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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes épidermiques humains déplétés en cholestérol

AMEELS, Hélène

Award date:
2005

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

Faculté des Sciences

ETUDE DES RECEPTEURS DE LA FAMILLE DU RECEPTEUR DE L'EGF DANS DES KERATINOCYTES EPIDERMIQUES HUMAINS DEPLETES EN CHOLESTEROL

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Hélène AMEELS
Juin 2005

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Etude des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes épidermiques humains déplétés en cholestérol

AMEELS Hélène

Résumé

Le niveau de cholestérol a été proposé comme régulateur de certaines voies de signalisation au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques. Les « lipid rafts » jouent probablement un rôle important dans la signalisation cellulaire. L'extraction du cholestérol par la MβCD perturbe la structure des « lipid rafts » et la signalisation sous-jacente. Notre étude s'est concentrée sur l'activation et la signalisation des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF dans les kératinocytes épidermiques humains déplétés en cholestérol membranaire.

Une déplétion en cholestérol par la MβCD active les récepteurs HER1, HER2 (mais pas HER3) et les MAPK p38 et ERK. Un traitement par l'EGF, contrairement à un traitement par la MβCD, entraîne l'internalisation de HER1. Par contre, le récepteur HER2 semble passer d'une localisation intracellulaire à une localisation en membrane en fonction de la différenciation épidermique.

Des études complémentaires seront nécessaires pour encore mieux comprendre le rôle du cholestérol dans la signalisation des kératinocytes. En effet, il se pourrait que la signalisation et l'internalisation des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF soient deux phénomènes ne dépendant pas l'un de l'autre.

Mémoire de licence en Sciences biologiques
Juin 2005
Promoteur: Y. Poumay

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Professeur Yves Poumay de m'avoir si gentiment accueillie dans son laboratoire, de m'avoir guidée et conseillée avec une grande disponibilité tout au long de mon mémoire.

J'exprime toute ma gratitude à :

Françoise Herphelin pour ses conseils judicieux, sa gentillesse, sa patience ainsi que pour l'intérêt qu'elle m'a témoigné au cours de mon mémoire,

Emilie Bera pour son soutien, sa bonne humeur, son sourire permanent et pour les très agréables « pauses-midi »,

Raphaël Deom pour ses précieux conseils, son aide en matière de marquage immuno et pour son humour,

Conny pour ses connaissances lors de la première quinzaine de septembre et Virginie et Céline pour leur aide au labo.

J'exprime également mes remerciements à l'équipe d'Histologie-Embryologie, particulièrement à Monsieur Michel Hérin pour ses remarques pertinentes, à Madame Michèle Leclercq-Smekens pour ses conseils de qualité, à Madame Annie Degen pour son dynamisme et sa bonne humeur, à Daniel Van Vlaender pour ses encouragements et à Patrick Glesner pour son aide dans le domaine informatique.

Merci à Noëlle Ninane et Catherine Demazy pour les belles photos et leur sympathie.

Un grand merci à Marianne (grande « future » biologiste) pour son amitié, sa disponibilité et les moments de détente (bien utiles) passés ensemble durant ces quatre années d'études ainsi qu'à Maxime pour ses explications limpides et Lindsay pour les soirées au kot.

Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour mes parents et toute ma famille ainsi que pour toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidée et soutenue durant ces quatre années d'études passées aux Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix.

INTRODUCTION

1. La peau 1
1.1. Généralités 1
1.2. L'épiderme 2
1.2.1. Structure de l'épiderme 2
1.2.2. Le kératinocyte 3
1.2.3. Les modèles de culture des kératinocytes épidermiques humains 3
2. Les compartiments de prolifération et de différenciation de l'épiderme 4
2.1. Prolifération des kératinocytes 4
2.2. Différenciation épidermique terminale 5
3. Les récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille des HER dans l'épiderme 5
3.1. Le récepteur de l'EGF ou HER1 6
3.2. Le récepteur HER2 6
3.3. Le récepteur HER3 7
3.4. Le récepteur HER4 7
3.5. Les récepteurs HER et la différenciation épidermique 7
4. Les ligands des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF 8
4.1. Les ligands épidermiques de HER1 9
4.2. Les facteurs de croissance de la famille de l'HRG 9
5. Signalisation des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF 10
5.1. Liaison du ligand et oligomérisation 10
5.2. Transphosphorylation et propagation du signal 10
5.3. Internalisation des récepteurs et dégradation 11
6. Intervention des MAPK 11
6.1. ERK1/2 12
6.2. JNK 12
6.3. p38 12
7. Le cholestérol 13
7.1. Généralités 13
7.2. Importance du cholestérol 13
7.2.1. Le cholestérol membranaire 14
7.2.2. Les « lipid rafts » 14
7.3. Activation des récepteurs HER sans intervention d'un ligand 15
7.4. Effets d'une extraction de cholestérol membranaire dans des 15
8. Objectifs 16

MATERIEL et METHODES

1. Culture des kératinocytes épidermiques humains 18
1.1. Cultures primaires à partir de prélèvements 18
1.2. Cultures secondaires 19
1.3. Cultures tertiaires 20
2. Traitement des kératinocytes 20
2.1. Déplétion en cholestérol des kératinocytes 20
2.2. Traitement des kératinocytes par l'EGF 21
2.3. Traitement des kératinocytes par l'HRG 21
3. Analyse de l'expression génique par Northern blot 21
3.1. Préparation des oligo-dT cellulose 22

3.2. Extraction des ARNm 22
3.3. Northern blot proprement dit 23
3.4. Révélation par hybridation avec des sondes d'ADNc marquées au 24
4. Analyse des protéines par Western blot 26
5. Marquage en immunofluorescence 27

RESULTATS

1. Présentation du modèle des kératinocytes humains en culture autocrine 29
1.1. Analyse morphologique en microscopie à contraste de phase 29
1.2. Analyse de l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation 29
1.3. Analyse de l'expression des récepteurs HER1, HER2 et HER3. 30
2. Etude de l'activation des HER et des MAPK induite par une déplétion en cholestérol membranaire 31
2.1. Effet de la déplétion en cholestérol et de l'EGF sur la morphologie du kératinocyte en culture confluente 31
2.2. Effet de la déplétion en cholestérol et de l'EGF sur l'activation des HER et des MAPK 31
2.2.1. Etude de l'activation des HER dans les kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire 32
2.2.2. Etude de l'activation des MAPK dans les kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire 33
2.2.3. Etude des HER dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire pendant 18 heures 34
2.2.3.1. Etude de l'expression au niveau ARN 34
2.2.3.1.1. Etude de l'expression des récepteurs HER1, HER2 et HER3 34
2.2.3.1.2. Etude de l'expression des marqueurs de prolifération et de différenciation 34
2.2.3.2. Etude de l'activation des HER et des MAPK 35
2.2.3.2.1. Etude de l'activation des HER dans les kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire pendant 18 heures 35
2.2.3.2.2. Etude de l'activation des MAPK dans les kératinocytes déplétés en cholestérol 35
3. Visualisation de l'influence des différents traitements sur la localisation des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF 36
3.1. Etude de la localisation cellulaire du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire 36
3.1.1. Localisation cellulaire de la forme totale et phosphorylée du récepteur de l'EGF . 36
3.1.2. Localisation du récepteur de l'EGF au sein des « lipid rafts » 37
3.1.3. Localisation du récepteur de l'EGF au sein des lysosomes 38
3.2. Etude de la localisation cellulaire de HER2 dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire 39
3.3. Etude de la localisation cellulaire de HER3 dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire 41
3.3.1. Localisation cellulaire de la forme totale du récepteur HER3 41

DISCUSSION et PERSPECTIVES

1. Le cholestérol et la physiologie des kératinocytes 42
1.1. Rôles éventuels de l'activation du récepteur de l'EGF induite par une déplétion en cholestérol 42
1.2. L'activation de p38 suite à une déplétion en cholestérol 42
1.3. Implication éventuelle du cholestérol au niveau de la localisation du récepteur de l'EGF 43
1.4. Implication éventuelle du cholestérol au niveau de la localisation du récepteur HER2 et localisation du récepteur HER2 au cours de la différenciation 44
1.5. Implication éventuelle du cholestérol dans le psoriasis 44
1.6. Mécanisme d'activation des récepteurs sans ligands 44
1.7. Conclusions et perspectives 45

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire
APS: ammonium persulfate
AR: amphiréguline
ARNm: acide ribonucléique messager
ATP: adénosine tri-phosphate
BPE: Bovine Pituitary Extract
BSA: Bovine Serum Albumin
DAG: 1,2-diacylglycérol
DEPC: diéthyl pyrocarbonate
dFCS: dialized Fetal Calf Serum
DLU: Digital Light Unit
DMSO: diméthylsulfoxide
DTT: DL-Dithiothréitol
EDTA: Ethylène Diamine Tétracétique
EGF: Epidermal Growth Factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EPSK: Epithélium pavimenteux stratifié kératinisé
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
GAP: GTPase-activating protein
GPI: Glycosylphosphatidylinositol
HB-EGF: Heparin-Binding-Epidermal Growth Factor
HDL: High Density Lipoproteins
hEGF: human Epidermal Growth Factor
HER: Human Epidermal Growth Factor Receptor
HIV: Human Immunodeficiency Virus
HKGS: Human Keratinocyte Growth Supplement
HMG-CoA: Hydroxyméthyl-coenzyme A
HRG: Heréguline
HRP: Horse Radish Peroxidase
hsp: heat shock protein
IP3: inositol-(1,4,5)-triphosphate
JNK: c-Jun-NH_2-terminal Kinases
LDL: Low Density Lipoproteins
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MβCD: méthyl-β-cyclodextrine
MOPS: -3-(N morpholino)-propane sulfonic acid
NAK: Normal Abdominal Keratinocytes
NDF: Neu Differentiation Factor
NRG: Neureguline
HRP: Horse Radish Perosxidase
kb: kilobases
KBM: Keratinocyte Basal Medium
kDa: kiloDalton
KGM: Keratinocyte Growth Medium
Lamp: Lysosome-associated membrane protein
PBS: Phosphate Buffer Saline
PFA: Paraformaldéhyde
PI3K: Phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2: phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate
PKC: Protéine Kinase C
PLCγ:Phospholipase Cγ
PVDF: PolyVinylDifluoride
SAPK: Stress-Activated Protein Kinases
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SH2: Src Homology 2
SH3: Src Homology 3
SSC: Saline Sodium Citrate
SV40: Simian Virus 40
TEMED: N,N,N,N Tetraméthyléthylènediamine
TGFα: TransformingGrowth Factor α
UV: Ultra violet
VLDL: Very Low Density Lipoproteins

INTRODUCTION

1. La peau

1.1. Généralités

La peau, représentant environ 6% du poids corporel et recouvrant une superficie de 1,7 à 2 m^2 chez l'adulte, constitue un des organes les plus volumineux du corps humain. Cet organe est exposé en première ligne aux agressions (mécaniques, chimiques, rayonnement ultraviolet, etc.) en provenance du milieu extérieur. La peau possède une résistance à l'étirement considérable. Elle varie par son épaisseur, sa couleur et la présence ou non de poils, glandes et ongles en fonction des différentes régions du corps et de leurs besoins physiologiques respectifs.

Elle se divise en trois parties, l'épiderme, le derme et l'hypoderme, qui sont communes à tous les types de peau (figure 1.1.):

L'**épiderme**, la couche épithéliale en contact avec l'environnement extérieur, se compose majoritairement de kératinocytes jointifs disposés en strates superposées. Ceux-ci s'organisent superficiellement en couche cornée qui donne à la peau de la dureté et la protège contre la déshydratation. Les kératinocytes subissent un programme de différenciation complexe durant lequel les cellules migrent de la lame basale vers la surface. Les cellules de la couche basale ont en effet la capacité de se diviser activement afin de combler les pertes de cellules mortes causées par les frottements ou autres phénomènes. Le tissu épidermique est ainsi entièrement renouvelé tous les 25 à 50 jours.

Le **derme**, d'épaisseur variable, est une couche intermédiaire de tissu conjonctif fibro-élastique synthétisé par les fibroblastes. Cette couche est essentielle car elle soutient l'épiderme et confère à la peau sa résistance et son élasticité. Le derme contient des annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées, glandes sudoripares), des vaisseaux sanguins (permettant de nourrir la peau et jouant un rôle dans le contrôle de la température du corps) et des nerfs (donnant une sensibilité à la peau).

L'**hypoderme** ou **tissu sous-cutané** est la couche la plus profonde et se caractérise par la présence de nombreux lobules adipeux séparés les uns des autres par des travées conjonctives. Les adipocytes, riches en triglycérides et en acides gras, interviennent dans le stockage énergétique sous forme de graisse. En outre, l'hypoderme assure une protection thermique (isolant) et mécanique (amortisseur).

Par sa morphologie, la peau est capable d'assurer quatre fonctions bien précises :

- établir une **barrière de protection** entre l'organisme et des agents traumatiques externes et contre les pertes de fluides corporels tout en permettant certains échanges entre le milieu extérieur et le milieu intérieur;

- établir une **sensibilité tactile** (chaleur, pression, douleur) par la présence de terminaisons nerveuses libres ou encapsulées;

- permettre la **thermorégulation** de l'organisme via les lobules adipeux qui, à faible température, agissent comme isolant thermique et comme réserve énergétique ou via les sécrétions des glandes sudoripares qui, à température élevée, permettent de refroidir la peau par transpiration et surtout via le contrôle de la circulation sanguine sous épidermique grâce à des anastomoses artério-veineuses;

- participer au **métabolisme,** notamment par la synthèse de la vitamine D au niveau de l'épiderme et au stockage énergétique sous forme de triglycérides stockés dans l'hypoderme.

1.2. L'épiderme

L'épiderme recouvrant la majorité de la surface extérieure du corps est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (EPSK). Son principal type cellulaire est le kératinocyte mais d'autres types cellulaires sont également présents dans ce tissu : les mélanocytes (responsables de la pigmentation de la peau et garantissant la photoprotection du tissu épidermique), les cellules de Langerhans (actives au niveau du système immunitaire) et les cellules de Merckel (associées à des terminaisons nerveuses).

L'épiderme est classé en deux types différents en fonction de son épaisseur et de la morphologie de la couche cornée : les épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (EPSK) de type A ou B.
Aux endroits de forte friction (paume des mains, plante des pieds), on trouve un épithélium caractérisé par une couche cornée beaucoup plus épaisse permettant une meilleure résistance et appelé épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (EPSK) de type A.
L'épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (EPSK) de type B constitue la majorité de la surface corporelle. Son épaisseur varie entre 75 et 150 µm ; il se caractérise par une couche cornée mince.

1.2.1. Structure de l'épiderme

L'épiderme s'organise en quatre couches morphologiquement différentes (figure 1.2.) dues à la différenciation permanente que subissent les kératinocytes au cours de leur migration de la profondeur de l'épiderme vers la couche externe :

- la **couche basale** (stratum basale) repose sur la jonction épidermo-dermique ; elle est formée d'une assise de cellules cubiques ou cylindriques présentant des radicelles au niveau de leur pôle basal augmentant l'ancrage de l'épiderme au derme. Les cellules souches de la couche basale garantissent le renouvellement continu de l'épiderme grâce à leur potentiel de division illimité. Ces cellules souches, suite à leurs mitoses, peuvent donner naissance à d'autres cellules souches pour ainsi assurer le renouvellement du compartiment souche ou produire des cellules amplificatrices transitoires caractérisées par un potentiel de multiplication rapide mais limité. Celles-ci donnent alors naissance à des cellules post-mitotiques qui quittent la couche basale et entament leur processus de différenciation épidermique.

- la **couche épineuse** ou **couche malpighienne** (stratum spinosum) contient environ trois à cinq assises de cellules polyédriques caractérisées par une adhérence

intercellulaire importante via les desmosomes. L'abondance de ces jonctions intercellulaires produit une morphologie en épine des contours cellulaires d'où le nom de couche épineuse. Les kératinocytes de cette couche possèdent encore des organelles fonctionnelles et les filaments intermédiaires de kératines se groupent en faisceaux denses.

- la **couche granuleuse** (stratum granulosum) est composée d'une à trois couches de cellules aplaties. Cette couche doit son nom à la présence, au niveau du cytoplasme des cellules, de grains de kératohyaline visibles en microscopie photonique. Les cellules de cette couche se caractérisent également par la présence de vésicules remplies de glycolipides et de phospholipides, les corps d'Odland ou corps lamellaires qui vont imperméabiliser l'espace intercellulaire. Lors de l'ascension vers la couche cornée, les cellules s'aplatissent, le noyau devient pycnotique et les organites cellulaires sont progressivement détruits.

- la **couche cornée** (stratum corneum) varie en épaisseur selon les régions du corps et est composée de kératinocytes morts appelés cornéocytes. Ceux-ci sont complètement aplatis, dépourvus de noyau et d'organites, et possèdent un cytosquelette robuste dû à l'organisation en réseau dense des filaments intermédiaire de kératine formant une barrière fonctionnelle entre l'organisme et son environnement. En effet, les filaments de kératines sont agrégés dans le cytosoplasme par la filaggrine issue des grains de kératohyaline. De plus, diverses protéines, synthétisées par les cellules des couches épineuses et granuleuses sous-jacentes, comme la loricrine et l'involucrine se conjugent les unes aux autres. Des modifications au niveau de la face cytoplasmique de la membrane des kératinocytes apparaissent donc et permettent la formation de l'enveloppe cornée qui procure un emballage résistant à chaque kératinocyte de cette couche. A la surface du tissu, les cornéocytes perdent leurs liaisons intercellulaires et se détachent progressivement donnant lieu au phénomène de desquamation.

L'épiderme est donc un tissu dynamique dont l'épaisseur idéale est maintenue grâce à un équilibre entre la prolifération des kératinocytes de la couche basale et la desquamation des cornéocytes de la couche cornée.

1.2.2. Le kératinocyte

Le kératinocyte est à la base de la formation de la barrière cutanée. Il produit notamment des protéines fibreuses, les kératines, appartenant à la famille des filaments intermédiaires. Ces protéines cytosquelettiques sont composées de deux classes : les kératines acides et les kératines basiques. L'expression des différentes kératines varie suivant l'état de différenciation des kératinocytes. Selon la classification de Moll et al. (1982), les cellules de la couche basale expriment majoritairement les kératines 5 et 14 alors que les cellules des couches suprabasales expriment les kératines 1 et 10 (figure 1.2.). Les kératines 5 et 14 constituent donc des marqueurs de cellules pas ou peu différenciées, tandis que les kératines 1 et 10 sont des marqueurs de cellules en différenciation (Poumay et Pittelkow, 1995).

1.2.3. Les modèles de culture des kératinocytes épidermiques humains

Afin d'étudier les caractéristiques des kératinocytes, différentes techniques de culture in vitro ont été mises au point :

En 1975, Rheinwald et Green utilisent une couche nourricière de fibroblastes 3T3 de souris bloqué par la mitomycine et un milieu de culture contenant 10% de sérum de veau fœtal et divers facteurs de croissance tels que l'insuline et l'Epidermal Growth Factor (EGF). Dans ces conditions, après adhésion au substrat, les kératinocytes ensemencés sur ce lit nourricier se multiplient, formant ainsi des colonies de plus en plus grandes refoulant à la périphérie les fibroblastes qui sont peu à peu éliminés. Ce modèle de culture possède cependant deux désavantages : premièrement, les kératinocyes se stratifient mais l'épithélium obtenu ainsi en immersion n'exprime pas les marqueurs de cellules en différenciation que sont les kératines 1 et 10 et il montre une expression précoce de l'involucrine; secondement, il est impossible de déterminer la composition exacte du milieu de culture étant donné que les fibroblastes produisent à des concentrations inconnues toute une série de facteurs de croissance mal identifiés et que la composition du sérum est complexe et éventuellement variable.

Huit ans plus tard, Boyce et Ham ont développé un milieu de culture sans sérum, le MCDB 153. Ce milieu contient 0,1 mM de calcium ce qui permet aux kératinocytes de proliférer sans la présence d'une couche nourricière de fibroblastes (Boyce et Ham, 1983). Cependant, pour garantir la croissance des kératinocytes, un apport en EGF, insuline et extrait pituitaire bovin est encore nécessaire, ce qui apporte une autre inconnue dans la composition du milieu de culture.

En 1991, Cook et al. démontrent que lorsque les cellules atteignent une densité suffisante (environ 40 à 50% de la superficie de culture) l'apport de facteurs exogènes comme l'EGF ou le TGFα (Transforming Growth Factor α) n'est plus nécessaire pour la prolifération des kératinocytes épidermiques. Les cellules acquièrent une autonomie de croissance grâce à la synthèse endogène d'amphiréguline (AR), un facteur de croissance capable de se lier au récepteur de l'EGF (EGFR ou HER1) et de l'activer. Les avantages de ce modèle sont que, grâce au passage en culture autocrine, la composition du milieu de culture peut être contrôlée et que les cellules peuvent suivre un processus de différenciation proche de celui des kératinocytes in vivo (Poumay et Pittelkow, 1995).

2. Les compartiments de prolifération et de différenciation de l'épiderme

De manière générale, la différenciation épidermique peut être décrite comme un processus où chaque cellule de la couche basale donne naissance à deux cellules filles, dont l'une est apte à se diviser de nouveau, et l'autre s'engage dans le processus de différenciation terminale, dont l'étape ultime est le cornéocyte.

2.1. Prolifération des kératinocytes

L'activité mitotique intensive des kératinocytes de la couche basale est stimulée par des facteurs de croissance. Ceux-ci se lient à leurs récepteurs membranaires respectifs et enclenchent toute une série de cascades de transduction du signal aboutissant à l'expression de gènes cibles favorisant la prolifération, la différenciation ou d'autres réponses cellulaires.

Par exemple, la liaison du facteur de croissance EGF au récepteur de l'EGF (EGFR) favorise la prolifération ainsi que la migration des kératinocytes (Chen et al., 1993). Le récepteur de l'EGF peut également être activé par d'autres facteurs de croissance, dont le TGFα (Transforming groth factor α) et l'amphiréguline.

2.2. Différenciation épidermique terminale

Le processus de différenciation des kératinocytes se déroule dès la première couche suprabasale de l'épiderme et est irréversible.
Une fois dans la couche épineuse, les kératinocytes amplificateurs transitoires expriment les kératines 1 et 10, mais plus les kératines 5 et 14 (figure 1.2.).
Lors de la transition vers la couche granuleuse, on observe une entrée massive d'ions calcium. Ceux-ci activent toute une série de processus catalytiques détruisant la plupart des organelles cellulaires et favorisent également l'expression de la loricrine, de l'involucrine, de la filaggrine et de la transglutaminase 1 (figure 1.2.).
Les nombreux grains de kératohyaline présents dans la couche granuleuse contiennent la profilaggrine, le précurseur de la filaggrine dont le rôle est de permettre l'agrégation des filaments de kératine en macrofibres entraînant ainsi une réorganisation du cytosquelette des kératinocytes.
On retrouve également dans les cellules granuleuses des vésicules d'origine golgienne, les corps d'Odland ou corps lamellaires. Ceux-ci contribuent à l'élaboration d'une matrice lipidique autour des cornéocytes qui assurent la fonction de barrière de la peau.

Le résultat final de la différenciation épidermique est un kératinocyte mort, le cornéocyte, qui paraît bien adapté à remplir sa fonction barrière. En effet, les cornéocytes sont munis d'une excellente cohésion grâce à des desmosomes.

3. Les récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille des HER dans l'épiderme

Les récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF sont des glycoprotéines transmembranaires à activité tyrosine kinase. Cette famille est composée de quatre membres (HER1, HER2, HER3 et HER4 pour « Human Epidermal Growth Factor Receptor ») qui ont des poids moléculaires proches et une structure primaire similaire composée de différents domaines (figure 1.3.):

- un domaine extracellulaire composé de deux régions riches en cystéines définissant une zone de liaison au facteur de croissance (le ligand),
- un domaine transmembranaire hydrophobe permettant l'ancrage du récepteur dans la membrane,
- un domaine intracellulaire comprenant d'une part, une région à activité tyrosine kinase hautement conservée et, d'autre part, une extrémité carboxy-terminale possédant des sites de phosphorylation sur résidus tyrosine. Les tyrosines

phosphorylées serviront de sites d'ancrage pour des protéines à domaines SH_2 (Src homology domain).

La liaison de ce type de récepteur avec un ligand entraîne la formation d'homo- ou d'hétérodimères qui stimulent la région tyrosine kinase et permettent ainsi le contrôle d'un large répertoire de processus cellulaires distincts.
La liaison du ligand induit également, d'une part, la migration de EGFR des « lipid rafts » et cavéoles vers d'autres régions des membranes plasmiques, et d'autre part, l'assemblage des récepteurs au niveau des puits tapissés de clathrine qui seront ensuite internalisés.

L'analyse des évènements dépendant du récepteur de l'EGF est complexe non seulement à cause de la présence de multiples ligands qui peuvent lier un ou plusieurs récepteur(s) de la famille du récepteur de l'EGF (figure 1.4.) mais aussi à cause de la capacité qu'a le récepteur de l'EGF à s'associer avec d'autres membres de cette famille.

3.1. Le récepteur de l'EGF ou HER1

Le récepteur de l'EGF a été le premier membre de la famille des récepteurs de l'EGF à être identifié. Son gène est appelé c-erbB1 en raison de sa similitude avec l'oncogène v-erbB du virus de l'érythroblastose aviaire.
Dans les tissus humains, le récepteur encodé par ce gène est appelé HER1 pour Human EGF Receptor-1. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa.
Le récepteur de l'EGF est impliqué dans des pathologies de la peau. En effet, ce récepteur a été identifié comme un proto-oncogène et il est soupçonné avoir un rôle dans des cancers de la peau.

3.2. Le récepteur HER2

Le proto-oncogène erbB-2 appartient au patrimoine génétique de toute cellule normale, et code une protéine transmembranaire, la protéine HER2.
Identifié tout d'abord chez le rat comme un oncogène associé au développement de neuroblastomes induits chimiquement par l'éthylnitrosourée, ce gène a pendant longtemps été appelé « neu » (Bargmann et al., 1986).

Ce récepteur possède une grande homologie (42%) avec le récepteur de l'EGF (EGFR ou HER1) d'où son appellation officielle HER2.
Le récepteur HER2 est donc une glycoprotéine transmembranaire de 1255 acides aminés et d'un poids moléculaire de 185 kDa (d'où son autre appellation de protéine p185).
Il est également nommé « récepteur orphelin » car il ne possède pas de ligand connu (figure 1.4.). La transduction du signal par HER2 est possible grâce à son hétérodimérisation avec d'autres récepteurs HER. HER2 peut donc, en coopération avec le récepteur de l'EGF, induire la signalisation et jouer un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire épidermique.
Cependant, malgré l'absence de ligand, il semble que HER2 soit le partenaire privilégié pour la formation d'hétérodimères (Graus-Porta et al., 1997) et qu'il s'associe préférentiellement avec HER3 (Citri et al., 2003).

Le récepteur HER2 est une protéine ubiquiste s'exprimant dans toutes les cellules épithéliales de l'organisme et jouant un rôle déterminant dans la transduction des signaux de prolifération et de différenciation cellulaires.
Chez l'humain, HER2 est fréquemment surexprimé dans certains cancers du sein et des ovaires dont le pronostic est défavorable. Un anticorps humanisé bloquant HER2 a été développé pour être utilisé en thérapie anti-cancéreuse : Herceptin (Hommelgaard et al., 2004).

3.3. Le récepteur HER3

HER3, le produit du gène c-erbB3, fut découvert plus tardivement et présente une grande homologie avec les autres membres de la famille de l'EGFR (81% pour HER1 et 83% pour HER2) (Kraus et al., 1989). Il s'agit en effet d'une glycoprotéine transmembranaire de 180 kDa. Son domaine cytoplasmique a une activité tyrosine kinase réduite en raison de la substitution en position 838 d'une aspartate au lieu d'une asparagine (Guy et al, 1994). Cependant, HER3 reste un partenaire d'hétérodimérisation important grâce à ses nombreux sites d'ancrage pour des protéines de la transduction du signal comme par exemple PI3K.

3.4. Le récepteur HER4

Le récepteur HER4, produit du gène c-erbB4, a un poids moléculaire de 180 kDa et possède des domaines hautement homologues avec les trois autres récepteurs précédemment identifiés (Carpenter, 2003). Il est exprimé dans de nombreux tissus humains embryonnaires et adultes (système nerveux central et périphérique) et dans des lignées cellulaires dérivant de cancers mammaires, mais il n'est pas exprimé par les kératinocytes épidermiques (De Potter et al, 2001).

3.5. Les récepteurs HER et la différenciation épidermique

In vivo, on remarque une expression plus importante pour HER1 au niveau de la couche basale de l'épiderme comparativement aux autres couches (De Potter et al., 2001; Piepkorn et al., 2003).
En ce qui concerne les récepteurs HER2 et HER3, leur expression semble être plus importante au niveau des couches épineuses supérieures et granuleuses de l'épiderme (De Potter et al., 2001). Les cellules basales, quant à elles, sont peu ou pas marquées, suggérant que l'expression de HER2 augmente avec la différenciation. HER2 est localisé dans le cytoplasme des kératinocytes de la couche basale, mais présente une localisation membranaire dans les couches suprabasales (Stoll et al., 2001). De plus, en condition de culture autocrine, les kératinocytes augmentent l'expression de HER2 et de HER3 dès le début de la différenciation (De Potter et al., 2001).

4. Les ligands des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF

De manière générale, les facteurs de croissance sont des protéines de poids moléculaire peu élevé (6-30 kDa) qui contrôlent la croissance cellulaire (par leur effet mitogène) et la différenciation cellulaire. Ils sont synthétisés par de nombreux tissus et peuvent agir selon trois modes d'action :

- le **mode endocrine** où le facteur, sécrété au préalable par un tissu, est transporté par la voie sanguine vers un autre tissu ou une cellule cible,

- le **mode paracrine** qui consiste en l'action d'un facteur synthétisé au sein d'un tissu sur des cellules voisines d'un type différent,

- le **mode autocrine** où le facteur, synthétisé par un type cellulaire, agit sur ce même type cellulaire.

Les facteurs de croissance des récepteurs HER sont synthétisés sous forme de précurseurs transmembranaires inactifs dont une portion extracellulaire est clivée (figure 1.5.) donnant ainsi naissance à une protéine mature soluble (Massagué, 1990).
Celle-ci s'avère être une protéine généralement composée de deux domaines : un **domaine de haute affinité**, composé d'un ou de plusieurs domaine(s) EGF - like, permettant la liaison du ligand à son récepteur spécifique et un **domaine de faible affinité** rendant possible le recrutement du récepteur secondaire (Tzahar et al., 1997).
De façon simpliste, pour agir, le facteur de croissance doit se lier à son récepteur membranaire spécifique et activer ensuite une cascade d'événements intracellulaires.

Les facteurs de croissance qui agissent sur les récepteurs de la famille HER peuvent être classés en deux familles (Harris et al., 2003) :

- les **facteurs de croissance de la famille de l'EGF proprement dit** dont l'EGF lui-même, le TGF-α, l'amphiréguline ou le HB-EGF (heparin-binding EGF-like).

- les **facteurs de croissance de la famille de l'HRG** (héréguline ou neuréguline)

Cette classification est fonction de leur affinité pour les différents membres des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF.
Ainsi, les facteurs de croissance de la famille de l'EGF proprement dit montrent une forte affinité pour le récepteur de l'EGF, alors que les facteurs de croissance de la famille de l'HRG partagent une affinité uniquement pour les récepteurs HER3 et HER4 (Falls, 2003).
L'affinité et la spécificité respectives des multiples ligands envers les différents HER entraînent un large répertoire de signalisation.

4.1. Les ligands épidermiques de HER1

L'**EGF** est le nom donné par Stanley Cohen au début des années soixantes à un polypeptide synthétisé sous forme d'un précurseur transmembranaire glycosylé, le pro-EGF, possédant un poids moléculaire de 128 kDa (Mroczkowski et al., 1989).
Il peut être divisé en trois régions (figure 1.5.):

- une séquence extracellulaire (contenant huit unités EGF-like) qui donnera, après clivage, la forme mature du facteur de croissance,
- une séquence hydrophobe permettant l'ancrage en membrane,
- une queue cytoplasmique C-terminale

L'EGF possède une influence directe sur la prolifération et la différenciation des cellules épidermiques mais cependant n'est pas produit au niveau de la peau.
Dans des cultures de kératinocytes humains, la croissance cellulaire autocrine (Cook et al., 1991) requiert l'occupation du récepteur de l'EGF (Pittelkow et al., 1993).
L'expression d'un autre facteur de croissance est détectée dans l'épiderme, le **TGFα** (Marquardt et al., 1983 ; Salomon et al., 1990). Il est synthétisé sous forme d'un précurseur transmembranaire (figure 1.5.) de 160 kDa, et est ensuite clivé, phosphorylé et glycosylé pour donner naissance à des formes actives de 5 à 20 kDa de poids moléculaire.
Ce facteur de croissance présente une structure et une fonction quasi semblables à celles de l'EGF et peut donc activer le récepteur de l'EGF.

L'**amphiréguline** (AR) et l'**heparin-binding EGF-like** (HB-EGF) sont exprimés dans l'épiderme et sont également capables d'activer HER1.
L'amphiréguline est également synthétisée sous forme d'un précurseur transmembranaire (figure 1.5.) glycosylé subissant un clivage protéolytique donnant un facteur soluble (Shoyab et al., 1988 ; Shoyab et al., 1989)
L'heparin-binding EGF-like, également de structure très semblable aux autres membres de la famille (figure 1.5.), entre en compétition avec l'EGF pour la liaison avec son récepteur (Higashiyama et al., 1991).

4.2. Les facteurs de croissance de la famille de l'HRG

L'Heréguline a été découverte comme une molécule capable de stimuler l'activité tyrosine kinase de HER2 (Peles et al., 1993 ; Tzahar et al., 1994). Ce sont des glycoprotéines synthétisées sous forme de précurseurs transmembranaires (figure 1.5.) et composées de différents domaines (un domaine extracytoplasmique, un domaine EGF-like, un domaine Spacer, une région hydrophobe et une queue cytoplasmique hydrophile). Plusieurs isoformes ont été identifiées : elles résultent de splicing alternatif des produits de transcription d'un gène commun. Tzahar et al. ont également découvert la liaison de l'HRG aux récepteurs HER3 (et HER4).

5. Signalisation des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF

En plus de leur structure commune, les récepteurs à activité tyrosine kinase, quelle que soit la famille à laquelle ils appartiennent, partagent un mécanisme d'activation des voies de signalisation assez semblable.

5.1. Liaison du ligand et oligomérisation

En ce qui concerne les récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF, on les retrouve en tant que monomères inactifs au niveau de la membrane. Suite à la liaison d'un ligand, le récepteur subit une **dimérisation** ou une **oligomérisation** avec d'autres récepteurs HER dont l'identité est fonction de la nature du ligand (figure 1.6.) (Schlessinger, 2000 ; Schlessinger, 2002).

5.2. Transphosphorylation et propagation du signal

Cette homo- ou hétérodimérisation entraîne un changement de conformation du dimère qui induit l'activation des domaines tyrosine kinase et la **transphosphorylation** au niveau de résidus tyrosines présents dans l'extrémité carboxy-terminale des récepteurs (figure 1.6.).
Dans cette conformation active, le récepteur déclenche différentes **voies de signalisation** en aval.
En effet, la phosphorylation du récepteur a deux effets (Schlessinger, 2000):
premièrement, la transphosphorylation du récepteur active son domaine tyrosine kinase permettant la phosphorylation sur des résidus tyrosines appartenant à d'autres molécules de la transduction du signal ;
deuxièmement, les tyrosines phosphorylées serviront de points d'ancrage pour différentes molécules cytoplasmiques à domaines SH_2 (Src homology domain 2) jouant un rôle dans la transduction du signal. Il s'agit entre autres, par exemple, de la phospholipase Cγ (PLCγ), de la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), de la molécule adaptatrice Grb2 et de la GTPase-activating protein (GAP) (figure 1.7.).

Ces protéines à domaines SH_2 sont ensuite phosphorylées, activées et envoient des signaux vers différentes voies.

Le résultat final de cette activation des récepteurs à activité tyrosine kinase est l'initiation de nombreux processus cellulaires contrôlés notamment par la cascade des Raf/Ras/Map kinases (MAPK) qui, en passant par la phosphorylation de extracellular signal-regulated kinases 1 et 2 (ERK1/2), aboutit à l'activation des facteurs de transcription c-fos et c-jun intervenant notamment dans le contrôle de la prolifération cellulaire (figure 1.8.) (Chang et al., 2003).
La cascade de signalisation qui démarre par la liaison de la protéine PI3K au récepteur permet le recrutement de la kinase Akt afin de favoriser la survie cellulaire (Wang et al.,2003).
La protéine de signalisation PLCγ peut également se lier au récepteur suite à son activation. Cette protéine hydrolyse le phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate (PIP2) donnant d'une part l'1,2-diacylglycérol (DAG) dans la membrane plasmique, et libérant d'autres part l'inositol-(1,4,5)-triphosphate (IP3) dans le cytoplasme. Le DAG active la protéine kinase C (PKC)

alors que l'IP3 stimule la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique (figure 1.7.) (Schlessinger, 2000 ; Schlessinger, 2002).

5.3. Internalisation des récepteurs et dégradation

La liaison de l'EGF à son récepteur induit rapidement l'agrégation de ce complexe ligand-récepteur au niveau des puits recouverts de clathrine (coated-pits) suivie par l'internalisation en vésicules recouvertes, puis soit un recyclage en membrane, soit une dégradation lysosomale (figure 1.8.).
Lorsque la vésicule recouverte est internalisée, elle perd sa couverture de clathrine et déverse son contenu dans un endosome. Cet endosome va maturer par l'action de pompes à protons ATP-dépendantes dont le rôle est d'acidifier progressivement le contenu de la vésicule. L'endosome mature va fusionner avec une vésicule d'origine golgienne contenant des hydrolases acides. La vésicule devient alors un endolysosome dont le pH acide permet l'activation des hydrolases (Wiley, 2003).
Le taux d'internalisation et la voie intracellulaire empruntée varient en fonction des récepteurs impliqués dans la formation des dimères. De fait, HER1 est rapidement endocyté, alors que HER2 et HER3 ne le sont que lentement (Wiley, 2003).
Le choix d'un recyclage ou d'une dégradation semble fonction de la résistance du complexe ligand-récepteur en milieu acide. Le récepteur HER1 n'est pas recyclé par exemple (Levkowitz et al., 1998).

6. Intervention des MAPK

Les voies de signalisation intracellulaire importantes impliquent souvent des MAPK (mitogen-activated protein kinases) qui sont bien connues dans la régulation de divers mécanismes cellulaires. Les MAPK interviennent au niveau de la prolifération, de la différenciation, de l'apoptose et de la réponse au stress (Kyriakis et al., 2001).
Il existe au moins trois voies de transduction du signal impliquant des MAPK différentes :

- les ERK (extracellular signal-regulated kinases),
- les JNK (c-jun NH_2-terminal kinases),
- les p38 kinases.

De façon générale, un groupe de trois kinases forme la base de la voie des MAPK. Une MAPK/ERK kinase kinase (MAPKKK ou MEKK) active une MAPK/ERK kinase (MEK ou MAPKK) qui active à son tour une MAPK (figure 1.9.).
Une partie des ces MAPK actives pénètre dans le noyau où elles phosphorylent certains facteurs de transcription comme p53, c-Myc,…qui induisent la transcription de gènes cibles.

La complexité des MAPK est surtout due au fait qu'elles peuvent être activées par une multitude de stimuli (activation des récepteurs membranaires, choc osmotique, radiations UV,…). De plus, le nombre de combinaisons possibles entre les différentes MEKK, MEK et

MAPK est important et enfin, les différents membres d'une cascade peuvent interagir avec les membres d'autres cascades.

6.1. ERK1/2

Il existe à l'heure actuelle deux formes de MAPK ERK dont ERK1 (42 kDa) et ERK2 (44 kDa).
Dans les kératinocytes, les protéines ERK1/2 peuvent être activées par l'activation des récepteurs HER. En effet, après la dimérisation (ou l'oligomérisation) et la transphosphorylation des ces récepteurs, la protéine Grb2 se lie aux résidus tyrosines phosphorylés. Cette protéine recrute alors une protéine Sos qui favorise la liaison de la protéine Ras à la membrane plasmique. Cette dernière recrute la protéine Raf, qui, dès sa liaison à Ras, va induire la phosphorylation d'une MEKK qui va phosphoryler une MEK. Celle-ci va phosphoryler ERK1/2 et induire leur translocation dans le noyau cellulaire. Là, elles vont phosphoryler différents facteurs de transcription qui entraîneront la transcription de gènes cibles permettant la prolifération des kératinocytes, ou favorisant la survie cellulaire (figure 1.9.).

6.2. JNK

Les Jun kinase (JNK) également appelées c-Jun NH_2-terminal kinase sont composées de trois membres JNK1, JNK2 et JNK3. Ils sont activés par une double phosphorylation sur des résidus tyrosine et thréonine. Ces MAPK se retrouvent principalement dans les neurones et peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose.
Dans les kératinocytes humains, des études ont montré que les UV induisent une activation des JNK « médiée » par l'activation de récepteurs en surface cellulaire (Wang et al., 2005).

6.3. p38

Les MAPK p38 également appelées stress-activated protein kinases (SAPK) sont principalement connues pour leur activation en condition de stress cellulaire (irradiation aux rayons UVB, incubation en conditions hyperosmotiques) mais elles contribuent aussi à d'autres réponses cellulaires comme la croissance, la prolifération et la mort cellulaire (Ono et Han, 2000).

A l'heure actuelle, quatre isoformes des MAPK p38 ont été découvertes: p38α, p38β, p38γ (absente dans l'épiderme) et p38δ. Toutes présentent une homologie de séquence d'acides aminés d'au moins 60%.

De manière comparable aux ERK, les MAPK p38 font partie de cascades de transduction du signal où l'on retrouve en amont des MEKK et des MEK. L'activation de p38 conduit par la suite à la transcription de gènes cibles dont les produits, par exemple les protéines hsp27 et hsp70 (heat shock protein), jouent un rôle dans les réactions des cellules, les kératinocytes particulièrement, face au stress (Garmyn et al., 2001).

7. Le cholestérol

7.1. Généralités

Les lipides biologiques sont des composés chimiquement hétérogènes regroupés en fonction de leur caractère hydrophobe commun. Ces lipides peuvent être classés en trois catégories : les triglycérides servant de réserve énergétique, les phospholipides, constituants majeurs des membranes et les stéroïdes dont le cholestérol.

Le cholestérol est une molécule amphiphile formée d'un squelette carboné (partie hydrophobe) et d'un groupement -OH (partie hydrophile) (figure 1.10.).
Le cholestérol joue un rôle fondamental dans la structure, la fluidité des membranes cellulaires mais également dans la production de nombreuses hormones (comme par exemple les hormones sexuelles), dans la constitution des sels biliaires (qui sont nécessaires à la digestion des lipides) et dans la synthèse de la vitamine D_3 au niveau de la peau sous l'influence des rayons UV du soleil.

Environ 70% du cholestérol est endogène, il est fabriqué par l'organisme surtout au niveau du foie. Le reste du cholestérol est apporté de manière exogène par l'alimentation mais uniquement par des produits d'origine animale (charcuteries, jaunes d'œufs, fromages, viandes,…). Le cholestérol est transporté dans le sang par de grosses protéines appelées lipoprotéines. Les deux types principaux de lipoprotéines chargées de cholestérol sont les Low Density Lipoproteins (LDL) et les High Density Lipoproteins (HDL).

- Les **LDL** (d'abord sous forme de VLDL) transportent le cholestérol du foie aux organes. Quand le cholestérol est en excès, il s'accumule dans les parois des vaisseaux sanguins et devient dangereux pour l'organisme (risque de maladies cardiovasculaires, développement de la maladie d'Alzheimer). On parle dans ce cas de « mauvais cholestérol ».

- Les **HDL** par contre transportent le cholestérol en sens inverse et empêchent la fixation de celui-ci dans les tissus et les parois des vaisseaux sanguins. On parle donc ici de « bon cholestérol ».

L'épiderme étant non vascularisé, les kératinocytes doivent synthétiser le cholestérol par leurs propres moyens.

7.2. Importance du cholestérol

Le cholestérol est un composant essentiel de la membrane cellulaire où il a un rôle structural (implication dans la fluidité des membranes, insertion polarisée au sein de la membrane plasmique,…) mais également de nombreuses implications fonctionnelles. Il est donc très important de maintenir l'homéostasie du cholestérol.
De plus, le cholestérol jouerait un rôle important en ce qui concerne la modulation de l'activité des récepteurs de l'EGF. En effet, Pike et Casey ont montré dans une de leurs études que le niveau de cholestérol module la signalisation « médiée » par le récepteur de l'EGF en altérant la fonction de ce récepteur et son traffic cellulaire (Pike et Casey, 2002).

Le rôle du cholestérol au sein de la signalisation cellulaire évoque également la notion importante de « lipid rafts ». En effet, le cholestérol jouerait un rôle critique dans l'assemblage des microdomaines membranaires tels que les « lipid rafts » et les cavéoles. Il s'agit de sous-domaines possédant des propriétés physicochimiques différentes (comparativement à la membrane plasmique) et qui se retrouvent au sein de la membrane plasmique et dans d'autres membranes intracellulaires (Pike, 2003).

7.2.1. Le cholestérol membranaire

La membrane plasmique possède une composition en lipides différente des membranes intracellulaires. En effet, au niveau de la membrane plasmique, on retrouve une proportion plus élevée en sphingolipides et en cholestérol. La membrane plasmique se caractérise également par une distribution asymétrique des lipides entre le feuillet externe et le feuillet interne.
Le cholestérol est un lipide membranaire qui régule la flexibilité et la stabilité mécanique des bicouches. Le cholestérol s'incorpore dans la membrane plasmique avec une polarité spécifique. Le groupement hydroxyl du cholestérol est orienté dans la membrane de façon à ce qu'il interagisse avec l'eau se trouvant aussi bien à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur.

7.2.2. Les « lipid rafts »

Les « lipid rafts » sont des microdomaines membranaires riches en protéines à ancres GPI (glycosylphosphatidylinositol) et caractérisés par une teneur élevée en cholestérol et en sphingolipides au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique (figure 1.11.). Ces microdomaines possèdent de plus une affinité particulière pour plusieurs protéines de signalisation (Rajendran et Simons, 2005).

Etant donné leur petite taille, ces sous-domaines sont difficilement visualisables. Cependant, ils peuvent constituer une fraction relativement grande de la membrane plasmique (Pike, 2003). La sous-unité B de la toxine cholérique (CT-B) couplée à une molécule fluorescente permet un marquage des « lipid rafts » en amas. Cette sous-unité non toxique se lie au ganglioside GM1, un glycosphingolipide associé principalement aux « lipid rafts ». Une sous-unité CT-B lie cinq glycosphingolipides GM1 et provoque de cette manière un clustering des « lipid rafts » (Rajendran and Simons, 2005 ; Bang et al., 2005).

Ces « lipid rafts » présentent une résistance aux détergents non ioniques. Cette caractéristique est notamment utilisée pour définir et isoler ces microdomaines (Pike, 2003 ; Simons and Toomre, 2000).
Des études suggèrent que tous les « lipid rafts » ne sont pas identiques au niveau de leur contenu soit en terme de lipides, soit en terme de protéines.
Les « lipid rafts » ont une implication dans le triage et la distribution des lipides et protéines à la surface cellulaire où ils jouent un rôle important dans la transduction du signal. En effet, la localisation de certaines protéines de signalisation, dont les HER, au sein des « lipid rafts » influence leur activité. C'est pourquoi on parle également des « lipid rafts » comme étant des plateformes de signalisation (Nagy et al., 2002 ; Simons et Toomre, 2000).
Les « lipid rafts » peuvent également jouer un rôle dans le bourgeonnement de certains virus (influenza, HIV) et dans l'endocytose médiée par clathrine (Rajendran et Simons, 2005) (figure 1.12.).

Les cavéoles forment une sous-classe des « lipid rafts » que l'on retrouve sous la forme d'invaginations membranaires stables. Ces structures ne contiennent pas de protéines à ancre GPI mais sont riches en cavéolines. Ces protéines lient le cholestérol et forment des structures en « hairpin » au sein de la bicouche (figure 1.13) (Pike, 2003 ; Simons et Ikonen, 2000).
La structure des cavéoles dépend également du cholestérol. En effet, une extraction du cholestérol entraîne une disparition des cavéoles.
Les cavéoles peuvent jouer un rôle important dans la locomotion et l'adhésion des cellules « médiées » par les intégrines. Les cavéoles peuvent également servir de porte d'entrée dans la cellule pour des virus non enveloppés comme le virus SV40 (Rajendran et Simons, 2005).

7.3. Activation des récepteurs HER sans intervention d'un ligand

Comme le suggèrent plusieurs articles, les activités tyrosine kinases du récepteur de l'EGF et de HER2 peuvent être modulées par certains lipides, dont le cholestérol, au niveau de la membrane plasmique des cellules de mammifères (Chen et Resh, 2002 ; Pike et Casey, 2002).
Les rôles physiologiques du cholestérol au niveau de la membrane plasmique peuvent être étudiés par un traitement des cellules en culture à la méthyl-β-cyclodextrine (MβCD). Il s'agit d'un polysaccharide cyclique (figure 1.14) capable d'extraire le cholestérol des membranes et donc capable de produire des informations sur les conséquences d'une déplétion en cholestérol. Ce polysaccharide entraîne également une désorganisation des « lipid rafts ».
Dans plusieurs types cellulaires, un traitement à la MβCD active le récepteur de l'EGF (Chen et Resh, 2002 ; Pike et Casey, 2002) et affecte aussi l'activité de HER2 (Nagy et al., 2002). Il semble que cette activation du récepteur de l'EGF et celle de HER2 observées lors d'un traitement à la MβCD soit liée à la destruction des « lipid rafs».

7.4. Effets d'une extraction de cholestérol membranaire dans des kératinocytes épidermiques

Le cholestérol étant considéré comme l'agent dynamique de l'intégrité des « lipid rafts », il est possible de détruire la structure de ces microdomaines lipidiques en traitant les cellules avec des substances telles que la méthyl-β-cyclodextrine, la filipine, la saponine, qui retirent ou complexent le cholestérol membranaire. La méthyl-β-cyclodextrine (MβCD) est un polysaccharide cyclique composé de sept résidus glucose reliés par des liaisons glycosidiques α-1,4 et portant un nombre variable de groupements méthyls (figure 1.14.). Ce composé est soluble dans l'eau et est capable de capturer, avec une grande spécificité, le cholestérol dans la cavité centrale hydrophobe qu'il forme.
En extrayant le cholestérol, un traitement des cellules à la MβCD désorganise la structure des « lipid rafts » et des cavéoles.
Cependant, pour une analyse de cellules déplétées en cholestérol pendant plusieurs heures, l'incubation des kératinocytes en présence de MβCD (7,5 mM, 1h) n'est pas suffisante pour obtenir une déplétion durable du cholestérol (Jans et al., 2004) vu la grande capacité de synthèse de cholestérol du kératinocyte (figure 1.15.b) (Ponec et al., 1983). Il est donc nécessaire après la MβCD d'utiliser la lovastatine (figure 1.16.), une statine inhibant l'enzyme clef de la synthèse du cholestérol, l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, pour maintenir une déplétion durable du cholestérol membranaire des kératinocytes. La figure 1.15.c. (Jans 2004) montre que seuls les kératinocytes incubés en

présence de MβCD puis de lovastatine exhibent un très faible marquage du cholestérol de la membrane plasmique des kératinocytes.

Une étude menée par Chen et Resh démontre qu'une déplétion en cholestérol par la MβCD induit l'activation des ERK via la voie dépendant de la PI3K (Chen et Resh, 2001). Une autre de leurs études a également montré que la MβCD entraînait la dimérisation, l'activation et l'autophosphorylation du récepteur de l'EGF (Chen et Resh, 2002 ; Pike et Casey, 2002). Ensuite, au moins deux voies de signalisation sont activées : la phosphorylation et le recrutement de SHC qui entraîne la cascade Ras/Raf/MEK/MAPK et l'activation de PI3K, menant également à l'activation des MAPK via un mécanisme encore inconnu (Chen et Resh, 2002).
Ces études suggèrent donc une activation de EGFR, indépendante de la présence d'un ligand étant donné l'activation de EGFR par la MβCD en l'absence d'EGF exogène

Un test de perméabilité membranaire basé sur la libération de l'enzyme cytoplasmique adénylate kinase a permis de montrer qu'une extraction du cholestérol membranaire de courte durée par la méthyl-β-cyclodextrine (MβCD 7,5 mM pendant 1h) suivie d'un traitement par la lovastatine (10µM pendant 17h) provoque une légère cytotoxicité (Jans et al., 2004). En effet, ce traitement semble augmenter légèrement la perméabilité de la membrane plasmique des kératinocytes pour l'adénylate kinase.

8. Objectifs

L'épiderme est formé majoritairement de kératinocytes qui prolifèrent au niveau de la couche basale et se différencient ensuite dans les couches suprabasales. Cette différenciation aboutit à la formation de la couche cornée qui joue, au niveau de l'épiderme, le rôle important de barrière. Toute perturbation au niveau de ces mécanismes de régulation peut induire l'apparition de pathologies telles que le psoriasis (pathologie hyperprolifératives) ou l'ichtyose (perturbation du processus de desquamation). Il y a donc un grand intérêt à comprendre les mécanismes qui assurent l'homéostasie de l'épiderme.
Plusieurs études ont démontré que le cholestérol, au niveau des « lipid rafts », avait une influence sur l'activité des protéines de signalisation telles que les récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF (Pike et Casey, 2002). Puisque l'activation de ces récepteurs contrôle la physiologie du kératinocyte épidermique, nous allons nous y intéresser et les étudier dans ces cellules après extraction du cholestérol.

Dans le cadre de notre laboratoire qui cherche à comprendre l'importance et l'implication du cholestérol dans les mécanismes qui contrôlent l'homéostasie de l'épiderme, notre travail a pour objectifs de localiser et d'analyser l'activité des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF (et des MAPK (p38 et ERK1/2)) lors d'un traitement de kératinocytes épidermiques humains par la MβCD. Deux types de traitement seront étudiés :

- un traitement court d'une heure à la MβCD afin d'analyser les phénomènes précoces se déroulant au sein des cellules ;

- un traitement long de 18 heures MβCD/lovastatine (1 heure à la MβCD suivie de 17 heures à la lovastatine) dans le but de laisser aux cellules le temps de réagir et d'analyser ainsi les phénomènes plus lents.

Parallèlement, à l'aide de la microscopie confocale, ce travail va tenter de localiser ces récepteurs dans les kératinocytes non traités ou traités à la MβCD (1h) et les comparer avec des kératinocytes traités avec les facteurs de croissance (1h). Nous rechercherons si l'activation de ces récepteurs s'accompagne de leur internalisation.

Tout cela permettra d'analyser les conséquences d'une déplétion en cholestérol par la MβCD sur l'activation et le traffic des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF.

MATERIEL et METHODES

1. Culture des kératinocytes épidermiques humains

Matériel

Milieu complet KGM-2 (Keratinocyte Growth Medium)
KBM-2 (Keratinocyte Basal Medium, Clonetics)
+ suppléments:
- BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0,2%
- hEGF (human Epidermal Growth Factor) 0,2 ng/ml
- Insuline 5µg/ml
- Hydrocortisone 5 x 10^{-7} M
- Epinéphrine
- Transferrine 5 µg/ml

+ Streptomycine 50 µg/ml
+ Pénicilline G 50 unités/ml

Milieu complet EpiLife® +
EpiLife Medium® (Cascade)
+ HKGS (Human Keratinocyte Growth Supplement) :
- BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0,2%
- hEGF (human Epidermal Growth Factor) 0,2 ng/ml
- Insuline 5µg/ml
- Hydrocortisone 5 x 10^{-7} M
- Transferrine 5 µg/ml

+ Streptomycine 50 µg/ml
+ Pénicilline G 50 unités/ml

Milieu autocrine EpiLife® -
EpiLife Medium® (Cascade)
+ suppléments :
- L-histidine 2,4 x 10^{-4} M
- L-isoleucine 7,5 x 10^{-4} M
- L-méthionine 9 x 10^{-4} M
- L-phénylalanine 9 x 10^{-4} M
- L-tryptophane 4,5 x 10^{-4} M
- L-tyrosine 7,5 x 10^{-4} M
- Hydrocortisone 5 x 10^{-7} M
- Streptomycine 50 µg/ml
- Pénicilline G 50 unités/ml

Solution A
- Glucose 10 mM
- KCl 3 mM
- NaCl 130 mM
- Na_2HPO_4 1 mM
- Rouge phénol 0,0033 mM
- HEPES 30 mM
- pH 7,4
- Stérilisation par filtration sur Stérivex-GV 0,22 µm

Trypsine T17
- Solution A
- Trypsine à 0,17%

Trypsine T25
- Solution A
- Trypsine à 0,025%
- Ethylène Diamine Tétracétique (EDTA) 0,01%

Solution dFCS 2% (solution bloquante)
- Solution A
- Sérum de veau fœtal dialysé à 2% (dialyzed fetal calf serum, dFCS)

Milieu de congélation
- Milieu Complet EpiLife® + à 80%
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10%
- dFCS à 10%

Méthodes

1.1. Cultures primaires à partir de prélèvements

Les abdominoplasties réalisées à la Clinique Saint-Luc à Bouge par le docteur B. Bienfait fournissent le matériel pour les cultures primaires de kératinocytes épidermiques humains. Immédiatement après l'intervention chirurgicale, la couche de peau superficielle (derme et épiderme) est prélevée grâce à un dermatome et est conservée, jusqu'à son arrivée au laboratoire, dans du liquide physiologique. Les kératinocytes contenus dans le prélèvement de peau sont isolés sous des hottes à flux laminaire vertical et constituent le point de départ pour l'établissement d'une souche NAK (Normal Abdominal Keratinocytes).

Les morceaux de peau sont coupés à l'aide de bistouris stériles en petits bouts d'environ 1 cm^2. Ceux-ci sont étalés, pendant une nuit à 4°C, avec la face dermique sur de la trypsine de pancréas bovin 0,17% (T17) contenant 0,25 µg/ml de fungizone et 50 µg/ml de gentamycine.
Le lendemain, l'épiderme est détaché du derme et les morceaux d'épiderme sont étalés sur du milieu complet KGM-2 contenant 2% de sérum de veau fœtal dialysé (dFCS) permettant de neutraliser l'activité de la trypsine. Etant donné que les milieux utilisés par la suite contiennent une concentration précise de Ca^{++}, il est nécessaire travailler avec du sérum de veau foetal dialysé afin de ne pas perturber la concentration de départ des milieux. Les cellules sont séparées les unes des autres via des passages successifs dans une pipette. Ensuite, cette suspension cellulaire est filtrée (Cell Strainer 70 µm Nylon stérile, Falcon) afin de ne laisser passer que les cellules isolées et donc d'éliminer les agrégats cellulaires et les cornéocytes. Le filtrat est ensuite centrifugé à 4°C, à 1000 rpm et pendant 10 minutes. Une fois la centrifugation terminée, le culot contenant les cellules épidermiques est resuspendu dans du milieu de culture KGM-2. Les kératinocytes sont alors ensemencés à une densité de 46000 cellules par cm^2 dans des boîtes de culture T175. La concentration en calcium du milieu KGM-2 et l'ajout de 0,1% de dFCS facilitent l'adhérence des kératinocytes au substrat. De plus, ce milieu de culture comporte tous les facteurs de croissance et hormones nécessaires à une prolifération intense des kératinocytes. L'incubation des cultures se réalise dans une étuve humide à 37°C où l'atmosphère contient 5% de CO_2. Le premier changement de milieu est réalisé trois jours plus tard, ensuite le milieu est renouvelé tous les 2 jours.

1.2. Cultures secondaires

Suite à la culture primaire, les kératinocytes sont passés en culture secondaire dont le but est une amplification importante du nombre de cellules. Il est nécessaire que la culture primaire n'atteigne pas le stade de confluence avant le premier passage afin de garantir que les cellules gardent leur pouvoir prolifératif et n'entrent pas encore en différenciation. Pendant leur phase de prolifération intense, les cellules sont donc détachées de leur support grâce à une solution de trypsine (T25).
Etant donné que les kératinocytes ont comme caractéristique d'adhérer fortement au substrat, il est possible de les isoler des autres types cellulaires éventuellement présents dans la culture primaire. Pour cela, une trypsinisation de courte durée (5 minutes) est tout d'abord réalisée. Celle-ci provoque un détachement des fibroblastes et des autres types cellulaires alors que les kératinocytes sont toujours accrochés à leur substrat. L'aspiration de la solution de trypsine après 5 minutes permet donc d'éliminer les cellules contaminantes et une trypsinisation de plus longue durée permet alors de détacher et de récupérer les kératinocytes. Ceux-ci sont récoltés dans la solution A contenant 2% de dFCS, puis immédiatement centrifugés à 1000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu et les cellules sont comptées et ensemencées à faible densité. L'ensemencement secondaire se fait dans du milieu de culture complet EpiLife® + qui favorise la prolifération cellulaire, notamment en raison de sa faible teneur en calcium (0,06 mM).
Afin d'obtenir un nombre important de kératinocytes non différenciés, ceux-ci sont congelés dès qu'ils sont en phase de prolifération intense sans avoir atteint le stade de la confluence. Comme précédemment, les kératinocytes sont trypsinisés, centrifugés, resuspendus dans du milieu complet et comptés. Le milieu de congélation, constitué de milieu de culture complet (60%), de DMSO (20%) et de dFCS (20%), est ajouté à la suspension cellulaire. Ce mélange est distribué dans des cryotubes (NUNC) de 1,5 ml, qui sont immédiatement congelés pendant une nuit à -80°C. Ensuite, pour leur conservation à long terme, les cryotubes sont transférés dans l'azote liquide à -180°C.

1.3. Cultures tertiaires

Les cryotubes contenant un nombre de kératinocytes suffisant pour réaliser l'expérience prévue sont sortis de l'azote liquide avec précaution et placés dans un bain à 37°C afin de dégeler rapidement leur contenu. Une fois dégelées, le contenu de chaque cryotube est rassemblé dans un seul tube qui est rapidement placé sur glace. Un comptage est ensuite réalisé et les cellules sont ensemencées à une densité entre 7000 et 12000 cellules par cm^2 dans du milieu de culture complet KGM-2 favorisant l'attachement au support.
Le lendemain, ce milieu est remplacé par du milieu EpiLife® +. Par la suite, le milieu de culture est changé tous les 2 jours.
Dès que les cellules occupent environ 60% de la superficie de la boîte, les cellules sont rincées deux fois avec de la solution A (afin d'éliminer les facteurs de croissance exogènes) et du milieu autocrine EpiLife® - (ne contenant plus aucun facteur de croissance) est ajouté. Les kératinocytes sont à ce stade capables de produire eux-mêmes leurs propres facteurs de croissance et donc de stimuler leur prolifération. Le milieu autocrine est également changé tous les 2 jours jusqu'à ce que les cellules atteignent le stade désiré.

2. Traitement des kératinocytes

2.1. Déplétion en cholestérol des kératinocytes

Les cultures tertiaires de kératinocytes sont cultivées jusqu'au stade de la confluence cellulaire. Comme précisé précédemment, deux types de traitement ont été appliqués dans le but d'extraire le cholestérol des membranes cellulaires.
Pour le traitement d'une heure, la méthyl-β-cyclodextrine (7,5 mM MβCD, Sigma) est dissoute extemporanément dans le milieu autocrine EpiLife® -. La solution subit ensuite une étape de filtration à travers un filtre de 0,2 µm (Millex GP, Millipore) permettant de la stériliser. Une fois stérilisée, la solution de MβCD vient remplacer le milieu de culture. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant 1 heure. Une fois ce laps de temps écoulé, les cellules sont rincées deux fois avec de la solution A stérile et les boîtes de culture sont, soit congelées à -80°C pour être analysées plus tard, soit analysées immédiatement.
Pour le traitement de 18 heures, on procède au départ de la même façon que pour le premier type de traitement (jusqu'à l'étape d'incubation d'une heure avec la MβCD comprise). Une fois l'heure d'incubation terminée, les cultures incubées en présence de MβCD sont rincées deux fois avec de la solution A stérile avant d'être incubées pendant 17 heures à 37°C en présence d'EpiLife® - contenant 10µM de lovastatine (Mevinolin ou Lovastatine, Sigma). Cette substance permet d'inhiber la synthèse endogène du cholestérol. En effet, il s'agit d'un inhibiteur de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, une enzyme clef dans la synthèse du cholestérol. Etant donné que la solution stock de lovastatine est dissoute dans du DMSO (Diméthylsulfoxyde), nous ajoutons la même concentration de DMSO aux cellules contrôles. Après l'incubation de 17 heures, ces cultures sont rincées deux fois avec la solution A et peuvent ensuite, soit être congelées à -80°C, soit être analysées tout de suite.

2.2. Traitement des kératinocytes par l'EGF

Des cultures tertiaires de kératinocytes sont cultivées jusqu'au stade de la confluence. La solution stock d'EGF (Epidermal Growth Factor) est de 50 µg par ml de PBS contenant 0,1% de BSA (bovine serum albumin). Pour le traitement appliqué, une concentration de 10 ng d'EGF par ml de milieu autocrine est utilisée. Après soit 1 heure, soit 18 heures de traitement, les cellules sont rincées deux fois à la solution A et les boîtes de culture sont congelées ou analysées immédiatement.

2.3. Traitement des kératinocytes par l'HRG

Des cultures tertiaires de kératinocytes sont cultivées jusqu'au stade de la confluence. La solution stock d'HRG (héréguline) est de 50 µg par ml de PBS contenant 0,1% de BSA. Pour le traitement appliqué, une concentration de 100 ng d'HRG par ml de milieu autocrine est utilisée. Après 30 minutes, les cellules sont rincées deux fois à la solution A et les boîtes de culture sont, soit congelées à -80°C, soit analysées immédiatement.

3. Analyse de l'expression génique par Northern blot

Afin d'éviter la dégradation des ARN messagers (ARNm) par les ARNases présentes dans l'environnement, il est nécessaire de porter des gants et de travailler avec des solutions et du matériel traités par le DEPC (diéthyl pyrocarbonate).

Matériel

H_2O traitée DEPC
- 500 ml H_2O
- traité avec 0,1% DEPC et autoclavé

Tampon riche en sels (High Salt Buffer)
- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,5 M
- EDTA 0,001 M
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,2%
- traité avec 0,1% DEPC et autoclavé

Tampon pauvre en sels (Low Salt Buffer)
- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,1 M
- EDTA 0,001 M
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,2%
- traité avec 0,1% DEPC et autoclavé

Tampon sans sels (No Salt Buffer)
- Tris-HCl 0,005 M
- EDTA 0,001 M
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,2%
- traité avec 0,1% DEPC et autoclavé

Tampon de lyse
- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,1 M
- EDTA 0,0002 M
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 1%
- traité avec 0,1% DEPC et autoclavé

Tampon TE
- Tris base 9 mM
- EDTA-$2H_2O$ 0,9 mM
- pH 8
- avant utilisation, ajouter 1 µg/ml de protéinase K (Sigma)

Méthodes

3.1. Préparation des oligo-dT cellulose

Des oligo-dT monobrins couplés à de la cellulose sont utilisés afin d'isoler les ARNm des autres types d'ARN (ARN de transfert, ARN ribosomiaux). Ces oligo-dT s'hybrident, en conditions salines élevées, à la queue poly-A qui caractérise la majorité des ARNm. Un oligo-dT consiste en une chaîne de 30 nucléotides de déoxythymine couplée de manière covalente à la cellulose par son extrémité 5'-phosphate (Oligo(dT)cellulose, Invitrogen). Les oligo-dT doivent absolument subir, avant utilisation, un traitement DEPC afin de ne pas dégrader les ARN poly-A. Pour cela, deux rinçages avec du NaOH 0,1M suivis d'une centrifugation (1200 rpm pendant 1 minute) sont réalisés dans le but d'éliminer les fines particules de cellulose en suspension. Ensuite un lavage avec de l'eau ultra-pure également suivi d'une centrifugation est effectué. Au culot ainsi obtenu est ajouté de l'eau distillée contenant 0,1% de DEPC. Le tout est placé sous agitation pendant 30 minutes. Après, trois lavages sont réalisés avec de l'H_2O traitée par le DEPC suivis d'un lavage au « High Salt Buffer ». Une centrifugation est effectuée et 2 ml de « High Salt Buffer » sont ajoutés au culot à raison d'une concentration de 0,025g ou 0,050g d'oligo-dT par boîte de culture T75 ou T175 respectivement. La suspension d'oligo-dT obtenue peut se conserver pendant deux semaines maximum à 4°C.

3.2. Extraction des ARNm

Immédiatement après avoir retiré le milieu de culture, les cellules sont lysées grâce à un tampon de lyse (cf. Matériel) auquel sont ajoutés 25 µg/ml de protéinase K (Roche). Il s'agit d'une protéase non spécifique permettant d'inactiver les ARNases et ADNases. Le lysat cellulaire, de nature visqueuse à cause de l'ADN, est récolté et passé à travers une seringue stérile munie d'une aiguille 21G (Braun) également stérile afin de liquéfier le tout. Le lysat cellulaire est ensuite ajusté à une concentration de 75 µg/ml de protéinase K et le tout est incubé pendant 30 minutes à 37°C. Cette incubation à cette température permet à l'enzyme d'avoir une activité optimale. Une concentration élevée en sels étant nécessaire pour fixer les oligo-dT sur les queues poly-A, la concentration en NaCl est ajustée à 0,5 M à l'aide d'une solution de NaCl 5 M. Les oligo-dT cellulose, préparés précédemment, peuvent donc être ajoutés. Afin que l'hybriation entre les oligo-dT et les queues poly-A des ARNm puisse s'effectuer correctement, les échantillons sont placés sur un plateau basculant à température ambiante pendant toute la nuit.
Une centrifugation à 1200 rpm pendant 1 minute est ensuite réalisée dans le but de rassembler les complexes oligo-dT/ARNm dans le fond du tube. Le culot est ensuite lavé avec du High Salt Buffer pour être finalement resuspendu dans ce même tampon. La solution est déposée sur une colonne contenant un filtre en silice (poly-prep chromatography column, Bio-Rad) qui permet de retenir la cellulose où se trouve également les oligo-dT couplés aux ARNm. Deux lavages avec le High Salt Buffer suivis d'un lavage avec le Low Salt Buffer (contenant de la protéinase K) sont ensuite effectués. Ce dernier lavage permet de décrocher les molécules éventuelles fixées aux oligo-dT de manière non spécifique. Vient enfin, afin de récolter les ARNm seuls, un lavage avec du No Salt Buffer chauffé à 55°C contenant également de la protéinase K. En effet, un tampon sans sels à température élevée est nécessaire pour déshybrider les ARNm des oligo-dT et permettre ainsi l'écoulement et donc la récolte des ARNm seuls. A cette récolte d'ARN, du NaCl 5 M (afin de réajuster la concentration en sels à

0,5 M) et de l'éthanol froid 95% sont ajoutés et le tout est placé à -20°C. Ces conditions permettront aux ARNm de précipiter durant la nuit.
Le lendemain, des centrifugations successives de 15 minutes à 12000 rpm sont réalisées afin de concentrer les ARNm. Afin d'éliminer l'éthanol, le culot d'ARNm est séché et resuspendu ensuite dans du tampon TE. Le tout est incubé sur glace pendant 30 minutes. Les mesures de l'absorbance à 260 nm, de la concentration en ARN et du ratio des longueurs d'onde 280 nm et 260 nm s'effectuent grâce à un spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro, Amersham). La concentration en ARNm est déterminée par l'absorbance de l'échantillon et le ratio (qui doit idéalement être proche de 2) révèle une éventuelle contamination par des protéines. A l'aide de ces mesures, le volume d'échantillons à prélever, afin de charger une même quantité d'ARNm sur le gel d'agarose, est calculé. Les échantillons d'ARNm concentrés sont stockés à -80°C.

3.3. Northern blot proprement dit

Matériel

MOPS 10x
- 3-(Nmorpholino)-propane sulfonic acid (MOPS) 0,2 M (Sigma)
- Acétate de sodium 50 mM
- EDTA 10 mM

Solution tamponée
- MOPS 0,2 M
- Acétate de sodium trihydraté 50 mM
- EDTA 10 mM
- pH 7

Gel d'électrophorèse
- Agarose pure à 1,2% (Gibco-BRL) dans de l'H_2O DEPC traitée
- MOPS 1x
- Formaldéhyde 6,5%

Formamide désionisée
Désionisation par incubation de 1g de Mixed Bed Resin (AG-501-X8 (D), Bio-Rad) avec 100 ml de formamide (Merck) pendant 3-4 heures suivie d'une filtration

Sample Buffer
- Formamide désionisée
- Formaldéhyde à 6,5%
- MOPS 1x

Tampon d'électrophorèse
- MOPS 1x
- Formaldéhyde 3,3%

20 x SSC (Saline Sodium Citrate)
- NaCl 2,9 M
- Citrate de sodium 0,29 M

Etalon ARN (RNA Ladder 0,24-9,5 kb, Gibco-BRL)

Sample loading Buffer
- glycérol 50%
- Na_2 EDTA 1 mM
- Xylene Cyanol 0,4%
- Bromophenol blue 0,4%

Méthode

Le volume exact d'échantillons d'ARNm prélevé, afin d'avoir une même quantité d'ARNm dans chacun des puits du gel, est tout d'abord séché au speedvac. Ensuite, les culots sont chacun resuspendus dans 20 µl de « Sample Buffer » et chauffés 15 minutes à 65°C. Cette étape permet de détruire les structures secondaires des ARNm grâce à l'agent dénaturant présent dans le « Sample Buffer » : la formaldéhyde. Après cette première incubation, les échantillons sont vortexés et subissent une seconde incubation de 20 minutes à la même température. Une fois l'incubation terminée, les échantillons sont immédiatement placés sur glace afin d'éviter tout réappariement. Enfin, 2 µl de « Sample loading Buffer » sont ajoutés à chaque échantillon.

Avant le chargement des échantillons sur le gel d'agarose, il est nécessaire de polariser celui-ci à 75 Volts et pendant environ 10 minutes. Ensuite, une fois les échantillons déposés, ils subissent une migration de 3 heures à 75 Volts en présence du tampon d'électrophorèse. Cette migration permet de séparer les ARNm en fonction de leurs tailles. Une fois la migration terminée et afin d'oter la formaldéhyde du gel, celui-ci subit trois rinçages de 10 minutes dans de l'eau désionisée. Après la réalisation de cette étape, les ARNm sont transférés durant toute la nuit sur une membrane en nylon (Zeta-Probe, BioRad) grâce au système « TurboBlotter » (Schleicher and Schuell).
Le lendemain, les ARNm sont fixés de manière covalente à la membrane par une exposition aux UV représentant une énergie de 150 joules/cm^2. La membrane peut, une fois la fixation réalisée, soit être conservée dans du papier filtre, soit être hybridée par une sonde d'ADNc marquée radioactivement.

3.4. Révélation par hybridation avec des sondes d'ADNc marquées au ^{32}p

Matériel

Solution d'hybridation
- Na_2HPO_4 0,12 M
- NaCl 0,25 M
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 7%
- Formamide désionisée 50%
- pH 7,2

20 x SSC
- NaCl 2,9 M
- Citrate de sodium 0,29 M
- pH 7

Solution de stripping
- 0,1 x SSC
- SDS (sodium dodecyl sulfate) à 0,5%

Méthodes

Préparation des membranes

Les membranes sont séparées par des treillis de nylon (ou meshs) et humidifiées avec du 2 x SSC avant d'être enroulées en cigare et placées dans un flacon à hybridation Hybaid contenant lui aussi du 2 x SSC. Le flacon est placé à 43°C dans le four à hybridation en prenant garde à ce que les différentes membranes et meshs adhèrent bien à la paroi du flacon. Ensuite, le 2 x SSC est remplacé par 10 ml de la solution d'hybridation chauffée préalablement à 43°C. Afin d'éliminer toute trace de 2 x SSC, un second lavage est réalisé avec la solution d'hybridation qui agira pendant 1 heure. Cette incubation permet de diminuer le bruit de fond en recouvrant les sites non spécifiques de la membrane.

Préparation des sondes marquées au ^{32}p

Les sondes d'ADNc (tableau2.1.) sont des fragments de restriction provenant de divers plasmides. Elles sont marquées par la méthode de « random priming ». Cette technique utilise 20 ng d'ADNc que l'on met bouillir pendant 5 minutes afin de désapparier les brins complémentaires. L'échantillon est immédiatement replacé sur glace dans le but d'éviter tout réappariement. A cet ADNc sont ajoutés successivement les nucléotides non marqués dATP, dCTP et dTTP (Kit Random Primers DNA, Invitrogen), les amorces aléatoires (random primers Buffer Mixture), le grand fragment Klenow de l'ADN polymérase I à activité

polymérase 5' vers 3'et le [α-^{32}p]-dCTP (Amersham). On laisse agir le tout à température ambiante pendant 1 heure et 30 minutes. Les amorces aléatoires sont des hexamères s'hybridant aux simples brins d'ADNc et servant de point de départ pour la polymérase.
Une fois la réaction de polymérisation terminée, elle est stoppée grâce à l'ajout de Stop Buffer (Kit Random Primers DNA, Invitrogen). Les nucléotides non marqués ainsi que les fragments inférieurs à 20 paires de bases sont éliminés grâce à un passage sur une colonne de chromatographie Biospin 30 (Bio-Rad).
Il est possible de mesurer la radioactivité de la sonde grâce à un compteur à scintillation Beckmann LS 6000. Pour cela, 100 µl d'eau et 4 ml d'Aqualuma sont ajoutés à 1 µl de la sonde préparée. Une bonne incorporation de la radioactivité se caractérise par une détection d'une valeur de 100,000 à 500,000 cpm par µl, soit 5,500,000 à 27,500,000 cpm pour la sonde totale.
Cette technique de « random priming » permet donc de préparer les sondes adéquates afin d'identifier les ARNm d'intérêt transférés par Northern sur la membrane. En effet, les sondes marquées radioactivement s'hybrident aux séquences d'ARN complémentaires et la radioactivité peut être révélée grâce à un écran de phosphore (Storage Phosphore Screen, Packard) et à l'appareil « Cyclone ».

Hybridation de la sonde

Après passage sur la colonne, la sonde est chauffée à 100°C pendant 5 minutes et placée ensuite immédiatement sur glace. La sonde est transvasée dans un tube contenant 10 ml de solution d'hybridation. Le tout est enfin versé dans le flacon contenant les membranes après l'avoir vidé de son contenu. L'hybridation se déroule pendant une nuit à 43°C dans le four à hybridation.

Lavage des membranes et révélation

Les membranes hybridées subissent tout d'abord trois lavages de 15 minutes à 25°C avec de la solution 2 x SSC/0,1% SDS. Ensuite, deux lavages de 15 minutes avec de la solution 0,5 x SSC/0,1% SDS à 43°C sont réalisés. Enfin, deux lavages de durée identique aux lavages précédents et avec cette même solution sont effectués mais cette fois-ci à une température de 65°C. Ces lavages permettent de détacher progressivement les sondes liées de manière non spécifique aux membranes.
La détection avec haute spécificité des kératines nécessite trois lavages supplémentaires à 65°C de 15 minutes avec de la solution 0,1 x SSC/0,1% SDS. Les membranes sont ensuite emballées dans du cellophane et exposées sur un écran de phosphore (Storage Phosphore Screen, Packard) pendant un temps qui dépend de l'intensité du signal radioactif. La détection proprement dite est réalisée grâce à l'appareil « Cyclone » et l'analyse de l'image est effectuée par le programme informatique OptiQuant. Ce programme permet une détection qualitative mais également quantitative. En effet, il est possible de quantifier l'expression des ARNm en normalisant les valeurs de DLU (Digital Light Unit) du messager d'intérêt par rapport à l'ARNm du gène 36B4. Ce gène est exprimé de manière constitutive dans les kératinocytes. Des spots de même intensité pour ce gène démontrent un chargement identique au niveau du Northern Blot. Les membranes peuvent être stockée à -20°C dans du cellophane afin d'éviter qu'elles ne sèchent.

Récupération et lavage des membranes

Plusieurs hybridations peuvent s'effectuer sur la même membrane. Cependant, il est nécessaire de décrocher les sondes hybridées précédemment. Cette étape se réalise en mettant bouillir (deux fois 5 minutes) le flacon contenant les membranes ainsi que la « solution de stripping ». Ensuite les membranes sont rincées puis incubées de nouveau avec de la solution d'hybridation à 43°C pendant 1 heure et peuvent alors ainsi être réutilisées pour d'autres hybridations.

4. Analyse des protéines par Western blot

Matériel

Tampon de lyse (Sample Buffer 2x)
- Tris-HCl 62,5 mM
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 2%
- Glycérol 8,7%
- Bleu de bromophénol 0,05%
- DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma) 0,2 M

Running gel
- Tris base 375 mM à pH 8,8
- SDS (sodium dodecyl sulfate) à 0,1%
- Acrylamide/Bisacrylamide 10%
- APS (persulfate d'ammonium) 0,05%
- TEMED (N,N,N,N Tetramethylethylenediamine) 0,1%

Stacking gel
- Tris base 375 mM à pH 6,8
- SDS (sodium dodecyl sulfate) à 0,1%
- Acrylamide/Bisacrylamide 4%
- APS 0,05%
- TEMED (N,N,N,N Tetramethylethylenediamine) 0,1%

Tampon d'électrophorèse
- Tris-base 25 mM
- Glycine 192 mM
- SDS 0,1%

Tampon de transfert
- Tris base 25 mM
- Glycine 192 mM
- Méthanol 20%

Membrane en PVDF (Hybond-P, Amersham) :
pores de 0,45 µm

Tampon PBS
- NaCl 136,86 mM
- $Na_2HPO_4\,2H_2O$ 8,09 mM
- KCl 2,68 mM
- KH_2PO_4 1,47 mM

Solution de rinçage
- PBS
- Tween-20 0,1%

Solution de saturation
- PBS
- Tween-20 0,1%
- Lait écrémé Gloria (Nestlé)

Méthodes

Après avoir subi les divers traitements, les boîtes de culture sont immédiatement placées sur glace et les kératinocytes sont lysés avec le tampon de lyse 2x concentré (200 µl pour une boîte de Pétri de 6 cm de diamètre contenant des cellules confluentes). Les lysats cellulaires sont récupérés à l'aide d'une « raclette » et transférés dans des tubes eppendorfs. Ceux-ci sont bouillis pendant 5 minutes et centrifugés à 4°C, à 10000 rpm et pendant 3 minutes. Les surnageants sont conservés à -20°C.

Avant la migration sur gel de polyacrylamide, les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à 100°C afin de dénaturer complètement les protéines. L'électrophorèse est réalisée en condition dénaturante en présence de SDS. Celui-ci se fixe sur les protéines, les chargeant négativement et entraînant une répulsion des charges et donc une dénaturation complète des protéines. Lors de la migration, les protéines migrent donc en fonction de leur poids moléculaire qui peut être déterminé grâce à un marqueur de poids moléculaire. Le SDS permet également aux protéines de migrer vers l'anode au niveau du dispositif d'électrophorèse.
Comme l'extraction des protéines se fait toujours à partir de cultures se trouvant au même stade (la confluence), un volume identique est chargé dans chacun des puits. On admet donc que ces volumes contiennent tous une quantité semblable de protéines.
Les échantillons sont tout d'abord tassés dans le gel concentrateur (ou stacking gel) 4% pour se déplacer ensuite au sein du gel de séparation (ou running gel) 7,5% ou 10%. Le pourcentage de ce dernier est choisi en fonction du poids moléculaire de la protéine que l'on veut étudier. La séparation des protéines s'effectue à 150 Volts pendant environ 1 heure (selon le pourcentage du gel).
Une fois la migration terminée, les protéines incluses dans le gel sont transférées sur une membrane en PVDF (PolyVinylDifluoride). Ce transfert se réalise en immersion en présence de tampon de transfert à 60 Volts et ceci durant toute une nuit.
Le lendemain, la membrane (portant à présent les protéines) est trempée dans la solution de rinçage et incubée pendant 1 heure dans la solution de saturation. Celle-ci permet de bloquer les réactions non spécifiques des anticorps primaires vis-à-vis de la membrane. En effet, les protéines de lait se fixent sur la membrane aux endroits où aucune protéine n'a été transférée. Les anticorps primaires peuvent ainsi réagir avec leur protéine d'intérêt. Viens ensuite l'incubation de la membrane en présence de l'anticorps primaire (tableau 2.2.) dilué dans la solution de saturation. Le temps d'incubation et la dilution utilisée sont variables selon l'anticorps. Une fois l'incubation de l'anticorps primaire terminée, trois lavages avec de la solution de rinçage sont effectués afin d'éliminer les anticorps primaires non liés. Une incubation d'une heure est réalisée par la suite avec un anticorps secondaire couplé à la HRP (horse radish peroxidase) (tableau 2.2.). Cet anticorps secondaire doit absolument être spécifique du fragment constant (Fc) de l'anticorps primaire. La membrane subit encore trois lavages avec la solution de rinçage. La détection se réalise enfin grâce à la solution de révélation (kit ECL ou kit Lumigen^{TM} TMA-6, Amersham) qui produit une réaction de chemoluminescence sur la membrane aux endroits où la peroxydase (HRP) est présente. Cette réaction peut être mise en évidence, en chambre noire, à l'aide de films photographiques (hyperfilm^{TM}, Amersham)

5. Marquage en immunofluorescence

Matériel

Tampon PBS/ABC
- $CaCl_2$ 0,9 mM
- KCl 2 mM
- KH_2PO_4 1,4 mM
- $MgCl_2$ 0,5 mM
- NaCl 0,13 mM
- Na_2HPO_4 $2H_2O$ 8 mM
- pH 7,2

Tampon PBS/BSA
- Tampon PBS/ABC
- BSA (Bovine Albumine Serum, Sigma) à 0,1%

Tampon Glycine
- Eau distillée
- Glycine 0,1 M

Méthode

Pour les marquages en immunofluorescence, les cellules sont ensemencées sur des lamelles couvre-objets en verre dans des plaques multi-puits. Une fois le traitement des cellules réalisé (comme expliqué précédemment), les cellules sont rincées trois fois 5 minutes à l'aide de PBS/ABC. Si le but est de mettre en évidence des protéines phosphorylées, on ajoute à ce tampon un inhibiteur de phosphatase, l'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4) à une concentration de 0,1 mM. Après ces trois rinçages avec le tampon PBS/ABC, les cellules peuvent être fixées. Deux types de fixation ont été utilisés selon les anticorps: soit une fixation de 10 minutes avec le paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du PBS, soit une fixation méthanol/acétone (80/20) à -20°C pendant 20 minutes. Lorsque les cellules subissent une fixation PFA, cette dernière est suivie de trois rinçages de 2 minutes à l'aide du tampon glycine afin de neutraliser les aldéhydes réactionnels laissés par la fixation et qui peuvent émettre de la fluorescence. Une fois les cellules fixées, elles sont de nouveau rincées trois fois 5 minutes dans du PBS/ABC. Ensuite, les cellules subissent une saturation des sites non spécifiques grâce à un rinçage de 30 minutes avec le tampon PBS/BSA. Ce tampon contient un détergent neutre, le Triton X-100 à 0,02% dans le cas où il est nécessaire de perméabiliser les membranes cellulaires. Il est à remarquer qu'une fixation méthanol/acétone ne requiert pas de perméabilisation par le Triton X-100. Une fois la saturation des sites non spécifiques réalisée, les cellules peuvent être incubées en présence de l'anticorps primaire (tableau 2.3.), dilué dans le PBS/BSA, durant une heure ou pendant une nuit (selon l'anticorps utilisé) en chambre humide. Suite à cette incubation, trois rinçages de 5 minutes avec le tampon PBS/BSA sont réalisés. Vient ensuite une incubation d'une heure en chambre humide en présence de l'anticorps secondaire (également dilué dans le tampon PBS/BSA) couplé à une sonde fluorescente « Alexa » (tableau 2.3.). L'incubation est également suivie de trois rinçages de 5 minutes dans le tampon PBS/BSA. Les lamelles couvre-objets sont ensuite montées sur lame porte-objet avec un milieu de montage préservant la fluorescence et préchauffé à 57°C, le Mowiol.
Un marquage des noyaux peut éventuellement être réalisé en incubant les cellules, 30 minutes et en chambre humide, en présence de Topro-3 (Molecular Probes) dilué 80x dans de la RNAse (2 mg/ml de PBS). Trois rinçages de 5 minutes dans le PBS/BSA sont également réalisés avant de monter les lamelles avec le Mowiol.
L'observation du marquage et la prise d'images se fait au microscope confocal (Leica). Les lamelles sont conservées à l'obscurité et à 4°C afin de préserver la fluorescence.

Pour le marquage de « lipid rafts » par la toxine cholérique couplée à l' « Alexa Fluor 555 » (Molecular Probes), un autre protocole est suivi. Après le traitement des cellules, celles-ci sont d'abord rincées trois fois avec du tampon PBS/ABC. Les kératinocytes sont ensuite incubés à 4°C et pendant 30 minutes en présence de PBS/BSA et de 8 µg/ml de la sous-unité B de la toxine cholérique couplée à l' « Alexa Fluor 555 ». Trois lavages avec du PBS/BSA sont réalisés avant de fixer les cellules pendant 30 minutes avec le paraformaldéhyde. Cette fixation est ensuite suivie de trois rinçages dans le tampon glycine et d'une incubation de 30 minutes dans du PBS/BSA. Le marquage de HER1 sur ces mêmes lamelles est effectué en utilisant le protocole décrit ci-dessus pour les autres marquages.

RESULTATS

1. Présentation du modèle des kératinocytes humains en culture autocrine

1.1. Analyse morphologique en microscopie à contraste de phase

Le modèle de culture utilisé prévoit que les kératinocytes en culture tertiaire soient ensemencés à une densité de 7000 cellules par cm^2 dans du milieu complet KGM-2. Le lendemain, le milieu complet, favorisant l'ancrage des cellules à la surface de la boîte, est remplacé par le milieu EpiLife® + qui contient les facteurs de croissance nécessaires à la prolifération cellulaire. Une fois que les kératinocytes recouvrent environ 60% de la surface disponible, l'EpiLife® + est remplacé par du milieu sans facteur de croissance, l'EpiLife® -. Ensuite, les cultures atteignent par croissance autocrine successivement les stades de sous-confluence, confluence et post-confluence (figure 3.1.).

La **sous-confluence** (~80%) (figure 3.1.A.) est atteinte 1 à 2 jours après le début de la culture autocrine et se caractérise par une prolifération importante des kératinocytes. L'observation des kératinocytes en microscopie à contraste de phase montre des cellules souvent allongées, aux pourtours réfringents. Il y a aussi de nombreuses mitoses.

La **confluence** (figure 3.1.B.) est atteinte environ 3 à 4 jours après la sous-confluence et se caractérise par un tapis cellulaire recouvrant l'entièreté de la surface de culture disponible. Ce stade est en fait atteint lorsque les mitoses se font rares étant donné que les cellules passent d'une prolifération intensive, caractéristique de la sous-confluence, à une différenciation progressive. Les kératinocytes présentent à ce stade une morphologie différente : les cellules, moins réfringentes, sont bien jointives et se caractérisent par une forme polyédrique.

Par convention, la culture atteint la **post-confluence** (figure 3.1.C.) 4 jours après la confluence et se caractérise par une stratification (détachement et arrondissement) de certaines cellules. La forme polyédrique des kératinocytes ancrés est partiellement perdue à ce stade et les cellules arrondies desquament.

1.2. Analyse de l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation

In vivo, l'épiderme se caractérise par l'expression des kératines 5 (K5) et 14 (K14) au niveau de l'assise basale, tandis que les kératines 1 (K1) et 10 (K10), l'involucrine, la loricrine et d'autres rendent compte d'une différenciation progressive au niveau des couches suprabasales.
Or, en condition de culture autocrine, la densité cellulaire régule progressivement le stade de différenciation des cultures de kératinocytes (Poumay et Pittelkow, 1995 ; Poumay et al., 1999).

Avant d'utiliser ce modèle pour l'étude des récepteurs de la famille HER, nous l'avons brièvement recaractérisé par l'étude de l'expression, au niveau ARNm, de certains marqueurs de prolifération (comme K14) et de différenciation (involucrine et K10) (figure 3.2.).

L'homogénéité du chargement du gel est vérifiée par l'observation de l'expression du « house keeping gene » 36B4 qui est exprimé de manière constitutive dans les kératinocytes (figure 3.2.).

Cette étude indique que l'expression de la kératine 14 (K14), un marqueur de la couche basale, est constante. La kératine 10 (K10), marqueur des couches suprabasales, est absente à sous-confluence. Elle est cependant faiblement exprimée à confluence et fortement exprimée post-confluence. L'involucrine, un marqueur de différenciation plus tardif, est très faiblement exprimée à confluence et augmente ensuite au niveau de la post-confluence.

Cette analyse suggère que les kératinocytes des cultures confluentes entament le programme de différenciation. L'expression de la kératine 14 (K14) suggère la présence persistante de kératinocytes possédant un phénotype basal dans les trois stades cellulaires étudiés.

1.3. Analyse de l'expression des récepteurs HER1, HER2 et HER3.

Nous avons ensuite analysé l'expression des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF dans ce modèle.
Sachant que le récepteur HER4 n'est pas exprimé par les kératinocytes épidermiques humains (De Potter et al, 2001 ; Stoll et al., 2001), notre intérêt s'est porté uniquement sur HER1, HER2 et HER3.

L'analyse par Northern blot montre que les ARNm codant pour HER1, HER2 et HER3 sont exprimés dès le stade de la sous-confluence (figure 3.3.A.). L'expression de HER3 est néanmoins plus faible. En ce qui concerne le récepteur HER1, on remarque la présence de deux ARNm (6,0 kb et 10,0 kb) ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment dans notre laboratoire (De Potter, 1996).

Par analyse densitométrique des bandes détectées par autoradiographie, nous pouvons étudier l'expression génique relative de HER1, HER2 et HER3 par rapport à l'expression du « house keeping gene », 36B4 (figure 3.3.B.).
Au niveau du récepteur HER1, les deux ARNm détectés varient différemment. En effet, on observe une diminution de l'expression du messager de grande taille (10,0 kb) alors que celui de petite taille (6,0 kb) tend à augmenter avec la densité cellulaire (figure 3.3.B.a.).

L'analyse densitométrique permet également de remarquer que l'expression de l'ARNm du récepteur HER2 diminue progressivement avec l'augmentation de la densité cellulaire des cultures autocrines de kératinocytes (figure 3.3.B.b.).
Ce résultat est en contradiction avec celui obtenu par Isabelle De Potter (De Potter et al., 2001) qui, en utilisant un autre milieu de culture (KGM-2) avait constaté une augmentation de l'expression du récepteur HER2 parallèlement à l'augmentation de la densité cellulaire.

L'expression du transcrit de HER3 ne varie que très peu dans nos conditions avec l'avancement de la densité cellulaire des cultures autocrines (figure 3.3.B.c.).

En résumé, les récepteurs HER1, 2 et 3 sont exprimés par les kératinocytes humains en culture autocrine. Nous allons pouvoir rechercher s'ils sont éventuellement activés lors d'une déplétion de leur cholestérol membranaire.

2. Etude de l'activation des HER et des MAPK induite par une déplétion en cholestérol membranaire

Dans ce mémoire, nous étudions les effets produits par une extraction en cholestérol des kératinocytes à confluence sur les récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF. Nous allons suivre aussi l'activation des MAPK (p38 et ERK).

2.1. Effet de la déplétion en cholestérol et de l'EGF sur la morphologie du kératinocyte en culture confluente

Dans notre laboratoire, Ralph Jans a montré que les effets d'une déplétion en cholestérol membranaire se marquent surtout au stade de confluence cellulaire et que l'expression d'involucrine est fortement induite dans ces conditions, alors que le niveau d'expression de K10 et K14 diminue (Jans, 2004).

Il a aussi été démontré dans notre laboratoire que l'extraction de cholestérol effectuée par la méthyl-β-cyclodextrine à 7,5 mM pendant une heure ne change pas significativement la viabilité cellulaire et donc, que les effets produits par la déplétion ne sont probablement pas dus à la cytotoxicité de cette cyclodextrine (Mathay, 2004).

L'observation en microcopie à contraste de phase fournit des renseignements intéressants sur les changements morphologiques des kératinocytes dus aux différents traitements appliqués (figure 3.4.).

Dans les conditions contrôles (sans traitement), les kératinocytes, de forme polyédrique, sont aplatis et leurs espaces intercellulaires semblent bien jointifs (figure 3.4.A. et figure 3.4.D.).
Les traitements par la MβCD 1 heure ou par la MβCD 1 heure suivie de la lovastatine 17 heures entraînent au niveau des kératinocytes d'importants changements morphologiques (figure 3.4.B. et figure 3.4.E.). En effet, les espaces intercellulaires apparaissent moins étroits et la réfringence des kératinocytes augmente de façon importante. Il semble également que quelques kératinocytes se détachent de leur support. Ces changements suggèrent que la MβCD pourrait diminuer l'adhérence cellulaire et causer des modifications au niveau du cytosquelette.
L'ajout d'EGF (10ng/ml) pendant les mêmes périodes augmente aussi la réfringence des cellules, surtout après une heure, mais de façon moins spectaculaire que l'extraction du cholestérol (figure 3.4.C. et figure 3.4.F.).

2.2. Effet de la déplétion en cholestérol et de l'EGF sur l'activation des HER et des MAPK

Nous avons tout d'abord tenté de savoir si une déplétion en cholestérol par la MβCD agit sur l'activation des différents récepteurs de la famille HER.

2.2.1. Etude de l'activation des HER dans les kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire

Dans notre laboratoire, des travaux précédents ont montré qu'une déplétion en cholestérol par un traitement MβCD (1h)/lovastatine (17h) induit une répression importante de la kératine 14 (K14) et de la kératine 10 (K10), ainsi qu'une induction de l'expression de l'involucrine et cela principalement au stade de la confluence (Jans, 2004).
Ces travaux ont également confirmé qu'un traitement avec l'EGF pendant 18 heures entraîne une répression de l'expression de la kératine 10 et une induction de l'expression de l'involucrine (Jans, 2004).

Pour tenter d'expliquer ces découvertes, Ralph Jans a émis l'hypothèse selon laquelle l'activation du récepteur de l'EGF pourrait être induite par une déplétion en cholestérol des kératinocytes ainsi que cela a été démontré dans d'autres types cellulaires.
Pour commencer, nous avons examiné la phosphorylation des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes confluents suite à une incubation en présence de MβCD 7,5 mM pendant 1 heure. Nous avons utilisé l'ajout d'EGF (10ng/ml) comme contrôle positif de l'activation de HER1.

La figure 3.5.A. révèle que les cellules ayant subi une déplétion en cholestérol présentent une proportion aisément détectable du récepteur de l'EGF qui est phosphorylée. Cette quantité est toutefois moins importante que la quantité du récepteur de l'EGF phosphorylé détectable après une stimulation par l'EGF (figure 3.5A.).
Comme l'a montré Ralph Jans, l'augmentation de la quantité phosphorylée du récepteur de l'EGF observée suite à un traitement par la MβCD semble être liée à une extraction de cholestérol. En effet, une incubation des cellules en présence de MβCD déjà complexée à du cholestérol n'entraîne pas en une quantité détectable de récepteur de l'EGF phosphorylé (Jans, 2004).

Nous nous sommes ensuite demandé si cette activation allait se retrouver pour les récepteurs HER2 et HER3.

En ce qui concerne le récepteur HER2, il semble se passer la même chose que pour le récepteur de l'EGF. En effet, comparativement aux cellules contrôles, on détecte une quantité plus importante de récepteur HER2 phosphorylé pour les cellules traitées à la MβCD. Cette quantité est cependant moins importante que celle détectable après une stimulation des kératinocytes par l'EGF (figure 3.5.A.).

On constate donc que l'activation du récepteur HER2 est également induite par une déplétion en cholestérol (figure 3.5.A.). En effet, l'augmentation du récepteur HER2 phosphorylé détectée lors d'un traitement des cellules par la MβCD semble également liée à une extraction du cholestérol car elle n'est pas détectable au niveau de cellules incubées en présence de MβCD déjà complexée à du cholestérol (Jans, 2004). Le mécanisme par lequel se fait cette activation d'HER2 reste inconnu, mais comme l'ajout d'EGF induit aussi la phosphorylation de HER2 (figure 3.5.A.), on peut dès lors supposer qu'une déplétion en cholestérol qui active le récepteur de l'EGF recrute ensuite HER2 pour l'hétérodimérisation et la transphosphorylation.

Au niveau du récepteur HER3 par contre, nous n'avons pu détecter aucune phosphorylation lors d'une incubation des cellules en présence de MβCD ou en présence d'EGF (figure 3.5.A.).
La phosphorylation d'HER3 ne semblerait donc pas induite par une déplétion en cholestérol, ni par l'EGF.

Afin de contrôler notre capacité à détecter une éventuelle phosphorylation de HER3, un traitement de 30 minutes par 100 ng/ml d'Heréguline (HRG) a été effectué sur des cellules à confluence. L'Heréguline est un ligand spécifique du récepteur HER3 qui peut induire la phosphorylation de HER3 dans les kératinocytes (De Potter et al., 2001). De fait, nous détectons une légère augmentation de HER3 phosphorylé lorsque les cellules subissent le traitement par l'HRG (figure 3.5.B.). La non-détection de HER3 phosphorylé après déplétion du cholestérol n'est donc pas due à un problème dans la technique de détection. Nous avons complété ce contrôle en étudiant les effets d'un traitement par l'HRG sur l'activation des MAPK p38 et ERK. Comparativement aux kératinocytes non traités, aucune augmentation de l'activation de p38 n'est détectée lors d'un traitement par l'HRG, mais on observe une légère activation des ERK comparativement aux cellules contrôles (résultats non illustrés).

2.2.2. Etude de l'activation des MAPK dans les kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire

L'activation du récepteur de l'EGF résulte en l'activation de plusieurs protéines kinases situées en aval dans des voies de signalisation induites par ce récepteur, notamment en l'activation des MAPK p38 et ERK (Schleissinger, 2000).

Suite à nos observations d'une activation des récepteurs HER1 et HER2 (figure 3.5.A.), nous avons recherché l'état d'activation des MAPK p38 et ERK (figure 3.6.).

Nous avons obtenu des résultats semblables à ceux de Ralph Jans. En effet, les cellules ayant subi une déplétion en cholestérol présentent une quantité aisément détectable de p38 phosphorylé (figure 3.6.). Par contre, les cellules traitées à l'EGF (10 ng/ml) pendant 1 heure ne présentent aucune augmentation de la quantité de p38 phosphorylée comparativement aux cellules non traitées (figure 3.6.), ce qui suggère que cette phosphorylation induite par la déplétion en cholestérol utilise une autre voie de signalisation que celle qui passe par les récepteurs HER.

Or, nous savons que dans plusieurs types cellulaires, une déplétion en cholestérol entraîne l'activation des ERK, probablement par l'intermédiaire du récepteur de l'EGF (Chen et Resh, 2002). Nous avons donc tenté de voir si la déplétion en cholestérol au niveau des kératinocytes résulte également en une activation des ERK. La figure 3.6. nous indique que, contrairement aux cellules non traitées, les cellules ayant subi une déplétion en cholestérol par la MβCD présentent une quantité aisément détectable des ERK phosphorylés (figure 3.6.). Toutefois cette quantité est moins importante que la quantité de ERK phosphorylés après une stimulation par l'EGF (figure 3.6.).
Ralph Jans (2004) avait cependant suggéré que la déplétion en cholestérol n'affectait le taux d'activation des ERK que pour des kératinocytes se trouvant au stade de la sous-confluence. Notre résultat semble donc différent, mais précisons que les expériences de Ralph Jans étaient réalisées avec des kératinocytes cultivés en milieu KGM-2 et à un stade différent, soit deux conditions de culture différentes.

2.2.3. Etude des HER dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire pendant 18 heures

Le traitement d'une heure par la MβCD a permis d'étudier les phénomènes précoces se déroulant au sein des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire. Nous avons jugé intéressant d'étudier les phénomènes plus tardifs consécutifs à une extraction efficace et durable du cholestérol membranaire des kératinocytes, c'est-à-dire avec utilisation de la lovastatine pour bloquer la synthèse endogène de cholestérol (Jans, 2004) (voir la section « Matériel et Méthodes »).

2.2.3.1. Etude de l'expression au niveau ARN

Nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés aux variations éventuelles dans l'expression des ARNm des récepteurs HER1, HER2 et HER3 et des marqueurs de prolifération et de différenciation pour des kératinocytes confluents ayant subi un traitement MβCD/lovastatine.

2.2.3.1.1. Etude de l'expression des récepteurs HER1, HER2 et HER3

Dans ce but, des kératinocytes en cultures confluentes sont déplétés en cholestérol ou traités par l'EGF pendant 18 heures. Les ARNm sont extraits et analysés par Northern blot suivi d'hybridations avec les sondes spécifique de HER1, HER2 et HER3.
Les résultats du Northern blot (figure 3.7.A.) ainsi que l'analyse densitométrique des bandes observées par autoradiographie nous a permis d'établir l'expression génique relative des messagers par rapport à l'expression du messager du « house keeping gene » 36B4 (figure 3.7.B.). Le traitement par la MβCD/Lovastatine entraîne une augmentation de l'expression des ARNm codant pour les récepteurs HER1, HER2 et HER3 (figure 3.7.B.). Cette augmentation est retrouvée lors d'un traitement des cellules par l'EGF d'une manière plus marquée.

2.2.3.1.2. Etude de l'expression des marqueurs de prolifération et de différenciation

Une même analyse par Northern blot (figure 3.8.A.) a été réalisée au niveau de l'expression des marqueurs de prolifération (K14) et de différenciation (K10 et involucrine).
Comme le démontre l'analyse densitométrique (figure 3.8.B.), une importante augmentation dans l'expression de l'ARNm codant pour l'involucrine est observée lorsque les cellules subissent un traitement MβCD/Lovastatine, en accord avec les résultats précédents du laboratoire (Jans et al., 2004).
On observe également sur cette figure qu'un traitement des cellules par l'EGF conduit à une augmentation encore plus importante de la quantité d'ARNm codant pour l'involucrine comparativement à la situation contrôle (sans traitement).
L'expression des ARNm codant pour K10 semble diminuer lors des différents traitements appliqués (figure 3.8.B.). Concernant l'expression des ARNm codant pour K14, il ne semble pas y avoir de variation importante dans l'expression du transcrit (figure 3.8.).

2.2.3.2. Etude de l'activation des HER et des MAPK

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'activation des différents récepteurs HER et à l'activation des MAPK p38 et ERK après 18 heures de déplétion en cholestérol.

2.2.3.2.1. Etude de l'activation des HER dans les kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire pendant 18 heures

En ce qui concerne le récepteur HER1, il semble que son activation observée après 18 heures de déplétion en cholestérol (figure 3.9.A.) soit plus faible qu'après 1 heure (figure 3.5.A.). De même, on remarque une diminution de la quantité de HER1 total pour les kératinocytes déplétés en cholestérol et pour ceux traités à l'EGF ce qui diffère du traitement d'une heure.
Ces observations nous suggèrent que les cellules ont entamé dans nos conditions de traitement le processus de dégradation du récepteur HER1 par endocytose.

Au niveau du récepteur HER2, il ne semble pas y avoir d'activation particulière de ce récepteur, ni lors du traitement MβCD/lovastatine, ni lors du traitement par l'EGF (figure 3.9.A.).
Cela suggère que l'activation du récepteur HER2 observée après 1 heure de déplétion en cholestérol (figure 3.5.A.) est terminée lorsque l'on analyse les cellules après 18 heures de déplétion.

En ce qui concerne le récepteur HER3, comme pour le traitement par la MβCD seule, aucune activation n'est détectée lors des différents traitements appliqués (figure 3.9.A.).
Donc, même après un laps de temps plus long, le récepteur HER3 ne semble pas être activé suite à une déplétion en cholestérol membranaire des kératinocytes.
On remarque (résultat non illustré) une faible détection de HER3 phosphorylé un jour avant le stade de confluence. Cela pourrait être dû au fait que les kératinocytes en prolifération produisent les Herégulines (De Potter et al., 2001).

2.2.3.2.2. Etude de l'activation des MAPK dans les kératinocytes déplétés en cholestérol

Nous avons aussi effectué un Western blot pour étudier l'activation des MAPK dans des kératinocytes confluents ayant subi les mêmes traitements (MβCD 1h/lovastatine 17h ou 18 heures EGF).

Au niveau de la MAPK p38, nous observons toujours, comme lors du traitement de courte durée (figure 3.6.), une phosphorylation de p38 lorsque les cellules ont subi un traitement MβCD/lovastatine (figure 3.9.B.).
Ce résultat concorde avec un résultat similaire obtenu précédemment dans notre laboratoire (Mathay, 2004) et suggère qu'une déplétion en cholestérol entraîne une activation prolongée de p38.
Par contre, aucune activation de p38 n'est détectée lors d'un traitement des cellules par l'EGF (figure 3.9.B.). Cela suggère que la phosphorylation de p38 induite par la déplétion en cholestérol utilise une autre voie de signalisation que celle qui passe par les récepteurs HER.

En ce qui concerne les MAPK ERK, l'analyse par Western blot indique que seul le traitement des kératinocytes par MβCD/lovasatine provoque une augmentation de la quantité de ERK phosphorylé comparativement aux cellules non traitées (figure 3.9.B.). Pour les cellules

traitées par l'EGF, le niveau de ERK phosphorylé ne semble pas avoir augmenté (figure 3.9.B.).

Suite à ce résultat, nous pouvons supposer que le traitement MβCD/lovastatine active les récepteurs durant la première heure (figure 3.5.A.) et entraîne par la suite une voie de signalisation aboutissant entre autre à l'activation de ERK et de p38 (figure 3.6.). De plus, nous pouvons supposer que le traitement par l'EGF, activant également les récepteurs durant la première heure, provoque aussi la phosphorylation des ERK, mais d'une façon plus importante et peut être plus rapide, qui s'éteint aussi plus rapidement. C'est pourquoi, plus aucune phosphorylation de ERK n'est détectable lorsque l'on regarde après 18 heures de traitement par l'EGF.

Ce résultat est encore en contradiction avec ceux de Ralph Jans (2004). En effet, il ne détectait aucune phosphorylation des ERK lors d'un traitement des kératinocytes par MβCD/lovastatine. Une fois de plus, ces cellules étaient cultivées dans du milieu KGM-2, alors que nous avons utilisé l'EpiLife. Cette différence de milieu peut-elle expliquer la discordance? Cela reste à investiguer.

3. Visualisation de l'influence des différents traitements sur la localisation des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF

A la vue des résultats précédents montrant l'activation des récepteurs HER1 et 2 lors d'un traitement de 1 heure des kératinocytes par la MβCD (figure 3.5.A.), nous avons tenté de localiser ces récepteurs grâce à la technique de marquage en immunofluorescence (comme expliquée dans la section « Matériel et Méthodes »). Cette technique nous permettra de voir comment les différents traitements appliqués agissent sur la localisation des récepteurs.

3.1. Etude de la localisation cellulaire du récepteur de l'EGF dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire

3.1.1. Localisation cellulaire de la forme totale et phosphorylée du récepteur de l'EGF

Des kératinocytes cultivés jusqu'au stade de confluence cellulaire sont déplétés en cholestérol (pendant 1 heure) ou traités par l'EGF (pendant 1 heure), ils sont ensuite fixés, perméabilisés et marqués par l'anticorps anti-HER1 total (Upstate) (tableau 2.3. dans la section « Matériel et Méthodes »).

Ce marquage (figure 3.10.) montre, au niveau des kératinocytes non traités, une localisation du récepteur de l'EGF qui est membranaire. Lorsque les cellules subissent un traitement par l'EGF, on remarque une localisation cytoplasmique du récepteur de l'EGF, ce qui suggère que l'EGF active ce récepteur et induit son internalisation (figure 3.10.). Cependant, un léger

marquage membranaire observé dans les cellules non traitées est encore présent (figure 3.10.), ce qui suggère que tous les récepteurs HER1 ne seraient pas nécessairement tous internalisés lors d'un traitement par l'EGF.
A noter que l'on remarque un marquage nucléaire dans certaines cellules (figure 3.10.). Dans la littérature, une localisation nucléaire de HER1 a été rapportée et il semblerait même que la présence du ligand soit requise pour observer cette localisation nucléaire (Carpenter, 2003). Le récepteur de l'EGF aurait, à ce niveau, un rôle de coactivateur ou de facteur de transcription afin d'activer des gènes requis pour les activités de prolifération des tissus (Lin et al., 2001). La manière dont le récepteur est transloqué de la surface cellulaire au noyau n'est pas encore claire (Lin et al., 2001).
Par contre, bien qu'une activation du récepteur de l'EGF fut détectée par Western blot, aucune internalisation ne semble se produire lorsque les cellules subissent un traitement par la MβCD (figure 3.10.).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation de la forme phosphorylée de HER1 (figure 3.11.) : la quantité du récepteur HER1 phosphorylé augmente lorsque les kératinocytes sont traités par l'EGF, mais aussi par la MβCD (figure 3.11.). On remarque en effet un marquage intracellulaire punctiforme dans ces deux conditions de traitement qui confirme l'augmentation décelée précédemment par Western blot (figure 3.5.A.).
La figure 3.11. montre également un marquage nucléaire de la forme phosphorylée de HER1 et cela aussi bien dans les cellules non traitées que dans les cellules traitées par la MβCD ou l'EGF (figure 3.11). Cependant, ce marquage nucléaire n'est pas présent dans les conditions contrôle et MβCD au niveau du marquage de HER1 total (figure 3.10.). Cette observation jette un doute sur le marquage de la forme phosphorylée du récepteur de l'EGF. Le marquage nucléaire observé à la figure 3.11. pourrait n'être qu'un artéfact.

3.1.2. Localisation du récepteur de l'EGF au sein des « lipid rafts »

Comme cité dans la littérature (Nagy et al., 2002 ; Simons et Toomre, 2000), les « lipid rafts » sont des plateformes de signalisation ayant un grand rôle dans la transduction du signal. En effet, la localisation des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF au sein des « lipid rafts » a une grande influence sur leur activité.

Grâce à un double marquage de HER1 total et des gangliosides par la toxine cholérique couplée à l' « Alexa Fluor 555 », nous avons recherché la localisation du récepteur de l'EGF au sein des « lipid rafts » dans les kératinocytes. De plus, étant donné que le récepteur de l'EGF est internalisé lors d'un traitement des cellules par l'EGF, nous avons voulu suivre le récepteur HER1 lorsque les cellules ont subi une incubation avec l'EGF (figure 3.12.).

Dans la condition contrôle (sans traitement), la figure 3.12. montre un marquage des « lipid rafts » inhomogène : quelques cellules sont très positives pour les « lipid rafts ». Par contre, toutes les cellules montrent un marquage du récepteur de l'EGF. Cependant, aucune colocalisation particulière entre le récepteur de l'EGF et les « lipid rafts » ne semble présente.

Lorsque les cellules sont traitées par la MβCD, les cellules sont toujours toutes marquées pour le récepteur HER1, alors que seulement certaines montrent un marquage des « lipid rafts » (figure 3.12.). Cependant, il semble y avoir une certaine colocalisation (couleur jaune, figure 3.12.) de récepteurs HER1 avec les « lipid rafts » dans des cellules où ces derniers sont présents (figure 3.12.).

Dans les kératinocytes traités par l'EGF, la figure 3.12 révèle encore, comme observé précédemment (figure 3.10.), l'internalisation du récepteur HER1. Le marquage par la toxine cholérique s'est modifié suite à ce traitement car il est présent dans tout le cytoplasme des cellules les plus positives (figure 3.12.).

Ce marquage des cellules par la toxine cholérique couplée à l' « Alexa Fluor 555 » ne correspond pas à la littérature et est peut être à mettre en doute. Il serait donc utile d'améliorer ou de vérifier ce marquage des « lipid rafts » par la toxine cholérique couplée à l' « Alexa Fluor 555 ». Nous pourrions par exemple réaliser un marquage de certains « lipid rafts » en marquant par exemple la cavéoline 1 (Sando et al., 2003).

3.1.3. Localisation du récepteur de l'EGF au sein des lysosomes

Suite à l'internalisation évidente du récepteur HER1 lorsque les kératinocytes sont traités par l'EGF (figure 3.10.), nous nous sommes demandé si cette internalisation conduisait vers une dégradation lysosomale.
Pour répondre à cette question, nous avons réalisé un double marquage HER1 – Lamp-1. Dans le but de marquer les lysosomes, nous avons utilisé un anticorps reconnaissant lamp-1 (lysosome-associated membrane glycoprotein 1), une protéine particulièrement localisée dans la membrane des lysosomes (Mane et al., 1989).

Un premier double marquage, lamp-1 (anticorps de lapin) - HER1 total (anticorps de souris), a été réalisé (figure 3.13.). Malheureusement, contrairement au marquage de HER1 total, le marquage de lamp-1 n'a pas fonctionné (figure 3.13.). Cela est peut être dû au fait que la date de péremption de l'anticorps anti-lamp-1 dont nous disposions pour ce marquage était dépassée.

Disposant d'un anticorps anti-lamp1 de souris, nous avons décidé de nous procurer un anticorps anti-HER1 total de lapin afin de pouvoir effectuer le double marquage HER1 total (de lapin)/ Lamp-1 (de souris) (figure 3.15.).

Nous avons tout d'abord effectué un marquage du récepteur de l'EGF à l'aide du nouvel anticorps (figure 3.14.). Ce nouvel anticorps anti-HER1 total ne semble pas fonctionner aussi bien que celui utilisé auparavant (figure 3.10.).

Etant donné que nous avons à notre disposition deux anticorps différents nécessitant deux types de fixation différentes, de multiples tests ont été réalisés afin d'utiliser la méthode de fixation qui conviendra le mieux au double marquage. Nous avons procédé à celui-ci en fixant les cellules par une combinaison des 2 types de fixation : Paraformaldéhyde (10 minutes) et Méthanol/Acétone (5 minutes).
La figure 3.15. montre un beau marquage des lysosomes mais un marquage de HER-1 total assez faible, beaucoup moins beau que le marquage obtenu précedemment avec l'anticorps de souris anti-HER1 total de chez Upstate. De plus, aucune colocalisation du récepteur de l'EGF avec les lysosomes ne semble visualisable lorsque les cellules sont traitées par l'EGF.

La qualité du marquage est cependant mise en doute. Il serait nécessaire d'améliorer ce marquage pour pouvoir tirer de réelles conclusions.
Nous avons pensé marquer les lysosomes par un autre moyen. En effet, nous avons pensé utiliser le Lysotracker Red. Il s'agit d'une sonde couplée à une base faible partiellement protonnée à pH neutre et qui s'accumule dans les organelles à pH acide dont les lysosomes.

Cependant, cette sonde semble ne pas fonctionner pour des doubles marquages étant donné qu'elle est incompatible avec une fixation et une perméabilisation des cellules. Il est donc déconseillé de l'utiliser.
Il serait sans doute intéressant d'utiliser par exemple un anticorps anti-cathepsine D de lapin pour marquer les lysosomes et de marquer alors le récepteur HER1 avec l'anticorps anti-HER1 de souris.

3.2. Etude de la localisation cellulaire de HER2 dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire

Nous avons également étudié la localisation du récepteur HER2 dans les kératinocytes.
Le premier marquage réalisé avec l'anticorps anti-HER2 n'a pas donné des résultats compatibles avec la littérature (Stoll et al., 2001). En effet, Stoll obtenait un marquage intracellulaire pour la localisation de HER2. Nous avons donc réalisé plusieurs marquages en prenant en considération plusieurs paramètres. Nous avons testé la validité de l'anticorps, la densité cellulaire des kératinocytes et le milieu de culture utilisé.

Pour tester la validité de l'anticorps, nous avons réalisé un marquage du récepteur HER2 total sur des cellules A 431 et MDA-MB-453 en prolifération.

Les cellules A 431 sont des cellules cancéreuses de type épidermoïde (col utérin) qui sur-expriment le récepteur HER1. Dans la littérature, ces cellules sont connues pour afficher un marquage cytoplasmique punctiforme du récepteur HER2 (Stoll et al., 2001).
Les cellules MDA-MB-453 sont des cellules cancéreuses du sein sur-exprimant le récepteur HER2. Dans la littérature, elles sont connues pour présenter un marquage important en surface cellulaire (Stoll et al., 2001).

La figure 3.16. nous montre que l'anticorps utilisé est valable. En effet, les résultats obtenus concordent bien avec ceux décrit dans la littérature (Stoll et al., 2001). Les cellules A-431 présentent un marquage intracellulaire, alors que les cellules MDA-MB-453 montrent un marquage périphérique (figure 3.16.). Les photos de la figure 3.16. ont été réalisées, afin de pouvoir comparer les deux types cellulaires, au même grossissement. Les cellules MDA-MB-453 étant plus petites que les A-431, la localisation précise du marquage a été plus difficile à observer ; un agrandissement (non illustré) nous a permis de constater un marquage membranaire.

Dans le but de tester l'influence de la densité cellulaire (afin de voir si on retrouve les mêmes résultats lorsque l'on travaille à une autre densité) et du milieu utilisé (afin de voir si l'internalisation du récepteur HER2 est due à la présence de facteurs de croissance), des kératinocytes ont été ensemencés sur lamelles couvre-objet et cultivés jusqu'aux stades de sous-confluence, confluence et post-confluence, soit dans du milieu EpiLife +, soit dans du milieu EpiLife -. Ces cultures ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées par l'anticorps anti-HER2 (tableau 2.3. dans la section « Matériel et Méthodes »).

Au niveau de la sous-confluence, le marquage de HER2 total est intracellulaire et il ne semble pas y avoir de différence entre la condition « EpiLife + » et « EpiLife – ». La présence ou non de facteur de croissance ne semble donc pas provoquer de changement dans la localisation du récepteur HER2 total (figure 3.17.).

Lorsque l'on se trouve au stade de la confluence, il semble que le récepteur HER2 se situe en majorité en périphérie, dans la membrane des kératinocytes (figure 3.17.). On remarque toujours un marquage intracellulaire dans quelques kératinocytes (figure 3.17.). Une fois encore, il ne semble pas y avoir d'influence du type de milieu de culture sur la localisation de HER2 total (figure 3.17.).

En ce qui concerne le stade de post-confluence, le milieu de culture utilisé n'a, encore une fois, aucune influence sur la localisation du récepteur HER2 total (figure 3.17). Cependant, au sein même des cellules à post-confluence, on distingue des différences importantes. En effet, la figure 3.17. (A et B) révèle un marquage principalement intracellulaire qui caractérise les cellules du tapis cellulaire basal. Par contre, la figure 3.17. (C et D) montre un marquage du récepteur HER2 total principalement membranaire dans des cellules situées au-dessus des cellules basales. Ce type de marquage semble caractériser les cellules en différenciation qui se trouvent dans un niveau de stratification supérieur au tapis cellulaire basal.

Ce résultat est intéressant car nous savons que dans l'épiderme, le récepteur HER2 possède surtout une localisation intracellulaire dans les couches inférieures, tandis que celle-ci devient progressivement membranaire au fur et à mesure que l'on se déplace vers les couches supérieures, plus précisément granuleuses (De Potter, 2001).

Nous avons ensuite effectué, sur des kératinocytes confluents cultivés en EpiLife + ou en EpiLife -, une déplétion en cholestérol membranaire ainsi qu'un traitement par l'EGF.
Une fois les traitements terminés, les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées par l'anticorps anti-HER2 (tableau 2.3. dans la section « Matériel et Méthodes »).

La figure 3.18. montre que le type de résultat obtenu pour les cellules cultivées en EpiLife + est identique aussi bien dans les cellules contrôles (sans traitement) que dans les cellules traitées par la MβCD ou l'EGF. En effet, dans chaque condition, le marquage du récepteur HER2 est majoritairement en membrane cellulaire et on remarque un marquage intracellulaire dans quelques kératinocytes (figure 3.18).
Par contre, en ce qui concerne les kératinocytes cultivés en EpiLife -, il semble y avoir une légère différence entre les kératinocytes non traités et les kératinocytes traités par la MβCD ou l'EGF. En effet, le marquage du récepteur HER2 apparaît comme étant beaucoup plus membranaire dans les conditions traitées par la MβCD et l'EGF (figure 3.18.).

Comme nous l'illustre les photos fournies par le Dr. Stefan Stoll (figure 3.19.), le marquage du récepteur HER2 qu'il a obtenu semble complètement intracellulaire contrairement au marquage du récepteur HER1 qui lui est membranaire. Nous avons par contre obtenu un marquage membranaire (figure 3.17.). Nous avons pensé dans un premier temps que le marquage intracellulaire obtenu par Stoll était peut être dû à la présence de facteur de croissance dans le milieu de culture mais apparemment il n'en est rien, puisque le même type de marquage est obtenu lorsque les cellules sont cultivées en EpiLife + qui contient de l'EGF (figure 3.17). A l'heure actuelle, nous n'avons pas d'explications pour cette discordance.

3.3. Etude de la localisation cellulaire de HER3 dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire

3.3.1. Localisation cellulaire de la forme totale du récepteur HER3

Nous avons également réalisé un marquage du récepteur HER3 sur des kératinocytes confluents soit non traités, soit traités par la MβCD (1h) ou soit traités par l'EGF (1h) (figure 3.20.).
Les kératinocyes sont ensuite fixés, perméabilisés et marqués avec l'anticorps anti-HER3 (tableau 2.3. dans la section « Matériel et Méthodes »).

Le marquage obtenu suggère une localisation cytoplasmique du récepteur HER3 aussi bien dans la condition contrôle (sans traitement) que dans les cellules traitées par la MβCD ou par l'EGF (figure 3.20.). On remarque aussi cependant un marquage du nucléole dans les trois conditions testées. Cette observation est inattendue et suggère que le marquage n'a peut être pas fonctionné. Il faudrait bien sûr reproduire cette expérience (qui n'a été réalisée qu'une seule fois) afin de voir si ces résultats sont reproductibles ou peut être tenter d'améliorer le marquage grâce à l'étude de cellules positives pour HER3, les cellules MDA-MB-453 par exemple.

DISCUSSION
et
PERSPECTIVES

1. Le cholestérol et la physiologie des kératinocytes

Dans le cadre de sa thèse, Ralph Jans (2004) a montré qu'une déplétion en cholestérol des kératinocytes épidermiques provoque une activation de l'EGFR qui est indépendante de la présence de tout ligand et qui est suivie d'une activation des MAPK p38 et ERK.

Dans ce travail, nous avons poursuivi l'étude des implications éventuelles du cholestérol dans la physiologie des kératinocytes épidermiques humains en analysant les effets d'une déplétion en cholestérol (induite par un traitement avec la MβCD) sur l'activation des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF et sur leur localisation cellulaire.

En résumé, nos résultats indiquent qu'une déplétion en cholestérol active des cascades de signalisation dans les kératinocytes épidermiques humains en induisant la phosphorylation des récepteurs HER1, HER2 (mais pas de HER3) et des MAPK p38 et ERK.
Le traitement des kératinocytes par l'EGF, contrairement au traitement par la MβCD entraîne l'internalisation du récepteur de l'EGF (HER1). Cependant, nous n'avons pas pu prouver que l'internalisation observée suit la voie de la dégradation lysosomale.
Le récepteur HER2 semble passer d'une localisation intracellulaire à une localisation membranaire au fur et à mesure de la différenciation épidermique des kératinocytes.

1.1. Rôles éventuels de l'activation du récepteur de l'EGF induite par une déplétion en cholestérol

Les rôles des cascades de signalisation activées par l'intermédiaire du récepteur de l'EGF lors d'une déplétion en cholestérol sur la physiologie des kératinocytes restent à déterminer. Notons cependant que les MAPK ERK peuvent favoriser la survie des kératinocytes, par exemple suite à une irradiation aux rayons UVB (Jost et al., 1999 ; Peus et al., 2000). Cette activation pourrait éventuellement jouer un rôle comparable lors d'une déplétion en cholestérol qui est cytotoxique (Mathay, 2004).

Dans les kératinocytes, l'activation du récepteur de l'EGF due à un traitement par l'EGF induit l'expression de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) synthase et de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase (Harris et al., 2000), qui sont des enzymes impliqués dans la synthèse du cholestérol. De plus, nous savons que la fonction et le trafic du récepteur de l'EGF sont modulés par une déplétion en cholestérol d'une façon qui sert à augmenter la signalisation du récepteur (Pike et Casey, 2002). L'activation du récepteur de l'EGF par une déplétion en cholestérol pourrait éventuellement constituer un signal sensible au taux de cholestérol membranaire pouvant induire la synthèse de cholestérol dans le cas d'une diminution de ce taux.

1.2. L'activation de p38 suite à une déplétion en cholestérol

Nous ne disposons pas d'information sur le mécanisme éventuel qui induit la phosphorylation de p38 lors d'un traitement par la MβCD.

Récemment, les Rho GTPases ont été démontrées comme étant capables d'induire des cascades de signalisation qui activent les MAPK p38 dans les kératinocytes exposés à un stress hyperosmotique (Cheng et al., 2002).
Nous savons que, dans les fibroblastes, une extraction du cholestérol de la membrane plasmique « médiée » par une apolipoprotéine active des Rho GTPases et p38 par l'intermédiaire de ces Rho GTPases (Nofer et al., 2003). L'argument qu'une déplétion en cholestérol active une voie de signalisation Rho-dépendante est de plus supporté par une publication récente montrant que les Rho GTPases se trouvent associées aux « lipid rafts » (del Pozo et al., 2004). Il est donc très probable que l'extraction du cholestérol provoque une perturbation des « lipid rafts » qui affecte les signalisations associées. Comme on sait que les Rho GTPases régulent négativement l'activation des MAPK p38 (Cheng et al., 2002), on peut proposer que la signalisation induite par une déplétion en cholestérol passe par ces Rho GTPases. En effet, ce traitement pourrait inactiver les Rho GTPases et lever dès lors l'inhibition de phosphorylation des MAPK p38. La phosphorylation de p38 s'en trouverait alors accrue au niveau des kératinocytes. Cette hypothèse fait l'objet d'un autre mémoire dans notre laboratoire (Brumenil, 2005).

1.3. Implication éventuelle du cholestérol au niveau de la localisation du récepteur de l'EGF.

Comme décrit dans les résultats, un traitement par l'EGF, contrairement au traitement par la MβCD, entraîne une internalisation du récepteur de l'EGF. Cela suggère que ce n'est pas l'extraction du cholestérol membranaire qui provoque l'internalisation du récepteur HER1, mais la liaison d'un ligand. Grâce à la microscopie confocale, nous avons observé l'internalisation du récepteur HER1 suite à un traitement des kératinocytes par l'EGF. Afin de compléter les résultats obtenus, il serait convaincant de vérifier cette internalisation par une autre méthode. Une technique quantitative utilisant de l'EGF marqué radioactivement pour évaluer une liaison en surface cellulaire à 4°C permettrait de mesurer la liaison de l'EGF au récepteur. Si celle-ci diminue, c'est que le récepteur est bien internalisé. Cette technique, appliquée aux cellules traitées par la MβCD, pourra déterminer si une proportion du récepteur HER1 est internalisée dans ce cas ou pas. Il serait aussi intéressant de réaliser une cinétique afin d'étudier la localisation du récepteur de l'EGF lorsque les kératinocytes subissent une extraction du cholestérol membranaire de plus longue durée. En effet, après un temps de traitement par la MβCD de plus d'une heure, il est possible que le récepteur HER1 soit internalisé.

De nombreuses études ont déjà démontré que le récepteur de l'EGF est localisé au sein de domaines membranaires riches en cholestérol comme les « lipid rafts » et les « cavéoles » (Pike et Casey, 2002). Nos résultats n'ont pas pu prouver cette localisation mais doivent être améliorés.

Par ailleurs, il est également décrit dans la littérature que HER1, une fois internalisé, suit la voie de la dégradation lysosomale (Wiley, 2003). Dans nos résultats, aucune colocalisation n'est observée entre HER1 et les lysosomes.
Devant encore affiner les procédures de fixation pour le double marquage, il serait nécessaire de vérifier la technique.

1.4. Implication éventuelle du cholestérol au niveau de la localisation du récepteur HER2 et localisation du récepteur HER2 au cours de la différenciation

Suite aux résultats obtenus en tentant de localiser le récepteur HER2 (figure 3.18.), nous avons remarqué que, suite à un traitement par l'EGF, ce récepteur ne suit pas le récepteur HER1. Pourtant, l'activation de HER1 par l'EGF active aussi HER2 (De Potter, 2004). On admet actuellement que HER2, n'ayant pas de ligand connu, dimérise avec HER1.
Nos résultats montrent qu'en plus d'une localisation membranaire, HER2 présente une localisation intracellulaire, peut être endosomale, où HER2 rencontre HER1 internalisé.

De plus, nous avons observé la localisation de HER2 au cours de la différenciation des kératinocytes en culture (figure 3.17.), ainsi que dans une coupe de peau normale (figure 4.1.). Au niveau de la couche basale, le récepteur HER2 est observé à l'intérieur des kératinocytes, alors qu'une localisation membranaire est présente dès la couche granuleuse (Stoll et al., 2001 ; De Potter, 2004), suggérant la même relocalisation. Nous ignorons encore ce que cette relocalisation signifie pour la fonction du kératinocyte épidermique.

1.5. Implication éventuelle du cholestérol dans le psoriasis

Nos résultats montrent qu'une déplétion en cholestérol dans des cultures de kératinocytes induit l'expression précoce d'involucrine et réprime l'expression de K10. Le psoriasis est une pathologie épidermique caractérisée par une hyperprolifération, mais aussi par une différenciation anormale des kératinocytes dans les couches épidermiques profondes. En effet, l'expression de K14 est très faible et les marqueurs suprabasaux K1 et K10 sont également réprimés. Par contre, l'involucrine est exprimée de manière précoce et est présente dans toutes les couches suprabasales (Bernerd et al., 1992 ; Watanabe et al., 1991). Ces altérations de l'expression de marqueurs de différenciation dans l'épiderme psoriatique sont similaires aux altérations provoquées par une extraction du cholestérol membranaire des kératinocytes en culture. On peut donc proposer qu'une dérégulation du taux de cholestérol pourrait favoriser l'apparition de kératinocytes psoriatiques. L'utilisation de médicaments hypo-lipémiants peut d'ailleurs provoquer cette maladie (Proksch, 1995).

1.6. Mécanisme d'activation des récepteurs sans ligands

Comme décrit dans la littérature, les récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF peuvent être activés en l'absence de ligand soit par une extraction en cholestérol, soit par un traitement aux UV, ou soit par un stress à l'H_2O_2 (qui peut également résulter d'une irradiation aux UV) (Miller et al., 1994 ; Iordanov et al., 2002 ; Peus et al., 1998 ; Meves et al., 2001). Il serait donc intéressant de comparer les effets des UV et de l'H_2O_2 sur la localisation du récepteur de l'EGF après déplétion du cholestérol.

L'activation des récepteurs par un traitement par la MβCD est sans doute due à une désorganisation des « lipid rafts » qui entraîne la sortie du récepteur hors de ces microdomaines lipidiques et permet sa dimérisation avec un autre récepteur de la famille du récepteur de l'EGF (Chen et Resh, 2002 ; Pike et Casey, 2002).
Les ROS (reactive oxygen species) peuvent modifier plusieurs voies de signalisation intracellulaires dont celle des tyrosines phosphatases (Maher et Schubert, 2000). De plus, il

semble que l'inhibition de l'activité phosphatase induite par l'H_2O_2 soit requise pour que la phosphorylation des tyrosine induite par l'EGF se manifeste (Bae et al., 1997). Il est donc possible que l'augmentation de la phosphorylation des récepteurs HER observée suite au traitement par la MβCD ou par l'EGF soit due à une inhibition de phosphatases spécifiques.
Il serait alors intéressant d'étudier la mécanisme par laquelle cette inhibition s'effectue.

1.7. Conclusions et perspectives

Comme suggéré ci-dessus, il serait intéressant pour affiner et continuer notre étude d'effectuer des traitements aux UV ou à l'H_2O_2 sur des kératinocytes pour comparer les effets dus à l'extraction du cholestérol et de mesurer l'internalisation de HER1 par une technique quantitative.

De plus, il faudra localiser simultanément les récepteurs HER1 et HER2 dans des kératinocytes non traités, traités par la MβCD et traités par l'EGF. Cela permettrait d'établir si ces deux récepteurs sont associés à un moment donné et dans quelle(s) condition(s).

Pour affiner ces localisations, la microscopie électronique à transmission permettrait d'observer la localisation éventuelle des récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF dans des zones particulières de la membrane plasmique.

Il serait également utile de traiter des kératinocytes par l'ajout d'EGF et de MβCD. Cela permettrait de voir ce qu'il advient de la signalisation de l'EGF provenant des récepteurs HER quand on déplète en plus les cellules en cholestérol.

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce mémoire et dans d'autres travaux du laboratoire permet d'établir une représentation schématique qui expliquerait les effets d'une déplétion en cholestérol sur l'activation des récepteurs HER et des MAPK p38 et ERK ainsi que les différentes possibilités d'activation des récepteurs HER1 et HER2 (figure 4.2.).
Suite à un traitement par la MβCD, le récepteur de l'EGF situé dans les « lipid rafts » peut sortir de ces microdomaines lipidiques et dimériser avec un récepteur semblable. Cet homodimère est alors transphosphorylé et internalisé, mais il entraîne aussi la signalisation activant les MAPK p38 et ERK.
Dans les kératinocytes, il se pourrait que le récepteur de l'EGF doive être internalisé dans un compartiment endosomal pour dimériser avec le récepteur HER2 déjà présent dans ce compartiment. Ou bien, il faut que le compartiment endosomal contenant HER2 fusionne avec la membrane plasmique pour que le récepteur HER2 dimérise avec un récepteur de l'EGF. Cet hétérodimère HER1/HER2 subirait alors une transphosphorylation, une internalisation et activerait ensuite les MAPK p38 et ERK (Chang et al., 2003). Ceci reste à étudier.

Enfin, on a pensé depuis longtemps que l'activation des récepteurs de l'EGF entraînait leur internalisation systématique. Cependant, un article très récent remet cela en cause (Puri et al., 2005). En effet, il semblerait exister deux « machineries » différentes au niveau des « lipid rafts » : une « machinerie » de signalisation et une « machinerie » d'internalisation. D'après ces auteurs, les « lipid rafts » auraient la capacité d'assembler ces deux « machineries », mais celles-ci pourraient agir de manière indépendante (Puri et al., 2005). De plus, on sait que la disruption des « lipid rafts » par une déplétion en cholestérol inhibe l'endocytose clathrine et non-clathrine-dépendante (Johannes et Lamaze, 2002). Cela pourrait expliquer qu'aucune

internalisation de HER1 n'est détectée dans les kératinocytes lors d'un traitement par la MβCD. Mais puisque nos résultats montrent l'existence d'une signalisation, les deux « machineries », de signalisation et d'internalisation, semblent indépendantes dans les cellules épidermiques étudiées et dans nos conditions de culture.

En conclusion, la destruction des « lipid rafts » semble influencer l'activité des protéines de signalisation et engendrer des phénomènes différents au niveau de la signalisation et de l'internalisation. Cela montre la complexité de la régulation dans ces microdomaines lipidiques et leur importance dans la physiologie des kératinocytes épidermiques.

BIBLIOGRAPHIE

Bae, Y. S. et al. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **272**, 217-21 (1997).

Bang, B., Gniadecki, R. & Gajkowska, B. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* **14**, 266-72 (2005).

Bargmann, C. I., Hung, M. C. & Weinberg, R. A. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* **319**, 226-30 (1986).

Bernerd, F., Magnaldo, T. & Darmon, M. Delayed onset of epidermal differentiation in psoriasis. *J Invest Dermatol* **98**, 902-10 (1992).

Boyce, S. T. & Ham, R. G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* **81**, 33s-40s (1983).

Brumenil, V. Implication des Rho GTPases sur l'activation de p38 induite par la déplétion du cholestérol dans les kératinocytes (2005) (mémoire).

Carpenter, G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 143-8 (2003).

Chang, F. et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* **17**, 1263-93 (2003).

Chen, J. D. et al. Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the alpha 2 integrin subunit. *Exp Cell Res* **209**, 216-23 (1993).

Chen, X. & Resh, M. D. Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization. *J Biol Chem* **276**, 34617-23 (2001).

Chen, X. & Resh, M. D. Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **277**, 49631-7 (2002).

Cheng, H. et al. Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol. *J Cell Physiol* **192**, 234-43 (2002).

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

Cook, P. W., Pittelkow, M. R. & Shipley, G. D. Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors. *J Cell Physiol* **146**, 277-89 (1991).

De Potter, I. Analyse de l'expression des isoformes de NDF/Heréguline et de ses récepteurs proto-oncogènes dans leskératinocytes épidermiques in vivo et en culture, 1-64 (1996) (mémoire)

De Potter, I. Y., Poumay, Y., Squillace, K. A. & Pittelkow, M. R. Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation. *Exp Cell Res* **271**, 315-28 (2001).

De Potter, I. Etude des fonctions du système Heréguline-récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF dans les kératinocytes épidermiques humains, Presses universitaires de Namur, 9-264 (2004) (thèse).

del Pozo, M. A. et al. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **303**, 839-42 (2004).

Eckert, R. L. & Green, H. Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell* **46**, 583-9 (1986).

Falls, D. L. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* **284**, 14-30 (2003).

Garmyn, M. et al. Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27. *J Invest Dermatol* **117**, 1290-5 (2001).

Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M. & Hynes, N. E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J* **16**, 1647-55 (1997).

Guy, P. M., Platko, J. V., Cantley, L. C., Cerione, R. A. & Carraway, K. L., 3rd. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8132-6 (1994).

Harris, I. R., Hoppner, H., Siefken, W., Farrell, A. M. & Wittern, K. P. Regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase by insulin and epidermal growth factor in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* **114**, 83-7 (2000).

Harris, R. C., Chung, E. & Coffey, R. J. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* **284**, 2-13 (2003).

Higashiyama, S., Abraham, J. A., Miller, J., Fiddes, J. C. & Klagsbrun, M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* **251**, 936-9 (1991).

Hommelgaard, A. M., Lerdrup, M. & van Deurs, B. Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor. *Mol Biol Cell* **15**, 1557-67 (2004).

Iordanov, M. S. et al. The UV (Ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* **22**, 5380-94 (2002).

Jans, R., Atanasova, G., Jadot, M. & Poumay, Y. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol* **123**, 564-73 (2004).

Jans, R. Etude du rôle des lysosomes et du cholestérol au cours de la différenciation des kératinocytes épidermiques, Presses universitaires de Namur, 11-179 (2004) (thèse).

Johannes, L. & Lamaze, C. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* **3**, 443-51 (2002).

Jorissen, R. N. et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* **284**, 31-53 (2003).

Jost, M., Class, R., Kari, C., Jensen, P. J. & Rodeck, U. A central role of Bcl-X(L) in the regulation of keratinocyte survival by autocrine EGFR ligands. *J Invest Dermatol* **112**, 443-9 (1999).

Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C. & Aaronson, S. A. 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**, 9193-7 (1989).

Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807-69 (2001).

Laborda, J. 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. *Nucleic Acids Res* **19**, 3998 (1991).

Levkowitz, G. et al. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* **12**, 3663-74 (1998).

Lin, S. Y. et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* **3**, 802-8 (2001).

Maher, P. & Schubert, D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1287-305 (2000).

Mane, S. M. et al. Purification and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins. *Arch Biochem Biophys* **268**, 360-78 (1989).

Marquardt, H. et al. Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4684-8 (1983).

Massague, J. Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem* **265**, 21393-6 (1990).

Mathay, C. Implication des protéines kinases C et de p38 MAPK dans la modulation de marqueurs de différenciation épidermique dans des kératinocytes déplétés en cholestérol, Presses universitaires de Namur, 1-65 (2004) (mémoire)

Meves, A., Stock, S. N., Beyerle, A., Pittelkow, M. R. & Peus, D. H(2)O(2) mediates oxidative stress-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation. *Toxicol Lett* **122**, 205-14 (2001).

Miller, C. C., Hale, P. & Pentland, A. P. Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway. Evidence for UVB-induced epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* **269**, 3529-33 (1994).

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**, 11-24 (1982).

Mroczkowski, B., Reich, M., Chen, K., Bell, G. I. & Cohen, S. Recombinant human epidermal growth factor precursor is a glycosylated membrane protein with biological activity. *Mol Cell Biol* **9**, 2771-8 (1989).

Nagy, P. et al. Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J Cell Sci* **115**, 4251-62 (2002).

Nofer, J. R. et al. Involvement of Cdc42 signaling in apoA-I-induced cholesterol efflux. *J Biol Chem* **278**, 53055-62 (2003).

Ono, K. & Han, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**, 1-13 (2000).

Peles, E. et al. Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/heregulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. *Embo J* **12**, 961-71 (1993).

Peus, D. et al. H2O2 is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* **110**, 966-71 (1998).

Peus, D., Vasa, R. A., Meves, A., Beyerle, A. & Pittelkow, M. R. UVB-induced epidermal growth factor receptor phosphorylation is critical for downstream signaling and keratinocyte survival. *Photochem Photobiol* **72**, 135-40 (2000).

Piepkorn, M., Predd, H., Underwood, R. & Cook, P. Proliferation-differentiation relationships in the expression of heparin-binding epidermal growth factor-related factors and erbB receptors by normal and psoriatic human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **295**, 93-101 (2003).

Pike, L. J. & Casey, L. Cholesterol levels modulate EGF receptor-mediated signaling by altering receptor function and trafficking. *Biochemistry* **41**, 10315-22 (2002).

Pike, L. J. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**, 655-67 (2003).

Pittelkow, M. R., Cook, P. W., Shipley, G. D., Derynck, R. & Coffey, R. J., Jr. Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Differ* **4**, 513-21 (1993).

Ponec, M., Havekes, L., Kempenaar, J. & Vermeer, B. J. Cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: differences in the regulation of cholesterol synthesis. *J Invest Dermatol* **81**, 125-30 (1983).

Poumay, Y. & Pittelkow, M. R. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J Invest Dermatol* **104**, 271-6 (1995).

Poumay, Y., Herphelin, F., Smits, P., De Potter, I. Y. & Pittelkow, M. R. High-cell-density phorbol ester and retinoic acid upregulate involucrin and downregulate suprabasal keratin 10 in autocrine cultures of human epidermal keratinocytes. *Mol Cell Biol Res Commun* **2**, 138-44 (1999).

Proksch, E. [Antilipemic drug-induced skin manifestations]. *Hautarzt* **46**, 76-80 (1995).

Puri, C. et al. Relationships between EGFR Signaling-competent and Endocytosis-competent Membrane Microdomains. *Mol Biol Cell* **16**, 2704-18 (2005).

Rajendran, L. & Simons, K. Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* **118**, 1099-102 (2005).

Rheinwald, J. G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331-43 (1975).

Roop, D. R., Krieg, T. M., Mehrel, T., Cheng, C. K. & Yuspa, S. H. Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **48**, 3245-52 (1988).

Salomon, D. S., Kim, N., Saeki, T. & Ciardiello, F. Transforming growth factor-alpha: an oncodevelopmental growth factor. *Cancer Cells* **2**, 389-97 (1990).

Sando, G. N. et al. Caveolin expression and localization in human keratinocytes suggest a role in lamellar granule biogenesis. *J Invest Dermatol* **120**, 531-41 (2003).

Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25 (2000).

Schlessinger, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* **110**, 669-72 (2002).

Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G. & Todaro, G. J. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6528-32 (1988).

Shoyab, M., Plowman, G. D., McDonald, V. L., Bradley, J. G. & Todaro, G. J. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* **243**, 1074-6 (1989).

Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-9 (2000).

Simons, K. & Ikonen, E. How cells handle cholesterol. *Science* **290**, 1721-6 (2000).

Stoll, S. W. et al. Differential utilization and localization of ErbB receptor tyrosine kinases in skin compared to normal and malignant keratinocytes. *Neoplasia* **3**, 339-50 (2001).

Tzahar, E. et al. ErbB-3 and ErbB-4 function as the respective low and high affinity receptors of all Neu differentiation factor/heregulin isoforms. *J Biol Chem* **269**, 25226-33 (1994).

Tzahar, E. et al. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *Embo J* **16**, 4938-50 (1997).

Wang, H. Q. et al. Epidermal growth factor receptor-dependent, NF-kappaB-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases-3, -8, and -9 in human keratinocytes. *J Biol Chem* **278**, 45737-45 (2003).

Wang, Q. et al. Extracellular matrix activity and caveolae events contribute to cell surface receptor activation that leads to MAP kinase activation in response to UV irradiation in cultured human keratinocytes. *Int J Mol Med* **15**, 633-40 (2005).

Watanabe, S., Wagatsuma, K., Ichikawa, E. & Takahashi, H. Abnormal distribution of epidermal protein antigens in psoriatic epidermis. *J Dermatol* **18**, 143-51 (1991).

Wiley, H. S. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* **284**, 78-88 (2003).

Yamamoto, T. et al. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* **319**, 230-4 (1986).