite au point 5.1.

Pour contrôler que les effets observés sont bien dus à l'extraction du cholestérol par la MβCD et pas à la MβCD en elle-même, des cellules ont été incubées en présence d'αCD (7.5 mM) dont la cavité formée par 6 résidus de glucose ne permet pas la séquestration du cholestérol membranaire (Ohtani *et al.* 1989). D'autres cultures ont été incubées en présence de cholestérol (Sigma).

Enfin, des complexes MβCD-cholestérol ont été préparés selon la méthode de Klein et al. (1995). Un gramme de MβCD est dissous dans de l'eau distillée. Cette solution est chauffée à 80°C et une solution de cholestérol (30 mg de cholestérol (Sigma) dissous dans une solution de méthanol/chloroforme à 2/1) est ajoutée goutte à goutte. Les solutions sont mélangées jusqu'à la dissolution complète du cholestérol. La solution de MβCD-cholestérol est alors déshydratée et stockée à température ambiante.

Afin de réaliser une déplétion plus longue en cholestérol membranaire, la néo-synthèse de ce dernier a été inhibée par une incubation de 17 heures en présence de lovastatine 10 µM (Sigma), un inhibiteur de l'enzyme-clé de la voie de synthèse du cholestérol : l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase (Kita *et al.* 1980).

2.2 Stress oxydatif

Les kératinocytes sont incubés pendant 20 minutes en présence d'H_2O_2 (Sigma) à une concentration de 1 mM avant d'être lysés ou préparés pour la microscopie confocale selon la méthode décrite au point 4.3. La concentration utilisée étant connue pour activer le récepteur de l'EGF dans les kératinocytes (Mathay *et al.* 2008).

2.3 Scratch

Les kératinocytes sont cultivés jusqu'à atteindre un état de confluence. Un *scratch* linéaire est alors réalisé dans la culture avec un embout de micropipette de 200 µl. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS afin d'éliminer les débris cellulaires et laissées pendant des périodes de récupération dans du nouveau milieu avant d'être préparées pour la microscopie confocale. Si les cultures sont destinées à être lysées, une quinzaine de *scratch* seront réalisés dans la boîte de Petri de 3 cm de diamètre.

2.4 Stress avec un sensibilisant : le DNFB

Les cellules sont incubées pendant une heure en présence de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (DNFB, Sigma) dilué dans du DMSO à la concentration indiquée avant d'être lysées ou préparées pour la microscopie confocale.

2.5 Traitements avec des inhibiteurs

De façon générale, les cellules confluentes ont été pré-traitées pendant 30 min avec les inhibiteurs décrits dans le tableau M-4 avant le début de l'expérience.

Inhibiteur	Firme	Cible	concentration
PD169316	Calbiochem	p38 MAPK	15 µM
SB202190	Calbiochem	p38 MAPK	10 µM
AG1478	Calbiochem	Domaine Tyrosine kinase de EGFR	1 µM
PD153035	Calbiochem	Domaine Tyrosine kinase de EGFR	500 nM
PD98059	Calbiochem	MAP kinase kinase (MEK)	2 µM
Cycloheximide	Calbiochem	hFKBP12 (ayant une fonction de chaperone) et donc la synthèse protéique	3 µg/ml
Bafilomycin	Calbiochem	v-H^+-ATPase vacuolaire lysosomale	0,25 µM
Lactacystin	Calbiochem	Inhibiteur spécifique du protéasome 20S	3 µM
GM6001	Calbiochem	MMP-1, -2, -3, -8 et -9	250 µM
PP2	Calbiochem	$p56^{lck}$, $p59^{fyn}$T, Hck et Src	10 µM
PP3	Calbiochem	Control négatif du PP2	10 µM

Tableau M-4 : Liste des inhibiteurs utilisés

3 Etude des lipid rafts

3.1 Extraction et dosage du cholestérol

Les cellules ont été ensemencées à une densité de 8000 cellules par cm^2 dans des boîtes de Petri de 10 cm de diamètre, cultivées jusqu'au stade de confluence et traitées comme décrit. Elles sont ensuite raclées dans 1 ml d'eau désionisée et les lysats sont soniqués une minute. Un volume de 800 µl est mélangé dans 3 ml d'une solution de chloroforme/méthanol (2/1) dans le but de solubiliser les lipides et de les séparer des protéines (le reste du lysat est utilisé afin de réaliser le dosage des protéines selon la méthode de Bradford). Les échantillons sont mélangés pendant une minute puis centrifugés 15 minutes à 3000 rpm. La phase organique est prélevée avec une seringue et mise dans un nouveau tube avant d'être lavée dans 2 ml de NaCl 0,05 M. Les échantillons sont à nouveau mélangés une minute avant d'être centrifugés 15 minutes à 3000 rpm. La phase organique est ensuite lavée deux fois dans 2 ml de $CaCl_2$ 0,36M/méthanol (1/1) afin de faciliter l'extraction de la phase aqueuse contenant les composants non lipidiques, puis mélangée une minute et centrifugée 15 minutes à 3000 rpm. La phase organique est prélevée et 50 µl de Triton X-100/acétone (0,01/1 W/V) sont ajoutés afin de solubiliser le cholestérol. Les échantillons sont évaporés à sec sous flux d'air et le culot est solubilisé dans 500 µl d'eau désionisée. Ce protocole d'extraction du cholestérol nous a été renseigné par L. D'Auria (UCL, unité de biologie cellulaire).

Le cholestérol ainsi extrait a ensuite été dosé avec le kit Amplex® Red Cholesterol assay (Invitrogen) selon les indications fournies par le fabricant.

3.2 Détection des lipid rafts

Les *lipid rafts* peuvent être visualisés à l'aide de la sous-unité B non catalytique de la toxine cholérique couplée à une sonde fluorescente Alexa Fluor® 555 (CTxB-Alexa Fluor® 555, Invitrogen). En effet, celle-ci se lie aux gangliosides de type GM1 présents dans les *lipid rafts* et est utilisée comme marqueur (Harder *et al.* 1998). Comme cette sous-unité est pentamérique, le marquage (30 min, 10 µg/ml) s'effectue avant fixation et à 4°C afin d'éviter tout mouvement membranaire susceptible d'être induit par la présence de la toxine (ie : internalisation des GM1 couplés à la toxine ou coalescencence des *lipid rafts*). Les cellules sont ensuite fixées avec de la formaldéhyde (paraformaldéhyde 4% dans du PBS), montées sur lame et observées en microscopie à épifluorescence.

3.3 Centrifugation sur gradients de densité

Les cellules ont été ensemencées dans des boîtes de Petri de 10 cm de diamètre et menées à confluence. Après un traitement d'une heure en présence de MβCD, les *lipid rafts* ont été isolés en utilisant la technique de lyse développée par Macdonald & Pike (2005) et la centrifugation décrite par Yao *et al.* (2009). Nous avons utilisé un tampon ne contenant pas de détergent car, même si la résistance aux détergents est un des premiers critères d'isolation cités dans l'isolation des *lipid rafts*, il semblerait qu'ils induisent un phénomène de fusion pouvant générer un mélange de rafts qui n'existerait pas dans les cellules intactes (Macdonald & Pike 2005). Il est à noter que toutes les étapes sont réalisées à 4°C.

Les cellules sont râclées dans 1 ml de tampon Base (Tris-HCl 20 mM pH7,8, sucrose 250 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1mM). Le lysat est centrifugé 2 min à 250 g afin de précipiter les débris membranaires et le culot est resuspendu dans 1 ml de tampon Base contenant des inhibiteurs de protéases. Les membranes sont homogénéisées par 20 passages successifs dans une aiguille 21 gauge. L'homogénat est centrifugé 10 min à 1000 g et le surnageant est transféré dans un tube tandis que le culot est resuspendu dans 1 ml de tampon Base contenant les inhibiteurs de protéases et passé 20 fois à travers une aiguille de 21 gauge. Après une centrifugation de 10 min à 1000 g, le surnageant est combiné au premier. La fraction membranaire ainsi obtenue est ensuite soniquée pendant 1 minute à une fréquence de 60 Hz (afin de détriorer plus finement les membranes cellulaires (Song *et al.* 1996)) puis mélangée à une solution de sucrose 90% (2 ml) et placée au fond d'un tube à centrifugation (Beckman) et recouvert d'un gradient de sucrose en 3 parties de respectivement 35% de sucrose (3 ml), 21% de sucrose (4 ml) et 5% de sucrose (1 ml) réalisé dans le tampon Base. Le gradient discontinu ainsi formé est centrifugé 25 heures à 34000 rpm dans un rotor SW41 afin de permettre aux fractions membranaires de migrer et d'atteindre la zone du gradient de sucrose qui correspond à leur densité. Le gradient est ensuite divisé en 14 fractions de 850 µl et les protéines contenues dans ces fractions sont précipitées au TCA avant d'être séparées par SDS-PAGE

et analysées par Western blot. Afin d'identifier les fractions correspondant aux *lipid rafts*, nous avons utilisé la cavéoline-1 et la flotilline-1 comme marqueurs.

4 Etude de la morphologie des cellules et de la localisation du récepteur de l'EGF

4.1 Préparation pour la microscopie électronique à balayage

Les cellules sont traitées 1 heure en présence de MβCD avant d'être rincées et fixées avec de la glutaraldéhyde (2,5% dans un tampon cacodylate 0,1M pH 7,4) pendant 30 min sur glace. Elles sont ensuite déshydratées par plusieurs bains successifs de 5 min dans des solutions d'éthanol à 25%, 50%, 75% et 90%. Les cellules sont ensuite passées au point critique et contrastées par le dépôt d'un film d'or de 20 nm d'épaisseur avant d'être observées en microscopie électronique à balayage (Philips XL20).

4.2 Marquage du cytosquelette d'actine

Les kératinocytes cultivés sur des lamelles couvre-objets sont traités pendant 1 heure avec la MβCD. Les cellules sont rincées avec du PBS puis fixées pendant 15 minutes avec une solution de paraformaldéhyde (Merck) à 4% dans du PBS et perméabilisées pendant 5 minutes avec du PBS contenant 1% (W/V) de Triton X-100 (Merck). Elles sont ensuite incubées 5 min en présence de phalloïdine couplée à la rhodamine (Invitrogen) dilué 40x dans du PBS/BSA 0,5% (W/V). Les cellules sont ensuite rincées et les couvre-objets sont montés sur des lames porte-objets à l'aide de Mowiol (Sigma) avant d'être observées au microscope confocal.

4.3 Marquage pour la microscopie confocale ou pour l'épifluorescence

Les kératinocytes cultivés sur des lamelles couvre-objets sont traités comme décrit. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS puis fixées pendant 15 minutes à température ambiante avec une solution de paraformaldéhyde (Merck) à 4% dans du PBS avant d'être perméabilisées pendant 5 minutes avec du PBS contenant 1% (W/V) de Triton X-100 (Merck). Les cellules sont ensuite rincées dans un tampon PBS contenant 0,5% de BSA (Sigma) avant d'être incubées 2 heures en chambre humide à température ambiante avec les anticorps présentés dans le tableau M-5 dilués dans du PBS contenant 0,5% de BSA.

La détection des anticorps primaires se fait, après quelques lavages, par une incubation d'une heure avec un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de souris et couplé à une sonde Alexa Fluor® 488 ou Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) dilués 500x dans du tampon PBS contenant 0,5% de BSA. Les noyaux sont marqués par une incubation de 20 min en présence de To-Pro®-3 iodide (642/661)(Invitrogen) dilué 80x dans une

solution de RNAse (2 mg/ml). Les couvre-objets sont ensuite montés sur des lames porte-objets à l'aide de Mowiol chauffé à 56°C (Sigma) et conservés à 4°C à l'abri de la lumière.

Anticorps	Firme	dilution	isotype	source
EGFR clone LA1	Millipore	250x	Monoclonal	Souris
EEA1	Cell Signaling Technology	100x	Polyclonal	Lapin
Lamp2b	Abcam	100x	Polyclonal	Lapin
anti-IgG de souris couplée à une sonde Alexa Fluor® 488	Invitrogen	500x	Polyclonal	Chèvre
anti-IgG de lapin couplée à une sonde Alexa Fluor® 555	Invitrogen	500x	Polyclonal	Chèvre

Tableau M-5 Liste des anticorps utilisés pour les marquages en microscopie confocale ou à épifluorescence

Les observations sont réalisées avec un microscope confocal (TCS, Leica) avec un objectif 63x et en gardant la même valeur de photomultiplication ou en utilisant un microscope à épifluorescence Olympus AX70 et un objectif 60x en utilisant le même temps d'exposition. Les photos sont prises au moyen d'une caméra numérique AxioCam et du logiciel AxioVision (Zeiss).

Dans le cas de la microcopie confocale, nous avons réalisé des quantifications afin de déterminer de façon objective la localisation du récepteur de l'EGF en périphérie cellulaire ou dans le cytoplasme. Pour cela, nous avons utilisé le programme ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij/) permettant de quantifier l'intensité en pixel des images.

Les images sont ouvertes avec le programme ImageJ et converties en 8 bit grayscale. Une ligne de 40 à 60 µM est tracée dans les cellules et le programme détermine l'intensité des pixels par lesquels cette ligne passe, générant un histogramme dont les valeurs (de 0 à 255) pour chaque point peuvent être transférées dans Excel. Nous avons déterminé arbitrairement la périphérie cellulaire comme étant une zone de 5 µm aux extrémités de la ligne traversant les cellules, la partie cytoplasmique étant la zone comprise entre ces deux régions. Si le récepteur de l'EGF se trouve en périphérie cellulaire, les valeurs des pixels seront élevées aux extrémités de la droite (exemple Ctl) tandis que si le récepteur de l'EGF est distribué entre la périphérie cellulaire et le cytoplasme, les valeurs seront aléatoires le long de la droite (exemple EGF).

Nous avons utilisé cette technique sur 4 images différentes et une trentaine de cellules par condition afin de déterminer la localisation du récepteur de l'EGF.

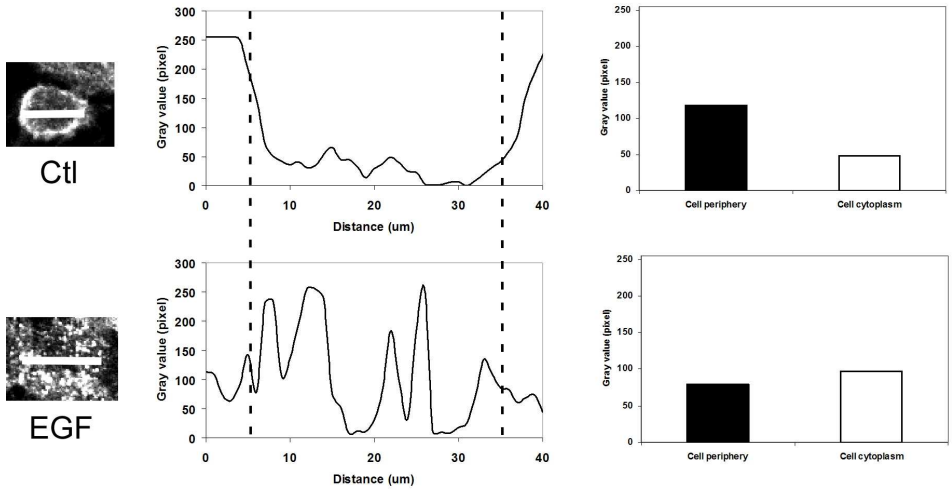


Figure M-1 *: Schématisation de la technique de quantification des images avec le programme ImageJ.*

5 Analyse en Western blot

5.1 Préparation des lysats cellulaires et analyse par Western blot

Suite aux traitements, les cellules sont lysées dans du tampon Laemmli deux fois concentré (62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 8,7% glycérol, 0,2% dithiothréitol, 0,05% bleu de bromophénol). Les lysats sont portés à 100°C pendant 5 min puis centrifugés 5 min à 13000 rpm et conservés à -20°C. Les protéines contenues dans les lysats cellulaires sont ensuite séparées par SDS-PAGE 10% avant d'être transférées sur une membrane de PVDF (GE Healthcare). La membrane est ensuite bloquée pendant 1 heure avec du PBS-Tween 20 (0,1%)(PBS-T) contenant 5% de lait en poudre (Gloria, Nestlé) ou avec du PBS contenant 1% de "blocking substrate" (Roche Diagnostics). Elle est ensuite incubée toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires présentés dans le tableau M-6 suivi par une incubation d'une heure en présence d'anticorps secondaires couplés à la HRP (ou une sonde 700 ou 800 IRDye pour les figures 2-1, 2-2 et 2-3). La réaction de chémoluminescence est révélée avec le kit Chemoluminescence blotting substrate (POD) (Roche Diagnostics) et détectée par l'impression d'un film radiographique (GE Healthcare), avec une caméra CCD (ImageQuant350, GE Healthcare) ou le système Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor).

Anticorps	Firme	Dilution	Isotype	Source
pEGFR (Tyr1173)	Biosource, Invitrogen	1000x	Polyclonal	Lapin
EGFR	Cell Signaling Technology	1000x	Polyclonal	Lapin
pp38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling Technology	1000x	Polyclonal	Lapin
p38	Cell Signaling Technology	1000x	Polyclonal	Lapin
pERK1/2 (Thr202/Tyr204) clone E10	Cell Signaling Technology	1000x	Monoclonal	Souris
ERK1/2	Cell Signaling Technology	1000x	Polyclonal	Lapin
pAkt (Ser473) clone 193H12	Cell Signaling Technology	1000x	Monoclonal	Lapin
Akt	Cell Signaling Technology	1000x	Polyclonal	Lapin
Flotilline-1 clone 18	BD Pharmingen	1000x	Monoclonal	Souris
Cavéoline-1	BD Pharmingen	1000x	Polyclonal	Lapin
Cavéoline-1 (pTyr 14)	BD Pharmingen	1000x	Polyclonal	Lapin
β-actine	Sigma	10 000x	Monoclonal	Souris
anti-IgG de souris couplé à la HRP	Cell Signaling Technology	1000x	Polyclonal	Cheval
anti-IgG de lapin couplé à la HRP	Cell Signaling Technology	1000x	Polyclonal	Chèvre

Tableau M-6 : Liste des anticorps utilisés pour les analyses en Western blot.

5.2 Analyse de la phosphorylation des différentes tyrosines du récepteur de l'EGF

Les cellules confluentes ont été mises en présence de MβCD (7,5 mM pendant 1h), ou des facteurs recombinants EGF, HB-EGF ou AR (R&D System, 10 ng/ml pendant 20 min) avant d'être lysées dans un tampon (Hepes 50 mM, pH 7,5, glycerol 10%, Triton X-100 0,5%, $MgCl_2$ 1,5 mM, EDTA 1 mM) contenant des inhibiteurs de phosphatases ($NaVO_3$ 250 mM, p-nitrophenylphosphate 10 mM, β-glycerophosphate 10 mM, NaF 5 mM) et des inhibiteurs de protéases (protease inhibitor cocktail Complete, Roche). Les lysats ont été centrifugés à 13000 rpm pendant 10 minutes et le surnageant a été analysé par Western blot pour la phosphorylation de différentes tyrosines du récepteur de l'EGF avec le Phospho-EGF Receptor Antibody Sampler Kit de Cell Signaling Technology en suivant les indications du fabricant.

5.3 Dimérisation du récepteur de l'EGF

Afin d'étudier la dimérisation du récepteur de l'EGF, nous avons utilisé du Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS^3, Pierce), un *crosslinker* soluble, non clivable et membrane-imperméable contenant un ester d'amine réactif N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) à chaque extrémité de son bras d'espacement constitué de 8 carbones. Les groupements NHS réagissent avec les amines primaires à un pH compris entre 7 et 9 afin de former des liens amides stables, permettant le relâchement du groupement N-hydroxysulfosuccinimide et la fixation covalente des protéines contiguës.

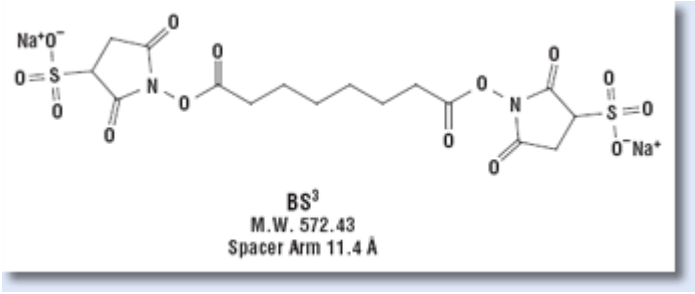


Figure M-2 *: Structure du crosslinker BS^3 (Source : Pierce).*

6 Analyse de la localisation du récepteur de l'EGF

Afin de montrer l'internalisation du récepteur de l'EGF lors des différents stress appliqués aux kératinocytes, nous avons utilisé une technique morphologique (les marquages en microscopie confocale) et des techniques biochimiques que nous allons décrire çi-dessous.

6.1 Test de liaison de ^{125}I-EGF

Les cellules ont été ensemencées dans des plaques 24 puits et cultivées jusqu'à atteindre un état de confluence. Elles ont ensuite été traitées comme décrit puis incubées 3 heures à 4°C avec 1nM de ^{125}I-EGF (Amersham, GE Healthcare) en présence (liaison non spécifique) ou non (liaison spécifique) de 200 nM d'EGF non marqué (R&D Systems). Après plusieurs lavages, les cellules ont été lysées dans 300 µl de NaOH 1M pendant 1 heure. Les lysats ont été récoltés et la radioactivité associée a été comptée pendant 1 min dans un compteur gamma (Beckman).

La liaison spécifique de l'EGF sur le récepteur a été calculée comme étant la différence entre la liaison totale et la liaison non spécifique.

6.2 Biotinylation de EGFR

Cette approche biochimique de la localisation du récepteur de l'EGF est basée sur une méthode décrite dans Zwang & Yarden (2006). La figure M-3 montre une représentation schématique de la procédure. Les cellules sont laissées à proliférer jusqu'au stade de confluence. Elles sont ensuite rincées avec un tampon

PBS avant d'être incubées 20 minutes avec une solution de PBS contenant du Sulfo-NHS-SS-Biotin (0,5 mg/ml, Pierce) afin de biotinyler les protéines de surface. L'excès de biotine est enlevé avec de la glycine (15 mM, Merck). Les kératinocytes sont ensuite mis en présence de MβCD (7,5 mM) pendant une heure, d'H_2O_2 (1 mM) ou d'EGF (10 ng/ml) pendant 20 minutes. Après le traitement, la biotine restant en surface des cellules est clivée par trois rinçages de huit minutes avec une solution contenant du glutathion 50 mM, du NaCl 75 mM, de l'EDTA 1 mM, 1% de BSA et 0,75% de NaOH 10N.

Les cellules sont ensuite lysées dans le tampon décrit au point 5.2 et les lysats sont incubés en rotation toute la nuit à 4°C avec l'anticorps LA1 dilué 100x. Le lendemain, les complexes immuns sont précipités à l'aide de billes d'agarose couvertes de protéine A (Roche) pendant quatre heures à 4°C. Les complexes immunoprécipités sont ensuite rincés cinq fois avec le tampon de lyse avant d'être séparés par SDS-PAGE. La détection de la biotine est réalisée par une incubation de la membrane avec de la streptavidine couplée à une HRP (DakoCytomation) diluée trois fois dans du tampon PBS-T contenant 5% de lait en poudre.

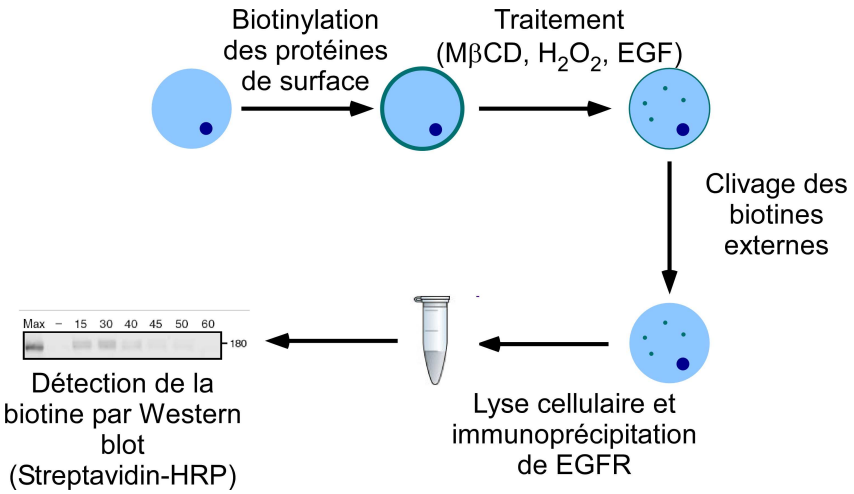


Figure M-3 : *Représentation schématique de la procédure expérimentale utilisée pour la détection biochimique de la localisation du récepteur de l'EGF.*

7 Survie et migration cellulaire

7.1 Accumulation de BrdU

Les kératinocytes sont mis en culture sur des couvre-objets et traités une heure en présence de MβCD 7,5 mM avant d'être laissés récupérer pour 0, 1, 3, 7, 17 ou 24 heures en présence de BrdU (10 µM, Sigma). Les cellules sont ensuite fixées avec de la PFA (4%, 15 min) et perméabilisées avec une solution de Triton X-100 (1%, 5 min). L'ADN a ensuite été dénaturé par une incubation de 30 minutes en présence d'HCl 2N, neutralisé par du $NaBH_4$ (0,1 M, pH 8,5). Le BrdU incorporé a été détecté par une incubation avec un

anticorps primaire spécifique (BD Pharmingen) suivi d'un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à une sonde Alexa Fluor® 488. Les noyaux ont été marqués avec du To-Pro®-3. Des images ont été prises au microscope confocal avec un objectif 40x et 400 cellules par condition ont été comptées dans trois expériences indépendantes, le pourcentage de cellules ayant incorporé le BrdU étant calculé comme suit : (nombre de cellules positive pour le BrdU /nombre total de cellules)*100.

7.2 Test de migration

Les kératinocytes ont été ensemencés sur des couvre-objets et les cultures confluentes ont été incubées en présence des inhibiteurs PD169316 (15 µM, Calbiochem), SB202190 (10 µM, Calbiochem), PD98059 (500 nM, Calbiochem) ou du véhicule (DMSO) 30 minutes avant que l'homogénéité de la culture ne soit rompue avec un embout de micropipette de 200 µl. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS puis laissées 24 heures dans du milieu contenant toujours les inhibiteurs afin de permettre la migration cellulaire. Les cultures ont ensuite été fixées à la PFA (4%, 15 min) avant d'être colorées au bleu de toluidine (0,5% dans du Borax 1% pendant 3 minutes à 37°C), montées sur lame et observées en microscopie à fond clair.

8 Etude de la libération de l'amphiréguline

Afin d'étudier la libération de l'amphiréguline dans le milieu de culture, nous avons réalisé des tests ELISA. Suite aux expériences, le milieu de culture a été récupéré et l'abondance de l'amphiréguline libérée dans le milieu a été quantifiée avec le kit DuoSet ELISA human Amphiregulin (R&D Systems) selon les indications fournies par le fabricant.

9 Neutralisation du récepteur de l'EGF ou neutralisation de l'amphiréguline

Afin de neutraliser le récepteur de l'EGF ou l'amphiréguline, nous avons utilisé des anticorps se liant à la poche de liaison du ligand du récepteur de l'EGF (anti-EGFR, neutralizing, clone LA1, Upstate Millipore) ou empêchant l'amphiréguline de se lier au récepteur (Neutralizing AR antibody, R&D Systems).

Les cellules ont été pré-traitées pendant 30 min avec les anticorps (10 µg/ml) avant d'être traitées pendant une heure avec de la MβCD (7,5 mM) en présence ou non des anticorps neutralisant. Les cellules ont ensuite été lysées comme décrit au point 5.1 et les lysats cellulaires ont été analysés par Western blot.

Résultats

1 Désorganisation et réorganisation des lipid rafts

1.1 Introduction

Afin de désorganiser les *lipid rafts*, nous avons choisi de priver les kératinocytes de cholestérol par un traitement que l'on peut qualifier de pharmaco-chimique. En effet, la méthyl-bêta-cyclodextrine (MβCD) est une molécule-cage cyclique composée de 7 résidus glucose disposés de telle manière à former une cavité capable de séquestrer diverses molécules comme le cholestérol (revu dans Zidovetzki & Levitan 2007). La MβCD est largement citée dans la littérature pour son utilisation lors de l'étude de l'effet de la désorganisation des *lipid rafts* induite par la déplétion du cholestérol (Pike & Casey 2002; Gniadecki 2004; Jans *et al.* 2004).

Afin d'observer les effets de cette molécule sur le contenu en cholestérol des kératinocytes ainsi que sur la constitution des *lipid rafts*, nous avons réalisé des dosages du cholestérol cellulaire et des marquages en fluorescence des *lipid rafts* après avoir incubé des cultures de kératinocytes en présence de MβCD.

1.2 Effets de la MβCD sur le contenu en cholestérol et la morphologie des kératinocytes

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction générale, les membranes plasmiques des cellules contiennent des régions particulières nommées *lipid rafts*. Ces plates-formes de signalisation peuvent être déstabilisées suite au retrait de ses composants structuraux comme le cholestérol. Cependant, si les effets de la MβCD sur la réduction du contenu en cholestérol des kératinocytes sont déjà connus pour un traitement d'une heure en présence de 7,5 mM de MβCD (Jans *et al.* 2004; Bang *et al.* 2005), nous nous sommes demandé si dans ces conditions, le cholestérol membranaire était extrait rapidement ou de façon graduelle au cours du temps d'incubation en présence de MβCD dans les kératinocytes normaux. Afin de répondre à cette question, nous avons incubé les kératinocytes en présence de MβCD durant différentes périodes de temps inférieures à une heure et dosé le cholestérol subsistant dans les cellules. L'abondance du cholestérol chute de façon progressive au cours de l'incubation en présence de MβCD, arrivant à une perte de 43 % du cholestérol cellulaire par rapport au contrôle après 1 heure (Figure 1-1). La séquestration du cholestérol par la MβCD se fait donc de façon progressive et non abrupte, en atteignant un plateau après 45 et 60 minutes d'incubation avec la MβCD. Il est cependant à noter que les valeurs obtenues lors du dosage concernent non seulement le cholestérol résidant en membrane plasmique, mais également le cholestérol intracellulaire, présent notamment sous forme d'ester de cholestérol. Les valeurs obtenues lors de ce dosage sous-estiment donc la perte de cholestérol membranaire puisque la MβCD ne pénètre pas

dans les cellules et n'extrait en conséquent que le cholestérol de la membrane plasmique alors que nous dosons l'entièreté du cholestérol cellulaire.

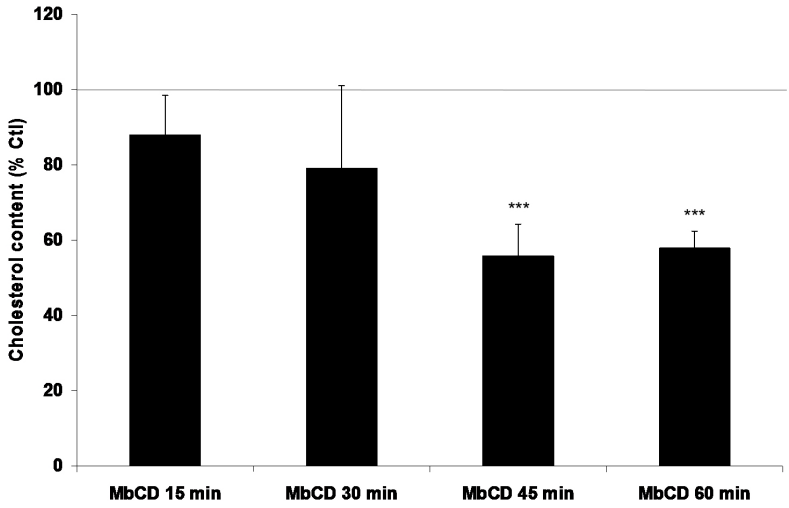


Figure 1-1 : Effets de la déplétion du cholestérol membranaire sur l'abondance du cholestérol.
Des cultures de kératinocytes à confluence ont été incubées pendant des périodes croissantes en présence de MβCD 7,5 mM. Le cholestérol a ensuite été extrait et dosé dans trois expériences indépendantes. ***=p<0,005.

Afin d'observer si le retrait du cholestérol membranaire a un effet sur la structure des *lipid rafts*, nous avons réalisé un marquage de ces derniers à l'aide de la sous-unité B de la toxine de Vibrio cholerae (Figure 1-2). Cette toxine est composée de deux sous-unités (A et B). La sous-unité A est une ADP-ribosyltransférase tandis que la sous-unité B, non toxique, permet à la protéine de s'accrocher à la surface cellulaire par l'intermédiaire des chaînes pentasaccharidiques des gangliosides GM1 (Spiegel 1985; Harder *et al.* 1998). Le couplage de la sous-unité B (CTx-B) de la toxine à une sonde Alexa 555 permet le marquage des gangliosides GM1 et donc la visualisation de la localisation et la structure des *lipid rafts*. Ce marquage est informatif, mais reste néanmoins relativement peu précis. En effet, comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, si la taille estimée des *lipid rafts* est de 10-200 nm, le pouvoir de résolution d'un microscope optique n'est au mieux que de 200 nm. Il est donc relativement difficile d'avoir une idée précise de ce que sont les *lipid rafts* en utilisant la microscopie optique. De plus, la structure pentamérique de la CTx-B induit l'agrégation des GM1 et donc des *lipid rafts* (Spiegel *et al.* 1984) et la fixation chimique des cellules ne préserve pas toujours la localisation des molécules (particulièrement des lipides), pouvant causer des résultats artéfactuels. Nous avons réalisé le marquage des GM1 à 4°C afin de minimiser les mouvements

membranaires avant de fixer les cellules avec de la paraformaldéhyde. Comme illustré à la figure 1-2, le marquage des *lipid rafts* n'est pas homogène dans la culture, certaines cellules sont marquées plus fortement que les autres, suggérant une plus grande concentration de régions riches en GM1 ou une meilleure accessibilité de la toxine pour ces cellules. Au niveau du motif du marquage, les cellules contrôles présentent un marquage en "taches" (Figure 1-2a flèches) couvrant toute la surface de la cellule alors que les cellules déplétées en cholestérol membranaire ne présentent plus ces "taches" mais ont un aspect plus rétracté comme attesté par la présence de prolongations (Figure 1-2b flèches). Le changement du marquage CTx-B dans les kératinocytes incubés avec la MβCD plaide en faveur d'une désorganisation des *lipid rafts* due à la déplétion du cholestérol membranaire.

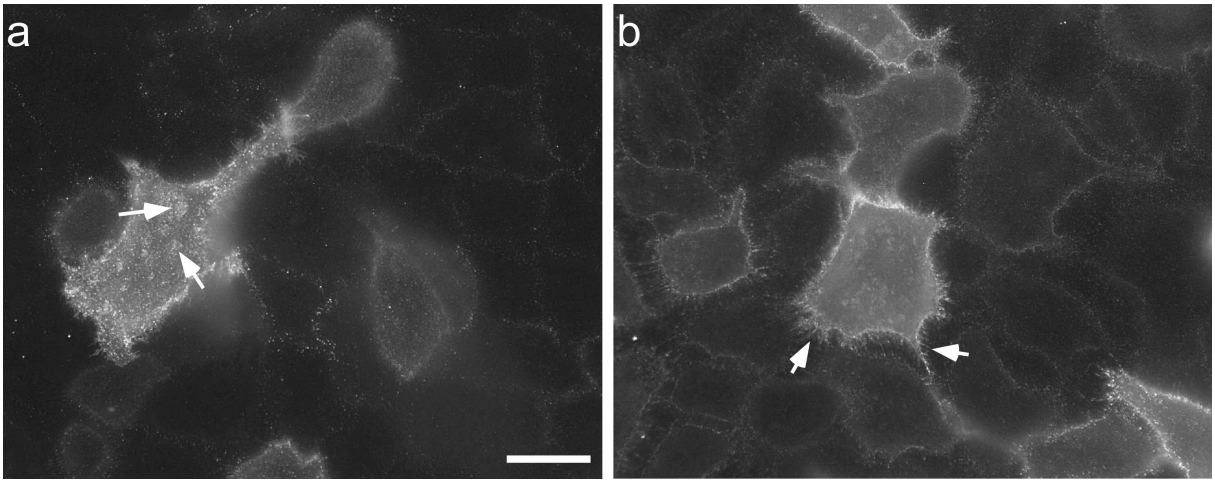


Figure 1-2 : Effets de la déplétion du cholestérol membranaire sur la morphologie des lipid rafts.
Des cultures confluentes de kératinocytes ont été laissées comme contrôle (**a**) ou incubées une heure en présence de MβCD 7,5 mM (**b**) avant que les *lipid rafts* ne soient marqués avec la CTx-B. Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (barre d'échelle = 20 µm).

La rétraction des kératinocytes et la modification des contacts intercellulaires suite à la déplétion du cholestérol membranaire est un phénomène observé tant en microscopie à contraste de phase qu'en microscopie électronique à balayage (Figure 1-3). En microscopie à contraste de phase, les kératinocytes traités par la MβCD présentent une morphologie plus allongée et rétractée, les contours cellulaires sont devenus réfringents et la culture n'apparaît plus toujours comme confluente, suggérant la rupture des structures d'adhérence comme les jonctions d'ancrage (Lynch *et al.* 1993; Stankewich *et al.* 1996). Observés en microscopie électronique à balayage, les kératinocytes traités avec la MβCD apparaissent nettement moins jointifs que les cellules contrôles et présentent de longues prolongations de type filopode. Les microvillosités présentes en surface des cellules paraissent moins marquées et donc les membranes des kératinocytes semblent plus " lisses " que celles des kératinocytes non traités (Figure 1-3b). Ces prolongations sont notamment constituées d'actine puisqu'un marquage avec la phalloïdine-

rhodamine produit exactement les mêmes caractéristiques de rétraction ainsi que la présence de prolongations lorsque les cellules sont traitées à la MβCD (Figure 1-3c). Ce qui pourrait être expliqué par le fait que la dépolymérisation du réseau d'actine est connue pour rompre les jonctions intercellulaires (Shen & Turner 2005) tandis que le cholestérol stabilise l'association des protéines contenues dans ce type de jonctions (Lambert *et al.* 2005).

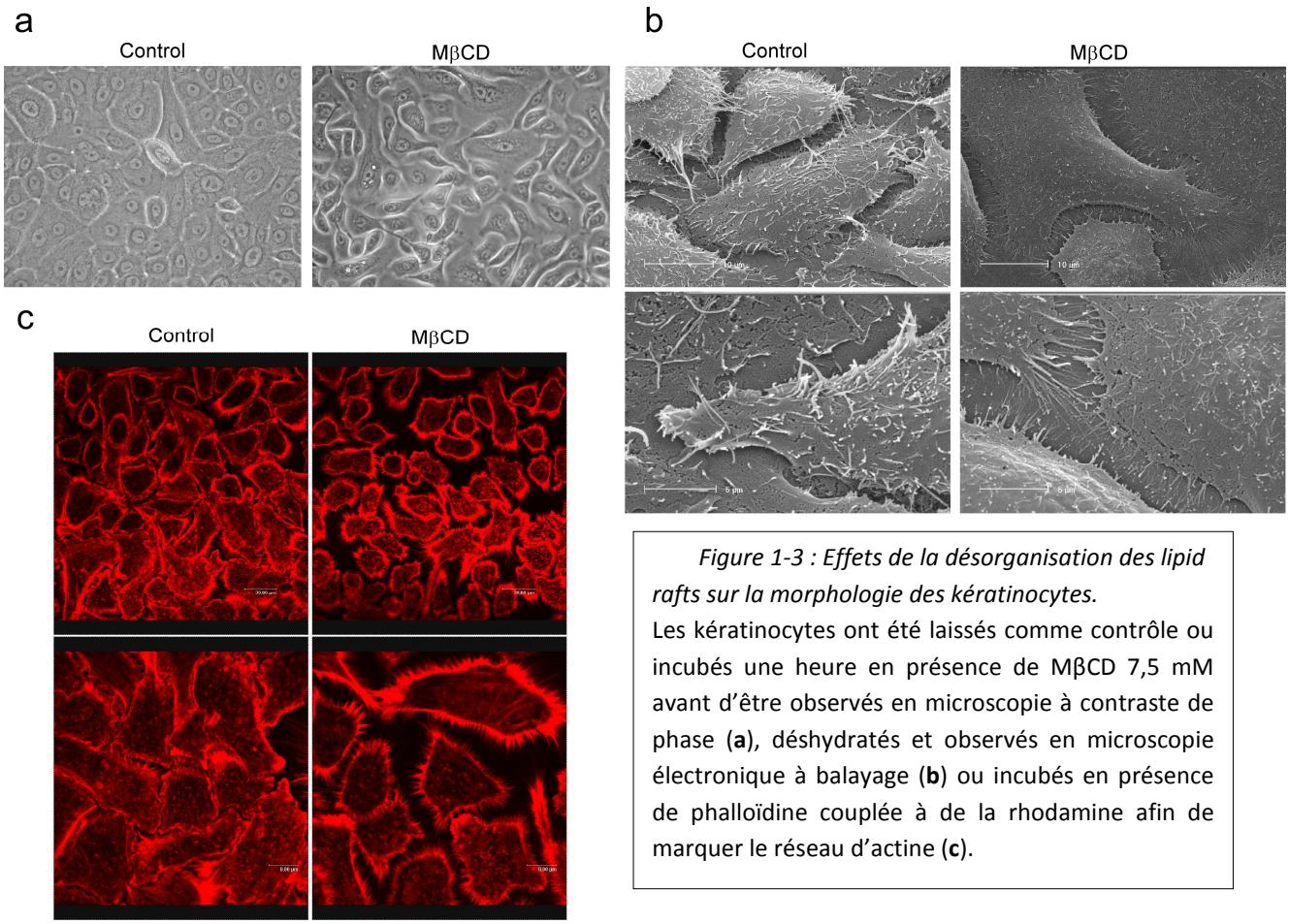


Figure 1-3 : Effets de la désorganisation des lipid rafts sur la morphologie des kératinocytes.
Les kératinocytes ont été laissés comme contrôle ou incubés une heure en présence de MβCD 7,5 mM avant d'être observés en microscopie à contraste de phase (**a**), déshydratés et observés en microscopie électronique à balayage (**b**) ou incubés en présence de phalloïdine couplée à de la rhodamine afin de marquer le réseau d'actine (**c**).

Nous avons ensuite recherché si la déplétion en cholestérol pouvait induire la désorganisation des plateformes moléculaires que sont les *lipid rafts.* Nous avons réalisé des centrifugations en gradient de densité après avoir traité les kératinocytes avec la MβCD et avons analysé par Western blot la localisation de deux protéines couramment utilisées comme marqueurs des *lipid rafts*, la cavéoline-1 et la flotilline-1, dans les différentes fractions obtenues à partir de ces gradients en utilisant les mêmes conditions de détection pour les paires contrôle-MβCD.

La figure 1-4 montre une distribution de la flotilline-1 entre les fractions 6, 7 et 8 dans la condition contrôle. Distribution qui change suite à un traitement à la MβCD puisque la flotilline-1 n'est alors plus détectable dans ces fractions.

La cavéoline-1, en revanche, est dispersée entre les fractions 7 à 15 dans la condition contrôle et un traitement à la MβCD provoque une perte de la détection de cette protéine dans ces même fractions.

Ce résultat indique que les *lipid rafts* pourraient être localisés dans les fractions 6, 7 et 8 de l'échantillon contrôle dans nos conditions de centrifugation puisque c'est dans celles-ci qu'on retrouve les deux protéines marqueurs. Cependant, comme ces régions sont enrichies en cholestérol, un dosage du cholestérol dans les différentes fractions du gradient permettrait d'affiner la localisation des *lipid rafts* dans ces conditions de centrifugation.

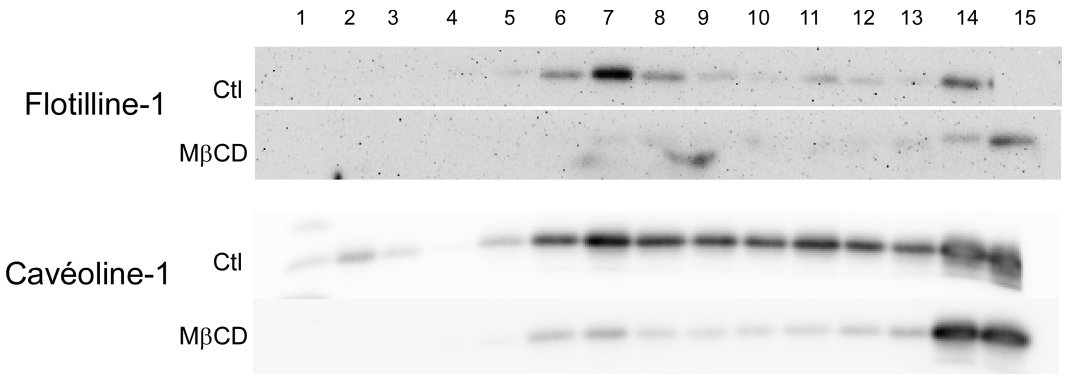


Figure 1-4 : Effets de la déplétion du cholestérol sur la localisation de la cavéoline-1 et de la flotilline-1 dans un gradient de densité.
Les kératinocytes ont été mis en présence de MβCD 7,5 mM pendant une heure. Les lysats cellulaires ont ensuite été placés au fond d'un tube et recouvert d'un gradient discontinu de sucrose. Après la centrifugation, le gradient a été séparé en 15 fractions en partant de la fraction la plus légère (1) jusqu'au culot (15) et analysé par Western blot pour la cavéoline-1 et la flotilline-1.

Il semble, par ailleurs, que la déplétion du cholestérol induit une perturbation des plateformes lipidiques puisque tant la flotilline-1 que la cavéoline-1 ne sont plus détectées dans les mêmes fractions suite à la déplétion du cholestérol mais bien dans les portions les plus lourdes du gradient, indiquant que la déplétion du cholestérol par la MβCD pourrait déstabiliser ces structures.

1.3 Effets de la déplétion du cholestérol sur la signalisation

De la même façon que pour la cinétique d'extraction du cholestérol par la MβCD, si les voies de signalisation induites par la désorganisation des *lipid rafts* sont étudiées dans les kératinocytes (Gniadecki 2004; Jans *et al.* 2004; Bang *et al.* 2005), mais également dans d'autres types cellulaires, aucune donnée concernant les cinétiques d'activation n'est disponible. Nous nous sommes donc intéressés à l'activation du récepteur de l'EGF (EGFR) en analysant la phosphorylation de la Tyr 1173 puisque ce récepteur est connu pour être activé lors de la déplétion du cholestérol tant dans les kératinocytes (Jans *et al.* 2004) que

dans d'autres types cellulaires (Chen & Resh 2002; Pike & Casey 2002). Nous avons également étudié l'état de phosphorylation de la MAPK p38 et de Akt. Si la MAPK p38 a été décrite comme étant un marqueur de stress (revu dans (Kyriakis & Avruch 2001), elle est également activée lors de la déplétion du cholestérol (Jans *et al.* 2004), au contraire de la protéine anti-apoptotique Akt qui est déphosphorylée dans ces mêmes conditions (Li *et al.* 2006b; Adam *et al.* 2007).

Afin d'étudier la mise en place des signalisations induites par la déplétion du cholestérol, nous avons incubé les kératinocytes en présence de MβCD pendant des périodes de temps croissantes, mais n'excédant pas 60 minutes. Si le cholestérol est extrait de façon progressive (Figure 1-1), la mise en place des signalisations par les kératinocytes en réponse à l'extraction de ce composé des *lipid rafts* est relativement rapide puisque tant le récepteur de l'EGF que la MAPK p38 sont activés dans les minutes qui suivent la mise en présence de MβCD (Figure 1-5). Cependant, si la phosphorylation du récepteur de l'EGF semble être constante tout au long de l'heure d'incubation en présence de MβCD, la MAPK p38 paraît subir une activation en deux phases. La première phase d'activation est précoce et fugace puisqu'elle prend part entre une et cinq minutes suivant l'ajout de MβCD tandis que la deuxième phase d'activation est plus tardive mais prolongée, débutant 30 minutes après l'ajout de MβCD et se prolongeant jusque 60 minutes après (Figure 1-5).

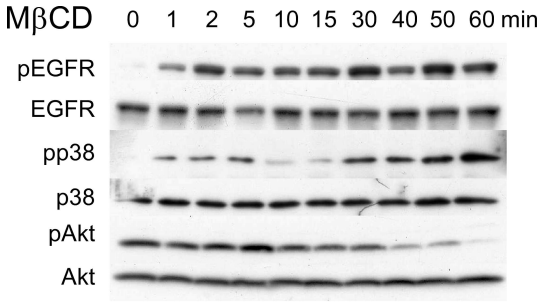


Figure 1-5 : Effets de la déplétion du cholestérol sur la signalisation.
Les kératinocytes ont été mis en présence de MβCD 7,5 mM pendant différentes périodes allant de une à soixante minutes. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par Western blot pour le récepteur de l'EGF, p38, Akt ainsi que leurs formes phosphorylées.

La protéine anti-apoptotique Akt en revanche commence à être déphosphorylée après 40 minutes de traitement et est complètement déphosphorylée après 60 minutes. Cette désactivation pourrait éventuellement être à l'origine de la mise en place d'un processus apoptotique et ce, bien que le récepteur de l'EGF soit activé. Il en va de ême pour l'activation biphasique de la MAPK p38 .

1.4 Les kératinocytes récupèrent suite à la déplétion du cholestérol membranaire

Nous nous sommes ensuite demandé si, suite à un traitement avec la MβCD, les kératinocytes sont capables de récupérer tant au niveau de la présence de cholestérol membranaire que sur le plan morphologique. En effet, si une incubation prolongée avec la MβCD induit la mort cellulaire (Bang *et al.* 2005; Li *et al.* 2006b), la présence de cholestérol chez le kératinocyte épidermique est indépendante

d'apport extérieur, notamment par les lipoprotéines circulant dans le sang. Il serait donc tout à fait possible que les cellules soient capables de re-synthétiser du cholestérol et peut-être de reformer des *lipid rafts* (Simons & Ikonen 2000). Afin de répondre à cette question, nous avons incubé les kératinocytes pendant une heure en présence de MβCD et nous les avons laissés récupérer pendant différentes périodes. A la suite de ces périodes de récupération, nous avons réalisé un dosage du cholestérol ou marqué les *lipid rafts*. La figure 1-6a montre les résultats obtenus pour le dosage du cholestérol et montre une re-synthèse progressive de ce composé des *lipid rafts*, permettant d'atteindre les valeurs initiales de cholestérol cellulaire après 17 heures de récupération. Une incubation en présence de MβCD préalablement chargée en cholestérol (Klein *et al.* 1995) ne génère aucune diminution du contenu cellulaire en cholestérol. Au contraire un léger apport, non significatif cependant par rapport au contrôle, est observé dans ces conditions. En effet, il est connu que la MβCD peut également servir de complexe d'inclusion permettant non seulement de re-fournir les membranes en cholestérol, mais également d'y délivrer le cholestérol et donc d'enrichir les membranes en ce composé (Zidovetzki & Levitan 2007).

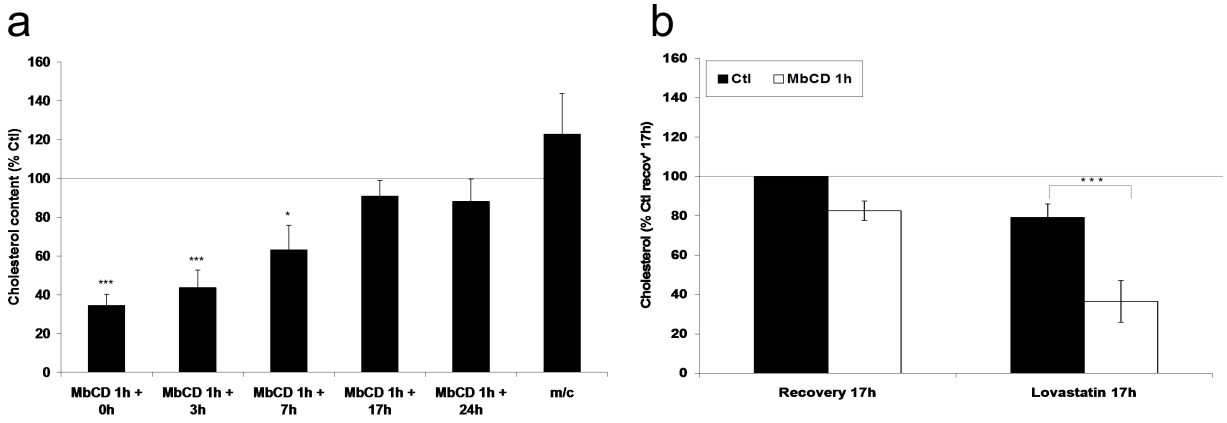


Figure 1-6 : Effet de la récupération suivant la déplétion en cholestérol sur la concentration en cholestérol.

Des cultures de kératinocytes à confluence ont été incubées 1 heure en présence de MβCD 7,5 mM puis laissées récupérer pendant différentes périodes ou incubées 1 heure en présence de MβCD chargée en cholestérol (m/c)(**a**) ou laissées récupérer en présence de lovastatine (10 µM) ou de DMSO (**b**). Le cholestérol a ensuite été extrait et dosé (n=3). Les moyennes ont été comparées en utilisant un test de Student. *** $p<0,001$, * $p<0,05$.

Il est à noter que si la récupération se fait en présence de lovastatine, une molécule qui inhibe la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA réductase (HMGCoA réductase), l'enzyme-clé de la voie de synthèse du cholestérol, ce dernier n'est pas re-synthétisé durant la récupération comme attesté à la figure 1-6b. De plus, la légère diminution de la quantité de cholestérol observée lorsque les cellules contrôles sont incubées 17 heures en présence de lovastatine pourrait indiquer qu'il existe une légère perte continuelle

du cholestérol membranaire qui ne peut être compensée par l'envoi en membrane de cholestérol néo-synthétisé si la HMGCoA réductase est inhibée.

Le cholestérol joue également un rôle dans la stabilisation de la cavéoline-1 (Frank *et al.* 2002). Nous avons donc recherché son abondance protéique lors de la déplétion du cholestérol par la MβCD puis suivant des périodes de récupération (Figure 1-7). On peut observer une diminution de la forme totale de la cavéoline-1 au cours des périodes de récupération suivant la déplétion du cholestérol. Il est cependant à noter que la cavéoline-1 est phosphorylée de façon plus marquée sur sa Tyr 14 lors des premières heures de récupération. Cette phosphorylation diminue par la suite, probablement en raison de la dégradation de la protéine. En revanche, une incubation en présence d'EGF n'induit pas de phosphorylation notable de la cavéoline-1.

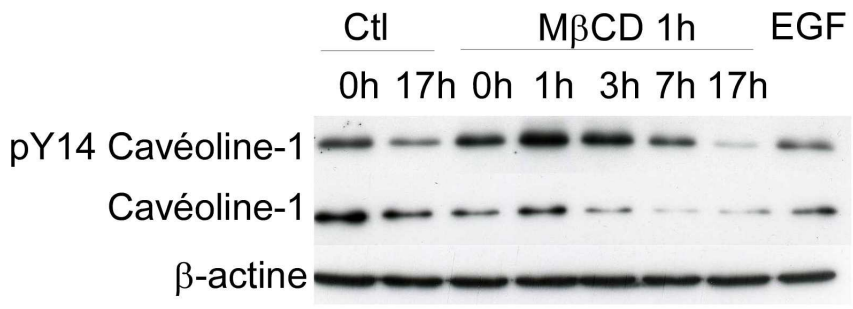


Figure 1-7 : Effet de la récupération suivant la déplétion du cholestérol sur la cavéoline-1.
Des cultures confluentes de kératinocytes ont été laissées comme contrôle, incubées une heure en présence de MβCD 7,5 mM avant d'être laissée récupérer pendant 1, 3, 7, ou 17 heures dans du milieu de culture ou incubées 20 min en présence d'EGF (10 ng/ml). Les lysats cellulaires ont été analysés par Western blot pour la cavéoline-1 et sa forme phosphorylée sur la Tyr 14. La détection de la β-actine constitue un contrôle de charge.

Nous pouvons observer au niveau du marquage des *lipid rafts* par la CTxB la reformation des taches observés dans les cellules contrôles lorsque les kératinocytes ont la possibilité de récupérer pendant 17h après la déplétion du cholestérol (Figure 1-8d, flèche). De plus, la rétraction des kératinocytes disparait lors de la récupération. Dans le cas d'une incubation en présence de MβCD chargée en cholestérol (Figure 1-8e), aucune altération du marquage n'est observée par rapport au contrôle.

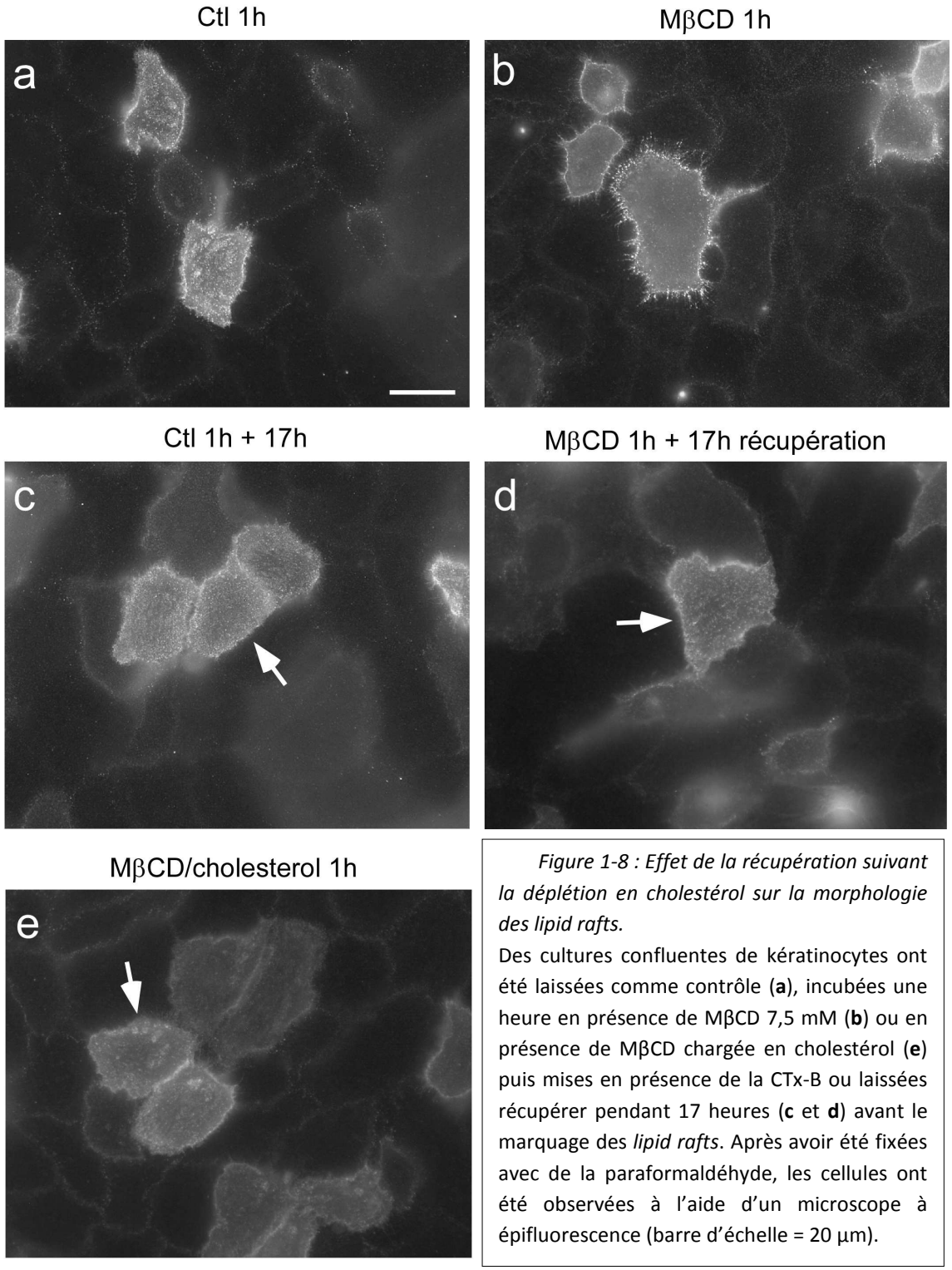


Figure 1-8 : Effet de la récupération suivant la déplétion en cholestérol sur la morphologie des lipid rafts.

Des cultures confluentes de kératinocytes ont été laissées comme contrôle (**a**), incubées une heure en présence de MβCD 7,5 mM (**b**) ou en présence de MβCD chargée en cholestérol (**e**) puis mises en présence de la CTx-B ou laissées récupérer pendant 17 heures (**c** et **d**) avant le marquage des *lipid rafts*. Après avoir été fixées avec de la paraformaldéhyde, les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (barre d'échelle = 20 µm).

Etant donné que les kératinocytes retrouvent une morphologie normale si on les laisse récupérer après la déplétion du cholestérol, nous nous sommes demandé si les signalisations observées et illustrées à la figure 1-5 étaient également supprimées. Nous avons donc étudié l'état de phosphorylation du récepteur de l'EGF, des MAPK ERK1/2 et p38, ainsi que la phosphorylation de Akt directement après la déplétion du cholestérol ou après une période de récupération qui dure entre 1 et 17 heures.

Alors que toutes les protéines investiguées (à l'exception d'Akt) sont phosphorylées dans l'heure suivant la déplétion du cholestérol, la période de récupération des kératinocytes permet d'observer l'extinction de certaines des signalisations après 17 heures. Les MAPK ERK1/2 semblent rester activées durant toutes les périodes de récupération, tandis que le récepteur de l'EGF et la MAPK p38 sont déphosphorylés après 7 heures de récupération (Figure 1-9a). De façon surprenante, Akt est à nouveau phosphorylé après 17 heures de récupération, indiquant éventuellement que la mise en place éventuelle d'un processus d'apoptose peut être interrompue dans ces conditions. Au contraire, lorsque les cellules sont laissées en présence de lovastatine durant les 17 heures de récupération, les phosphorylations du récepteur de l'EGF et de la MAPK p38 restent détectables, tandis que la phosphorylation de Akt n'est pas entièrement récupérée (Figure 1-9b).

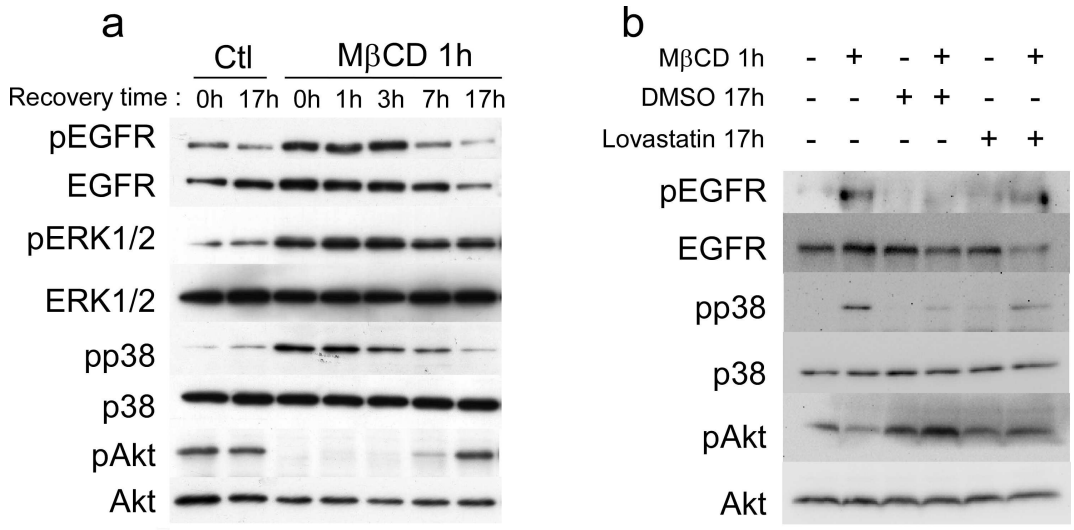


Figure 1-9 : Effet de la récupération suivant la désorganisation des lipid rafts sur la signalisation.

a : Des cultures confluentes de kératinocytes ont été laissées comme contrôle ou incubées une heure en présence de MβCD 7,5 mM avant d'être laissée récupérer pendant 1, 3, 7, ou 17 heures dans du milieu de culture.

b : Les cellules ont été traitées ou non 1h en présence de MβCD 7,5 mM avant d'être laissée récupérer (ou non) 17 heures en présence de lovastatine ou du véhicule (DMSO). Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par Western blot pour le récepteur de l'EGF, ERK1/2, p38, Akt ainsi que leur forme phosphorylée.

D'un point de vue plus fonctionnel, nous avons cherché à voir si la déplétion transitoire du cholestérol influait sur certaines fonctions des kératinocytes, notamment la migration et la prolifération qui sont deux activités importantes dans la fonction des kératinocytes épidermiques.

Nous avons donc réalisé un test de recolonisation afin d'étudier la capacité des kératinocytes à migrer. Un *scratch* a été réalisé dans des cultures de kératinocytes et les cellules ont été traitées une heure en présence de MβCD puis laissées récupérer (ayant donc possibilité de migrer) pendant 24 heures, en présence ou non de lovastatine afin d'empêcher la re-synthèse du cholestérol (Figure 1-10a).

La migration des cellules contrôles, qu'elles soient en présence ou non de lovastatine, ne semble pas particulièrement perturbée puisqu'elles sont capables de recoloniser la totalité de la surface du *scratch*. Le fait d'avoir perturbé les *lipid rafts* par la déplétion du cholestérol ne montre qu'une incidence partielle sur la capacité de migration des kératinocytes comme le montre la recolonisation d'une grande surface du *scratch*. Toutefois, l'inhibition de l'HMGCoA réductase par la lovastatine après la déplétion du cholestérol par la MβCD ne permet pas la migration des kératinocytes, soulignant l'importance du cholestérol, et donc des *lipid rafts*, dans la fonctionnalité de ces cellules pour réparer une monocouche épithéliale.

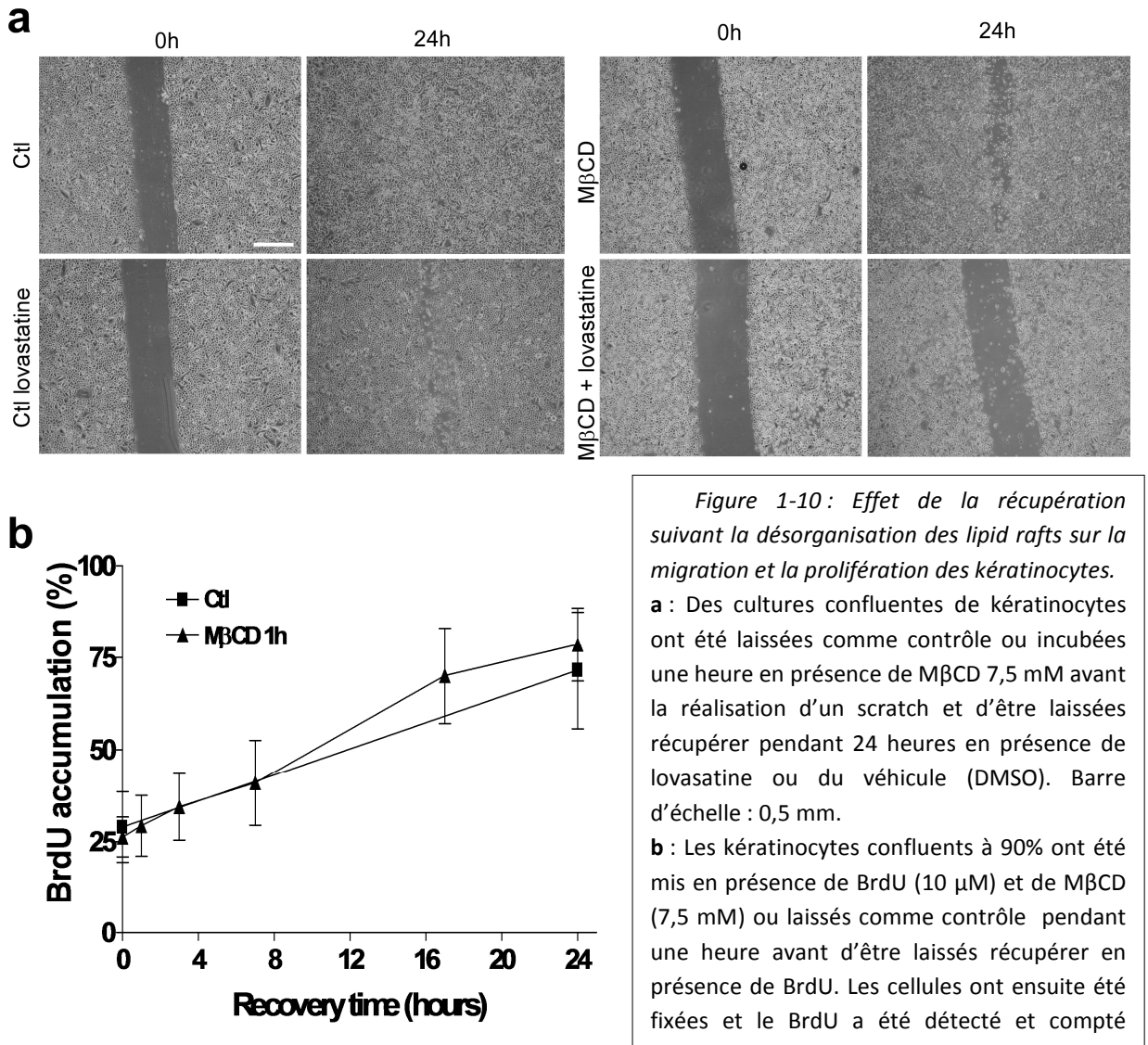


Figure 1-10 : Effet de la récupération suivant la désorganisation des lipid rafts sur la migration et la prolifération des kératinocytes.
a : Des cultures confluentes de kératinocytes ont été laissées comme contrôle ou incubées une heure en présence de MβCD 7,5 mM avant la réalisation d'un scratch et d'être laissées récupérer pendant 24 heures en présence de lovasatine ou du véhicule (DMSO). Barre d'échelle : 0,5 mm.
b : Les kératinocytes confluents à 90% ont été mis en présence de BrdU (10 µM) et de MβCD (7,5 mM) ou laissés comme contrôle pendant une heure avant d'être laissés récupérer en présence de BrdU. Les cellules ont ensuite été fixées et le BrdU a été détecté et compté comme décrit dans la section Matériel et Méthodes.

Au point de vue de la prolifération, nous n'avons observé aucune variation suite à la désorganisation des *lipid rafts* puisque 24 heures après l'incubation en présence de MβCD, 78,5 % des cellules ont incorporé du BrdU alors que les contrôles présentent un pourcentage d'incorporation de BrdU de 71,5 %. Le fait d'incuber les kératinocytes en présence de MβCD pendant une période d'une heure ne semble pas perturber la prolifération cellulaire alors que des temps d'incubation plus long résultent en la mort cellulaire (Bang *et al.* 2005; Li *et al.* 2006b).

En conclusion de cette première partie, nous pouvons dire que la MβCD induit bien une déplétion du cholestérol (Figure 1-1), laquelle semble induire deux types de réponses opposées : d'une part la survie en activant le récepteur de l'EGF et les MAPK ERK1/2, et d'autre part le stress par l'activation de la MAPK p38 et la déphosphorylation de Akt (Figure 1-5). Ces réponses sont mises en place de façon rapide, mais sont réversibles puisque laisser la possibilité aux cellules de récupérer résulte en une néo-synthèse de cholestérol et en une extinction des signalisations (Figures 1-6a et 1-9a). En revanche, empêcher la néo-synthèse de cholestérol en inhibant l'enzyme-clé de la voie de synthèse du cholestérol ne permet ni la récupération du cholestérol membranaire, ni la reformation des structures marquées par la CTx-B, ni la déphosphorylation complète des protéines de signalisation comme EGFR ou p38 (Figures 1-6b et 1-9b).

2 Processing du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol

2.1 Introduction

L'activation du récepteur de l'EGF se fait de façon conventionnelle par la liaison d'un ligand, induisant la dimérisation du récepteur suivie par l'activation de son domaine tyrosine kinase (Jorissen *et al.* 2003). Cependant, le récepteur de l'EGF a également été décrit comme pouvant être activé de façon indépendante de ligand, ce mode d'activation se produisant le plus souvent en situation de stress, notamment suite à une exposition aux UV (Peus *et al.* 1998) ou lors de la désorganisation des *lipid rafts* (Chen & Resh 2002).

La première partie de ce chapitre a été réalisée dans le département de dermatologie du Bispebjerg Hospital (Copenhague, Danemark) chez le Dr. Robert Gniadecki avec des cellules HaCaT qui sont des kératinocytes transformés spontanément (Boukamp *et al.* 1988) et fait partie d'une publication présentée dans les annexes. La seconde partie a été réalisée au laboratoire Cellules et Tissus avec des kératinocytes humains normaux isolés selon la technique décrite dans la partie Matériel et Méthodes et fait également l'objet d'une publication présentée en annexe.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à montré l'activation ligand-indépendante du récepteur de l'EGF suite à la déplétion du cholestérol dans des kératinocytes de types HaCaT comme cela avait déjà été montré dans des cellules Cos-1 (Chen & Resh 2002).

Au regard de nouvelles données disponibles dans la littérature, la ré-examination des résultats obtenus avec les cellules HaCaT a cependant laissé penser que l'activation du récepteur n'était pas entièremment indépendante de la présence de ligand et nous avons recherché le rôle d'un ligand dans l'activation du récepteur de l'EGF suite à la déplétion du cholestérol. Cette partie du travail sera présentée dans le troisième chapitre des résultats. Au vu des résultats obtenus après la publication des deux articles, les discussions développées dans ceux-ci concernant l'activation indépendante de ligand du récepteur de l'EGF suite à la déplétion du cholestérol sont donc à reconsidérer.

2.2 Activation indépendante de ligand du récepteur de l'EGF dans les cellules HaCaT

Nous avons tout d'abord cherché à savoir si le récepteur de l'EGF était activé de la même façon dans les cellules HaCaT que dans les kératinocytes normaux en réponse à la déplétion du cholestérol. En effet, Jans *et al.* avaient montré dans leur étude que lors de la désorganisation des *lipid rafts* suite à la déplétion du cholestérol, le récepteur de l'EGF (HER1) mais également HER2 étaient activés. Aucune phosphorylation d'HER3 n'avait été détectée (Jans *et al.* 2004). Le récepteur de l'EGF étant l'un des systèmes de contrôle les plus importants chez les kératinocytes, nous avons cherché à savoir si les kératinocytes transformés réagissaient de manière similaire en réponse à la déplétion du cholestérol.

Afin d'éviter tout effet dû à la présence de facteurs de croissance dans le sérum, les cellules ont été rincées et incubées deux heures dans du milieu DMEM ne contenant pas de sérum avant d'être mises en présence de MβCD. Comme montré à la figure 2-1, le récepteur de l'EGF est légèrement activé suite à la déplétion du cholestérol par la MβCD dans les cellules HaCaT. Les kinases ERK1/2 et p38 sont également phosphorylées dans ces conditions. Cependant, si l'activation du récepteur de l'EGF paraît être croissante entre 1 et 3 heures d'incubation en présence de MβCD, la phosphorylation de ERK1/2 décroît tandis que celle de la MAPK p38 est constante.

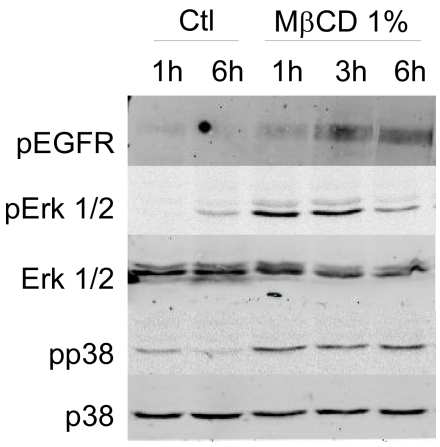


Figure 2-1 : Activation du récepteur de l'EGF, ERK1/2 et p38 dans les cellules HaCaT.
Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre un état de confluence puis privées de sérum pendant 2h avant d'être incubées en présence de MβCD 1% (= 7,5 mM) pendant 1, 3 ou 6 heures. Les lysats cellulaires ont été analysés par Western blot pour EGFR, ERK1/2, p38 et leur forme phosphorylée.

La phosphorylation de la partie cytoplasmique du récepteur de l'EGF est notamment due à l'activation du domaine tyrosine kinase. Jans *et al.* ayant montré le rôle de ce domaine dans l'activation du récepteur de l'EGF suite à déplétion du cholestérol (Jans *et al.* 2004), nous avons reproduit cette expérience avec les cellules HaCaT en utilisant un autre inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de EGFR, l'AG1478. Comme le montre la figure 2-2, la phosphorylation du

récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol n'est plus possible lorsque son domaine tyrosine kinase est inhibé par l'agent pharmacologique AG1478 (Figure 2-2a). De plus, la transduction du signal ne se fait pas puisque les MAPK ERK1/2 et p38 sont également déphosphorylées dans ces conditions. Ce qui laisse penser que l'activation de la MAPK p38 dépend de l'activité kinase du récepteur de l'EGF, après une heure du moins. En effet, après 90 min de traitement, si le récepteur de l'EGF et ERK1/2 ne sont pas phosphorylés en présence de l'inhibiteur, la phosphorylation de la MAPK p38 ne semble pas varier. Ce qui pourrait être dû à la mise en place d'une autre voie de signalisation activant p38, reflètant peut-être un léger effet toxique de l'inhibiteur puisque la MAPK p38 est activée en situation de stress.

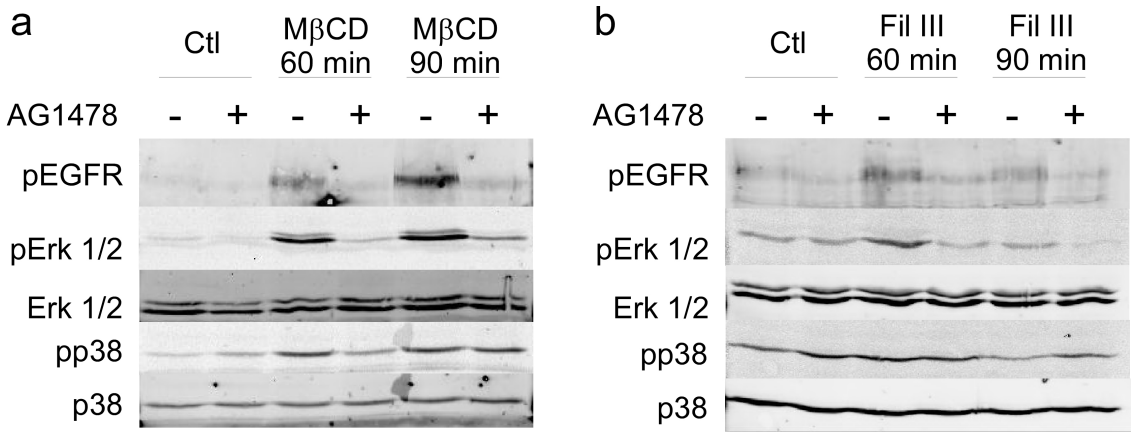


Figure 2-2 : Rôle du domaine tyrosine kinase dans l'activation du récepteur de l'EGF.
Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre un état de confluence puis privées de sérum pendant 2h avant d'être incubées 30 min en présence d'AG1478 (10 µM) ou du véhicule (DMSO) puis incubées 60 ou 90 min avec de la MβCD 7,5 mM (**a**) ou de la filipin III 2 µg/ml (**b**) en présence ou non de l'inhibiteur. Les lysats cellulaires ont été analysés par Western blot pour EGFR, p38, ERK1/2 et leur forme phosphorylée.

Nous avons également vérifié que l'activation du récepteur de l'EGF était due à la désorganisation des *lipid rafts* et pas à un effet inhérent à la MβCD. Pour cela, nous avons utilisé la filipin III qui complexe le cholestérol membranaire sans l'extraire comme le fait la MβCD (Robinson & Karnovsky 1980). Nous pouvons également observer une activation du récepteur de l'EGF lorsque les cellules sont traitées avec la filipin III (Figure 2-2b). Cependant, si un temps d'incubation croissant en présence de MβCD induit une augmentation de la phosphorylation du récepteur de l'EGF, celle-ci, de même que la phosphorylation de ERK1/2, semble diminuer au cours du temps d'incubation en présence de filipin III. De plus, la phosphorylation de la MAPK p38 ne varie pas en fonction de l'activité kinase du récepteur de l'EGF suite à son activation par la filipin III.

De façon générale, nous pouvons conclure de cette expérience que le récepteur de l'EGF est bien phosphorylé en réponse à la désorganisation des *lipid rafts* dans les cellules HaCaT et que l'activation du récepteur, due à l'activation du domaine tyrosine kinase, se transmet aux MAPK ERK1/2 et p38.

La question suivante consistait à savoir si l'activation du récepteur de l'EGF était due à la liaison d'un ligand à sa partie extracellulaire. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un anticorps neutralisant le domaine de liaison au ligand du récepteur de l'EGF. Si un ligand présent en membrane est clivé par l'activation de métallo-protéinase (Prenzel *et al.* 1999), il ne pourra pas se lier au récepteur de l'EGF et donc aucune phosphorylation de ce dernier ne sera observée. Au contraire, si l'activation est indépendante de ligand, le fait de bloquer le site de liaison du ligand n'empêchera pas l'activation du récepteur. Les résultats obtenus et présenté à la figure 2-3 nous paraissaient concordants avec ceux obtenus par Chen et Resh (Chen & Resh 2002).

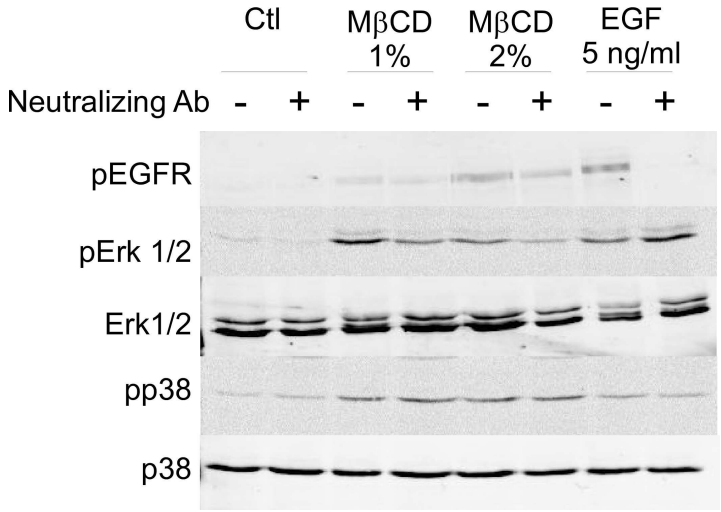


Figure 2-3 : Activation indépendante de ligand du récepteur de l'EGF dans les cellules HaCaT.
Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre un état de confluence puis privées de sérum pendant 2h avant d'être incubées 30 min en présence de l'anticorps neutralisant (10 µg/ml) avant d'être incubées 1 heure avec de la MβCD (1 ou 2%) ou de l'EGF 5 ng/ml en présence ou non de l'anticorps neutralisant. Les lysats cellulaires ont été analysés par Western blot pour EGFR, p38, ERK1/2 et leur forme phosphorylée.

En effet, l'activation du récepteur de l'EGF paraît être maintenue en présence de l'anticorps neutralisant lors de la déplétion du cholestérol (que ce soit avec 1 ou 2% de MβCD), alors qu'un ligand comme l'EGF est incapable de se lier au récepteur, et donc de déclencher son activation, lorsque le site de liaison du ligand est encombré par l'anticorps, confirmant l'effet de l'anticorps neutralisant.

La diminution de phosphorylation de la MAPK ERK1/2 en présence de l'anticorps neutralisant reflète bien le rôle du récepteur de l'EGF dans son activation, au contraire de la MAPK p38 dont le niveau de phosphorylation ne varie pas. Ce résultat pourrait éventuellement suggérer une activation indépendante du récepteur de l'EGF malgré le fait que l'inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF dimine l'activation de p38 (Figure 2-2a).

Au terme de cette partie du travail, nous avons pu montrer que les cellules HaCaT se comportaient comme les kératinocytes normaux en réponse à la déplétion du cholestérol en activant le récepteur de l'EGF mais également les MAPK ERK1/2 et p38.

Ce travail, réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr. Robert Gniadecki dans le département de dermatologie de l'hôpital Bispebjerg à Copenhague, fait partie d'une publication (voir les Annexes). Dans cet article, nous avons tout d'abord confirmé, par microscopie optique, la localisation du récepteur de l'EGF dans les *lipid rafts*, situé principalement au niveau de la partie apicale de la membrane plasmique. Nous avons ensuite montré que lors de la désorganisation des *lipid rafts*, la localisation du récepteur de l'EGF est modifiée et qu'il sort de ces régions denses pour former des agrégats stables dont la mobilité semble réduite par rapport à la membrane environnante, réduction d'autant plus forte lors de la déplétion du cholestérol.

Ce regroupement de récepteurs de l'EGF, qui n'est pas dû à une modification de la population membranaire du récepteur, permet probablement la création d'un environnement propice à son activation de façon indépendante de ligand (éventuellement en raison de la haute concentration d'une même protéine dans une aire restreinte (Nagy *et al.* 2002)) puisque le fait d'encombrer le site de liaison du ligand du récepteur de l'EGF n'empêche pas son activation suite à la déplétion du cholestérol.

Nous avons également cherché si l'activation du récepteur de l'EGF par la MβCD était traduite en signal mitogène pour la cellule suite à l'activation de la voie ERK1/2. L'incorporation de BrdU ou des colorations au bleu de méthylène ont montré que l'incubation en présence de faibles concentrations de MβCD (0,1-0,5%) induit une légère prolifération des cellules HaCaT. Cependant, si la concentration en MβCD est supérieure à 1% ou si le temps d'incubation est prolongé au-delà de 12 heures, l'effet devient létal pour les cellules.

2.3 Effet de la déplétion du cholestérol sur la signalisation et la localisation du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes normaux

Le récepteur de l'EGF peut être activé de différentes manières ne dépendant pas toutes de l'ajout d'un ligand dans le milieu extracellulaire. Nous avons donc comparé l'état d'activation du récepteur de l'EGF suite à différents types d'activation (c'est-à-dire dépendant ou non de l'ajout d'un ligand exogène) en analysant par Western blot l'état de phosphorylation du récepteur de l'EGF ainsi que des MAPK ERK1/2 et p38. Comme le montre la figure 2-4, la déplétion du cholestérol, le stress oxydatif par l'H_2O_2 et un ligand comme l'EGF induisent une phosphorylation du récepteur de l'EGF. Il est à noter que si la MAPK ERK1/2 est phosphorylée de façon semblable dans les trois conditions, p38 est particulièrement phosphorylé dans des situations de stress comme la déplétion du cholestérol ou le stress oxydatif.

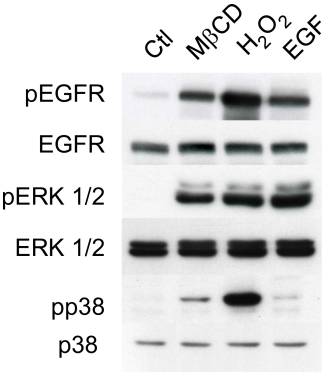


Figure 2-4 : Etat d'activation du récepteur de l'EGF, ERK1/2 et p38.
Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre un état de confluence puis incubées 1 heure avec de la MβCD 7,5 mM ou 20 min en présence d'H_2O_2 1 mM ou d'EGF 10 ng/ml. Les lysats cellulaires ont été analysés par Western blot pour EGFR, ERK1/2, p38 et leur forme phosphorylée.

Il est connu que la phosphorylation du récepteur de l'EGF induit la formation de dimères (Jorissen *et al.* 2003). Nous avons donc cherché si le récepteur de l'EGF, une fois activé dans nos trois conditions, était également capable de former des dimères. Pour cela, nous avons utilisé du Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS^3), un *crosslinker* non clivable, permettant de maintenir les liaisons entre deux protéines à la condition qu'elles soient suffisamment proches l'une de l'autre. Dans le cas où des dimères sont formés, le récepteur de l'EGF sera détecté à une taille de 180 kDa pour les formes non dimérisées, mais également à 360 kDa pour les formes dimérisées.

Nous avons pu observer la formation de dimères lorsque le récepteur de l'EGF est activé par un ligand, dimères qui sont constitués de monomères phosphorylés (Figure 2-5). Dans le cas de la déplétion du cholestérol, le récepteur de l'EGF forme également des dimères phosphorylés. Par contre, lors d'une incubation avec de l'H_2O_2, si le récepteur de l'EGF est phosphorylé, aucune dimérisation n'a été détectée (Figure 2-5).

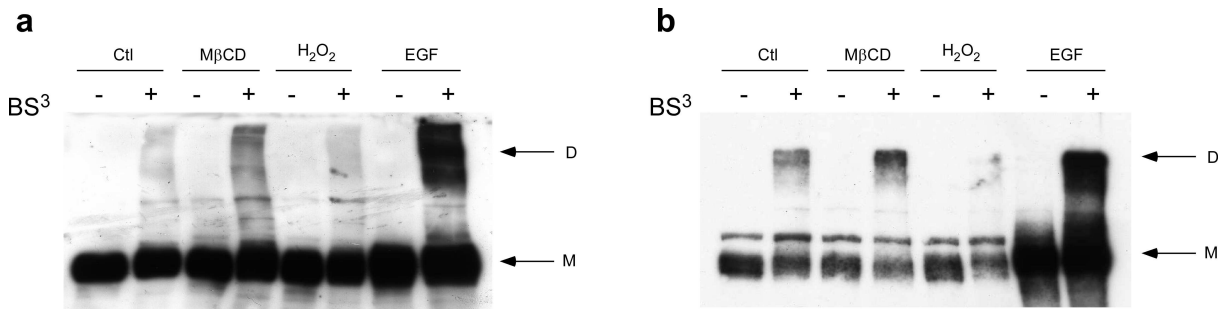


Figure 2-5 : Dimérisation du récepteur de l'EGF lors de la désorganisation des lipid rafts.
Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre un état de confluence. Les protéines de surface ont été crosslinkées (ou non) avec du BS^3 (2 mM, 15 min) avant d'être incubées 1 heure avec de la MβCD 7,5 mM ou 20 min en présence d'H_2O_2 1 mM ou d'EGF 10 ng/ml. Les cellules ont ensuite été lysées et les lysats ont été analysés par Western blot après migration dans un gel SDS-PAGE 5% pour le récepteur de l'EGF (**a**) et sa forme phosphorylée (**b**).

Le fait que le récepteur de l'EGF soit activé mais ne forme pas de dimère en situation de stress oxydatif et que des dimères soient détectés dans la condition contrôle pose la question de l'utilité de l'état de phosphorylation pour déclencher la dimérisation. Nous ne pouvons toutefois pas répondre à cette question du fait que bloquer l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF induit en soi une dimérisation de la protéine (Wang *et al.* 2005) (résultat non montré). De plus, il est probable que des récepteurs soient déjà présents sous forme de dimères inactifs en membrane (Tao & Maruyama 2008).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la possibilité d'internalisation du récepteur de l'EGF. En effet, dans la suite des événements suivant son activation et sa dimérisation en réponse à un ligand, le récepteur de l'EGF est internalisé. Nous avons donc réalisé un marquage du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes contrôles, traités à l'H_2O_2, déplétés en cholestérol ou incubés en présence d'EGF. Comme le montre la figure 2-6a, le récepteur de l'EGF est principalement localisé au niveau de la membrane plasmique dans les cellules contrôles. En réponse à un ligand comme l'EGF, le récepteur est internalisé et le marquage de la figure 2-6a présente une localisation essentiellement cytoplasmique du récepteur de l'EGF.

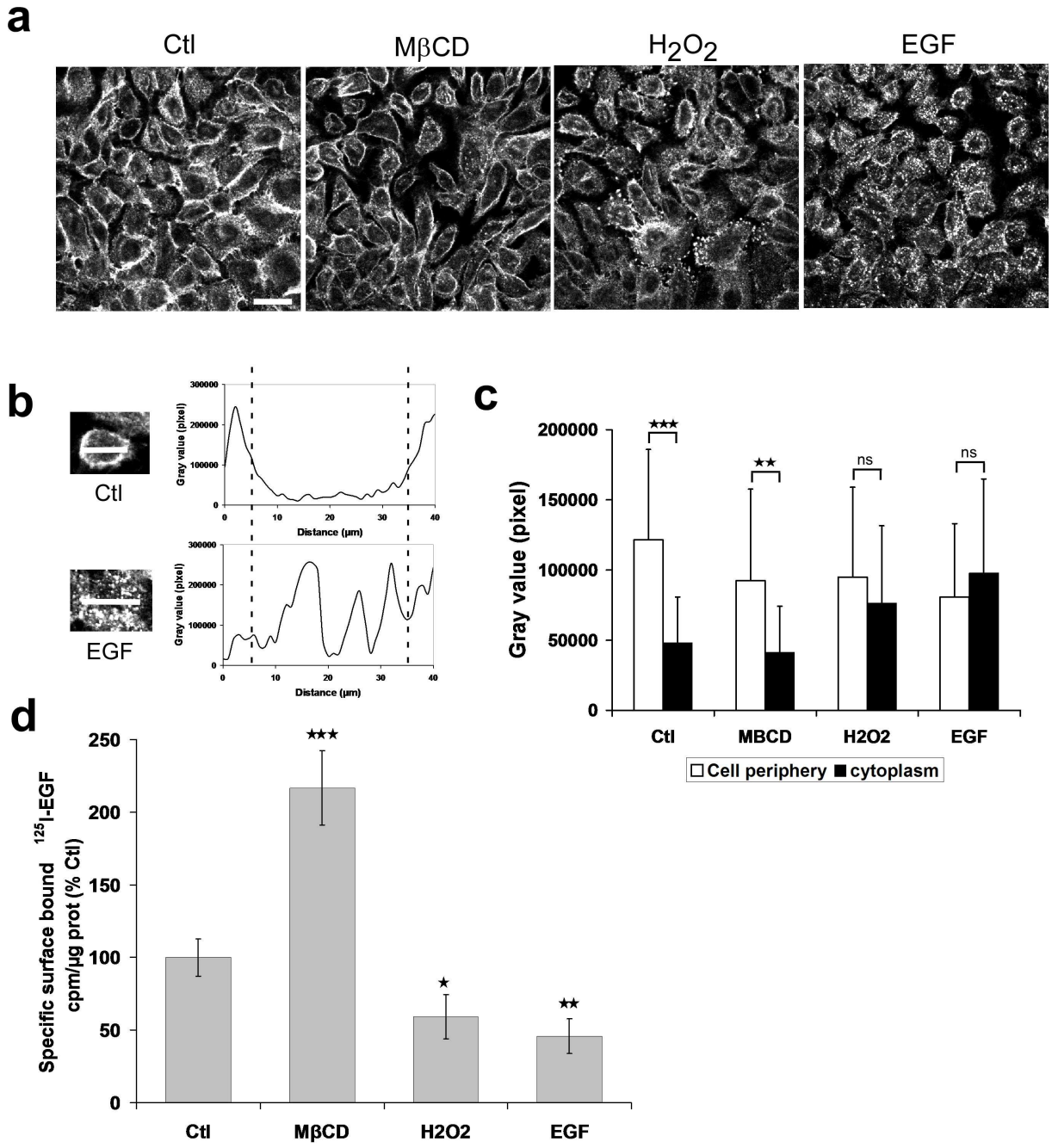


Figure 2-6 : localisation du récepteur de l'EGF.

a : Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre un état de confluence avant d'être incubées 1 heure avec de la MβCD 7,5 mM ou 20 min en présence d'H_2O_2 1 mM ou d'EGF 10 ng/ml. Les cellules ont ensuite été fixées avant que le récepteur de l'EGF soit marqué. Barre d'échelle : 40 µm.

b : Graphe d'intensité représentant la localisation du récepteur de l'EGF dans des cellules contrôles (Ctl) ou traitées à l'EGF (EGF) après analyse des images obtenues en microscopie confocale avec le programme ImageJ.

c : Les cellules ont été traitées comme décrit en **a** et les images obtenues par microscopie confocale ont été analysées comme décrit en **b**.***=p<0,001, **=p<0,01 et ns= non significatif.

d : Les cellules ont été traitées comme en **a** avant d'être mises en présence de ^{125}I-EGF. La liaison spécifique de l'EGF radio-marqué a alors été mesuré à 4°C comme décrit dans la section matériel et méthodes. Le graphe représente la moyenne +/- un écart-type de 3 expériences indépendantes (*=p<0,05, **=p<0,01 et ***=p<0,001).

En cas d'activation du récepteur de l'EGF sans ajout de ligand exogène, nous pouvons observer deux réponses différentes. En effet, si le récepteur est activé en réponse à la déplétion du cholestérol, il ne semble pas être délocalisé. Par contre, suite à son activation par l'H_2O_2, le récepteur de l'EGF est internalisé, comme attesté par la quantification des images obtenues par microscopie confocale (Figure 2-4c).

Afin d'évaluer de façon quantitative l'internalisation du récepteur de l'EGF, nous avons utilisé le programme ImageJ, permettant de quantifier les pixels sur les images obtenues par microscopie confocale, en utilisant la méthode décrite à la figure 2-6b et au point 4.3 de la section Matériel et Méthodes. L'histogramme obtenu indique une localisation majoritairement périphérique du récepteur de l'EGF dans la condition contrôle ainsi que lorsque le cholestérol est déplété par la MβCD. Par contre, une incubation avec de l'H_2O_2 ou de l'EGF résulte en une distribution du récepteur depuis la périphérie cellulaire vers le cytoplasme, indiquant une probable internalisation du récepteur de l'EGF puisqu'il n'y a plus de différence significative entre la détection du récepteur en périphérie cellulaire ou dans le cytoplasme.

Nous avons utilisé une deuxième technique permettant d'analyser l'accessibilité en surface cellulaire du récepteur de l'EGF en utilisant la liaison d'un ligand marqué radioactivement. Les cellules ont subi les différents traitements avant d'être incubées en présence d'EGF marqué à l'iode 125 (à 4°C afin d'éviter toute internalisation membranaire). Après plusieurs rinçages suivis de la lyse des cellules, la radioactivité associée aux cellules a été mesurée dans un compteur gamma. Si le récepteur se trouve encore en surface de la cellule, le ligand radioactif peut s'y lier, tandis que si le récepteur est internalisé, le ligand radioactif est incapable de s'y lier. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 2-6d. Les cellules traitées avec l'H_2O_2 ou l'EGF présentent une liaison d'EGF marqué de respectivement 59 et 46 % par rapport au contrôle, reflétant bien l'internalisation du récepteur de l'EGF. En revanche, et de façon surprenante, les cellules incubées avec la MβCD présentent une radioactivité associée de 216 % par rapport au contrôle. Cette augmentation de la liaison d'un ligand radioactif pourrait être expliquée par l'exocytose de vésicule contenant le récepteur de l'EGF or le fait d'enlever le cholestérol membranaire résulte en une rigidification de la membrane empêchant tout mouvement tant d'endocytose que d'exocytose (Rodal *et al.* 1999; Chamberlain *et al.* 2001). Il est également possible que cette augmentation soit due à une affinité plus importante du récepteur pour ses ligands suite au traitement à la MβCD. Ce dernier argument a cependant été infirmé par Pike et Casey (2002), mais également dans l'article réalisé au Danemark (voir dans les Annexes). Une autre hypothèse pouvant justifier cette augmentation serait une meilleure accessibilité du récepteur pour son

ligand, comme proposé par Pike et Casey. En effet, la MβCD, en extrayant le cholestérol membranaire, aplanit les surfaces en détruisant les cavéoles, où peut également se trouver le récepteur de l'EGF, donnant l'impression d'une augmentation de la liaison du ligand marqué qui n'est en fait que le reflet d'une meilleure accessibilité du ligand pour son récepteur.

Dans le cas où le *processing* du récepteur de l'EGF serait plus lent lors d'une activation indépendante de ligand, nous avons recherché la localisation du récepteur après certaines périodes de récupération suivant la déplétion du cholestérol. En effet, le fait de dépléter la membrane plasmique en cholestérol rigidifie cette dernière et inhibe les phénomènes d'endocytose, notamment du récepteur de l'EGF (He *et al.* 2006), ces derniers pourraient alors n'avoir lieu que lorsque la membrane se replète en cholestérol comme nous l'avons montré dans la première partie de ce travail.

Le récepteur de l'EGF semble être endocyté entre 1 et 3 heures suivant l'heure de déplétion du cholestérol (Figure 2-7a) et la quantification des images obtenues en microscopie confocale et analysées avec le programme ImageJ indique une diminution de la localisation périphérique du récepteur de l'EGF 1 et 3 heures suivant la déplétion du cholestérol. De plus, la liaison d'un ligand radioactif est diminuée par rapport à la liaison du ligand marqué directement après la déplétion du cholestérol. Donc, si l'augmentation de liaison est toujours observable entre la condition contrôle et la condition MβCD sans récupération, le fait de laisser les cellules récupérer induit une diminution de la liaison du ligand. Diminution qui, si elle n'est pas significative par rapport au contrôle, l'est par rapport à la condition MβCD sans récupération, indiquant une diminution du nombre de récepteurs en surface.

La biotinylation des protéines de surface nous a également permis de montrer l'internalisation du récepteur de l'EGF. En effet, la figure 2-7d indique qu'après 1 heure de récupération, il est possible de détecter le récepteur de l'EGF biotinylé, reflétant son internalisation puisque la biotine a été "protégée" par l'internalisation du récepteur. La diminution d'abondance de la forme totale du récepteur lors de l'immunoprécipitation ainsi que l'absence de détection de la biotine après 3 heures de récupération nous ont suggéré une éventuelle dégradation du récepteur. Il est en effet possible que la biotine, suite à une dégradation, ne soit plus détectable après 3 heures de récupération. Nous reparlerons de cette possibilité au point 2.6.

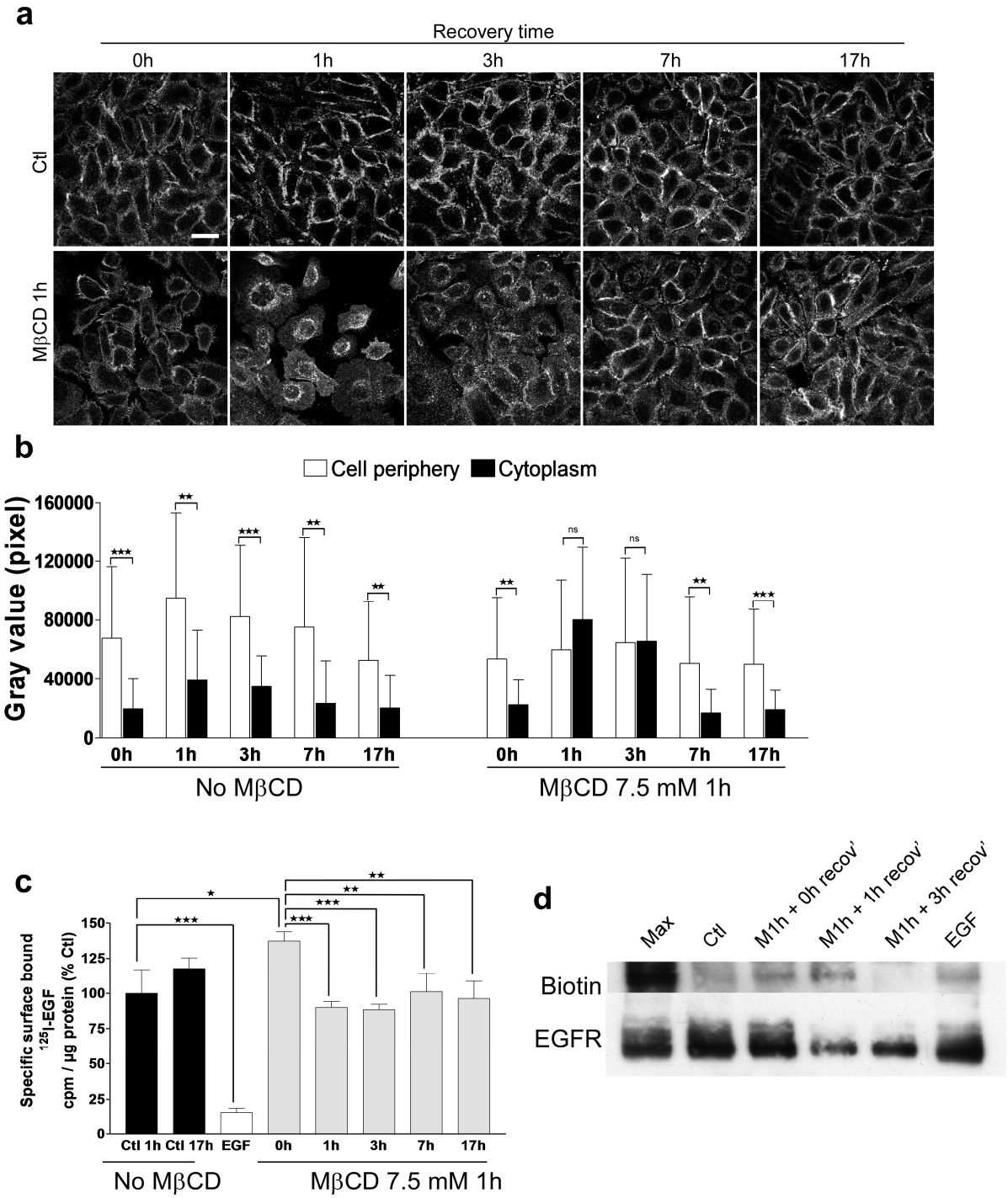


Figure 2-7 : Internalisation du récepteur de l'EGF pendant les périodes de récupération suivant la désorganisation des lipid rafts.

a : Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre un état de confluence avant d'être incubées 1 heure avec de la MβCD 7,5 mM puis laissées récupérer 0, 1, 3, 7 ou 17 heures. Les cellules ont ensuite été fixées avant que le récepteur de l'EGF soit marqué. Barre d'échelle : 40 µm.

b : Les cellules ont été traitées comme décrit en **a** et les images obtenues par microscopie confocale ont été analysées comme décrit à la figure 2-6b. ***=p<0.001, **=p<0.01 et ns= non significatif.

c : Les cellules ont été traitées comme en **a** avant d'être mises en présence de ^{125}I-EGF. La liaison spécifique de l'EGF radio-marqué a alors été mesurée à 4°C comme décrit dans la section matériel et méthodes. Le graphe représente la moyenne +/- un écart-type de 3 expériences indépendantes (*=p<0,05, **=p<0,01 et ***=p<0,001).

d : Les kératinocytes ont été traités comme en **a** après biotinylation des protéines de surface. La biotine encore accessible en surface a ensuite été clivée et le récepteur de l'EGF a été immunoprécipité avant détection en utilisant de la streptavidine-HRP.

Comme la MβCD s'avère avoir un effet inhibiteur de l'internalisation en "rigidifiant" la membrane plasmique suite au retrait du cholestérol (Rodal *et al.* 1999; Subtil *et al.* 1999), nous avons cherché à savoir si une incubation courte avec la MβCD, créant une courte perturbation sans diminuer de façon significative la concentration en cholestérol (Figure 1-1), pourrait avoir un effet sur l'internalisation du récepteur. Nous avons donc traité les kératinocytes pendant 10 minutes avec la MβCD, avant de laisser les cellules récupérer pendant différentes périodes de temps (Figure 2-8). Dans ce cas de figure également, le récepteur de l'EGF est internalisé, indiquant que cette endocytose pourrait être en fait une réponse à la désorganisation des *lipid rafts*, peut-être déclenchée par la perturbation physique de la membrane.

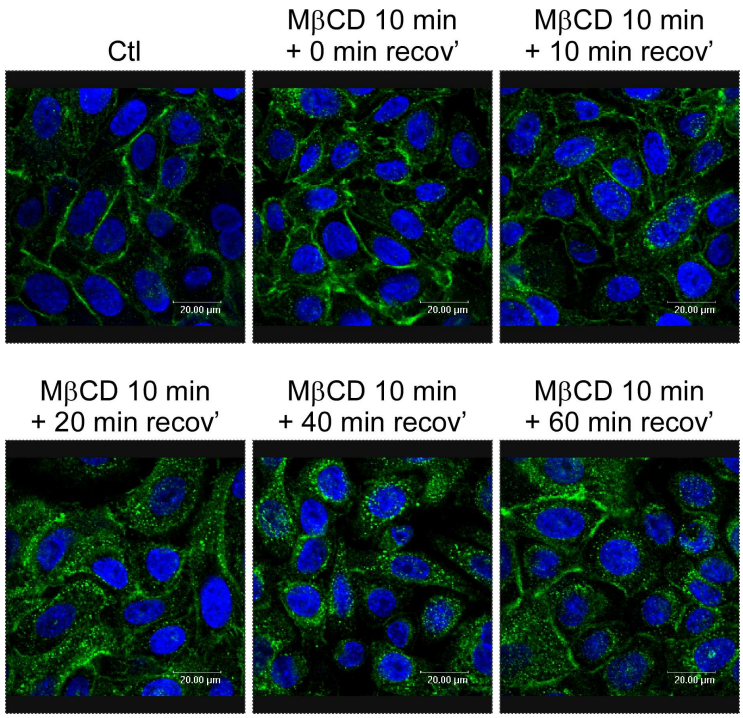


Figure 2-8 : Internalisation du récepteur de l'EGF après un traitement court à la MβCD.
Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre un état de confluence avant d'être incubées 10 minutes avec de la MβCD 7,5 mM puis d'être laissées pendant des périodes de récupération de 10, 20, 40 ou 60 minutes. Les cellules ont ensuite été fixées avant que le récepteur de l'EGF soit marqué. Barre d'échelle : 20 µm.

Etant donné qu'il est possible que l'internalisation du récepteur de l'EGF que nous avons observée soit due à un effet de la MβCD elle-même et non à la déplétion du cholestérol, nous avons localisé le récepteur de l'EGF suite à une incubation en présence d'αCD (α cyclodextrine). Cette molécule ne possède que 6 résidus glucose, rendant la cavité du cycle trop petite pour pouvoir séquestrer le cholestérol et donc n'interfèrant pas avec le cholestérol présent en membrane.

Aucune internalisation du récepteur de l'EGF n'a été observée lors des périodes de récupération suivant l'incubation en présence d'αCD (Figure 2-9a). De plus, au contraire de la MβCD, l'αCD n'induit pas l'activation du récepteur de l'EGF, ni de la MAPK p38. Nous avons également testé les effets de la MβCD préalablement chargée en cholestérol sur la phosphorylation du récepteur de l'EGF et de p38 et n'avons observé aucune activation de ces protéines (Figure 2-9b). En revanche, si les cellules sont incubées avec du cholestérol, nous observons une activation du récepteur et de la MAPK p38. Ce résultat pourrait indiquer qu'une surcharge des membranes en cholestérol a les mêmes effets au niveau de l'activation de ces protéines qu'une déplétion de ce même composé. Cependant, comme nous n'avons pas réalisé de dosage du cholestérol cellulaire dans ces conditions, nous pouvons uniquement nous baser sur la littérature pour justifier la surcharge en cholestérol.

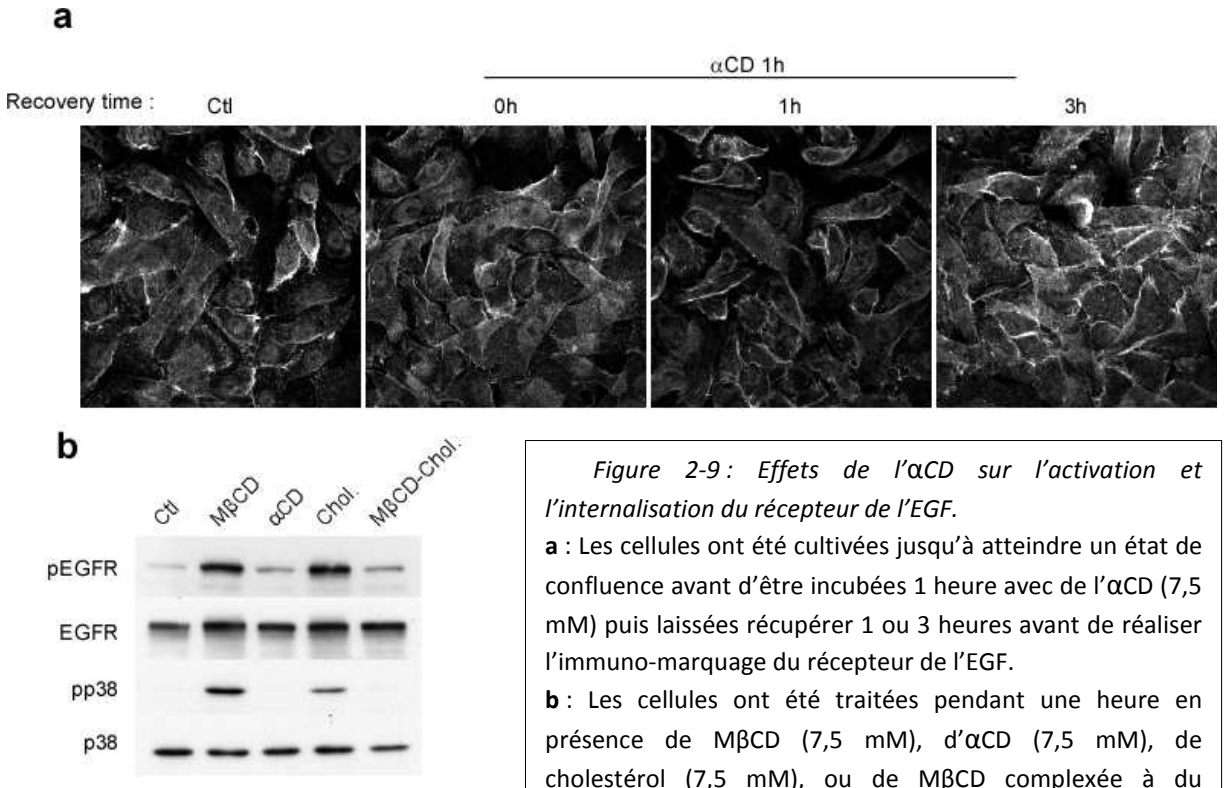


Figure 2-9 : Effets de l'αCD sur l'activation et l'internalisation du récepteur de l'EGF.

a : Les cellules ont été cultivées jusqu'à atteindre un état de confluence avant d'être incubées 1 heure avec de l'αCD (7,5 mM) puis laissées récupérer 1 ou 3 heures avant de réaliser l'immuno-marquage du récepteur de l'EGF.

b : Les cellules ont été traitées pendant une heure en présence de MβCD (7,5 mM), d'αCD (7,5 mM), de cholestérol (7,5 mM), ou de MβCD complexée à du cholestérol (7,5 mM). Les lysats cellulaires ont été analysés par Western blot pour le récepteur de l'EGF, p38 et leur forme phosphorylée.

A partir de ces résultats, une question vient à l'esprit : est-ce que l'activation et l'internalisation du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol que nous observons est spécifique des kératinocytes épidermiques ou est-ce que d'autres types cellulaires sont touchés par ce processus ?

2.4 Etat d'activation et localisation du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes transformés

Nous avons donc réalisé la même cinétique de déplétion du cholestérol suivie de différents temps de récupération avec différentes souches de kératinocytes normaux (donc provenant de différents patients) ou transformés (les cellules HaCaT déjà utilisées lors de notre travail au Danemark, et les kératinocytes hTert) afin de vérifier si les phénomènes que nous avions observés dans une souche de kératinocytes normaux se produisaient de façon générale lors de la déplétion du cholestérol dans différents types de kératinocytes. Nous avons ainsi étudié l'état de phosphorylation du récepteur de l'EGF ainsi que de la MAPK p38, mais également l'internalisation du récepteur de l'EGF au cours des périodes de récupération qui suivent la déplétion du cholestérol. Les résultats obtenus avec les différentes souches de kératinocytes normaux étant semblables à ceux présentés précédemment, nous n'en reparlerons pas ici.

Les kératinocytes de types HaCaT présentent le même type d'activation du récepteur de l'EGF que les kératinocytes normaux, c'est-à-dire une phosphorylation apparaissant après une heure de MβCD suivie d'une extinction au cours de la récupération (Figure 2-10). La déplétion du cholestérol dans les kératinocytes de types hTert induit également une activation du récepteur de l'EGF, mais celle-ci n'apparait qu'une heure après la déplétion du cholestérol.

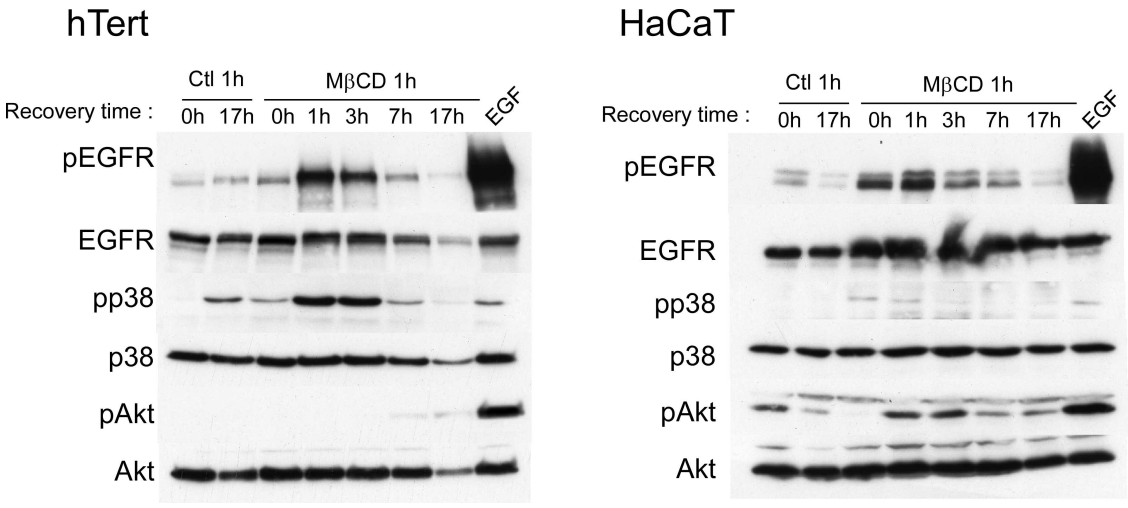


Figure 2-10 : Signalisation en réponse à la désorganisation des lipid rafts dans les kératinocytes transformés.
Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum jusqu'à atteindre un état de confluence. Les cellules ont ensuite été traitées dans du milieu sans sérum pendant 1h avant d'être laissées pendant des périodes de récupération. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés pour le récepteur de l'EGF, p38 et leurs formes phosphorylées.

L'activation de la MAPK p38, si elle paraît plus forte dans les cellules hTert que dans les cellules HaCaT suit également le même profil d'activation par rapport aux kératinocytes normaux. On peut cependant noter que le faible signal de phosphorylation observé dans les cellules HaCaT est assez rapidement éteint et que dans les cellules hTert, le profil de phosphorylation de la MAPK p38 est semblable à celui du récepteur de l'EGF.

Nous avons également localisé le récepteur de l'EGF dans ces types de kératinocytes et les figures 2-11 (cellules HaCaT) et 2-12 (cellules hTert) montrent bien une internalisation du récepteur de l'EGF dans les cellules HaCaT et hTert durant les périodes de récupération après la MβCD.

En effet, des vésicules contenant le récepteur de l'EGF commencent à être détectées, tant dans les cellules HaCaT que dans les cellules hTert, environ après une heure de récupération suivant la déplétion du cholestérol. De façon intéressante dans les cellules HaCaT, le récepteur de l'EGF reste partiellement membranaire tout au long de la récupération et le marquage cytoplasmique disparait après 17 heures de récupération, de la même manière qu'avec les kératinocytes normaux (Figure 2-7). Ce qui pourrait suggérer l'existence de deux populations de récepteur, l'une étant plus sensible à la déplétion du cholestérol que l'autre, peut-être en fonction de leur localisation dans les différents types de domaines membranaires.

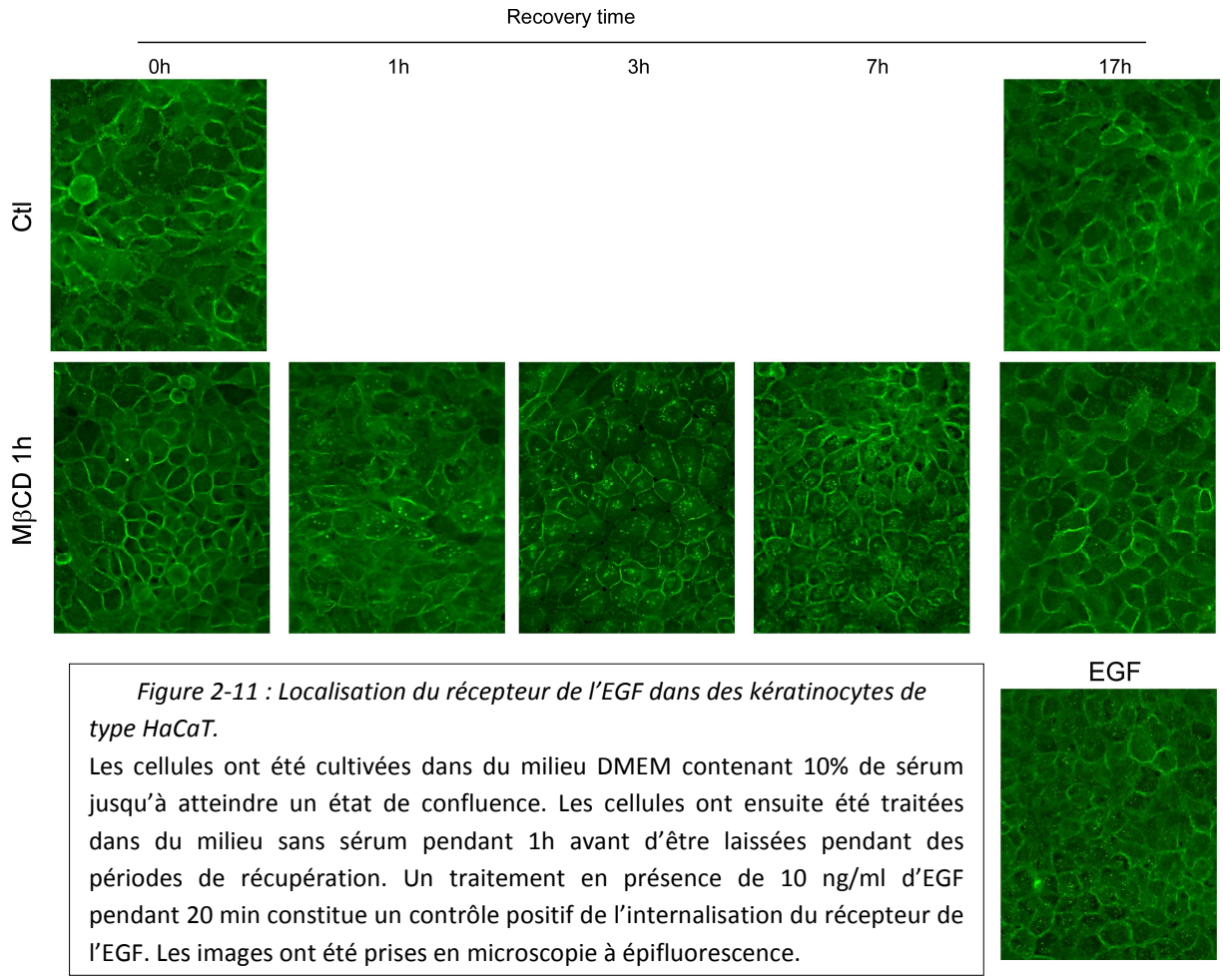


Figure 2-11 : Localisation du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes de type HaCaT.
Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum jusqu'à atteindre un état de confluence. Les cellules ont ensuite été traitées dans du milieu sans sérum pendant 1h avant d'être laissées pendant des périodes de récupération. Un traitement en présence de 10 ng/ml d'EGF pendant 20 min constitue un contrôle positif de l'internalisation du récepteur de l'EGF. Les images ont été prises en microscopie à épifluorescence.

La déplétion du cholestérol dans les cellules hTert induit également une internalisation du récepteur de l'EGF après une heure de récupération. Ces cellules paraissent cependant ne pas vraiment récupérer du stress induit par la déplétion du cholestérol. En effet, après 17 heures de récupération, les cellules ont un aspect nécrosé et le marquage du récepteur de l'EGF est essentiellement cytoplasmique, ce qui se pourrait se produire en cas de mort cellulaire. De plus, les contrôles de charge de la piste MβCD 1h et 17 heures de récupération des Western blot présentés à la figure 2-10 montrent une diminution importante de l'abondance des protéines EGFR et p38, probablement liée à la mort des cellules. Il est à noter que la MAPK p38 est également acitvée dans la piste contrôle 17 heures et que les cellules étaient également nécrosée dans cette condition. Il est dès lors possible qu'une confluence trop importante des cellules hTert induise l'activation de la MAPK p38 et résulte en une mort cellulaire.

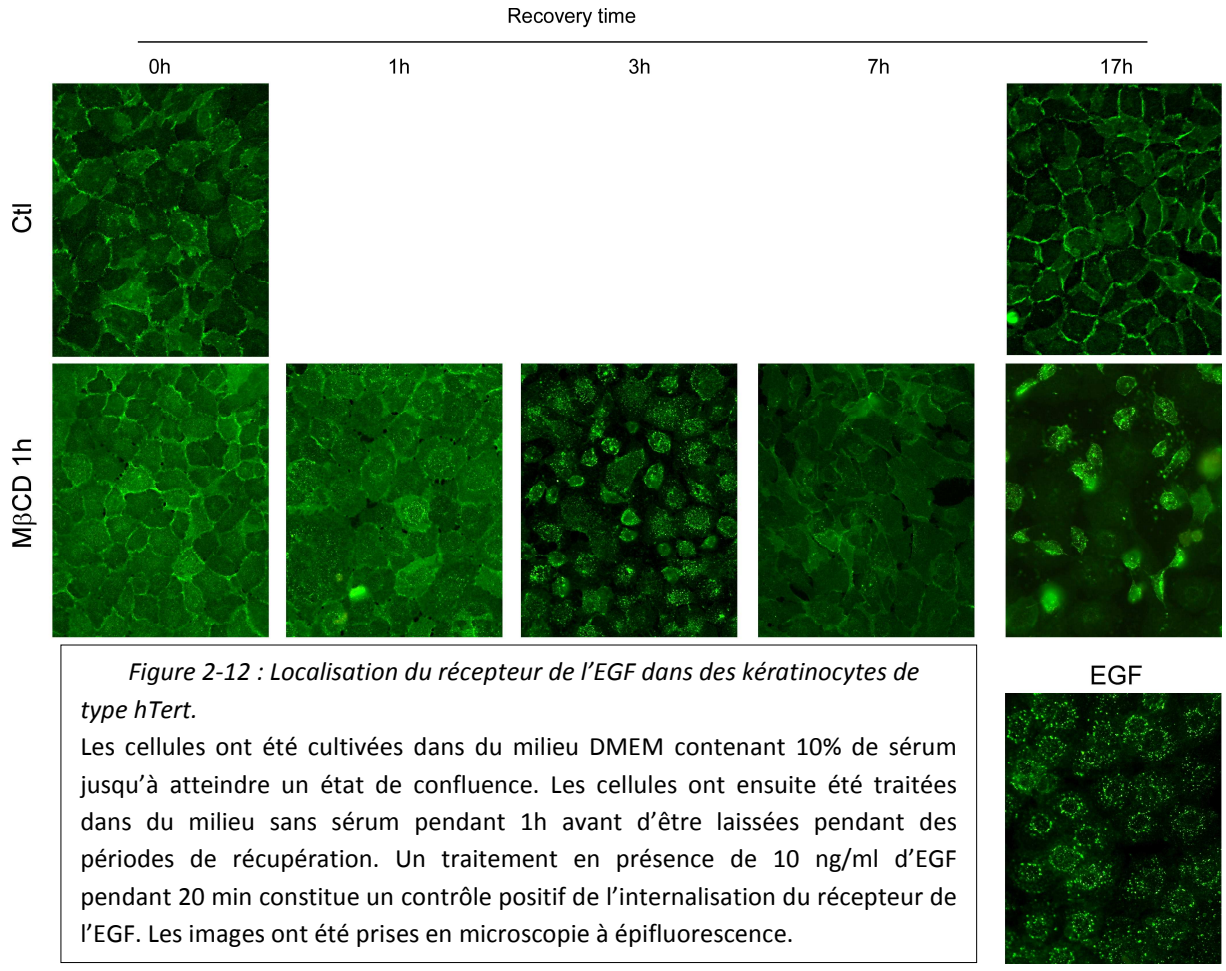


Figure 2-12 : Localisation du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes de type hTert.
Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum jusqu'à atteindre un état de confluence. Les cellules ont ensuite été traitées dans du milieu sans sérum pendant 1h avant d'être laissées pendant des périodes de récupération. Un traitement en présence de 10 ng/ml d'EGF pendant 20 min constitue un contrôle positif de l'internalisation du récepteur de l'EGF. Les images ont été prises en microscopie à épifluorescence.

2.5 Etat d'activation et localisation du récepteur de l'EGF dans d'autres types cellulaires

Afin de voir si l'activation et l'internalisation du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol étaient spécifiques ou non des kératinocytes, nous avons réalisé cette même cinétique de déplétion du cholestérol pendant une heure suivie de différentes périodes de récupération avec différents types cellulaires tels que des fibroblastes humains normaux, des cellules HeLa, des cellules MDA-MB-231 et des cellules A431. Le traitement à la MβCD a été réalisé sur des cultures cellulaires à confluence dans le but de conserver des conditions de travail similaires à celles utilisés avec les kératinocytes.

De façon générale, l'état d'activation du récepteur de l'EGF et de la MAPK p38 dans ces types cellulaires montre un profil tout à fait différent de celui observé dans les kératinocytes et ce, bien que le récepteur de l'EGF soit activable par un ligand (l'EGF) dans tous les types cellulaires testés (Figure 2-13).

En effet, les fibroblastes humains normaux (NHF) ne présentent aucune activation détectable du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol, et la légère activation de la MAPK p38 observée ne perdure pas après l'heure de MβCD.

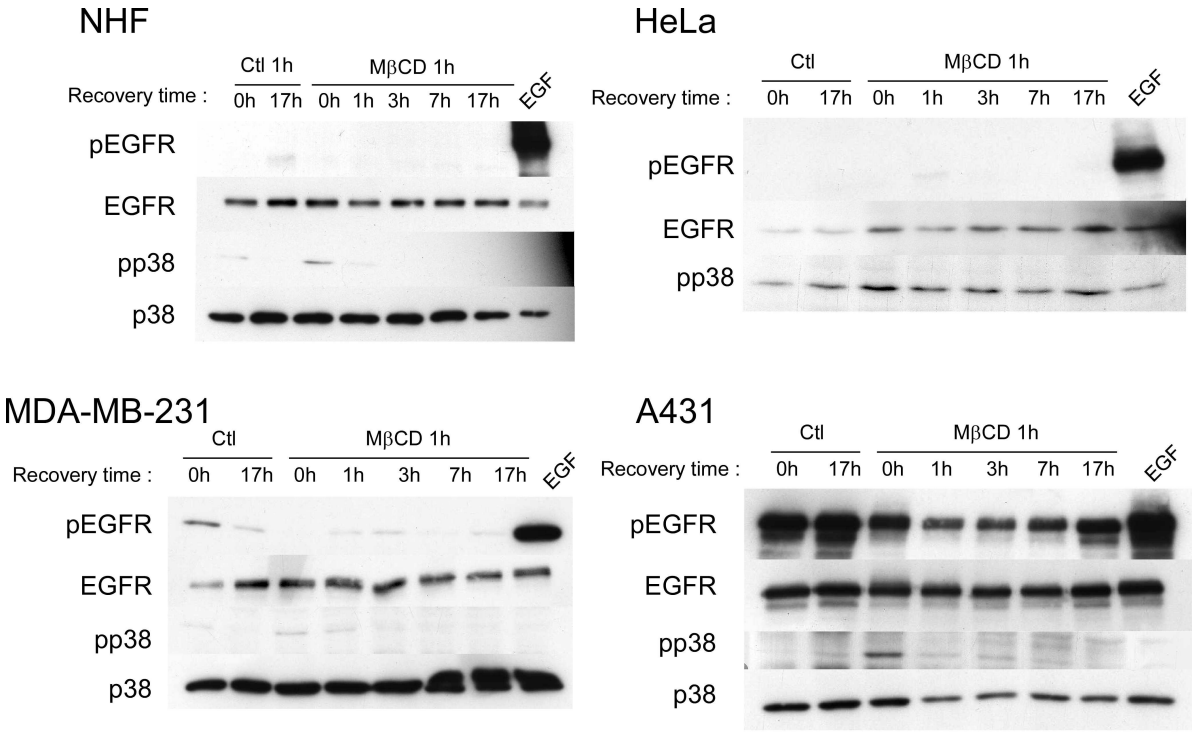


Figure 2-13 : Signalisation en réponse à la désorganisation des lipid rafts dans des cellules autres que des kératinocytes.
Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum jusqu'à atteindre un état de confluence. Les cellules ont ensuite été traitées dans du milieu sans sérum pendant 1h avant d'être laissées pendant des périodes de récupération. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés pour le récepteur de l'EGF, p38 et leurs formes phosphorylées.

Les cellules HeLa ne semblent pas non plus activer le récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol. Par contre, dans ce type cellulaire, l'activation de la MAPK p38 perdure jusque 17 heures suivant le traitement à la MβCD, ce qui pourrait être expliqué, comme pour les cellules hTert, par une confluence trop importante. En effet, il semble que le phénomène d'inhibition de contact induit lorsque les cellules arrivent à un stade de confluence soit responsable de l'activation de la MAPK p38 (Swat *et al.* 2009).

Les cellules MDA-MB-231 présentent une légère activation du récepteur de l'EGF entre une et trois heures après la déplétion du cholestérol ainsi qu'une faible activation de p38.

Les cellules les plus surprenantes sont les cellules de types A431. En effet, ces cellules surexpriment le récepteur de l'EGF et ce dernier est activé de façon constitutive dans ce type cellulaire (Haigler *et al.* 1978; Van de Vijver *et al.* 1991). Par contre, en réponse à la déplétion du cholestérol, le récepteur de l'EGF est partiellement déphosphorylé dans ce type cellulaire (Figure 2-13). La MAPK p38 suit cependant dans ces cellules le même profil d'activation que les autres types cellulaire investigués, c'est-à-dire une phosphorylation après une heure de MβCD qui disparaît rapidement durant la récupération.

Quant à la localisation du récepteur de l'EGF, si le comportement de certains types cellulaires est assez surprenant, aucun changement important n'a été observé en réponse à la déplétion du cholestérol. En effet, les fibroblastes présentent une localisation du récepteur de l'EGF assez inhabituelle puisqu'on le retrouve tant dans le noyau que dans le cytoplasme des cellules alors qu'aucun marquage membranaire n'est détecté. Lors de la déplétion du cholestérol, les fibroblastes se rétractent comme le font les kératinocytes (Figure 2-14). Cependant, au cours de la récupération suivant cette déplétion, aucun changement majeur n'est observé par rapport aux cellules contrôles. Si les cellules semblent être moins rétractées, le récepteur de l'EGF reste localisé dans le noyau et le cytoplasme (sans toutefois former des vésicules comme c'est le cas lors d'un traitement avec l'EGF).

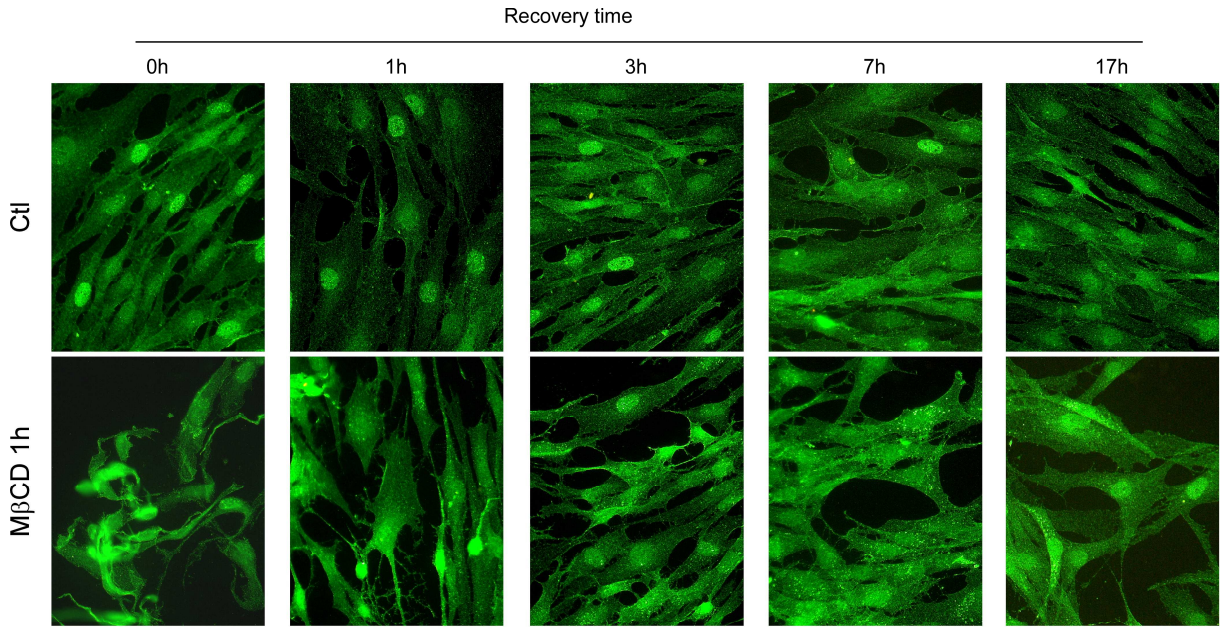


Figure 2-14 : Localisation du récepteur de l'EGF dans des fibroblastes humains normaux.
Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum jusqu'à atteindre un état de confluence. Les cellules ont ensuite été traitées dans du milieu sans sérum pendant 1h avant d'être laissées pendant des périodes de récupération. Un traitement en présence de 10 ng/ml d'EGF pendant 20 min constitue un contrôle positif de l'internalisation du récepteur de l'EGF. Les images ont été prises en microscopie à épifluorescence.

Dans les cellules HeLa, le récepteur de l'EGF est essentiellement localisé en membrane (Figure 2-15). La déplétion du cholestérol ne semble pas induire de changement dans cette localisation. On peut cependant observer un regroupement de récepteurs localisés à côté du noyau après 17h, que ce soit dans les cellules contrôles ou dans celles ayant été traitées par la MβCD, ce qui pourrait être dû à un effet post-confluent ou dû à la privation de sérum.

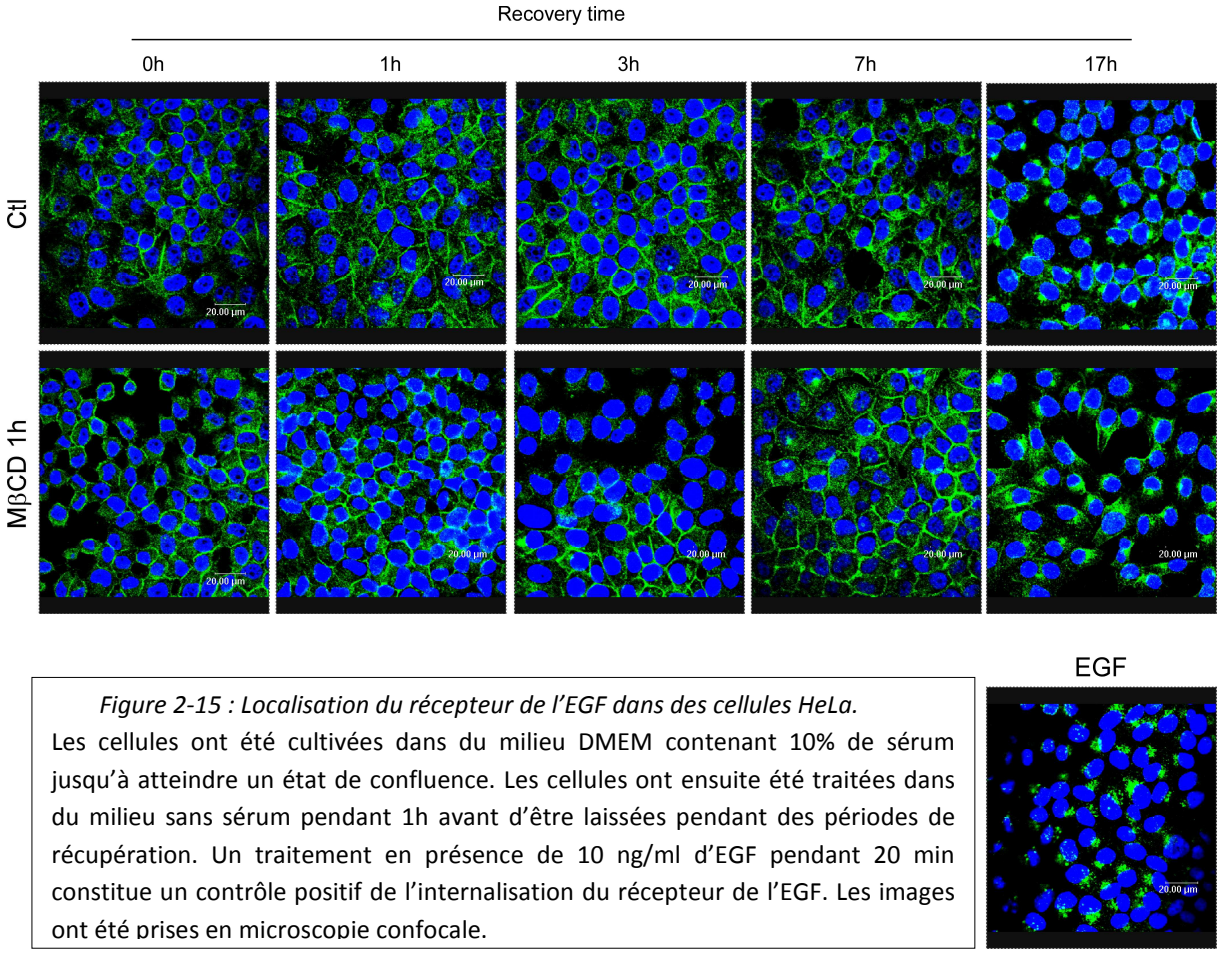
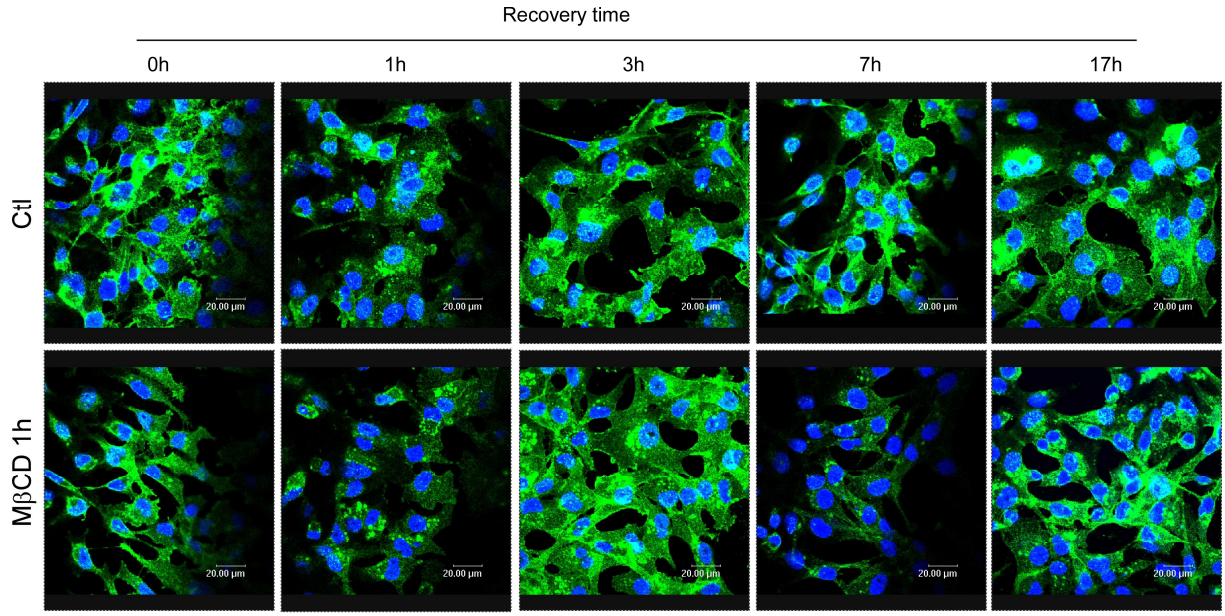


Figure 2-15 : Localisation du récepteur de l'EGF dans des cellules HeLa.
Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum jusqu'à atteindre un état de confluence. Les cellules ont ensuite été traitées dans du milieu sans sérum pendant 1h avant d'être laissées pendant des périodes de récupération. Un traitement en présence de 10 ng/ml d'EGF pendant 20 min constitue un contrôle positif de l'internalisation du récepteur de l'EGF. Les images ont été prises en microscopie confocale.

De la même façon que les fibroblastes, les cellules MDA-MD-231 présentent une localisation du récepteur de l'EGF assez inhabituelle puisqu'il est distribué entre la membrane plasmique et le cytoplasme (Figure 2-16). Cette distribution ne semble pas être affectée par la déplétion du cholestérol et ce, même si le marquage est plus faible après 1 et 7 heures de récupération.



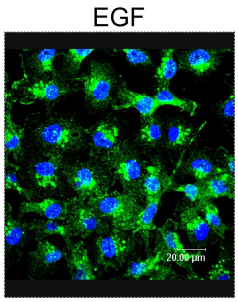


Figure 2-16 : Localisation du récepteur de l'EGF dans des cellules MDA-MB-231.
Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum jusqu'à atteindre un état de confluence. Les cellules ont ensuite été traitées dans du milieu sans sérum pendant 1h avant d'être laissées pendant des périodes de récupération. Un traitement en présence de 10 ng/ml d'EGF pendant 20 min constitue un contrôle positif de l'internalisation du récepteur de l'EGF. Les images ont été prises en microscopie confocale.

Etant donné que les cellules A431 présentaient une déphosphorylation du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol nous n'avons pas étudié la localisation de ce dernier dans ce type cellulaire.

2.6 Dégradation protéasomale du récepteur de l'EGF suite à son internalisation

Comme nous avions observé que dans les kératinocytes le récepteur de l'EGF était internalisé sous forme de vésicules entourant le noyau et que la quantité de biotine liée au récepteur était plus faible après 1 et 3 heures de récupération (Figure 2-7d), nous nous sommes demandé s'il était possible que l'endocytose du récepteur lors des périodes de récupération suivant la déplétion du cholestérol mène à sa dégradation. En effet, suite à son internalisation, le récepteur de l'EGF peut être recyclé en membrane, mais également dégradé.

Nous avons donc incubé les kératinocytes en présence de cycloheximide afin d'inhiber toute néo-synthèse protéique pouvant masquer l'éventuelle dégradation du récepteur de l'EGF. Les cellules ont ensuite été incubées en présence d'un inhibiteur lysosomal (la Bafilomycine, qui est un inhibiteur spécifique de la v-H^+-ATPases lysosomales) ou d'un inhibiteur du protéasome (la Lactacystine).

L'analyse de l'abondance protéique du récepteur de l'EGF en présence de cycloheximide présente bien une diminution de la forme totale de la protéine lorsque les cellules peuvent récupérer de la déplétion du cholestérol (Figure 2-17a et Figure 1-7). Cette dégradation du récepteur de l'EGF n'est cependant pas empêchée par l'inhibition de la fonction de dégradation des lysosomes, mais bien par l'inhibition du protéasome. Ceci suggère donc une protéolyse du récepteur de l'EGF médiée par le protéasome.

De plus, nous n'avons observé aucune co-localisation entre le récepteur de l'EGF et le marqueur des endosomes primaires EEA1 (résultat non montré), ni avec le marqueur lysosomal LAMP2b (Figure 2-17b), indiquant que le récepteur de l'EGF, lors de son internalisation, n'emprunte pas la route menant vers la dégradation lysosomale. Il est à noter que nous n'avons pas étudié l'état d'ubiquitinylation du récepteur de l'EGF suite à la déplétion du cholestérol. De plus, si le récepteur est dégradé, il n'est peut-être plus possible de le détecter par la liaison d'anticorps spécifique et donc aucune co-localisation avec les marqueurs lysosomaux n'est détectable.

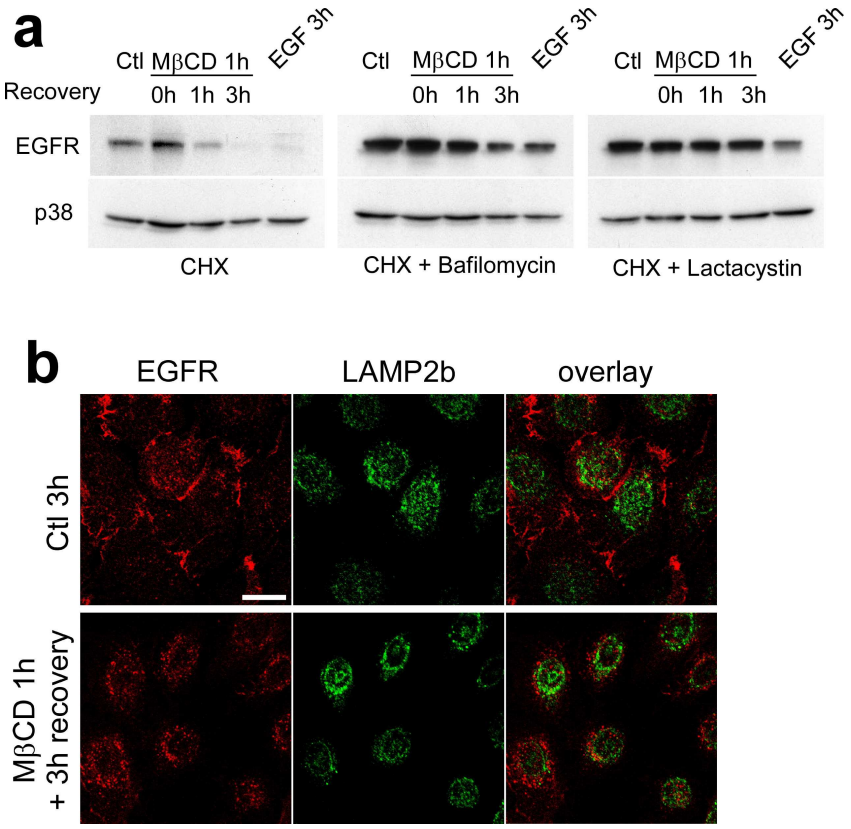


Figure 2-17 : Dégradation protéasomale du récepteur de l'EGF.

a : Les kératinocytes ont été mis en présence de Cycloheximide (CHX, 3 µg/ml) 30 min avant le traitement avec la MβCD (7,5 mM, 1h suivi de 0, 1 ou 3h de récupération) ou d'EGF (10 ng/ml, 20 min) en présence des inhibiteurs. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par Western blot pour l'abondance du récepteur de l'EGF. La détection de la MAPK p38 a été utilisée comme marqueur de charge.

b : Les kératinocytes ont été traités 1h en présence de MβCD 7,5 mM puis laissés récupérer 3h. Les cellules ont ensuite été fixées et le récepteur de l'EGF (rouge) et LAMP2b (vert) ont ensuite été détectés par immunomarquage. Les images ont été prises en microscopie confocale. Barre d'échelle : 40 µm.

2.7 Internalisation du récepteur de l'EGF dépendant de l'activation de la MAPK p38

Pendant que nous réalisions nos expériences, deux études utilisant des cellules HeLa sont parues, décrivant un rôle majeur de la MAPK p38 pour contrôler l'internalisation du récepteur de l'EGF dans des situations de stress comme les UV et le TNFα (Zwang & Yarden 2006) ou des traitements à l'anisomycine qui induisent de façon spécifique l'activation des MAPK (Vergarajauregui *et al.* 2006).

Nous nous sommes donc posé la question de savoir si ce contrôle de l'internalisation du récepteur de l'EGF par la MAPK p38 pouvait avoir lieu lors de la déplétion du cholestérol étant donné que ces deux protéines suivent une cinétique d'activation similaire en réponse à la déplétion du cholestérol (Figure 1-9).

Nous avons recherché si le fait d'inhiber la MAPK p38 avec l'inhibiteur pharmacologique PD169316 pouvait interférer avec l'internalisation du récepteur de l'EGF suite à la déplétion du cholestérol après 1 et 3 heures de récupération. Effectivement, le fait d'inhiber l'activité de la MAPK p38 empêche l'internalisation du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol. Cette inhibition est également observable, de façon plus légère, suite à un stress à l'H_2O_2 ou suite à l'activation de EGFR par un ligand (Figure 2-18a). La quantification des images obtenues en microscopie confocale suite à leur analyse avec le programme ImageJ comme décrit précédemment confirme bien l'inhibition de l'internalisation du récepteur de l'EGF lorsque la MAPK p38 est inactivée. Nous avons également réalisé un test de liaison d'un ligand marqué radioactivement. Dans ce cas aussi, le ligand est capable de se lier au récepteur de façon plus importante si la MAPK p38 est inhibée lors de la déplétion du cholestéol par la MβCD, indiquant le fait que le récepteur n'a pas été internalisé (Figure 2-18).

Dans le cas d'une internalisation en réponse à un stress oxydatif, bien que les images obtenues en microscopie confocale tendent à montrer une localisation plus membranaire du récepteur en présence de l'inhibiteur de p38, le test de liaison d'un ligand radioactif ne montre pas de différence significative dans le cas d'une internalisation due à l'H_2O_2. Par contre, en réponse à l'EGF, l'internalisation du récepteur de l'EGF semble partiellement dépendre de son activation puisque la figure 2-18a présente bien une localisation membranaire du récepteur de l'EGF lorsque les cellules sont incubées en présence d'EGF et de l'inhibiteur de p38. De plus, la liaison du ligand radioactif est augmentée de façon significative dans cette condition (Figure 2-18c).

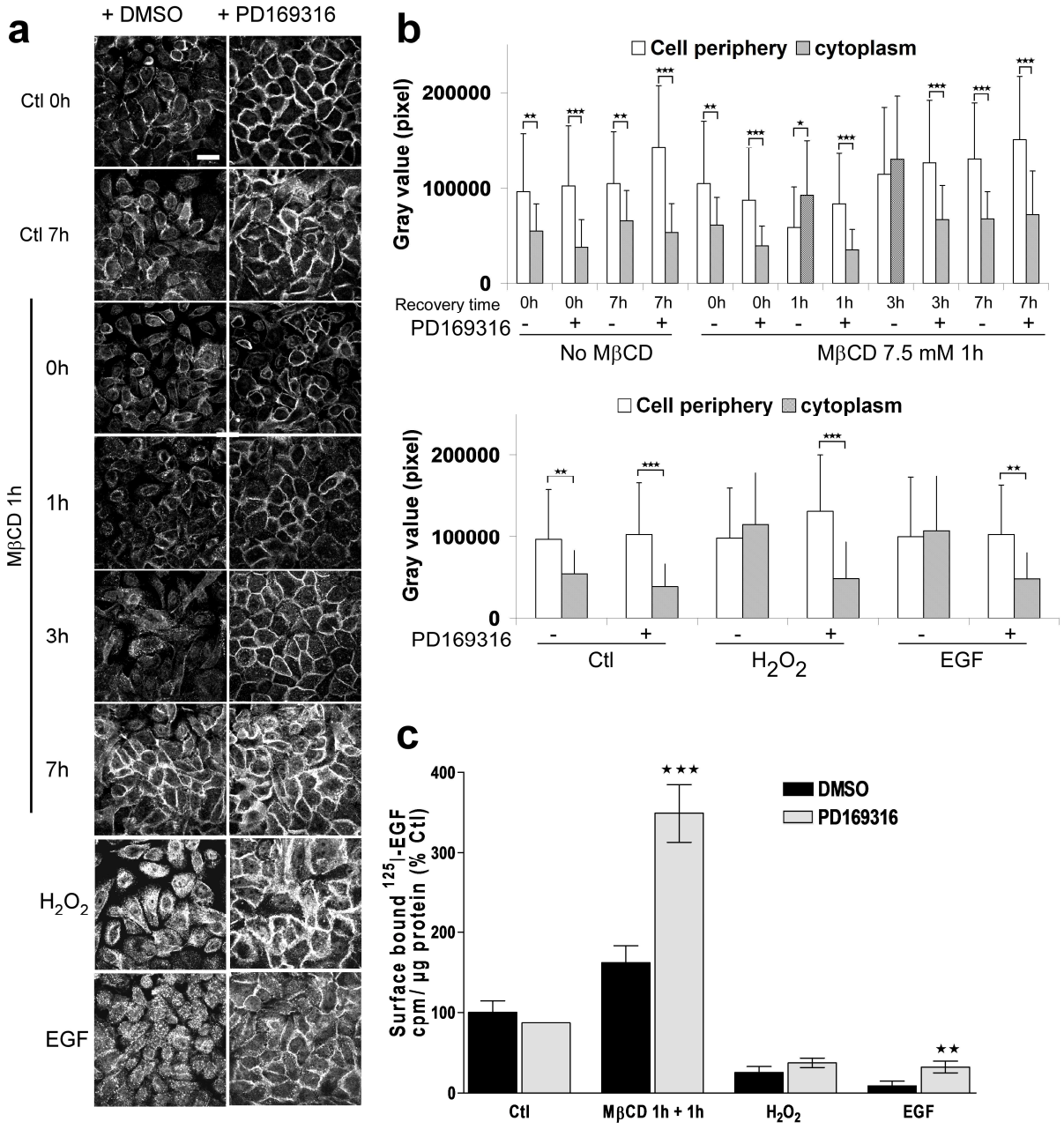


Figure 2-18 : Contrôle de l'internalisation du récepteur de l'EGF par la MAPK p38.

a : Les kératinocytes ont été mis en présence de l'inhibiteur PD169316 (15 µM) ou du véhicule (DMSO) 30 min avant le traitement avec la MβCD (7,5 mM, 1h) suivie de périodes de récupération en présence de l'inhibiteur ou d'une incubation de 20 min en présence d'H_2O_2 (1 mM) ou d'EGF (10 ng/ml). Les cellules ont ensuite été fixées et le récepteur de l'EGF marqué. Les images ont été prises en microscopie confocale. Barre d'échelle : 40 µm.

b : Les images obtenues en **a** ont été analysées avec le programme ImageJ selon la méthode décrite au point 4.3 de la section matériel et méthodes.

c : Les cellules ont été traitées comme en **a** avant d'être mises en présence de ^{125}I-EGF et d'EGF non marqué (ou non). La liaison spécifique de l'EGF radio-marqué a été mesurée à 4°C comme décrit dans la section matériel et méthodes. Le graphe représente la moyenne +/- un écart-type de 3 expériences indépendantes (*=p<0,05, **=p<0,01 et ***=p<0,001).

Nous avons ensuite recherché si la phosphorylation du récepteur de l'EGF pouvait dépendre de l'activation de la MAPK p38. La figure 2-19 montre que lorsque p38 est inhibé avec le PD169316, la phosphorylation de la Tyr 1173 du récepteur de l'EGF, mais également celle de ERK1/2 sont moins fortes lors de la déplétion du cholestérol. De même, une très légère diminution de ces phosphorylations est observée lors d'une incubation en présence d'EGF mais ne semble avoir aucun effet sur la phosphorylation des MAPK ERK1/2 (Figure 2-19a).

Comme nous l'avions montré à la figure 2-2, l'activation du domaine kinase du récepteur de l'EGF semble avoir un effet sur la phosphorylation de la MAPK p38 dans les cellules HacaT. Nous avons donc recherché si ce lien entre le récepteur de l'EGF et p38 prennait également place dans les kératinocytes normaux. Nous pouvons observer que lorsque l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF est inhibée par le PD153035, la phosphorylation de la MAPK p38 diminue légèrement en réponse à la déplétion du cholestérol, ce qui pourrait suggérer une boucle de rétro-activation entre le récepteur de l'EGF et la MAPK p38 (Figure 2-19b). Cependant, à ce jour, les intermédiaires entre ces deux protéines ainsi que les autres voies de signalisation menant à l'activation de la MAPK p38 en réponse à la déplétion du cholestérol restent indéterminés.

En revanche, l'inhibition partielle du récepteur de l'EGF par le PD153035 lors d'un stress oxidatif n'induit aucune variation notable de la phosphorylation de p38, suggérant qu'il n'y a aucun lien entre ces deux protéines dans ces conditions, et ce, malgré leur activation concomitante.

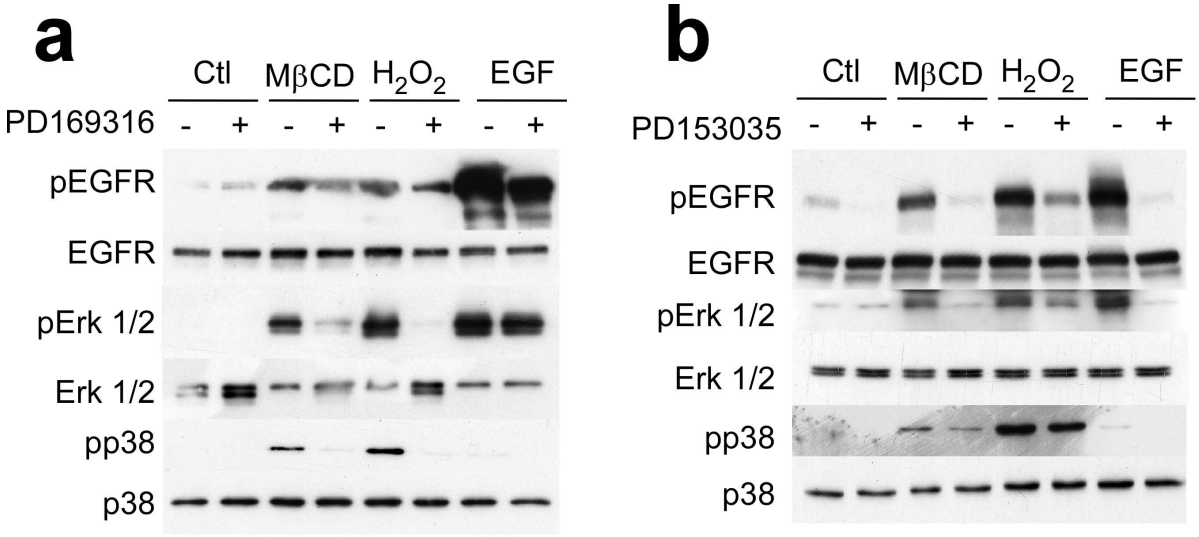


Figure 2-19 : Lien entre le récepteur de l'EGF et de la MAPK p38 lors de la déplétion du cholestérol.
Les kératinocytes ont été mis en présence d'inhibiteur de p38 (PD169316, 15 µM)(**a**) ou d'un inhibiteur du récepteur de l'EGF (PD153035, 500 nM)(**b**) avant d'être traités 1h en présence de MβCD (7,5 mM) ou 20 min en présence d'H_2O_2 (1mM) ou d'EGF (10 ng/ml). Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par Western blot pour le récepteur de l'EGF, ERK1/2, p38 ainsi que leur forme phosphorylée.

2.8 Internalisation p38-dépendante du récepteur de l'EGF dans d'autres circonstances pathophysiologiques

Ayant montré le rôle de la MAPK p38 lors de l'internalisation du récepteur de l'EGF en réponse au stress induit par la déplétion du cholestérol, nous nous sommes demandé si ce processus pouvais avoir lieu dans d'autres conditions pathophysiologiques. Nous avons donc appliqué aux kératinocytes des stress appropriés au niveau de l'épiderme en réalisant d'une part des *scratches* dans les cultures (mimant les conditions d'une blessure) et, d'autre part en incubant les cellules avec du 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène (DNFB), couramment utilisé comme modèle de molécule fortement sensibilisante au niveau cutané.

Des *scratches* ont été réalisés dans des cultures de kératinocytes confluents ou les cellules ont été incubées en présence de DNFB. Comme le montre la figure 2-20a, la MAPK p38 est activée 30 min après ces deux types de stress. Cette activation ne semble cependant pas se prolonger au-delà de cette période. De plus, nous avons trouvé le récepteur de l'EGF internalisé tant dans les cellules situées dans la bordure du scratch que dans les cellules incubées avec le DNFB (Figure 2-20 b).

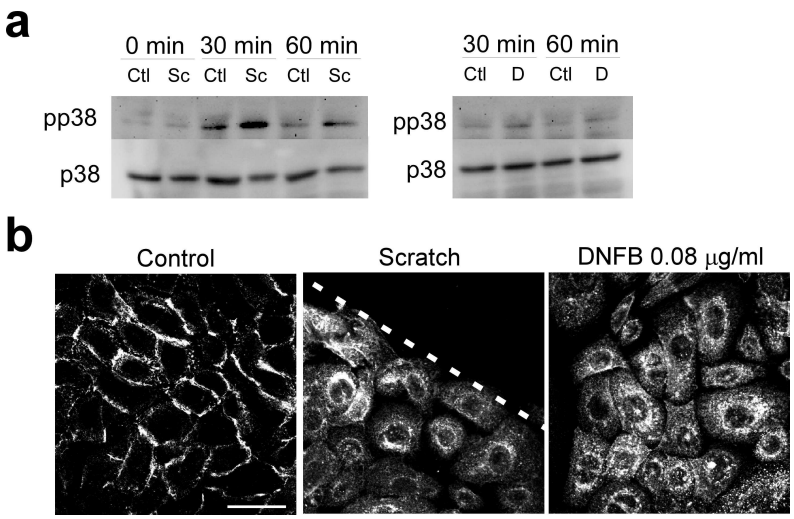


Figure 2-20 : Activation du récepteur de l'EGF et de la MAPK p38 lors de stress physiologiques.
Des cultures confluentes de kératinocytes ont été abîmées avec la pointe d'un tips et laissées pendant 30 min et 1 heure ou mises en présence du DNFB (0,08 µg/ml) pendant 30 min ou 1 heure. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par Western blot pour p38 ainsi que sa forme phosphorylée (**a**) ou les cellules ont été fixées après 30 min et le récepteur de l'EGF immuno-marqué avant d'être observé par microscopie confocale (**b**).

Etant donné que ces deux types de stress induisent une internalisation du récepteur de l'EGF et que nous avons détecté une activation de la MAPK p38 dans chacune des conditions investiguées, nous avons recherché si le mécanisme d'internalisation du récepteur de l'EGF dépendant de la MAPK p38 que nous avons mis en évidence dans le cadre d'une déplétion du cholestérol pouvait également avoir lieu dans ces situations. L'homogénéité de la culture a donc été rompue par un *scratch* ou les cellules ont été incubées avec le DNFB en présence d'inhibiteurs de la MAPK p38 (PD169316 ou SB202190) ou des MEK (PD98059).

De façon générale, aucun des inhibiteurs utilisés n'induit de changement de localisation du récepteur de l'EGF dans les cellules contrôles comme le montre les images obtenues en microscopie confocale ainsi que leur quantification (Figure 2-21). Cependant, dans les conditions de stress, l'inhibition de la MAPK p38 par l'un ou l'autre inhibiteur empêche de façon significative l'internalisation du récepteur de l'EGF. L'inhibition des MEK par le PD98059, n'ayant aucun lien avec la MAPK p38, ne présente pas d'effet sur l'internalisation du récepteur de l'EGF. Nous pouvons donc dire que, dans ces conditions de stress, l'internalisation du récepteur de l'EGF est due à une intervention spécifique de la MAPK p38.

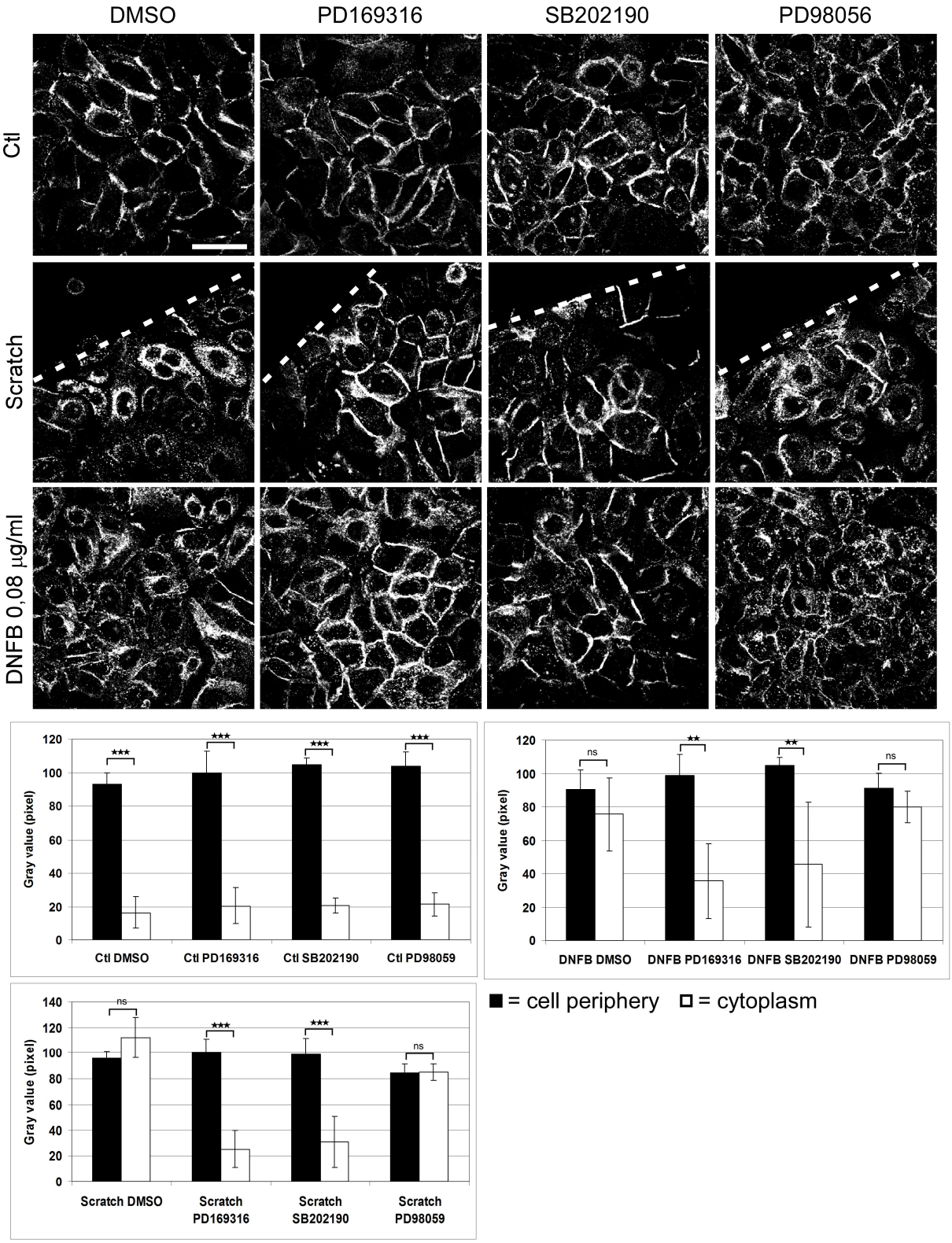


Figure 2-21 : Lien entre la MAPK p38 et l'internalisation du récepteur de l'EGF en condition physiologique.

Les kératinocytes ont été mis en présence d'inhibiteur de la MAPK p38 PD169316 (15 µM) ou SB202190 (10 µM), des MEK PD98059 (2 µM) ou du véhicule (DMSO) 30 min avant d'être laissés comme contrôle, traités 1h avec du DNFB (0,08 µg/ml) ou qu'un *scratch* soit réalisé dans la culture. Le récepteur de l'EGF a ensuite été immuno-marqué et les cellules ont été observées par microscopie confocale (Barre d'échelle : 40 µM).

Les images obtenues ont ensuite été analysées avec le programme ImageJ. Les graphes représentent la moyenne +/- un écart type de trois expériences indépendantes avec ***=p<0,001, **=p<0,01 pour n=90.

Afin de voir si l'internalisation du récepteur de l'EGF sous le contrôle de la MAPK p38 peut avoir une signification fonctionnelle et parce que le récepteur de l'EGF est un acteur primordial dans le phénomène de migration cellulaire, nous avons réalisé des *scratch* dans des cultures confluentes et observé si les kératinocytes sont encore capables de migrer lorsque la MAPK p38 est inhibée. La figure 2-22 montre qu'en condition normale, les kératinocytes migrent afin de recouvrir la presque totalité de la surface abîmée lors du *scratch* (condition DMSO). En revanche, si les MEK sont inhibées par le PD98059, empêchant l'activation des MAPK ERK1/2, la migration semble possible, mais ralentie. L'inhibition de la MAPK p38, bloquant l'internalisation du récepteur de l'EGF comme nous l'avons vu à la figure 2-22, empêche complètement le phénomène de migration. Ce qui confirme les résultats obtenus par d'autres équipes (Fitsialos *et al.* 2007; Stoll *et al.* 2009).

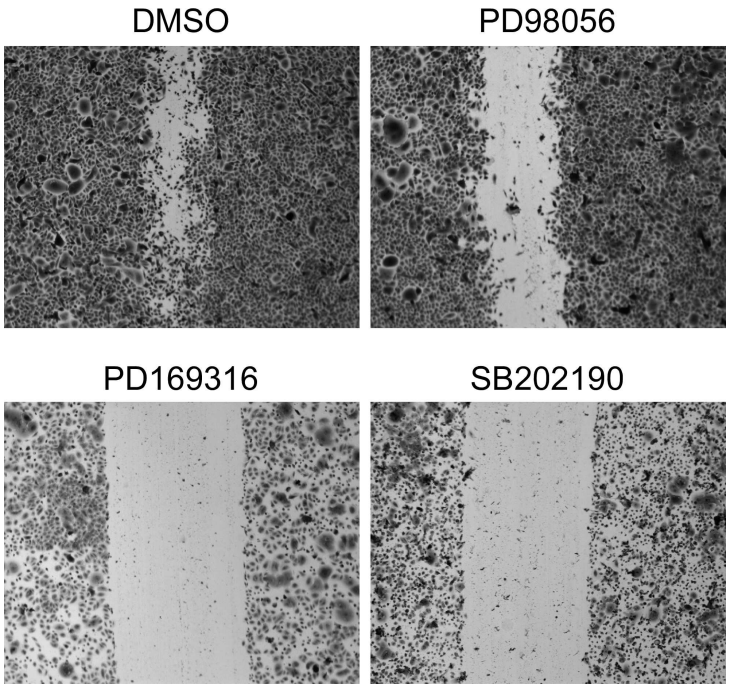


Figure 2-22 :L'inhibition de la MAPK p38 empêche la migration cellulaire.
Les kératinocytes ont été mis en présence d'inhibiteur de p38 PD169316 (15 µM) ou SB202190 (10 µM), des MEK PD98059 (2 µM) ou du véhicule (DMSO) 30 min avant que l'homogénéité de la culture ne soit rompue par un scratch. Les cellules ont ensuite été laissées pendant 24 heures en présence des inhibiteurs avant d'être fixées et colorées au bleu de toluidine.

3 Rôle de l'amphiréguline dans l'activation du récepteur de l'EGF en réponse à la désorganisation des lipid rafts

3.1 Introduction

Nous avions précédemment pensé que l'activation du récepteur de l'EGF dans les kératinocytes de type HaCaT ne semblait pas dépendre de la présence d'un ligand (Figure 2-3). Une étude récemment publiée par l'équipe de Ullrich démontre cependant le rôle de l'amphiréguline dans l'activation du récepteur de l'EGF par les UV, activation restée inexpliquée jusqu'alors (Singh *et al.* 2009). L'amphiréguline étant un facteur de croissance essentiel dans le modèle de culture en croissance autocrine que nous utilisons (Poumay & Coquette 2007), nous avons ré-examiné les résultats obtenus au Danemark avec les cellules HaCaT (Figure 2-3) et pensé que la légère diminution de la phosphorylation de ERK1/2 en présence de l'anticorps neutralisant pourrait avoir une signification au regard de la publication du groupe de Ullrich.

3.2 Activation partiellement ligand-dépendante

Nous avons donc reproduit l'expérience réalisée au Danemark avec des kératinocytes humains normaux en bloquant, d'une part le site de liaison du récepteur de l'EGF avec un anticorps neutralisant (Figure 3-1a) et, d'autre part en inhibant avec le GM6001, un inhibiteur à large spectre, l'activité des MMPs présentes en membrane et susceptibles de cliver les ligands du récepteur de l'EGF (Figure 3-1b).

Comme le montre la figure 3-1, le fait de bloquer le site de liaison du ligand lors de l'activation du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol réduit sensiblement la phosphorylation du récepteur ainsi que de ERK1/2. Le fait que ce bloquage du site de liaison du récepteur ne résulte pas en une extinction totale du signal de phosphorylation peut indiquer d'une part que la neutralisation du récepteur de l'EGF par l'anticorps n'est pas totale, ou d'autre part que cette phosphorylation ne dépend pas uniquement de la liaison d'un ligand mais d'un phénomène générant partiellement l'activation du récepteur de manière indépendante de la liaison d'un ligand.

L'activation de la MAPK p38 ne semble pas varier dans ces conditions, indiquant soit que son activation ne dépend pas du récepteur de l'EGF, soit qu'elle dépend de la part "ligand-indépendante" de l'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol.

De plus, le fait d'inhiber les MMPs -1, -2, -3, -8 et -9 avec le GM6001 diminue également l'activation du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol (Figure 3-1b), suggérant fortement qu'un ligand pourrait intervenir dans le processus d'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol. L'utilisation du GM6001 ne permet pas non plus d'éteindre complètement le signal de phosphorylation du récepteur de l'EGF après un traitement à la MβCD, suggérant que l'inhibiteur n'a pas une action totalement inhibitrice sur la libération d'un ligand, que le récepteur peut être partiellement activé de façon indépendante de ligand ou encore que plusieurs MMPs (dont certaines n'ont pas été touchées par l'inhibiteur) sont nécessaires dans la libération de l'amphiréguline.

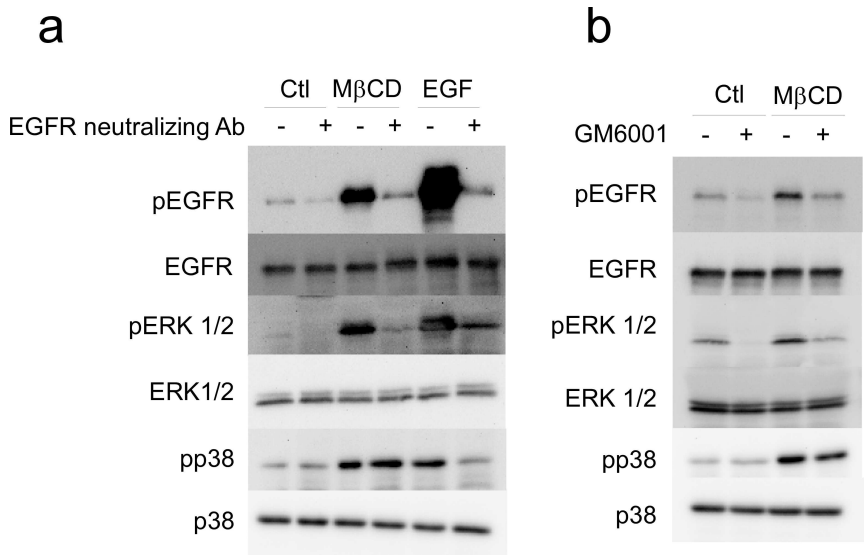


Figure 3-1 : activation partiellement dépendante d'un ligand.
a : Les kératinocytes ont été traités 1 heure avec de la MβCD (7,5 mM) ou 20 min avec de l'EGF (10 ng/ml) en présence ou non de l'anticorps neutralisant. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés pour le récepteur de l'EGF, ERK1/2 et leurs formes phosphorylées.
b : Les kératinocytes ont été laissés comme contrôles ou traités 1 heure avec de la MβCD (7,5 mM) en présence ou non de GM6001 (250 µM). Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés pour le récepteur de l'EGF, ERK1/2, p38 et leurs formes phosphorylées.

Par contre, le fait d'empêcher l'activation du récepteur de l'EGF (en bloquant le récepteur ou les MMPs) ne semble pas influencer la phosphorylation de la MAPK p38.

Nous avons ensuite comparé la phosphorylation des tyrosines du domaine cytoplasmique du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol, mais également suite à son activation par différents ligands. En effet, comme tous les ligands du récepteur de l'EGF induisent des réponses cellulaires différentes, il est possible que les différences se fassent déjà dans le motif de transphosphorylation du récepteur de l'EGF.

La figure 3-2 montre l'état de phosphorylation des tyrosines en réponse à la déplétion du cholestérol par la MβCD ou à la présence de ligand du récepteur de l'EGF comme l'EGF, HB-EGF ou l'amphiréguline (AR). Le motif de phosphorylation des tyrosines activées par la MβCD ressemble à celui obtenu avec l'amphiréguline. En effet, dans ces deux situations, seule la Tyr 1068 semble faiblement phosphorylée. Et si la Tyr 845 est fortement phosphorylée dans la condition MβCD, elle l'est également légèrement suite à une incubation avec l'amphiréguline. Nous nous sommes donc demandé si l'amphiréguline n'était pas le ligand responsable de l'activation du récepteur de l'EGF. Il est à noter que si la Tyr 1173 n'est pas détectée comme étant phosphorylée dans cette expérience, c'est parce que la détection a été réalisée avec un anticorps provenant d'une firme différente que dans les autres expériences et que la sensibilité de cet anticorps est peut-être moindre que celui utilisé pour les autres Western blot.

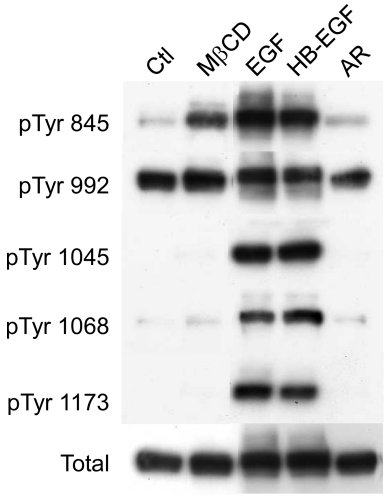


Figure 3-2 : Profil de phosphorylation des différentes tyrosines du récepteur de l'EGF.
Les kératinocytes ont été laissés comme contrôle, traités 1 heure avec de la MβCD (7,5 mM) ou 20 min avec de l'EGF, de l'HB-EGF ou de l'AR (10 ng/ml). Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés pour le récepteur de l'EGF ainsi que la phosphorylation de différentes de ses tyrosines.

Afin de tester si l'amphiréguline pouvait être le facteur participant à l'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol, nous avons réalisé des dosages de l'amphiréguline éventuellement sécrétée dans le milieu de culture des kératinocytes. Ces dosages montrent que si les cellules contrôles sécrètent de l'amphiréguline en condition contrôle (expliquant le phénomène de croissance autocrine chez les kératinocytes (Cook *et al.* 1991)), les cellules traitées pendant une heure en présence de MβCD présentent une sécrétion significativement plus importante d'amphiréguline lors de l'heure de traitement, mais également par la suite, lors des différentes périodes de récupération suivant la déplétion du cholestérol (Figure 3-3).

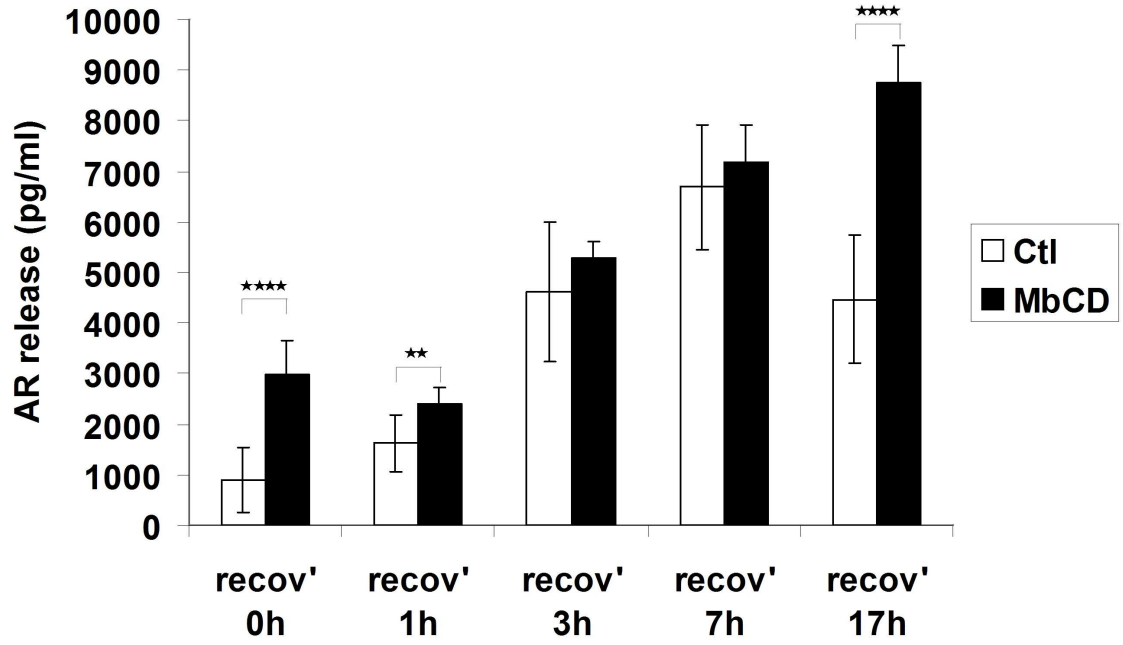


Figure 3-3 : Pofil de sécrétion de l'AR lors de la cinétique de récupération suivant la déplétion du cholestérol.
Les kératinocytes ont été laissés comme contrôles, traités 1 heure avec de la MβCD (7,5 mM) avant d'être laissés à récupérer pendant 0, 1, 3, 7, ou 17 heures. Les milieux de cultures ont ensuite été prélevés et analysés par ELISA. Les moyennes de 3 expériences indépendantes ont été comparées en utilisant un test de student. ****=p< 0,0001, **=p<0,01.

L'augmentation de la libération d'amphiréguline observée au cours des périodes de récupération dans les cellules contrôles, mais également dans les cellules traitées à la MβCD, pourrait être due au changement de milieu. En effet, les cellules, ayant reçu du milieu frais, pourraient synthétiser et libérer plus d'amphiréguline.

La question suivante a alors été de savoir si l'amphiréguline est responsable de l'activation du récepteur de l'EGF lors du traitement par la MβCD. Nous avons donc spécifiquement bloqué l'amphiréguline avec un anticorps neutralisant et observé l'état de phosphorylation du récepteur de l'EGF et des MAPK ERK1/2 et p38 dans ces circonstances (Figure 3-4). La neutralisation de l'amphiréguline empêche bien la phosphorylation du récepteur de l'EGF dans la condition contrôle, montrant ainsi son rôle dans le phénomène de croissance autocrine, ainsi que dans les cellules incubées avec de l'amphiréguline. Les cellules traitées avec la MβCD en présence de l'anticorps neutralisant ne présentent qu'une diminution partielle de la phosphorylation du récepteur de l'EGF et de ERK1/2, tandis que la phosphorylation de la MAPK p38 ne semble pas être influencée par la neutralisation de l'amphiréguline. Ce résultat suggère que l'amphiréguline n'est pas seule responsable de l'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol (présence éventuelle d'un autre ligand du récepteur de l'EGF) ou encore que l'anticorps pourrait ne pas neutraliser totalement la liaison de l'amphiréguline sur le récepteur de l'EGF.

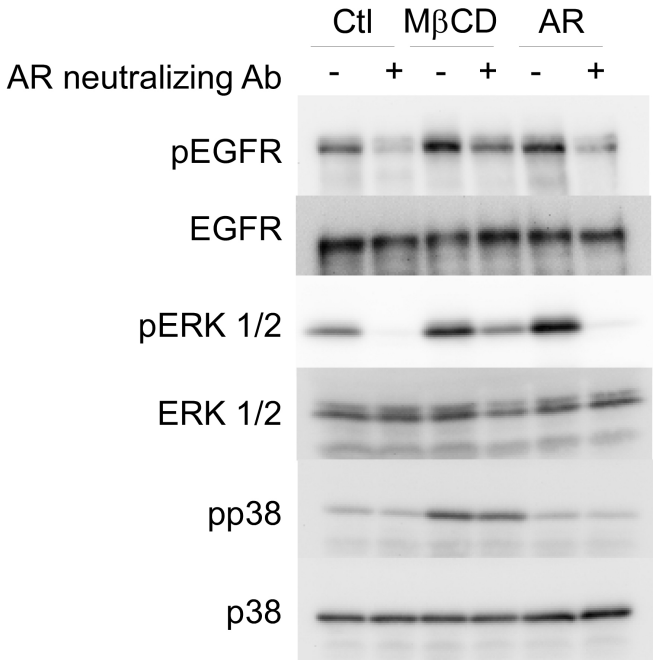


Figure 3-4 : Rôle de l'amphiréguline dans l'activation du récepteur de l'EGF.
Les kératinocytes ont été laissés comme contrôle ou traités 1 heure avec de la MβCD (7,5 mM) en présence ou non de l'anticorps neutralisant l'AR (10 µg/ml). Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par Western blot pour le récepteur de l'EGF, ERK1/2, p38 et leurs formes phosphorylées.

Comme nous avions précédemment montré le rôle des MMPs dans la sécrétion d'un éventuel facteur de croissance activant le récepteur de l'EGF (Figure 3-1b), nous avons cherché à savoir si le fait d'inhiber les MMPs pouvait interférer avec le clivage et la libération de l'amphiréguline puisque celle-ci semble participer à l'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol. La figure 3-5 montre en effet que l'inhibition des MMPs réduit de façon significative la libération d'amphiréguline dans le milieu, que ce soit dans les cellules contrôles ou traitées à la MβCD.

Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que lors de la dépléton du cholestérol, les MMPs sont activées de façon plus importante qu'en condition contrôle, libérant ainsi de façon plus importante l'amphiréguline présente en surface cellulaire.

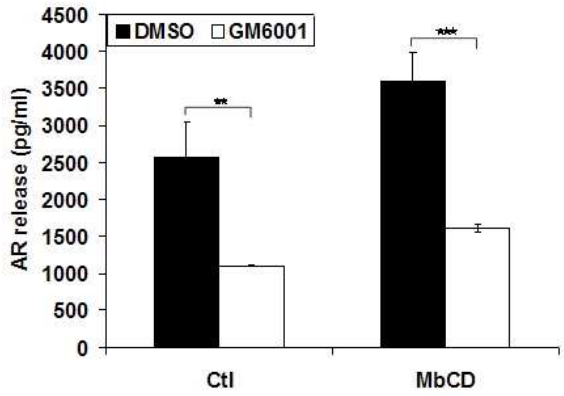


Figure 3-5 : Rôle des MMPs dans la sécrétion d'AR.
Les kératinocytes ont été laissés comme contrôles ou traités 1 heure avec de la MβCD (7,5 mM) en présence de GM6001 (250 µM) ou du véhicule (DMSO). Les milieux de culture ont ensuite été prélevés et analysés par ELISA. Le graphe représente les valeurs moyennes de trois expériences indépendantes +/- un écart-type avec ***=p<0,001 et **=p<0,01.

Par ailleurs, comme nous avions détecté une phosphorylation de la Tyr 845 du récepteur de l'EGF suite à la déplétion du cholestérol (Figure 3-2), nous avons suspecté une activation des Src kinases. En effet, ces kinases sont responsables de la phosphorylation de cette tyrosine spécifique du récepteur lors de son activation par un ligand (Biscardi *et al.* 1999) ou lors d'un traitement MβCD (Westover *et al.* 2003) mais peuvent également activer les MMPs (Kansra *et al.* 2005). Nous avons donc utilisé l'inhibiteur PP2 ainsi que son analogue non fonctionnel, le PP3, afin d'inhiber les Src kinases et observer l'éventuel effet sur la phosphorylation du récepteur de l'EGF ainsi que sur la libération de l'amphiréguline.

Comme le montre la figure 3-6a, le fait d'inhiber les Src kinases induit une diminution partielle de la phosphorylation de la Tyr 845 du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol. Le PP3 en revanche a peu d'effet sur la phosphorylation du récepteur de l'EGF. La diminution de phosphorylation de la Tyr 1173 peut être expliquée par le fait que la Tyr 845 est localisée dans le domaine kinase du récepteur de l'EGF et qu'il est possible que sa phosphorylation induise l'activation de ce domaine, résultant en la phosphorylation de la Tyr 1173 notamment (Belsches *et al.* 1997). Si la phosphorylation de la Tyr 845 est diminuée, il est possible que le domaine kinase soit moins actif.

Au niveau de la libération d'amphiréguline, nous pouvons observer que la différence de sécrétion entre les cellules contrôles et les cellules traitées à la MβCD n'est plus significative lorsque les Src kinases sont inhibée par le PP2 (Figure 3-6c). Ceci pourrait confirmer la possibilité d'un rôle des Src kinases dans le processus de clivage de l'amphiréguline.

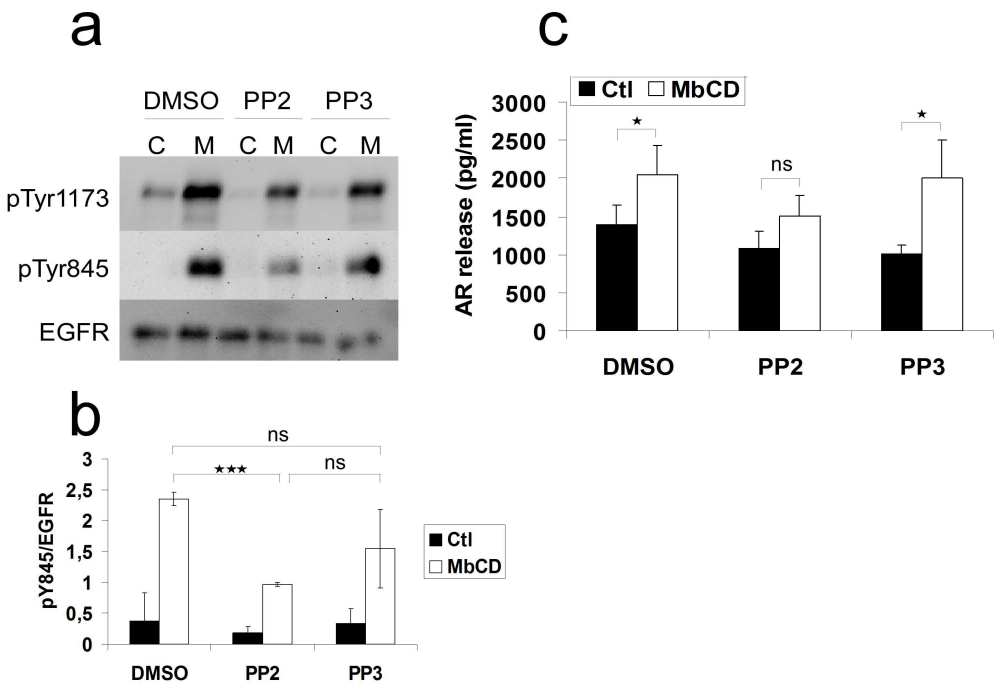


Figure 3-6: Rôle des Src kinases dans la sécrétion d'amphiréguline.
a : Les kératinocytes ont été laissés comme contrôle (C) ou traités 1 heure avec de la MβCD (7,5 mM) en présence PP2 (10 µM), de PP3 (10 µM) ou du véhicule (DMSO). Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par Western blot pour le récepteur de l'EGF et la phosphorylation de ses Tyr 845 et 1173.
b : Analyse densitométrique de trois expériences indépendantes montrée en **a**. Le graphe représente la moyenne de 3 expériences indépendantes +/- un écart-type avec ***=p<0,001 et ns=non significatif
c : Les kératinocytes ont été laissés comme contrôle ou traités 1 heure avec de la MβCD (7,5 mM) en présence de PP2 (10 µM), de PP3 (10 µM) ou du véhicule (DMSO). Les milieux de cultures ont été analysés par ELISA pour la quantification de l'AR. Le graphe représente la moyenne de 3 expériences indépendantes +/- un écart-type avec *=p<0,05 et ns=non significatif.

Mais quel est le rôle de l'amphiréguline sur l'internalisation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol ?

Pour répondre à cette question, nous avons étudié la localisation du récepteur de l'EGF lorsque l'amphiréguline est neutralisée ou lorsque le domaine de liaison du ligand est encombré par un anticorps neutralisant. De façon générale, la présence des anticorps neutralisants n'influence pas la localisation du récepteur de l'EGF dans les cellules contrôles puisqu'il reste localisé essentiellement en membrane dans ces conditions (Figure 3-7). Par contre, durant la récupération qui suit la déplétion du cholestérol et pendant laquelle l'internalisation du récepteur de l'EGF est induite, la neutralisation, tant du récepteur de l'EGF que de l'amphiréguline, réduit sensiblement le phénomène d'endocytose. Il est cependant à noter que si les anticorps bloquent complètement l'endocytose du récepteur due à l'ajout d'EGF ou d'amphiréguline, ils n'empêchent que partiellement l'internalisation en réponse à la déplétion du cholestérol, car dans ces conditions, une partie de la population du récepteur de l'EGF reste localisée en membrane, alors que l'autre partie de la population est internalisée.

Cette observation suggère à nouveau le fait que la libération d'amphiréguline pourrait ne pas être seule responsable de l'activation et de l'internalisation du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol.

En résumé, les résultats obtenus dans cette partie du travail suggèrent (de façon indirecte puisque nous n'avons pas testé leur état de phosphorylation et d'activation) que lors de la déplétion du cholestérol, les Src kinases sont activées, permettant l'activation de certaines MMPs responsables du clivage de l'amphiréguline. La libération plus importante de ce ligand lors de la déplétion du cholestérol ainsi que sa liaison au récepteur de l'EGF participe, du moins partiellement, à l'activation et l'internalisation de ce dernier. En effet, le fait de bloquer tant l'amphiréguline que le domaine de liaison au ligand du récepteur de l'EGF avec des anticorps neutralisant n'empêche que partiellement l'internalisation du récepteur de l'EGF suggérant l'implication d'un mécanisme indépendant de la présence d'un ligand dans l'activation et l'internalisation du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol.

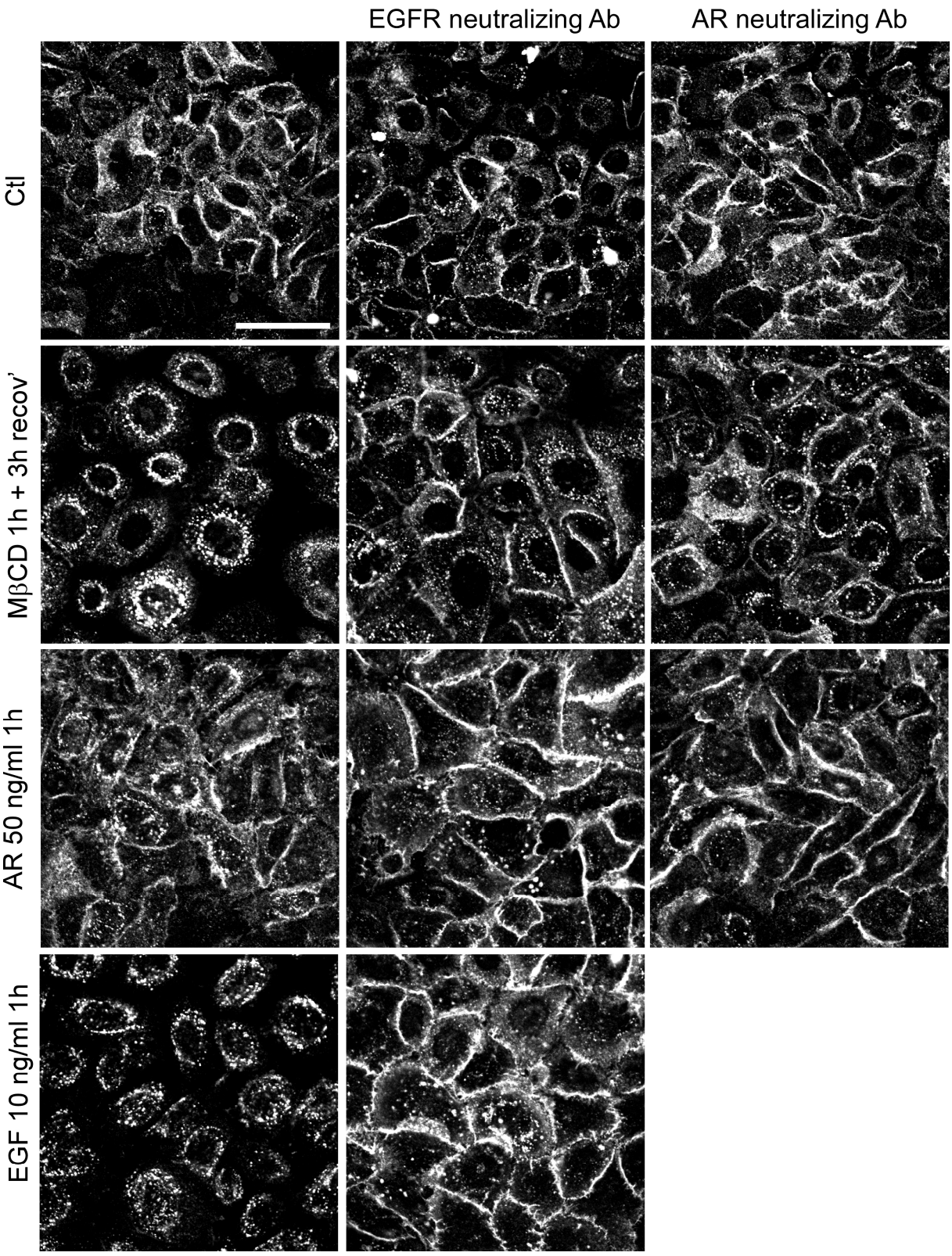


Figure 3-7 : Rôle de la liaison de l'amphiréguline dans l'internalisation du récepteur de l'EGF.
Les kératinocytes ont été non traités comme contrôles, traités 1 heure avec de la MβCD (7,5 mM) puis laissés récupérer 3 heures, ou 20 min avec de l'AR (50 ng/ml) ou de l'EGF (10 ng/ml) en présence ou non de l'anticorps neutralisant l'AR (10 µg/ml) ou de l'anticorps neutralisant le récepteur de l'EGF (10 µg/ml). Les cellules ont ensuite été fixées et le récepteur de l'EGF a été marqué. Barre d'échelle : 40 µm.

Discussion et Perspectives

a. Importance du cholestérol dans la formation des lipid rafts

Le cholestérol est un composant essentiel des membranes biologiques de par son rôle dans leur rigidification. Il est maintenant largement admis que ce composé membranaire a également une fonction importante dans la formation et la stabilisation des structures nommées *lipid rafts* en condensant l'espace entre les chaînes hydrocarbonées saturées des sphingolipides (Simons & Ikonen 1997), rôle que le desmostérol, précurseur du cholestérol, est incapable de remplir (Vainio *et al.* 2006). Le fait de retrouver associées à ces régions membranaires de nombreuses protéines impliquées dans les voies de transduction du signal rend les *lipid rafts* comparables à des plateformes de signalisation. Et si le rôle de ces plateformes est extensivement étudié dans les phénomènes de trafic vésiculaire (revu dans Hanzal-Bayer & Hancock 2007), les signalisations déclenchées lors de leur déstabilisation ne sont pas moins importantes. Le fait de déstabiliser ces plateformes permet d'étudier l'importance de ces structures dans la physiologie cellulaire et d'apprécier les fonctions des protéines composant les *lipid rafts*, ainsi que l'influence de la (re-)formation de ces structures sur le fonctionnement cellulaire ainsi que les signalisations déclenchées à la suite de ce stress membranaire. Il est cependant à noter que si la littérature prolifère à ce sujet, la majorité des laboratoires travaillant sur la composition des *lipid rafts* se basent essentiellement sur l'utilisation de la MβCD afin de dépléter le cholestérol membranaire et de ce fait, déstabiliser les *rafts*. D'autres moyens de déstabilisation seraient peut-être à utiliser afin de conforter les idées générées suite aux observations faites par l'utilisation de la MβCD. En effet, les sphingolipides sont également des composants essentiels dans la formation des *lipid rafts* (Simons & Ikonen 1997). Leur retrait de la membrane, par l'utilisation de sphingomyélinase par exemple, pourrait aussi générer une déstabilisation de ces régions. Les *lipid rafts* sont également connu pour être des régions enrichies en PI(4,5)P2 (Caroni 2001). Et l'étude de Kwik *et al*. tend à montrer que la séquestration de ces molécules par la néomycine induit des effets semblables à ceux obtenus avec la MβCD au niveau de la réorganisation du cytosquelette (Kwik *et al.* 2003).

Le cholestérol joue donc un rôle important dans la physiologie du kératinocyte épidermique en structurant les *lipid rafts* d'une part, mais également en participant à la différenciation et donc à la formation de la couche cornée de l'épiderme. Nous avons étudié la façon dont un traitement d'une heure en présence de MβCD pouvait influencer l'abondance du cholestérol cellulaire ainsi que la structure des *lipid rafts* et avons montré, par des techniques de marquage en fluorescence et de centrifugation en gradient de densité, que le retrait du cholestérol membranaire par la MβCD résultait en la désorganisation des *lipid rafts*. De plus, suite à cette désorganisation, les kératinocytes mettent rapidement en place des signalisations impliquant notamment le récepteur de l'EGF et la

MAPK p38. Ces réponses sont néanmoins réversibles si les cellules ont la possibilité de re-synthétiser du cholestérol, et la prolifération ainsi que la migration des cellules ne semblent pas affectées dans ces conditions. En revanche, une déplétion prolongée du cholestérol membranaire résulte en un déclenchement du processus apoptotique dans les kératinocytes (Gniadecki 2004; Bang *et al.* 2005), mais également dans les cellules cancéreuses (Li *et al.* 2006b).

Le fait que les cellules soient capables de re-synthétiser le cholestérol suite à sa déplétion est probablement dû à la régulation des efflux de cholestérol, impliquant notamment le facteur de transcription SREBP dont la régulation est assurée par le niveau de cholestérol présent dans la cellule (Brown & Goldstein 1999). De plus, le cholestérol régule l'expression de la cavéoline-1 et permet la stabilisation de cette protéine (Bist *et al.* 1997; Frank *et al.* 2002). En effet, la déplétion du cholestérol dans les cellules MDCK induit une diminution de l'abondance de la cavéoline-1 (Hailstones *et al.* 1998), phénomène que nous avons également observé dans les kératinocytes (Figure 1-7). Nous n'avons cependant pas investigué ces voies de signalisation étant donné que notre travail s'est essentiellement focalisé sur les effets de la déplétion du cholestérol membranaire sur la signalisation du récepteur de l'EGF et non aux effets de la déplétion du cholestérol sur la régulation de sa voie de synthèse.

Lors de cette étude, nous avons utilisé la sous-unité B de la toxine cholérique couplée à une sonde fluorescente afin de visualiser les *lipid rafts* et nous avons réalisé des centrifugations en gradient de densité dans le but de séparer les *lipid rafts* de la membrane environnante. Cependant, ces deux techniques ont des limites, particulièrement au niveau de leur précision. En effet, les marquages en microscopie optique ne sont pas suffisamment précis afin de permettre notamment des études de co-localisation, d'une part en raison de la taille des *lipid rafts* (inférieure au pouvoir de résolution des microscopes optiques), et d'autre part à cause de leur mobilité, fusion et autres mouvements dans la membrane. Par ailleurs, les protocoles disponibles dans la littérature pour réaliser des centrifugations en gradient de densité permettant d'isoler les *lipid rafts* sont différents d'un laboratoire à l'autre, suggérant qu'aucune procédure n'est totalement satisfaisante ou que nous n'avons pas de critères suffisamment sûrs et généraux (c'est-à-dire valables pour tous les types cellulaires) permettant de définir, dans des gradients, où sont les *lipid rafts*.

Il serait donc intéressant de développer l'étude de nouveaux marqueurs des *lipid rafts* de manière plus précise car si des protéines comme la cavéoline-1 ou la flotilline-1 sont généralement utilisées afin de localiser ces régions membranaires (en microscopie ou dans des gradients de densité), ces deux protéines ne sont pas exclusivement détectées dans les *lipid rafts* puisque la cavéoline-1 est la

protéine structurant les cavéoles (et donc ne se trouve pas dans les *lipid rafts* proprement dit) tandis que, même si les flotillines peuvent être localisées dans les *lipid rafts*, elles transitent également entre divers compartiments cellulaires (Babuke & Tikkanen 2007). Tant que des protéines (et non des lipides) faisant partie de la structure intrinsèque des *lipid rafts* ou qu'une séquence de ciblage ne seront pas déterminées (à supposer qu'elles existent), l'étude de ces structures nécessitera l'utilisation complémentaire de multiples méthodes et marqueurs afin d'atteindre un niveau de certitude suffisant, permettant d'admettre que les régions observées sont effectivement particulières et méritent d'être distinguées sous le nom de *lipid rafts*.

Nos résultats montrent des cinétiques d'activation du récepteur de l'EGF et de la MAPK p38 différentes selon les types cellulaires utilisés (Figure 2-10 et 2-13). Il est donc possible que les *lipid raft* soient différents d'un type cellulaire à l'autre et ne résistent pas de la même manière au retrait du cholestérol. Tout comme il pourrait exister, dans une même cellule, différents types de *lipid rafts* regroupant les molécules de signalisation faisant partie d'une même voie de signalisation comme cela a été proposé par Golub *et al.* (2004) et Allen *et al.* (2007). Ceci dans le but de promouvoir des cinétiques d'activation favorables à la transmission rapide des signalisations. Mais les populations de *lipid raft* pourraient également être de compositions différentes suivant le type cellulaire afin de répondre au mieux aux besoins et fonctions de la cellule dans laquelle ils se trouvent. Certaines cellules pourraient par conséquent être plus dépendantes de l'intégrité des *lipid rafts* ou du cholestérol membranaire que d'autres.

Mais bien sûr, notre but dans ce travail n'a pas été d'étudier les *lipid rafts* des kératinocytes en tant que tels, mais d'analyser les conséquences de leur désorganisation suite à la déplétion du cholestérol dans ces cellules.

b. Rôle de l'activation de la MAPK p38

Depuis le début de l'étude de la fonction des *lipid rafts* dans la physiologie du kératinocyte épidermique, l'importance de la MAPK p38 a été soulevée (Jans *et al.* 2004). Cependant à ce jour, les mécanismes menant à l'activation de cette MAPK dans ces conditions n'ont pas été élucidées. Notre étude confirme l'importance du rôle de p38 notamment en identifiant son intervention dans le mécanisme d'internalisation du récepteur de l'EGF pendant les heures qui suivent la déplétion du cholestérol (schématisé à la figure D-1), ainsi que lors de la migration des kératinocytes.

- ***Dans la phosphorylation et l'internalisation du récepteur de l'EGF***

La littérature regorge d'études démontrant l'interaction de la MAPK p38 avec le récepteur de l'EGF et les résidus ciblés par la MAPK p38 sont nombreux. Il est tout d'abord à noter que l'activation de la MAPK p38 lors de la déplétion du cholestérol semble suivre une cinétique biphasique (Figure 1-5). En effet, nous avons observé une première phase d'activation dans les 5 premières minutes d'incubation avec la MβCD puis une deuxième activation après 30 minutes d'incubation. Cette dernière phase perdurant jusqu'à la fin de l'incubation en présence de MβCD. Nous avons également montré que l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de EGFR lors de la déplétion du cholestérol diminuait légèrement la phosphorylation de la MAPK p38 et que l'inhibition de cette kinase dans les mêmes conditions diminuait également la phosphorylation de EGFR sur sa Tyr 1173 (Figure 2-19), conduisant à une probable boucle de rétro-activation du récepteur de l'EGF. Cette boucle pourrait être initiée lors de la première phase d'activation de la MAPK p38, consistant probablement en une réponse rapide au stress et permettant la phosphorylation/activation du récepteur de l'EGF, tandis que la deuxième phase pourrait être adaptatrice en participant notamment à l'internalisation du récepteur de l'EGF.

En effet, nous avons montré le rôle de la MAPK p38 dans l'internalisation du récepteur de l'EGF lors de la récupération qui suit la déplétion du cholestérol. Cette internalisation du récepteur pourrait être due à la phosphorylation de résidus-cibles de la MAPK p38 sur le récepteur. En effet, il a été montré que la phosphorylation de résidus situés entre les acides aminés 1002 et 1022 intervenait lors de l'internalisation du récepteur de l'EGF (Zwang & Yarden 2006).

La phosphorylation des résidus Ser 1046 et 1047 joue également un rôle important dans la dégradation du récepteur suite à un traitement à l'anisomycine, un inducteur bien connu de l'activation de la MAPK p38 (Adachi *et al.* 2009). Il serait dès lors intéressant d'étudier par spectrométrie de masse les sites de phosphorylation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol et voir, parmi ceux-ci, lesquels sont dus à l'activation de la MAPK p38.

- ***Dans le phénomène de migration et d'attachement***

La MAPK p38 semble également intervenir dans le phénomène de migration des kératinocytes puisque son inhibition empêche la recolonisation d'un *scratch* réalisé dans des cultures confluentes (Figure 2-22). Cette intervention pourrait se situer dans la production du facteur de croissance HB-EGF, bien connu pour contribuer à la migration des kératinocytes (Shirakata *et al.* 2005), mais encore pour être régulé par l'activation de la MAPK p38 lors de la déplétion du cholestérol (Mathay *et al.* 2008).

La migration cellulaire nécessite une réorganisation du cytosquelette et nous avons montré un changement important de l'organisation du cytosquelette d'actine, suite à la déplétion du cholestérol, qui semble dépendre de l'activation de la MAPK p38 (résultats non montrés). Cette kinase intervenant dans l'activation de PRAK/MAPKAPK5, une protéine activée en situation de stress et intervenant dans la phosphorylation de HSP27 (New *et al.* 1998), il est possible que cette voie soit responsable des changements morphologiques observés. D'autre part, la MAPK p38 n'est pas activée lors de la déplétion du cholestérol dans des cellules sous-confluentes (résultat non montré). Son activation pourrait donc dépendre des changements de la membrane se produisant lors de la déplétion du cholestérol (particulièrement les contacts inter-cellulaires). Il est possible que les kératinocytes sous-confluents, n'étant pas (ou très peu) en contact les uns avec les autres, n'activent pas la MAPK p38.

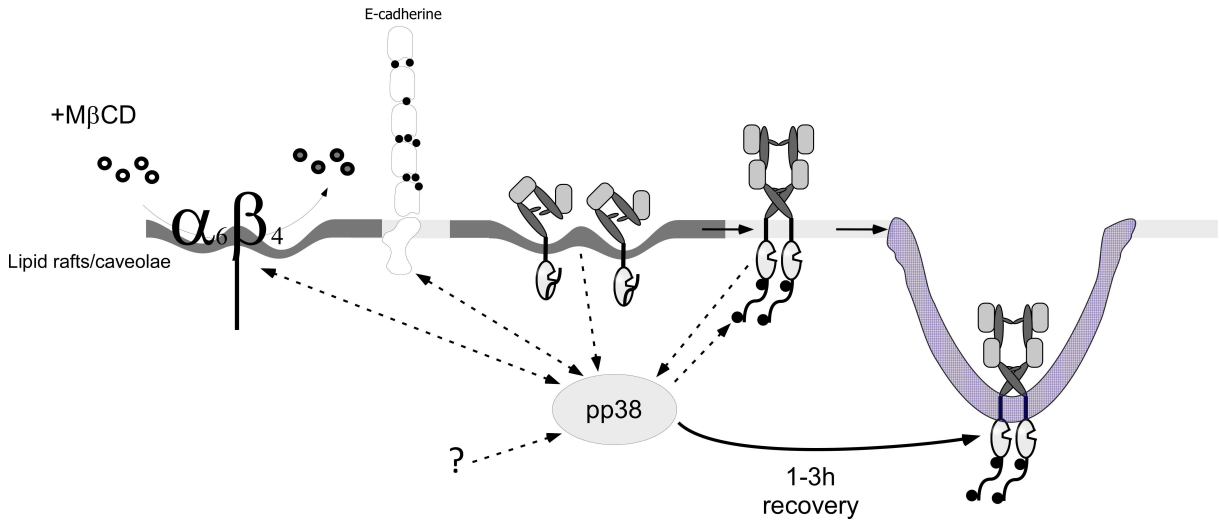


Figure D-1 : Activation de la MAPK p38 lors de la déplétion du cholestérol.

La MAPK p38 est activée suite à la déplétion du cholestérol. Cette activation pourrait être due aux changements observés au niveau de la membrane plasmique et participe notamment à la phosphorylation et l'internalisation du récepteur de l'EGF.

En effet, des résultats obtenus au laboratoire montrent une diminution de l'abondance de la E-cadhérine (participant à la formation des jonctions de type "adherens") ainsi qu'un marquage désorganisé de l'intégrine α6 (essentiellement localisée dans les jonctions d'ancrage de type hémidesmosome quand elle est associée à la sous-unité β4 dans les kératinocytes) (résultats non montrés). Ces résultats pourraient indiquer que les jonctions entre les cellules sont déstructurées suite à la déplétion du cholestérol, possiblement dans le but de permettre la migration des cellules (ou peut-être est-ce un élément participant à la différenciation des kératinocytes puisqu'ils doivent se détacher de la matrice pour pouvoir migrer dans les couches supérieures de l'épiderme ?) et pourraient éventuellement intervenir dans (ou dépendre de) l'activation de la MAPK p38.

c. Comment le récepteur de l'EGF est-il activé en réponse à la déplétion du cholestérol ?

Le récepteur de l'EGF a été un des premiers récepteurs à activité tyrosine kinase à être localisé dans les *lipid rafts.* Cependant, et contrairement aux autres récepteurs de ce type, sa présence dans ces domaines membranaires a un effet inhibiteur sur son activation (Pike 2005). Il a d'ailleurs été suggéré que l'association du récepteur de l'EGF avec les gangliosides GM3 (également présents dans les *lipid rafts*) soit à l'origine de cette inhibition en empêchant sa dimérisation ainsi que l'activation du domaine tyrosine kinase (Wang *et al.* 2002a).

Le rôle du récepteur de l'EGF étant capital dans la physiologie des kératinocytes et le fait que Ralph Jans dans notre laboratoire (Thèse, 2004) ainsi que d'autres aient démontré son activation lors de la déplétion du cholestérol, nous avons cherché quel était le mode d'activation de ce récepteur lors de la déplétion du cholestérol dans les kératinocytes épidermiques.

Les résultats obtenus avec les cellules HaCaT suggéraient une augmentation de l'activité basale du récepteur probablement due à l'augmentation de sa fonction tyrosine kinase intrinsèque (également montré dans d'autres types cellulaires (Chen & Resh 2002; Pike & Casey 2002; Ringerike *et al.* 2002)) et semblait indépendante de la présence de ligand. Cependant, le récepteur de l'EGF pourrait être activé suite au clivage de l'amphiréguline dans les kératinocytes épidermiques, mais également de façon indépendante de ligand. En effet, une courte incubation en présence de MβCD (ne réduisant pas de façon significative l'abondance du cholestérol en membrane) suffit à déclencher la phosphorylation et l'endocytose du récepteur de l'EGF (Figure 2-8), et la neutralisation, tant du domaine de liaison au ligand du récepteur de l'EGF que de l'amphiréguline (dont nous discuterons plus loin le rôle dans l'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol), n'empêchent pas totalement la phosphorylation ni l'internalisation du récepteur suggèrent une

activation partiellement indépendante de ligand. Une possibilité d'explication de ce phénomène d'activation indépendante de ligand pourrait être que le retrait du cholestérol des membranes, si léger soit-il, déclenche une hyper-fluidification de la membrane plasmique, résultant en un mouvement des protéines qui pourrait induire une activation du récepteur de l'EGF suite à l'augmentation locale de la concentration en protéines, comme il a été montré pour HER2 (Nagy *et al.* 2002). D'autre part, le fait de déstructurer les *lipid rafts* pourrait très bien déstabiliser les interactions que le récepteur de l'EGF partage avec des molécules ayant un effet inhibiteur sur son activation (comme les GM3 ou la cavéoline) et de ce fait, induire son activation ou encore signifier que le cholestérol en lui-même pourrait avoir un effet inhibiteur sur le récepteur de l'EGF.

Nos résultats semblent mettre en évidence deux populations de récepteurs de l'EGF, l'une étant plus sensible à la déplétion du cholestérol que l'autre. Ceci pourrait être l'effet de la localisation variable du récepteur de l'EGF dans la membrane plasmique. En effet, lorsque le récepteur se trouve dans des régions riches en cholestérol, ce dernier pourrait jouer négativement sur son activation en empêchant les changements de conformation nécessaires à la dimérisation du récepteur de l'EGF en situation non stimulée. Le fait de dépléter les membranes du cholestérol pourrait enlever des contraintes stériques et permettre une activation du récepteur de façon indépendante de ligand. De même, fluidifier localement la membrane par le retrait du cholestérol pourrait également conduire à une activation indépendante de ligand. D'autre part, les récepteurs de l'EGF localisés dans d'autres régions membranaires (c'est-à-dire non *lipid raft*/cavéoles) pourraient être activés par l'amphiréguline. Nous pourrions donc être en présence de deux populations distinctes dont l'activation dépend ou non d'un ligand, mais qui sont toutes deux internalisées.

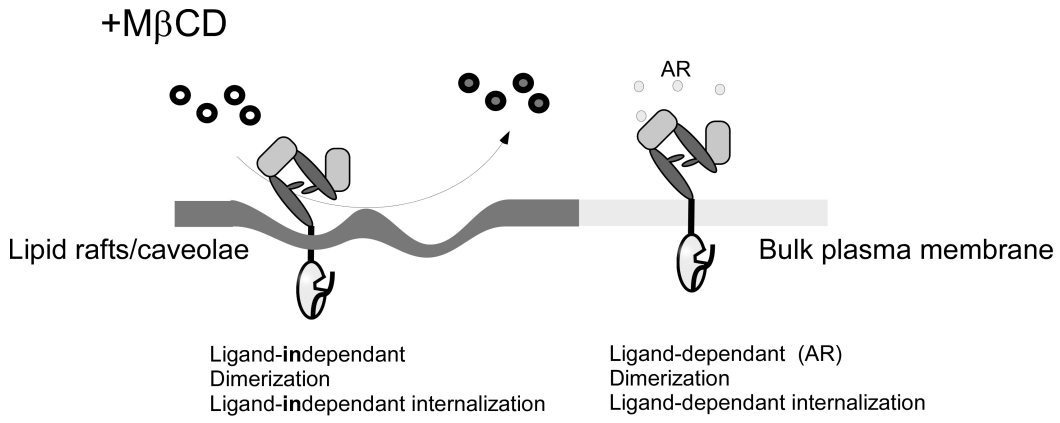


Figure D-2 : Hypothèse des deux populations de récepteur de l'EGF.

Si le récepteur de l'EGF est localisé dans des régions riches en cholestérol, la déplétion de ce composé pourrait induire une activation et une internalisation du récepteur qui sont probablement indépendantes de la présence de ligand. Tandis que si le récepteur de l'EGF est localisé dans des régions ne dépendant pas de la présence de cholestérol, ces phénomènes dépendront de la libération d'AR.

d. Rôle de l'amphiréguline dans l'activation du récepteur de l'EGF

Suite à la publication d'une étude récente réalisée par le groupe d'Ullrich identifiant le rôle de l'amphiréguline dans l'activation du récepteur de l'EGF par les UV (Singh *et al.* 2009), nous avons ré-examiné les résultats obtenus au Danemark. En effet, le fait de bloquer le site de liaison du ligand du récepteur de l'EGF dans les kératinocytes de types HaCaT lors de la déplétion du cholestérol nous avait semblé produire un résultat en accord avec la littérature, c'est-à-dire aucun changement majeur dans l'activation du récepteur de l'EGF, suggérant une activation indépendante de ligand. Cependant, nous n'avions pas prêté attention à la légère diminution de phosphorylation tant du récepteur de l'EGF que des MAPK ERK1/2 et la répétition de cette expérience avec des kératinocytes normaux a suggéré la présence d'un ligand participant, du moins partiellement, à l'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol. Nous avons par la suite identifié ce ligand comme étant l'amphiréguline. Il est dès lors possible, au vu de ces résultats, que les kératinocytes de type HaCaT, ainsi que les cellules Cos-1 utilisées par Chen et Resh, expriment et sécrètent moins d'amphiréguline que les kératinocytes normaux et donc que l'activation du récepteur de l'EGF en réponse à la déplétion du cholestérol dans ces cellules dépende davantage des phénomènes ligand-indépendants que d'une sécrétion plus importante d'amphiréguline, comme nous l'avons observé dans les kératinocytes normaux.

La sécrétion d'amphiréguline observée suite à la déplétion du cholestérol est probablement due à l'activation d'une MMP par les Src kinases, comme représenté à la figure D-3. Bien que nous n'ayons pas recherché l'identité de la (ou des) MMP(s) responsable(s) de la libération de l'amphiréguline, les MMP-2 et -9 pourraient représenter de bons candidats. En effet, *in vivo* la MMP-2 est constitutivement exprimée dans l'épiderme tandis que la MMP-9 y est induite en condition inflammatoire. De plus, ces deux gélatinases sont présentes en surface des kératinocytes en culture (Varani *et al.* 2000; Xue & Jackson 2008) et l'utilisation du MMP-2/MMP-9 inhibitor II diminue fortement l'activation du récepteur de l'EGF chez les kératinocytes en croissance autocrine (Kansra *et al.* 2004). Enfin, l'expression de la MMP-9 semble être régulée par la présence de cholestérol dans les cellules HaCaT (Kim *et al.* 2007).

Un autre candidat potentiel dans le clivage de l'amphiréguline serait ADAM17/TACE, dont il a été montré qu'elle régulait le clivage de l'amphiréguline lors de l'activation du récepteur de l'EGF dépendant des GPCR (Gschwind *et al.* 2003). On peut dès lors proposer que la MMP-2 ou ADAM17/TACE soit responsable de la libération rapide de l'amphiréguline tandis que la MMP-9, exprimée dans des conditions inflammatoires, clive plus tardivement le facteur de croissance HB-EGF dont nous savons qu'il est exprimé et libéré après la déplétion du cholestérol (Mathay *et al.* 2008).

Ce schéma d'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol est tout à fait comparable à son processus d'activation en condition autocrine (Kansra *et al.* 2004; Kansra *et al.* 2005), à la différence qu'il est exacerbé dans les conditions de déplétion du cholestérol. Cette amplification d'un mécanisme de stimulation autocrine pourrait être due à une sur-activation de la ou des MMPs responsables de la libération de l'amphiréguline ou à une activation plus importante des Src kinases responsables de l'activation des MMPs peut-être due à leur localisation dans les *lipid rafts* (Chen & Resh 2001). En effet, plusieurs MMPs, incluant les MMPs-1, -2, -3, -9, -10 et -19, sont induites ou sur-régulées dans des contextes inflammatoires ou de réparation des tissus dans les kératinocytes (revu dans (Kahari & Saarialho-Kere 1997). Dans ce contexte, il serait intéressant, après avoir identifié les MMP(s) responsable(s) du clivage de l'amphiréguline, de comparer leur niveau d'activation en condition basale et après avoir déplété le cholestérol.

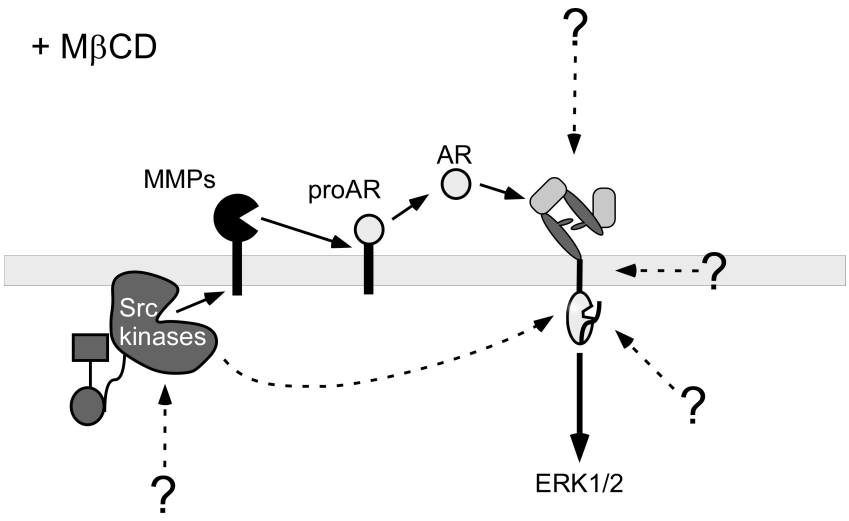


Figure D-3 : Schéma de l'activation du récepteur de l'EGF par l'amphiréguline lors de la désorganisation des lipid rafts.

Le récepteur de l'EGF peut être activé par l'AR, elle-même libérée de la membrane suite à l'activation de MMP et de Src kinase encore non identifiées. D'autres facteurs (extracellulaire, membranaire ou intracellulaire) participent également à l'activation du récepteur de l'EGF suite au retrait du cholestérol membranaire.

Parmi les membres de la famille des Src kinases, c-Src, c-Yes et Fyn sont exprimés dans les kératinocytes (Kansra *et al.* 2005) et tous trois interagissent avec le récepteur de l'EGF (Thomas & Brugge 1997). Nous n'avons pas recherché lesquels de ces membres étaient activés par la désorganisation des *lipid rafts*. Il est cependant à noter que si certains auteurs décrivent une possible activation des Src kinases lors de la déplétion du cholestérol (Chen & Resh 2002; Westover *et al.* 2003), personne à ce jour n'a encore clairement démontré leur activation. Au contraire, la non-

activation de v-Src due à son association diminuée avec les *lipid rafts* lors de la déplétion du cholestérol a récemment été montré dans des cellules MDCK exprimant un mutant thermosensible de v-Src (de Diesbach *et al.* 2008); reste à savoir si ce phénomène s'applique également à c-Src. Quoiqu'il en soit, il semble que dans nos conditions, une Src kinase participe à l'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol. Et comme l'inhibiteur que nous avons utilisé n'est pas spécifique de c-Src, nous ne pouvons exclure la participation des autres membres de la famille des Src kinases dans cette phosphorylation.

La phosphorylation de la Tyr 845 du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol pourrait être due, soit à une meilleure accessibilité de ce résidu tyrosine pour la Src kinase responsable de cette phosphorylation, soit à une activation accrue de cette kinase lors de la déplétion du cholestérol. Comparer son état d'activation en situation basale et suite à la déplétion du cholestérol pourrait répondre à cette question. De plus, la Tyr 845 du récepteur de l'EGF se trouve dans la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase et sa phosphorylation est associée à une augmentation de l'activité kinase du récepteur de l'EGF (Maa *et al.* 1995). Il est donc possible que la phosphorylation de la Tyr 845 compte dans la part ligand-indépendant de l'activation du récepteur en réponse à la déplétion du cholestérol. L'étude de l'activation d'un récepteur muté spécifiquement sur la tyrosine 845 et des signalisations activées par ce récepteur muté lors de la déplétion du cholestérol nous aiderait à comprendre le rôle des Src kinases dans l'activation du récepteur de l'EGF, tandis que l'étude d'un récepteur muté dans la poche de liaison du ligand permettrait d'identifier plus précisément les effets ligand-indépendants de l'activation du récepteur de l'EGF.

e. Pourquoi le récepteur de l'EGF est-il activé lors de la déplétion du cholestérol ?

Le récepteur de l'EGF régule de nombreuses fonctions de survie et de prolifération chez les kératinocytes épidermiques et son activation suite à la déplétion du cholestérol a été suggérée comme étant indépendante de ligand puisque le fait de bloquer le site de liaison du ligand n'empêche pas sa phosphorylation (Chen & Resh 2002). Nous avons toutefois montré que, dans les kératinocytes épidermiques, le processus d'activation du récepteur de l'EGF dépendait majoritairement de la libération d'amphiréguline. De plus, l'activation de la MAPK p38 semble avoir un rôle important lors de cette activation puisqu'elle régule l'internalisation du récepteur et semble également intervenir dans la phosphorylation de ce dernier. Il est cependant à noter que l'internalisation du récepteur de l'EGF n'est observable qu'une heure après le traitement à la MβCD, suggérant que le récepteur de l'EGF pourrait rester bloqué en membrane durant l'heure de déplétion du cholestérol. En effet, la MβCD perturbe les phénomènes d'endocytose (Rodal *et al.* 1999; Subtil *et al.* 1999) et nous avons observé qu'un traitement de 10 minutes avec la MβCD suivi de 20 minutes de récupération suffit à induire l'internalisation du récepteur de l'EGF (Figure 2-8). Ceci pourrait également suggérer que l'amphiréguline est libérée très rapidement lors de la déplétion du cholestérol. Nous reviendrons plus loin sur cette cinétique d'internalisation assez particulière.

Concernant la voie d'entrée du récepteur de l'EGF, il a été montré qu'elle dépendait de la clathrine lors de son internalisation suite à un traitement à l'anisomycine ou aux UV (Vergarajauregui *et al.* 2006; Zwang & Yarden 2006). Khan *et al.* ont cependant montré que l'internalisation du récepteur de l'EGF suite à un stress oxidatif se produit par les cavéoles, probablement suite à la phosphorylation de la Tyr 14 de la cavéoline-1 par les Src kinases (Khan *et al.* 2006). Malgré le fait que nous observons également une phosphorylation de la cavéoline-1 et que nous suspectons les Src kinases d'être activées suite à la déplétion du cholestérol, il est probable que l'internalisation du récepteur de l'EGF dans ces conditions ne s'effectue pas par les cavéoles étant donné que la cavéoline-1 est dégradée lors des périodes de récupération suivant la déplétion du cholestérol (Figure 1-7).

Comme nous l'avons dit précédemment, l'internalisation du récepteur de l'EGF suite à la déplétion du cholestérol est relativement lente puisque ce n'est qu'après une heure de récupération suivant le traitement à la MβCD que nous avons observé le récepteur de l'EGF localisé près du noyau (Figure 2-7). Cette internalisation décalée dans le temps peut être due à un ralentissement des mouvements membranaires suite au retrait du cholestérol, bloquant tout mouvement d'endocytose pendant l'heure de traitement, mouvements qui sont à nouveau possibles dès que les cellules ne sont plus en présence de MβCD. Il est intéressant de noter que l'amphiréguline déclenche une cinétique d'internalisation du récepteur de l'EGF relativement lente par rapport à l'EGF et dont le profil

correspond à ce que nous observons lors de la récupération. L'intervention de la MAPK p38 dans cette internalisation démontre cependant un processus inhabituel qui n'est pas uniquement dû à la liaison d'un ligand sur le récepteur de l'EGF. L'internalisation du récepteur de l'EGF pendant les heures qui suivent la déplétion du cholestérol n'est donc pas identique, tant au niveau trafic qu'au niveau du processus en lui-même, à l'endocytose déclenchée par un ligand.

Nous pouvons supposer que l'internalisation du récepteur de l'EGF suite à la déplétion du cholestérol pourrait conférer une protection à la cellule, comme il semble que ce soit le cas lors de stress aux UV ou à l'anisomycine (Adachi *et al.* 2009) puisque l'internalisation du récepteur de l'EGF contribue essentiellement à diminuer la sensibilité de la cellule envers les ligands présents dans le milieu extra-cellulaire, en dégradant le récepteur de l'EGF si le ligand est fort, ou en le recyclant si ce dernier n'est pas très puissant (Roepstorff *et al.* 2009). L'amphiréguline, n'étant pas un ligand puissant du récepteur de l'EGF, pourrait induire une internalisation du récepteur de l'EGF le mettant à l'abri d'autres ligands plus puissants (comme HB-EGF) qui seront produit par la suite et ainsi empêcher les cellules de proliférer dans des conditions de stress.

f. Le récepteur de l'EGF lors d'autres stress patho-physiologiques

L'internalisation du récepteur de l'EGF lorsque les cellules HeLa sont en situation de stress (UV, TNFα, anisomycine) dépend de l'acivation de la MAPK p38 (Vergarajauregui *et al.* 2006; Zwang & Yarden 2006). Ce mécanisme est également d'application lorsque les kératinocytes sont en situation de stress puisque nous l'avons observé lorsque l'homogénéité de la culture est rompue par un *scratch* ou lorsque les cellules sont mises en présence d'une molécule sensibilisante comme le DNFB. L'internalisation du récepteur de l'EGF de façon dépendante de l'activité de la MAPK p38 dans ces circonstances plaide pour un mécanisme similaire à celui que nous avons observé lors de la déplétion du cholestérol. Il est donc possible que ces types de stress passent par une déstabilisation des membranes (et donc des *lipid rafts*) conduisant à l'activation du récepteur de l'EGF. De plus, cette internalisation du récepteur de l'EGF pourrait jouer un rôle de protection de la cellule en situation de stress comme nous l'avons expliqué au point précédent. Il serait donc intéressant de tester d'une part si l'activation ainsi que l'internalisation du récepteur de l'EGF que nous avons observées dans ces conditions de stress dépendent ou non du clivage d'un ligand ancré en membrane, et d'autre part si ce mécanisme d'internalisation du récepteur de l'EGF a lieu dans d'autres types de stress dont on sait qu'ils interagissent avec les *lipid rafts*, comme par exemple les UV (Grether-Beck *et al.* 2008).

Il est intéressant de noter le fait que les épidermes psoriatiques présentent une sur-expression d'amphiréguline, ainsi qu'une activation continue du récepteur de l'EGF, probablement responsable de l'hyper-prolifération des kératinocytes causant ce désordre épidermique (Piepkorn 1996; Cook *et al.* 1997). De plus, la sur-expression de l'amphiréguline semble induire un phénotype psoriatique chez des souris transgéniques où son expression est contrôlée par le promoteur de K14 en induisant une hyper-prolifération des cellules épidermiques (Cook *et al.* 1997). Ce ligand du récepteur de l'EGF pouvant également induire l'expression de la chémokine pro-inflammatoire IL-8 (Chokki *et al.* 2006), il est tout à fait probable qu'il fasse partie des causes/conséquences du développement du psoriasis. Le rôle du récepteur de l'EGF dans le développement de cette pathologie reste cependant encore assez flou, étant donné qu'on trouve des études démontrant soit des améliorations (Wierzbicka *et al.* 2006), soit l'exacerbation de la maladie (Zorzou *et al.* 2004) après inhibition de l'activité kinase du récepteur de l'EGF.

Le phénotype développé par les kératinocytes dont les *lipid rafts* ont été perturbés suite à la déplétion du cholestérol est relativement semblable à celui observé dans une pathologie comme le psoriasis. En effet, des résultats obtenus dans notre laboratoire lors des expériences de la thèse de Conny Mathay montrent une sur-expression du TNFα ainsi que de l'IL-8 après déplétion du cholestérol. Or ces deux cytokines sont présentes dans l'épiderme affecté par cette maladie. Il serait

dès lors intéressant d'étudier les *lipid rafts* dans des kératinocytes psoriatiques afin de voir s'ils sont perturbés. En effet, une diminution de la fluidité des membranes des érythrocytes et des leukocytes polymorphonucléaires a été observée chez des patients souffrant de psoriasis (Ferretti *et al.* 1989; Gornicki & Gutsze 2001), phénomène également observé lorsque les fibroblastes ou les kératinocytes sont déplétés en cholestérol (Kwik *et al.* 2003; Lambert *et al.* 2006).

La déplétion du cholestérol chez les kératinocytes épidermiques conduit donc à l'activation du récepteur de l'EGF d'une part de façon indépendante de ligand et nécessitant probablement l'activation d'une Src kinase, et d'autre part de façon dépendante de la sécrétion d'amphiréguline (schématisé à la figure D-3). Il est probable que la sécrétion d'amphiréguline dans ces circonstances induise le développement d'un phénotype inflammatoire avant la mise en place de la différenciation terminale comme montré par Ralph Jans au cours de sa thèse.

g. En conclusion

De façon générale, nous avons montré que la déplétion du cholestérol dans les kératinocytes épidermiques conduit à la mise en place d'une signalisation impliquant notamment le récepteur de l'EGF. Si l'activation de ce récepteur avait précédemment été décrite pour être indépendante de ligand, nous avons montré le rôle important de la sécrétion d'amphiréguline dans cette activation chez les kératinocytes épidermiques. Cependant d'autres évènements, encore inconnus et indépendants de la présence de ligand, semblent également participer à l'activation du récepteur de l'EGF lors de la déplétion du cholestérol. Suite à son activation, et de façon dépendante de l'activation de la MAPK p38, le récepteur de l'EGF est internalisé durant les heures suivant la déplétion du cholestérol. A ce jour, nous n'avons pas élucidé les causes ni la signification de ce mécanisme d'internalisation assez particulier qui pourrait participer autant à la régulation négative du récepteur qu'à sa désensibilisation envers les facteurs de croissance extra-cellulaires.

Etant donné que les acteurs participant au développement d'un phénotype, d'abord inflammatoire puis différencié, du kératinocyte en réponse à la déplétion du cholestérol partagent certaines analogies avec ceux impliqués dans le phénotype observé dans les épidermes psoriatiques, il serait intéressant de rechercher si le mécanisme que nous avons observé est également mis en place dans ces cellules et s'il est la cause ou une conséquence du développement de la maladie.

D'autre part, nous avons montré que le processus d'internalisation du récepteur de l'EGF dépendant de l'activation de la MAPK p38 est également mis en place lors d'autres stress patho-physiologiques pour l'épiderme comme les *scratch* ou une incubation en présence d'une molécule sensibilisante comme le DNFB. Il serait dès lors intéressant de rechercher si ce mécanisme est mis en place dans d'autres types de stress physiologiques pour l'épiderme (comme les UV, les brûlures, les engelures ou d'autres molécules irritantes ou sensibilisantes) et d'investiguer si ce mécanisme, observé dans des cultures de kératinocytes en monocouches peut également prendre place dans des modèles d'épidermes reconstitués. De plus, ces stress pourraient également perturber la structure des *lipid rafts*, mais seule l'utilisation de techniques plus pointues que celles que nous avons utilisées jusqu'ici permettrait cette étude des structures membranaires.

Bibliographie

Abe Y, Odaka M, Inagaki F, Lax I, Schlessinger J , Kohda D (1998). Disulfide bond structure of human epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. **273**, 11150-11157.

Adachi S, Natsume H, Yamauchi J, Matsushima-Nishiwaki R, Joe AK, Moriwaki H , Kozawa O (2009). p38 MAP kinase controls EGF receptor downregulation via phosphorylation at Ser1046/1047. *Cancer Lett*. **277**, 108-113.

Adam RM, Mukhopadhyay NK, Kim J, Di Vizio D, Cinar B, Boucher K, Solomon KR , Freeman MR (2007). Cholesterol sensitivity of endogenous and myristoylated Akt. *Cancer Res*. **67**, 6238-6246.

Agazie YM , Hayman MJ (2003). Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol*. **23**, 7875-7886.

Aifa S, Frikha F, Miled N, Johansen K, Lundstrom I , Svensson SP (2006). Phosphorylation of Thr654 but not Thr669 within the juxtamembrane domain of the EGF receptor inhibits calmodulin binding. *Biochem Biophys Res Commun*. **347**, 381-387.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB , Cohen P (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*. **7**, 261-269.

Alexander A (1998). Endocytosis and intracellular sorting of receptor tyrosine kinases. *Front Biosci*. **3**, d729-738.

Allen JA, Halverson-Tamboli RA , Rasenick MM (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci*. **8**, 128-140.

Alwan HA, van Zoelen EJ , van Leeuwen JE (2003). Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *J Biol Chem*. **278**, 35781-35790.

Aroian RV, Koga M, Mendel JE, Ohshima Y , Sternberg PW (1990). The let-23 gene necessary for Caenorhabditis elegans vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily. *Nature*. **348**, 693-699.

Babuke T , Tikkanen R (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *Eur J Cell Biol*. **86**, 525-532.

Balbis A, Parmar A, Wang Y, Baquiran G , Posner BI (2007). Compartmentalization of signaling-competent epidermal growth factor receptors in endosomes. *Endocrinology*. **148**, 2944-2954.

Bang B, Gniadecki R , Gajkowska B (2005). Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol*. **14**, 266-272.

Bao J, Alroy I, Waterman H, Schejter ED, Brodie C, Gruenberg J , Yarden Y (2000). Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors from a degradative pathway to the recycling endosome. *J Biol Chem*. **275**, 26178-26186.

Batzer AG, Rotin D, Urena JM, Skolnik EY , Schlessinger J (1994). Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol*. **14**, 5192-5201.

Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP , Carpenter G (1996). All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem*. **271**, 5251-5257.

Belsches AP, Haskell MD , Parsons SJ (1997). Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis. *Front Biosci*. **2**, d501-518.

Berger CL, Vasquez JG, Shofner J, Mariwalla K , Edelson RL (2006). Langerhans cells: mediators of immunity and tolerance. *Int J Biochem Cell Biol*. **38**, 1632-1636.

Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, Cox ME, Leu TH , Parsons SJ (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem*. **274**, 8335-8343.

Bist A, Fielding PE , Fielding CJ (1997). Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 10693-10698.

Boerner JL, Demory ML, Silva C , Parsons SJ (2004). Phosphorylation of Y845 on the epidermal growth factor receptor mediates binding to the mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II. *Mol Cell Biol*. **24**, 7059-7071.

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A , Fusenig NE (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*. **106**, 761-771.

Boulais N , Misery L (2007). Merkel cells. *J Am Acad Dermatol*. **57**, 147-165.

Boyce ST , Ham RG (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.

Brown DA , London E (1998). Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol*. **164**, 103-114.

Brown MS , Goldstein JL (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 11041-11048.

Byyny RL, Orth DN , Cohen S (1972). Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology*. **90**, 1261-1266.

Candi E, Schmidt R , Melino G (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6**, 328-340.

Caroni P (2001). New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *Embo J*. **20**, 4332-4336.

Carpenter G , Cohen S (1978). Biological and molecular studies of the mitogenic effects of human epidermal growth factor. *Symp Soc Dev Biol*, 13-31.

Cavani A, Zambruno G, Marconi A, Manca V, Marchetti M , Giannetti A (1993). Distinctive integrin expression in the newly forming epidermis during wound healing in humans. *J Invest Dermatol*. **101**, 600-604.

Chamberlain LH, Burgoyne RD , Gould GW (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**, 5619-5624.

Chang C , Sternberg PW (1999). C. elegans vulval development as a model system to study the cancer biology of EGFR signaling. *Cancer Metastasis Rev*. **18**, 203-213.

Chantry A (1995). The kinase domain and membrane localization determine intracellular interactions between epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem*. **270**, 3068-3073.

Chen X , Resh MD (2001). Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization. *J Biol Chem*. **276**, 34617-34623.

Chen X , Resh MD (2002). Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. **277**, 49631-49637.

Chinkers M, McKanna JA , Cohen S (1979). Rapid induction of morphological changes in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factors. *J Cell Biol*. **83**, 260-265.

Cho HS , Leahy DJ (2002). Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science*. **297**, 1330-1333.

Choi JH, Ryu SH , Suh PG (2007). On/off-regulation of phospholipase C-gamma 1-mediated signal transduction. *Adv Enzyme Regul*. **47**, 104-116.

Chokki M, Mitsuhashi H , Kamimura T (2006). Metalloprotease-dependent amphiregulin release mediates tumor necrosis factor-alpha-induced IL-8 secretion in the human airway epithelial cell line NCI-H292. *Life Sci*. **78**, 3051-3057.

Citri A, Skaria KB , Yarden Y (2003). The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*. **284**, 54-65.

Coffey RJ, Jr., Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL , Pittelkow MR (1987). Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *Nature*. **328**, 817-820.

Cohen S (1965). The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol*. **12**, 394-407.

Cook PW, Piepkorn M, Clegg CH, Plowman GD, DeMay JM, Brown JR , Pittelkow MR (1997). Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. *J Clin Invest*. **100**, 2286-2294.

Cook PW, Pittelkow MR , Shipley GD (1991). Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors. *J Cell Physiol*. **146**, 277-289.

Costin GE , Hearing VJ (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*. **21**, 976-994.

Countaway JL, Nairn AC , Davis RJ (1992). Mechanism of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*. **267**, 1129-1140.

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U , et al. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*. **230**, 1132-1139.

Dans M, Gagnoux-Palacios L, Blaikie P, Klein S, Mariotti A , Giancotti FG (2001). Tyrosine phosphorylation of the beta 4 integrin cytoplasmic domain mediates Shc signaling to extracellular signal-regulated kinase and antagonizes formation of hemidesmosomes. *J Biol Chem*. **276**, 1494-1502.

de Diesbach P, Medts T, Carpentier S, D'Auria L, Van Der Smissen P, Platek A, Mettlen M, Caplanusi A, van den Hove MF, Tyteca D , Courtoy PJ (2008). Differential subcellular membrane recruitment of Src may specify its downstream signalling. *Exp Cell Res*. **314**, 1465-1479.

de Laurentiis A, Donovan L , Arcaro A (2007). Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *Open Biochem J*. **1**, 12-32.

de Melker AA, van der Horst G, Calafat J, Jansen H , Borst J (2001). c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. *J Cell Sci*. **114**, 2167-2178.

De Potter IY, Poumay Y, Squillace KA , Pittelkow MR (2001). Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation. *Exp Cell Res*. **271**, 315-328.

Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, Louis DN, Li FP , Rheinwald JG (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol*. **20**, 1436-1447.

Donepudi M , Resh MD (2008). c-Src trafficking and co-localization with the EGF receptor promotes EGF ligand-independent EGF receptor activation and signaling. *Cell Signal*. **20**, 1359-1367.

Dong C, Waters SB, Holt KH , Pessin JE (1996). SOS phosphorylation and disassociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signaling pathways. *J Biol Chem*. **271**, 6328-6332.

Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J , Waterfield MD (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*. **307**, 521-527.

Duneau JP, Vegh AP , Sturgis JN (2007). A dimerization hierarchy in the transmembrane domains of the HER receptor family. *Biochemistry*. **46**, 2010-2019.

Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M , Rorke EA (2005). Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol*. **124**, 481-492.

Elias PM (2005). Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol*. **125**, 183-200.

Elleman TC, Domagala T, McKern NM, Nerrie M, Lonnqvist B, Adams TE, Lewis J, Lovrecz GO, Hoyne PA, Richards KM, Howlett GJ, Rothacker J, Jorissen RN, Lou M, Garrett TP, Burgess AW, Nice EC , Ward CW (2001). Identification of a determinant of epidermal growth factor receptor ligand-binding specificity using a truncated, high-affinity form of the ectodomain. *Biochemistry*. **40**, 8930-8939.

Feinmesser RL, Wicks SJ, Taverner CJ , Chantry A (1999). Ca2+/calmodulin-dependent kinase II phosphorylates the epidermal growth factor receptor on multiple sites in the cytoplasmic tail and serine 744 within the kinase domain to regulate signal generation. *J Biol Chem*. **274**, 16168-16173.

Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ , Lemmon MA (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell*. **11**, 507-517.

Ferretti G, Offidani AM, Simonetti O, Valentino M, Curatola G , Bossi G (1989). Changes in membrane properties of erythrocytes and polymorphonuclear cells in psoriasis. *Biochem Med Metab Biol*. **41**, 132-138.

Fitsialos G, Chassot AA, Turchi L, Dayem MA, LeBrigand K, Moreilhon C, Meneguzzi G, Busca R, Mari B, Barbry P , Ponzio G (2007). Transcriptional signature of epidermal keratinocytes subjected to in vitro scratch wounding reveals selective roles for ERK1/2, p38, and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *J Biol Chem*. **282**, 15090-15102.

Forestier JP (1992). Les enzymes de l'espace extra-cellulaire du stratum corneum. *Int J Cosmet Sci*. **14**, 47-63.

Foster LJ, De Hoog CL , Mann M (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 5813-5818.

Fountoulakis M, Juranville JF, Maris A, Ozmen L , Garotta G (1990). One interferon gamma receptor binds one interferon gamma dimer. *J Biol Chem*. **265**, 19758-19767.

Fra AM, Williamson E, Simons K , Parton RG (1994). Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem*. **269**, 30745-30748.

Fra AM, Williamson E, Simons K , Parton RG (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 8655-8659.

Frank PG, Marcel YL, Connelly MA, Lublin DM, Franklin V, Williams DL , Lisanti MP (2002). Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. *Biochemistry*. **41**, 11931-11940.

French AR, Tadaki DK, Niyogi SK , Lauffenburger DA (1995). Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J Biol Chem*. **270**, 4334-4340.

Frodin M , Gammeltoft S (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol*. **151**, 65-77.

Fuchs E, Coulombe P, Cheng J, Chan YM, Hutton E, Syder A, Degenstein L, Yu QC, Letai A , Vassar R (1994). Genetic bases of epidermolysis bullosa simplex and epidermolytic hyperkeratosis. *J Invest Dermatol*. **103**, 25S-30S.

Futter CE, Pearse A, Hewlett LJ , Hopkins CR (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*. **132**, 1011-1023.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW , Ward CW (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*. **110**, 763-773.

Gniadecki R (2004). Depletion of membrane cholesterol causes ligand-independent activation of Fas and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. **320**, 165-169.

Goding CR (2007). Melanocytes: the new Black. *Int J Biochem Cell Biol*. **39**, 275-279.

Golub T, Wacha S , Caroni P (2004). Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol*. **14**, 542-550.

Gornicki A , Gutsze A (2001). Erythrocyte membrane fluidity changes in psoriasis: an EPR study. *J Dermatol Sci*. **27**, 27-30.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM , Hynes NE (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J*. **16**, 1647-1655.

Green MR, Basketter DA, Couchman JR , Rees DA (1983). Distribution and number of epidermal growth factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. *Dev Biol*. **100**, 506-512.

Green MR , Couchman JR (1984). Distribution of epidermal growth factor receptors in rat tissues during embryonic skin development, hair formation, and the adult hair growth cycle. *J Invest Dermatol*. **83**, 118-123.

Grether-Beck S, Salahshour-Fard M, Timmer A, Brenden H, Felsner I, Walli R, Fullekrug J , Krutmann J (2008). Ceramide and raft signaling are linked with each other in UVA radiation-induced gene expression. *Oncogene*. **27**, 4768-4778.

Grovdal LM, Stang E, Sorkin A , Madshus IH (2004). Direct interaction of Cbl with pTyr 1045 of the EGF receptor (EGFR) is required to sort the EGFR to lysosomes for degradation. *Exp Cell Res*. **300**, 388-395.

Gschwind A, Hart S, Fischer OM , Ullrich A (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *Embo J*. **22**, 2411-2421.

Gullick WJ (1994). A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two. *Eur J Cancer*. **30A**, 2186.

Gullick WJ, Downward J, Parker PJ, Whittle N, Kris R, Schlessinger J, Ullrich A , Waterfield MD (1985). The structure and function of the epidermal growth factor receptor studied by using antisynthetic peptide antibodies. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. **226**, 127-134.

Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA , Carraway KL, 3rd (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 8132-8136.

Haigler H, Ash JF, Singer SJ , Cohen S (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **75**, 3317-3321.

Haigler HT, McKanna JA , Cohen S (1979). Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J Cell Biol*. **81**, 382-395.

Hailstones D, Sleer LS, Parton RG , Stanley KK (1998). Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J Lipid Res*. **39**, 369-379.

Han W , He YY (2009). Requirement for Metalloproteinase-dependent ERK and AKT Activation in UVB-induced G1-S Cell Cycle Progression of Human Keratinocytes. *Photochem Photobiol*. **85**, 997-1003.

Hanzal-Bayer MF , Hancock JF (2007). Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett*. **581**, 2098-2104.

Harder T, Scheiffele P, Verkade P , Simons K (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol*. **141**, 929-942.

Harris RC, Chung E , Coffey RJ (2003). EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*. **284**, 2-13.

Hashimoto K, Higashiyama S, Asada H, Hashimura E, Kobayashi T, Sudo K, Nakagawa T, Damm D, Yoshikawa K , Taniguchi N (1994). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J Biol Chem*. **269**, 20060-20066.

He YY, Council SE, Feng L , Chignell CF (2008). UVA-induced cell cycle progression is mediated by a disintegrin and metalloprotease/epidermal growth factor receptor/AKT/Cyclin D1 pathways in keratinocytes. *Cancer Res*. **68**, 3752-3758.

He YY, Huang JL , Chignell CF (2006). Cleavage of epidermal growth factor receptor by caspase during apoptosis is independent of its internalization. *Oncogene*. **25**, 1521-1531.

Heerklotz H (2002). Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys J*. **83**, 2693-2701.

Heisermann GJ , Gill GN (1988). Epidermal growth factor receptor threonine and serine residues phosphorylated in vivo. *J Biol Chem*. **263**, 13152-13158.

Heisermann GJ, Wiley HS, Walsh BJ, Ingraham HA, Fiol CJ , Gill GN (1990). Mutational removal of the Thr669 and Ser671 phosphorylation sites alters substrate specificity and ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. **265**, 12820-12827.

Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K , Yuspa SH (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*. **19**, 245-254.

Herbst JJ, Opresko LK, Walsh BJ, Lauffenburger DA , Wiley HS (1994). Regulation of postendocytic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention. *J Biol Chem*. **269**, 12865-12873.

Hotchin NA, Gandarillas A , Watt FM (1995). Regulation of cell surface beta 1 integrin levels during keratinocyte terminal differentiation. *J Cell Biol*. **128**, 1209-1219.

Huang F, Khvorova A, Marshall W , Sorkin A (2004). Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *J Biol Chem*. **279**, 16657-16661.

Itoh T, Koshiba S, Kigawa T, Kikuchi A, Yokoyama S , Takenawa T (2001). Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science*. **291**, 1047-1051.

Jans R, Atanasova G, Jadot M , Poumay Y (2004). Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol*. **123**, 564-573.

Jones JC, Kurpakus MA, Cooper HM , Quaranta V (1991). A function for the integrin alpha 6 beta 4 in the hemidesmosome. *Cell Regul*. **2**, 427-438.

Jones PH, Harper S , Watt FM (1995). Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell*. **80**, 83-93.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW , Burgess AW (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. **284**, 31-53.

Junttila TT, Sundvall M, Maatta JA , Elenius K (2000). Erbb4 and its isoforms: selective regulation of growth factor responses by naturally occurring receptor variants. *Trends Cardiovasc Med*. **10**, 304-310.

Jura N, Endres NF, Engel K, Deindl S, Das R, Lamers MH, Wemmer DE, Zhang X , Kuriyan J (2009). Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*. **137**, 1293-1307.

Kahari VM , Saarialho-Kere U (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*. **6**, 199-213.

Kamata H, Shibukawa Y, Oka SI , Hirata H (2000). Epidermal growth factor receptor is modulated by redox through multiple mechanisms. Effects of reductants and H2O2. *Eur J Biochem*. **267**, 1933-1944.

Kansra S, Stoll SW, Johnson JL , Elder JT (2004). Autocrine extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation in normal human keratinocytes: metalloproteinase-mediated release of amphiregulin triggers signaling from ErbB1 to ERK. *Mol Biol Cell*. **15**, 4299-4309.

Kansra S, Stoll SW, Johnson JL , Elder JT (2005). Src family kinase inhibitors block amphiregulin-mediated autocrine ErbB signaling in normal human keratinocytes. *Mol Pharmacol*. **67**, 1145-1157.

Kassenbrock CK , Anderson SM (2004). Regulation of ubiquitin protein ligase activity in c-Cbl by phosphorylation-induced conformational change and constitutive activation by tyrosine to glutamate point mutations. *J Biol Chem*. **279**, 28017-28027.

Kaur P (2006). Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J Invest Dermatol*. **126**, 1450-1458.

Keilhack H, Tenev T, Nyakatura E, Godovac-Zimmermann J, Nielsen L, Seedorf K , Bohmer FD (1998). Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling. *J Biol Chem*. **273**, 24839-24846.

Khan EM, Heidinger JM, Levy M, Lisanti MP, Ravid T , Goldkorn T (2006). Epidermal growth factor receptor exposed to oxidative stress undergoes Src- and caveolin-1-dependent perinuclear trafficking. *J Biol Chem*. **281**, 14486-14493.

Kim S, Kim Y, Lee Y, Cho KH, Kim KH , Chung JH (2007). Cholesterol inhibits MMP-9 expression in human epidermal keratinocytes and HaCaT cells. *FEBS Lett*. **581**, 3869-3874.

Kippenberger S, Loitsch S, Guschel M, Muller J, Knies Y, Kaufmann R , Bernd A (2005). Mechanical stretch stimulates protein kinase B/Akt phosphorylation in epidermal cells via angiotensin II type 1 receptor and epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. **280**, 3060-3067.

Kita T, Brown MS , Goldstein JL (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**, 1094-1100.

Klein U, Gimpl G , Fahrenholz F (1995). Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry*. **34**, 13784-13793.

Kloth MT, Laughlin KK, Biscardi JS, Boerner JL, Parsons SJ , Silva CM (2003). STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Biol Chem*. **278**, 1671-1679.

Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A , Herrlich P (1996). Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *Embo J*. **15**, 5314-5325.

Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC , Aaronson SA (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**, 9193-9197.

Kuppuswamy D, Dalton M , Pike LJ (1993). Serine 1002 is a site of in vivo and in vitro phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. **268**, 19134-19142.

Kusumi A, Koyama-Honda I , Suzuki K (2004). Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic*. **5**, 213-230.

Kuwada SK, Lund KA, Li XF, Cliften P, Amsler K, Opresko LK , Wiley HS (1998). Differential signaling and regulation of apical vs. basolateral EGFR in polarized epithelial cells. *Am J Physiol*. **275**, C1419-1428.

Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP , Edidin M (2003). Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 13964-13969.

Kyriakis JM , Avruch J (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. **81**, 807-869.

Lai EC (2003). Lipid rafts make for slippery platforms. *J Cell Biol*. **162**, 365-370.

Lambert D, O'Neill CA , Padfield PJ (2005). Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. *Biochem J*. **387**, 553-560.

Lambert S, Vind-Kezunovic D, Karvinen S , Gniadecki R (2006). Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J Invest Dermatol*. **126**, 954-962.

Larjava H (1991). Expression of beta 1 integrins in normal human keratinocytes. *Am J Med Sci*. **301**, 63-68.

Leevers SJ, Vanhaesebroeck B , Waterfield MD (1999). Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol*. **11**, 219-225.

Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM , Schlessinger J (1997). Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *Embo J*. **16**, 281-294.

Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ , Yarden Y (1998). Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *Embo J*. **17**, 3385-3397.

Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S , Yarden Y (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell*. **4**, 1029-1040.

Li H, Ruano MJ , Villalobo A (2004). Endogenous calmodulin interacts with the epidermal growth factor receptor in living cells. *FEBS Lett*. **559**, 175-180.

Li Y, Bi Z, Yan B , Wan Y (2006a). UVB radiation induces expression of HIF-1alpha and VEGF through the EGFR/PI3K/DEC1 pathway. *Int J Mol Med*. **18**, 713-719.

Li YC, Park MJ, Ye SK, Kim CW , Kim YN (2006b). Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol*. **168**, 1107-1118; quiz 1404-1105.

Linggi B , Carpenter G (2006). ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol*. **16**, 649-656.

Lisanti MP, Tang Z, Scherer PE, Kubler E, Koleske AJ , Sargiacomo M (1995). Caveolae, transmembrane signalling and cellular transformation. *Mol Membr Biol*. **12**, 121-124.

Longva KE, Blystad FD, Stang E, Larsen AM, Johannessen LE , Madshus IH (2002). Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol*. **156**, 843-854.

Lund KA, Lazar CS, Chen WS, Walsh BJ, Welsh JB, Herbst JJ, Walton GM, Rosenfeld MG, Gill GN , Wiley HS (1990). Phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at threonine 654 inhibits ligand-induced internalization and down-regulation. *J Biol Chem*. **265**, 20517-20523.

Lynch RD, Tkachuk LJ, Ji X, Rabito CA , Schneeberger EE (1993). Depleting cell cholesterol alters calcium-induced assembly of tight junctions by monolayers of MDCK cells. *Eur J Cell Biol*. **60**, 21-30.

Ma L, Huang YZ, Pitcher GM, Valtschanoff JG, Ma YH, Feng LY, Lu B, Xiong WC, Salter MW, Weinberg RJ , Mei L (2003). Ligand-dependent recruitment of the ErbB4 signaling complex into neuronal lipid rafts. *J Neurosci*. **23**, 3164-3175.

Maa MC, Leu TH, McCarley DJ, Schatzman RC , Parsons SJ (1995). Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 6981-6985.

Macdonald JL , Pike LJ (2005). A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res*. **46**, 1061-1067.

Maguire HC, Jr., Jaworsky C, Cohen JA, Hellman M, Weiner DB , Greene MI (1989). Distribution of neu (c-erbB-2) protein in human skin. *J Invest Dermatol*. **92**, 786-790.

Martin-Nieto J , Villalobo A (1998). The human epidermal growth factor receptor contains a juxtamembrane calmodulin-binding site. *Biochemistry*. **37**, 227-236.

Mathay C, Giltaire S, Minner F, Bera E, Herin M , Poumay Y (2008). Heparin-binding EGF-like growth factor is induced by disruption of lipid rafts and oxidative stress in keratinocytes and participates in the epidermal response to cutaneous wounds. *J Invest Dermatol*. **128**, 717-727.

Mayor S , Pagano RE (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**, 603-612.

McKanna JA, Haigler HT , Cohen S (1979). Hormone receptor topology and dynamics: morphological analysis using ferritin-labeled epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**, 5689-5693.

Meves A, Stock SN, Beyerle A, Pittelkow MR , Peus D (2001). H(2)O(2) mediates oxidative stress-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. *Toxicol Lett*. **122**, 205-214.

Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z , Derynck R (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*. **376**, 337-341.

Milarski KL, Zhu G, Pearl CG, McNamara DJ, Dobrusin EM, MacLean D, Thieme-Sefler A, Zhang ZY, Sawyer T, Decker SJ , et al. (1993). Sequence specificity in recognition of the epidermal growth factor receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem*. **268**, 23634-23639.

Mineo C, Gill GN , Anderson RG (1999). Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol Chem*. **274**, 30636-30643.

Minner F, Herphelin F , Poumay Y (2009). Study of Epidermal Differentiation in Human Keratinocytes Cultured in Autocrine Conditions. In *Methods in Molecular Biology*. (K Turksen, ed): Humana Press, pp. 71-82.

Moll R, Divo M , Langbein L (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*. **129**, 705-733.

Moriki T, Maruyama H , Maruyama IN (2001). Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol*. **311**, 1011-1026.

Morita K , Miyachi Y (2003). Tight junctions in the skin. *J Dermatol Sci*. **31**, 81-89.

Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV , Simons K (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**, 10339-10343.

Nagy P, Vereb G, Sebestyen Z, Horvath G, Lockett SJ, Damjanovich S, Park JW, Jovin TM , Szollosi J (2002). Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J Cell Sci*. **115**, 4251-4262.

New L, Jiang Y, Zhao M, Liu K, Zhu W, Flood LJ, Kato Y, Parry GC , Han J (1998). PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *Embo J*. **17**, 3372-3384.

Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A , Kitano H (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol*. **1**, 2005 0010.

Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M , Yokoyama S (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell*. **110**, 775-787.

Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K , Pitha J (1989). Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem*. **186**, 17-22.

Okabayashi Y, Kido Y, Okutani T, Sugimoto Y, Sakaguchi K , Kasuga M (1994). Tyrosines 1148 and 1173 of activated human epidermal growth factor receptors are binding sites of Shc in intact cells. *J Biol Chem*. **269**, 18674-18678.

Okutani T, Okabayashi Y, Kido Y, Sugimoto Y, Sakaguchi K, Matuoka K, Takenawa T , Kasuga M (1994). Grb2/Ash binds directly to tyrosines 1068 and 1086 and indirectly to tyrosine 1148 of activated human epidermal growth factor receptors in intact cells. *J Biol Chem*. **269**, 31310-31314.

Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B , Hynes NE (1998). ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol*. **18**, 5042-5051.

Onishi-Haraikawa Y, Funaki M, Gotoh N, Shibuya M, Inukai K, Katagiri H, Fukushima Y, Anai M, Ogihara T, Sakoda H, Ono H, Kikuchi M, Oka Y , Asano T (2001). Unique phosphorylation mechanism of Gab1 using PI 3-kinase as an adaptor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. **288**, 476-482.

Orr G, Hu D, Ozcelik S, Opresko LK, Wiley HS , Colson SD (2005). Cholesterol dictates the freedom of EGF receptors and HER2 in the plane of the membrane. *Biophys J*. **89**, 1362-1373.

Ozcan F, Klein P, Lemmon MA, Lax I , Schlessinger J (2006). On the nature of low- and high-affinity EGF receptors on living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 5735-5740.

Padhy LC, Shih C, Cowing D, Finkelstein R , Weinberg RA (1982). Identification of a phosphoprotein specifically induced by the transforming DNA of rat neuroblastomas. *Cell*. **28**, 865-871.

Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, Mittnacht S, Lane EB , Jorcano JL (1999). Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Mol Cell Biol*. **19**, 3086-3094.

Pawson T , Schlessingert J (1993). SH2 and SH3 domains. *Curr Biol*. **3**, 434-442.

Peus D, Vasa RA, Meves A, Pott M, Beyerle A, Squillace K , Pittelkow MR (1998). H2O2 is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*. **110**, 966-971.

Piepkorn M (1996). Overexpression of amphiregulin, a major autocrine growth factor for cultured human keratinocytes, in hyperproliferative skin diseases. *Am J Dermatopathol*. **18**, 165-171.

Piepkorn M, Lo C , Plowman G (1994). Amphiregulin-dependent proliferation of cultured human keratinocytes: autocrine growth, the effects of exogenous recombinant cytokine, and apparent requirement for heparin-like glycosaminoglycans. *J Cell Physiol*. **159**, 114-120.

Pike LJ (2005). Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta*. **1746**, 260-273.

Pike LJ (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*. **47**, 1597-1598.

Pike LJ , Casey L (2002). Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry*. **41**, 10315-10322.

Pike LJ, Han X , Gross RW (2005). Epidermal growth factor receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: a shotgun lipidomics study. *J Biol Chem*. **280**, 26796-26804.

Pittelkow MR, Cook PW, Shipley GD, Derynck R , Coffey RJ, Jr. (1993). Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Differ*. **4**, 513-521.

Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG , Shoyab M (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**, 1746-1750.

Plowman GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ , Shoyab M (1990). Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**, 4905-4909.

Poumay Y , Coquette A (2007). Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch Dermatol Res*. **298**, 361-369.

Poumay Y, Herphelin F, Smits P, De Potter IY , Pittelkow MR (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**, 138-144.

Poumay Y , Pittelkow MR (1995). Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol*. **104**, 271-276.

Poumay YG (2007). The dumb ErbB receptor helps healing. *J Invest Dermatol*. **127**, 995-997.

Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C , Ullrich A (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*. **402**, 884-888.

Prigent SA, Lemoine NR, Hughes CM, Plowman GD, Selden C , Gullick WJ (1992). Expression of the c-erbB-3 protein in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene*. **7**, 1273-1278.

Raiborg C , Stenmark H (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. **458**, 445-452.

Raucher D, Stauffer T, Chen W, Shen K, Guo S, York JD, Sheetz MP , Meyer T (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell*. **100**, 221-228.

Rebecchi MJ , Pentyala SN (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev*. **80**, 1291-1335.

Red Brewer M, Choi SH, Alvarado D, Moravcevic K, Pozzi A, Lemmon MA , Carpenter G (2009). The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Mol Cell*. **34**, 641-651.

Rheinwald JG , Green H (1975). Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell*. **6**, 317-330.

Ringerike T, Blystad FD, Levy FO, Madshus IH , Stang E (2002). Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *J Cell Sci*. **115**, 1331-1340.

Robinson JM , Karnovsky MJ (1980). Evaluation of the polyene antibiotic filipin as a cytochemical probe for membrane cholesterol. *J Histochem Cytochem*. **28**, 161-168.

Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B , Sandvig K (1999). Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell*. **10**, 961-974.

Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, Knudsen SL, Lerdrup M, Grovdal L, Willumsen BM , van Deurs B (2009). Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic*. **10**, 1115-1127.

Roepstorff K, Grovdal L, Grandal M, Lerdrup M , van Deurs B (2008). Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol*. **129**, 563-578.

Roepstorff K, Thomsen P, Sandvig K , van Deurs B (2002). Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J Biol Chem*. **277**, 18954-18960.

Rosenberger CM, Brumell JH , Finlay BB (2000). Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. *Curr Biol*. **10**, R823-825.

Rosette C , Karin M (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*. **274**, 1194-1197.

Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Zinck R, Nordheim A, Herrlich P , Rahmsdorf HJ (1994). Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell*. **78**, 963-972.

Scales SJ , Scheller RH (1999). Lipid membranes shape up. *Nature*. **401**, 123-124.

Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB , Soling HD (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*. **401**, 133-141.

Schmidt MH , Dikic I (2005). The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6**, 907-918.

Schneider MR , Wolf E (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol*. **218**, 460-466.

Schroeder R, London E , Brown D (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 12130-12134.

Schweitzer R , Shilo BZ (1997). A thousand and one roles for the Drosophila EGF receptor. *Trends Genet*. **13**, 191-196.

Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, Azzariti A, Bellizzi A , Paradiso A (2006). The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta*. **1766**, 120-139.

Shaw AS (2006). Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat Immunol*. **7**, 1139-1142.

Shen L , Turner JR (2005). Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*. **16**, 3919-3936.

Shen X , Kramer RH (2004). Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. *Am J Pathol*. **165**, 1315-1329.

Shirakata Y, Kimura R, Nanba D, Iwamoto R, Tokumaru S, Morimoto C, Yokota K, Nakamura M, Sayama K, Mekada E, Higashiyama S , Hashimoto K (2005). Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci*. **118**, 2363-2370.

Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, Di Fiore PP , Polo S (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**, 2760-2765.

Simons K , Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*. **387**, 569-572.

Simons K , Ikonen E (2000). How cells handle cholesterol. *Science*. **290**, 1721-1726.

Simons K , Toomre D (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **1**, 31-39.

Singer SJ , Nicolson GL (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. **175**, 720-731.

Singh AB , Harris RC (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*. **17**, 1183-1193.

Singh B, Schneider M, Knyazev P , Ullrich A (2009). UV-induced EGFR signal transactivation is dependent on proligand shedding by activated metalloproteases in skin cancer cell lines. *Int J Cancer*. **124**, 531-539.

Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL , Carraway KL, 3rd (1994). Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem*. **269**, 14661-14665.

Smart EJ, Ying Y, Donzell WC , Anderson RG (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem*. **271**, 29427-29435.

Soltoff SP, Carraway KL, 3rd, Prigent SA, Gullick WG , Cantley LC (1994). ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*. **14**, 3550-3558.

Song KS, Li S, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M , Lisanti MP (1996). Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem*. **271**, 9690-9697.

Sorkin A, Di Fiore PP , Carpenter G (1993). The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimerae is internalization impaired. *Oncogene*. **8**, 3021-3028.

Sorkin A , Goh LK (2008). Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res*. **314**, 3093-3106.

Sorkin A, Mazzotti M, Sorkina T, Scotto L , Beguinot L (1996). Epidermal growth factor receptor interaction with clathrin adaptors is mediated by the Tyr974-containing internalization motif. *J Biol Chem*. **271**, 13377-13384.

Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY , Dikic I (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*. **416**, 183-187.

Spiegel S (1985). Fluorescent derivatives of ganglioside GM1 function as receptors for cholera toxin. *Biochemistry*. **24**, 5947-5952.

Spiegel S, Kassis S, Wilchek M , Fishman PH (1984). Direct visualization of redistribution and capping of fluorescent gangliosides on lymphocytes. *J Cell Biol*. **99**, 1575-1581.

Srinivasan R, Poulsom R, Hurst HC , Gullick WJ (1998). Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumour types. *J Pathol*. **185**, 236-245.

Stankewich MC, Francis SA, Vu QU, Schneeberger EE , Lynch RD (1996). Alterations in cell cholesterol content modulate Ca(2+)-induced tight junction assembly by MDCK cells. *Lipids*. **31**, 817-828.

Stein RA , Staros JV (2000). Evolutionary analysis of the ErbB receptor and ligand families. *J Mol Evol*. **50**, 397-412.

Stoll SW, Johnson JL, Bhasin A, Johnston A, Gudjonsson JE, Rittie L , Elder JT (2009). Metalloproteinase-Mediated, Context-Dependent Function of Amphiregulin and HB-EGF in Human Keratinocytes and Skin. *J Invest Dermatol*.

Stover DR, Becker M, Liebetanz J , Lydon NB (1995). Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha. *J Biol Chem*. **270**, 15591-15597.

Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH , McGraw TE (1999). Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**, 6775-6780.

Swat A, Dolado I, Rojas JM , Nebreda AR (2009). Cell density-dependent inhibition of epidermal growth factor receptor signaling by p38alpha mitogen-activated protein kinase via Sprouty2 downregulation. *Mol Cell Biol*. **29**, 3332-3343.

Takada Y, Ye X , Simon S (2007). The integrins. *Genome Biol*. **8**, 215.

Tao RH , Maruyama IN (2008). All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *J Cell Sci*. **121**, 3207-3217.

Tebar F, Llado A , Enrich C (2002). Role of calmodulin in the modulation of the MAPK signalling pathway and the transactivation of epidermal growth factor receptor mediated by PKC. *FEBS Lett*. **517**, 206-210.

Theroux SJ, Taglienti-Sian C, Nair N, Countaway JL, Robinson HL , Davis RJ (1992). Increased oncogenic potential of ErbB is associated with the loss of a COOH-terminal domain serine phosphorylation site. *J Biol Chem*. **267**, 7967-7970.

Thiel KW , Carpenter G (2007). Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 19238-19243.

Thomas SM , Brugge JS (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **13**, 513-609.

Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC , et al. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*. **269**, 230-234.

Tsukita S , Furuse M (2002). Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol*. **14**, 531-536.

Vainio S, Jansen M, Koivusalo M, Rog T, Karttunen M, Vattulainen I , Ikonen E (2006). Significance of sterol structural specificity. Desmosterol cannot replace cholesterol in lipid rafts. *J Biol Chem*. **281**, 348-355.

Van de Vijver MJ, Kumar R , Mendelsohn J (1991). Ligand-induced activation of A431 cell epidermal growth factor receptors occurs primarily by an autocrine pathway that acts upon receptors on the surface rather than intracellularly. *J Biol Chem*. **266**, 7503-7508.

van der Goot FG , Harder T (2001). Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol*. **13**, 89-97.

Varani J, Hattori Y, Chi Y, Schmidt T, Perone P, Zeigler ME, Fader DJ , Johnson TM (2000). Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. *Br J Cancer*. **82**, 657-665.

Vecchi M, Baulida J , Carpenter G (1996). Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J Biol Chem*. **271**, 18989-18995.

Vecchi M , Carpenter G (1997). Constitutive proteolysis of the ErbB-4 receptor tyrosine kinase by a unique, sequential mechanism. *J Cell Biol*. **139**, 995-1003.

Vega QC, Cochet C, Filhol O, Chang CP, Rhee SG , Gill GN (1992). A site of tyrosine phosphorylation in the C terminus of the epidermal growth factor receptor is required to activate phospholipase C. *Mol Cell Biol*. **12**, 128-135.

Vergarajauregui S, San Miguel A , Puertollano R (2006). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase promotes epidermal growth factor receptor internalization. *Traffic*. **7**, 686-698.

Vidal GA, Naresh A, Marrero L , Jones FE (2005). Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ERBB4/HER4 activities. *J Biol Chem*. **280**, 19777-19783.

Vieira AV, Lamaze C , Schmid SL (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science*. **274**, 2086-2089.

Wan YS, Wang ZQ, Voorhees J , Fisher G (2001). EGF receptor crosstalks with cytokine receptors leading to the activation of c-Jun kinase in response to UV irradiation in human keratinocytes. *Cell Signal*. **13**, 139-144.

Wang HQ, Quan T, He T, Franke TF, Voorhees JJ , Fisher GJ (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**, 45737-45745.

Wang Q, Villeneuve G , Wang Z (2005). Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation. *EMBO Rep*. **6**, 942-948.

Wang XQ, Sun P , Paller AS (2002a). Ganglioside induces caveolin-1 redistribution and interaction with the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. **277**, 47028-47034.

Wang Y, Pennock S, Chen X , Wang Z (2002b). Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol Cell Biol*. **22**, 7279-7290.

Waterman H, Alroy I, Strano S, Seger R , Yarden Y (1999). The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing. *Embo J*. **18**, 3348-3358.

Waterman H, Katz M, Rubin C, Shtiegman K, Lavi S, Elson A, Jovin T , Yarden Y (2002). A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. *Embo J*. **21**, 303-313.

Waterman H, Sabanai I, Geiger B , Yarden Y (1998). Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem*. **273**, 13819-13827.

Watt FM (1984). Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis. *J Cell Biol*. **98**, 16-21.

Watt FM (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **353**, 831-837.

Watt FM (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *Embo J*. **21**, 3919-3926.

Westover EJ, Covey DF, Brockman HL, Brown RE , Pike LJ (2003). Cholesterol depletion results in site-specific increases in epidermal growth factor receptor phosphorylation due to membrane level effects. Studies with cholesterol enantiomers. *J Biol Chem*. **278**, 51125-51133.

Wierzbicka E, Tourani JM , Guillet G (2006). Improvement of psoriasis and cutaneous side-effects during tyrosine kinase inhibitor therapy for renal metastatic adenocarcinoma. A role for epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors in psoriasis? *Br J Dermatol*. **155**, 213-214.

Wiley HS (1988). Anomalous binding of epidermal growth factor to A431 cells is due to the effect of high receptor densities and a saturable endocytic system. *J Cell Biol*. **107**, 801-810.

Wiley HS (2003). Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res*. **284**, 78-88.

Wille JJ, Jr., Pittelkow MR, Shipley GD , Scott RE (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.

Winograd-Katz SE , Levitzki A (2006). Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38(MAPK) phosphorylation of the EGF receptor. *Oncogene*. **25**, 7381-7390.

Worthylake R, Opresko LK , Wiley HS (1999). ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem*. **274**, 8865-8874.

Xu Y, Voorhees JJ , Fisher GJ (2006). Epidermal growth factor receptor is a critical mediator of ultraviolet B irradiation-induced signal transduction in immortalized human keratinocyte HaCaT cells. *Am J Pathol*. **169**, 823-830.

Xue M , Jackson CJ (2008). Autocrine actions of matrix metalloproteinase (MMP)-2 counter the effects of MMP-9 to promote survival and prevent terminal differentiation of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. **128**, 2676-2685.

Yao Y, Hong S, Zhou H, Yuan T, Zeng R , Liao K (2009). The differential protein and lipid compositions of noncaveolar lipid microdomains and caveolae. *Cell Res*. **19**, 497-506.

Yarden Y , Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2**, 127-137.

Yarden Y , Ullrich A (1988). Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry*. **27**, 3113-3119.

Yu X, Sharma KD, Takahashi T, Iwamoto R , Mekada E (2002). Ligand-independent dimer formation of epidermal growth factor receptor (EGFR) is a step separable from ligand-induced EGFR signaling. *Mol Biol Cell*. **13**, 2547-2557.

Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM , Roop DR (1989). Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol*. **109**, 1207-1217.

Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA , Kuriyan J (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*. **125**, 1137-1149.

Zidovetzki R , Levitan I (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta*. **1768**, 1311-1324.

Zorzou MP, Stratigos A, Efstathiou E , Bamias A (2004). Exacerbation of psoriasis after treatment with an EGFR tyrosine kinase inhibitor. *Acta Derm Venereol*. **84**, 308-309.

Zwang Y , Yarden Y (2006). p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy. *Embo J*. **25**, 4195-4206.

Zwang Y , Yarden Y (2009). Systems biology of growth factor-induced receptor endocytosis. *Traffic*. **10**, 349-363.


I just read this great science fiction story
HEY! What time is it ?? My tv show is on !
WATTERSON