



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Implication des Protéine kinases C et de p38MAPK dans la modulation de marqueurs de différenciation épidermique dans des kératinocytes déplétés en cholestérol

Mathay, Conny

Award date:
2004

[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.

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20



19 JUN 2004

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

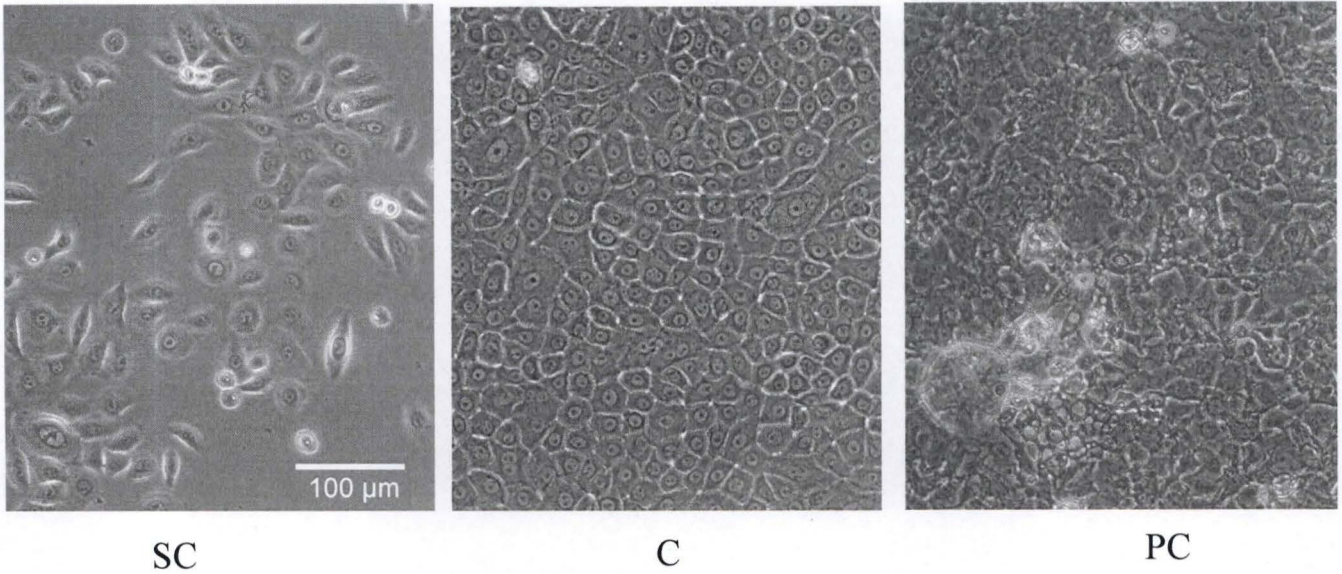
Faculté des Sciences

**IMPLICATION DES PROTEINE KINASES C ET DE p38MAPK DANS LA MODULATION
DE MARQUEURS DE DIFFERENCIATION EPIDERMIQUE DANS DES
KERATINOCYTES DEPLETES EN CHOLESTEROL**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Conny MATHAY
Juin 2004

A.



B.

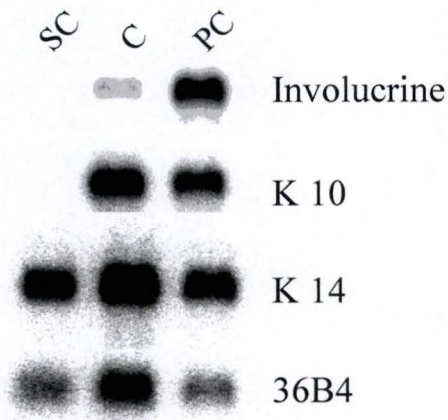


Figure 3-1: **A.** Observation en microscopie à contraste de phase de cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains aux stades de sous-confluence (SC), confluence (C) et post-confluence (PC) (barre = 100 µm)

B. Analyse par Northern blot de l'expression des marqueurs de différenciation en fonction du stade cellulaire.

Les kératinocytes non traités sont extraits aux stades de sous-confluence (SC), confluence (C) et post-confluence (PC). Les ARNm transférés sur une membrane en PDVF sont hybridés avec des sondes spécifiques pour l'involucrine, la kératine 10 (K 10), la kératine 14 (K 14). L'expression de la protéine ribosomale 36B4 sert de contrôle de charge.

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>

Implication des Protéine Kinases C et de p38MAPK dans la modulation de marqueurs de différenciation épidermique dans des kératinocytes déplétés en cholestérol

MATHAY Conny

Résumé

Récemment le cholestérol a été proposé comme un régulateur des premières étapes de la différenciation épidermique à travers les "lipid rafts". Ces microdomaines membranaires sont riches en cholestérol et jouent probablement un rôle important dans la signalisation cellulaire. L'extraction du cholestérol membranaire par un traitement à la méthyl- β -cyclodextrine perturbe la structure des "lipid rafts" et la signalisation sous-jacente. Une déplétion en cholestérol active les MAP kinases p38 et induit une expression augmentée d'involucrine, un marqueur tardif de la différenciation épidermique. Notre étude s'est concentrée sur la signalisation et notamment sur l'implication des protéine kinases C (PKC) et des MAP kinases p38 dans les voies de transduction du signal induites par une extraction de cholestérol membranaire. Un traitement à l'ester de phorbol (TPA) active les PKC et les MAP kinases p38 et induit la différenciation des kératinocytes. Les effets d'un traitement au TPA et d'une déplétion en cholestérol sur l'expression de marqueurs de différenciation sont comparables. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des MAP kinases p38 α , β a permis d'identifier des différences entre les effets produits par ces deux traitements: la déplétion en cholestérol active les isoformes p38 α , β alors que le traitement au TPA active surtout l'isoforme p38 δ . L'utilisation d'un inhibiteur des PKC suggère que les PKC ne sont pas impliquées dans la réponse à la déplétion en cholestérol dans des kératinocytes. Des études complémentaires seront nécessaires pour encore mieux comprendre le rôle du cholestérol dans la différenciation épidermique: il serait ainsi intéressant de rechercher si d'autres activateurs des MAP kinases p38, les Rho GTPases par exemple, pourraient être responsables de la signalisation provoquée par une déplétion en cholestérol.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2004

Promoteur: Y. Poumay

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Professeur Yves Poumay pour mon accueil chaleureux dans le département d'Histologie-Embryologie, je suis reconnaissante pour l'encadrement bienveillant, les bons conseils et la disponibilité de Monsieur Poumay qui par ses grandes compétences a su éveiller mon intérêt en recherche scientifique...

J'exprime mes remerciements les plus sincères à :

Françoise Herphelin pour ses conseils, son bon cœur et tout le savoir-faire qu'elle a partagé avec moi. Toujours intéressée, disponible et de bonne humeur, elle rend l'ambiance de travail particulièrement agréable.

Ganka Atanosova pour son assistance, son soutien et sa gentillesse.

Ralph Jans et Frédéric Dupont pour leurs bons conseils, disponibilité et sympathie.

J'exprime également toute ma reconnaissance à l'équipe d'Histologie-Embryologie, y compris Monsieur le Professeur Michel Herin pour ses encouragements, Madame Michèle Leclercq-Smekens pour l'intérêt qu'elle m'a témoigné, Raphael Deom et Daniel Van Vlaender pour leurs conseils, Emilie Bera pour sa bonne humeur et tous les autres membres du département permettant la bonne ambiance.

Je tiens aussi à remercier toute ma famille et surtout mes parents pour m'avoir permis la réalisation de mes projets et de m'avoir encouragée tout au long de ce travail. A ne pas oublier mes amis, particulièrement Isabelle, Aurélia et Quentin pour leur amitié et disponibilité et Ariane Messinne pour les moments merveilleux, pas toujours sérieux qu'on a partagés dans le laboratoire et au kot.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1. La peau	5
1.1. Généralités.....	5
1.2. L'épiderme	6
1.2.1. L'organisation de l'épiderme	6
1.2.2. Le kératinocyte.....	7
1.2.3. Les modèles de culture des kératinocytes épidermiques humains	8
2. La différenciation épidermique	9
2.1. La différenciation du kératinocyte	9
2.1.1. La prolifération et la différenciation précoce des kératinocytes	9
2.1.2. La différenciation épidermique tardive et terminale	10
2.1.3. La différenciation épidermique module la composition lipidique des kératinocytes	11
3. Le cholestérol	12
3.1. Généralités.....	12
3.2. Importance physiologique du cholestérol	12
3.2.1. Le cholestérol membranaire	13
3.2.2. Les "lipid rafts"	13
3.3. Effets d'une extraction de cholestérol membranaire dans des kératinocytes épidermiques	14
4. La signalisation cellulaire	17
4.1. Généralités.....	17
4.2. La famille des protéine kinases C	17
4.2.1. Propriétés structurales des PKC	18
4.2.2. Mécanismes d'activation des PKC.....	18
4.3. Les MAP kinases.....	19
4.3.1. Les MAP kinases p38.....	20
5. Les objectifs du travail	22

MATERIEL & METHODES

1. Culture de kératinocytes épidermiques humains	24
1.1. Etablissement de cultures primaires à partir de prélèvements	24
1.2. Etablissement de cultures secondaires	25
1.3. Congélation des kératinocytes.....	25
1.4. Etablissement de cultures tertiaires	26
2. Traitement des kératinocytes	26
2.1. Déplétion en cholestérol des kératinocytes	26
2.2. Traitement au TPA des kératinocytes	26
2.3. Inhibition de protéine kinases	27
3. Test de viabilité cellulaire: test MTT	27
4. Extraction d'ARNm et analyse de l'expression génique par Northern blot	27
4.1. Préparation des oligo-dT couplés à la cellulose	28
4.2. Extraction d'ARNm	28

4.3. Electrophorèse et transfert des ARNm (Northern blot)	29
4.4. Hybridation des "Northern blots" avec des sondes d'ADNc marquées au ³² P	30
5. Analyse des protéines par Western blot.....	32
6. Marquage en immunofluorescence.....	33

RESULTATS & DISCUSSION

1. Etude du modèle de culture des kératinocytes humains en culture autocrine	36
1.1. Analyse morphologique en microscopie à contraste de phase	36
1.2. Analyse de l'expression de marqueurs de différenciation.....	36
2. Etude de l'implication des MAP kinases p38 dans la signalisation induite par une déplétion en cholestérol membranaire	37
2.1. Etude des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire	37
2.1.1. Détermination de la cytotoxicité des traitements	38
2.1.2. Effets d'une déplétion en cholestérol sur la physiologie du kératinocyte en culture	38
2.2. Etude des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire traités avec des inhibiteurs de p38	39
2.2.1. Effets d'une déplétion en cholestérol en présence d'inhibiteurs de p38 sur la physiologie des kératinocytes en culture.....	40
2.3. Détermination du stade cellulaire idéal pour extraire le cholestérol membranaire de kératinocytes en culture.....	41
2.4. Extraction du cholestérol membranaire par une concentration plus élevée en méthyl-β-cyclodextrine	42
3. Etude de l'implication des protéine kinases C (PKC) dans la signalisation induite par une déplétion en cholestérol membranaire	45
3.1. Effets d'une déplétion en cholestérol en présence d'un inhibiteur de PKC sur la physiologie du kératinocyte en culture.....	45
3.2. Test de cytotoxicité de la molécule GF 109203X, un inhibiteur des PKC	48
3.2.1. Analyse morphologique en microscopie à contraste de phase	48
3.2.2. Test de cytotoxicité des kératinocytes traités par le TPA et par l'inhibiteur GF 109203X	49
3.3. Effets de l'inhibiteur GF 109203X sur la physiologie des kératinocytes déplétés en cholestérol	50
4. Etude morphologique des kératinocytes déplétés en cholestérol.....	51
4.1. Localisation subcellulaire des p38 kinases dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire.....	51
4.2. Localisation subcellulaire d'involucrine dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire.....	52
5. Implication des PKC dans les kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire	53

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

1. Caractérisation de la physiologie des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire.....	55
--	-----------

1.2. Implication des isoformes de MAP kinases p38 et leurs fonctions éventuelles dans la signalisation provoquée par une déplétion en cholestérol membranaire.....	55
1.3. Les protéine kinases C, des régulateurs de l'activité des MAP kinases p38 en cas de déplétion en cholestérol membranaire ?.....	56
1.4. Les Rho GTPases, des régulateurs de l'activité des MAP kinases p38 en cas de déplétion en cholestérol membranaire ?.....	57
1.5. Les effets éventuels d'une déplétion en cholestérol membranaire sur la différenciation épidermique et le psoriasis, une pathologie épidermique	57
1.6. Implication éventuelle des signalisations via les "lipid rafts" et les intégrines dans le phénotype des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire	58

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

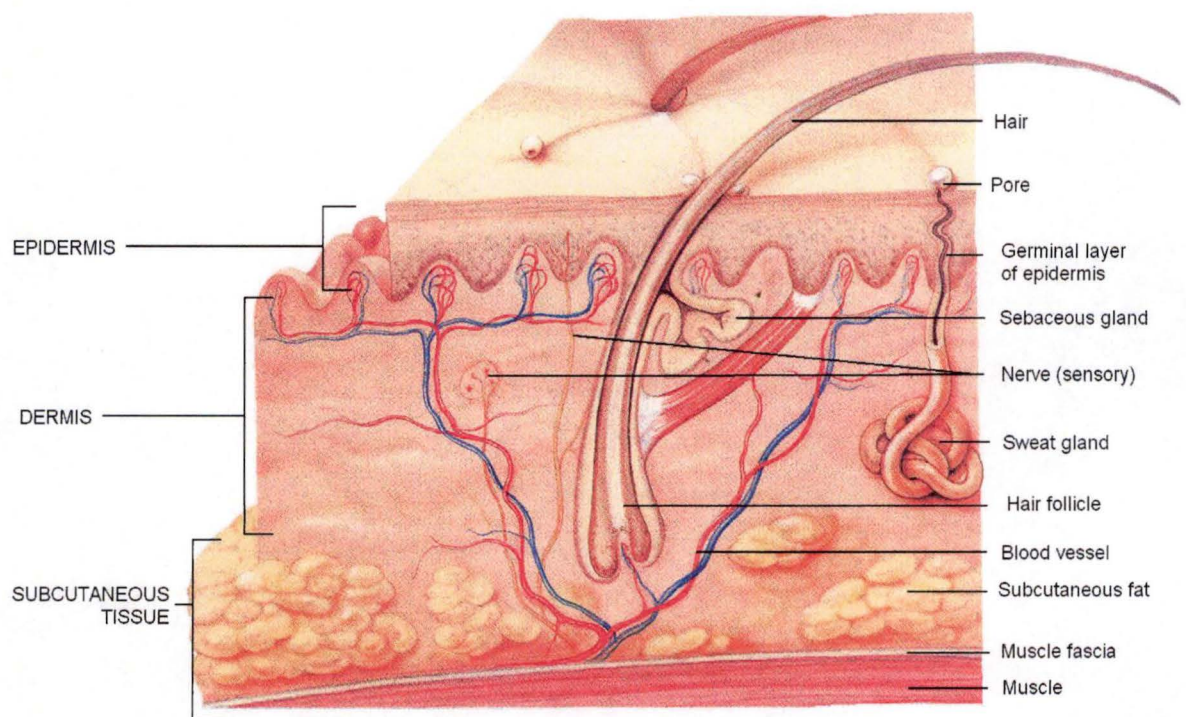


Figure 1-1 : Structure de la peau. La peau est formée par l'épiderme, le derme et l'hypoderme.
 (<http://www.emergencymedicaled.com/Illustrations/TheAnatomyoftheSkin.htm>)

1. La peau

1.1. Généralités

La peau, l'organe le plus volumineux du corps humain, revêt la surface corporelle. La peau représente environ 6% du poids corporel et recouvre une superficie de 1,7 à 2 m² chez l'adulte. En fonction des différentes régions du corps et de leurs besoins physiologiques respectifs, la peau varie par son épaisseur, sa couleur et la présence ou non de poils, glandes et ongles. Un des rôles les plus importants de la peau est la protection des organes contre les agressions de l'environnement. La peau est subdivisée en trois parties communes à tous les types de peaux: l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure 1-1).

L'**épiderme** se trouve à l'interface corps-environnement. Le kératinocyte est le type cellulaire majoritaire de l'épiderme où les cellules s'organisent en assises superposées. Les kératinocytes subissent un programme de différenciation complexe durant lequel les cellules migrent vers la surface.

Le **derme** est formé de tissu conjonctif richement vascularisé. Les cellules-clé du derme sont les fibroblastes, ils sécrètent la matrice extracellulaire fibroélastique et synthétisent des facteurs de croissance et de différenciation. Le derme et l'épiderme comportent de nombreuses terminaisons sensorielles. Dans le derme ces récepteurs sensoriels sont disposés dans une matrice extracellulaire fibroélastique. Le collagène de cette matrice rend la peau résistante, alors que les fibres élastiques lui procurent son élasticité. Les annexes cutanées, les glandes sudoripares, les glandes sébacées et les follicules pileux, sont ancrées dans la matrice extracellulaire.

L'**hypoderme** est un tissu conjonctif cellulaire composé partiellement de matrice extracellulaire, mais qui présente surtout de nombreux lobules de tissu adipeux.

La peau constitue non seulement une barrière physique vis-à-vis d'agressions, mais elle remplit également des fonctions bien précises :

- **Protection** : La peau, surtout l'épiderme, protège l'organisme contre les traumatismes physiques, la perte de fluides internes et les agressions environnementales. Ces agressions peuvent être causées par la pénétration d'agents étrangers, les rayons ultraviolets et des températures extrêmes.
- **Thermorégulation** : La régulation de la température corporelle peut s'effectuer via les tissus sous-cutanés adipeux et les poils. La thermorégulation contrôle la déperdition de chaleur au niveau des réseaux capillaires sous-cutanés grâce aux anastomoses artérioveineuses. A faible température les lobules adipeux servent de réserve énergétique, alors qu'en cas d'excès de chaleur, les sécrétions des glandes sudoripares servent à refroidir la peau via la transpiration.
- **Sensation** : A côté de ces propriétés mécaniques, la peau est un lieu d'échange et de communication entre les milieux externe et interne. La peau, l'organe du tact, est à l'origine de la sensation nerveuse. En effet, le sens du toucher provient des nombreuses terminaisons nerveuses, qui sont capables de transmettre des sensations tactiles, thermiques et douloureuses.
- **Métabolisme** : La peau intervient également dans le métabolisme corporel par la synthèse de vitamine D à partir de cholestérol au niveau de l'épiderme et des réserves énergétiques sous forme de triglycérides sont stockées dans l'hypoderme.

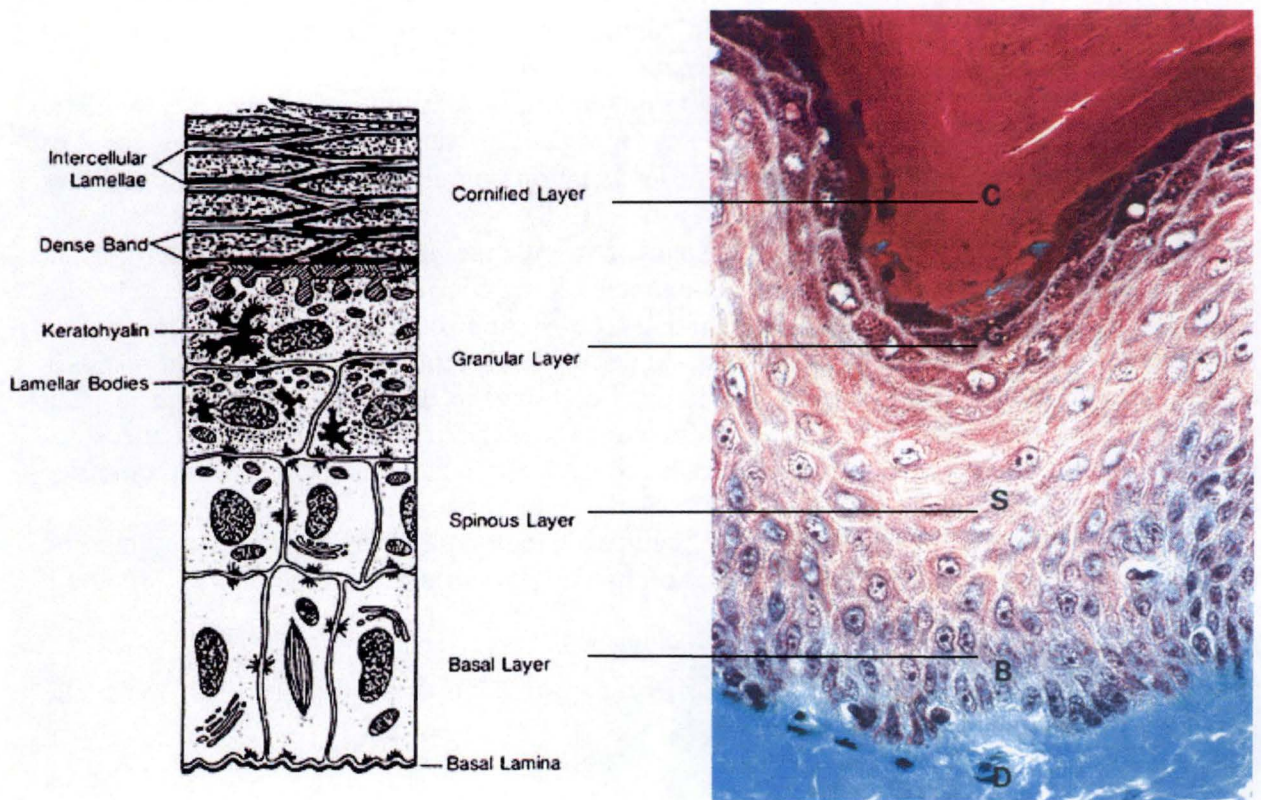


Figure 1-2: Organisation des couches de kératinocytes dans l'épiderme. Coloration au trichrome de Masson.

1.2. L'épiderme

La majorité de la surface corporelle est recouverte d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé mince E.P.S.K.(B). L'épiderme non vascularisé est surtout formé de kératinocytes dont la différenciation aboutit à la formation d'une couche de cellules mortes remplies de kératine.

L'épaisseur épidermique idéale est maintenue par une prolifération en profondeur au niveau de la couche basale et une desquamation des cellules en surface. Ainsi une régulation précise maintient l'équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaire et garantit de cette façon l'homéostasie de l'épiderme.

L'épaisseur de l'épiderme varie entre 75 et 150 μm à l'exception des paumes des mains et des plantes des pieds où son épaisseur peut atteindre 600 μm , à ce niveau il est dénommé épithélium pavimenteux stratifié kératinisé épais E.P.S.K.(A). La force de cohésion de l'épiderme est une des caractéristiques importantes de ce tissu, cette cohésion est assurée par la présence d'un très grand nombre de jonctions cellulaires renforcées par un réseau filamenteux intracellulaire composé de filaments intermédiaires de kératine.

Les kératinocytes constituent le type cellulaire majoritaire de l'épiderme et forment environ 90% de la population cellulaire épidermique, les kératinocytes sont responsables de la morphologie caractéristique de l'épiderme. Dans les couches épidermiques non kératinisées, les kératinocytes sont accompagnés de cellules de Langerhans actives au niveau du système immunologique, de cellules de Merkel associées à des terminaisons nerveuses et de mélanocytes responsables de la pigmentation de la peau. La jonction entre le derme et l'épiderme est assurée par une lame basale spécialisée, la jonction épidermo-dermique. Cette lame basale qui forme la barrière entre le derme et l'épiderme, est composée de trois couches distinctes: la lamina lucida, la lamina densa et la lamina sub-basale. Le collagène de type IV et les laminines assurent la cohésion de la jonction épidermo-dermique et représentent avec l'héparan sulfate et l'entactine les constituants essentiels de la lame basale. La laminine-5 de la jonction épidermo-dermique s'associe avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ des kératinocytes basaux au niveau des hémidesmosomes; ces derniers renforcent l'ancrage des kératinocytes épidermiques sur le derme sous-jacent.

1.2.1. L'organisation de l'épiderme

L'épiderme présente une organisation pluristratifiée complexe, témoignant d'une différenciation progressive des kératinocytes. Depuis la base jusqu'à surface du tissu épidermique, le kératinocyte subit un processus de différenciation complexe, aboutissant à la stratification et à la kératinisation de l'épiderme. Cette différenciation définitive peut être observée à travers un changement morphologique qui est accompagné d'une migration cellulaire. Au niveau des E.P.S.K.(B), on peut distinguer quatre couches épidermiques: la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (figure 1-2).

- La **couche basale** constitue l'assise germinative de l'épiderme. Il s'agit de la couche épidermique la plus profonde, elle est formée d'une assise de cellules cubiques. Les cellules de l'assise germinative présentent des radicules au niveau de leur pôle basal, qui renforcent l'adhérence de l'épiderme au derme via la jonction épidermo-dermique. Les cellules souches de la couche basale assurent le renouvellement constant de

l'épiderme grâce à leur pouvoir prolifératif illimité. Les 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. Ces cellules à taux de prolifération élevé subissent quelques cycles de multiplication et génèrent une population de kératinocytes qui vont sortir irréversiblement du cycle cellulaire et se différencier.

- La **couche épineuse** surmonte la couche basale et forme la plus grande partie de l'épiderme vivant comportant plusieurs assises de kératinocytes. Les kératinocytes de cette couche sont caractérisés par une adhérence intercellulaire importante via les desmosomes. L'abondance de ces jonctions intercellulaires donne lieu à une morphologie en épine des contours cellulaires, d'où le nom de couche épineuse. Les cellules épineuses des assises superficielles augmentent de taille et s'aplatissent progressivement. Les kératinocytes épineux possèdent encore une batterie d'organelles fonctionnels et présentent une synthèse active de protéines.
- La **couche granuleuse** constitue la dernière couche nucléée de l'épiderme, elle est formée d'une à deux assises de kératinocytes d'aspect pavimenteux. Le volume cellulaire s'accroît et le cytoplasme des kératinocytes de cette couche contient des grains de kératohyaline, visibles en microscopie photonique. Les cellules contiennent aussi des vésicules remplies de glycolipides et phospholipides, les corps d'Odland (ou corps lamellaires). Avant d'atteindre la couche cornée, le noyau des kératinocytes entre en pycnose et les autres organelles disparaissent progressivement.
- La **couche cornée** est composée de cellules mortes, les cornéocytes. Ces cellules anucléées dotées d'un cytosquelette robuste formé par de nombreux filaments de kératine et d'une enveloppe cornée sous-membranaire épaisse, forment une barrière fonctionnelle entre l'organisme et son environnement. Les cornéocytes sont enrobés de lipides, qui assurent l'imperméabilité épidermique. Le modèle des briques (cornéocytes) et du mortier (lipides intercellulaires) schématise bien la couche cornée. Au niveau de la couche superficielle cornée, les cellules mortes finissent par desquamer.

Chez l'homme, la différenciation d'une cellule basale en cellule desquamante dure environ un mois.

1.2.2. Le kératinocyte

Le kératinocyte produit des protéines fibreuses, les kératines. Ces protéines cytosquelettiques appartiennent à la famille des filaments intermédiaires. Les kératines sont un groupe de protéines d'origine multigénique qui sont classées en deux types: les kératines acides et les kératines basiques.

Les kératines présentent toutes une même organisation structurale : le domaine central en hélice α d'environ 310 acides aminés est entouré d'un domaine carboxy- et amino-terminal de taille très variable. La polymérisation des filaments de kératine (figure 1-3) débute obligatoirement par la formation d'un hétérodimère comprenant une kératine acide et une kératine basique. La cohésion entre les deux protéines est garantie par l'établissement de nombreux ponts disulfure. Les hétérodimères de kératine sont repris deux par deux en tétramères. Le tétramère ou protofilament est l'unité de base des filaments intermédiaires. Huit protofilaments forment un filament intermédiaire de 10 nm de diamètre. La juxtaposition de

plusieurs filaments intermédiaires forme un réseau. Ces réseaux de kératines relient les régions périnucléaires du kératinocyte aux desmosomes et sont essentiels pour la cohésion et l'élasticité de l'épiderme.

Lorsque les kératinocytes entament leur différenciation et migrent vers la surface cutanée, les gènes qui contrôlent la synthèse des kératines s'expriment par paire et de manière successive. Le kératinocyte doit donc coordonner l'expression d'au moins deux gènes pour produire un réseau de kératines dans son cytoplasme. L'expression de paires de gènes codant pour des kératines est spécifique d'un état de différenciation cellulaire. D'après une classification établie par Moll et al. (1982), les cellules mitotiquement actives de la couche basale expriment principalement les kératines 5 et 14, tandis que les cellules en cours de différenciation expriment plutôt la paire des kératine 1 et 10.

1.2.3. Les modèles de culture des kératinocytes épidermiques humains

Pour 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 pour permettre la prolifération des kératinocytes épidermiques qui ont été préalablement ensemencés sous forme d'une suspension de cellules épidermiques dissociées. Leur milieu de culture contient du sérum de veau fœtal et des facteurs de croissance tels que l'insuline et l'Epidermal Growth Factor (EGF). Dans ces conditions, les kératinocytes, après adhésion au substrat, se multiplient rapidement en formant des clones qui s'étendent de plus en plus au dessus de la couche de fibroblastes. Le désavantage de cette couche nourricière est que les fibroblastes fournissent toute une série de facteurs de croissance mal identifiés, ce qui rend la détermination de la composition exacte du milieu impossible. En plus, dans ce modèle immergé, les marqueurs de différenciation des couches suprabasales, tels que les kératines 1 et 10 ne s'expriment pas.

Dans le souci d'améliorer le contrôle des cultures, Boyce et Ham (1983) développent un milieu sans sérum : le MCDB 153. Avec ce milieu, les kératinocytes ne nécessitent plus de couche nourricière, néanmoins il faut encore ajouter des facteurs de croissance comme l'EGF et l'insuline, ainsi que des extraits de glande pituitaire bovine pour permettre les premières étapes de culture primaire. Boyce et Ham démontrent que le taux de prolifération des kératinocytes augmente avec la concentration du milieu en calcium jusqu'à une valeur seuil de 0,1 M. A une concentration en calcium de 1,0 M, le taux de prolifération des kératinocytes diminue et la différenciation se met en place.

Une dizaine d'années plus tard, en 1991, Cook et al. montrent qu'à partir d'un certain stade de culture, les facteurs de croissance EGF et TGF α (Transforming Growth Factor α) ne sont plus nécessaires pour la prolifération des kératinocytes épidermiques. A partir d'une densité cellulaire de 1 000 cellules par cm², les kératinocytes acquièrent une autonomie de prolifération et deviennent capables de sécréter de l'amphiréguline, un facteur de croissance pouvant se lier au récepteur de l'EGF. Pittelkow et al. (1993) montrent qu'en culture autocrine l'occupation du récepteur de l'EGF est essentielle pour la prolifération cellulaire. Le passage en culture autocrine permet de contrôler la composition du milieu et les cellules peuvent suivre un processus de différenciation proche de celui des kératinocytes *in vivo* (Poumay & Pittelkow, 1995).

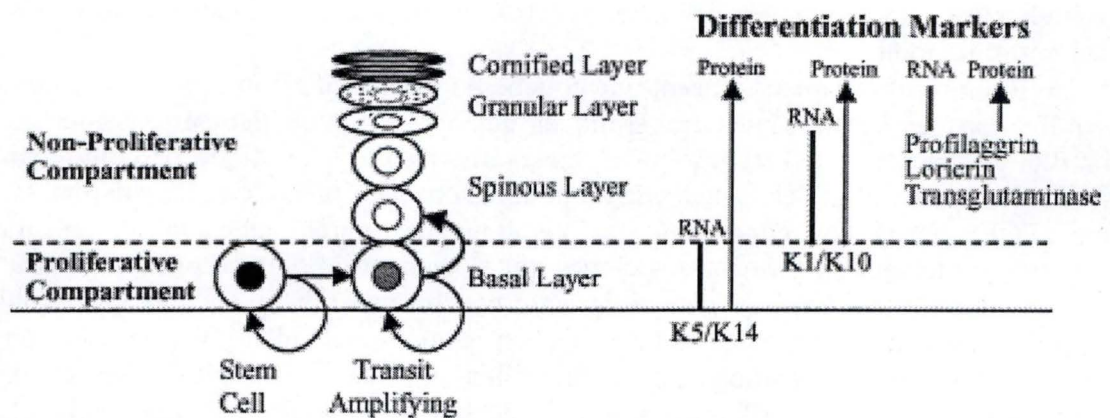


Figure 1- 4: Les compartiments de prolifération et de différenciation de la peau. Les cellules souches épidermiques donnent naissance aux cellules amplificatrices transitoires qui sont responsables de la majorité d'activité proliférative dans la couche basale. Les kératinocytes de la couche basale expriment les kératines 5 et 14 (K5/K14), mais lors de leur migration dans les couches suprabasales, ils perdent le contact avec la jonction épidermo-dermique. Les kératinocytes suprabasaux quittent le cycle cellulaire de manière irréversible et expriment les kératines 1 et 10 (K1/K10). Dans les strates épidermiques plus superficielles, les kératinocytes expriment les marqueurs de différenciation involucrine, profilaggrine, loricrine et transglutaminase.

2. La différenciation épidermique

2.1. La différenciation du kératinocyte

Au niveau de l'épiderme, on peut distinguer un compartiment de prolifération et un compartiment de différenciation (figure 1-4). Le compartiment de prolifération est formé par la couche profonde (basale) de l'épiderme, alors que le compartiment de différenciation regroupe toutes les couches suprabasales où le processus de différenciation est mis en route. De façon simpliste, la différenciation épidermique peut être décrite comme un processus qui réorganise le kératinocyte basal en une cellule capable de former une unité de structure rigide, le cornéocyte (Eckert, 1989).

2.1.1. La prolifération et la différenciation précoce des kératinocytes

Les cellules souches de la couche basale sont dotées d'une capacité infinie de prolifération et d'auto-renouvellement, mais leur cycle cellulaire est lent. Ces cellules souches donnent naissance à d'autres cellules souches ou à des cellules amplificatrices transitoires qui présentent un taux de prolifération élevé. Quels sont les facteurs favorisant cette activité mitotique intensive?

L'activité des kératinocytes peut être stimulé par des facteurs de croissance. Ceux-ci se lient à leurs récepteurs membranaires respectifs et initient des cascades de transduction qui transmettent leurs informations via phosphorylation (ou déphosphorylation) de protéines kinases. Les effets de ces protéines de signalisation aboutissent à une expression génique particulière correspondant à la prolifération, à la différenciation ou à d'autres réponses cellulaires.

En effet, les facteurs de croissance forment un ensemble d'environ 40 polypeptides, l'insuline, l'EGF, la transferrine, beaucoup d'autres substances appartiennent à la famille des facteurs de croissance. En règle générale, les facteurs de croissances montrent une action à plus long terme que les hormones.

La liaison du facteur de croissance épidermique (EGF) au récepteur de l'EGF (EGFR) favorise la prolifération ainsi que la migration des kératinocytes (Cheng et al., 1993). Le récepteur de l'EGF peut également être activé par le TGF α et l'amphiréguline par exemple.

Les kératinocytes non différenciés de la couche basale sont caractérisés par l'expression de certaines protéines d'adhérence. La molécule d'adhérence intégrine $\alpha 6 \beta 4$ est capable de se lier à la laminine 5 de la jonction épidermo-dermique et assure de cette manière la fixation des cellules souches et amplificatrices à la lame basale.

Le cytoplasme des kératinocytes de la couche basale renferme des filaments intermédiaires de kératines 5 et 14 qui assurent l'ancrage cellulaire par leurs attaches, soit aux hémidesmosomes (ancrage au derme), soit aux desmosomes (ancrage entre les cellules basales et avec les cellules suprabasales).

Au moment où la cellule basale perd son ancrage avec la lame basale, elle entame son processus de différenciation et fait partie du compartiment de différenciation. Il semble que l'induction de la différenciation est un processus complexe qui nécessite une coordination précise entre différents facteurs.

La culture des kératinocytes en suspension induit la différenciation des kératinocytes (McMullan et al., 2003). Une hypothèse postule que la culture en suspension reflète la perte de contact avec la jonction épidermo-dermique *in vivo*, puisque les kératinocytes en suspension, ainsi que les kératinocytes des couches épidermiques suprabasales n'expriment plus l'intégrine $\alpha\beta 4$. La perte d'ancrage à la lame basale pourrait activer ou arrêter des cascades de transduction du signal qui mettraient en route la différenciation des cellules non attachées à la jonction épidermo-dermique.

Dans le modèle de Cook et al. (1991) la confluence des kératinocytes induit le programme de différenciation tout en inhibant fortement la prolifération des cellules (Poumay & Pittelkow, 1995). Ainsi, la présence d'inhibiteurs de prolifération peut être un stimulus en faveur du processus de différenciation. Le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) réduit le taux de prolifération dans les kératinocytes épidermiques puisqu'il est capable de sortir les cellules du cycle cellulaire et d'induire de cette manière leur transformation ou différenciation.

L'ester de phorbol TPA (12-O-tétradecanoylphorbol-13-acétate ou PMA) est un inducteur puissant de la différenciation des kératinocytes. Il s'agit d'une molécule synthétique qui mime les effets du diacylglycérol et qui stimule l'activité des protéine kinases C (PKC) (cf page 14).

2.1.2. La différenciation épidermique tardive et terminale

Le processus de différenciation des kératinocytes se poursuit en montant vers les couches superficielles de l'épiderme.

Lors de la transition de la couche épineuse à la couche granuleuse, l'intégrité de la membrane plasmique est perdue et une entrée massive de calcium extracellulaire dans les kératinocytes augmente leur taux de Ca^{2+} . L'entrée de calcium et d'autres ions active des processus catalytiques qui détruisent la plupart des organelles cellulaires, mais la concentration élevée en calcium intracellulaire favorise l'expression d'involucrine, de la transglutaminase I et des kératines suprabasales K 1 et K10.

La transglutaminase I se trouve activée par le calcium et elle établit alors des liaisons isopeptidiques (ponts lysine) entre l'involucrine et d'autres composants de l'enveloppe cornée. Par l'intermédiaire de cette réaction de "cross-linking", l'involucrine cytoplasmique prend une localisation submembranaire. La structure rigide de l'involucrine indique son intervention éventuelle dans l'échafaudage de l'enveloppe cornée (Eckert, 1989). Cette enveloppe cornée (7 à 15 nm d'épaisseur) de nature protéique procure la résistance mécanique de l'épiderme.

Une autre protéine importante pour la structure de l'épiderme est la filaggrine dont le rôle est d'agréger les cytokératines. Le précurseur de la filaggrine est présent sous forme de profilaggrine stockée dans les granules de kératohyaline qui s'accumulent dans la couche granuleuse. Dans cette couche, les granules de kératohyaline se dissolvent et libèrent la profilaggrine dans le cytoplasme. Cette forme précurseur est alors processée par clivage protéolytique en filaggrine. La filaggrine assemble les filaments de kératine en macrofilaments en les unissant par des ponts disulfure, cette protéine structurale provoque ainsi une réorganisation du cytosquelette des kératinocytes.

Toujours dans la couche granuleuse interviennent aussi les corps d'Odland ou corps lamellaires ; ces derniers fusionnent avec la membrane plasmique des kératinocytes et libèrent

A.

Table 1 Classes of epidermal lipids

Phospholipids	phosphoglycerides containing two fatty acids and bases such as choline, serine, ethanolamine and inositol
Ceramides	sphingosine esterified with a very long-chain fatty acid; when glycosylated becomes a glycolipid
Sterols	cholesterol, cholesterol esters, cholesterol sulfate, vitamin D ₃
Triglycerides	glycerol esterified with three fatty acids ranging from 14 to 20 carbons
Free fatty acids	

B.

STRATIFICATION OF LIPID SPECIES IN HUMAN EPIDERMIS

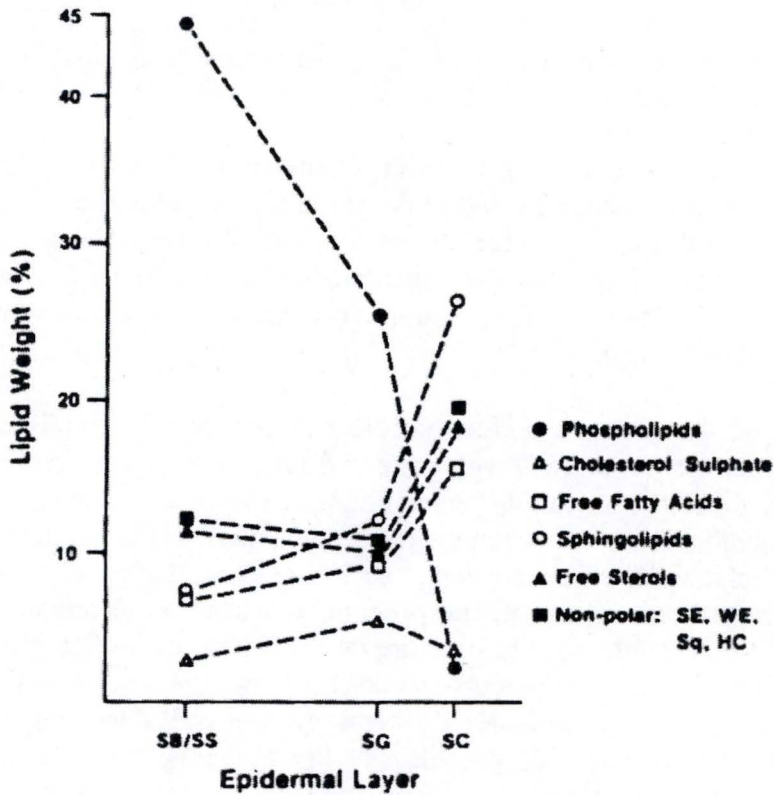


Figure 1-5: Les lipides épidermiques.

A. Présentation des classes de lipides épidermiques (Freinkel, 2001)

B. Distribution des lipides dans les couches épidermiques (SB/SS: couche basale / couche épineuse, SG: couche granuleuse, SC: couche cornée, SE: sterol esters, WE: wax esters, Sq: squalène, HC: hydrocarbures) (Lampe et al., 1983)

leurs phospholipides dans l'espace intercellulaire. Ces lipides assurent l'imperméabilité cutanée en formant une matrice lipidique autour des cornéocytes.

Le produit final de la différenciation épidermique est un kératinocyte mort, le cornéocyte, qui s'avère bien adapté à remplir sa fonction barrière. Les cornéocytes sont inertes et dotés d'une bonne cohésion grâce à la matrice lipidique intercellulaire.

2.1.3. La différenciation épidermique module la composition lipidique des kératinocytes

La différenciation épidermique est accompagnée d'une synthèse lipidique à partir d'acétate. Les classes de lipides épidermiques sont représentées sur la figure 1-5A. Les cellules de la couche basale ont des récepteurs membranaires LDL et sont donc capables d'absorber du cholestérol provenant de la circulation sanguine (Ponec et al., 1992). Quand les kératinocytes entament leur différenciation et se détachent de la jonction épidermo-dermique, ces récepteurs LDL sont internalisés et dégradés, il en résulte que la plupart du cholestérol épidermique doit être synthétisé *in situ* (Wertz & Michniak, 2000).

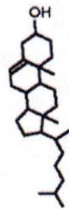
Une des étapes-clés dans la production de cholestérol est l'enzyme β -hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase), cette enzyme peut être inhibée par phosphorylation ou par des statines, lovastatine ou fluvastatine par exemple. Le sulfate de cholestérol inhibe également la synthèse du cholestérol en empêchant l'activité de l'HMG-CoA réductase.

De la couche basale à la couche cornée il y a une augmentation graduelle du contenu des kératinocytes en cholestérol et en acides gras (Long, 1970) alors que la proportion de phospholipides diminue (figure 1-5B). Une grande partie des lipides est accumulée dans les corps d'Odland (Freinkel, 2001).

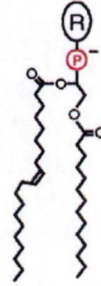
Les classes majeures de lipides de la couche cornée sont les céramides (50%), le cholestérol (25%) et les acides gras (14%). Si on change les proportions de ces trois classes de lipides au niveau de la couche cornée, la fonction barrière de l'épiderme est retardée (Wertz & Michniak, 2000).

A Lipid structures

cholesterol



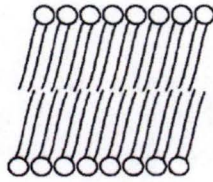
phospholipids



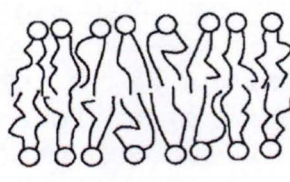
sphingolipids



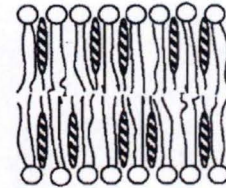
B Membrane phases



gel



liquid disordered (I_d)



liquid ordered (I_o)

Figure 1-6: A. Lipides membranaires. B. Schéma des phases membranaires. La bicouche lipidique artificielle est représentée par la phase "gel". La phase "liquide désordonnée" (I_d) est formée de phospholipides insaturés alors que la phase "liquide ordonnée" (I_o) est composée de shingo- et phospholipides avec des molécules de cholestérol intercalées. Le cholestérol épaissit et rigidifie la bicouche lipidique (Munro, 2004).

3. Le cholestérol

3.1. Généralités

Les lipides sont des composés chimiquement hétérogènes, mais regroupés en fonction de leur caractère hydrophobe commun. Il existe trois grandes catégories de lipides biologiques :

- les triacylglycérols (graisses servant de réserve d'énergie),
- les phosphoglycérolipides (constituants principaux des membranes biologiques)
- les stéroïdes (cholestérol, hormones sexuelles, vitamine D₃)

Le cholestérol est une molécule amphiphile de la famille des stéroïdes; sa partie hydrophobe est formée par un squelette carboné de quatre cycles accolés et la présence du groupement -OH lui donne son caractère partiellement hydrophile (fig 1-6A). Dans l'organisme, le cholestérol sert de précurseur pour la synthèse de la plupart des autres stéroïdes (hormones sexuelles, vitamine D₃).

Il faut savoir que le cholestérol est d'une part amené dans le corps par la consommation de produits d'origine animale (beurre, œufs : source exogène) et d'autre part est synthétisé à la suite d'une cascade de réactions complexes au niveau des cellules hépatiques (source endogène). Les experts estiment que deux tiers de la synthèse du cholestérol est assurée par l'organisme lui-même.

Une fois arrivé dans la circulation sanguine, le cholestérol se trouve englobé dans des lipoprotéines sous forme d'esters de cholestérol. L'épiderme étant non vascularisé, les kératinocytes sont contraints à synthétiser le cholestérol par leurs propres moyens.

3.2. Importance physiologique du cholestérol

Il est connu depuis longtemps que le cholestérol est un composant essentiel de la membrane des cellules animales, ayant un rôle structural, mais également de multiples implications fonctionnelles: "*Eukaryotic life seems to depend on sterols and this is probably due to their key function in lipid rafts*" (Simons & Ikonen, 2000).

Il est connu que le cholestérol intervient dans beaucoup de processus cellulaires différents comme la transduction du signal, l'adhérence cellulaire, l'apoptose et l'activation de réponses immunitaires (Simons & Toomre, 2000). Afin que ces processus physiologiques se déroulent de manière optimale, il est très important de maintenir l'homéostasie du cholestérol. Le taux cellulaire en cholestérol, ainsi que l'absorption cellulaire à partir de lipoprotéines sont strictement contrôlés. En outre, une concentration trop élevée en cholestérol libre est toxique et peut provoquer des maladies comme l'athérosclérose et la maladie d'Alzheimer (Simons et al., 1998)

Le sujet du rôle du cholestérol dans la signalisation évoque le concept récent des "lipid rafts". D'après ce modèle lipidique apparu dans les années 90, la membrane plasmique est subdivisée en microdomaines lipidiques ayant des propriétés physicochimiques différentes, nommés "lipid rafts".

3.2.1. Le cholestérol membranaire

Le monde scientifique sait depuis longtemps que la membrane plasmique des cellules eucaryotes animales renferme plus de différentes sortes de lipides qu'il n'est nécessaire pour former une bicouche lipidique. Suite à cette constatation datant de 1973, la question se pose : Quelle est la fonction de cette diversité lipidique ?

Voyons d'abord comment le cholestérol module les fonctions de la membrane plasmique eucaryote animale. La composition lipidique de la membrane plasmique est différente de celle des membranes intracellulaires. La membrane plasmique comporte une proportion plus élevée en sphingolipides et en cholestérol : le pourcentage de cholestérol dépend du type cellulaire mais varie en général entre 30 et 40 mol % des lipides de la membrane plasmique (Munro, 2004) (figure 1-6A).

Une distribution lipidique asymétrique entre le feuillet externe et le feuillet interne caractérise la membrane plasmique. L'analyse de la distribution des lipides membranaires à ce niveau montre que les sphingolipides se trouvent préférentiellement dans le feuillet externe alors que le cholestérol membranaire présente une distribution plus ou moins équitable dans les deux feuillets, puisque son taux de flipping spontané d'un feuillet à l'autre est élevé ($T_{1/2} = 1 \text{ s}$) (Steck et al., 2002).

Comment le cholestérol module-t-il les propriétés physiques de la membrane plasmique ? La présence du cholestérol membranaire détermine un état ordonné de la phase liquide de la membrane plasmique, son absence définit donc la phase liquide désordonnée (figure 1-6B). La structure longue et rigide du cholestérol provoque un allongement des chaînes hydrophobes des phospholipides : de cette manière, la membrane plasmique est compactée et épaissie, formant une bicouche lipidique à phase liquide ordonnée. La présence du cholestérol réduit donc la perméabilité membranaire sans affecter le taux de diffusion latérale des protéines et lipides dans un feuillet (Owicki & McConnell, 1980). La bicouche lipidique riche en cholestérol est donc appelée "phase liquide ordonnée". L'étude détaillée des propriétés physiques des membranes était le point de départ pour l'hypothèse des "lipid rafts".

3.2.2. Les "lipid rafts"

Le modèle des "lipid rafts" propose que le cholestérol et les sphingolipides du feuillet externe ne sont pas distribués uniformément dans la membrane, mais plutôt en assemblages de domaines liquides ordonnés qui flottent dans une bicouche liquide désordonnée (Schroeder et al., 1994). Dans ces microdomaines lipidiques, la proportion en cholestérol, sphingolipides et protéines de signalisation est donc plus élevée que dans les autres domaines de la membrane plasmique.

Il semble que le cholestérol soit le constituant dynamique responsable du maintien de l'assemblage de ces microdomaines lipidiques : une déplétion en cholestérol provoque une sensibilité accrue des protéines des "lipid rafts" à certains détergents (Simons & Ehehalt, 2002).

En effet, une caractéristique des "lipid rafts" est leur résistance aux détergents non ioniques, critère utilisé en même temps pour définir et isoler ces microdomaines lipidiques. L'extraction de composants de la membrane plasmique avec le détergent non ionique Triton X-100 à 4°C ne permet pas d'isoler certaines parties membranaires enrichies en cholestérol et en protéines à ancre GPI (glycosylphosphatidyl inositol). Ces protéines sont des molécules

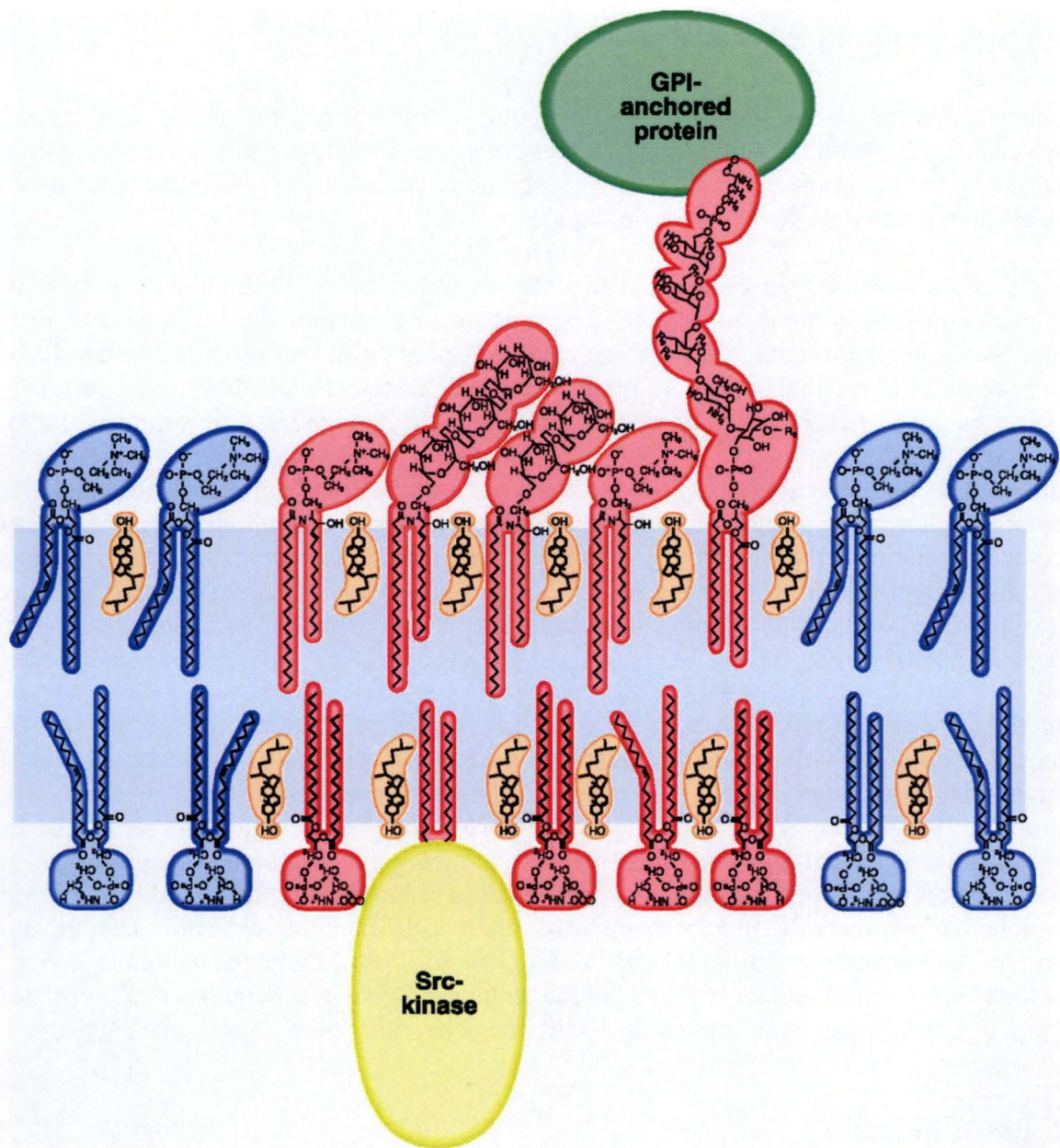


Figure 1-7: Modèle d'un "lipid raft" avec deux protéines intercalées. Une protéine à ancre GPI est attachée au feuillet externe de la membrane plasmique et une Src kinase est associée au feuillet interne. Les lipides de la phase liquide ordonnée formant le "lipid raft" sont représentés en rouge, alors que les lipides de la phase liquide désordonnée sont représentés en bleu. Le cholestérol, en orange, se trouve préférentiellement dans la phase liquide ordonnée, c'est-à-dire les "lipid raft". Le feuillet externe est enrichi en glycosphingolipides et sphingomyéline, alors que le feuillet interne contient surtout des glycérolipides à acides gras saturés (Simons & Ikonen, 2000).

typiquement associées aux “lipid rafts”, il en découle que les “lipid rafts” sont résistants aux détergents non ioniques (Edidin, 2003).

Vu la petite taille des “lipid rafts”, il est très difficile de les visualiser afin de démontrer leur existence. Toute fois, un marquage avec la sous-unité B de la toxine cholérique (CTx-B) couplée à une molécule fluorescente permet de voir des agrégats de “lipid rafts”. Cette sous-unité non toxique se lie aux glycosphingolipides GM1, utilisés comme marqueurs des “lipid rafts” (Harder et al., 1998). Une sous-unité CTx-B lie cinq glycosphingolipides GM1 et provoque de cette manière une agrégation (clustering) des “lipid rafts”.

En supposant que les domaines riches en cholestérol du feuillet externe sont reliés avec des domaines lipidiques du feuillet interne comportant des molécules de signalisation, comme par exemple des récepteurs à activité tyrosine kinase, les “lipid rafts” deviennent très importants du point de vue physiologique : les “lipid rafts” peuvent être envisagés comme des plateformes de signalisation qui couplent des signaux extracellulaires aux voies intracellulaires. Simons et al. (1997, 2000) suggèrent même que la transduction du signal est le rôle le plus important des “lipid rafts”.

Les “lipid rafts” semblent jouer un rôle central dans beaucoup de processus cellulaires, comme le trafic membranaire, la polarisation cellulaire (Simons & Ehehalt, 2002), la prolifération, l'apoptose, la mobilité cellulaire et la transduction du signal (Gniadecki & Bang, 2003).

Il paraît qu'un bon nombre de pathogènes utilisent les “lipid rafts” comme porte d'entrée et de sortie des cellules eucaryotes. Par exemple, le virus HIV-1 incorpore des “lipid rafts” de l'hôte dans son enveloppe et les utilise pour entrer dans les cellules immunitaires, pour altérer la signalisation de l'hôte et pour sortir des lymphocytes (Simons & Ehehalt, 2002). En plus, la protéine Nef myristoylée produite par le virus HIV-1 favorise l'infection virale via son association aux “lipid rafts” où elle produit des changements dans la signalisation (Zheng et al., 2003).

Un autre aspect intéressant des “lipid rafts” est leur intervention dans les maladies à prions. Les protéines prions comportent une ancre GPI qui leur permet de s'associer au “lipid rafts”. Les “lipid rafts” jouent probablement un rôle plus actif en régulant directement la conversion de prions normaux (PrPc) en formes altérés pathogènes (PrPsc) puisque l'extraction du cholestérol réduit le taux de formation de prions PrPsc pathogènes (Baron et al., 2002).

En partant du point de vue des “lipid rafts”, le modèle de la membrane plasmique en mosaïque fluide de Singer et Nicholson évolue vers un système plus complexe (figure 1-7).

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

Dans les kératinocytes épidermiques les “lipid rafts” sont localisés préférentiellement dans les membranes plasmiques des cellules amplificatrices transitoires de la couche basale (Gniadecki & Bang, 2003). En comparaison aux “lipid rafts” des lymphocytes, les microdomaines lipidiques enrichis en sphingolipides et cholestérol des kératinocytes forment de larges agrégats, appelés “flotillas” (Gniadecki, 2004). Dans un but d'identifier comment les “lipid rafts” sont impliqués dans la signalisation intracellulaire des kératinocytes, il est possible de rompre la structure des “lipid rafts” et d'analyser par conséquent l'activation de

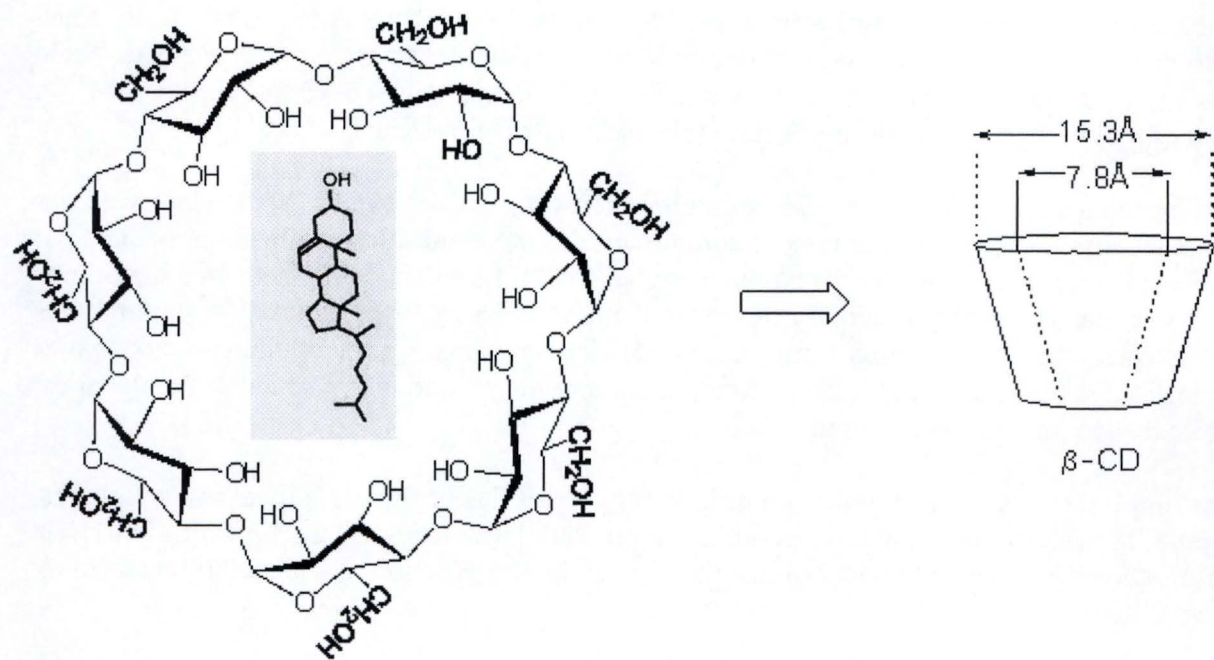


Figure 1-8: Structure de la molécule de méthyl-β-cyclodextrine ; la cavité de ce polysaccharide renferme une molécule de cholestérol (proportions non représentatives).

molécules de signalisation. 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 mettant les cellules en présence de substances qui retirent ou complexent le cholestérol membranaire (méthyl- β -cyclodextrine, filipine, saponine) (Ono & Han, 2000).

La méthyl- β -cyclodextrine (figure 1-8) est une molécule capable d'extraire le cholestérol membranaire, elle est hydrosoluble et renferme sept unités glucose. Cette molécule cyclique comporte une cavité intramoléculaire qui peut abriter par exemple des médicaments hydrophobes ou du cholestérol (Pitha et al., 1988).

L'application de la méthyl- β -cyclodextrine diminue donc la teneur en cholestérol membranaire des "lipid rafts" ainsi qu'au niveau de l'ensemble de la membrane plasmique.

Le cholestérol intervient dans un bon nombre de processus membranaires non liés aux "lipid rafts", une extraction du cholestérol membranaire affecte donc également ces fonctions et les conséquences observées ne sont pas nécessairement dues à la destruction des "lipid rafts". Ainsi une déplétion en cholestérol provoque l'augmentation de la perméabilité cellulaire vis-à-vis d'ions et de petites molécules, comme le glucose et l'eau (Munro, 2004). A faible température, le cholestérol membranaire prévient la formation de la phase lipidique solide de la membrane plasmique en augmentant la fluidité des lipides membranaires.

Une étude sur des fibroblastes montre qu'une incubation de 8h en présence de M β CD même à faible concentration (2 mM) est cytotoxique pour 20% des fibroblastes (Kilsdonk et al., 1995). L'incubation des kératinocytes en présence de M β CD (7,5mM, 1h) n'est pas suffisante pour induire un remodelage dans la distribution du cholestérol. De même, l'action isolée de la lovastatine (10 μ M, 18h) n'entraîne pas de changement significatif du taux de cholestérol membranaire. L'action concertée des deux substances est donc requise pour une extraction efficace du cholestérol membranaire des kératinocytes (Jans et al., 2004). Une extraction rapide du cholestérol membranaire par la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD 7,5 mM pendant 1h) et une inhibition de la néosynthèse du cholestérol par une statine (lovastatine 10 μ M pendant 17h) permettent d'éviter une perte de viabilité des kératinocytes en culture. La lovastatine inhibe l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, l'enzyme-clé dans la synthèse du cholestérol. Dans le domaine médical, la lovastatine est utilisée comme agent thérapeutique dans le traitement de l'hypercholestérolémie.

Trois expériences menées par notre laboratoire fournissent les preuves qu'un traitement à la M β CD et à la lovastatine induit une réelle déplétion en cholestérol.

- Le marquage du cholestérol membranaire par la filipine est fortement réduit dans les kératinocytes ayant subi un traitement à la M β CD et lovastatine.
- Seule la méthyl- β -cyclodextrine est capable d'extraire le cholestérol des membranes plasmiques, puisque l'application de l' α -cyclodextrine, comportant 6 unités glucose, ne change pas la quantité de cholestérol membranaire présente, il ne s'agit donc pas d'un effet produit par les cyclodextrines.
- Une extraction du cholestérol membranaire par la M β CD suivie d'une réplétion en cholestérol par la M β CD chargée en cholestérol restaure le phénotype cellulaire normal après 18h, une preuve qu'il s'agit d'une déplétion en cholestérol et pas d'un effet de la molécule M β CD.

Un test de la perméabilité membranaire basé sur la libération de l'adénylate kinase montre qu'une déplétion en cholestérol de 18h augmente d'environ 10% la perméabilité membranaire, cette hausse indique que le traitement à la méthyl- β -cyclodextrine et à la lovastatine provoque

une légère cytotoxicité (Jans et al., 2004). Cependant il est connu que l'extraction du cholestérol membranaire augmente la perméabilité membranaire (Owicki & McConnell, 1980).

Le stade de culture des kératinocytes est très important pour détecter les effets d'une déplétion en cholestérol. Des cultures autocrines sous-confluentes et post-confluentes de kératinocytes déplétés en cholestérol ne modifient pas l'expression génique des marqueurs de différenciation involucrine, K10 et K14 par rapport aux cultures non traitées. Par contre, les kératinocytes confluentes déplétés en cholestérol induisent leur synthèse d'involucrine et répriment l'expression des cytokératines 10 et 14, simultanément une phosphorylation des MAP kinases p38 peut être observée (Jans et al., 2004).

Les résultats de cette étude incitent à postuler que le cholestérol joue un rôle régulateur dans l'expression génique des marqueurs de différenciation épidermique.

D'autres molécules liant le cholestérol ont été testées par le groupe de Chen & Resh (2002), la molécule 2-OH-propyl- β -cyclodextrine (Trappasol) et la filipine provoquent également une extraction du cholestérol membranaire.

En plus, l'incubation des kératinocytes en présence de 2-OH-propyl- β -cyclodextrine ou de filipine induit une phosphorylation de récepteur de l'EGF (Chen & Resh, 2002).

Dans les kératinocytes, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est impliqué dans un bon nombre de réponses cellulaires. Les façons d'activer ce récepteur membranaire sont multiples :

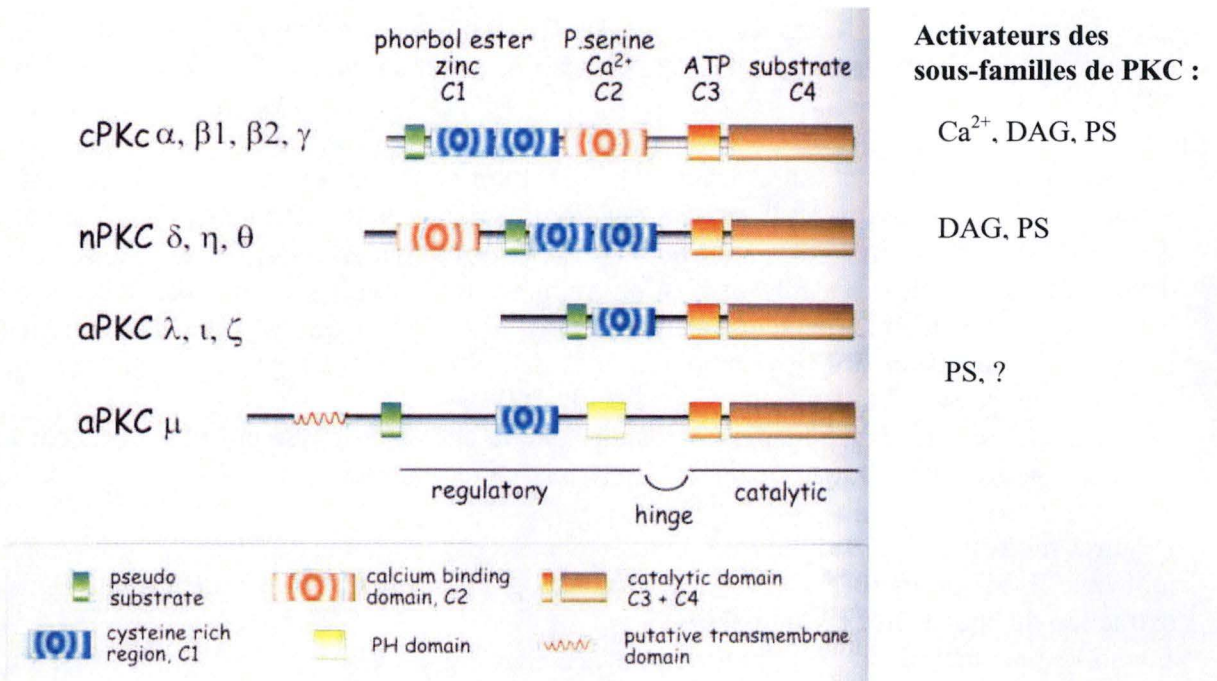
- les facteurs de croissance tels que l'EGF, l'heparin-binding-EGF (HB-EGF) et l'amphiréguline peuvent se fixer au récepteur et provoquer son activation par phosphorylation (Takenobu et al., 2003);
- une dépolarisation membranaire peut entraîner son activation (Zwick et al., 1999) ;
- l'ester de phorbol TPA induit la transphosphorylation de l'EGFR (Chen & Resh, 2002) ;
- une déplétion en cholestérol membranaire via la M β CD active de façon ligand-indépendante le récepteur de l'EGF (Chen & Resh, 2002)
- la présence de cholestérol dans le milieu réduit l'activité kinase du récepteur de l'EGF, (Ringerike et al., 2002)

L'activation du récepteur de l'EGF induit des signalisations intracellulaires, dont la voie dépendante de Ras et la voie de la PI 3-K (phosphatidylinositol 3-kinase). Ces cascades activent à leur tour des p38 MAP kinases (Chen & Resh, 2002). Les ERK MAP kinases sont également activées lors d'une phosphorylation du récepteur de l'EGF (Schlessinger et al., 2000).

L'activation du récepteur de l'EGF provoque entre autre une diminution du niveau d'expression de la kératine 10 et une augmentation dans la transcription du gène involucrine, marqueur de différenciation tardive (Poumay & Pittelkow, 1995).

Pour mieux comprendre les voies de signalisation induites par une déplétion en cholestérol, les protéines kinases C (PKC) et les mitogen-activated-protein kinases (MAP kinases), ainsi que les réponses cellulaires engendrées seront présentées.

A.



B.

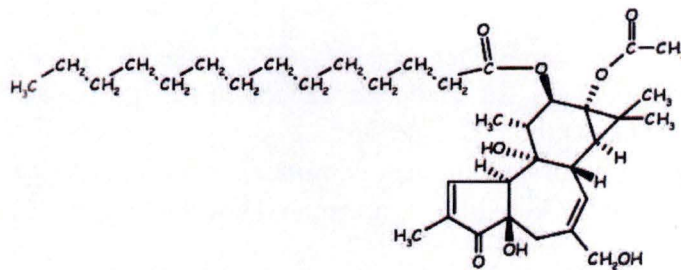


Figure 1-9: Les protéines kinases C.

A. La famille des protéine kinases C (PKC). Les PKC mammaliennes forment une famille de 12 membres qui est divisée en trois sous-familles: les PKC classiques (cPKC) activées par Ca²⁺, DAG (diacylglycérol) et PS (phosphatidylsérine), les PKC nouvelles (nPKC) activées par DAG et PS, et les PKC atypiques (aPKC) dont le seul activateur connu est la phosphatidylsérine. Les PKC comportent un domaine régulateur et un domaine catalytique. (Gomperts et al., 2003).

B. Formule développée de l'ester de phorbol TPA, un activateur synthétique des PKC (Gomperts et al., 2003).

4. La signalisation cellulaire

4.1. Généralités

Les cascades de transduction du signal sont essentielles pour transformer un signal extracellulaire en une réponse intracellulaire adéquate. De nombreux signaux extracellulaires activent des récepteurs membranaires qui transmettent leur activation à des protéines de signalisation intracellulaires. L'activation de ces protéines aboutit souvent en une expression altérée de certains gènes pour produire une réponse adaptée au stimulus. En général, les cascades de transduction du signal sont accompagnées d'une amplification du signal.

Quand les facteurs de croissance se lient à leurs récepteurs respectifs, ceux-ci s'activent en formant des dimères qui se transphosphorylent, première étape dans la transduction de signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule.

Les protéines de signalisation sont souvent des protéine kinases qui ont des rôles critiques dans le contrôle de nombreux processus cellulaires. On estime que le génome humain encode plus de 2 000 protéine kinases, qui phosphorylent un ensemble d'environ 30 000 protéines (Cuenda & Alessi, 1999). Les kinases actives ajoutent des groupements phosphates aux acides aminés sérine, thréonine et tyrosine des protéines en aval dans la cascade. La phosphorylation de ces résidus change les propriétés chimiques de la protéine, qui à son tour peut lier, activer, phosphoryler ou déphosphoryler son substrat.

Un des grands défis de la recherche actuelle consiste à identifier des modules de signalisation, puisque des phosphorylations anormales de protéines sont impliquées dans des pathologies comme le diabète, l'hypertension, l'inflammation (Cuenda & Alessi, 1999) et le psoriasis (Fisher et al, 1990).

4.2. La famille des protéine kinases C

Les PKC sont des protéines de signalisation, impliquées dans un bon nombre de processus cellulaires, comme la formation de tumeurs, la défense contre des pathogènes, le développement embryonnaire, la perception douloureuse ou le développement d'une mémoire à long terme (Gomperts et al., 2003). Les PKC appartiennent au groupe des sérine/thréonine kinases dépendantes de phospholipides.

La famille des PKC comprend 12 acteurs identifiés, subdivisés en trois sous-familles (figure 1-9A): les PKC classiques (cPKC) activées par le calcium et le diacylglycérol (DAG), les PKC nouvelles (nPKC) indépendantes du calcium mais activées par le DAG, et les PKC atypiques (aPKC) indépendantes de calcium et de DAG. Les membres de ces sous-familles de protéine kinase C sont classifiés selon leur mode d'activation et leur homologie de séquence (Gomperts et al., 2003).

La localisation de certaines PKC est ubiquitaire, alors que d'autres PKC sont tissu spécifiques. Les différents cofacteurs requis, la distribution tissulaire, la localisation subcellulaire ainsi que la spécificité des substrats suggèrent que chaque isoforme de PKC remplit un rôle biologique différent (Nishizuka, 1995, Denning, 2004).

Les MARCKS (myrystoylated alanine-rich C-kinase substrate) sont des substrats de phosphorylation de toutes les isoformes de PKC.

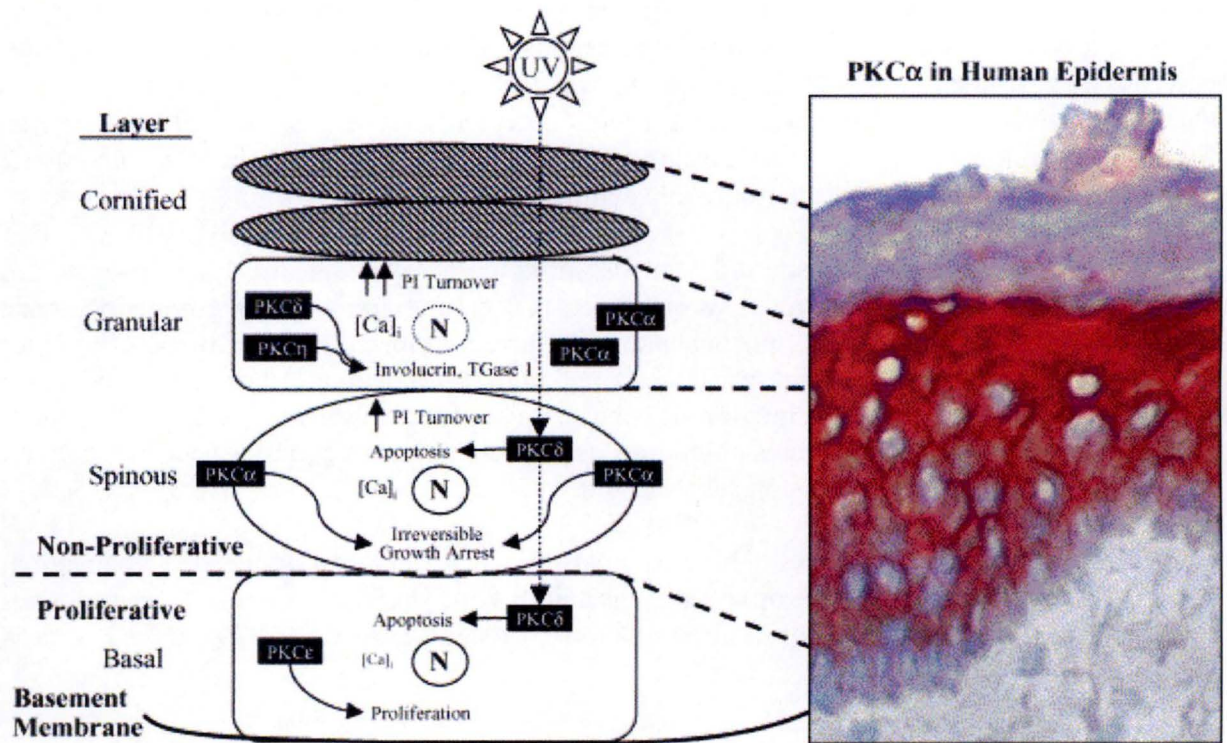


Figure 1-10: Les isoformes de PKC dans l'épiderme. Ce schéma montre le profil d'expression et les fonctions potentielles de certaines isoformes épidermiques de PKC déduites à partir de marquages immunohistochimiques *in vivo* et *in vitro*. Les localisations différentes des isoformes de PKC dans l'épiderme reflète leurs différents rôles dans la prolifération, la différenciation et la mort des kératinocytes. PKC δ est faiblement détecté dans toutes les couches épidermiques, l'activation des PKC δ par les rayons UV est capable d'induire la mort cellulaire programmée, l'apoptose. (Denning, 2004)

4.2.1. Propriétés structurales des PKC

Toutes les PKC contiennent un domaine catalytique et un domaine régulateur, ainsi qu'un pseudosubstrat formé par la partie N-terminale de la PKC. Le pseudosubstrat est non phosphorylable, car la sérine phosphorylable est remplacée par une alanine. En absence de stimulus, le pseudosubstrat se lie au domaine catalytique et supprime ainsi l'activité kinase de la PKC. En cas d'activation de la PKC, la kinase s'ancre en membrane plasmique.

4.2.2. Mécanismes d'activation des PKC

Les isoformes de PKC sont régulées par des messagers secondaires (calcium et DAG), des lipides, par l'auto- et la transphosphorylation, par les interactions protéine-protéine et par la protéolyse (Denning, 2004). Souvent la régulation des PKC est liée à l'activité des phospholipases C (PLC) produisant le DAG, un activateur des PKC. Le DAG est un messager secondaire de nature lipidique ; sa petite taille et son caractère hydrophobe lui permettent de se fixer en membrane. A côté du DAG, d'autres messagers secondaires lipidiques comme le PIP_2 et PIP_3 sont capables d'activer les PKC en se liant sur leur domaine C1.

Le DAG, le calcium et la phosphatidylsérine (PS) sont des activateurs de PKC. Le DAG présente un intérêt particulier, puisqu'il existe un analogue synthétique de ce messager lipidique: l'ester de phorbol TPA (figure 1-9B). Le TPA mime le diacylglycérol et active les cPKC et nPKC DAG-dépendantes.

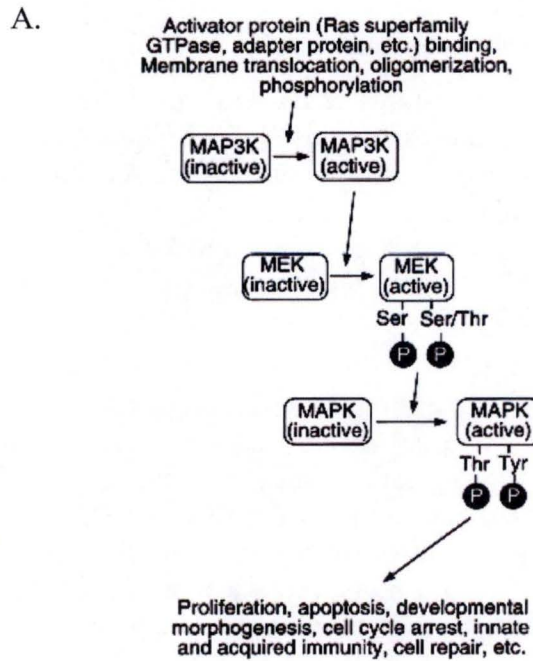
Le TPA est un agent inflammatoire qui agit également comme un irritant cutané. Dans des kératinocytes murins, il est un inducteur de tumeurs.

Dans les kératinocytes en culture, le TPA active les PKC de manière dose-dépendante (Dlugosz & Yuspa, 1993). Un traitement au TPA réduit sélectivement la transcription du gène K1 et la stabilité de son messager dans des kératinocytes en différenciation (Dlugosz & Yuspa, 1993).

Dans des cultures confluentes de kératinocytes, le TPA réduit l'affinité de l'EGF pour son récepteur d'au moins 50% vis-à-vis de cellules contrôle. En effet, le TPA active les PKC qui phosphorylent alors le récepteur de l'EGF, qui une fois phosphorylé ne peut plus lier l'EGF (Downward et al., 1985). Ce même effet inhibiteur du TPA sur la liaison de l'EGF a été trouvé dans des fibroblastes 3T3 (Toullec et al., 1991). Des études récentes suggèrent que le TPA active surtout l'isoforme PKC δ dans les kératinocytes épidermiques (Efimova & Eckert, 2000, Takenobu et al., 2003).

L'analyse de régions promotrices d'un bon nombre de gènes induits par le TPA montre un motif palindromique de 7 paires de bases, appelé TRE (TPA-responsive element). Le site TRE est reconnu par le facteur de transcription AP-1, formé par l'association de *c-fos* et *c-jun*. En cas de stimulation des kératinocytes avec le TPA, le facteur de transcription AP-1 est un des éléments transmettant les effets de l'ester de phorbol à la machinerie de transcription (Efimova et al., 1998).

Dans les kératinocytes, la fixation d'AP-1 sur le site TRE augmente le taux de transcription de gènes tels que celui de la métalloprotéinase 9 (MMP-9) (Kobayashi et al., 2004) et celui de l'involucrine (Poumay et al., 1999) via l'augmentation de l'activité du promoteur du gène de l'involucrine (Efimova et al., 1998). L'expression de la cytokératine K10 diminue lors d'un traitement à l'ester de phorbol (Poumay et al., 1999).



B.

MAP KINASE PATHWAYS

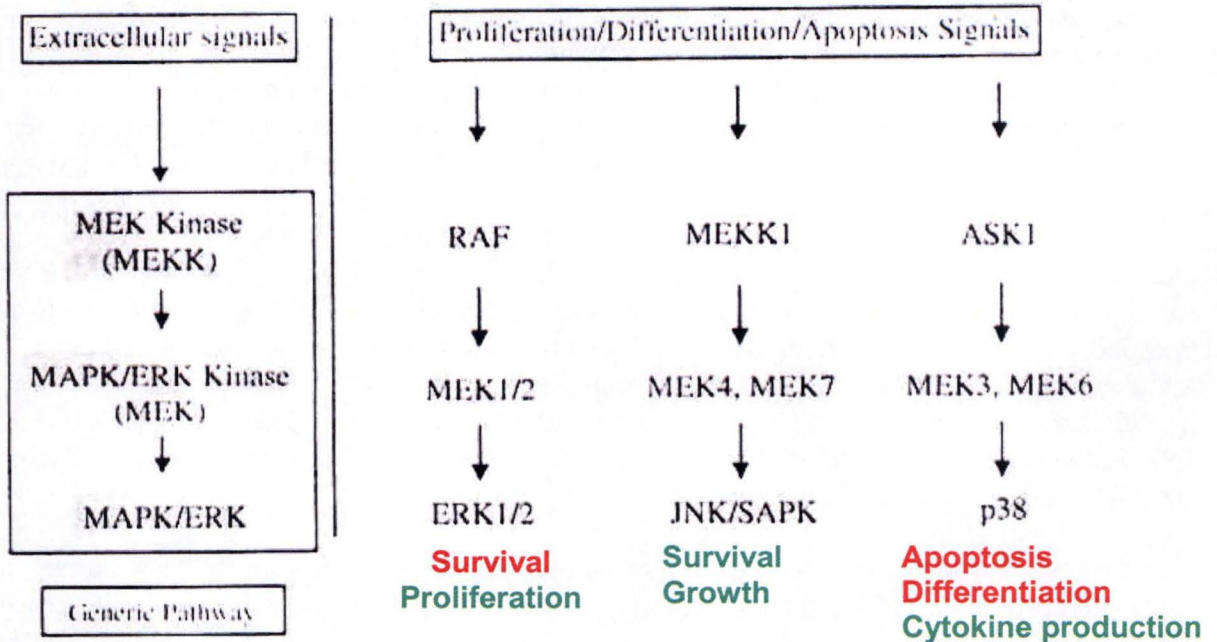


Figure 1-11: Les MAP kinases.

A. La voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) est composée d'un module de trois kinases, formé par la MAP kinase kinase kinase (MAP3K ou MEKK), la MAP kinase kinase (MAPKK ou MEK) et la MAP kinase (MAPK) (Kyriakis & Avruch, 2001).

B. Les cascades des MAPK. Les signaux qui régulent la prolifération, la différenciation et l'apoptose passent par trois cascades de MAP kinases, nommées ERK 1/2, JNK/SAPK et p38. Les connexions entre les cascades sont multiples, ici les cascades sont cependant représentées de façon linéaire pour simplifier le schéma (Eckert et al., 2002).

La figure 1-10 schématise la localisation des isoformes de PKC dans les kératinocytes épidermiques. Les isoformes PKC α (cPKC), δ , ϵ , η (nPKC) et ζ (aPKC) sont exprimées dans les kératinocytes épidermiques (Osada et al., 1990). Dans les kératinocytes humains, les nPKC, surtout l'isoforme δ , activent des MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase) qui provoquent alors une induction du gène involucrine via l'activation de la MAP kinase p38 δ (Efimova & Eckert, 2000). Cette induction du gène involucrine par les nPKC est d'intensité comparable à une induction du gène par le TPA (Efimova & Eckert, 2000).

La molécule pharmacologique GF 109203X est considérée comme un inhibiteur général des protéines kinases C (Toullec et al., 1991). L'inhibiteur GF 109203X seul (0,5-8 μ M) n'a pas d'effet sur l'activation du EGFR, cependant il rétablit de manière dose dépendante la capacité de fixation de l'EGF sur son récepteur en cas d'un traitement au TPA (100 ng/ml). Ceci suggère que les PKC inhibées par la molécule GF 109203X ne peuvent plus phosphoryler le récepteur de l'EGF et donc celui-ci est libre pour fixer l'EGF (Le Panse et al., 1994).

Des études récentes montrent que l'inhibiteur GF 109203X n'inhibe pas seulement les PKC, mais également p90Rsk, MSK1 et p70S6, protéines de signalisation induites par le TPA qui se trouvent en aval des MAP kinases (Cuenda & Alessi, 1999). D'un autre côté cet inhibiteur montre une forte cytotoxicité à concentration élevée (10 μ M) dans des kératinocytes HaCaT (Papp et al., 2003). Remarquons que les effets de cet inhibiteur peuvent changer en fonction du type cellulaire : par exemple le GF 109203X inhibe la prolifération des fibroblastes, alors que ce même inhibiteur favorise la prolifération des kératinocytes (Le Panse et al., 1994).

4.3. Les MAP kinases

La réponse cellulaire adaptée à un stimulus extracellulaire nécessite des voies de signalisation intracellulaires. Souvent ces voies de signalisation impliquent des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases), celles-ci sont bien connues dans la régulation de mécanismes cellulaires. Les MAP kinases (MAPK) interviennent aussi bien au niveau de la prolifération et de la différenciation que sur le plan de l'apoptose et de la réponse au stress.

Un module de trois kinases forme la base de la voie des MAP kinases (figure 1-11A). Une MAPK, caractérisée par un site de phosphorylation dual Thr-aa-Tyr, est activée par une MAPK/ERK kinase (MEK ou MAPKK) qui, elle, est à son tour activée par une MEK kinase (MEKK ou MAPKKK). Une fraction des MAPK actives est transloquée dans le noyau où les kinases phosphorylent certains facteurs de transcription comme ATF-2, p53, c-Myc (Hildesheim et al., 2004) qui induisent alors la transcription de gènes cibles.

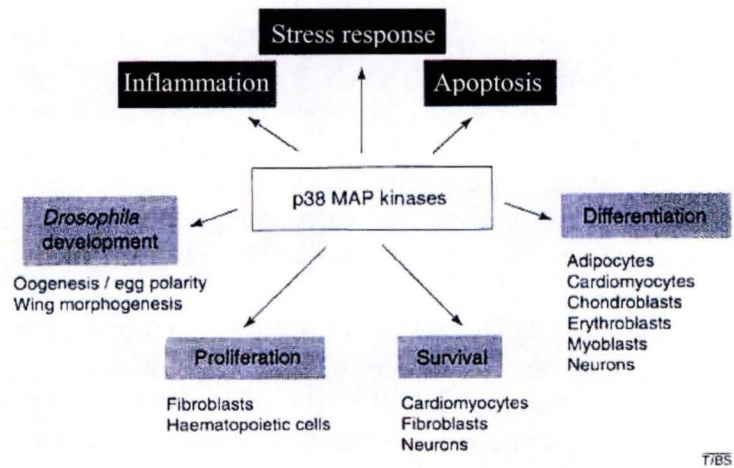
Trois groupes fonctionnellement distincts de MAP kinases ont été identifiés dans les cellules de mammifères, incluant les ERK (extracellular signal regulated kinase), les JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase) et les p38 kinases (figure 1-11B) (Eckert et al., 2002).

Il est souvent difficile d'assimiler une réponse cellulaire à une des trois groupes de MAP kinases parce que les interconnexions entre les MAP kinase sont multiples.

La complexité des MAP kinases est surtout due au fait que ces kinases peuvent être activées par une multitude de stimuli (activation de récepteurs membranaires, choc osmotique, radiations UV,...). De plus, les MAP kinases provoquent beaucoup de réponses cellulaires différentes (phosphorylation de kinases et de facteurs de transcription, synthèse de protéines, machinerie du cycle cellulaire, mort cellulaire et différenciation).

De nombreuses protéines se trouvent en aval des MAP kinases et elles peuvent être régulées par plusieurs voies. La MAPKAPK 3 (MAPK activated protein kinase 3) peut être activée par

A.



B.

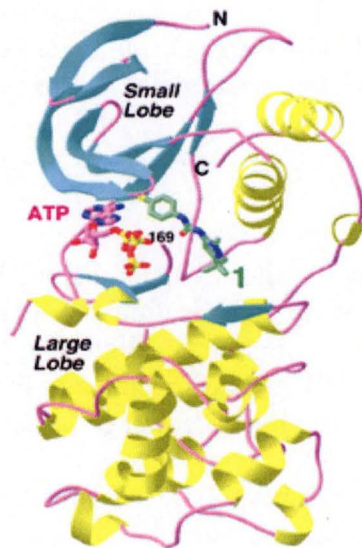


Figure 1-12: Les MAP kinases p38.

A. Processus cellulaires régulés par les p38 MAP kinases. L'implication des p38 dans l'inflammation, la réponse au stress et l'apoptose (en noir) est bien documentée. Des données récentes lient les p38 kinases avec la différenciation, la prolifération, la survie et le développement des *Drosophila* (en gris).

B. Représentation en trois dimensions de la structure de la p38 MAP kinase. Un inhibiteur de la famille des pyridinyl imidazoles est fixé au site de fixation d'ATP.

ERK, JNK ou p38, ce qui permet d'intégrer les signaux des trois voies. La MNK 1 (MAPK signal integrating kinase 1) est un substrat des MAP kinases ERK et p38. Cette MNK 1 peut phosphoryler le facteur eucaryote d'initiation de traduction eIF-4E (Robinson & Cobb, 1997), ce qui laisse apparaître le lien entre les MAP kinases et l'initiation de la traduction.

4.3.1. Les MAP kinases p38

Les kinases p38 (figure 1-12A) sont surtout connues pour leur activation en condition de stress cellulaire et sont nommées dès lors stress kinases mais elles participent aussi à d'autres réponses cellulaires comme la croissance, la prolifération et la mort cellulaire (Ono & Han, 2000). L'expression de plusieurs cytokines, facteurs de transcription et récepteurs transmembranaires est régulée par les MAP kinases p38 (Ono & Han, 2000).

En 1998, les chercheurs ont découvert qu'il existe plusieurs isoformes de p38 ayant des rôles différents. Jusqu'à présent, quatre isoformes de p38 sont identifiées : p38 α (figure 1-12B), β , γ et δ . Les quatre isoformes de MAP kinases p38 présentent une homologie de séquence d'acides aminés d'au moins 60%. Au niveau de l'épiderme on retrouve les isoformes p38 α , β ubiquitaires et l'isoforme p38 δ .

Au sein des MAP kinases p38, les réponses cellulaires varient en fonction de l'isoforme de p38 activée (Efimova et al., 2003). Cependant toutes les p38 kinases ont un motif de phosphorylation commun : Thr-Gly-Tyr (TGY).

Evolutivement les MAP kinases sont hautement conservées: la kinase Hog1 (high osmolarity glycerol) dans *Saccharomyces cerevisiae* et la kinase Spc1/Sty1 dans *Schizosaccharomyces pombe* (O'Rourke et al., 1998) semblent provenir du même gène ancestral que la kinase mammalienne p38.

4.3.1.1. Mécanismes d'activation des MAP kinases p38

En ce qui concerne l'activation des p38, on sait que des stimuli extracellulaires comme les rayons UVB, le lipopolysaccharide (LPS) bactérien, le peroxyde d'hydrogène, un choc hyperosmotique, le TPA, le TNF α ainsi que l'IL-1 β constituent des facteurs connus pour activer les p38 kinases dans différents types cellulaires (Ono & Han, 2000). Surtout les réponses au stress ainsi qu'aux stimuli mitogènes sont médiés par les kinases p38.

Quelles voies de transduction sont induites par ces signaux ? Il semble que les TAO kinases (thousand and one kinases) activent spécifiquement les MAP kinases p38, il faut noter que beaucoup d'autres kinases sont capables d'activer p38 mais pas de manière aussi spécifique que les TAO kinases (Kyriakis & Avruch, 2001). On sait que les nPKC peuvent induire une phosphorylation de p38 (Efimova & Eckert, 2000) : en effet, un traitement au TPA ou à l'acide okadaïque (Efimova et al., 2003) dans des kératinocytes humains entraîne l'activation de la PKC δ qui peut dès lors activer les MEKK 3,6 et 7, kinases qui induisent la phosphorylation de la MAP kinase p38 δ (Efimova et al., 1998, Efimova et al., 2002). La kinase p38 δ semble jouer un rôle important dans l'apoptose induite par PKC δ (Eckert et al., 2003).

La p38 α (p38) est une kinase de 38 kDa qui est fortement activée par des cytokines inflammatoires et des stress environnementaux (LPS, TNF α , IL-1 β , TPA) dont les effets aboutissent souvent à l'apoptose (Porrás et al., 2004). La régulation de la voie des MAP kinases p38 α n'est pas être une cascade isolée car des souris p38 $\alpha^{-/-}$ ne sont pas viables alors que les souris knock-out des kinases en amont ou en aval de p38 sont viables (Ono & Han, 2000).

Remarquons que l'activation de p38 α ne dépend pas seulement des stimuli mais également du type cellulaire.

Des petites Rho GTPases (Cdc42, Rac) sont capables d'activer les p38 kinases (Ono & Han, 2000) en réponse à un traitement au sorbitol hyperosmotique (Cheng et al., 2002).

Une des cibles de phosphorylation de p38 est le facteur de transcription p53 qui active alors la transcription de p21 inducteur d'apoptose (Hildesheim et al., 2004).

Les protéines de choc thermique Hsp 27 et Hsp 70 (Garmyn et al., 2001) ainsi que les facteurs de transcription ATF-2 (Ono & Han, 2000) et AP-1 (Efimova et al., 1998) sont des substrats de phosphorylation en aval des MAP kinases p38 α et β .

La kinase p38 α est capable de phosphoryler la MAPKAPK 2 *in vitro* et peut de cette manière activer la phosphorylation de Hsp 27. La protéine de signalisation p38 δ est impliquée dans la régulation du niveau de transcription du gène de l'involucrine au cours de la différenciation du kératinocyte (Efimova et al., 2003).

A l'heure actuelle, on dispose de différents inhibiteurs capables d'inhiber spécifiquement l'activité kinase de p38 mais les inhibiteurs agissent seulement sur certaines isoformes de p38. Les inhibiteurs SB 202190 (Garmyn et al., 2001) et PD 169316 (Kummer et al., 1997) se lient au site de fixation d'ATP des kinases p38 α et β et empêchent de cette façon l'activité kinase de ces deux isoformes des MAP kinases p38. Ces inhibiteurs appartiennent à la classe des pyridinyl imidazoles qui empêchent la production de cytokines proinflammatoires. Ces dérivés de pyridinyl imidazoles font partie de la famille des CSAID (cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs) dont on espère des applications thérapeutiques dans le domaine des supprimeurs de douleurs (Kyriakis & Avruch, 2001).

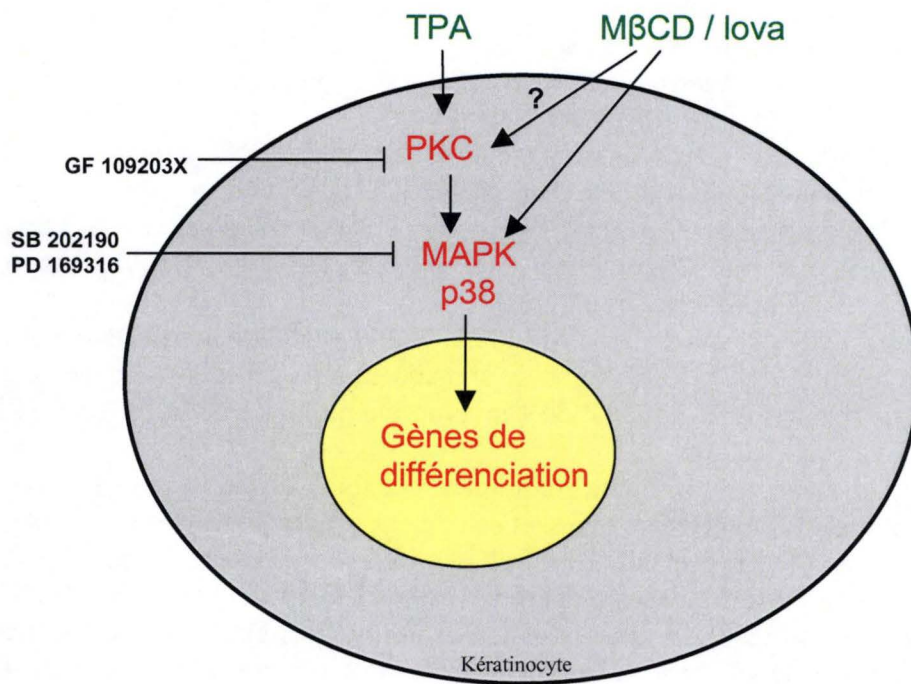


Figure 1-13: Schéma récapitulatif sur les objectifs de l'étude.

5. Les objectifs du travail

L'épiderme est formé majoritairement de kératinocytes, cellules qui subissent une différenciation complexe pour assurer la protection du corps en formant la couche superficielle de la peau. Dans le tissu épidermique, la différenciation des kératinocytes est en équilibre avec la prolifération au niveau de la couche basale. Une perturbation des mécanismes de prolifération et différenciation conduit inévitablement à des dysfonctionnements. Une meilleure connaissance des mécanismes régulant la prolifération et la différenciation doit aider à comprendre et à guérir des pathologies comme le psoriasis, maladie hyperproliférative de l'épiderme.

Le cholestérol a été proposé comme élément régulateur de certaines voies de transduction du signal impliquées dans la différenciation épidermique. Dans le cadre de ce travail, nous analysons le rôle du cholestérol membranaire dans la transduction des signaux conduisant à une différenciation des kératinocytes épidermiques.

Afin d'investiguer le rôle du cholestérol dans la différenciation, nous analysons les effets d'une déplétion en cholestérol sur des marqueurs de différenciation et la phosphorylation simultanée de MAP kinases et de protéine kinases C, molécules de signalisation.

La voie de signalisation induite par l'ester de phorbol TPA est bien connue dans les kératinocytes épidermiques et aboutit à une différenciation précoce de ce type cellulaire. En effet, l'ester de phorbol est un activateur des protéine kinases C (PKC) qui activent alors des MAP kinases p38. Comme on sait qu'une déplétion en cholestérol induit également l'activation de MAP kinases p38, il est intéressant de comparer les effets des deux traitements, de comprendre leurs parallélismes et similitudes. Quelles isoformes des MAP kinases p38 se trouvent activées par une déplétion en cholestérol membranaire? Les PKC font-elles partie de cette voie de signalisation induite par une déplétion en cholestérol membranaire?

MATERIEL & METHODES

1. Culture de kératinocytes épidermiques humains

Matériel:

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 5 µg/ml
- Hydrocortisone 5×10^{-7} M
- Transferrine 5 µg/ml

+ Pénicilline G 50 unités/ml (0,1 %)

+ Streptomycine 50 µg/ml (0,1 %)

Milieu complet KGM-2

(Keratinocyte Growth Medium)

KBM-2 (Keratinocyte Basal Medium, Clonetics)

+ suppléments :

- BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0,2 %
- hEGF 0,2 ng/ml
- Insuline 5 µg/ml
- Hydrocortisone 5×10^{-7} M
- Epinéphrine
- Transferrine 5 µg/ml

+ Streptomycine 50 µg/ml

+ Pénicilline G 50 unités/ml

Milieu autocrine EpiLife® -

EpiLife Medium® (Cascade)

+ suppléments:

- L-histidine $2,4 \times 10^{-4}$ M
- L-isoleucine $7,5 \times 10^{-4}$ M
- L-méthionine 9×10^{-4} M
- L-phénylalanine 9×10^{-4} M
- L-tryptophane $4,5 \times 10^{-4}$ M
- L-tyrosine $7,5 \times 10^{-4}$ M
- Hydrocortisone 5×10^{-7} M
- Pénicilline G 50 unités/ml
- Streptomycine 50 µg/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 foetal dialysé (dFCS) à 2 %
(le sérum est dialysé contre un tampon sans Mg^{2+} et sans Ca^{2+})

Milieu de congélation

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

Méthode:

1.1. Etablissement de cultures primaires à partir de prélèvements

Les abdominoplasties réalisées par le docteur B. Bienfait à la Clinique Saint-Luc à Bouge fournissent le matériel pour les cultures primaires de kératinocytes épidermiques. Immédiatement après l'intervention chirurgicale, la couche de peau superficielle (derme et épiderme) est prélevée au dermatome. Ce prélèvement est conservé dans une solution physiologique jusqu'à son arrivée au laboratoire. Les kératinocytes des morceaux de peau fournis par un patient sont isolés et constituent le point de départ pour l'établissement d'une souche de kératinocytes abdominaux normaux (NAK). Au laboratoire, les manipulations se font en conditions stériles sous hotte à flux vertical.

Le prélèvement de peau est coupé à l'aide de bistouris stériles en petits morceaux d'environ 1 cm². A ce stade, l'épiderme est encore associé au derme via la jonction épidermo-dermique. Les petites sections découpées sont étalées, la face dermique sur une solution de trypsine de pancréas bovin 0,17% (T17) pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, l'épiderme est détaché du derme et les morceaux d'épiderme sont étalés sur une solution bloquante contenant 2% de sérum de veau fœtal dialysé (dFCS) pour neutraliser l'activité de la trypsine.

Une fois que l'épiderme est détaché du derme, qui est éliminé, il faut isoler cellules. Via des frottements mécaniques avec des pinces et des passages successifs dans une pipette, les kératinocytes sont séparés les uns des autres. Une filtration sur un tamis cellulaire de 70 µm permet ensuite d'éliminer les cellules non dissociées et notamment la couche cornée. La suspension cellulaire recueillie est centrifugée à 4°C à 1 000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite, on resuspend le culot contenant les cellules épidermiques dans du milieu de culture KGM-2. La concentration en calcium du milieu KGM-2 et l'ajout de 0,1 % de dFCS facilitent l'adhérence des kératinocytes au substrat : ce milieu de culture comporte tous les facteurs de croissance et hormones nécessaires à une prolifération intense des kératinocytes qui sontensemencés à densité élevée (46 000 cellules par cm²). L'incubation des cultures se réalise dans une étuve humide à 37°C où l'atmosphère contient 5% de CO₂. Le premier changement de milieu prend place au quatrième jour, ensuite le milieu est renouvelé tous les deux jours.

1.2. Etablissement de cultures secondaires

Suite à la culture primaire, les kératinocytes sont passés en culture secondaire dont l'objectif est une amplification importante du nombre de cellules. Afin de garantir que les cellules gardent leur pouvoir prolifératif et n'entrent pas encore en différenciation, il est important que la culture primaire n'atteigne pas le stade de confluence avant le passage. Pendant leur phase de prolifération intense, les cellules sont donc détachées de leur support avec une solution de trypsine (T25). La solution servant à décrocher les kératinocytes contient de la trypsine à 0,025% et le chélateur de calcium EDTA. Ensuite les kératinocytes sont récoltés dans la solution A contenant 2% de dFCS, centrifugés, comptés etensemencés à faible densité (10 000 cellules par cm²).

Les kératinocytes sont connus pour leur forte adhérence au substrat, propriété qui permet de les isoler d'autres types cellulaires éventuellement présents dans la culture primaire en laissant agir la trypsine pendant un temps court (5 min). A ce moment, fibroblastes et autres types cellulaires perdent déjà leur fixation au substrat alors que les kératinocytes restent accrochés. L'aspiration de la solution de trypsine après cinq minutes élimine les cellules contaminantes mais la trypsinisation doit durer plus longtemps afin de détacher les kératinocytes.

L'ensemencement secondaire se fait dans du milieu de culture complet EpiLife[®]+ favorisant la prolifération cellulaire, notamment en raison de sa faible teneur en calcium (0,06 mM).

1.3. Congélation des kératinocytes

La congélation des kératinocytes se fait lorsque les cultures secondaires sont en phase de prolifération intense sans avoir atteint le stade de confluence, donnant ainsi un nombre important de kératinocytes non différenciés.

Comme décrit précédemment, les kératinocytes sont trypsinisés, centrifugés, suspendus dans du milieu complet et comptés. Le milieu de congélation, formé par du milieu de culture complet (60%), du DMSO (20%) et du 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, puis transférés dans l'azote liquide à -180°C pour leur conservation à long terme.

1.4. Etablissement de cultures tertiaires

Les cryotubes contenant les kératinocytes sont sortis avec précaution de l'azote liquide et leur contenu est dégelé rapidement dans un bain-marie à 37°C. Les kératinocytes sont ensuite comptés et ensemencés dans du milieu de culture complet KGM-2. La mise en culture tertiaire se fait à une densité entre 6 000 et 10 000 cellules par cm². Le lendemain, le milieu est échangé contre du milieu complet EpiLife[®], ceci afin d'éliminer les traces cytotoxiques du DMSO provenant des ampoules de congélation. Par la suite, le milieu des cultures est renouvelé tous les deux jours.

Dès que les kératinocytes occupent environ 50% de la superficie de la boîte et sont alors cultivés en milieu autocrine c'est-à-dire que le milieu complet EpiLife[®] + est échangé contre du milieu autocrine EpiLife[®] - qui contient des acides aminés et l'hydrocortisone mais plus aucun facteur peptidique exogène. Les kératinocytes sont alors capables de stimuler eux-mêmes leur prolifération.

Le milieu autocrine est changé tous les deux jours et les kératinocytes atteignent successivement les stades cellulaires de sous-confluence, confluence et post-confluence.

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. Dans le but d'extraire le cholestérol des membranes cellulaires, on dissout extemporanément la poudre de méthyl- β -cyclodextrine (7,5 mM ou 12,5 mM M β CD, Sigma) dans le milieu autocrine EpiLife[®]. Une étape de filtration à travers un filtre de 0,2 μ m (Millex GP, Millipore) sert à stériliser la solution qui remplace alors le milieu de culture. Ensuite les cultures sont incubées à 37°C dans cette solution pendant 60 minutes seulement afin d'éviter la toxicité de la M β CD.

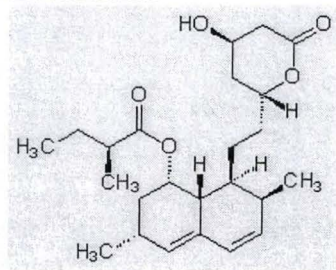
La deuxième phase du traitement consiste alors à inhiber la synthèse endogène du cholestérol via une statine pendant une durée assez longue pour pouvoir constater une éventuelle altération de l'expression génique. Dans ce but, on prépare du milieu autocrine contenant 10 μ M de lovastatine (Mevinolin ou Lovastatine, Sigma), inhibiteur de l'enzyme hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA), l'enzyme-clé dans la synthèse du cholestérol. Pratiquement, les cultures incubées en présence de M β CD sont rincées deux fois avec de la solution A stérile puis on procède à l'incubation des kératinocytes dans la solution de lovastatine pendant 17h à 37°C. La solution stock de lovastatine est dissoute dans du DMSO, la même concentration de DMSO est mise en présence des cellules contrôle.

Après le traitement, on prend des photos des cultures puis les boîtes de kératinocytes sont soit congelées à -78°C, soit analysées immédiatement.

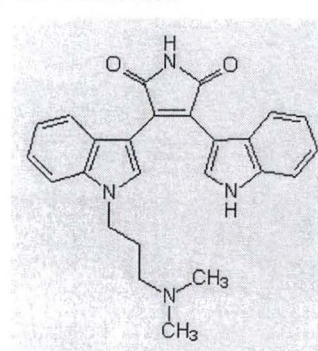
2.2. Traitement au TPA des kératinocytes

Les cultures de kératinocytes sont cultivées jusqu'au stade cellulaire de la confluence. La solution stock de TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate encore appelé PMA ou

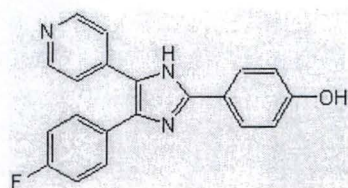
Lovastatine



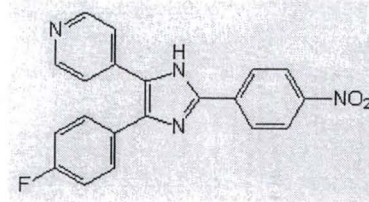
GF 109203X



PD 169316



SB 202190



Produit	Famille	Enzyme inhibée	Source	Concentration utilisée
SB 202190	pyridinyl imidazoles	p38 α , β	Calbiochem	10 μ M
PD 169316	pyridinyl imidazoles	p38 α , β	Calbiochem	15 μ M
GF 109203X	Bisindolyl-maleimide I	PKC α , β _I , β _{II} , γ , δ , ϵ	Calbiochem, Sigma	1,3,10,15 et 30 μ M
Lovastatine	Statine	HMG-CoA réductase	Sigma	10 μ M

Figure 2-1 : Formule chimique développée des inhibiteurs utilisés au cours de ce travail.

La lovastatine inhibe l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, l'enzyme clé dans la synthèse du cholestérol. Les molécules SB 202190 et PD 169316 sont des dérivés de pyridinyl imidazoles, des inhibiteurs des MAP kinases p38 α , β . La molécule GF 109203X est un bisindolyl-maleimide, un inhibiteur des protéine kinases C.

Phorbol-12-Myristate-13-acetate, Calbiochem) est de 1 mg/ml. Pour le traitement appliqué, nous utilisons une concentration de 10 ng de TPA par ml de milieu autocrine.

Après 18h de traitement, on prend des photos des cultures puis les boîtes de kératinocytes sont soit congelées à -78°C, soit analysées immédiatement.

2.3. Inhibition de protéine kinases

Pour mettre en évidence si une protéine kinase particulière est impliquée dans la voie de signalisation investiguée, on se sert d'inhibiteurs spécifiques de cette kinase. Du point de vue des manipulations, toutes les étapes de l'extraction du cholestérol ou du traitement au TPA sont identiques, si ce n'est que l'inhibiteur est joint aux cultures 30 à 60 minutes avant que le traitement proprement dit ne commence. L'inhibiteur reste présent dans le milieu de culture jusqu'à la fin du traitement. En fonction des dilutions de l'inhibiteur, une quantité identique de DMSO est ajoutée aux cellules contrôle. Notons que la concentration maximale en DMSO appliquée ainsi à nos cellules est de 0,7%.

La figure 2-1 reprend les différents inhibiteurs utilisés au cours de ce travail.

3. Test de viabilité cellulaire: test MTT

La cytotoxicité éventuelle exercée par un traitement à la M β CD et au TPA sur des cultures de kératinocytes confluents est évaluée à l'aide d'un test MTT. Le principe de base de ce test est une mesure densitométrique de la présence de formazan, substance colorée formée à partir de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromide, Sigma).

Le MTT est une poudre jaune photosensible et hydrosoluble. Si les cellules sont vivantes, le MTT est transporté dans les mitochondries où il est métabolisé en formazan, un produit bleu non soluble dans l'eau. La quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Toutes les manipulations se font à l'abri de la lumière, puisque le MTT est photosensible. La poudre MTT est dissoute dans du milieu autocrine en raison de 0,5 mg de MTT par ml et les cultures cellulaires traitées sont rincées deux fois à la solution A et puis incubées à 37°C pendant au moins une heure en présence de cette solution. Ensuite, les kératinocytes cultivés dans des plaques 12 puits sont lysés avec 1 ml d'isopropanol dans lequel le formazan est soluble. La lyse cellulaire libère la couleur bleue de l'intérieur des cellules lors d'une incubation pendant 5 minutes sur un plateau tournant. On réalise des duplicats dilués deux fois avec de l'isopropanol dans une plaque 96 puits et on mesure la densité optique à 720 nm. Une forte coloration bleue est le signe d'une bonne viabilité cellulaire. Remarquons que les conditions de traitements sont réalisées en triplicats pour augmenter la fiabilité des résultats.

4. Extraction d'ARNm et analyse de l'expression génique par Northern blot

Vu la fragilité des ARN messagers suite à l'omniprésence d'ARNases dans l'environnement, il est essentiel de porter des gants et d'utiliser du matériel traité au diéthyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma) lors de la manipulation d'ARN poly-A (le DEPC et le NaOH, permettent

d'éliminer toute trace d'ARNase et d'éviter la dégradation des messagers). Toutes les solutions ci-dessous sont traitées avec le DEPC.

Matériel:

H₂O traitée DEPC

-500 ml H₂O
-traité avec 0,1% DEPC et autoclavé

Tampon riche en sels

-Tris-HCL 0,01 M
-NaCl 0,5 M
-EDTA 0,001 M
-SDS 0,2%
-traité avec 0,1% DEPC et autoclavé

Tampon pauvre en sels

-Tris-HCL 0,01 M
-NaCl 0,1 M
-EDTA 0,001 M
-SDS 0,2%
-traité avec 0,1% DEPC et autoclavé

Tampon sans sels

-Tris-HCL 0,005 M
-EDTA 0,001 M
-sodium dodecyl sulfate (SDS) 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 1%
-traité avec 0,1% DEPC et autoclavé

Tampon TE

-Tris base 9 mM
-EDTA-2H₂O 0,9 mM
-pH 8

Méthode:

4.1. Préparation des oligo-dT couplés à la cellulose

Les ARN messagers constituent une petite partie du "pool" d'acides ribonucléiques. La méthode utilisée pour isoler les ARN messagers consiste à utiliser des oligo-dT monobrans qui s'apparient, en conditions salines élevées, à la queue poly-A typique des ARN messagers. Un oligo-dT est formé de séquences de 30 bases désoxythymidines et cette chaîne de nucléotides est attachée par sa partie 5'-phosphate à la cellulose (Oligo(dT)cellulose, Invitrogen). Afin d'éviter toute dégradation des ARN poly-A, les oligo-dT sont traités au DEPC avant utilisation. Tout d'abord deux rinçages sont effectués avec une solution de NaOH 0,1 M pour enlever les fines particules de cellulose puis suit un lavage de 30 minutes dans de l'eau distillée comportant 0,1% de DEPC. Après cette étape, suivent 3 rinçages des oligo-dT avec de l'eau distillée traité DEPC et un lavage avec le "Tampon riche en sels". Par la suite, les oligo-dT sont mis en suspension dans 2 ml de ce même tampon à raison d'une concentration de 0,025g d'oligo-dT par boîte de culture de 75 cm². La suspension d'oligo-dT se conserve pendant une semaine à 4°C.

4.2. Extraction d'ARNm

L'extraction des ARNm à partir de cultures cellulaires est réalisée selon le protocole établi par Schwab et al. (1983). Afin d'éviter l'effet des ARNases endogènes, il faut rapidement lyser les cultures avec le tampon de lyse. Ce tampon contient 25 µg/ml de protéinase K (Roche), une protéase non spécifique qui inactive les ARNases et ADNases. Le lysat cellulaire obtenu est de nature visqueuse, cependant plusieurs passages à travers une seringue munie d'une aiguille stérile de calibre 21G (Braun) permettent de casser la structure globulaire de l'ADN et de fluidifier de cette manière le lysat cellulaire. La concentration en protéinase K est ajustée à 75 µg/ml et une incubation de 30 minutes à 37°C permet à l'enzyme d'exercer son travail de façon optimale. D'un autre côté, on augmente la concentration en sels de 0,1 M à 0,5 M,

puisque cette étape prépare les ARN poly-A à leur hybridation avec les oligo-dT. Les oligo-dT-cellulose sont mis en présence du lysat cellulaire contenant les ARN messagers. L'hybridation se fait pendant au moins deux heures à température ambiante par agitation sur un plateau basculant.

Une centrifugation à 1 200 rpm permet de rassembler les complexes cellulose-oligo-dT-ARNm dans le fond du tube, ce culot est lavé une fois avec le tampon riche en sels puis suspendu dans 10 ml de ce même tampon. Cette solution est alors déposée sur des colonnes comportant un filtre en silice (poly-prep chromatography column, Bio-Rad) qui retient les complexes de cellulose. On réalise deux lavages avec le tampon riche en sels, suivis d'un autre lavage avec un tampon à faible concentration en sels. Ce lavage sert à décrocher les molécules qui sont éventuellement fixées de manière aspécifique aux oligo-dT. Pour déshybrider les ARN messagers des oligo-dT couplés à la cellulose, il faut utiliser des conditions de température élevée et de salinité faible. On récupère donc les ARN poly-A de la colonne en utilisant un tampon sans sels à température élevée (55°C). Les ponts hydrogènes entre les bases se défont et de cette façon les ARNm sont décrochés des oligo-dT. Une fois que l'éluion des ARN poly-A est terminée, on réajuste la concentration en NaCl à 0,5 M et on ajoute deux volumes d'éthanol froid 95%. Les acides ribonucléiques précipitent dans ces conditions lors d'une incubation pendant une nuit à -20°C.

Le lendemain, les échantillons sont concentrés à l'aide de centrifugations successives de 15 minutes à 12 000 rpm. On sèche le culot d'ARNm afin d'éliminer l'éthanol puis on le resuspend dans du tampon TE. L'absorbance de l'échantillon à 260 nm détermine la concentration en ARN, alors qu'une éventuelle contamination en protéines est révélée par le ratio des longueurs d'onde 280 nm et 260 nm. Idéalement ce ratio est proche de la valeur 2. L'échantillon d'ARNm concentré est stocké à -78°C. Sur base de la mesure densitométrique, on calcule le volume à prélever de l'échantillon pour charger la même quantité d'ARN ($\approx 1,5 \mu\text{g}$) dans chaque puits du gel d'agarose en vue de l'analyse par Northern blot.

4.3. Electrophorèse et transfert des ARNm (Northern blot)

Matériel:

MOPS 10x

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

Solution tamponnée

- MOPS 10x
- pH 7

Gel d'électrophorèse

- Agarose pure à 1,2 % (Gibco-BRL) dans de l'H₂O 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 suivi d'une filtration

Sample Buffer

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

Tampon d'électrophorèse

- MOPS 1x
- Formaldéhyde 3,3%

20x SSC

- NaCl 2,9 M
- Citrate de sodium 0,29 M

RNA Ladder 0.24-9.5 kb (Gibco-BRL)

Sample loading Buffer

- glycérol 50%
- Na₂ EDTA 1 mM
- Xylene cyanol 0,4%
- Bromophenol blue 0,4%

Méthode:

Le volume de l'échantillon d'ARNm prélevé est déshydraté au Speedvac. Ensuite, on redissout le culot dans du "Sample Buffer" qui contient de la formamide et du formaldéhyde afin de détruire les éventuelles structures secondaires formées par l'ARN. L'incubation des échantillons dans ce tampon pendant 35 minutes à 65°C sert aussi à désapparier les acides ribonucléiques formant des structures secondaires en "hairpins" par exemple. Immédiatement après l'incubation, les échantillons sont placés sur glace afin d'éviter tout réappariement, ensuite on ajoute du "Sample loading Buffer" aux échantillons d'ARNm. Un µl de bromure d'éthidium est ajouté au marqueur de poids moléculaire (RNA Ladder) qui contient également du "Sample Buffer" et du "Sample loading buffer" comme les échantillons. Avant de déposer les échantillons sur le gel d'électrophorèse, celui-ci est polarisé pendant 10 minutes à 75V. La migration se réalise à 75V pendant 3 heures en présence de tampon d'électrophorèse comportant également du formaldéhyde. Une fois que l'électrophorèse est terminée, on prend une photo du gel sous rayonnement UV pour pouvoir situer le marqueur de poids moléculaire contenant du bromure d'éthidium.

Par la suite, on enlève un maximum de formaldéhyde du gel en réalisant 3 lavages avec de l'eau désionisée. Les ARNm qui ont migré selon leur poids moléculaire sont transférés sur une membrane en nylon par le système "Turbo Blotter" (Schleicher & Schuell). Le transfert se fait par capillarité avec du Tampon 20x "Saline Sodium Citrate" (SSC 20x) pendant une nuit. Le lendemain, les ARN poly-A transférés sur la membrane sont fixés de manière covalente par des rayons UV (150 mJ/cm²). A ce moment la membrane est prête pour l'hybridation avec une sonde radioactive ou elle peut être conservée à -20°C emballée dans du cellophane.

4.4. Hybridation des "Northern blots" avec des sondes d'ADNc marquées au ³²P

Matériel:

Solution d'hybridation

- Na₂HPO₄ 0,12 M
- NaCl 0,25 M
- SDS 7 %
- Formamide désionisée 50 %
- pH 7,2

20x SSC ()

- NaCl 2,9M
- Citrate de sodium 0,29 M

Solution de stripping

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

Méthode:

Les membranes, enroulées et séparées par des treillis en nylon, sont placées dans les bouteilles à hybridation (Hybaid). Dans ces bouteilles, on introduit la membrane en nylon et du tampon 2x SSC qui sert à mouiller la membrane. Les bouteilles tournant dans un four à hybridation Hybaid à 43°C, il faut veiller à bien étaler le montage (membrane/treillis en nylon) sur les parois de la bouteille. Ensuite, on remplace le tampon 2x SSC contre quelques ml de solution d'hybridation chauffée à 43°C. Pour ôter toute trace de tampon 2x SSC, on change la solution d'hybridation contre un second volume de la même solution et on laisse incuber la membrane pendant une heure dans le four à 43°C. Cette étape de préhybridation sert à masquer les sites non spécifiques, ce qui diminue le bruit de fond lors de la détection de la sonde.

Sondes ADNc	Taille (pb)	Plasmide	Référence	Sites de restriction
Involucrine	852	pSPORT	Eckert & Green, 1986	Pst I
K 10	2039	pGem-3	Roop et al., 1988	Pst I
K 14	503	PGem3	Roop et al., 1988	Bst X I
36B4	700	pGem-4	Laborda, 1991	Pst I

Tableau 2-1 : Liste des sondes d'ADN complémentaire utilisées pour hybrider des membranes de Northern blot.

Les hybridations des membranes sont éventuellement effectuées après décrochage des sondes précédentes. Le décrochage se fait en bouillant la membrane deux fois pendant 5 minutes dans de la "solution de stripping" contenant du SDS.

Les ADN complémentaires, répris dans le tableau 2-1, sont marqués selon la méthode du "random priming" en utilisant 20 ng d'ADNc purifié après restriction. L'ADNc est désapparié en plaçant l'échantillon dans un bain à ébullition pendant 5 minutes. On le refroidit ensuite brutalement sur glace et on ajoute les amorces aléatoires (random primers), le fragment Klenow de l'ADN-polymérase et les nucléotides non marqués dATP, dGTP et dTTP (Kit Random Primers DNA, Invitrogen) ainsi que le (α - ^{32}P) dCTP (Amersham). Les amorces aléatoires sont des hexamères qui s'hybrident à différents endroits de la sonde et servent de point de départ pour la polymérase. Après 90 minutes, la réaction de polymérisation est arrêtée par le Stop Buffer (Kit Random Primers DNA, Invitrogen). Les nucléotides non utilisés ainsi que les fragments de taille inférieure à 200 paires de bases sont éliminés par un passage sur une colonne de chromatographie Bio-Spin 30 (Bio-Rad). On évalue alors la radioactivité de la sonde préparée par une mesure au compteur à scintillation BECKMANN LS 6000. Pratiquement un μl de la sonde est mélangé à 100 μl d'eau et 4 ml d'Aqualuma ; une détection 10^5 et 5×10^5 cpm signale une bonne incorporation d'activité radioactive. Avant de mettre la sonde en présence de la membrane, on la fait bouillir pendant 5 minutes afin de s'assurer qu'elle se trouve sous forme monobrin. La sonde ainsi préparée est ajoutée à 10 ml de solution d'hybridation et ce mélange remplace alors la solution d'hybridation seule utilisée pour la préparation des membranes. L'hybridation se déroule pendant la nuit dans le four tournant à une température de 43°C .

Le lendemain, les membranes sont lavées pour enlever notamment les sondes accrochées de manière non spécifique à la membrane. Lors de ces lavages de 15 minutes, on augmente successivement la concentration du tampon SSC ainsi que la température (3 lavages avec la solution 2x SSC/0,1% SDS à 25°C , 2 lavages avec la solution 0,5x SSC/0,1% SDS à 43°C et 2 lavages avec la solution 0,5x SSC/0,1% SDS à 65°C). Afin d'augmenter la spécificité de l'hybridation et de pouvoir distinguer les différents messagers des kératines, il faut mettre en œuvre trois lavages supplémentaires avec une solution 0,1x SSC/0,1% SDS puisque les différentes kératines ont des séquences nucléotidiques très proches. Quand les lavages sont terminés, on emballe les membranes dans du cellophane et on les expose à un écran de phosphore (Storage Phosphore Screen, Packard). La durée d'exposition de la membrane à cet écran dépend de l'intensité du signal radioactif. L'écran de phosphore est scanné dans un appareil cyclone (Packard). L'analyse de l'image se fait par le programme OptiQuant : en effet les spots détectés témoignent de la présence de sondes radioactives accrochées sur la membrane, leur intensité est proportionnelle à l'incorporation de ^{32}P . Via le programme OptiQuant il est possible de quantifier l'expression de messagers en normalisant les valeurs de DLU (Digital Light Unit) de l'ARN d'intérêt par rapport à l'ARNm du gène 36B4, un gène constitutivement exprimé dans les kératinocytes. Des spots de même intensité pour le 36B4 témoignent d'un chargement homogène des ARNm sur le gel et d'un bon transfert sur la membrane lors du Northern blot.

Anticorps	Dilution	Provenance	Source et isotype	Spécificité
p38 total	1 : 750	Cell signaling	IgG polyclonal de lapin	p38 phosphorylé et non phosphorylé
p38 total	1 : 2500	Biosource	IgG monoclonal de souris	p38 phosphorylé et non phosphorylé
phospho-p38	1 : 750	Cell signaling	IgG polyclonal de lapin	p38 phosphorylé
phospho-p38	1 : 1 000	Biosource	IgG polyclonal de lapin	p38 phosphorylé
Involucrine	1: 250	Harbor Bio-Products	IgG polyclonal de lapin	Involucrine humaine
Hsp 27 phosphorylé	1: 10 000	Upstate	IgG polyclonal de lapin	phospho Hsp 27
β -actine	1: 20 000	Sigma	IgG monoclonal de souris	β -actine
Ac 2aire-anti lapin-HRP	1 : 1 000	DakoCytomation	IgG de chèvre	IgG de lapin
Ac 2aire-anti souris-HRP	1 : 1 000	DakoCytomation	IgG de chèvre	IgG de souris

Tableau 2-2: Liste des anticorps utilisés pour l'immunodétection de protéines par Western blot.

5. Analyse des protéines par Western blot

Matériel:

Tampon de lyse:

- Tris-HCl 62,5 mM
- SDS (sodium dodécyl sulfate) 2 %
- Glycérol 8,7 %
- Bleu de bromophénol 0,05%
- DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma)

Running gel:

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

Stacking gel:

- Tris base 125 mM à pH 6,8
- SDS 0,1 %
- Acrylamide/Bisacrylamide 4 %
- APS (persulfate d'ammonium) 0,05 %
- TEMED 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 %

Tampon PBS:

- NaCl 136,86 mM
- Na₂HPO₄ 2H₂O 8,09 mM
- KCl 2,68 mM
- KH₂PO₄ 1,47 mM

Solution de rinçage

- PBS
- Tween-20 0,1 %

Solution bloquante:

- PBS
- Tween-20 0,1 %
- Lait écrémé Gloria 5%

Méthode:

Les boîtes de kératinocytes traités et rincés sont placés sur glace et les cellules sont lysées avec un petit volume de tampon de lyse 2x concentré. Ce tampon contenant du SDS détruit la membrane plasmique et le lysat cellulaire devient visqueux. Les échantillons sont bouillis pendant 5 minutes afin de dénaturer complètement les protéines avant leur migration électrophorétique. Il s'agit d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 12,5 % contenant 0,1 % de SDS. Le SDS, agent dénaturant, se fixe sur les protéines et la répulsion mutuelle des charges négatives du SDS provoque le dépliement des protéines. Comme l'extraction des protéines se déroule toujours à partir d'un même matériel cellulaire à confluence, un volume de 15 µl est chargé sur chaque piste du gel, en supposant que ce volume contienne une quantité identique de protéines. Lors de l'électrophorèse, les protéines migrent en fonction de leur dimension qui est proportionnelle au poids moléculaire. Le glycérol ajouté aux protéines alourdit l'échantillon et le bleu de bromophénol permet de suivre la migration des plus petites protéines. La séparation électrophorétique s'effectue à 150 Volts pendant environ 1h.

Les protéines séparées, mais incluses dans le gel, sont transférées sur une membrane PVDF contenant des pores de 0,45 µm (Amersham). Cette technique de transfert en immersion utilise de nouveau un procédé électrophorétique et se réalise en présence de tampon de transfert à un voltage de 60 Volts pendant une nuit.

Le lendemain, la membrane est rincée avec la solution de rinçage afin d'éliminer les restes de méthanol provenant du tampon de transfert. Ensuite une incubation d'une heure dans la solution de rinçage contenant 5% de lait écrémé (Gloria, Nestlé) (solution bloquante) est indispensable pour éviter la fixation aspécifique de l'anticorps primaire. Les protéines du lait

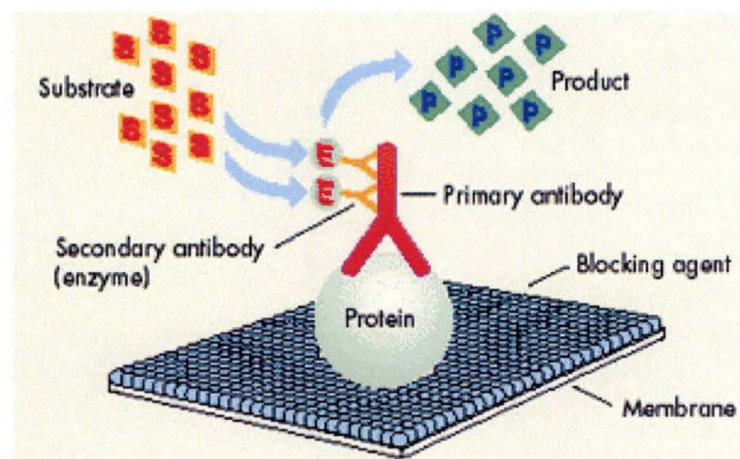


Figure 2-2 : Représentation schématique d'immunodétection de protéines par Western blot
 (www.millipore.com/eHandbook.nsf/docs)

couvrent la membrane en dehors des protéines transférées et n'empêchent pas les interactions spécifiques entre anticorps et antigènes (fig 2-2).

Suite à cette étape de saturation, la membrane est mise en présence de l'anticorps primaire dilué dans cette même solution de saturation. L'anticorps primaire est spécifique de la protéine qu'on veut mettre en évidence (tab 2-2). Le temps d'incubation et sa dilution dépendent de l'anticorps utilisé. Trois rinçages servent ensuite à éliminer les anticorps non accrochés. On procède à l'incubation de la membrane avec l'anticorps secondaire spécifique du fragment constant de l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est couplé à l'enzyme « horse radish peroxidase (HRP) ». Cette enzyme permet de détecter facilement la présence de l'anticorps et donc aussi de l'antigène grâce à un kit de révélation (kit ECL, Amersham). La solution de révélation produit une réaction de chémoluminescence sur la membrane si la peroxydase est présente.

Afin de réaliser des contrôles de charge, on peut décrocher les anticorps de la membrane PVDF avec un kit de stripping (Re-Blot Plus, Chemicon) puis, détecter soit une autre protéine, soit la même protéine non phosphorylée. Cependant, comme la différence de poids moléculaire entre la forme non phosphorylée et la forme phosphorylée des protéines est minime, il faut que le stripping de la membrane fonctionne de façon optimale. Dans nos expériences le stripping des anticorps n'était pas complet. Or, un temps d'incubation plus long en présence de la solution de stripping décroche non seulement les anticorps, mais aussi les protéines transférées sur la membrane. Pratiquement, les membranes incubées après avoir subi un stripping, montraient un bruit de fond élevé et la concentration de l'anticorps primaire devait être augmentée pour détecter la protéine. Pour ces raisons, nous avons décidé de réaliser chaque fois deux gels: un premier pour la détection de la protéine phosphorylée, et le deuxième pour la détection de la protéine non phosphorylée. Les volumes de protéines chargés sont toujours identiques pour les deux gels et toutes les étapes de migration, transfert et incubation sont réalisées en parallèle.

6. Marquage en immunofluorescence

Matériel:

Tampon PBS/ABC :

- CaCl₂ 0.9 mM
- KCl 2 mM
- KH₂PO₄ 1.4 mM
- MgCl₂ 0.5 mM
- NaCl 0.13 M
- Na₂HPO₄ 2H₂O 8 mM
- pH 7.2
- Na₃VO₄ 0.1 mM

Tampon PBS/BSA :

- Tampon PBS/ABC
- Bovine Albumine Serum (BSA) (Sigma) à 0.1 %
- Triton X-100 (Merck) à 0.02 %

Tampon Glycine:

- Tampon PBS/ABC
- Glycine 0.1 M

Méthode:

Les protocoles de culture et de traitement des kératinocytes suivent les indications données précédemment, si ce n'est que les kératinocytes sontensemencés sur des lamelles couvre-objets dans des plaques de 6 ou 12 puits. Après les 18h de traitement, les cellules sont rincées avec du Tampon PBS/ABC contenant 0,1 mM d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄, Sigma), un inhibiteur de phosphatases. Ensuite, on procède à une fixation des cellules de 15 min avec du formaldéhyde 4% préparé dans le PBS/ABC à partir d'une solution stock à 37 % (Merck).

Anticorps	Dilution	Provenance	Source et isotype	Spécificité
p38 total	1 : 100	Cell signaling	IgG polyclonal de lapin	p38 phosphorylé et non phosphorylé
phospho-p38	1 : 100	Biosource	IgG polyclonal de lapin	p38 phosphorylé
Involucrine	1: 40	Harbor Bio-Products	IgG polyclonal de lapin	Involucrine humaine
Ac 2aire-anti lapin-Alexa 488	1 : 200	Molecular Probes	IgG de lapin	IgG de lapin

Tableau 2-3 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence.

Cette étape est suivie de 3 rinçages dans du PBS contenant 0,1 M de glycine pour neutraliser les aldéhydes libres.

Les protéines d'intérêt étant cytoplasmiques, on doit perméabiliser les cellules par le Triton X-100, un détergent neutre. Triton X-100 0,02% (Merck) et BSA 0,1% (Sigma) ajoutés au PBS/ABC forment la solution de perméabilisation qui sert aussi à saturer les sites non spécifiques. Après 30 minutes d'incubation dans la solution de saturation (Tampon PBS/BSA), les lamelles portant les kératinocytes fixés et perméabilisés sont prêtes pour leur incubation avec l'anticorps primaire. La dilution dans la solution de saturation et le temps d'incubation dépendent de l'anticorps utilisé (tab 2-3). L'incubation est suivie de trois rinçages de 10 minutes dans la solution de saturation. Puis suit une incubation d'une heure dans l'anticorps secondaire couplé à la sonde fluorescente *Alexa 488* (Molecular probes). Trois nouveaux rinçages de 10 minutes dans la solution de saturation sont effectués, puis les lamelles couvre-objets sont montées au Mowiol (Sigma). L'observation du marquage et la prise de photos se fait au microscope confocal (Leica).

RESULTATS & DISCUSSION

1. Etude du modèle de culture des kératinocytes humains en culture autocrine

1.1. Analyse morphologique en microscopie à contraste de phase

Le modèle de culture employé prévoit que les kératinocytes soient ensemencés à une densité de 7 500 cellules par cm^2 dans le milieu de culture complet (Epilife[®] +) contenant les facteurs nécessaires à la prolifération cellulaire. Ce milieu est échangé contre un milieu sans facteurs de croissance (Epilife[®] -) lorsque les kératinocytes recouvrent environ 50 % de la surface disponible. Les cultures atteignent successivement les stades de sous-confluence, confluence et post-confluence (fig. 3-1A).

La **sous-confluence** est caractérisée par une prolifération intensive visible par de nombreuses mitoses. Les kératinocytes présentent un aspect allongé avec des jonctions cellulaires réfringentes. Souvent cette phase de culture autocrine est atteinte 4 à 5 jours après la mise en culture.

Le stade de **confluence** est défini par un tapis cellulaire couvrant la surface de culture et où les mitoses se font plus rares. En effet, on assiste alors à la transition d'une prolifération intensive vers une différenciation progressive des kératinocytes. Les cellules prennent une forme polyédrique et sont tassées les unes contre les autres. A confluence, les jonctions cellulaires ont perdu leur aspect réfringent. Remarquons que la détermination précise de la confluence cellulaire peut parfois être difficile, puisque les kératinocytes cultivés dans le milieu de culture Epilife[®] forment un tapis cellulaire présentant encore une certaine activité mitotique.

La **post-confluence** se caractérise par la mise en place d'un essai de stratification. En effet, certains kératinocytes se détachent de la surface de culture couverte par le tapis cellulaire pour former une deuxième assise de cellules. Une autre caractéristique des kératinocytes post-confluents en culture autocrine est la présence fréquente de granulations cytoplasmiques.

1.2. Analyse de l'expression de marqueurs de différenciation

Dans le but de caractériser ce modèle de culture autocrine, nous analysons l'expression de certains marqueurs épidermiques de différenciation à des stades de culture différents. *In vivo*, la stratification témoigne d'une différenciation progressive qui est caractérisée par l'expression des protéines kératine 1 et kératine 10, involucrine, filaggrine, loricrine et autres. Rappelons qu'en conditions de culture autocrine, la densité cellulaire régule le stade de différenciation des cultures de kératinocytes (Poumay & Pittelkow, 1995). Nous allons mettre en évidence la présence des messagers de ces marqueurs pour suivre la différenciation progressive des kératinocytes. Cette mise en évidence des marqueurs de différenciation se fait par l'analyse de leurs transcrits par la méthode Northern blot. L'homogénéité du chargement des gels est assurée par l'étude de l'expression du house-keeping gene 36B4. Ce gène est exprimé de manière constitutive dans les kératinocytes, car il code pour la phosphoprotéine ribosomique humaine PO (Laborda, 1991).

L'observation du Northern Blot (fig. 3-1B) révèle que l'expression de la kératine 14 (K14) est élevée et constante dans les stades de culture analysés. Relevons que K14 est présente même dans les stades de post-confluence.

La kératine 10 (K10) constitue un marqueur des couches suprabasales : l'observation de son expression révèle que K10 est absente à sous-confluence, alors que le gène est fortement exprimé à confluence et post-confluence.

En ce qui concerne l'involucrine, un marqueur de la différenciation tardive, l'ARNm codant pour l'involucrine est faiblement présent à confluence et son expression augmente significativement en avançant vers les stades de post-confluence.

A partir de ce profil d'expression, on peut assimiler de façon théorique la sous-confluence aux kératinocytes de la couche basale, exprimant surtout la kératine 14. Au stade de confluence, la prolifération des kératinocytes ralentit et favorise l'expression de K10, un marqueur des couches épidermiques suprabasales. A post-confluence, l'expression de K10 diminue déjà, mais on assiste à une induction de l'expression de l'involucrine. Le fait que l'expression de K14 reste élevée au stade de post-confluence parle en faveur d'un modèle de culture où des cellules basales sont encore présentes aux stades avancés de culture.

2. Etude de l'implication des MAP kinases p38 dans la signalisation induite par une déplétion en cholestérol membranaire

2.1. Etude des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire

Notre intérêt se porte sur les effets produits par une extraction du cholestérol membranaire dans les kératinocytes confluent. L'extraction est réalisée par l'incubation des cellules en présence de méthyl- β -cyclodextrine pendant 1 heure, suivie d'une étape d'inhibition de la néosynthèse du cholestérol par la lovastatine (cf Matériel & Méthodes).

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 et al., 2004).

Une étude récente révèle que l'expression de l'involucrine pendant la différenciation épidermique est régulée par les MAP kinases p38 (Efimova et al., 2003). Les résultats de Jans et al. (2004) montrent qu'une déplétion en cholestérol induit l'expression d'involucrine et une activation simultanée de p38.

La littérature présente l'ester de phorbol TPA comme un inducteur d'involucrine dans les kératinocytes humains (Welter et al., 1995, Poumay et al., 1999). Le TPA est une molécule synthétique souvent utilisée pour favoriser la différenciation des kératinocytes, puisque les voies de signalisation activées par l'ester de phorbol, la MAP kinase p38 δ notamment, induisent l'expression d'involucrine.

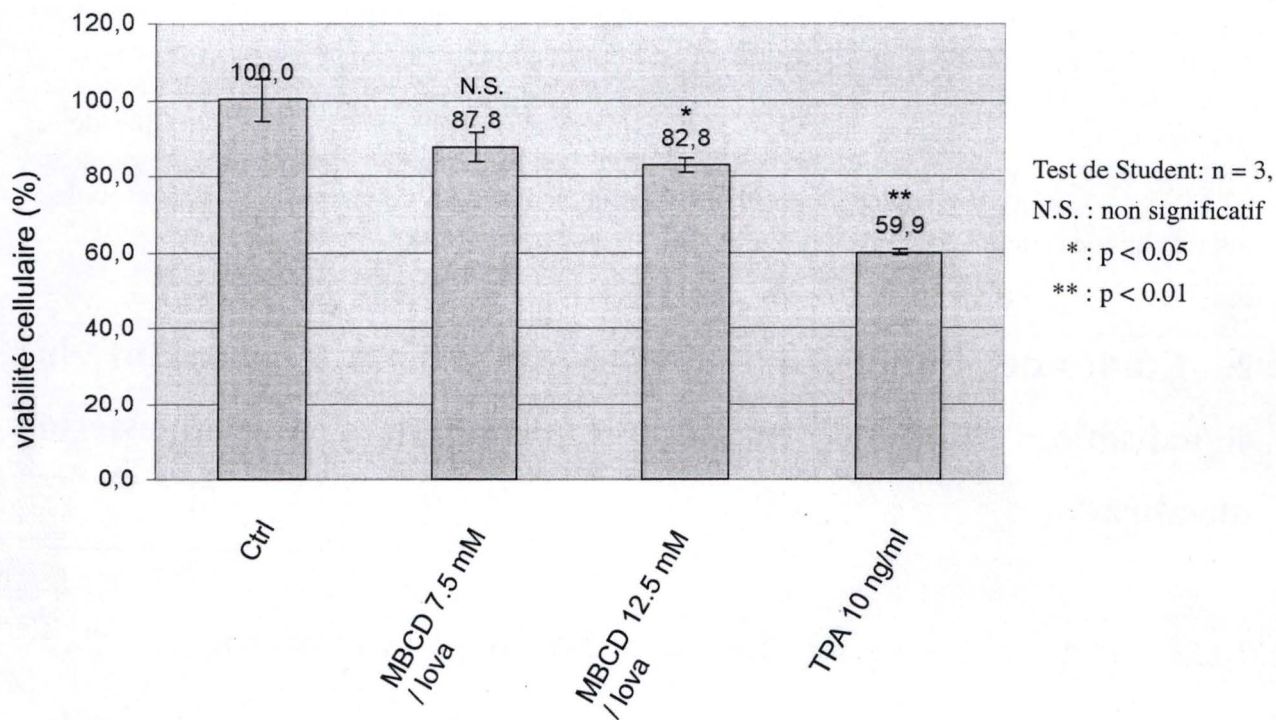


Figure 3-2: Test de cytotoxicité des traitements appliqués.

Des cultures confluentes de kératinocytes sont déplétées en cholestérol membranaire par un traitement à la MBCD 7.5 mM, respectivement MBCD 12.5 mM pendant 1h, suivi d'une incubation en présence de lovastatine 10 μ M pendant 17h. Le traitement au TPA 10 ng/ml est effectué pendant une durée de 18h. Suite aux traitements, la viabilité cellulaire est déterminée par un test MTT. Les résultats sont représentés en triplicats \pm l'écart-type. Le test de Student appliqué compare la viabilité moyenne de la condition à la viabilité moyenne des cultures contrôle fixées arbitrairement à 100 %.

Les effets d'une extraction du cholestérol membranaire et d'un traitement au TPA dans des cultures confluentes de kératinocytes présentent donc tous les deux une activation des MAP kinases p38 et une induction de la transcription d'involucrine.

Les similitudes entre les effets de ces deux traitements nous ont incité à comparer les effets de l'extraction du cholestérol membranaire avec l'action du TPA sur les kératinocytes en fonction de la différenciation.

2.1.1. Détermination de la cytotoxicité des traitements

Dans un but de déterminer la cytotoxicité éventuelle des traitements administrés, nous effectuons un test MTT. Ce test se base sur une mesure colorimétrique permettant de déterminer la viabilité par l'intermédiaire d'un substrat (MTT) qui est métabolisé par les mitochondries en une substance bleue si les cellules sont vivantes (cf Matériel & Méthodes).

La figure 3-2 indique clairement qu'un traitement au TPA 10 ng/ml pendant 18h entraîne une perte de viabilité cellulaire d'environ 40%, ce qui confirme la morphologie observée : les kératinocytes sont allongés et beaucoup de cellules sont décrochées du support.

Par rapport aux kératinocytes non traités, la déplétion en cholestérol par un traitement à la M β CD 7,5 mM pendant 18h dévoile aussi une très légère perte de viabilité non significative (test de Student, n=3, p > 0,1) ; si on augmente la concentration de la méthyl- β -cyclodextrine à 12,5 mM, la perte de viabilité cellulaire augmente (n=3, p < 0,05). Ce résultat montre que l'extraction de cholestérol effectuée par la méthyl- β -cyclodextrine à 7,5 mM tout au long des expériences qui vont suivre ne change pas significativement la viabilité cellulaire et donc que les effets produits par la déplétion ne sont vraisemblablement pas dus à la cytotoxicité de cette cyclodextrine.

2.1.2. Effets d'une déplétion en cholestérol sur la physiologie du kératinocyte en culture confluente

L'observation en microscopie à contraste de phase révèle des changements morphologiques importants entre les différents traitements appliqués (fig. 3-3A).

Dans la condition contrôle, les kératinocytes sont petits et aplatis. Les contacts intercellulaires semblent étroits. Il ne reste plus que quelques rares mitoses par endroits, signe du stade de confluence.

Le traitement à la méthyl- β -cyclodextrine et à la lovastatine retire le cholestérol membranaire (Jans et al., 2004) et les kératinocytes subissent des changements morphologiques. Par rapport à la situation contrôle, la réfringence des kératinocytes augmente et leurs contacts intercellulaires apparaissent moins jointifs. De manière générale, les espaces intercellulaires augmentent et quelques kératinocytes semblent se détacher du support. Ceci peut suggérer que la déplétion en cholestérol diminue l'adhérence cellulaire et provoque un remaniement du cytosquelette.

Un traitement de 18h à l'ester de phorbol (TPA 10 ng/ml) inflige aussi de grands changements morphologiques aux kératinocytes. Les effets du TPA sont très marqués et provoquent une morphologie caractéristique où les kératinocytes présentent une forme allongée accentuée par des prolongements digitiformes. Il semble que le volume cytoplasmique des kératinocytes traités au TPA diminue et qu'il y ait une perte d'adhérence au substrat par rapport aux cellules contrôle.

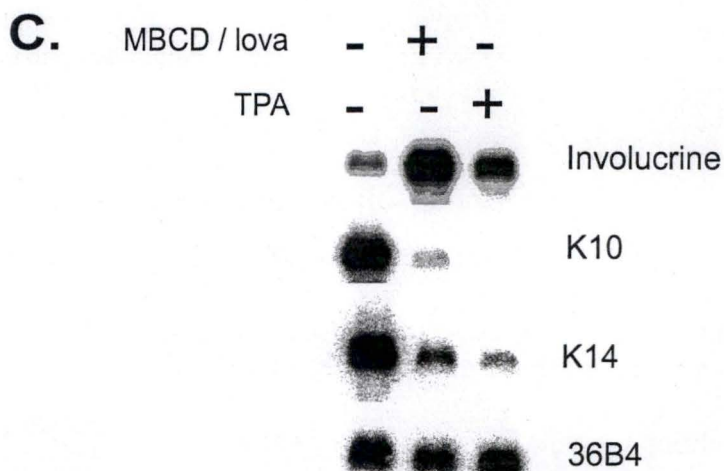
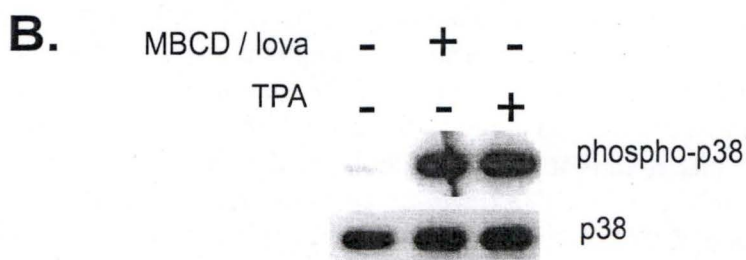
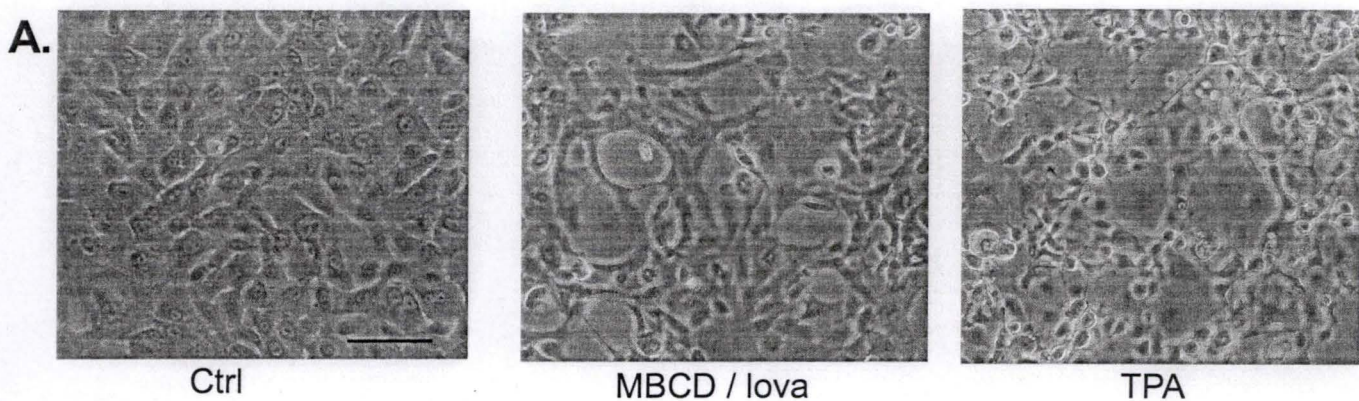


Figure 3-3: Effets d'une déplétion en cholestérol (MBCD 7.5 mM pendant 1h et lovastatine 10 μ M pendant 17h) (MBCD/lova) ou d'un traitement à l'ester de phorbol TPA (TPA 10 ng/ml pendant 18h) (TPA) sur des cultures confluentes de kératinocytes. Les résultats de cette expérience ont été reproduits avec une autre souche de kératinocytes.

A. Observation en microscopie à contraste de cultures confluentes de kératinocytes non traités, déplétés en cholestérol (MBCD / lova) ou traités au TPA (barre = 100 μ m)

B. Analyse par Western Blot de la phosphorylation de p38.

C. Analyse par Northern Blot des marqueurs de différenciation épidermique.

Une étude récente dans notre laboratoire (Jans et al., 2004) a donc montré qu'une extraction du cholestérol membranaire des kératinocytes pendant 18h induit une phosphorylation des MAP kinases p38. Cette étude a été réalisée avec le milieu de culture KGM-2. Afin de vérifier que dans nos conditions de culture dans le milieu EpiLife® - les traitements appliqués sont adéquats, nous avons répété la déplétion en cholestérol membranaire (traitement à la M β CD (1h) suivi d'une incubation de 17h en présence de lovastatine). A noter que cette publication fournit également les preuves démontrant que ce traitement à la M β CD et à la lovastatine provoque effectivement une extraction du cholestérol membranaire (cf Introduction).

L'analyse de la phosphorylation des MAP kinases p38 (fig 3-3B) permet de voir qu'un traitement de 18h au TPA, ainsi qu'une déplétion en cholestérol membranaire (18h) dans des kératinocytes humains augmentent tous les deux la quantité de p38 phosphorylée par rapport à la situation contrôle. Notons que les kératinocytes confluent non traités ne montrent pas de phosphorylation de p38. Vis-à-vis des résultats publiés par Jans et al. (2004), on constate que les effets de cette déplétion sur l'activation des MAP kinases p38 sont reproductibles et induisent un même profil de phosphorylation de p38, même si un milieu de culture différent est utilisé (EpiLife®). Nous avons donc confirmé que le TPA et une extraction de cholestérol activent la voie des MAP kinases p38.

Afin d'investiguer le rôle de la phosphorylation de p38 sur l'expression des marqueurs de différenciation, nous analysons les transcrits de ces marqueurs épidermiques.

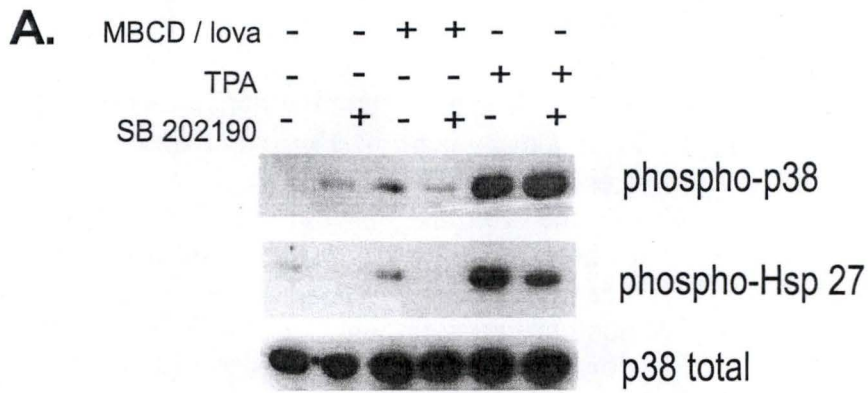
Dans ce but, des cultures confluentes de kératinocytes sont déplétées en cholestérol ou sont traitées au TPA. Des hybridations du Northern blot avec les sondes d'ADNc spécifiques des ARN messagers involucrine, kératine 10 et kératine 14 sont réalisées. Les résultats du Northern blot (fig 3-3C) indiquent qu'une déplétion en cholestérol induit fortement l'expression d'involucrine, tout comme l'ester de phorbol TPA. Le TPA est connu pour être un inducteur de la différenciation épidermique qui peut être caractérisée par un taux élevé d'ARNm involucrine dans les kératinocytes. Les résultats montrent aussi que le traitement au TPA, ainsi que l'extraction du cholestérol membranaire réduisent fortement le niveau d'expression des kératines 10 et 14. Les deux traitements administrés produisent donc des profils semblables d'expression des marqueurs de différenciation, si ce n'est que le traitement au TPA réprime davantage l'expression des kératines 10 et 14.

A ce stade, notre défi est de savoir comment ces deux traitements, qui pourtant induisent des changements morphologiques très différents, comme nous allons le voir ci-dessous, peuvent réguler l'expression des marqueurs de différenciation.

2.2. Etude des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire traités avec des inhibiteurs de p38

L'application d'inhibiteurs des MAP kinases p38 permet d'investiguer les isoformes de p38 impliquées lors d'une déplétion en cholestérol membranaire car ils empêchent spécifiquement l'activité kinase de certaines isoformes de p38.

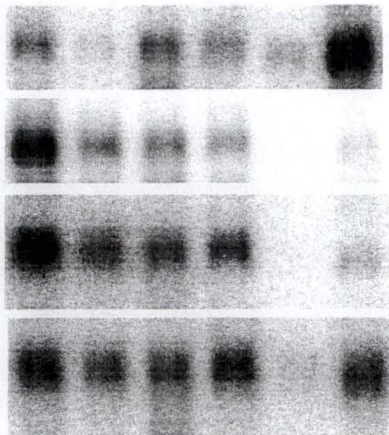
Les inhibiteurs SB 202190 et PD 169316 de la famille des pyridinyl imidazoles empêchent l'activité kinase des MAP kinases p38 α et β , en se liant sur leur site de fixation d'ATP.



B.

a.

MBCD / lova	-	-	+	+	-	-
TPA	-	-	-	-	+	+
SB 202190	-	+	-	+	-	+



Involucrine

K10

K14

36B4

b.

MBCD / lova	-	-	+	+	-	-
TPA	-	-	-	-	+	+
SB 202190	-	+	-	+	-	+

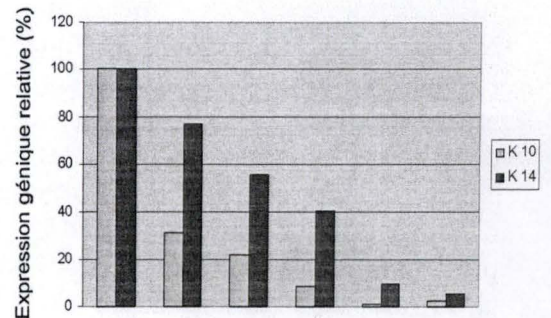
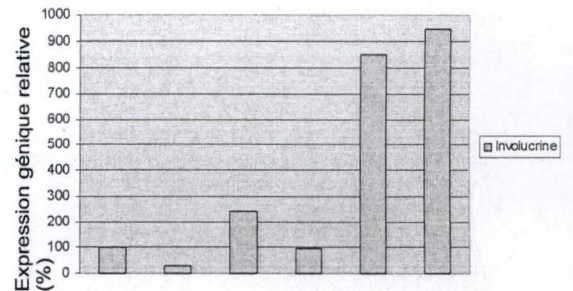


Figure 3-4: Effets d'une inhibition des MAP kinases p38 alpha et beta par SB 202190 sur la physiologie des kératinocytes confluents déplétés en cholestérol (MBCD 7.5 mM/ lova 10 μ M) ou traitées au TPA pendant 18h. Les résultats de cette expérience ont été reproduits une fois.

A. Effets de l'inhibiteur SB 202190 (10 μ M) sur la phosphorylation de p38 et de Hsp27.

B. Effets de l'inhibiteur SB 202190 (10 μ M) sur l'expression des marqueurs de différenciation.

a. Analyse par Northern blot

b. Quantification de l'expression génique d'involucrine, de K10 et K14 selon le programme OptiQuant (Packard). Dans l'échantillon contrôle, l'expression génique relative a été fixée arbitrairement à 100 %.

A une concentration de SB 202190 10 μ M, les isoformes α et β sont inhibées tandis que l'activité kinase de l'isoforme p38 δ n'est pas affectée (Cuenda & Alessi, 1999). La molécule PD 169316 inhibe les isoformes p38 α et β à une concentration de 15 μ M (Kummer et al., 1997).

2.2.1. Effets d'une déplétion en cholestérol en présence d'inhibiteurs de p38 sur la physiologie des kératinocytes en culture confluente

L'inhibiteur SB 202190

Les traitements administrés sont exactement identiques à ceux des expériences précédentes si ce n'est que l'inhibiteur de p38 est ajouté au milieu de culture 30 minutes avant et pendant toute la durée des traitements.

La figure 3-4A montre que l'application de l'inhibiteur SB 202190 (10 μ M) pendant 18h n'induit pas de phosphorylation de p38 comparé à la situation contrôle sans inhibiteur. Le traitement au TPA entraîne une forte activation de p38 et la présence simultanée de l'inhibiteur SB 202190 et du TPA ne change guère ce niveau élevé de phosphorylation. Cependant, par rapport à l'activation de p38 induite par le TPA, la déplétion en cholestérol n'expose qu'une phosphorylation faible de p38. Pour cette raison, il est difficile, voire impossible, de tirer des conclusions sur l'effet de l'inhibiteur SB 202190 dans les kératinocytes déplétés en cholestérol. Remarquons toutefois que l'inhibiteur SB 202190 montre une tendance à diminuer le niveau de phosphorylation de la protéine kinase p38 dans les kératinocytes déplétés en cholestérol.

Comme Cuenda & Alessi (1999) le proposent, l'efficacité de la molécule SB 202190 à inhiber les p38 α , β kinases est contrôlée par l'analyse de la phosphorylation de Hsp 27, un substrat des MAP kinases p38 α , β (Garmyn et al., 2001). L'inhibiteur semble diminuer le niveau de phosphorylation de Hsp 27 située en aval par rapport à la MAP kinase p38 dans les différentes conditions de traitement.

Les messagers des marqueurs de différenciation ont été analysés par Northern blot dans des kératinocytes cultivés et traités en parallèle.

La figure 3-4B révèle que l'ester de phorbol appliqué pendant 18h induit fortement l'expression d'involucrine, un marqueur tardif de la différenciation épidermique. Par contre, l'extraction du cholestérol membranaire par le traitement à la M β CD et à la lovastatine n'induit qu'une expression faible d'involucrine. La présence de l'inhibiteur lors d'un traitement au TPA ne change pas l'expression d'involucrine, ainsi que le démontre l'analyse densitométrique (fig 3-4Bb), alors que une déplétion en cholestérol dans des kératinocytes où les p38 kinases sont inhibées par SB 202190, réprime faiblement l'expression d'involucrine. Notons que le profil d'expression d'involucrine montre une analogie avec le schéma de phosphorylation des p38 kinases.

Le messageur de la kératine K10 est présent dans les cultures contrôles, son expression est réprimée par la déplétion en cholestérol et le traitement au TPA. Notons que la seule présence de l'inhibiteur des p38 kinases réduit déjà fortement l'expression de K10.

A notre surprise, l'analyse des messagers et des protéines dans cette expérience a montré que la déplétion en cholestérol membranaire n'a produit que partiellement le phénotype attendu. C'est-à-dire que la phosphorylation de p38 et la transcription du gène involucrine

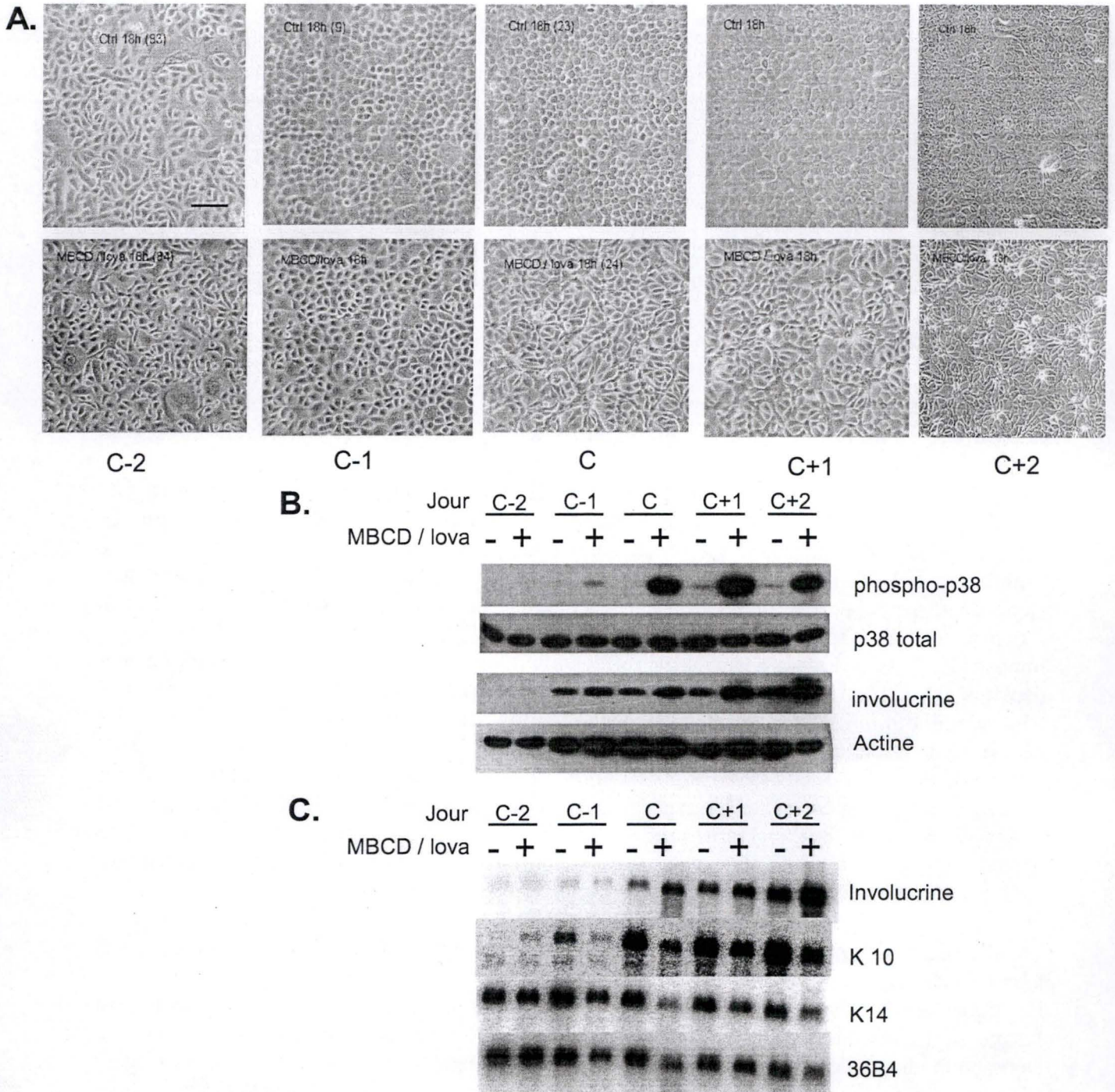


Figure 3-5: Effets de l'avancement du stade cellulaire sur la physiologie des kératinocytes déplétés en cholestérol. Des cultures de kératinocytes subissent une déplétion en cholestérol (MBCD 7,5 mM pendant 1h / lovastatine 10 μ M pendant 17h) (MBCD / lova) à confluence cellulaire moins 2 jours (C-2), à confluence moins un jour (C-1), à confluence (C), à confluence plus un jour (C+1) respectivement à confluence plus deux jours (C+2).

A. Observation en microscopie à contraste de phase de cultures de kératinocytes non traitées (Ctrl), ou déplétées en cholestérol (MBCD / lova) en fonction du stade cellulaire (barre = 100 μ m).

B. Analyse par Western blot de la phosphorylation de p38 et détection de la protéine involucrine.

C. Analyse par Northern blot des marqueurs de différenciation épidermique.

n'augmentent pas assez fortement vis-à-vis du traitement au TPA. Nous avons cherché à comprendre cette différence.

Les études récentes dans notre laboratoire ont montré que l'extraction de cholestérol membranaire ne produit des changements d'expression génique des marqueurs de différenciation qu'au stade de la confluence cellulaire, pas avant, ni après. L'avancement des cultures semble donc être un des facteurs déterminant la possibilité de modifier le phénotype, car une déplétion en cholestérol à sous-confluence ou à post-confluence ne change pas l'expression génique des marqueurs de différenciation étudiés (Jans et al., 2004).

Il est donc très probable que les kératinocytes en culture ne répondent à une déplétion en cholestérol qu'à un stade cellulaire particulier.

2.3. Détermination du stade cellulaire idéal pour extraire le cholestérol membranaire de kératinocytes en culture

Pour rechercher de manière plus précise le stade cellulaire sensible à une déplétion en cholestérol provoquant une modification des marqueurs de différenciation, nous mettons en œuvre une expérience où une extraction de cholestérol par jour est effectuée pendant 5 jours consécutifs. Les cultures sont analysées par Northern et Western blot (fig 3-5).

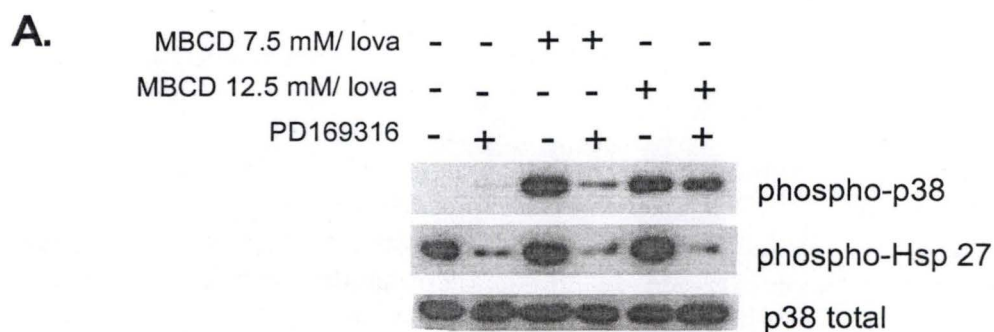
L'étude des protéines (fig 3-5B) indique clairement que le moment adéquat pour le traitement se situe entre la confluence cellulaire et la confluence plus 2 jours, puisque la déplétion en cholestérol membranaire provoque une activation des MAP kinases p38 dans ces stades cellulaires.

Dans les stades sous-confluents l'application du traitement à la M β CD et à la lovastatine n'active pas les MAP kinases p38. Comme les p38 kinases sont des enzymes activées en cas de stress, on démontre que l'extraction du cholestérol en elle-même ne constitue pas un stress cellulaire pour les kératinocytes, puisque les extractions de cholestérol à sous-confluence n'activent pas p38.

L'avancement de la culture n'active pas les MAP kinases p38 dans les kératinocytes non traités, puisque le niveau basal de phosphorylation est toujours très faible dans les conditions contrôle. Cette observation confirme que le programme de différenciation normal n'active pas p38.

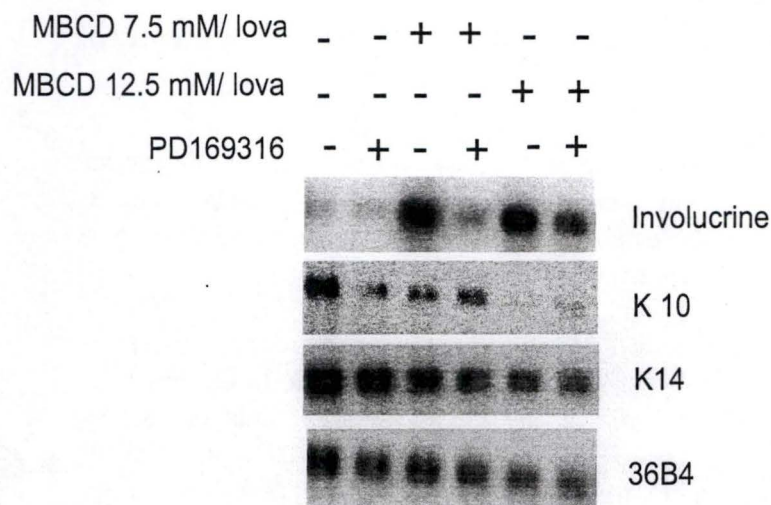
Lors de cette expérience, nous avons également détecté la présence de la protéine involucrine par Western blot (fig 3-5B). Comme il s'agit d'un marqueur de la différenciation tardive, nous n'observons la présence de l'involucrine qu'à partir de la confluence cellulaire dans les cultures non traitées, en avançant vers les stades de post-confluence nous détectons une quantité d'involucrine accrue. Une déplétion en cholestérol membranaire induit une synthèse augmentée de cette protéine structurale de l'enveloppe cornée qu'à partir de la confluence cellulaire. Il semble que les effets de la déplétion en cholestérol sur la synthèse d'involucrine soient plus marqués dans les jours suivant la confluence cellulaire. Ce résultat concorde avec la détection du messager d'involucrine par Northern blot analysé par la suite.

En effet, l'analyse simultanée de l'expression des marqueurs de différenciation (fig 3-5C) montre que les ARNm de l'involucrine ne sont pas présents dans les stades sous-confluents



B.

a.



b.

MBCD 7.5 mM/ lova	-	-	+	+	-	-
MBCD 12.5 mM/ lova	-	-	-	-	+	+
PD169316	-	+	-	+	-	+

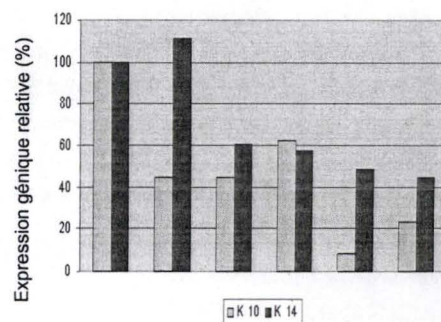
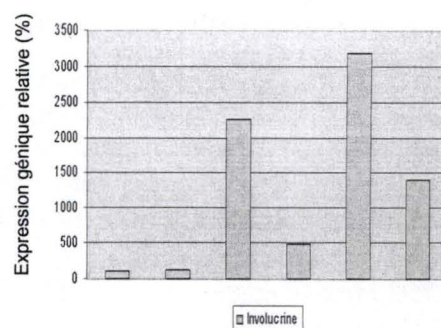


Figure 3-6: Effets d'une inhibition des MAP kinases p38 alpha et beta par PD 169316 sur la physiologie des kératinocytes confluents déplétés en cholestérol par la concentration habituelle en MBCD (7.5 mM) respectivement une concentration plus élevée (12.5 mM).

A. Effets de l'inhibiteur PD 169316 (15 μ M) sur la phosphorylation de p38 et Hsp 27.

B. Effets de l'inhibiteur PD 169316 (15 μ M) sur l'expression des marqueurs de différenciation.

a. Analyse par Northern blot.

b. Quantification de l'expression génique d'involucrine, de K10 et de K14 selon le programme OptiQuant (Packard). Dans l'échantillon contrôle, l'expression génique relative a été fixée arbitrairement à 100 %;

non traités, puisque l'involucrine est un marqueur de la différenciation tardive. L'extraction du cholestérol membranaire dans ces stades sous-confluents n'active pas la transcription du gène involucrine.

Par contre, les cultures confluentes montrent comme d'habitude une expression encore assez faible d'involucrine. La déplétion en cholestérol à confluence augmente cependant fortement le niveau d'expression d'involucrine et cette augmentation s'accroît jusqu'au stade de confluence plus 2 jours.

Remarquons que l'expression du marqueur involucrine suit de très près la phosphorylation de p38 et montre un même profil que la présence de sa protéine correspondante ; ces concordances suggèrent que les p38 kinases sont dans ce cas les kinases principalement responsables de l'induction de la transcription du gène de l'involucrine.

L'ARNm du marqueur de différenciation K10 n'est exprimé fortement qu'à partir de la confluence cellulaire. L'extraction du cholestérol membranaire ne réprime que faiblement son expression.

Notre hypothèse selon laquelle le stade cellulaire serait le facteur déterminant la sensibilité à l'extraction du cholestérol membranaire est donc vérifiée et le stade de la confluence plus un jour a été choisi pour réaliser l'extraction du cholestérol membranaire dans les expériences suivantes.

2.4. Extraction du cholestérol membranaire par une concentration plus élevée en méthyl- β -cyclodextrine

La phosphorylation faible de la p38 kinase lors de la déplétion en cholestérol aurait pu aussi être due à une concentration trop faible en méthyl- β -cyclodextrine car les kératinocytes de la souche étudiée montraient une confluence où les cellules étaient extrêmement nombreuses et de très petite taille. En comparaison aux autres souches utilisées auparavant (cf fig 3-1 et fig 3-3), la dose de M β CD par unité de membrane plasmique peut être plus faible et donc moins efficace dans la souche employée actuellement, vu la petite taille des kératinocytes. Pour vérifier si la concentration en M β CD devrait être augmentée pour extraire de manière plus efficace le cholestérol membranaire, nous avons traité les kératinocytes de cette souche à confluence avec la concentration habituelle en M β CD (7,5 mM) et avec une dose plus élevée (12,5 mM de M β CD). Dans les deux conditions, une incubation en présence de lovastatine 10 μ M pendant 17h suit l'extraction par la M β CD.

Cette expérience, illustrée à la figure 3-6, est également effectuée en présence d'un inhibiteur des p38 α , β kinases, la molécule PD 169316.

Pour analyser simultanément l'expression par Northern blot des marqueurs de différenciation et l'état de phosphorylation des protéines, des kératinocytes sont cultivés et traités en parallèle.

La figure 3-6A indique que le niveau de phosphorylation de la MAP kinase p38 n'est pas changé par la seule présence de cet inhibiteur. La phosphorylation de p38 est importante lors d'une application de 7,5 mM M β CD et la dose de 12,5 mM M β CD n'augmente pas le niveau de phosphorylation des MAP kinases p38.

Comme Cuenda & Alessi (1999) le proposent, l'efficacité de la molécule PD 169316 à inhiber les p38 α , β kinases est contrôlée par l'analyse de la phosphorylation de Hsp 27, un substrat des MAP kinases p38 α , β (Garmyn et al., 2001). On remarque que Hsp 27 est phosphorylé

dans toutes les conditions en absence de PD 169316 alors que la présence de celui-ci diminue la phosphorylation de Hsp 27, suggérant que l'inhibiteur PD 169316 inhibe de manière efficace les MAP kinases p38 α et β .

La molécule PD 169316 réduit le niveau de phosphorylation de p38 lorsque l'extraction du cholestérol membranaire est effectuée avec la M β CD 7,5 mM. Cependant, même si l'inhibiteur est actif et empêche la phosphorylation de p38 α , β , il semble avoir moins d'effets sur la phosphorylation de p38 lorsque la dose de M β CD est élevée (12,5 mM).

Ce résultat suggère qu'une concentration élevée en M β CD active non seulement p38 α , β , mais peut-être aussi l'isoforme p38 δ , non inhibée par PD 169316. En effet, la méthyl- β -cyclodextrine est une molécule qui, à concentration élevée, peut provoquer une perte significative de la viabilité cellulaire (cf fig 3-2) et provoquer de cette manière des stress cellulaires activant peut-être la p38 δ . Pour confirmer ces résultats de manière plus précise, il faudrait identifier les isoformes de p38 phosphorylées par la déplétion en cholestérol.

L'analyse de l'expression des marqueurs de différenciation (fig 3-6B) montre que le gène de l'involucrine est induit par les déplétions en cholestérol. L'induction d'involucrine est déjà forte dans les kératinocytes déplétés par 7,5 mM M β CD, mais elle est encore plus forte lorsque la déplétion en cholestérol est réalisée avec 12,5 mM M β CD. La molécule PD 169316 réprime l'expression d'involucrine dans les deux conditions où les kératinocytes sont déplétés en cholestérol. L'observation des histogrammes d'expression génique relative de l'involucrine (fig 3-6Bb) révèle que cette répression du gène involucrine par PD 169316 est du même ordre de grandeur dans les kératinocytes déplétés par 7,5 mM M β CD que dans les cellules déplétés par 12,5 mM M β CD. Cette observation suggère de nouveau que la concentration plus élevée en cyclodextrine active, en plus des p38 α , β kinase, la p38 δ kinase, puisque l'inhibiteur n'est pas capable de réduire le niveau d'expression d'involucrine au même niveau que celui des kératinocytes déplétés par 7,5 mM de M β CD.

L'analyse de l'expression de la kératine 10 montre que les kératinocytes sont bien à confluence puisque les cultures contrôles expriment K10. La déplétion via l'application de 7,5 mM M β CD réprime l'expression de K10. La répression est complète dans des cultures de kératinocytes déplétés par 12,5 mM M β CD.

L'inhibition des p38 kinases par PD 169316 dans les kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire réaugmente légèrement l'expression de K10, ce qui suggère que les p38 kinases exercent une régulation négative sur le gène K10 en cas de traitement à la M β CD et à la lovastatine.

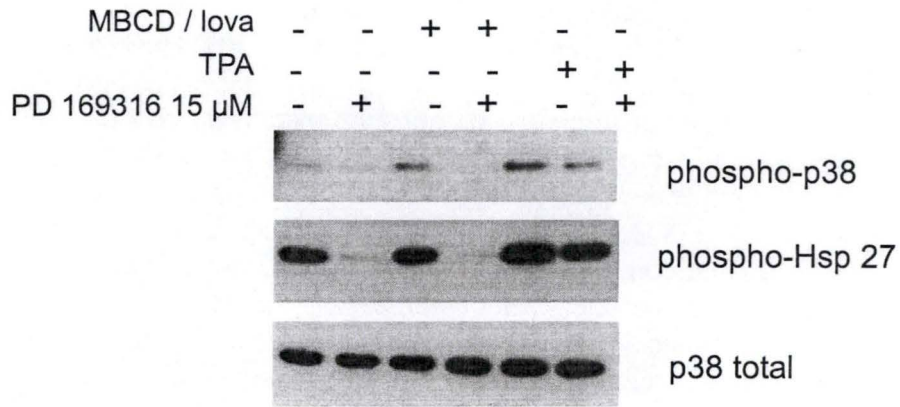
L'inhibiteur PD 169316

La déplétion en cholestérol membranaire en présence de la molécule PD 169316, un inhibiteur des MAP kinases p38 α , β , a été répétée en analysant en même temps l'effet de la présence de cet inhibiteur lors d'un traitement au TPA (fig 3-7).

La détection de la phosphorylation de protéines de signalisation par Western blot et l'analyse simultanée de marqueurs de différenciation requiert des cultures et des traitements de kératinocytes en parallèle.

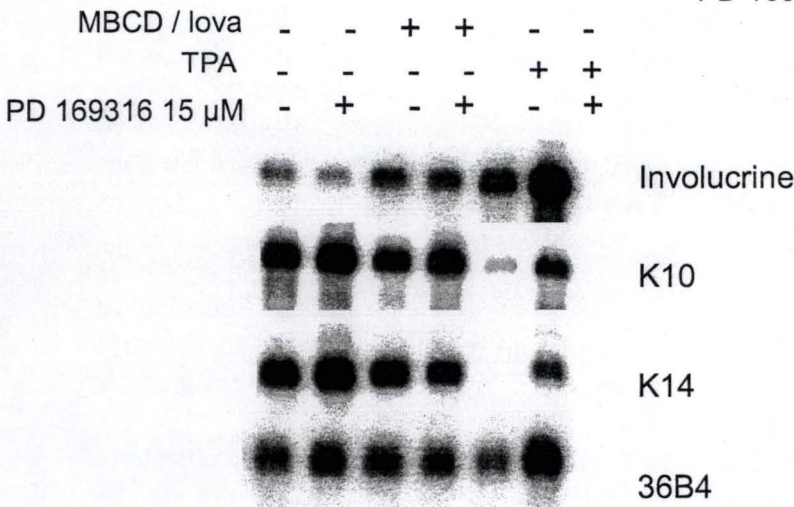
L'analyse par Western blot (fig 3-7A) de la phosphorylation de p38 confirme qu'une déplétion en cholestérol membranaire par la M β CD 7,5 mM provoque une activation des MAP kinases p38. Cette phosphorylation de p38 est d'intensité comparable à celle induite par un traitement au TPA.

A.



B.

a.



b.

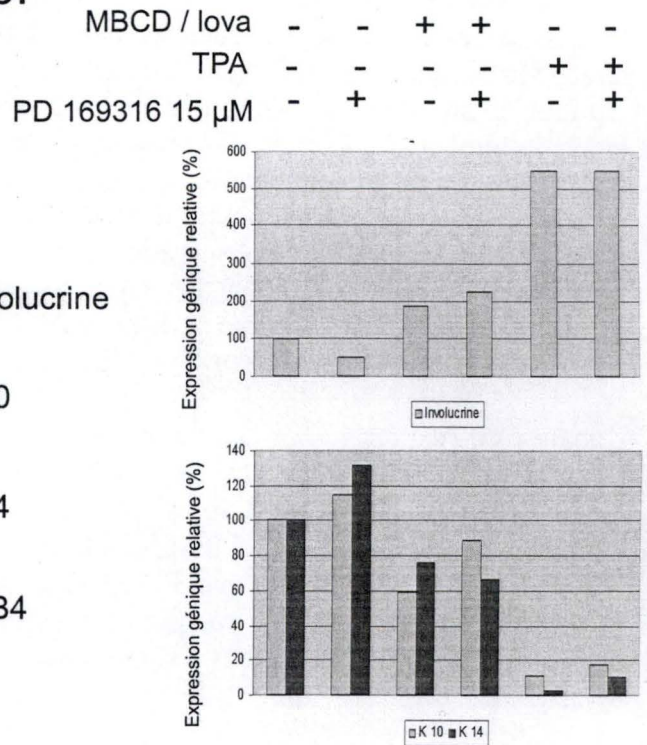


Figure 3-7: Effets d'une inhibition des MAP kinase p38 alpha et beta sur la physiologie des kératinocytes confluents déplétés en cholestérol (MBCD 7,5 mM / lova 10 μ M) ou traités au TPA (10 ng/ml) pendant 18h.

A. Effets de l'inhibiteur PD 169316 (15 μ M) sur la phosphorylation de p38 et Hsp 27.

B. Effets de l'inhibiteur PD 169316 (15 μ M) sur l'expression des marqueurs de différenciation.

a. Analyse par Northern blot.

b. Quantification de l'expression génique d'involucrine, de K10 et de K14 selon le programme OptiQuant (Packard). Dans l'échantillon contrôle, l'expression génique relative a été fixée arbitrairement à 100 %;

La présence de l'inhibiteur PD 169316 fait apparaître des différences entre les effets produits par une extraction de cholestérol membranaire et un traitement au TPA. En effet, le niveau de phosphorylation de p38 dans les cultures de kératinocytes déplétés en cholestérol diminue en présence de PD 169316 alors que la phosphorylation de p38 ne change pas dans des kératinocytes traités au TPA en présence de PD 169316.

Nous avons vérifié l'efficacité de l'inhibiteur PD 169316 à empêcher l'activité kinase des MAP kinases p38 α , β par la détection de la phosphorylation de Hsp 27. La similitude entre le profil de phosphorylation de p38 et de Hsp 27 est frappante: la présence de PD 169316 dans les cellules contrôle et les cellules déplétées en cholestérol empêche la phosphorylation de Hsp 27. Ce résultat confirme l'expérience précédente et suggère fortement que l'extraction de cholestérol membranaire dans des kératinocytes active les MAP kinases p38 α , β et pas l'isoforme p38 δ puisque l'inhibition de la phosphorylation de Hsp 27 par PD 169316 est presque complète dans les cultures de kératinocytes déplétées en cholestérol.

Le traitement au TPA en présence de PD 169316 ne modifie ni la phosphorylation de p38, ni celle de Hsp 27. On détecte de fortes phosphorylation de p38 et de Hsp 27, ce qui indique ou bien que l'inhibiteur PD 169316 n'inhibe pas de manière très efficace en cas de traitement au TPA ou bien, que les effets du TPA phosphorylent Hsp 27 de manière indépendante de p38 α , β . Comme la molécule PD 169316 est très efficace dans les kératinocytes contrôle et déplétés en cholestérol et que l'utilisation de SB 202190, un autre inhibiteur de p38 α , β n'empêchait pas non plus complètement la phosphorylation de Hsp 27 dans les kératinocytes traités au TPA (cf fig 3-4), nous pouvons penser que la phosphorylation de Hsp 27 est due à une voie indépendante des isoformes p38 α , β et que l'inhibiteur PD 169316 est effectif lors d'un traitement au TPA. La phosphorylation de p38 observée en présence de PD 169316 lors d'un traitement au TPA provient vraisemblablement d'une activation de p38 δ .

Le Northern blot de la figure 3-7B montre que le traitement au TPA induit fortement l'expression d'involucrine. La quantification de l'expression génique relative d'involucrine montre que la présence de l'inhibiteur des MAP kinases p38 α , β lors de l'application de TPA ne réprime pas la transcription d'involucrine.

L'expression des marqueurs de différenciation épidermique K10 et K14 est fortement réprimée par un traitement au TPA et l'inhibition des MAP kinases p38 α , β lors de ce traitement ne change pas le niveau faible d'expression de K10 et K14.

L'analyse des effets d'une déplétion en cholestérol membranaire sur les marqueurs de différenciation (fig 3-7B) montre que les kératinocytes déplétés augmentent leur expression d'involucrine par rapport aux cellules contrôles non traitées, cette induction d'involucrine n'arrive cependant pas au niveau atteint par le traitement au TPA. La présence de l'inhibiteur PD 169316 lors de l'extraction de cholestérol membranaire ne réprime exceptionnellement pas l'expression d'involucrine ; dans ce cas-ci, il est possible que l'extraction de cholestérol n'était pas réalisée dans les meilleures conditions et que pour cette raison la différence entre une déplétion en cholestérol en présence ou non de PD 169316 ne soit pas visible.

L'expression de K10 et de K14 est réprimée par la déplétion en cholestérol mais pas de manière aussi spectaculaire que par un traitement au TPA. L'inhibition des MAP kinases p38 α , β par la molécule PD 169316 ne change pas significativement le niveau d'expression des marqueurs de différenciation K10 et K14 dans les différentes conditions appliquées.

Les résultats des effets produits par l'ester de phorbol TPA sont en accord avec les données obtenues avec l'autre inhibiteur des MAP kinases p38 α , β , la molécule SB 202190. En effet, le traitement au TPA en présence de SB 202190 ou de PD 169316 ne change pas le niveau d'expression d'involucrine par rapport à un traitement au TPA en absence d'inhibiteurs, ce qui

suggère que les voies de transduction des effets du TPA aboutissant au gène involucrine ne passent pas par des voies dépendantes des isoformes p38 α , β . Comme on observe quand même une activation des MAP kinases p38 en cas de traitement au TPA en présence des inhibiteurs, on peut en déduire que ce traitement doit activer l'isoforme p38 δ , la seule isoforme présente dans les kératinocytes qui ne se trouve pas inhibée par les molécules SB 202190 ou PD 169316. Efimova et al. (2003) ont montré que le traitement au TPA induit l'expression d'involucrine par un mécanisme dépendant de p38 δ , nos expériences confirment leurs résultats.

L'observation des marqueurs de différenciation K10 et K14 indique la signalisation induite par le TPA n'empreinte pas de voie dépendante des MAP kinases p38 α , β pour réprimer la transcription des gènes K10 et K14, puisque la présence de l'inhibiteur PD 169316 ne change pas l'expression de ces marqueurs.

En ce qui concerne la déplétion en cholestérol membranaire dans des kératinocytes confluents, nous pouvons déduire de nos expériences avec les inhibiteurs des MAP kinases p38 α , β que l'extraction de ce composé lipidique induit des signalisations passant par les MAP kinases p38, vraisemblablement les isoformes p38 α , β , qui influencent l'expression de marqueurs de différenciation en régulant positivement le taux de transcription du gène involucrine et négativement l'expression des kératines 10 et 14.

3. Etude de l'implication des protéine kinases C (PKC) dans la signalisation induite par une déplétion en cholestérol membranaire

Il est bien établi que les protéine kinases C (PKC) sont impliquées dans la prolifération et différenciation cellulaire (Le Panse et al., 1994). En effet, les PKC jouent un rôle central dans la transmission de signaux extracellulaires (facteurs de croissance, hormones) vers le noyau cellulaire.

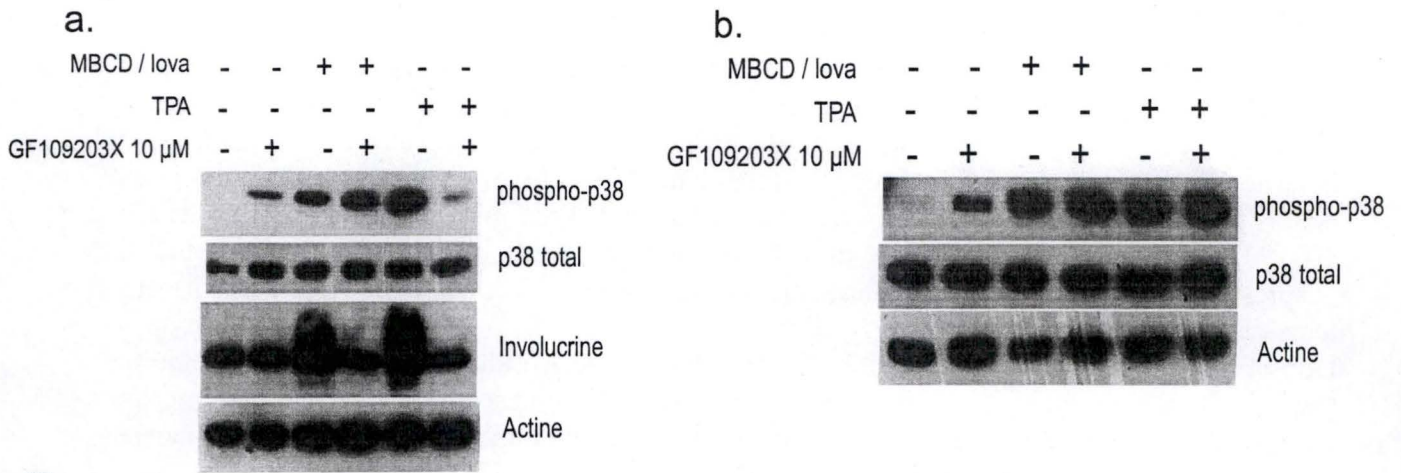
Dans les kératinocytes épidermiques, les protéine kinases C sont représentées par les isoformes PKC α (cPKC), δ , ϵ , η (nPKC) et ζ (aPKC) (Osada et al., 1990).

Le rôle de ces protéines kinases C dans la régulation de fonctions cellulaires peut être investigué par l'utilisation de l'ester de phorbol TPA, un activateur des nPKC et cPKC.

3.1. Effets d'une déplétion en cholestérol en présence d'un inhibiteur de PKC sur la physiologie du kératinocyte en culture

L'inhibiteur GF 109203X empêche l'activité kinase des protéine kinases C et inhibe donc la phosphorylation de leurs substrats (Toullec et al., 1991). Les PKC sont présentes dans tous les types cellulaires et sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires, ce qui explique que les protéines en aval des PKC sont nombreuses. Or, l'ester de phorbol active les cPKC et nPKC. On sait que le TPA active l'isoformes PKC δ , qui phosphoryle alors les MAP kinases p38. Ces MAP kinases induisent alors l'expression d'involucrine chez les kératinocytes (Efimova & Eckert, 2000, Efimova et al., 2003)

A.



B.

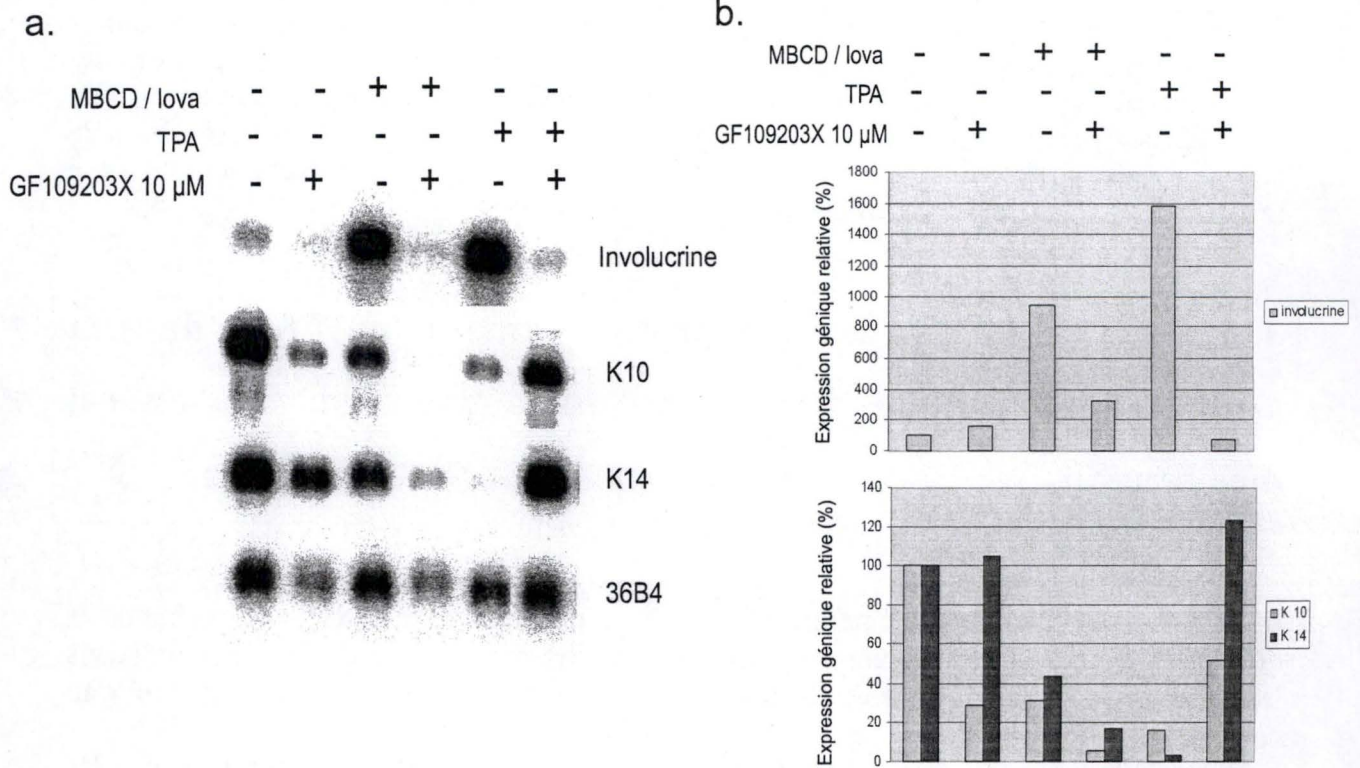


Figure 3-8: Effets d'une inhibition des protéine kinases C par GF 109203X 10 μ M sur la physiologie des kératinocytes confluents déplétés en cholestérol (MBCD 7.5 mM / lova 10 μ M) ou traités au TPA (10 ng/ml) pendant 18h.

A. Effets de l'inhibiteur GF 109203X (10 μ M) sur la phosphorylation de p38 et l'expression de la protéine involucrine.

a. et b. Répétition de la même expérience donnant cependant des résultats différents

B. Effets de l'inhibiteur GF 109203X (10 μ M) sur l'expression des marqueurs de différenciation dans des cultures confluentes kératinocytes déplétées en cholestérol (MBCD/lova) ou traitées au TPA pendant 18h.

a. Analyse par Northern blot

b. Quantification de l'expression génique d'involucrine, de K10 et K14 selon le programme OptiQuant (Packard). Dans l'échantillon contrôle l'expression génique relative a été fixée arbitrairement à 100 %.

Au stade de confluence plus un jour des cultures de kératinocytes épidermiques, l'inhibiteur GF 109203X est ajouté au milieu de culture une demi-heure avant la déplétion en cholestérol ou le traitement au TPA. L'analyse par Western blot (figure 3-8Aa) montre que les kératinocytes de la condition contrôle ne présentent pas de phosphorylation de la p38 kinase, alors qu'une incubation de 18h des cultures en présence de l'inhibiteur GF 109203X (10 μ M) active déjà de manière faible, mais significative les MAPK p38. L'application du TPA induit une phosphorylation plus importante de p38. Par contre, ce même traitement au TPA sur des kératinocytes se trouvant en présence de l'inhibiteur GF 109203X (10 μ M) n'entraîne qu'une très faible activation de la MAP kinase p38.

On peut donc supposer que l'inhibiteur bloque l'activité des PKC mais il faut remarquer que cette répression de la phosphorylation de p38 n'est pas complète et l'intensité de phosphorylation de p38 est du même ordre de grandeur que dans la condition avec l'inhibiteur seul. Cette constatation avance l'hypothèse que les PKC sont des protéines de signalisation tellement importantes que leur inactivation pendant 18h par l'inhibiteur GF 109203X à une concentration de 10 μ M dans des kératinocytes confluent entraîne un stress cellulaire qui active la MAP kinase p38 via une voie de stress qui ne passe pas par les protéine kinases C. Notre condition test, la déplétion en cholestérol membranaire, induit une phosphorylation de p38 mais son ampleur est plus faible que celle induite par le traitement au TPA. L'application de l'inhibiteur ne diminue pas la phosphorylation de p38 mais bien au contraire, l'activité de la p38 kinase semble augmentée dans ces conditions. Cette observation suggère que la déplétion du cholestérol membranaire paraît donc activer la p38 kinase de manière PKC-indépendante.

Afin d'étudier le rôle de p38 dans la différenciation des kératinocytes, nous avons investigué la présence de la protéine involucrine dans les conditions appliquées. La figure 3-8Aa montre que l'involucrine est déjà exprimée dans nos cultures confluentes non traitées. La déplétion en cholestérol membranaire, ainsi que le traitement au TPA augmentent son expression davantage. Pendant l'élaboration de l'enveloppe cornée, la transglutaminase catalyse l'association covalente d'involucrine avec des protéines comme la loricrine. Les bandes de poids moléculaire plus élevé reconnues par l'anticorps anti-involucrine correspondent probablement à des protéines liées de manière covalente à l'involucrine. L'application de GF 109203X sur les kératinocytes traités au TPA réprime l'expression de l'involucrine à un niveau comparable à celui des cellules non traitées.

Dans le but de confirmer nos observations, l'expérience a été répétée dans les mêmes conditions. Cependant, les résultats de la figure 3-8Ab se présentent différemment.

Comme décrit précédemment, les cultures contrôle n'exposent pas de phosphorylation de p38, alors que l'incubation pendant 18h en présence de GF 109203X (10 μ M) active déjà faiblement les p38MAPK. Un traitement au TPA active les MAP kinases p38 mais à notre surprise, la présence de l'inhibiteur GF 109203X lors d'un traitement au TPA n'empêche pas la phosphorylation de p38. En effet, les MAP kinases p38 sont toujours actives, même si leurs protéine kinases C devraient être inhibées par la molécule GF 109203X. Comme, on n'a pas pu mettre en évidence une inhibition effective des PKC par l'inhibiteur GF 109203X, il n'est pas possible de tirer des conclusions concernant l'implication des PKC dans les kératinocytes déplétés en cholestérol à partir de cette expérience.

Le fait que l'inhibiteur ne réduit pas l'activation de p38 lors d'un traitement au TPA constitue un résultat étonnant à première vue, puisqu'on sait que dans la cascade induite par le TPA, les p38 kinases sont des substrats de phosphorylation des PKC (Efimova et al., 1998). Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour essayer d'expliquer ce résultat.

L'anticorps anti-phospho-p38 utilisé reconnaît toutes les isoformes de p38 phosphorylées. Il n'est dès lors pas possible de distinguer les isoformes de p38 activées. La voie induite par le TPA phosphoryle p38 δ probablement via la PKC δ (Eckert et al., 2003). Il est possible que l'inhibiteur soit moins actif sur cette isoforme de PKC et que la phosphorylation de p38 s'explique de cette manière.

Une autre hypothèse est que la concentration de l'inhibiteur GF 109203X ne serait pas adéquate: à concentration trop faible, l'inhibition des PKC n'est pas complète, alors qu'à concentration trop forte, l'inhibiteur risque d'être cytotoxique (Papp et al., 2003) et d'activer de cette façon d'autres voies de signalisation ayant comme conséquence une phosphorylation de p38. Dans ce cas, la présence de l'inhibiteur constitue un stress cellulaire qui active probablement les p38 kinases par des voies indépendantes des PKC.

Une phosphorylation de p38 non modifiée par la présence de l'inhibiteur GF 109203X dans des kératinocytes traités au TPA, représenté à la figure 3-8Ab, indique que l'inhibition des PKC n'était pas complète ou que d'autres kinases interviennent dans l'activation des MAP kinases p38 lors d'un traitement au TPA. Comme il s'agit cependant d'un résultat unique et que les expériences suivantes infirment ces observations, nous ne tenons pas compte de ce résultat, si ce n'est que la régulation de l'activité des PKC peut s'avérer compliquée.

En ce qui concerne l'analyse des marqueurs de différenciation par Northern blot (fig 3-8B), une expression très forte du gène involucrine s'observe dans les kératinocytes traités au TPA. Cette expression élevée d'involucrine est fortement réprimée dans des kératinocytes ayant subi le traitement TPA en présence de l'inhibiteur GF 109203X.

Les cultures déplétées en cholestérol membranaire expriment fortement l'ARNm involucrine, alors que la déplétion en cholestérol réalisée en présence de GF 109203X réprime son expression.

Ce résultat suggère que la régulation du gène involucrine dans des kératinocytes déplétés en cholestérol passe par des voies PKC-dépendantes.

En comparant l'expression génique de l'involucrine (fig 3-8B) avec la présence de la protéine involucrine (fig 3-8Aa) dans les kératinocytes, on remarque que le taux d'expression d'ARNm est représentatif de la quantité d'involucrine produite pendant les 18h du traitement.

De façon surprenante la présence de l'inhibiteur GF 109203X semble empêcher la transcription de la cytokératine 10 dans les cultures contrôle et celles déplétées en cholestérol (fig 3-8Ba). Ce résultat indique probablement que les PKC sont des protéines de signalisation tellement importantes que leur inhibition perturbe la régulation des marqueurs de différenciation dans les kératinocytes épidermiques. Une autre explication possible de ce résultat pourrait être que la molécule GF 109203X exerce une action cytotoxique à la concentration de 10 μ M employée que nous analyserons par la suite.

Les messagers de la kératine 10 sont fortement réprimés lorsque les cultures sont traitées au TPA. Quand ce même traitement est administré en présence de l'inhibiteur GF 109203X, l'expression de K10 n'est plus réprimée, probablement parce que les PKC inhibées ne peuvent plus répondre au TPA. Donc le gène K10 serait négativement régulé par les PKC. En plus, cette condition rétablit en quelque sorte la situation contrôle où les kératinocytes ne subissent aucun traitement.

Par contre, les effets de la déplétion en cholestérol et de l'inhibiteur GF 109203X semblent être cumulatifs sur K10, puisque son expression est alors réduite de manière aussi forte que lors d'un traitement au TPA (fig 3-8B).

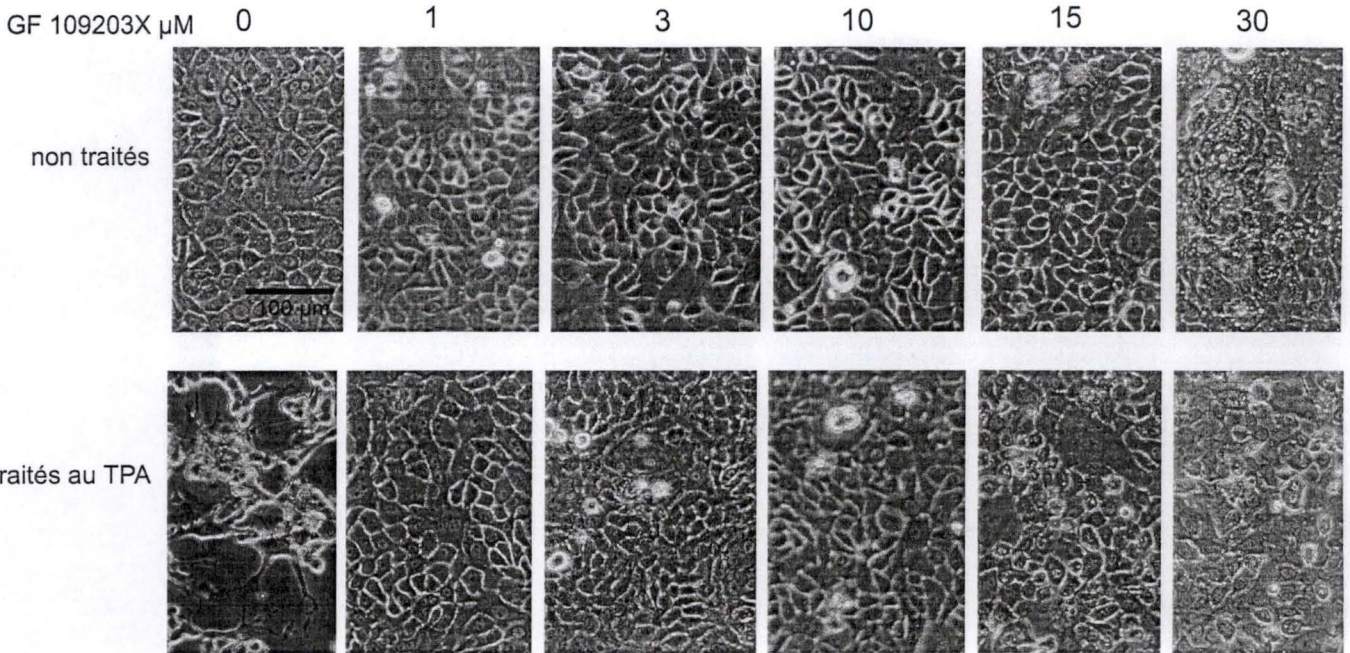
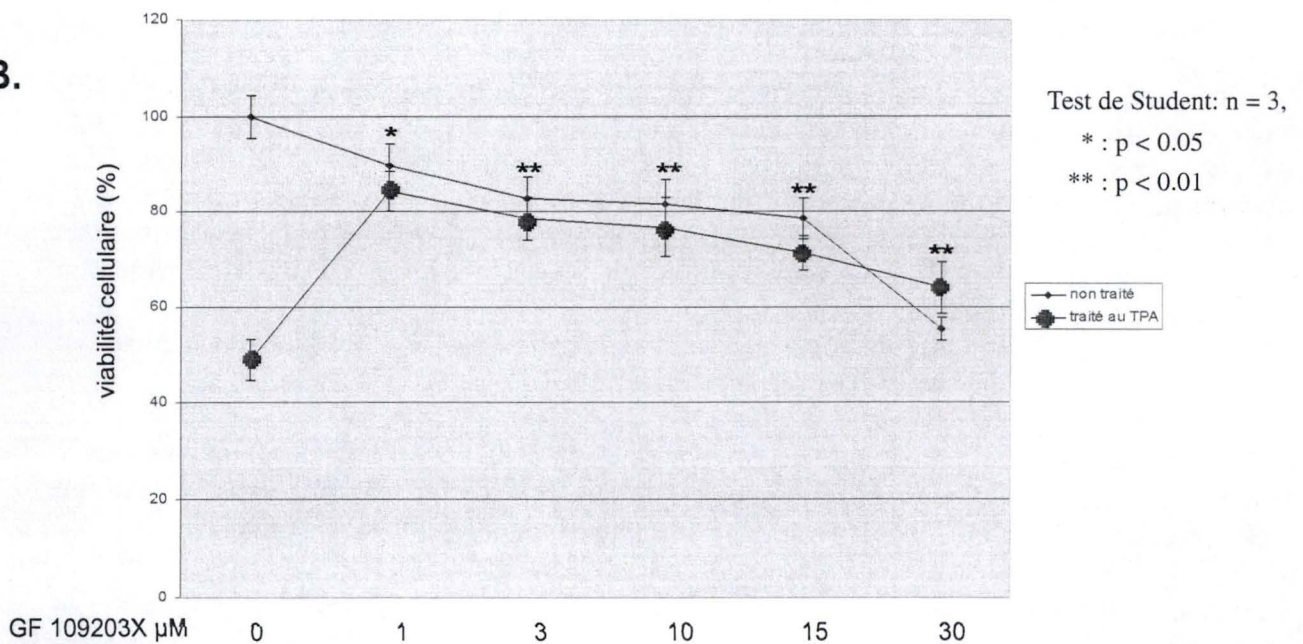
A.**B.**

Figure 3-9: **A.** Observation en microscopie à contraste de phase de cultures confluentes de kératinocytes en présence de différentes concentrations de l'inhibiteur des PKC, GF 109203X; les kératinocytes confluentes sont ou bien non traités ou traités au TPA pendant 18h.

B. Test de cytotoxicité de la molécule GF 109203X sur des kératinocytes respectivement non traités et traités au TPA pendant 18h. La viabilité cellulaire est déterminée par un test MTT. Les résultats sont représentés en triplicats \pm l'écart-type. Les cultures contrôle contiennent 0,3% de DMSO, correspondant à la concentration maximale de 30 μM en GF 109203X. La viabilité de ces cultures contrôle est fixée arbitrairement à une valeur de 100%. Le test de Student appliqué compare la viabilité moyenne des cultures non traitées en présence de différentes concentrations en GF 109203X à la viabilité moyenne des cultures contrôle fixées arbitrairement à une valeur de 100%. La différence de viabilité entre les cultures traitées au TPA et non traitées n'est significative qu'en absence de GF 109203X (non indiqué).

L'expression de K14 n'est pas affectée par la seule présence de l'inhibiteur mais la présence de l'inhibiteur en cas de traitement au TPA est essentielle pour maintenir un taux élevé de transcription de K14 (fig 3-8B). Ce résultat est en accord avec l'article de Le Panse et al. (1994) qui montre que cet inhibiteur favorise la prolifération des kératinocytes en culture.

L'inhibiteur GF 109203X à une concentration de 10 μ M arrive donc à empêcher de manière efficace les effets dus au traitement au TPA dans les kératinocytes. Ce traitement au TPA implique des voies de transduction du signal passant par les PKC puisque la phosphorylation de p38 lors d'un traitement au TPA est réduite en présence de l'inhibiteur GF 109203X (cf fig 3-8Aa). La déplétion en cholestérol membranaire semble activer les MAP kinases p38 α , β de manière PKC-indépendante, néanmoins, leur implication semble importante pour la régulation du gène involucrine, puisque l'inhibiteur GF 109203X réduit fortement le niveau d'expression d'involucrine dans des cultures déplétées en cholestérol membranaire.

Cependant, le phénotype cellulaire provoqué par la molécule GF 109203X (10 μ M) sur les cellules contrôle pose des questions concernant la cytotoxicité de cet inhibiteur. Celle-ci a donc été analysée par un test MTT.

3.2. Test de cytotoxicité de la molécule GF 109203X, un inhibiteur des PKC

3.2.1. Analyse morphologique en microscopie à contraste de phase

L'observation en microscopie à contraste de phase montre que l'application de l'inhibiteur GF 109203X sur des cultures autocrines confluentes de kératinocytes induit des changements morphologiques importants (fig 3-9A). Des cultures de kératinocytes mises en présence de concentrations faibles en GF 109203X (1, 3, 10 et 15 μ M) ne provoquent que de légers changements morphologiques, les espaces intercellulaires s'élargissent par rapport à la condition contrôle où les kératinocytes ne sont pas traités. Une concentration de 30 μ M en GF 109203X provoque cependant des modifications cellulaires importantes : les kératinocytes se détachent de leur support et prennent un aspect granuleux, ressemblant fortement à des cultures au stade de la post-confluence cellulaire.

Un traitement au TPA induit la différenciation des kératinocytes. En microscopie à contraste de phase, on observe que le TPA provoque de forts remaniements cellulaires impliquant peut-être le cytosquelette. En effet, les kératinocytes adoptent un aspect allongé et semblent se détacher de leur support.

Une application d'une concentration modérée de l'inhibiteur GF 109203X (1, 3, 10 μ M) lors d'un traitement au TPA restaure le phénotype cellulaire de la condition contrôle. Des concentrations élevées de cet inhibiteur dans des cultures traitées au TPA provoquent des lésions cellulaires, tout comme dans les kératinocytes non traités incubés en présence de concentrations élevées en GF 109203X.

L'aspect morphologique des cellules traitées par l'inhibiteur GF 109203X et le TPA supporte le résultat du Western blot (figure 3-8Aa) montrant que l'inhibition des PKC empêche la phosphorylation de la stress kinase p38 dans des kératinocytes traités au TPA. Vraisemblablement les protéine kinases C des kératinocytes sont inhibées par le GF 109203X,

de manière telle que l'activateur des PKC, le TPA, n'est plus capable de les activer, ce qui restaure en quelque sorte la morphologie observée dans la condition contrôle sans traitement administré.

Remarquons que les kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire ne changent pas de façon détectable leur morphologie en fonction de la présence ou non de l'inhibiteur des PKC GF 109203X.

3.2.2. Test de cytotoxicité des kératinocytes traités par le TPA et par l'inhibiteur GF 109203X

Pour évaluer la viabilité cellulaire, nous avons opté pour un test MTT afin de déterminer la concentration optimale de l'inhibiteur GF 109203X à utiliser sur la souche employée.

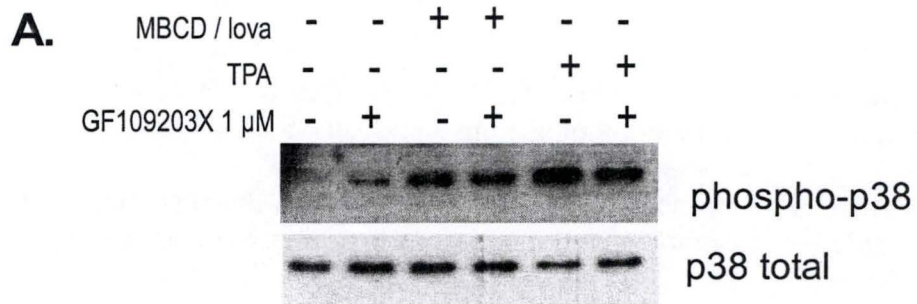
La littérature présente la molécule GF 109203X comme inhibiteur général des PKC (Toullec et al., 1991). Nous avons observé une activation des MAP kinases p38 dans des kératinocytes cultivés en présence de GF 109203X (10 μ M pendant 18h) alors que les cellules contrôle ne présentent pas de phosphorylation de p38 (fig 3-8Aa et 3-8Ab) ; il est donc possible que cet inhibiteur expose les kératinocytes à un stress menant à une activation des MAP kinases p38. Pour vérifier cette hypothèse, nous mettons en œuvre un test MTT. Celui-ci permettra de déterminer la concentration maximale de GF 109203X non toxique pour les kératinocytes confluents de la souche employée. En plus, une étude récente montre que la molécule GF 109203X provoque une cytotoxicité à partir d'une concentration de 10 μ M dans des kératinocytes HaCaT (Papp et al., 2003).

D'après la figure 3-9B, nous pouvons dire que la molécule GF 109203X appliquée pendant 18h sur des kératinocytes confluents montre déjà des effets toxiques significatifs (Test de Student: $n=3$, $p < 0,05$) à une concentration de 1 μ M. Par rapport aux kératinocytes non traités, la perte de viabilité cellulaire est hautement significative à partir d'une concentration de 3 μ M GF 109203X ($n=3$, $p < 0,01$).

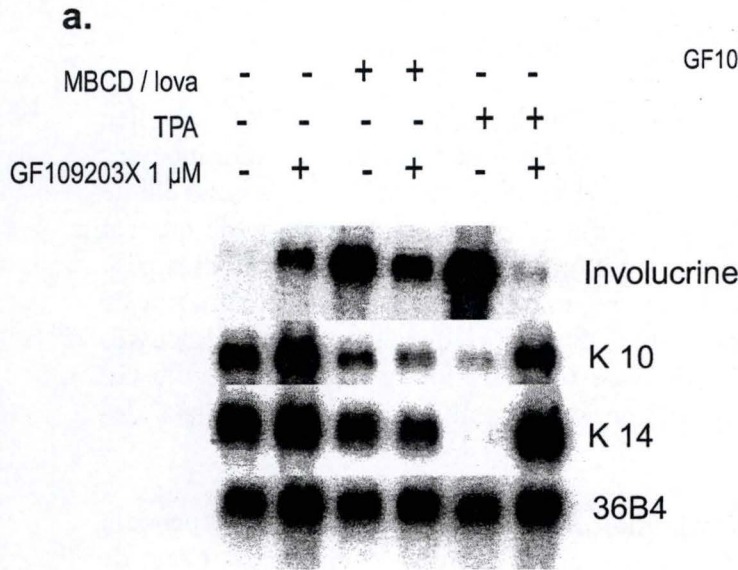
Dans une deuxième phase, nous avons investigué la concentration cytotoxique dans des kératinocytes traités au TPA pendant 18h. L'application de cet ester de phorbol provoque une chute de la viabilité cellulaire d'environ 40-50% (fig 3-2 et 3-9B). Cependant une inhibition des PKC par l'inhibiteur GF 109203X (1 μ M) diminue les effets cytotoxiques du TPA d'environ 35 % de façon à ce que la viabilité cellulaire réaugmente fortement, confirmant les observations microscopiques. Des concentrations plus élevées en GF 109203X (3, 10, 15, 30 μ M) n'augmentent plus la viabilité cellulaire dans les kératinocytes traités au TPA. Bien au contraire, la perte de viabilité va de pair avec les concentrations croissantes de l'inhibiteur GF 109203X.

La concentration de 1 μ M en GF 109203X entraîne donc une inhibition maximale de la perte de viabilité cellulaire due au traitement au TPA. En effet, la courbe des kératinocytes traités au TPA suit celle des cellules non traités au TPA à partir d'une concentration de 1 μ M en GF 109203X et les différences entre la condition traitée et non traitée à concentration égale en inhibiteur sont non significatives. Ce résultat suggère que la baisse de viabilité dans les kératinocytes traités au TPA et en présence de fortes concentrations en GF 109203X est due aux effets cytotoxiques de cette molécule. Au-delà de 3 μ M la molécule GF 109203X empêche probablement l'activité des PKC mais la cytotoxicité élevée de cette substance impose vraisemblablement un stress cellulaire.

D'après les résultats du test MTT, on peut déterminer qu'une concentration de 1 μ M de l'inhibiteur GF 109203X est la concentration optimale pour empêcher une perte de viabilité



B.



b.

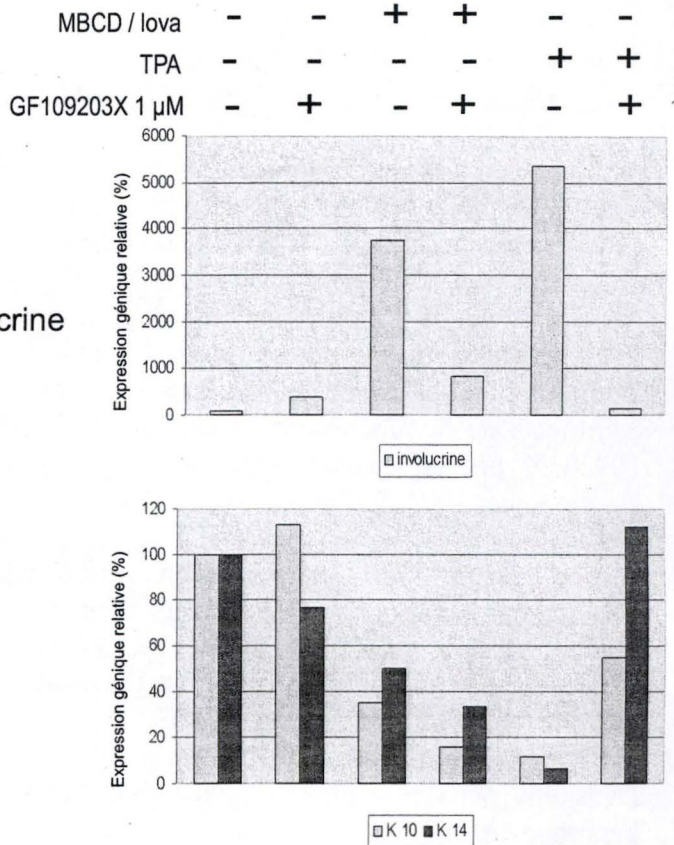


Figure 3-10 : Effets d'une inhibition des protéine kinases C par GF 109203X 1 μ M sur la physiologie des kératinocytes confluents déplétés en cholestérol membranaire (MBCD 7.5 mM / lova 10 μ M) ou traités au TPA (10 ng/ml) pendant 18h.

A. Effets de l'inhibiteur GF 109203X (1 μ M) sur la phosphorylation de p38.

B. Effets de l'inhibiteur GF 109203X (1 μ M) sur l'expression des marqueurs de différenciation.

a. Analyse par Northern blot.

b. Quantification de l'expression génique d'involucrine, de K10 et K14 selon le programme OptiQuant (Packard). Dans l'échantillon contrôle l'expression génique relative a été fixée arbitrairement à 100 %.

provoquée par l'ester de phorbol, même si l'inhibiteur montre déjà des effets cytotoxiques à 1 μM . Notons que cette concentration semble nécessaire pour inhiber les PKC des kératinocytes ($\text{IC}_{50}^{\text{GF 109203X}} = 0,4 \mu\text{M}$ (Le Panse et al., 1994)).

3.3. Effets de l'inhibiteur GF 109203X sur la physiologie des kératinocytes déplétés en cholestérol

Les traitements administrés restent identiques à ce qui a été décrit ci-dessus. Seule la concentration de l'inhibiteur GF 109203X change. Une étude publiée par Efimova et al. (1999) montre qu'un traitement au TPA de 24h augmente le contenu cellulaire en involucrine, mais quand ce traitement est effectué sur des kératinocytes en présence de l'inhibiteur GF 109203X, il n'y a pas d'augmentation d'involucrine détectable, preuve de l'efficacité de cet inhibiteur à empêcher la transcription du gène involucrine.

Le traitement de 18h au TPA devrait donc aussi modifier le contenu en involucrine de nos kératinocytes.

L'analyse de l'activation de p38 par Western blot (fig 3-10A) indique que la présence de GF 109203X à une concentration de 1 μM n'engendre qu'une très légère phosphorylation de p38. Le traitement au TPA et la déplétion en cholestérol activent les p38 kinases. Vis-à-vis du traitement au TPA, la présence de l'inhibiteur à une concentration de 1 μM lors d'un traitement au TPA semble déjà réduire le niveau de phosphorylation des p38 MAP kinases. L'inhibiteur inactive donc les PKC et la présence de GF 109203X (1 μM) lors d'une déplétion en cholestérol membranaire ne montre pas de changement du niveau de phosphorylation de p38, suggérant donc que la déplétion en cholestérol n'active pas de voie passant par les PKC.

L'analyse des marqueurs de différenciation par Northern blot (fig 3-10B) indique aussi qu'une concentration de 1 μM de l'inhibiteur GF 109203X induit déjà une faible augmentation de l'expression d'involucrine. De nouveau, l'extraction du cholestérol membranaire ainsi que le traitement au TPA, induisent fortement le niveau de transcription d'involucrine. Un traitement au TPA pendant une incubation en présence de l'inhibiteur GF 109203X (1 μM) réprime fortement cette transcription d'involucrine. Les kératinocytes déplétés en cholestérol mais incubés en présence de GF 109203X (1 μM) montrent aussi cette expression réduite d'involucrine.

Le marqueur de différenciation K10 est très peu exprimé lors d'un traitement au TPA, mais son expression n'est plus réprimée quand l'application du TPA est réalisée en présence de l'inhibiteur GF 109203X.

La déplétion en cholestérol provoque une diminution de l'expression du marqueur K10. Si cette déplétion est effectuée en présence de l'inhibiteur GF 109203X, le niveau d'expression de K10 diminue davantage.

La confirmation des résultats des analyses de la phosphorylation de p38 a été obtenue lors d'une deuxième série d'expériences où différentes concentrations de l'inhibiteur ont été testées en parallèle (fig 3-11). La présence de l'inhibiteur GF 109203X ne provoque qu'une faible phosphorylation de p38 à partir d'une concentration de 3 μM . Par contre, l'application du TPA suscite une phosphorylation importante des p38 kinases. Le traitement au TPA réalisé en présence de concentrations croissantes de l'inhibiteur GF 109203X (1, 3, 10 μM) réduit de plus en plus le niveau de phosphorylation de p38 mais l'inhibition des p38 kinases n'est jamais complète. Cependant, lors des déplétions en cholestérol en présence de GF 109203X, le

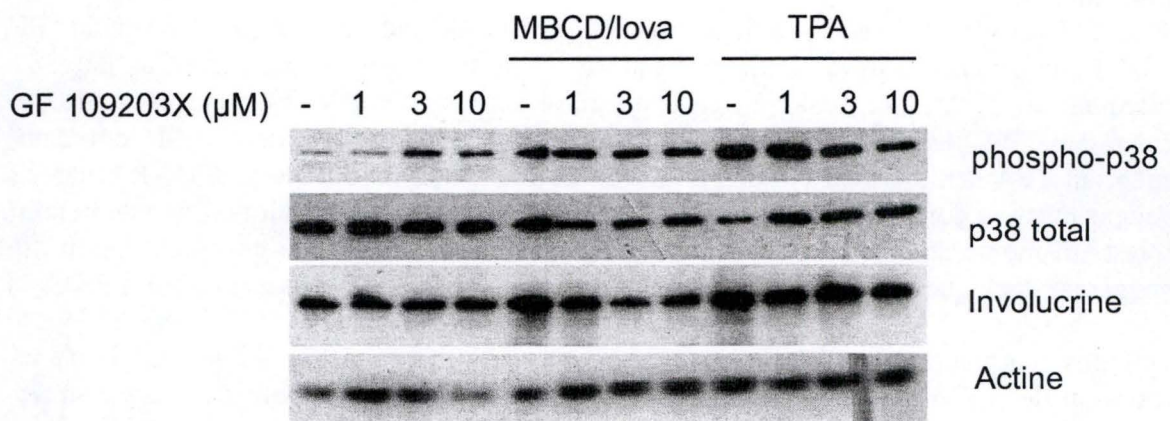


Figure 3-11: Effets de différentes concentrations en GF 109203X (1,3,10 μM), un inhibiteur des protéine kinases C sur des cultures confluentes de kératinocytes déplétées en cholestérol (MBCD 7,5 mM pendant 1h / lovastatine 10 μM pendant 17h) (MBCD / lova) ou traités au TPA (TPA 10 ng/ml) pendant 18h. Détection par Western blot de la phosphorylation de p38 et de la présence de la protéine involucrine.

niveau de phosphorylation de p38 reste constant indépendamment de la concentration de l'inhibiteur (1, 3 ou 10 μ M).

Ce résultat suggère donc à nouveau qu'une déplétion en cholestérol par un traitement à la M β CD et à la lovastatine ne passe pas par des voies PKC-dépendantes puisque la phosphorylation de p38 ne semble pas modifiée par la présence d'inhibiteur des PKC dans des kératinocytes déplétés en cholestérol.

Lors de cette expérience, nous avons également investigué la production de la protéine involucrine pendant la durée du traitement (fig 3-11). L'analyse par Western Blot indique que l'involucrine est déjà bien présente dans les cultures contrôle puisque les kératinocytes se trouvent à confluence. L'application du TPA pendant 18h augmente davantage l'expression de la protéine involucrine. La présence de l'inhibiteur GF 109203X semble réprimer cette synthèse d'involucrine qui n'atteint cependant pas le niveau des cellules contrôles non traitées.

Les kératinocytes déplétés en cholestérol exposent une synthèse importante d'involucrine et la présence de l'inhibiteur réduit la production de ce marqueur de différenciation. Cette expérience combinée aux résultats du Northern blot (fig 3-10B) permet de déduire que la présence de GF 109203X dans les kératinocytes déplétés en cholestérol, réduit l'expression du messager involucrine et la synthèse sa protéine correspondante.

En plus, il semble que la transcription d'involucrine dans les kératinocytes déplétés en cholestérol n'est pas directement dépendante de la phosphorylation des MAP kinases p38 α , β . En effet, les résultats avec l'inhibiteur des PKC suggèrent que l'expression d'involucrine induite par une déplétion en cholestérol dépend d'une signalisation impliquant les PKC, tandis que la phosphorylation des MAP kinases p38 est indépendante des protéine kinases C en cas d'extraction de cholestérol membranaire par la méthyl- β -cyclodextrine. Cette interprétation semble logique puisque les stimuli et voies activant les p38 kinases sont multiples (UV, TNF α , choc osmotique, déplétion en cholestérol membranaire) et qu'une activation des MAP kinases p38 provoque des réponses cellulaires variées (prolifération, apoptose, synthèse de cytokines) et n'entraîne pas forcément une différenciation en augmentant l'expression du gène involucrine dans les kératinocytes épidermiques.

La littérature souligne que les MAP kinases p38 cytoplasmiques sont transloquées dans le noyau lorsqu'elles se trouvent activées par phosphorylation. De localisation nucléaire, elles peuvent activer des facteurs de transcription, comme ATF-2 et AP-1 (Ono & Han, 2000).

Nous venons de montrer qu'une déplétion en cholestérol membranaire active les MAP kinases p38 et nous essayons de mettre en évidence la localisation subcellulaire de ces molécules de signalisation lors d'une extraction de cholestérol membranaire.

4. Etude morphologique des kératinocytes déplétés en cholestérol

4.1. Localisation subcellulaire des p38 kinases dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire

Des kératinocytes cultivés jusqu'à la confluence cellulaire sont déplétés en cholestérol ou traités au TPA, ils sont par la suite fixés, perméabilisés et marqués par des anticorps anti-p38

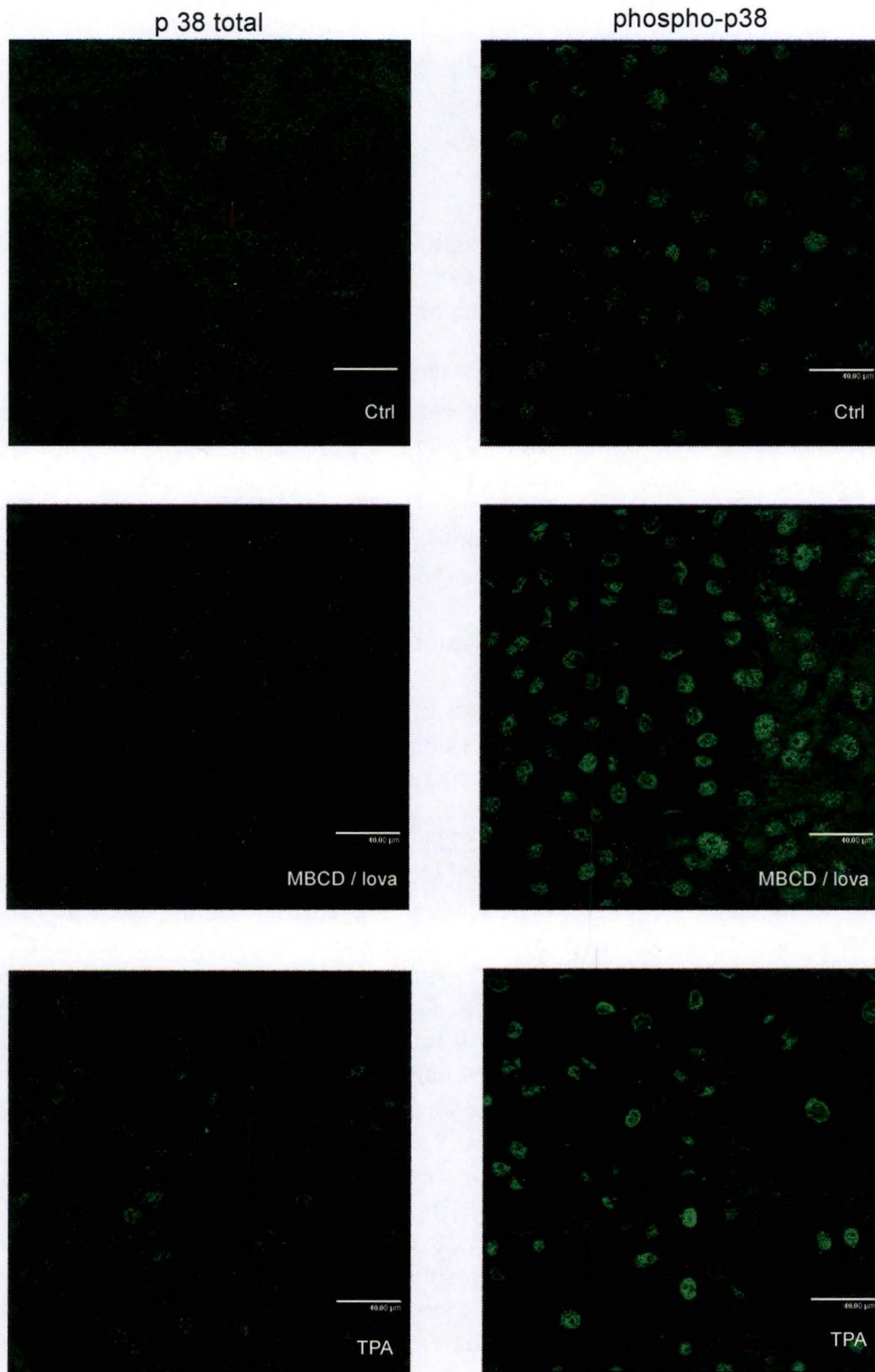


Figure 3-12: Effets d'une déplétion en cholestérol membranaire ou d'un traitement au TPA sur la localisation subcellulaire des MAP kinases p38 (p38 total) et des MAP kinases p38 phosphorylées (phospho-p38) dans des cultures confluentes de kératinocytes.

La déplétion en cholestérol est réalisée par une incubation en présence de MBCD 7,5 mM pendant 1h, suivie d'une inhibition de la synthèse du cholestérol par la lovastatine 10 µM appliquée pendant 17h (MBCD / lova). Le traitement au TPA 10 ng/ml est appliqué pendant 18h (TPA). Un microscope confocal Leica est utilisé pour observer les cellules et prendre les photos (barre = 40 µm).

total et anti-phospho-p38 (fig 3-12). L'analyse de ce marquage immunofluorescent montre que dans les kératinocytes non stimulés, les kinases p38 se trouvent réparties uniformément dans le cytoplasme et le noyau, de façon tellement homogène que les limites cellulaires sont difficiles à distinguer. Les kératinocytes déplétés en cholestérol montrent un marquage des kinases p38 un peu plus intense dans le noyau de presque toutes les cellules alors que la présence de kinases p38 cytoplasmiques ne change pas. Le traitement au TPA modifie la morphologie cellulaire et provoque également un marquage nucléaire de certaines cellules. Le marquage de la forme phosphorylée des p38 kinases est déjà intense dans les cultures de la condition contrôle. Ce marquage est entièrement nucléaire. La déplétion en cholestérol par un traitement de 18h accentue encore ce marquage nucléaire dans toutes les cellules. Par contre, le traitement au TPA provoque aussi un marquage nucléaire plus intense que celui des cellules contrôle, mais les kinases p38 phosphorylées semblent se concentrer au niveau de certaines cellules seulement.

En comparant le marquage de la totalité des kinases p38 (p38 total) à celui des kinases p38 phosphorylées (phospho-p38), nous pouvons confirmer les résultats de la littérature disant que les formes phosphorylées de p38 sont transloquées dans le noyau (Ono & Han, 2000). Leur translocation nucléaire sert probablement à phosphoryler et activer des facteurs de transcriptions tels que AP-1 et ATF-2.

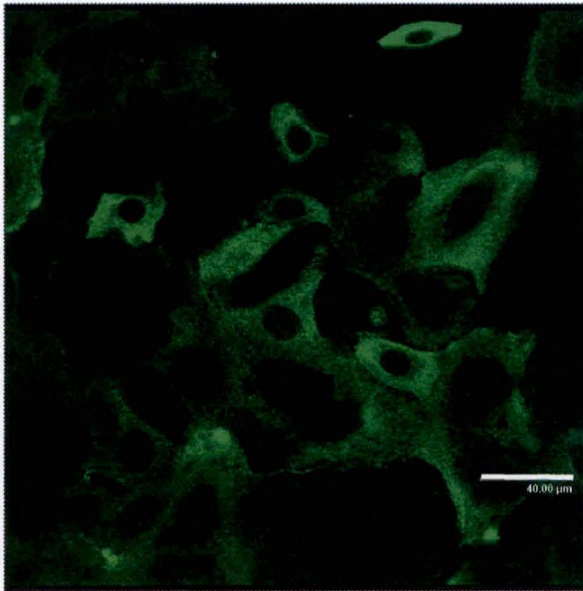
Les analyses par Northern et Western blot montrent que l'expression d'involucrine et la présence de la protéine sont augmentées en cas de traitement au TPA ainsi que lors d'une déplétion en cholestérol membranaire. Par l'intermédiaire d'un marquage en immunofluorescence, nous avons essayé de déterminer les effets des deux traitements sur l'expression d'involucrine dans certaines cellules et sa localisation subcellulaire.

4.2. Localisation subcellulaire d'involucrine dans des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire

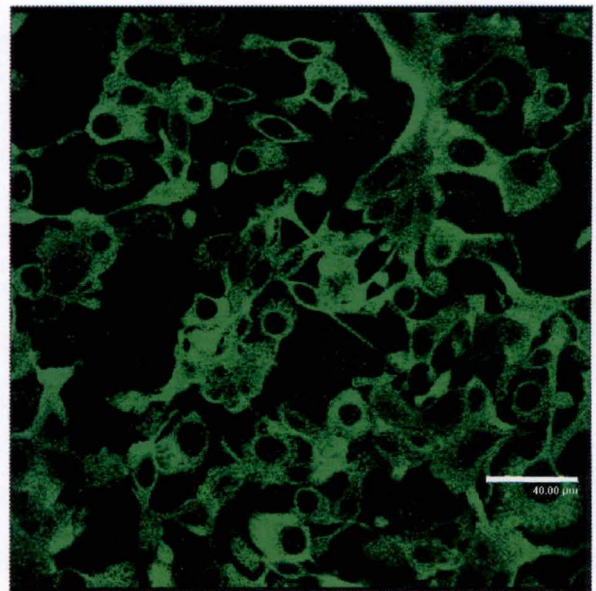
Un marquage en immunofluorescence a été réalisé pour détecter la présence d'involucrine dans des cultures confluentes de kératinocytes (fig 3-13).

Le marquage de kératinocytes non traités montre que l'involucrine se trouve essentiellement répartie dans des cellules de grande taille. Celles-ci présentent un marquage cytoplasmique uniforme. Le traitement au TPA pendant 18h provoque un aspect allongé des kératinocytes. L'involucrine, marqueur de différenciation tardive, est présent en grande quantité dans le cytoplasme de toutes les cellules et semble en plus, s'accumuler dans la région submembranaire, marquant ainsi d'une manière plus intense les contours cellulaires. Cette observation confirme les résultats du Western blot (fig 3-8Aa et 3-11) qui montrent que la synthèse d'involucrine est stimulée par un traitement au TPA.

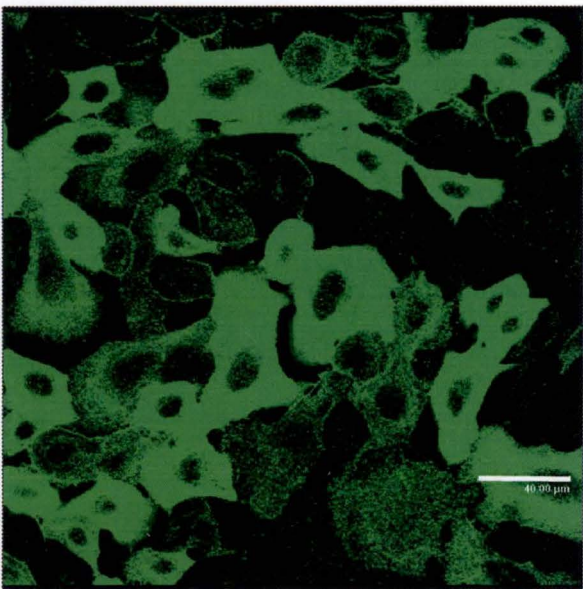
Une déplétion en cholestérol de 18h provoque un marquage cytoplasmique de certains kératinocytes seulement. La présence d'involucrine dans ces cellules semble se concentrer sur les extrémités des kératinocytes. En effet, le marquage cytoplasmique paraît diminué en faveur d'une localisation submembranaire de l'involucrine. Ce résultat suggère peut-être que la déplétion en cholestérol favoriserait la formation de l'enveloppe cornée dans les cellules marquées puisque lors de l'établissement de l'enveloppe cornée, l'involucrine s'associe avec d'autres constituants submembranaires (Eckert et al., 1989).



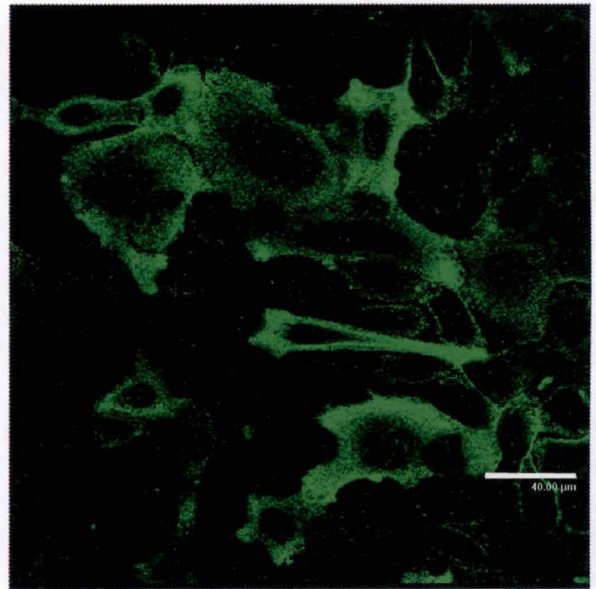
Ctrl



TPA 18h



MBCD 1h



MBCD / lova 18h

Figure 3-13: Effets d'une déplétion en cholestérol membranaire ou d'un traitement au TPA sur la localisation subcellulaire d'involucrine dans des cultures confluentes de kératinocytes.

La déplétion en cholestérol est réalisée par une incubation en présence de MBCD 7,5 mM pendant 1h (MBCD 1h) ou par une incubation en présence de MBCD 7,5 mM pendant 1h suivie d'une inhibition de la synthèse du cholestérol par la lovastatine 10 µM appliquée pendant 17h (MBCD / lova 18h). Un microscope confocal Leica est utilisé pour observer les cellules et prendre les photos (barre = 40 µm).

Par rapport au contrôle positif (traitement au TPA), la déplétion en cholestérol semble favoriser la présence d'involucrine dans les contours de la membrane plasmique de certains kératinocytes. L'extraction de cholestérol membranaire semble induire la différenciation tardive de certaines cellules alors que l'ester de phorbol TPA semble favoriser la différenciation de la totalité des cellules, vu que le marquage d'involucrine est submembranaire dans tous les kératinocytes.

5. Implication des PKC dans les kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire ?

D'après nos résultats, nous postulons que la réponse à une déplétion en cholestérol membranaire implique des voies de transduction du signal activant les MAP kinases p38 de manière PKC-indépendante. En effet, à partir des expériences réalisées avec l'inhibiteur GF 109203X, nous pouvons déduire que la phosphorylation de p38 provoquée par le traitement au TPA est empêchée lorsque l'inhibiteur est présent dans le milieu de cultures confluentes traitées au TPA. Plusieurs auteurs montrent que le traitement au TPA induit une signalisation passant par les PKC et les MAP kinases p38 qui augmente la transcription d'involucrine. Nos expériences montrent dans ce cas que l'inhibiteur employé inhibe effectivement des protéine kinases C. Par contre, des kératinocytes déplétés en cholestérol montrent une phosphorylation de p38 identique en présence ou non de l'inhibiteur GF 109203X (cf fig 3-11). De surcroît, l'observation de la morphologie des cellules confirme l'idée que la réponse cellulaire lors d'une déplétion en cholestérol est PKC-indépendante: la présence de GF 109203X n'altère pas la morphologie des kératinocytes déplétés en cholestérol, alors que lors du traitement au TPA la présence ou non de GF 109203X change radicalement la morphologie des cellules: la présence de cet inhibiteur empêche complètement les altérations provoquées par le traitement au TPA (cf figure 3-9).

Un autre argument plus indirect en faveur d'une signalisation indépendante des PKC dans les kératinocytes déplétés en cholestérol peut être déduit de l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des MAP kinases p38 α , β (SB 202190 et PD 169316). Nos résultats suggèrent que le traitement au TPA induit une phosphorylation de l'isoforme p38 δ , alors que l'extraction de cholestérol membranaire active les isoformes p38 α et β , puisque la présence d'inhibiteurs de p38 α et β réduit le niveau de phosphorylation de p38 dans les cultures déplétées en cholestérol, mais pas après le traitement au TPA. Les cascades de signalisation impliquées dans les deux conditions ne seraient donc pas identiques et la probabilité que les molécules de signalisation en amont de ces deux cascades soient différentes est d'autant plus grande.

DISCUSSION GENERALE
& PERSPECTIVES

1. Caractérisation de la physiologie des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire

Le cholestérol est un composant essentiel des membranes plasmiques animales. Dans les kératinocytes, ce lipide est nécessaire à l'élaboration de l'enveloppe cornée (Schmidt et al., 1991) et à l'étanchéité de la barrière lipidique épidermique. Le cholestérol joue donc probablement un rôle physiologique important dans ce type cellulaire.

Ralph Jans a montré dans le cadre de sa thèse que l'extraction de cholestérol membranaire, par un traitement à la méthyl- β -cyclodextrine et à la lovastatine, dans des cultures confluentes de kératinocytes, altère l'expression de marqueurs de différenciation et provoque une activation simultanée des MAP kinases p38, activation responsable partiellement de ces altérations (Jans et al., 2004). Le défi est maintenant de comprendre comment l'extraction du cholestérol peut induire l'activation des MAP kinases p38 et d'identifier les molécules de signalisation impliquées.

Dans ce travail, nous avons commencé à investiguer les voies de signalisation conduisant à une activation des MAP kinases p38 dans les kératinocytes épidermiques déplétés en cholestérol. Les p38 kinases sont des protéines de signalisation importantes qui peuvent être régulées par un réseau complexe de plusieurs voies de signalisation interconnectées. En remontant dans les voies de signalisation provoquant une activation des MAP kinases p38, nous avons recherché l'implication éventuelle des protéine kinases C dans la réponse des kératinocytes face à une déplétion en cholestérol membranaire. Nos expériences montrent et confirment qu'une déplétion en cholestérol membranaire provoque une phosphorylation des MAP kinases p38 et une induction simultanée d'involucrine dans des cultures autocrines confluentes de kératinocytes.

1.1. Implication des isoformes de MAP kinases p38 et leurs fonctions éventuelles dans la signalisation provoquée par une déplétion en cholestérol membranaire

Les MAP kinases p38 peuvent être activées par une multitude de stimuli. Certaines cytokines, le stress osmotique, les rayons ultraviolets et la déplétion en cholestérol membranaire constituent des stimuli activateurs de p38. Au sein des kératinocytes, il existe trois isoformes de MAP kinases p38, α , β et δ , dont les rôles respectifs sont différents. Afin d'identifier les isoformes de p38 impliquées lors d'une déplétion en cholestérol, des inhibiteurs des isoformes p38 α , β ont été utilisés. Les résultats montrent qu'une déplétion en cholestérol membranaire semble surtout activer les isoformes p38 α , β . Un traitement au TPA active surtout l'isoforme p38 δ , un résultat en accord avec la littérature (Efimova et al., 2003). A l'heure actuelle, il existe encore peu d'informations sur les différentes réponses cellulaires engendrées par l'activation de certaines isoformes des MAP kinases p38. Plusieurs équipes essayent cependant de mettre au point des caractérisations plus détaillées des isoformes de p38 pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués et les voies de signalisation induites.

Une étude récente de Porras et al. (2004) propose un rôle de l'isoforme p38 α dans l'induction de l'apoptose. L'activation de p38 α semble en effet provoquer l'entrée en apoptose de kératinocytes via une voie impliquant le récepteur membranaire Fas, un inducteur puissant de l'apoptose (Porras et al., 2004). A ce sujet, il est particulièrement intéressant de relever les

résultats de Gniadecki (2004) montrant que l'extraction de cholestérol membranaire par l'application d'un traitement à la M β CD dans des kératinocytes induit la mort cellulaire par apoptose. Gniadecki (2004) démontre que l'extraction de cholestérol membranaire par la M β CD provoque l'apoptose en activant Fas, le "membrane death receptor"; il montre que l'extraction de cholestérol membranaire n'entraîne pas simplement une rupture des membranes plasmiques puisque la solubilisation des phospholipides membranaires par un détergent non ionique ne provoque pas de mort cellulaire par apoptose. En plus cet auteur suggère que le récepteur Fas inactif est localisé au niveau des "lipid rafts". La perturbation des "lipid rafts" par l'extraction du cholestérol membranaire induirait une agrégation spontanée de Fas dans les parties de la membrane plasmique pauvres en cholestérol (Gniadecki, 2004). Cette agrégation semble activer le récepteur Fas et déclencher alors l'apoptose via l'activation du complexe DISC (death inducing signalling domain).

En combinant les résultats de ces études avec nos propres données, on peut supposer que l'activation de la MAP kinase p38 α lors de la déplétion en cholestérol favoriserait l'apoptose via une expression augmentée de Fas. Nos résultats concordent donc avec la littérature, d'autant plus que, selon Porras et al. (2004), le récepteur Fas montre une analogie d'activation avec le récepteur de l'EGF, dont nous savons qu'il est activé par l'extraction de cholestérol membranaire dans les kératinocytes (Jans et al., 2004).

1.2. Les protéine kinases C, des régulateurs de l'activité des MAP kinases p38 en cas de déplétion en cholestérol membranaire ?

Nous avons émis l'hypothèse que la déplétion en cholestérol pourrait induire la différenciation épidermique dans des kératinocytes en culture, vu que des marqueurs de la différenciation terminale s'expriment davantage dans cette condition. Dlugosz & Yuspa (1994) ont montré que les protéine kinases C (PKC) sont clairement impliquées dans la différenciation des kératinocytes, car leur activation augmente l'expression de la transglutaminase et de constituants de l'enveloppe cornée, comme la loricine, la filaggrine et l'involucrine. Il était donc intéressant d'étudier l'implication des PKC dans la transduction des signaux produits par une déplétion en cholestérol membranaire dans des kératinocytes humains. Les PKC sont des molécules de signalisation impliquées dans un grand nombre de réponses cellulaires. Efimova et al. (1998) ont démontré qu'un traitement au TPA active la MAP kinase p38 δ par l'intermédiaire d'une voie de signalisation passant par les PKC. L'isoforme p38 δ semble impliquée dans la régulation de la différenciation terminale des kératinocytes : son activation augmente l'expression d'involucrine qui est nécessaire pour la formation de l'enveloppe cornée. Nos résultats utilisant l'inhibiteur des MAP kinases p38 confirment d'ailleurs que le TPA active p38 δ . Ces arguments étaient en faveur d'une implication des PKC dans l'activation de p38 produite par une déplétion en cholestérol membranaire. Nos expériences avec un inhibiteur des PKC, la molécule GF 109203X, montrent cependant qu'une extraction de cholestérol membranaire dans des kératinocytes ne semble pas activer les PKC. Il faut reconnaître que cet inhibiteur GF 109203X, présenté à l'origine par Toullec et al. (1991) comme inhibiteur sélectif des PKC, produit des effets cytotoxiques sur nos kératinocytes, et que des études récentes montrent que cette molécule n'inhibe pas seulement les PKC mais qu'elle inhibe de manière aussi sensible des substrats de MAP kinases, comme MSK1 (mitogen-stress activated kinase 1) (Cuenda & Alessi, 1999). L'interprétation des résultats produits par cet inhibiteur doit donc rester prudente et notre observation que la déplétion en cholestérol n'utilise pas de voies PKC-dépendantes dans les kératinocytes reste à confirmer. Par exemple, des études complémentaires utilisant d'autres inhibiteurs sélectifs de PKC ou des approches par dominants négatifs pourraient confirmer notre hypothèse. La molécule rottlerin pourrait se révéler particulièrement intéressante car elle

inhibe spécifiquement la PKC δ dont on sait qu'elle est phosphorylée par le traitement au TPA dans les kératinocytes humains (Efimova et al., 2003).

1.3. Les Rho GTPases, des régulateurs de l'activité des MAP kinases p38 en cas de déplétion en cholestérol membranaire ?

Selon nos résultats avec l'inhibiteur des PKC, l'activation des MAP kinases p38 ne semblerait pas passer par des voies PKC-dépendantes. Quels sont dans ce cas les autres candidats possibles régulant l'activité des MAP kinases p38 en réponse à une déplétion en cholestérol ? Récemment, les Rho GTPases ont été démontrées capables d'induire des cascades de signalisation qui activent les MAP kinases p38 dans les kératinocytes exposés à un stress hyperosmotique (Cheng et al., 2002). D'une manière générale, que sait-on de ces Rho GTPases ? Plusieurs études indépendantes proposent un rôle crucial des protéines Rho dans le maintien du cytosquelette d'actine (Mackay & Hall, 1998, Koch et al., 1997). En effet, une étude avec des fibroblastes montre qu'une inactivation des protéines de signalisation Rho par la toxine B de *Clostridium difficile* provoque des changements morphologiques : les cellules s'arrondissent, vraisemblablement parce que l'activité des Rho GTPases est essentielle pour le maintien du cytosquelette d'actine (Koch et al., 1997). Il est intéressant de noter qu'une inhibition de la synthèse du cholestérol par un traitement à la lovastatine empêche l'activation des Rho GTPases. En effet, l'ancrage en membrane est essentiel pour l'activité des Rho GTPases, la lovastatine empêche cependant la synthèse d'isoprène et évite de cette manière l'ancrage membranaire et l'activité des Rho GTPases. 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 concentrées dans les "lipid rafts" (del Pozo et al., 2004). Guan (2004) suggère qu'une signalisation intégrine-dépendante pourrait provoquer une internalisation des "lipid rafts" qui rend les Rho GTPases cytoplasmiques et donc inactives. Dans ce cas, les Rho GTPases ne peuvent plus interagir avec le complexe PAK (p21-activated kinase) qui est en partie responsable de la stabilisation du cytosquelette (Guan, 2004). A ce propos, lors de la déplétion en cholestérol membranaire, nous observons un changement de forme des kératinocytes qui s'arrondissent partiellement. Ces altérations morphologiques traduisent probablement les effets d'un remodelage du cytosquelette qui pourrait être dû à une inactivation des Rho GTPases, connues pour leur rôle cytostructural. Un marquage du cholestérol par la filipine montre que la déplétion en cholestérol membranaire par un traitement à la M β CD provoque une internalisation du marquage du cholestérol dans les kératinocytes confluents (Jans et al., 2004). Il semble donc très probable que l'extraction de cholestérol provoque une perturbation des "lipid rafts" entraînant une internalisation des molécules associées. Comme on sait que les Rho GTPases régulent négativement l'activation des MAP kinases p38 (Cheng et al., 2002), il est possible que la signalisation induite par une déplétion en cholestérol passe par ces Rho GTPases. En effet, une extraction de cholestérol membranaire pourrait inactiver les Rho GTPases et lever dès lors l'inhibition de phosphorylation des MAP kinases p38.

1.4. Les effets éventuels d'une déplétion en cholestérol membranaire sur la différenciation épidermique

Une déplétion en cholestérol dans des cultures confluentes de kératinocytes induit l'expression d'involucrine et réprime simultanément l'expression des kératines 10 et 14. Ce

phénotype montre un certain parallélisme avec l'expression de marqueurs de différenciation dans des cultures post-confluentes non traitées où l'involucrine est fortement exprimée. Le phénotype produit par une déplétion en cholestérol sur les marqueurs de différenciation analysés peut être comparé à l'étape de différenciation correspondant à la migration des kératinocytes de la couche épineuse vers la couche granuleuse dans les épidermes *in vivo* (Dlugosz & Yuspa, 1993). Lors de cette transition, l'expression d'involucrine augmente fortement alors que la transcription des kératines est réprimée. La perte de cholestérol pourrait donc favoriser la différenciation des kératinocytes épineux en cellules granuleuses. Rappelons que *in vivo* la kératine 14 n'est pas exprimée dans les couches suprabasales ; l'expression de marqueurs de différenciation analysés au niveau de la couche granuleuse est donc proche de celle observée suite à une déplétion en cholestérol dans des cultures confluentes de kératinocytes. On peut de ce fait penser qu'une déplétion en cholestérol favoriserait une différenciation épidermique plus proche de la situation *in vivo*. Pour étudier une telle hypothèse, il faudrait analyser l'expression d'autres marqueurs tardifs de différenciation comme la loricrine, la transglutaminase et la filaggrine.

La déplétion en cholestérol ne change pas l'expression des marqueurs de différenciation analysés lorsque l'extraction du cholestérol est réalisée à post-confluence (Jans et al., 2004). Or la post-confluence peut être assimilée, *in vivo*, à la différenciation épidermique tardive. On sait que le contenu en cholestérol augmente graduellement dans les couches épidermiques superficielles (Lampe et al, 1983). Il est dès lors possible qu'à post-confluence, la synthèse endogène de cholestérol approvisionne largement les membranes plasmiques des kératinocytes et qu'une déplétion par la M β CD soit incapable de diminuer le taux de cholestérol de façon à déclencher une expression altérée des marqueurs de différenciation.

Le psoriasis est une pathologie épidermique fréquente qui est caractérisée par une différenciation précoce des kératinocytes dans les couches épidermiques profondes. En effet, l'expression de marqueurs de différenciation de la couche basale, K14, n'est que très faible et les marqueurs suprabasaux, K1 et K10, sont également réprimés. Par contre, l'involucrine est exprimée dans toutes les couches suprabasales de façon à ce que les kératinocytes entrent trop tôt en différenciation (Bernerd et al., 1992). L'expression des marqueurs de différenciation dans cette pathologie ressemble très fort aux altérations des marqueurs de différenciation épidermique provoquées par une extraction de cholestérol membranaire. Il est donc possible qu'il y ait une dérégulation du taux de cholestérol dans les kératinocytes psoriatiques, d'autant plus si on sait que le sérum de personnes atteintes du psoriasis montre fréquemment un profil lipidique anormal (Roche-Pereira et al., 2001).

1.5. Implication éventuelle des signalisations via les "lipid rafts" et les intégrines dans le phénotype des kératinocytes déplétés en cholestérol membranaire

Lors de certaines expériences, nous avons observé que les déplétions en cholestérol ne provoquaient qu'une très faible phosphorylation des MAP kinases p38 ainsi qu'une induction modérée d'involucrine. Pour comprendre ce problème, des cultures ont été déplétées en cholestérol avant la confluence (confluence moins deux jours) et jusqu'à post-confluence cellulaire (confluence plus deux jours) puis analysées. Grâce à cette expérience, nous avons déterminé que le stade de la confluence cellulaire est un facteur essentiel, déterminant la sensibilité des marqueurs de différenciation analysés ainsi que la phosphorylation simultanée des MAP kinases p38. Nous confirmons donc qu'une déplétion en cholestérol membranaire dans des kératinocytes humains provoque des changements uniquement au stade de la

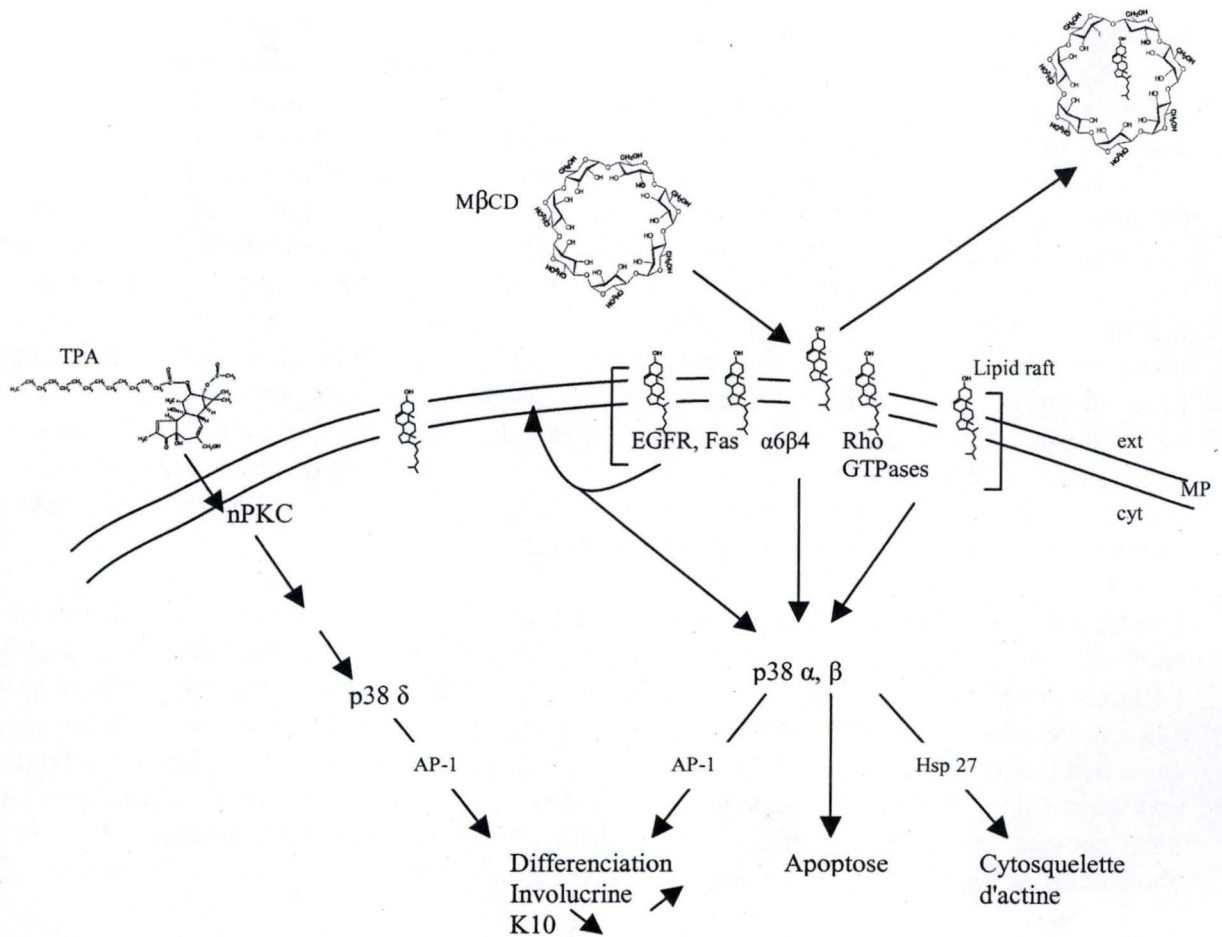


Figure 4-1: Représentation schématique des effets éventuels d'une déplétion en cholestérol membranaire et d'un traitement au TPA sur la signalisation dans des kératinocytes épidermiques.

confluence et simultanément nous démontrons que les effets produits de l'extraction de cholestérol ne sont pas de simples effets cytotoxiques puisqu'ils ne sont pas observés dans les cultures sous-confluentes. A ce sujet, une hypothèse récente propose que le détachement des cellules de leur substrat serait une contrainte majeure pour la régulation du taux de cholestérol. Quand les cellules perdent l'ancrage au substrat, les intégrines sont internalisées. del Pozo et al. (2004) montrent que la rupture des "lipid rafts" par extraction de cholestérol membranaire imite les effets d'une perte d'adhésion dans des fibroblastes humains. Selon ces auteurs, les "lipid rafts" sont internalisés par un mécanisme dépendant des intégrines lors du détachement des cellules. Cette internalisation fait que le cholestérol membranaire ainsi que les protéines de signalisation liées aux "lipid rafts" se retrouvent dans le cytoplasme. Selon leur hypothèse, les intégrines seraient des éléments clés dans la régulation des "lipid rafts" et donc dans la signalisation sous-jacente à ces microdomaines lipidiques riches en cholestérol. Dans les kératinocytes *in vivo*, les "lipid rafts" sont prépondérants dans les cellules amplificatrices de la couche basale (Gniadecki & Bang, 2003). On sait que la différenciation implique une perte de contact avec la jonction épidermo-dermique et que, *in vitro*, le détachement basal des kératinocytes entraîne une internalisation des intégrines $\alpha 6\beta 4$ (Poumay et al., 1993), on donc peut penser que l'internalisation des domaines membranaires contenant l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ enclencherait une cascade de transduction du signal rendant les kératinocytes plus sensibles à une extraction du cholestérol membranaire. En suivant l'hypothèse de del Pozo et al. (2004), l'internalisation de domaines membranaires via un mécanisme intégrine-dépendant et concernant principalement des "lipid rafts" pourrait dépendre du contenu en cholestérol membranaire. Une extraction du cholestérol membranaire des kératinocytes provoquerait peut-être dans cette situation des altérations dans l'expression de marqueurs de différenciation. Ceci devra être étudié et des marquages simultanés des "lipid rafts" et des MAP kinases 38 α , β phosphorylées, ou bien des intégrines $\alpha 6\beta 4$ et des MAP kinases 38 α , β phosphorylées, pourraient s'avérer intéressantes pour comprendre les mécanismes moléculaires liés à la désorganisation des "lipid rafts" via une extraction du cholestérol membranaire. Signalons encore, à propos des "lipid rafts" et des intégrines épidermiques, que Gagnoux-Palacios et al. (2003) montrent qu'une fraction considérable d'intégrines $\alpha 6\beta 4$ se trouve regroupée dans les parties membranaires résistantes aux détergents non ioniques, c'est-à-dire dans les "lipid rafts". Cette équipe propose que la palmitoylation de la sous-unité $\beta 4$ de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ favoriserait sa localisation dans les "lipid rafts" et serait indicatrice de son rôle dans la signalisation cellulaire. Par ailleurs Mariotti et al. (2001) ont montré que l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ coopère avec des récepteurs tyrosine kinase comme, par exemple, le récepteur de l'EGF. Dans certains cas, l'activation de ce récepteur provoque un changement de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ qui entraîne un détachement des cellules de leur support : cette perte d'ancrage favoriserait la mobilité et la prolifération cellulaire (Mariotti et al., 2001). Comme on sait que la déplétion en cholestérol membranaire provoque une activation de l'EGFR indépendante de tout ligand (Jans et al., 2004), il est possible que nos kératinocytes s'arrondissent suite à une signalisation intégrine-dépendante capable de provoquer ce remaniement du cytosquelette.

En conclusion, la perturbation de la structure des "lipid rafts" engendre des réponses de molécules de signalisation fort différentes. Certaines de ces protéines des "lipid rafts" se trouvent activées (EGFR, Fas) alors que d'autres sont inactivées (Rho GTPases) (fig 4-1). Cette variabilité des réponses engendrées illustre la complexité de la régulation au sein de ces microdomaines lipidiques dont l'importance dans la physiologie du kératinocyte épidermique semble dorénavant évidente.

BIBLIOGRAPHIE

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J., The cytoskeleton. In: *Molecular Biology of the Cell*, third edition (Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J., eds), pp. 787-861, Garland Publishing, New York (1994).
- Baron, G. S., Wehrly, K., Dorward, D. W., Chesebro, B. & Caughey, B. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes. *Embo J* **21**, 1031-40 (2002).
- 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).
- Bernerd, F., Magnaldo, T. & Darmon, M. Delayed onset of epidermal differentiation in psoriasis. *J Invest Dermatol* **98**, 902-10 (1992).
- 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., Kartenbeck, J., Kabsch, K., Mao, X., Marques, M. & Alonso, A. Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol. *J Cell Physiol* **192**, 234-43 (2002).
- 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).
- Cuenda, A. & Alessi, D. R. Use of kinase inhibitors to dissect signaling pathways. *Methods Mol Biol* **99**, 161-75 (2000).
- del Pozo, M. A., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Chiang, H. H., Anderson, R. G. & Schwartz, M. A. Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **303**, 839-42 (2004).
- Denning, M. F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1141-6 (2004).
- Deucher, A., Efimova, T. & Eckert, R. L. Calcium-dependent involucrin expression is inversely regulated by protein kinase C (PKC)alpha and PKCdelta. *J Biol Chem* **277**, 17032-40 (2002).
- Dlugosz, A. A. & Yuspa, S. H. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J Cell Biol* **120**, 217-25 (1993).
- Dlugosz, A. A. & Yuspa, S. H. Protein kinase C regulates keratinocyte transglutaminase (TGK) gene expression in cultured primary mouse epidermal keratinocytes induced to terminally differentiate by calcium. *J Invest Dermatol* **102**, 409-14 (1994).
- Downward, J., Waterfield, M. D. & Parker, P. J. Autophosphorylation and protein kinase C phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Effect on tyrosine kinase activity and ligand binding affinity. *J Biol Chem* **260**, 14538-46 (1985).
- Eckert, R. L. & Green, H. Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell* **46**, 583-9 (1986).
- Eckert, R. L. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* **69**, 1316-46 (1989).
- Eckert, R. L., Efimova, T., Balasubramanian, S., Crish, J. F., Bone, F. & Dashti, S. p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface--a function for p38 delta. *J Invest Dermatol* **120**, 823-8 (2003).
- Eckert, R. L., Efimova, T., Dashti, S. R., Balasubramanian, S., Deucher, A., Crish, J. F., Sturniolo, M. & Bone, F. Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads

- lead to mitogen-activated protein kinase. *J Invest Dermatol Symp Proc* **7**, 36-40 (2002).
- Eddidin, M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 257-83 (2003).
- Efimova, T., Broome, A. M. & Eckert, R. L. A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. *J Biol Chem* **278**, 34277-85 (2003).
- Efimova, T., Deucher, A., Kuroki, T., Ohba, M. & Eckert, R. L. Novel protein kinase C isoforms regulate human keratinocyte differentiation by activating a p38 delta mitogen-activated protein kinase cascade that targets CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* **277**, 31753-60 (2002).
- Efimova, T. & Eckert, R. L. Regulation of human involucrin promoter activity by novel protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* **275**, 1601-7 (2000).
- Efimova, T., LaCelle, P., Welter, J. F. & Eckert, R. L. Regulation of human involucrin promoter activity by a protein kinase C, Ras, MEKK1, MEK3, p38/RK, AP1 signal transduction pathway. *J Biol Chem* **273**, 24387-95 (1998).
- Fielding, C. J. & Fielding, P. E. Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochim Biophys Acta* **1610**, 219-28 (2003).
- Fisher, G. J., Talwar, H. S., Tavakkol, A., Esmann, J., Baldassare, J. J., Elder, J. T., Griffiths, C. E., Baadsgaard, O., Cooper, K. D. & Voorhees, J. J. Phosphoinositide-mediated signal transduction in normal and psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* **95**, 15S-17S (1990).
- Freinkel, R. K. Metabolism of the Skin. In: *The Biology of the Skin* (Freinkel, R. K. & Woodley, D.T., eds), pp 191-199, Parthenon Publishing, New York (2001).
- Gagnoux-Palacios, L., Dans, M., van't Hof, W., Mariotti, A., Pepe, A., Meneguzzi, G., Resh, M. D. & Giancotti, F. G. Compartmentalization of integrin alpha6beta4 signaling in lipid rafts. *J Cell Biol* **162**, 1189-96 (2003).
- Garmyn, M., Mammone, T., Pupe, A., Gan, D., Declercq, L. & Maes, D. Human keratinocytes respond to osmotic stress by p38 map kinase regulated induction of HSP70 and HSP27. *J Invest Dermatol* **117**, 1290-5 (2001).
- Gniadecki, R. & Bang, B. Flotillas of lipid rafts in transit amplifying cell-like keratinocytes. *J Invest Dermatol* **121**, 522-8 (2003).
- Gniadecki, R., Depletion of membrane cholesterol causes ligand-independent activation of Fas and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 165-169 (2004).
- Gomperts, B.D., Kramer, I.M. & Tatham, P.E. Phosphorylation and dephosphorylation: Protein kinases A and C. In: *Signal Transduction* (Gomperts, B.D., Kramer, I.M., Tatham, P.E., eds), pp 189-223, Elsevier Academic Press, London (2003).
- Guan, J. L. Cell biology. Integrins, rafts, Rac, and Rho. *Science* **303**, 773-4 (2004).
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. & Simons, K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* **141**, 929-42 (1998).
- Hildesheim, J., Awwad, R. T. & Fornace, A. J., Jr. p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitor protects the epidermis against the acute damaging effects of ultraviolet irradiation by blocking apoptosis and inflammatory responses. *J Invest Dermatol* **122**, 497-502 (2004).
- Jans, R., Atanasova, G., Jadot, M. & Poumay, Y. Cholesterol Depletion Upregulates Involucrin Expression in Epidermal Keratinocytes Through Activation of p38. *J Invest Dermatol* DOI: 10.1111/j.0022-202x.2004.23221.x online May 26, 2004

- Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C. & Rothblat, G. H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* **270**, 17250-6 (1995).
- Kobayashi, T., Kishimoto, J., Hattori, S., Wachi, H., Shinkai, H. & Burgeson, R. E. Matrix metalloproteinase 9 expression is coordinately modulated by the KRE-M9 and 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate responsive elements. *J Invest Dermatol* **122**, 278-85 (2004).
- Koch, G., Benz, C., Schmidt, G., Olenik, C. & Aktories, K. Role of Rho protein in lovastatin-induced breakdown of actin cytoskeleton. *J Pharmacol Exp Ther* **283**, 901-9 (1997).
- Kummer, J. L., Rao, P. K. & Heidenreich, K. A. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **272**, 20490-4 (1997).
- 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).
- Lampe, M. A., Williams, M. L. & Elias, P. M. Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J Lipid Res* **24**, 131-40 (1983).
- Le Panse, R., Coulomb, B., Mitev, V., Bouchard, B., Lebreton, C. & Dubertret, L. Differential modulation of human fibroblast and keratinocyte growth by the protein kinase C inhibitor GF 109203X. *Mol Pharmacol* **46**, 445-51 (1994).
- Long, R. A., Hruska, F., Gesser, H. D., Hsia, J. C. & Williams, R. Membrane condensing effect of cholesterol and the role of its hydroxyl group. *Biochem Biophys Res Commun* **41**, 321-7 (1970).
- Mackay, D. J. & Hall, A. Rho GTPases. *J Biol Chem* **273**, 20685-8 (1998).
- Mariotti, A., Kedeshian, P. A., Dans, M., Curatola, A. M., Gagnoux-Palacios, L. & Giancotti, F. G. EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin alpha6beta4 at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *J Cell Biol* **155**, 447-58 (2001).
- McMullan, R., Lax, S., Robertson, V. H., Radford, D. J., Broad, S., Watt, F. M., Rowles, A., Croft, D. R., Olson, M. F. & Hotchin, N. A. Keratinocyte differentiation is regulated by the Rho and ROCK signaling pathway. *Curr Biol* **13**, 2185-9 (2003).
- Mitev, V., Le Panse, R., Coulomb, B., Miteva, L. & Houdebine, L. M. Epidermal growth factor stimulates mitogen-activated protein kinase by a PKC-dependent pathway in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 245-52 (1995).
- 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).
- Munro, S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377-88 (2003).
- Nebreda, A. R. & Porras, A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* **25**, 257-60 (2000).
- Nishizuka, Y. & Nakamura, S. Lipid mediators and protein kinase C for intracellular signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* **22**, S202-3 (1995).
- Ono, K. & Han, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**, 1-13 (2000).
- O'Rourke, S. M. & Herskowitz, I. The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**, 2874-86 (1998).

- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T. C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T. & Ohno, S. A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC ϵ , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J Biol Chem* **265**, 22434-40 (1990).
- Owicki, J. C. & McConnell, H. M. Lateral diffusion in inhomogeneous membranes. Model membranes containing cholesterol. *Biophys J* **30**, 383-97 (1980).
- Papp, H., Czifra, G., Lazar, J., Gonczi, M., Csernoch, L., Kovacs, L. & Biro, T. Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* **12**, 811-24 (2003).
- Pitha, J., Irie, T., Sklar, P. B. & Nye, J. S. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci* **43**, 493-502 (1988).
- 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., Lavrijsen, S., Wijsman, M., Boonstra, J. & Vermeer, B. J. Calcium-mediated regulation of the low density lipoprotein receptor and intracellular cholesterol synthesis in human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol* **125**, 98-106 (1985).
- Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A. M., Ambrosino, C., Benito, M. & Nebreda, A. R. P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell* **15**, 922-33 (2004).
- 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).
- Poumay, Y., Leclercq-Smekens, M., Grailly, S., Degen, A. & Leloup, R. Specific internalization of basal membrane domains containing the integrin alpha 6 beta 4 in disperse-detached cultured human keratinocytes. *Eur J Cell Biol* **60**, 12-20 (1993).
- 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).
- 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).
- Ringerike, T., Blystad, F. D., Levy, F. O., Madshus, I. H. & Stang, E. Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae. *J Cell Sci* **115**, 1331-40 (2002).
- Robinson, M. J. & Cobb, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 180-6 (1997).
- Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A., Rebelo, I., Figueiredo, A., Quintanilha, A. & Teixeira, F. Dislipidemia and oxidative stress in mild and in severe psoriasis as a risk for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* **303**, 33-9 (2001).
- 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).
- Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25 (2000).
- Schmidt, R., Parish, E. J., Dionisius, V., Cathelineau, C., Michel, S., Shroot, B., Rolland, A., Brzokewicz, A. & Reichert, U. Modulation of cellular cholesterol and its effect on cornified envelope formation in cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **97**, 771-5 (1991).
- Schroeder, R., London, E. & Brown, D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored

- proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12130-4 (1994).
- Simons, K. & Ehehalt, R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* **110**, 597-603 (2002).
- Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-72 (1997).
- Simons, K. & Ikonen, E. How cells handle cholesterol. *Science* **290**, 1721-6 (2000).
- Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-9 (2000).
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G. & Simons, K. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6460-4 (1998).
- Steck, T. L., Ye, J. & Lange, Y. Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin. *Biophys J* **83**, 2118-25 (2002).
- Takenobu, H., Yamazaki, A., Hirata, M., Umata, T. & Mekada, E. The stress- and inflammatory cytokine-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is mediated by p38 MAPK, distinct from the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and lysophosphatidic acid-induced signaling cascades. *J Biol Chem* **278**, 17255-62 (2003).
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F. & et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**, 15771-81 (1991).
- Wertz, P.W. & Michniak, B.B. Epidermal Lipid Metabolism and Barrier Function of Stratum Corneum. In: *Biochemical Modulation of Skin Reactions* (Kydonieus, A.F., Wille, J. J., eds), pp. 35-44, CRC Press, London (2000).
- Zheng, Y. H., Plemenitas, A., Fielding, C. J. & Peterlin, B. M. Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8460-5 (2003).
- Zwick, E., Hackel, P. O., Prenzel, N. & Ullrich, A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 408-12 (1999).