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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Expression et activation de HSP27 comme indicateur de la réponse des kératinocytes épidermiques face à un stress irritant

Messinne, Ariane

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.

Download date: 02. May. 2026

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

16 JUIN 2004

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

EXPRESSION ET ACTIVATION DE HSP27 COMME INDICATEUR DE LA RÉPONSE DES KÉRATINOCYTES ÉPIDERMIQUES FACE À UN STRESS IRRITANT

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Ariane MESSINNE
Juin 2004

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

EXPRESSION ET ACTIVATION DE HSP27 COMME INDICATEUR DE LA RÉPONSE DES KÉRATINOCYTES ÉPIDERMIQUES FACE À UN STRESS IRRITANT

MESSINNE Ariane

Résumé

La peau est quotidiennement exposée à un grand nombre de substances irritantes responsables de la plupart des inflammations cutanées. Il est donc important de disposer de tests qui prédisent ces irritations. Les tests actuels se font sur des animaux vivants. Dans l'optique de la mise au point d'un modèle de peau *in vitro* pour remplacer ces tests *in vivo*, nous avons tenté de déterminer si l'expression et l'activation par phosphorylation de la protéine de stress HSP27 sont corrélées à la réponse des kératinocytes épidermiques *in vitro* vis-à-vis d'un irritant. Dans des cultures de kératinocytes épidermiques en immersion, l'expression et la phosphorylation de HSP27 augmentent avec la différenciation. Le choc thermique induit une augmentation de l'expression des transcrits et de l'expression protéique de HSP27 ainsi que sa relocalisation nucléaire et périnucléaire. Le traitement par l'ester de phorbol TPA, un inducteur de la différenciation épidermique, induit la phosphorylation de HSP27 et sa relocalisation nucléaire. Ces données suggèrent un rôle important de HSP27 dans les kératinocytes normaux et dans leur réponse au stress. Nous avons traité les kératinocytes avec des concentrations sub-toxiques d'un irritant cutané, le chlorure de benzalkonium (CB) pour détecter un éventuel changement de HSP27 au niveau moléculaire. Aux concentrations sub-toxiques, le CB ne modifie ni l'expression ni la phosphorylation de HSP27. Par contre, des concentrations cytotoxiques en CB peuvent induire une phosphorylation de HSP27. Nos résultats et ceux de la littérature (obtenus sur des kératinocyte cultivés en monocouche et des modèles d'épiderme reconstitué *in vitro*) suggèrent que l'expression et la relocalisation de HSP27 constituent un marqueur potentiel du phénomène d'irritation cutanée.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

Promoteur: Y. Poumay

Remerciements

Ces quelques mois passés au département d'Histologie-Embryologie m'ont apporté une expérience plus qu'enrichissante en terme de recherche scientifique au sein d'une équipe.

Je remercie mon promoteur, le professeur Yves Poumay pour son accueil, pour l'encadrement, pour la disponibilité ainsi que pour les encouragements et la confiance qu'il m'apporté.

Je remercie mon co-promoteur, le Professeur Michel Hérin pour la supervision qu'il a apporté, pour ses réflexions pertinentes et ses judicieux conseils.

Merci aussi à,

Françoise Herphelin pour l'aspect pratique de mon mémoire qu'elle a rendu très agréable par sa bonne humeur, sa patience et son soutien.
Frédérique Dupont pour son amabilité et sa gentillesse.
Ganka Atanasova pour ses nombreux coups de main, pour sa douceur et pour son sourire.
Ralph Jans pour les réponses aux nombreuses questions et pour sa sympathie.
Daniel Van Vlaender et Raphael Déom pour leur aide thechnique et leur chaleureuse compagnie.

Un merci tout particulier à ma collègue et co-koteuse Conny Mathay pour sa coopération, sa générosité et son amitié des plus agréables.

Merci aussi à tous les autres membres du département pour l'ambiance et l'accueil très plaisants.

Je remercie ma mère pour son soutien, sa compassion et son aide ainsi que ma sœur et mon fiancé.

Je dédie ce mémoire à Jean-Pierre Messinne, mon papa.

TABLE DES MATIERES

1 INTRODUCTION 4

1.1 La peau 5
1.1.1 Généralités 5
1.1.1.1 Interface intérieur-extérieur 5
1.1.1.2 Caractéristiques et fonctions 5
1.1.1.3 Constitution en trois parties : épiderme, derme et hypoderme 6
1.1.2 L'épiderme 6
1.1.2.1 Caractéristiques et clasification 6
1.1.2.2 Les 4 différentes couches de l'épiderme 7
1.1.2.3 Autres types cellulaires présents au niveau de l'épiderme 9
1.1.2.4 Les filaments intermédiaires 9
1.1.2.5 Différenciation et prolifération 10

1.2 Irritation cutanée 11
1.2.1 Introduction 11
1.2.2 Les méthodes alternatives 12
1.2.3 Caractérisation de la réponse cellulaire suite à une irritation 13
1.2.4 Plusieurs modèles établis 13
1.2.4.1 La culture de kératinocytes en immersion 14
1.2.4.2 La culture d'épidermes humains reconstitués 14
1.2.5 Identification de marqueurs d'irritation 15
1.2.6 Marqueur potentiel d'irritation 16

1.3 Les HSP 16
1.3.1 Découverte 16
1.3.2 Classification 17
1.3.3 Thermotolérance 17
1.3.4 Fonctions 17

1.4 La HSP27 18
1.4.1 sHSP 18
1.4.2 Différenciation et prolifération 18
1.4.3 Activation 19
1.4.3.1 Phosphorylation 19
1.4.3.2 Relocalisation 20
1.4.3.3 Oligomérisation 20
1.4.4 Transduction du signal 20

1.5 Objectif 21

2 MATERIEL ET METHODES 22

2.1 Culture cellulaire 23
2.1.1 Culture des kératinocytes épidermiques humains 23
2.1.2 Culture des MCF-7 25

2.2 Test de viabilité cellulaire : Test MTT 26

2.3 Analyse des protéines 26
2.3.1 Western Blot 26
2.3.2 Localisation protéique intracellulaire par immunofluorescence 28

2.4 Analyse des ARN messager (Poly-A) 29
2.4.1 Extraction des ARNm 29
2.4.2 Northern blot 31
2.4.2.1 Northern Blot proprement dit 31
2.4.2.2 Révélations des Northern blots : hybridation des membranes par de sondes ADN marquées au ^{32}P 32

2.5 RT-PCR de HSP 27 34

3 RESULTATS 36

3.1 Caractérisation de l'expression et de l'activation de HSP27 dans notre modèle de culture de kératinocytes épidermiques humains en immersion 37
3.1.1 Analyse de l'expression et de l'activation de HSP27 en fonction de la différenciation des kératinocytes épidermiques humains 37
3.1.1.1 Caractérisation de la différenciation 37
3.1.1.2 Expression des ARNm codant pour HSP27 en fonction de la différenciation 38
3.1.1.3 Expression protéique et modification post-traductionnelle de HSP27 en fonction de la différenciation 39
3.1.2 Analyse de l'expression et de l'activation de HSP27 par les kératinocytes épidermiques humains en condition de stress 40
3.1.2.1 Observation morphologique en microscopie à contraste de phase 41
3.1.2.2 Expression des ARNm codant pour HSP27 en réponse à un choc thermique 41
3.1.2.3 Expression protéique et modification post-traductionnelle de HSP27 en réponse à un choc thermique 42
3.1.3 Analyse de l'expression et de l'activation de HSP27 par les kératinocytes épidermiques humains en réponse à un traitement par le TPA 42
3.1.3.1 Observation morphologique en microscopie à contraste de phase 43
3.1.3.2 Expression des ARNm codant pour HSP27 en réponse à un traitement au TPA 43
3.1.3.3 Expression protéique et modification post-traductionnelle de HSP27 en réponse à un traitement au TPA 43
3.1.4 Localisation intracellulaire de HSP27 dans les kératinocytes en réponse à un traitement au TPA et à un choc thermique 44
3.1.5 Synthèse des observations 45

3.2 Etude de l'expression et de l'activation de HSP27 dans les kératinocytes épidermiques humains en immersion en réponse à un traitement par le chlorure de benzalkonium 46
3.2.1 Etude de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration en chlorure de benzalkonium : détermination des concentrations à utiliser 47
3.2.2 Analyse de l'expression et de l'activation de HSP27 par les kératinocytes épidermiques humains en réponse à un traitement par le chlorure de benzalkonium 48
3.2.2.1 Observation morphologique en microscopie à contraste de phase 48

3.2.2.2 Expression des ARNm codant pour HSP27 en réponse à un traitement par le chlorure de benzalkonium 48
3.2.2.3 Expression protéique et modification post-traductionnelle de HSP27 en réponse à un traitement au chlorure de benzalkonium 48

4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES 50

5 BIBLIOGRAPHIE 56

1. INTRODUCTION

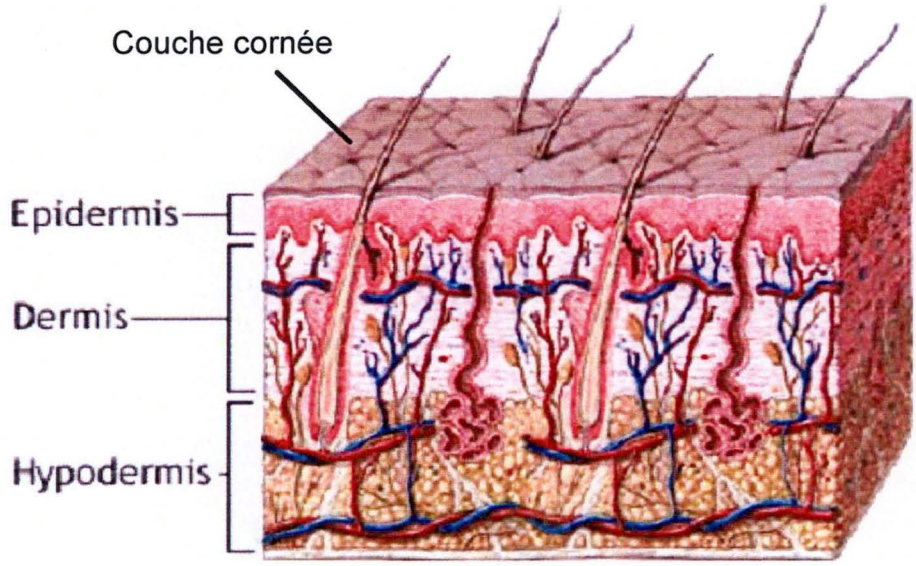


Figure I.1 : Schéma d'une coupe de peau (A.D.A.M. medical illustration team)

1.1 LA PEAU

1.1.1 Généralités

1.1.1.1 Interface intérieur-extérieur

La peau ainsi que les muqueuses digestive, respiratoire et uro-génitale sont les tissus épithéliaux du corps chargés de recouvrir et d'isoler du milieu extérieur les structures internes de l'organisme. Ces surfaces épithéliales, faisant interface entre l'organisme et son environnement, remplissent donc un rôle de barrière essentiel. Au contraire des autres interfaces baignant dans un liquide sur leur surface extérieure, la peau est, sur sa face externe, en contact d'un milieu hostile, non-aqueux. Elle empêche les pertes d'eau et de substances vitales depuis le milieu intérieur et protège contre le passage de substances étrangères depuis le milieu extérieur. Pour assurer ce rôle, une barrière imperméable efficace et spécifique est formée en surface. Il s'agit de la couche cornée. (*Figure I.1*).

1.1.1.2 Caractéristiques et fonctions

La peau recouvre le corps d'un adulte moyen sur une surface de 1,5 à 2,0 m^2, a une épaisseur variant de 1,5 à 4 mm et pèse environ 2 kg. Dans son ensemble, la peau est l'organe le plus étendu et le plus volumineux du corps puisqu'elle représente environ 8% de la masse corporelle. Elle se compose de trois tissus différents de l'extérieur vers l'intérieur de l'organisme : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (*Figure I.1*).

La peau est un organe complexe auquel, on reconnaît plusieurs fonctions cruciales à côté de son rôle de barrière évident :

- **Protection :** C'est une barrière contre les agents traumatisants du milieu extérieur, qu'ils soient d'origine chimique, thermique, mécanique, microbienne, radiative… Mais elle empêche également, la perte des liquides corporels.
- **Thermorégulation :** La peau est une interface intérieur-extérieur par laquelle l'organisme régule sa température interne. Le tissu adipeux de l'hypoderme et l'organisation de la vasculature cutanée contrôlent les échanges thermiques. La présence des glandes sudoripares intervient également dans le contrôle de ces échanges.
- **Sensation :** on retrouve au niveau de la peau, des réseaux de neurorécepteurs (mécanorécepteurs, thermorécepteurs, nocicepteurs) ainsi que des terminaisons nerveuses libres ou encapsulées.
- **Métabolisme :** La synthèse de la vitamine D s'effectue au sein de l'épiderme par photoréaction en présence de rayons ultraviolets pour compléter l'apport alimentaire. Des réserves énergétiques importantes sous forme de triglycérides se trouvent dans les tissus adipeux de l'hypoderme.

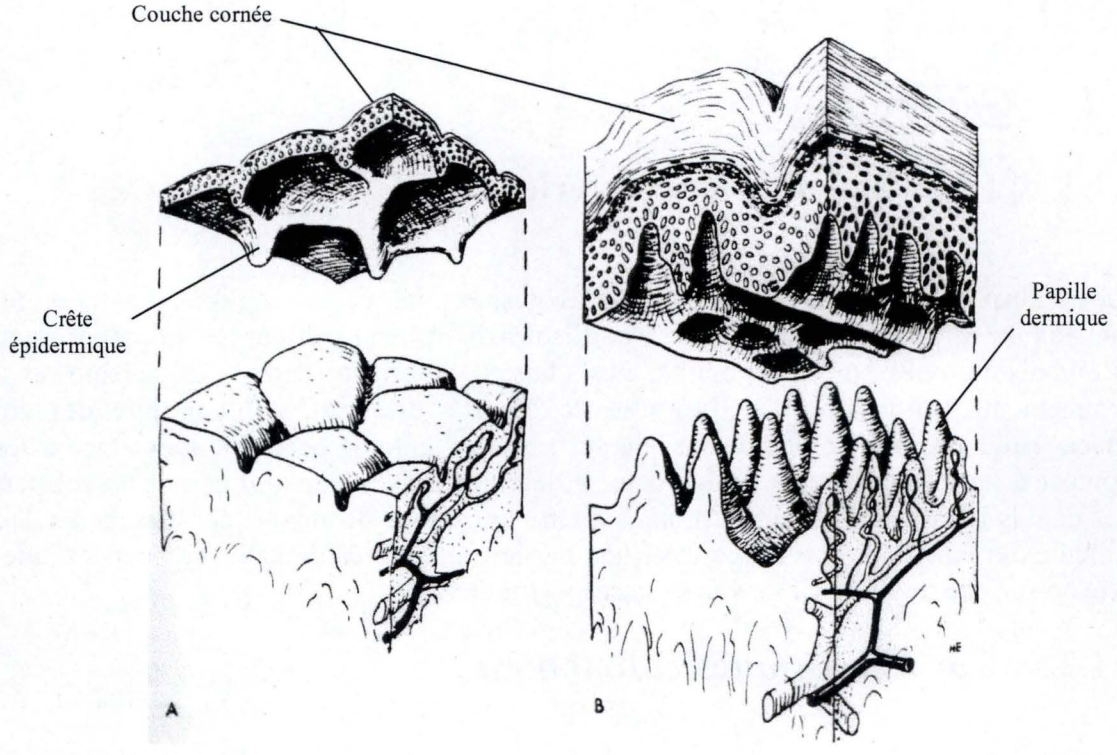


Figure I.2 : Schéma tridimensionnel de la peau. L'épiderme repose sur le derme et est nourri par ce dernier. La surface de contact entre ces 2 tissus est augmentée par la présence des papilles dermiques et des crêtes épidermiques.
On distingue 2 types d'épiderme différant par l'épaisseur de leur couche cornée. L'épiderme de type A (**B**), le plus épais, se retrouve au niveau de la plante des pieds et sur la paume des mains, tandis que l'épiderme de type B (**A**), plus fin, se retrouve sur le reste du corps (Histology and human microanatomy, Elias-Pauly-Burns, Piccin medical books, quatrième edition, 1978).

Le rôle important de cette barrière biologique joué par la peau peut être illustré par les graves inconvénients que subissent les grands brûlés ayant perdu de grandes surfaces de peau : une déshydratation sévère, un déséquilibre des électrolytes et pertes des sensations au niveau des régions atteintes. De plus, les agents chimiques et les microbes ne sont plus retenus et ont accès aux tissus sous-jacents, pouvant ainsi causer des infections et des complications toxiques.

1.1.1.3 Constitution en trois parties : épiderme, derme et hypoderme

L'**épiderme** est un tissu principalement épithélial stratifié et kératinisé. Le type cellulaire largement dominant (95%) retrouvé dans l'épiderme est le kératinocyte qui est une cellule d'origine ectodermique dont le nom dérive des filaments de kératine contenus dans ces cellules. Cet épithélium est séparé du derme sous-jacent par une lame basale ayant un rôle de soutien et d'adhésion. L'épiderme, dépourvu de réseau capillaire, est nourri par diffusion à partir du réseau vasculaire dermique (*figure I.1*).

Le **derme** est un tissu conjonctif sur lequel repose l'épiderme. Il est constitué de fibroblastes, de fibres élastiques et collagènes (pour la souplesse et la résistance), de substance fondamentale (pour une résistance face à des forces de compression), de vaisseaux sanguins et de nerfs et terminaisons nerveuses. On y retrouve également des annexes cutanées telles que les poils, les ongles, les glandes sébacées et sudoripares (*figure I.1*).

La surface de contact entre ces deux tissus est augmentée par la présence d'une limite festonnée. Des sillons dermiques plongent dans l'épiderme, on les nomme papilles dermiques. D'autres sillons, partant cette fois de l'épiderme vers le derme, sont appelés crêtes épidermiques (*FigureI.2*). Ainsi, on note une vascularisation importante au niveau des papilles dermiques.

Sous le derme, se trouve l'**hypoderme** qui est en grande partie constitué de lobules adipeux. Il contient également des vaisseaux sanguins et des nerfs. Il agit comme un isolant thermique, comme réserve énergétique et absorbe les chocs mécaniques (*figure I.1*).

Notre étude porte sur la partie la plus externe de la peau : l'épiderme.

1.1.2 L'épiderme

1.1.2.1 Caractéristiques et clasification

Il s'agit d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. Son épaisseur varie de 75 à 150 µm pour la majorité de l'épiderme recouvrant le corps, on parle d'épiderme de type B. Au niveau de la plante des pieds et de la paume des mains, il peut atteindre 600 à 700 µm, on parle d'épiderme de type A (*figure I.2*).

L'épiderme peut être classifié de manière morphologique : il est constitué de **4 couches**. En partant de la lame basale adhérente au derme vers la périphérie, on distingue: la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (*Figure I.3*).

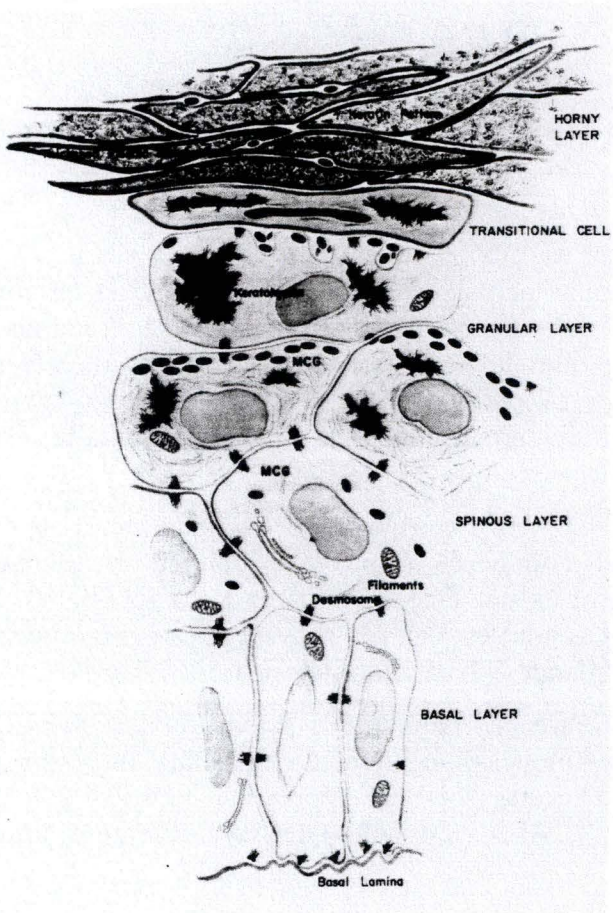


Figure I.3 : Les quatre couches de l'épiderme. Les cellules basales à activité mitotique élevée reposent sur la lame basale. Au cours de la progression des kératinocytes dans les couches suprabasales suite à l'enclenchement de leur différenciation, le cytoplasme des cellules augmente de volume et ensuite s'aplatit. Au niveau de la couche épineuse, les cellules sont ancrées les unes aux autres par de nombreux desmosomes. Les grains de keratohyaline apparaissent et les cellules forment la couche granuleuse. Pour finir les kératinocytes perdent leurs organites, se remplissent de filaments intermédiaires de kératine et forment ainsi la couche cornée (Montagna, W.,and Parakal, P.F. 1974. The structure and function of skin, New York : academic press)

Les kératinocytes migrent depuis la couche basale, lieu de prolifération, vers la surface où ils forment la couche cornée. En passant par les différentes couches, ils leur donnent leur aspect caractéristique en subissant plusieurs changements biochimiques et structuraux. Chaque couche cellulaire est caractérisée par la morphologie et la composition biochimique, autrement dit l'état de différenciation des cellules qui la composent. Arrivés au niveau de la couche cornée, au terme de leur différenciation, les kératinocytes morts desquament. Il faut environ 12 à 14 jours aux kératinocytes pour atteindre la surface de la peau depuis la couche basale.

Le processus irréversible de différenciation qu'entament les kératinocytes quittant la couche basale, est appelé différenciation terminale. Selon ces mécanismes, on peut classifier l'épiderme en **2 compartiments** : d'une part la section basale, lieu de la prolifération et de l'ancrage au derme et d'autre part la section suprabasale où se déroule la différenciation.

1.1.2.2 Les 4 différentes couches de l'épiderme

1.1.2.2.1 La couche basale ou « stratum basale »

La couche basale (*figure I.3, I.4*) repose sur la lame basale et est le siège de la prolifération. Afin de maintenir une épaisseur épidermique constante, les cellules de la couche cornée desquament pour laisser la place à la poussée de cellules sous-jacentes migrant depuis la couche basale. Ainsi les cellules de l'épiderme sont renouvelées de manière continue. Il faut environ un mois pour renouveler le tissu épidermique.

Cette couche basale est composée de kératinocytes cylindriques à rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Les kératinocytes de cette couche adhèrent à la lame basale via des **hémidesmosomes** et entre eux via des **desmosomes** (*figure I.4*). Malgré une homogénéité morphologique des cellules au sein de cette couche, trois types cellulaires distincts peuvent être identifiés. Les **cellules souches** ont un potentiel de prolifération lent et illimité. Ces dernières engendrent des **cellules amplificatrices transitoires** qui au contraire prolifèrent rapidement mais de façon limitée. Elles engendrent à leur tour des **cellules filles post-mitotiques** non prolifératives. Celles-ci entament la différenciation terminale suite à la perte de leur ancrage basal et progressent dans les couches suprabasales de l'épiderme (Hall & Watt 1989). Les différents types cellulaires peuvent être identifiés par un taux d'expression de molécules d'adhésion, telles que les intégrines de type β1. Ce taux décroît depuis les cellules souches jusqu'aux cellules en différenciation (Jones *et al.*, 1995).

1.1.2.2.2 La couche épineuse ou stratum spinosum

Cette couche est épaisse d'environ 3 à 4 kératinocytes (*figure I.3, I.4*). Les kératinocytes y sont de forme polyédrique et présentent de nombreuses indentations cytoplasmiques semblables à des épines en microscopie à balayage. La surface de contact intercellulaire est de ce fait importante. Les cellules adhèrent entre elles par la présence de nombreux **desmosomes** (*figure I.4*). Dans les parties supérieures de cette couche épineuse les kératinocytes s'aplatissent et on voit apparaître des corpuscules lamellaires au niveau de leur cytoplasme, les **corps d'Odland**. Ces petits organites sécrétoires proviennent de l'appareil de Golgi et contiennent des glycolipides et phospholipides, ainsi que des enzymes de nature lysosomale.

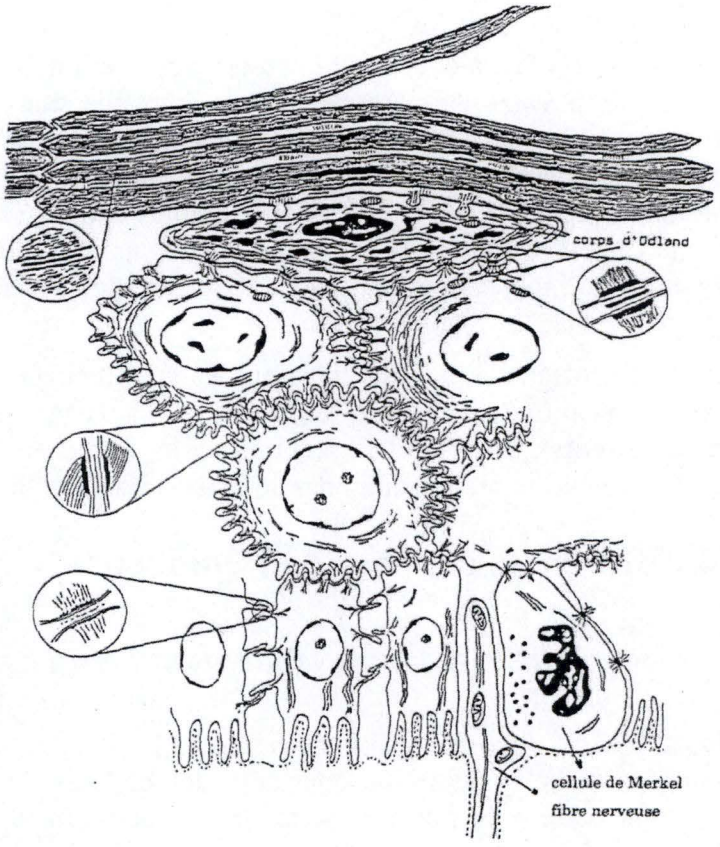


Figure I.4. : Schématisation de la différenciation des kératinocytes et de l'évolution des desmosomes qui les lient entre eux ainsi qu'aux cellules de Merkel.

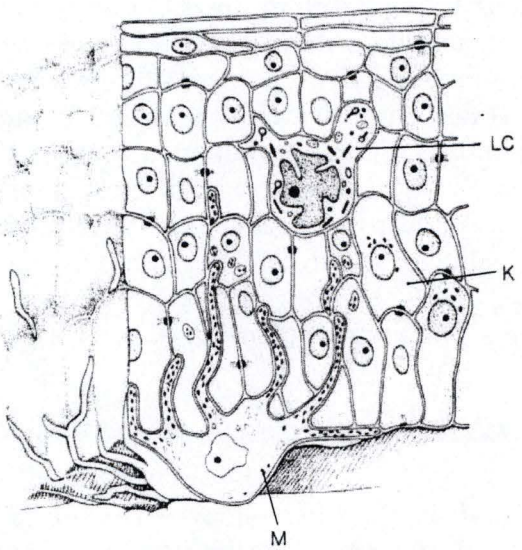


Figure I.5 : Schéma de l'épiderme montrant un mélanocyte (**M**), situé au niveau basal projetant des indentations de cytoplasme dans lesquelles se retrouvent des mélanosomes. Dans les couches un peu supérieures, on retrouve des cellules de Langerhans (**LC**). Ce sont cependant les kératinocytes (**K**) qui représentent le type cellulaire majoritaire de l'épiderme (Jimbow K., Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B. and Szabo, G. 1976, J. invest. Derm. 67:72: courtesy of W.C. Quevedo).

1.1.2.2.3 La couche granuleuse ou stratum granulosum

Il s'agit de la dernière couche nucléée de l'épiderme (*figure I.3, I.4*). Elle est épaisse de 2 à 3 kératinocytes qui s'aplatissent. Le cytoplasme des cellules contient de nombreux granules : **grains de kératohyaline** et **corps d'Odland**. Les grains de kératohyaline sont des agrégats de protéines insolubles. Ces grains contiennent la profilaggrine qui est un précurseur de la filaggrine, une protéine basique constituée de nombreuses histidines et impliquée dans le processus de kératinisation de la couche cornée. Le contenu des corps d'Odland commence à être déversé dans l'espace intercellulaire et initie la formation d'une barrière kératinisée unique à la peau. Des jonctions étanches ferment les espaces intercellulaires (*figure I.4*).

1.1.2.2.4 La couche cornée ou stratum corneum

La couche cornée (*figure I.3, I.4*) est la couche fonctionnelle de l'épiderme : elle joue le rôle de protection, de barrière. Elle se compose de 15 à 25 cellules entassées sur la plupart du corps sauf sur les faces palmaires et plantaires où elle est plus épaisse. Elle est constituée de cellules aplaties dépourvues des habituels organites cellulaires. C'est la couche « morte » de la peau. Cependant certaines activités enzymatiques critiques persistent et des changements biochimiques surviennent entre la partie plus interne et la plus externe de la couche cornée.

En passant de la couche granuleuse à la couche cornée, un programme de mort cellulaire que l'on distingue de l'apoptose se met en route. Plusieurs événements se déclenchent et concourent à la formation de cette barrière :

- Le noyau se pycnose et ensuite se lyse.
- Les grains de kératohyaline se dissolvent dans le cytoplasme. La filaggrine provoque l'agrégation en réseaux denses des filaments intermédiaires de kératine ou tonofilaments. Ceci se fait par l'intermédiaire de ponts disulfure qui empêcheront la destruction des filaments intermédiaires de kératine agrégés lors de la mort cellulaire (Fuchs, 1993). 80% des protéines du cornéocyte sont des kératines de haut poids moléculaire.
- L'espace cytoplasmique se réduit. Il y a épaississement de nature protéique de la face cytoplasmique de la membrane cellulaire afin de former l'enveloppe cornée. Parmi ces protéines on retrouve l'involucrine riche en cystéines et la loricrine. La membrane étant plus perméable suite à la mort cellulaire, un flux de calcium entre dans la cellule et active la transglutaminase épidermique. Cette dernière catalyse la formation de liens isopeptidiques entre les protéines de l'enveloppe. (Rice et Green, 1979 ; Thacher et Rice, 1985)
- L'espace intercellulaire s'élargit et se remplit du contenu lipidique originaire de l'exocytose des corps d'Odland. Ces lipides sont organisés en plusieurs bicouches conférant ainsi une imperméabilité.

La différenciation des kératinocytes est, à ce stade, terminée. Au cours de leur migration au travers de la couche cornée les kératinocytes perdent leur ancrage, les uns aux autres (*figure I.4*), par dégradation protéolytique. Ainsi, arrivés à la surface de l'épiderme, les kératinocytes non attachés desquament. Cette desquamation est facilitée par l'activation d'enzymes lysosomales libérées par les corps d'Odland suite à une diminution du pH aux environs de 5 en surface de l'épiderme (Holbrook, 1994).

Type de kératine	Nature	Point isoélectrique
I	Acide	< 5,5
II	basique	> 6,5

Tableau I.I : classification des kératines selon Moll (Moll et al., 1992)

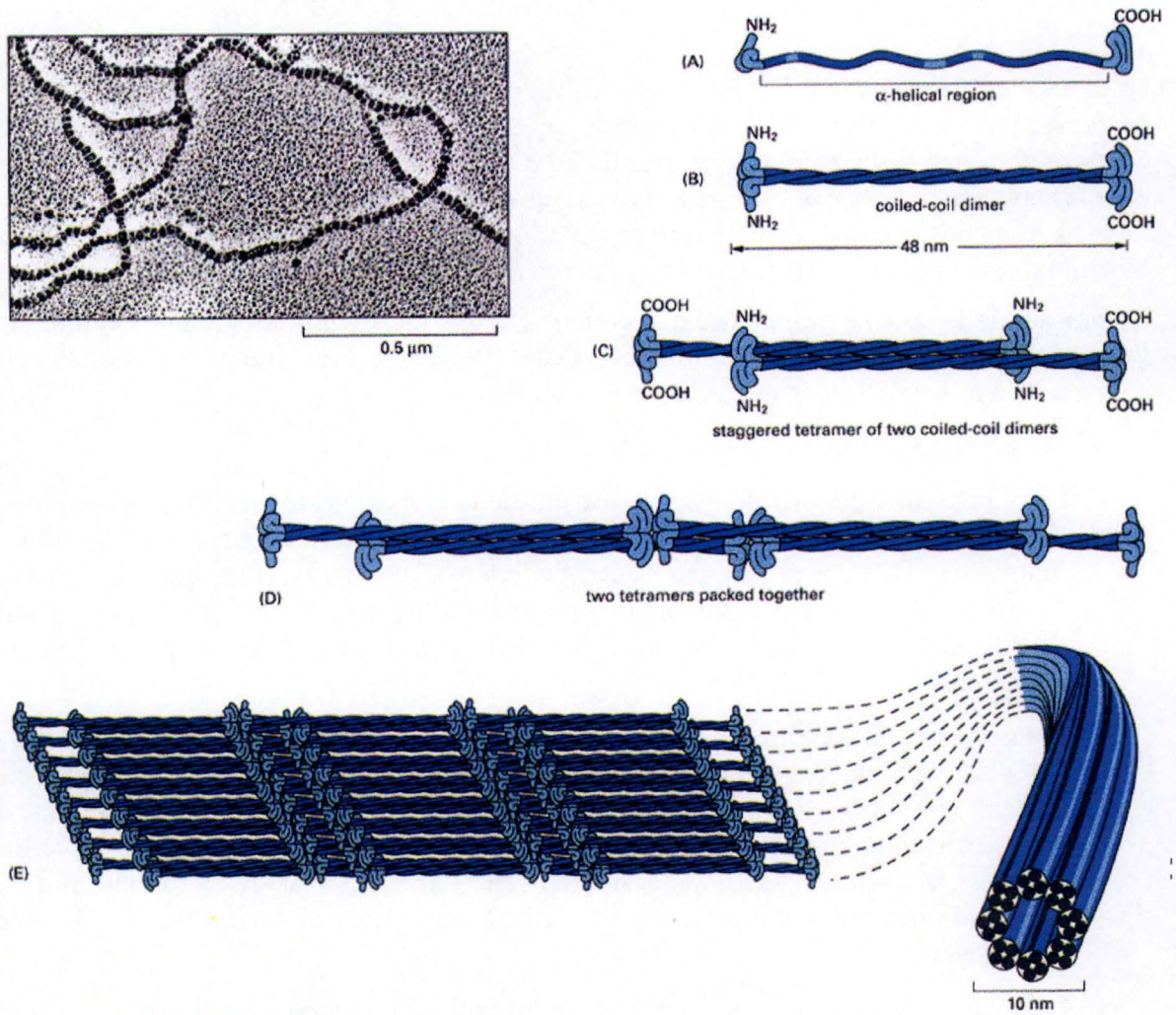


Figure I.6 : Schématisation de la formation des filaments intermédiaires ou tonofilaments. Les monomères de kératine présentent un domaine central hélicoïdal retrouvé dans tous les filaments intermédiaires et des extrémités qui diffèrent en fonction du type de kératine (**A**). Deux monomères s'assemblent et forment un dimère (**B**) le dimères s'assemblent pour former un tétramère appelé protofilament (**C**). Les protofilaments s'assemblent (**D**) et huit protofilaments forment un tonofilament (**E**) (Molecular biology of the cell, 3ème édition, B., Alberts, D., Bray, J., Lewis, M., Raff, K., Roberts, J. D., Watson, 1994)

Au niveau de la couche cornée, on peut faire la différence entre les épidermes de type A et de type B. Si la desquamation est rapide, la couche cornée est fine, il s'agit d'un épiderme de type B. Par contre si la desquamation est plus lente, les cornéocytes s'accumulent et la couche cornée est épaisse, il s'agit d'un épiderme de type A (*figure I.2*).

1.1.2.3 Autres types cellulaires présents au niveau de l'épiderme

A coté des kératinocytes, représentant 80 à 90% des cellules de l'épiderme, on retrouve trois autres types cellulaires : (*Figure I.4, I.5*)

- **Les mélanocytes** : Ces cellules ont pour origine embryologique, les crêtes neurales. Les mélanocytes prennent assise au niveau de la couche basale (figure I.5). Ils émettent plusieurs expansions cytoplasmiques s'étendant entre les kératinocytes. Les UV ont une action directe sur ces cellules et permettent la synthèse de mélanine. Ce pigment qui a la propriété d'absorber les UV est stocké dans des organites spécialisés, les mélanosomes. Après, les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes où la mélanine assure son rôle de protection contre les UV.
- **Les cellules de Langerhans** : Ces cellules originaires de la moelle osseuse se retrouvent parmi les kératinocytes des couches suprabasales (figure I.5). Ce sont des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes qui jouent un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire cellulaire via la stimulation des lymphocytes T. Elles capturent les antigènes et ensuite migrent vers les régions T-dépendantes des organes lymphoïdes.
- **Les cellules de Merkel :** Elles sont présentes au niveau de la couche basale (*figure I.4*). Ces cellules sont au contact de terminaisons nerveuses venant du derme. Ce sont des récepteurs sensoriels.

1.1.2.4 Les filaments intermédiaires

Les kératines sont nombreuses au sein du kératinocyte. Ces protéines représentent jusqu'à deux tiers du poids sec total de la cellule. Les kératinocytes assurent leur rôle de protection en partie grâce aux filaments intermédiaires de kératine appelés aussi tonofilaments impliqués dans la structure du cytosquelette. Les tonofilaments participent à la structure des contacts intercellulaires. Les kératines sont des protéines fibreuses à hélice alpha, insolubles dans l'eau. Leur taille varie de 40 à 70 kDa. Plus de 30 kératines humaines différentes ont été identifiées. On distingue 2 familles qui ont été classifiées par Moll (Moll et al., 1982) (*tableau I.I*). On distingue les kératines de type I qui sont des protéines acides (point isoélectrique <5.5) et les kératines de type II qui sont basiques (point isoélectrique >6.5).

Les filaments intermédiaires se forment seulement si les proportions de kératines basiques et acides sont les mêmes. La plupart des kératines forment des dimères de manière préférentielle couplant deux sortes de kératines, une basique et une acide. Les partenaires d'un dimère sont exprimées de façon conjointe par la cellule (Watt, 1989). L'expression des différents couples de kératines est caractéristique de l'état de différenciation et de la santé du tissu (Moll et al., 1982) comme c'est le cas pour l'épiderme. Dans l'épiderme on retrouve principalement 4 types de kératines (K) : 50 et 56, 5 kDa pour le type acide ainsi que 58 et 65-67 kDA pour le type basique autrement dit respectivement K14, K10, K5 et K1.

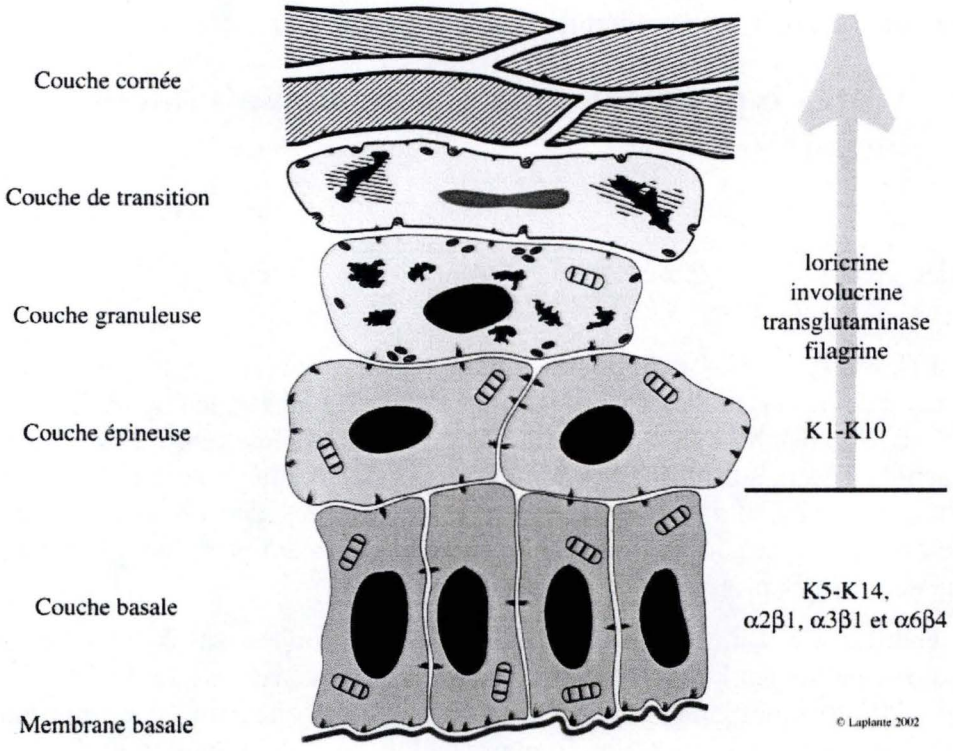


Figure I.7 : Caractérisation du phénotype des kératinocytes épidermiques par analyse du profil d'expression protéique de certains marqueurs caractéristiques des diverses couches de l'épiderme (Laplante, thèse de doctorat, 2002).

Facteurs modulateurs de la prolifération	**Facteurs modulateurs de la différenciation**
Insulin-like growth factors (IGF)	Acide rétinoïque
Epidermal growth factor (EGF)	12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA)
Transforming growth factor α (TGF-α)	densité cellulaire confluente
Amphiréguline	
TGF-β1 et TGF-β2	
Kératinocyte growth factor (KGF ou FGF-7)	
Interferon γ (IFN- γ)	
Calcium	
densité cellulaire confluente	

Tableau I.II : Facteurs modulateurs de la différenciation et de la prolifération des kératinocytes épidermiques.

La composition des filaments intermédiaires est présentée à la *figure I.6*. Les sous-unités de kératines formées de 300 acides aminés possèdent un domaine central hélicoïdal retrouvé dans tous les filaments intermédiaires. Par contre, les extrémités carboxy- et amino-terminales diffèrent au niveau de la séquence et de la conformation en fonction du type de kératine formant le dimère (*figure I.6 A*). Deux monomères s'assemblent en dimère (*figure I.6 B*) et une paire de dimères forme la sous-unité de base du filament intermédiaire, le protofilament qui a un diamètre de 3 nm (*figure I.6 C*). Huit protofilaments s'assemblent et on obtient un filament intermédiaire ayant un diamètre de 10 nm (*figure I.6 D et E*).

1.1.2.5 Différenciation et prolifération

1.1.2.5.1 Les marqueurs de prolifération et de différenciation

Les différentes couches de l'épiderme sont caractérisées entre autres par la modification du profil d'expression protéique. Ce paramètre peut être utilisé pour caractériser le phénotype cellulaire des kératinocytes en culture (*figure I.7*).

Au niveau de la **couche basale**, l'expression du couple **K5** (58 kDa, basique) et **K14** (50 kDa, acide) prédomine. Les **couches épineuses et granuleuses** sont caractérisées par la production de **K1** (67 kDa, basique) et **K10** (56,5kDa, acide).

L'**involucrine** est exprimée dans la **couche épineuse supérieure et la couche granuleuse**. La **loricrine** et la **filaggrine** ne sont synthétisées que dans la **couche granuleuse**.

1.1.2.5.2 Facteurs régulateurs de la prolifération et de la différenciation

On connaît plusieurs facteurs capables de moduler la **prolifération** des kératinocytes (*Tableau I.II*). La famille des « insulin-like growth factor » (IGF) agit sur des récepteurs situés sur les cellules basales (Krane et al., 1991). Le « Epidermal growth factor » (EGF)(Chen et al., 1993), le « transforming growth factor α» (TGF-α) (Barrandon & Green, 1987) et l'Amphiréguline (Piepkorn et al., 1994) agissent tous les trois au niveau du récepteur de l'EGF.

D'autres facteurs modulent la **différenciation** (*Tableau I.II*). L'acide rétinoïque : inhibe la différenciation des kératinocytes *in vitro* mais augmente l'épaisseur de la couche granuleuse de l'épiderme in vivo (Rosenthal et al., 1992). Cependant Poumay et al. (1999) ont montré que les kératinocytes traités par l'acide rétinoïque à densité confluente expriment davantage l'involucrine alors que l'expression de la K10 est réduite. La densité cellulaire confluente induit la différenciation terminale des kératinocytes qui perdent leur phénotype prolifératif et leur clonogénicité (Wille et al., 1984) et expriment alors le couple de kératine K1/K10 (Poumay & Pittelkow, 1995). Le 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA), un ester de phorbol, stimule la différenciation par augmentation de l'expression de l'involucrine (Poumay et al, 1999)

Certains facteurs ont un effet modulateur à la fois sur la **prolifération** et la **différenciation** (*Tableau I.II*). TGF-β1 et TGF-β2 suppriment la prolifération des cellules épithéliales et sont exprimés de façon différentielle au cours de la différenciation (Pietenpol et al., 1990). Le « Kératinocyte growth factor » (KGF ou FGF-7) appartenant à la famille des « fibroblast

growth factor » (FGF) stimulent la prolifération *in vitro* et inhibe la différenciation (Aaronson et al., 1990). L'Interferon γ (IFN-γ) inhibe la prolifération et induit la différenciation (Saunders & Jetten, 1994). On observe un gradient de la concentration en calcium du milieu extracellulaire depuis la couche basale jusqu'aux couches supérieures de l'épiderme. La couche basale, proliférative, est caractérisée par une faible concentration en calcium extracellulaire. Cette concentration en calcium est plus élevée lorsqu'on monte dans les couches suprabasales de l'épiderme (Menon et al. 1985). Les kératinocytes de souris cultivés en conditions de concentration faible en calcium (0,1 mM) ne peuvent stratifier et montrent une prolifération accrue ainsi qu'une diminution d'expression des marqueurs de différenciation (Hennings et al., 1980 ; Yuspa et al., 1989). Une concentration élevée en calcium favorise l'établissement des jonctions intercellulaires (Hines et al., 1999). L'atteinte de la confluence par les kératinocytes, dont le milieu est faiblement concentré en calcium, engendre une diminution de la clonogénicité et une stimulation de l'expression de marqueurs de différenciation (Poumay et Pittelkow, 1995).

1.2 IRRITATION CUTANÉE

1.2.1 Introduction

La peau, interface entre l'organisme et son environnement, est l'organe du corps le plus exposé aux diverses agressions exogènes susceptibles de perturber son homéostasie. La fonction de barrière remplie par la couche cornée est généralement efficace et nous protège contre un grand nombre de substances nocives. Cependant la peau est un site fréquent d'inflammation. L'inflammation est complexe et médiée par les cellules et plusieurs facteurs solubles pour aboutir aux quatre signes caractéristiques d'une inflammation : douleur, rougeur (érythème), gonflement (œdème) et chaleur. L'apparence d'une inflammation cutanée dépend du stade de la réaction, aiguë ou chronique, et de la potentialité de l'agent agresseur.

Une grande partie des réactions inflammatoires au niveau cutané est causée par des irritations de la peau induites par divers agents chimiques, cosmétiques et médicaments de la vie quotidienne. Il est donc essentiel d'identifier les substances à potentiel irritant utilisées par l'homme pour en prévenir les effets.

Au contraire des réactions allergiques qui sont précédées d'une présensibilisation, la réaction inflammatoire cutanée causée par une irritation est immédiate (Basketter, 1999). On définit l'irritation cutanée comme étant l'apparition d'une réaction inflammatoire non-immunogène grandissante, survenant assez rapidement après la stimulation et qui disparaît habituellement dans l'espace de quelques jours (Harvell et al., 1995).

Vu le rôle protecteur de l'épiderme, les substances irritantes sont en fait capables de traverser la barrière cornée et induire une réponse au niveau des kératinocytes qui se traduit notamment par la libération de la cytokine pro-inflamatoire IL-1α (Coquette et al., 1999 ; 2003).

1.2.2 Les méthodes alternatives

Un grand nombre de substances peuvent induire une irritation cutanée et endommager la barrière épidermique au contact de la peau humaine (cosmétiques, drogues, produits ménagers, ...). Pour des raisons de sécurité et de santé humaine, il est important de pouvoir détecter la présence de ces substances dans les produits qui sont utilisés par l'homme pour prévenir des éventuels effets indésirables. Actuellement, pour détecter les irritants dans divers produits, on réalise des tests sur les animaux selon la méthode de Draize (Draize et al., 1944). Pour identifier l'effet irritant d'un produit sur les animaux par cette méthode, on applique le produit sur la peau de l'animal et on attend l'apparition d'effets visibles tels que des érythèmes et des oedèmes.

Plusieurs reproches sont faits à cette méthode. Ces tests sont douloureux et induisent une souffrance pour l'animal. Le fait que ces tests soient réalisés sur des espèces différentes de l'espèce humaine peut avoir pour conséquence de ne pas assurer une fiabilité totale quand les résultats sont extrapolés à l'homme et ainsi pas toujours prédictifs des effets irritants chez l'homme (Nixon et al., 1975 ; York et al., 1996). En effet, on retrouve des réponses variées face à des stress irritants lorsqu'on passe d'une espèce à l'autre.

Actuellement, le développement de méthodes alternatives est une tendance générale pour divers types de substances. Certaines méthodes ont déjà été validées et sont maintenant obligatoires. Entre autres selon la directive 2000/33/CE, les tests de corrosivité cutanée ne peuvent plus être réalisés sur des animaux vivants. Deux méthodes *in vitro* ont été validées pour remplacer les modèles *in vivo* entraînant une souffrance pour l'animal. Il s'agit de « l'essai de résistance électrique » sur peau de rat et un essai utilisant un « modèle de peau humaine reconstruite en culture ». Ces essais permettent de distinguer les substances corrosives et non corrosives pour la peau. Cette directive définit la corrosion cutanée comme « la survenue de lésions irréversibles de la peau après l'application d'un matériel d'essai ». La dite directive interdit également l'utilisation d'animaux pour les tests de phototoxicité.

Ainsi, une tendance éthique, légale mais aussi commerciale, pour le bien-être de l'homme mais aussi celui de l'animal, explique qu'un nombre croissant de méthodes alternatives à l'expérimentation animale sont à l'étude. Il s'agit d'un vaste domaine d'exploitation dont l'intérêt ne cesse de prendre de l'ampleur avec le développement des connaissances du vivant. Dans cet objectif, la mise au point de nouveaux modèles et méthodes in vitro est devenue le centre d'intérêt de nombreux laboratoires universitaires et privés.

Pour établir des tests fiables, il faut que les modèles soient aussi proches que possible du vivant, mais il faut aussi identifier et comprendre les divers mécanismes impliqués dans l'apparition d'une irritation cutanée. Malgré les nombreuses recherches en cours, les mécanismes de réponses moléculaires et cellulaires engendrées par un stress irritant sont encore mal connus. Ainsi un grand nombre de questions restent encore sans réponses, et dès lors la validité des méthodes alternatives reste encore à préciser.

Cytokines

Primary	C-C chemokines
IL-1α	MCP-1
IL-1β	MIP-1α
TNF-α	RANTES
Humoral/cellular immune regulation	Growth factors
IL-10	TGF-α
IL-12	AR
IL-18	HB-EGF
IFN-α	NDF
IFN-β	VEGF
T cell growth	PDGF
IL-7	NGF
IL-15	FGFs
Colony-stimulating activity	Neurotrophin
IL-6	Suppressive/antagonist
G-CSF	IL-IRA
M-CSF	TGF-β
GM-CSF	IL-10
C-X-C chemokines	
IL-8	
Gro-α, -β, -γ	
IP-10	

Neuroendocrine

α-MSH

Eicosenoids

Arachidonate	12-HETE
PGE-2	LTB_4

Oxygen-derived

Nitric oxide (NO)	Superoxide ($O_2^{\bullet-}$)
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	

Tableau I.III : Médiateurs libérés par les kératinocytes lors d'une irritation ou d'une sensibilisation cutanée (Coquette et al., 2000).

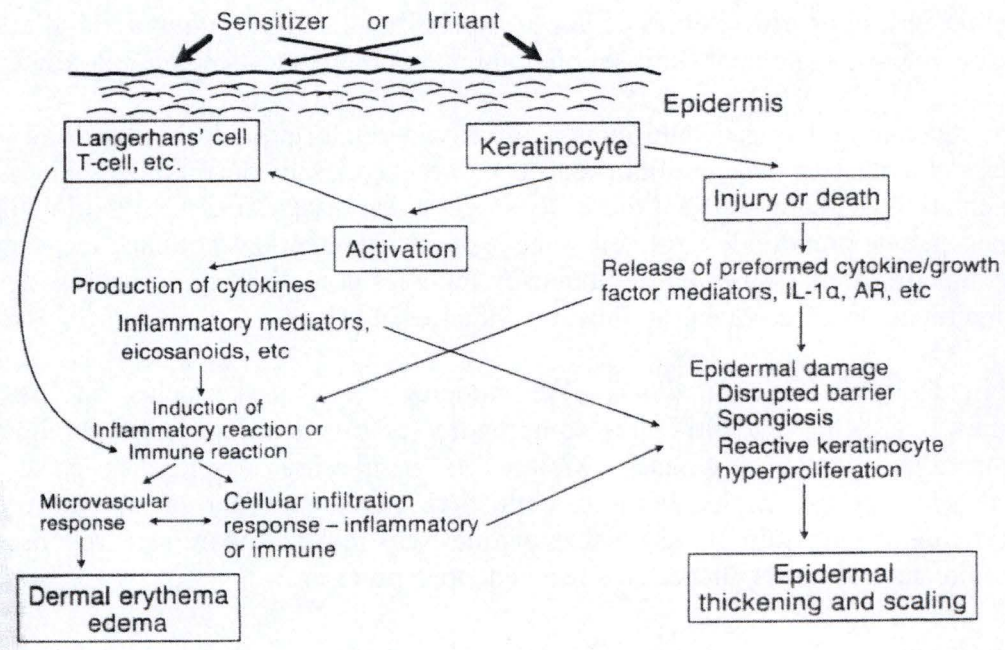


Figure I.8 : Evénements consécutifs à l'application d'un irritant ou d'un sensibilisant sur l'épiderme et conduisant aux signes caractéristiques d'une inflammation (Coquette et al., 2000).

1.2.3 Caractérisation de la réponse cellulaire suite à une irritation

Les kératinocytes semblent impliqués dans l'initiation, la modulation et la régulation de la réponse de la peau face à un grand nombre d'agents agresseurs. En effet, il devient de plus en plus clair que les kératinocytes ne forment pas qu'une barrière mécanique et passive à l'environnement extérieur mais qu'ils sont également capables de produire et de libérer des cytokines et d'autres médiateurs ayant des propriétés immunologiques, inflammatoires et d'adaptation cellulaire (comme la prolifération) (Coquette et al., 2000). Suite à un stress physique ou chimique, tel qu'un produit irritant, les keratinocytes libèrent diverses cytokines reprises dans le *tableau I.III.* Les plus importantes d'entre elles sont l'interleukine-1α (IL-1α), le « tumor necrosis factor α» (TNF-α), les cytokines chémotactiques (interleukine 8, interferon induced protein 10), les « growth promoting factor » (interleukins 6, 7 et 15 ou IL 6,7 et 15 ; « granulocytes macrophage colony-stimulating factor » ou GM-CSF), les « transforming growth factor α» (TGF-α), les cytokines régulant l'immunité humorale contre l'immunité cellulaire (interleukines 10 et 12 ou IL 10 et 12) (William and Kupper 1996).

Ensemble, ces facteurs vont influencer, de manière directe ou indirecte, la réponse épidermique face aux agressions de l'environnement. Certains sont bien caractérisés mais par contre d'autres le sont moins. L'ordre dans lequel les divers éléments de la réponse cellulaire surviennent est encore à établir. Cette réponse est sans aucun doute très complexe.

La *figure I.8* est une esquisse de la réponse épidermique face à un stress irritant ou sensibilisant qui a la potentialité, comme mentionné ci-avant, de provoquer une réponse épidermique similaire, avec la différence que l'agent sensibilisant induit une réponse immunitaire spécifique engendrant une « mémoire » immunologique. L'application d'un irritant ou d'un sensibilisant à une certaine concentration, **endommage** et provoque la **mort de cellules** ce qui enclenche une réponse au sein de l'épiderme. Il s'ensuit une libération d'**IL-1α** qui est primordiale et d'autres substances telles que l'amphiréguline qui influence la réponse immunitaire et la réparation du dommage engendré. Les keratinocytes sont **activés** par application des agents agresseurs et libèrent une série de cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation. Les kératinocytes émettent également des signaux qui permettent le recrutement des cellules de Langerhans et des lymphocytes T. Tous ces événements concourent aux signes morphologiques d'une inflammation, à l'épaississement de l'épiderme et à la cicatrisation (Coquette et al., 2000).

En plus de ces modifications, les kératinocytes modifient l'expression de plusieurs autres molécules telles que des molécules d'adhésion, des récepteurs membranaires et des facteurs de la matrice extracellulaire

1.2.4 Plusieurs modèles établis

Pour les raisons scientifiques et éthiques citées ci-avant, divers modèles de peau *in vitro* sont à l'étude pour remplacer ces tests in vivo concernant les irritants : la culture d'explants de peau humaine (Rambukkana et al., 1996), de cellules de Langerhans épidermiques (Pineau et al., 1994), de cellules dendritiques dérivées du sang et la culture de keratinocytes (Ponec, 1992 ; Corsini et al., 1996).

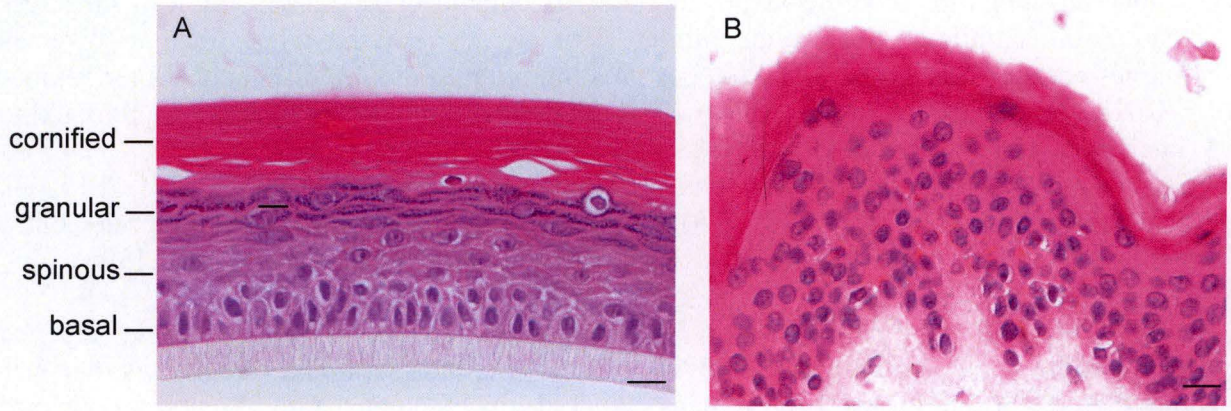


Figure I.9 : (**A**) Epiderme humain reconstitué *in vitro* et (**B**) peau humaine *in vivo* (Frédéric Dupont, Département Histologie-Embryologie, 2003).

Les kératinocytes représentent le type cellulaire majoritaire de l'épiderme et jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire. Ils sont donc capitaux dans la constitution d'un modèle in vitro de peau humaine pour tester des irritants.

1.2.4.1 La culture de kératinocytes en immersion

Plusieurs modèles de culture en immersion ont été proposés, tenant compte de diverses améliorations. **Rheinwald et Green** en 1975, ont réalisé une culture de kératinocytes en présence d'une couche nourricière de cellules murines 3T3 de type fibroblaste. Ces derniers fournissent des facteurs de croissance aux kératinocytes. Le milieu utilisé comportait 10% de sérum de veau fœtal ainsi que d'autres facteurs de croissance (EGF, insuline). Le désavantage de ce modèle est le manque de contrôle des facteurs indéfinis présents dans le sérum et produits par les cellules de la couche nourricière.

Boyce et Ham en 1983, ont établi un milieu de culture dont les paramètres étaient mieux caractérisés et permettaient ainsi d'entreprendre des études plus précises concernant les kératinocytes et les facteurs influençant leur physiologie. Ce milieu, « MCDB-153 », ne contenant pas de sérum de veau fœtal, a une concentration faible en calcium et ne nécessite pas de lit nourricier. Cependant afin d'initier la culture primaire, il faut tout de même ajouter de l'extrait pituitaire bovin. Il faut également ajouter au milieu de l'EGF, de l'insuline et de l'hydrocortisone qui ont une activité mitogène.

Cook et al. (1991a) ont montré qu'à partir d'une certaine densité cellulaire des facteurs de croissance mitogènes tel l'EGF ou le TGF-α ne devaient plus être administrés aux cellules car elles étaient capables de les synthétiser. Cette observation a permis de diminuer les facteurs exogènes non contrôlables. Cook et al ont pu montrer que le facteur de croissance libéré dans le milieu, exempt de facteurs de croissance, par les cellules était l'amphiréguline. Les kératinocytes, montrent ainsi une croissance autocrine. Lors de l'ensemencement à faible densité cellulaire, il est cependant toujours nécessaire d'apporter 10 ng/ml de EGF, 50 µg/ml de BPE et 5 µg/ml d'insuline. Ce même groupe (Pittelkow et al., 1993) a découvert que le récepteur de l'EGF était activé lors de la prolifération autocrine des kératinocytes. C'est l'amphiréguline qui exerce cette stimulation de manière paracrine et/ou autocrine.

Ces modèles en immersion ont souvent été utilisés pour tester la toxicité cutanée. Une bonne corrélation a été obtenue entre l'irritation cutanée, la cytotoxicité et la libération de cytokines pro-inflamatoires (De Leo et al., 1987 ; Brosin et al., 1997). Cependant la peau n'est pas constituée d'une couche unique, et ce modèle est dépourvu de couche cornée, faisant normalement office de barrière à la toxicité de certaines substances.

1.2.4.2 La culture d'épidermes humains reconstitués

Des modèles fonctionnels de peau humaine ont été développés pour se rapprocher de la situation *in vivo*. Ces modèles sont constitués d'une base mimant le derme et la lame basale sur laquelle des keratinocytes entreprennent une maturation afin de former un tissu épidermique stratifié qui se kératinise (c'est-à-dire, forme une couche cornée) à l'interface air-liquide. Ces bases peuvent être des dermes dé-épidermisés (Regnier et al., 1992), une matrice de collagène (Ernesti et al, 1992) avec ou sans fibroblastes ou un filtre de polycarbonate

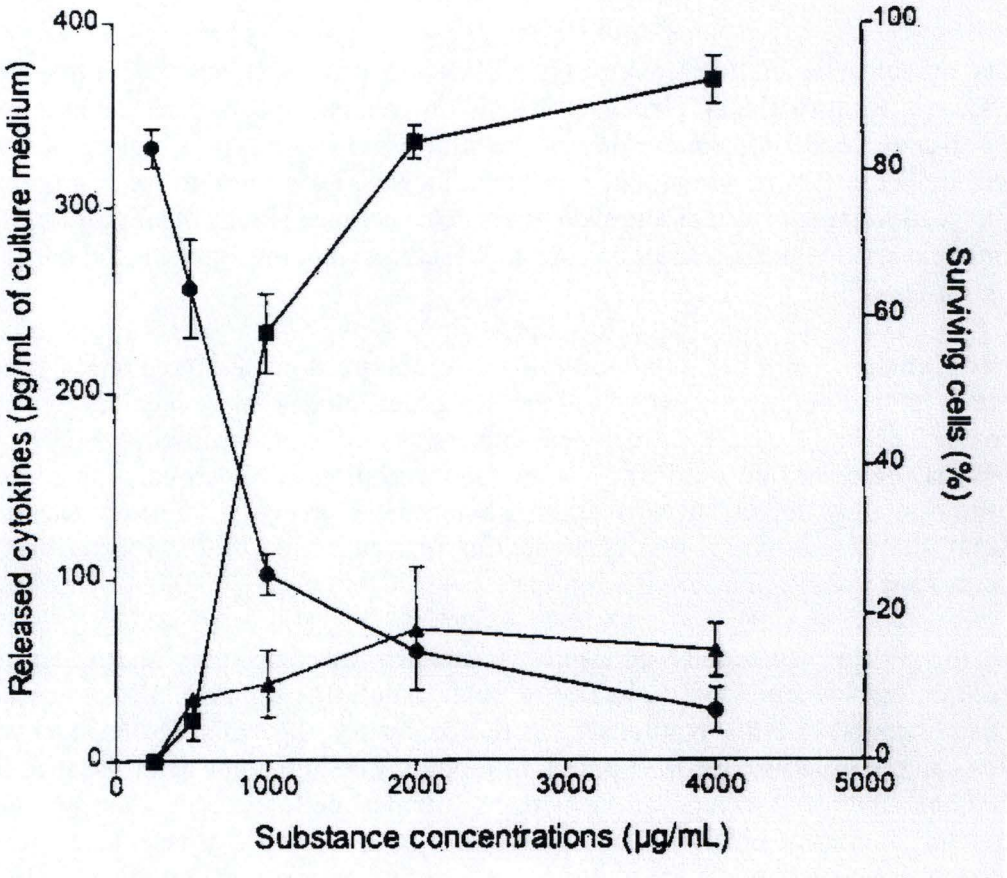


Figure I.10 : Viabilité cellulaire (●) et libération d'IL-1α (■) et d'IL-8 (▲) en fonction de la concentration en chlorure de benzalkonium appliquée sur des épidermes humains reconstitués *in vitro* (Coquette et al., 1999).

(Rosdy et al., 1990 ; Rosdy et al., 1993). Dans notre laboratoire, nous travaillons sur les épidermes reconstitués *in vitro* sur membrane de polycarbonate (*figure I.9*).

Ces modèles d'épiderme reconstruits *in vitro* sont les meilleures représentations de la réalité *in vivo* disponibles actuellement. Ils ont été développés au cours de ces dernières années et certains sont même disponibles commercialement. Ces cultures représentent des épithéliums pavimenteux stratifiés kératinisés qui possèdent donc une couche cornée fonctionnelle. On y retrouve également, les divers marqueurs de différenciation caractéristiques de la peau (Rosdy et al., 1993 ; Fleischmajer et al., 1993). Cependant, il faut garder à l'esprit les limites de ces modèles. Les kératinocytes et les fibroblastes présents dans ces modèles ne sont pas les seuls participants de la réponse cutanée face à aux irritants. Les vaisseaux sanguins, les cellules du système immunitaire, les nerfs, ... sont également essentiels pour cette réponse (Welss et al., 2004).

Bien sûr les concentrations de substances irritantes appliquées sur les 2 modèles immergé ou kératinisé sont bien évidemment différentes. La culture immergée ne possède pas de couche cornée et donc pas de barrière faisant office de protection des cellules sous-jacentes toujours vivantes. Ce modèle est donc sensible à des concentrations qui n'ont pas d'effet au niveau de l'épiderme reconstruit. L'épiderme reconstruit possède une couche cornée et donc résistera à des concentrations plus élevées en substance irritante, toxiques pour les cellules en culture immergée.

1.2.5 Identification de marqueurs d'irritation

Pour détecter la présence d'un irritant, il est nécessaire d'identifier des marqueurs dont l'expression ou la libération par les cellules de la peau est en corrélation avec l'application d'irritants. Il faut aussi que la réponse des cellules de la peau soit dépendante de la dose d'irritant. Quelques marqueurs ont déjà été proposés, mais la compréhension de la réponse cellulaire devrait permettre d'en identifier d'autres.

Pour caractériser les divers stress subis, une approche est de se tourner vers le profil de substances libérées par les kératinocytes suite à un stress donné. Coquette et al. ont montré que lorsque des épidermes humains reconstruits *in vitro* sont traités avec un irritant tel que le chlorure de benzalkonium, la viabilité cellulaire diminue quand la concentration en irritant augmente et qu'il existe à ce niveau, une relation inverse entre la **viabilité cellulaire** et la libération d'**IL-1α** par les kératinocytes. La viabilité cellulaire et le taux de IL-1α libéré sont deux paramètres reconnus comme valables en tant qu'identifiants d'une substance irritante (Coquette et al., 1999 et 2003) (*figure I.10*). Le taux d'IL-1α dans la peau humaine est de 100 à 1000 fois plus élevé que dans les autres tissus. Cette cytokine est produite par les cellules mais n'est pas sécrétée en condition normale car elle ne possède pas de séquence signal hydrophobe pour être envoyée vers l'exocytose. L'IL-1α est donc éliminée avec la desquamation. Il semblerait que l'IL-1α ne soit libérée par les cellules épidermiques que lors d'une destruction cellulaire (Dinarello, 1998).

Un des objectifs de notre projet est d'identifier un marqueur cellulaire répondant à un traitement irritant et dont la modification précède cette libération d'IL-1 et la mort cellulaire. Ce marqueur verrait idéalement son expression modulée pour de faibles concentrations en irritant qui ne modifient pas la morphologie des cellules et n'altèrent pas leur viabilité. Les

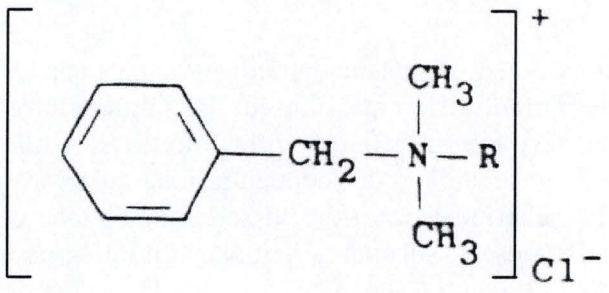


Figure I.11 : Formule chimique développée du chlorure de benzalkonium.

concentrations en irritant choisies pour être étudiées seraient juste inférieures aux concentrations à partir desquelles la viabilité est altérée.

1.2.6 Marqueur potentiel d'irritation

Puisque les irritants provoquent des agressions cellulaires, nous avons orienté notre recherche de marqueurs vers des protéines de stress : les **HSP** ou **« heat shock proteins »**. Ces HSP ont la propriété de voir leur expression et leur activation augmenter lors de stress cellulaires (voir ci-après). Plusieurs de ces HSP sont présentes dans l'épiderme : HSP27, 60, 72, 90 et 110 (Wilson et al, 2000). Chacune a un rôle spécifique au sein de l'épiderme (Charveron et al., 1995). Notre choix s'est porté sur HSP27 notamment parce qu'elle est présente dans l'épiderme où elle est sensible à un stress par les UV (Nozaki et al., 1997). Guesdon et al (1993), ont également démontré que l'expression et la phosphorylation de HSP27 sont régulées par les cytokines inflamatoires IL-1 et TNF-α. Trautinger et al. (1995) ont observé une augmentation de cette protéine lors de maladies cutanées inflammatoires (psoriasis, dermatite et herpes simplex). L'irritant que nous utiliserons dans le cadre de cette étude est le chlorure de benzalkonium (*figure I.11*) bien caractérisé en tant que tel.

1.3 LES HSP

Dès le début de ce projet, une publication de la littérature a conforté notre choix : en effet, Boxman et al. (2002), ont tenté de mettre en évidence un marqueur d'irritation à l'aide des gels à 2 dimensions après l'application ou non d'irritants (dont le sodium lauryl sulfate et le chlorure de benzalkonium) sur des prélèvements de peau. Après analyse des différences d'expression protéique entre les tissus contrôles et les tissus traités, ils conclurent que la protéine marqueur potentielle, c'est-à-dire la protéine dont l'expression était la plus modifiée, se révélait être HSP27.

1.3.1 Découverte

Les "heat shock proteins" ou protéines de stress/choc thermique constituent une grande famille de protéines hautement conservées de manière fonctionnelle et structurelle dans la phylogénie. Ceci reflète leur importance au sein d'une cellule. On retrouve ainsi ces protéines ubiquistes depuis les bactéries jusqu'à l'homme. La découverte, en 1962, des premières HSP a été réalisée par Ritossa (1962) qui observa, suite à des conditions d'hyperthermie, un renflement de certaines régions des chromosomes de cellules des glandes salivaires de *Drosophila buskii.* Ces zones enflées au niveau des chromosomes représentent des gènes activement transcrits et dans le cas échéant, il s'agit de la transcription de gènes codant pour les HSP (Ritossa, 1962). Cette découverte réalisée suite à un choc thermique leur valut leur nom de protéines de choc thermique ou « heat shock proteins » ou HSP. Elles sont aussi appelées protéines de stress, car nous le verrons, elles sont exprimées dans bien d'autres types de stress que le choc thermique.

HSP Family	Cellular Location	Proposed Function
HSP27 (sHSP)	Cytosol, nucleus	Microfilament stabilization, antiapoptotic
HSP60	Mitochondria	Refolds proteins and prevents aggregation of denatured proteins, proapoptotic
HSP70 family:		Antiapoptotic
HSP72 (Hsp70)	Cytosol, nucleus	Protein folding, cytoprotection
HSP73 (Hsc70)	Cytosol, nucleus	Molecular chaperones
HSP75 (mHSP70)	Mitochondria	Molecular chaperones
HSP78 (GRP78)	ER	Cytoprotection, molecular chaperones
HSP90	Cytosol, ER, nucleus	Regulation of steroid hormone receptors, protein translocation
HSP110/104	Cytosol	Protein folding

HSP, heat shock protein; sHSP, small HSP; ER, endoplasmic reticulum.

Tableau I.IV : localisations cellulaires et hypothèses quant à la fonction des « heat shock protein » de mammifères (Kregel, 2002).

1.3.2 Classification

Les HSP ont été classées en 5 grands groupes selon leur poids moléculaire exprimé en kDa (tableau IV) à savoir HSP27, HSP60, HSP70, HSP90 et HSP110.

Les HSP les plus étudiées et les mieux connues actuellement sont celles de haut poids moléculaire c'est-à-dire d'un poids moléculaire d'environ 60, 70, 90 et 110 kDa. Les autres HSP, celles de faible poids moléculaire, sont aussi nommées sHSP pour « small heat shock protein ». Le poids moléculaire des HSP peut varier d'une espèce à l'autre comme c'est le cas pour HSP27 humaine et son homologue murin, HSP25. Le *tableau I.IV* reprend les différentes localisations des HSP identifiées que l'on retrouve dans le cytosol, le noyau, les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Ce tableau donne également des propositions quant à leur fonction (Kregel, 2002).

1.3.3 Thermotolérance

Une propriété importante de ces protéines de choc thermique est de conférer une thermotolérance aux cellules ayant subi un préconditionnement thermique dans des conditions de températures non létales. En effet, les cellules incubées à des températures légèrement supérieures à leurs conditions physiologiques, 2 à 10°C au-dessus de la normale, surexpriment les HSP et inhibent la synthèse de macromolécules (ADN, ARN, protéines) (Lindquist et al., 1986 ; Lindquist et Craig, 1988). Ces cellules sont, suite à ce traitement, plus résistantes à des températures qui leur sont habituellement létales, mais aussi à d'autres stress cellulaires chaotropes protéiques c'est-à-dire induisant une dénaturation protéique tels que l'alcool, les UV, les métaux lourds, l'arsénite de sodium, les oxydants, les infections virales, les chocs thermiques, la destruction tissulaire (Lindquist et al., 1988 ; Polla et al.,1988 ; Kindas-Mügge et al., 1993). Plusieurs études ont montré que cette thermotolérance n'était pas uniquement due à l'augmentation de la transcription de ces protéines de stress. En effet, on peut induire une certaine thermotolérance en inhibant la transcription. Ceci serait dû aux modifications post-traductionnelles et de relocalisation des protéines (Bader et al.,1992).

Les kératinocytes épidermiques engendrent une réponse de stress thermique accompagnée d'une thermotolérance lorsqu ils sont incubés entre 40 et 43°C. Au-delà de ces températures, la chaleur devient létale pour les cellules (Gatto et al., 1992 ; Maytin, 1990).

1.3.4 Fonctions

Les HSP ont la propriété de pouvoir lier des peptides et des protéines à leurs domaines hydrophobes. Beaucoup d'évidences suggèrent que ces protéines remplissent des fonctions importantes dans les conditions physiologiques normales et dans les situations de stress cellulaire et semblent impliquées dans diverses maladies (Minowada et al, 1995). Ces protéines sont en effet exprimées de façon constitutive aux températures physiologiques de la cellule et y jouent un rôle de chaperonnes nécessaires au repliement des protéines dans leur conformation fonctionnelle (structure secondaire, tertiaire et quaternaire). Elles seraient également impliquées dans le transport et la dégradation de protéines. Comme déjà mentionné ci-avant, on leur reconnaît également un rôle cytoprotecteur dans des situations de stress

engendrant une dénaturation des protéines. Les HSP permettraient le repliement des protéines dépliées en utilisant l'ATP et empêcheraient l'agrégation de ces protéines dénaturées (Minowada et al., 1995 ; Lindquist S & Craig, 1988).

On reconnaît plusieurs rôles aux différentes HSP mais encore beaucoup d'incompréhensions les concernant restent à élucider. Cependant elles sont des candidates potentielles en tant que marqueurs de stress cellulaire et pourraient avoir une utilité à des fins diagnostiques et thérapeutiques. Dans le cas présent, nous les avons choisies comme marqueurs potentiels de réponse des kératinocytes épidermiques face à un stress irritant

1.4 LA HSP27

1.4.1 sHSP

HSP27 fait partie de la famille des « small heat shock protein » ou sHSP. Ainsi que la plupart des sHSP, HSP27 est impliqué dans la protection cellulaire contre divers stress : oxydation, chaleur, hyperosmolarité, cytokines inflammatoires, promoteur de tumeur ou agents chimiques (Ciocca et al., 1993 ; Maytin et al., 1995 ; Trautinger et al., 1996). A l'instar des autres HSP, les sHSP peuvent augmenter la thermorésistance des cellules lorsqu'elles y sont surexprimées (Landry et al., 1989). Des rôles plus spécifiques leur ont été reconnus comme la stabilisation des ARN (Nover et al., 1983), l'interaction avec le cytosquelette (Miron et al., 1991) et elles seraient également impliquées dans l'apoptose (Arrigo et al., 1998 ; Mehlen et al., 1996). Ces protéines peuvent former des complexes oligomériques allant jusque 1MDa (Arrigo et al., 1998). Les larges oligomères ont une activité de chaperonne (Rogalla et al., 1999). On pense qu'elles lient les protéines non dépliées (Ehrnsperger et al., 1997) et les présentent aux HSP ATP-dépendantes (HSP70, HSP40, HSP90) et co-chaperonnes. Les larges oligomères pourraient également présenter les protéines dont le déploiement est irréversible au protéasome (Arrigo, 2001).

HSP27 a notamment été identifiée dans une lignée de cellules provenant d'un cancer mammaire, les MCF-7 qui surexpriment cette protéine. Pour divers auteurs, les MCF-7 font dès lors office de contrôle positif pour l'expression de HSP27 (Kindas-Mügge et al., 1994).

1.4.2 Différenciation et prolifération

Des études ont montré que HSP27 est impliquée dans certaines voies de la transduction de signal, l'arrêt de croissance des cellules et la différenciation. (Michishita et al., 1991 ; Stahl et al., 1992). Dans l'épiderme, par des études immunohistochimiques, Kindas-Mügge et al. (1994), ont observé dans des biopsies de peau une augmentation croissante du marquage de HSP27 dans les couches suprabasales. En utilisant le calcium comme stimulateur de la différenciation, ils ont montré dans leur modèle de culture de kératinocytes que l'expression de HSP27 est multipliée par deux au niveau protéique lors d'une augmentation du calcium dans le milieu extérieur par rapport à une concentration faible en calcium. Ces constatations

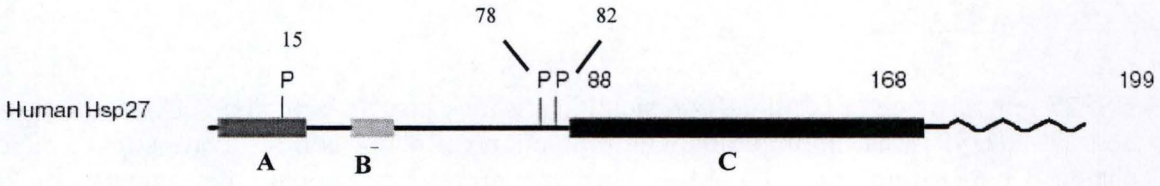


Figure I.12 : Schéma de la structure protéique monomérique de HSP27. La région **A** représente le domaine WDPF, la région **B** représente un domaine conservé des sHSP et la région **C** représente le domaine conservé α-crystallin. HSP27 peut être phosphorylée au niveau des sérines 15, 78 et 82 (Gusev et al., 2002).

sont en corrélation avec les marquages immunohistochimiques obtenus à partir des biopsies de peau dont l'intensité augmente dans les couches suprabasales. L'expression de HSP27 serait en corrélation avec la différenciation (Kindas-Mügge et al., 1994).

D'autre part d'autres études ont montré que de hauts taux de HSP27 phosphorylée seraient en corrélation avec une inhibition de la prolifération dans des cellules d'une tumeur Ehrlich ascites (Knauf et al., 1992) et une stimulation de la différenciation cellulaire comme dans les cellules leucémiques myélomonocytiques murines (Mishishita et al., 1991), des ostéoblastes, des cellules leucémiques promyélocytiques (Shakoori et al., 1992) et des cellules leucémiques humaines HL-60 (Spector et al., 1994).

1.4.3 Activation

1.4.3.1 Phosphorylation

HSP27 peut voir son expression augmenter et, par là, s'accumuler dans la cellule endéans quelques heures après un stress, mais elle est aussi une protéine pouvant être phosphorylée en quelques minutes après une stimulation telle qu'un choc thermique (Landry et al., 1991). Trois sites de phosphorylation sur des sérines ont été identifiés. Il s'agit des sérines 15, 78 et 82. La sérine 28 semble être le site de phosphorylation majeur *in vivo* suivi par la serine 78 et ensuite la sérine 15 (Landry et al., 1992 ; Stokoe et al., 1992) (*Figure I.12*).

Divers facteurs induisant la phosphorylation de HSP27 ont été identifiés tels que les stress chimiques comme l'arsenite de sodium (Kato et al., 1997) ou les esters de phorbol, (Welch, 1985) et physiques comme les UV (Nozaki et al., 1997) mais aussi le sérum (Welch, 1985), les TNF et autres cytokines (Guesdon et al., 1993 ; Arrigo, 1990), le calcium ionophore (Welch, 1985), et les inducteurs de différenciation (Mishishita et al., 1991; Shakoori et al., 1992 ; Spector et al., 1994).

Des études sur les transfections de gènes ont montré qu'une surexpression de la protéine HSP27 sauvage confère une plus grande résistance aux chocs thermiques et stress oxydatifs (Lavoie et al., 1993 ; Huot et al 1996). Cependant une surexpression de la forme non-phosphorylable est beaucoup moins efficace pour augmenter cette protection, ce qui suggère que la HSP27 serait activée par phosphorylation (Lavoie et al., 1995 ; Huot et al., 1995).
La phosphorylation de HSP27 est également induite par des facteurs de croissance et de différenciation sur les mêmes résidus que lors d'un stress (Landry et al 1992 ; Gaestel et al., 1991).

Plusieurs **isoformes phosphorylées** de HSP27 ont été mises en évidence par gel d'électrophorèse à une dimension en fonction du point isoélectrique. Dans les kératinocytes non stressés, HSP27 non-phosphorylée prédomine avec une faible présence de la forme monophosphorylée. Lors d'un stress cellulaire (UVB, arsenite de sodium), il y a augmentation des isoformes bi- et tri-phosphorylées, et en faible quantité augmentation d'une quatrième isoforme (Wong et al., 2000 ; Biao Shi et al., 2003).

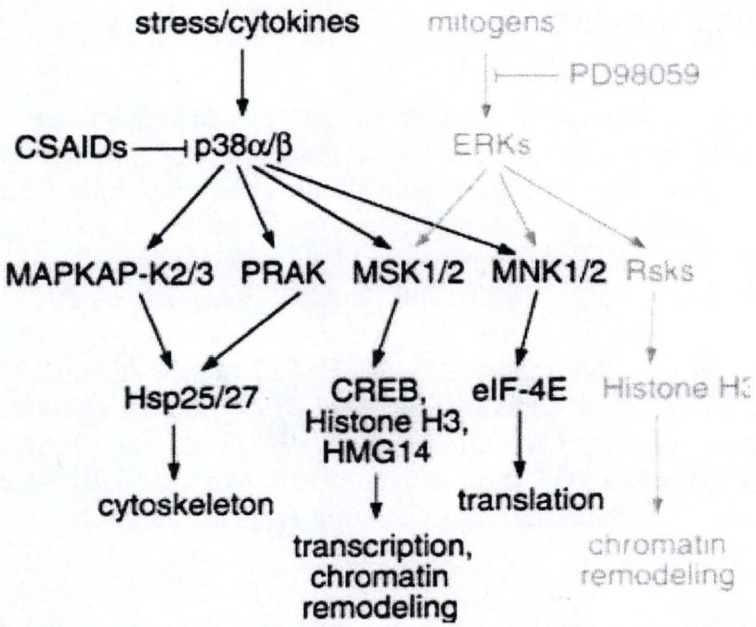


Figure I.13 : Implication de HSP27 dans la signalisation cellulaire (Kyriakis et Avruch, 2001).

1.4.3.2 Relocalisation

En plus d'être phosphorylée, HSP27 est aussi une protéine qui subit une translocation nucléaire en réponse à des stress cellulaires. En effet, dans les kératinocytes non stressés, HSP27 est localisée dans le cytoplasme. Après un stress, elle est transloquée vers le noyau et elle y forme des agrégats granulaires. Cette relocalisation nucléaire a été observée dans les kératinocytes suite à divers stress tels que le choc thermique, les UVB, les oxydants, l'arsenite de sodium et le sodium lauryl sulfate (Wong et al., 2000 ; McClaren et al., 1994 ; Shi et al., 2003 ; Boxman et al., 2002). Cependant d'autres équipes n'ont pas pu mettre en évidence cette relocalisation nucléaire mais ont plutôt observé une relocalisation périnucléaire (Lavoie et al., 1995).

1.4.3.3 Oligomérisation

Comme discuté ci-avant, HSP27 forme des oligomères. La forme phosphorylée de cette protéine semble réguler l'équilibre entre les différentes tailles d'oligomères. HSP27 phosphorylée formerait de petits oligomères mais la forme non phosphorylée en formerait de plus larges (Rogalla et al., 1999).

La phosphorylation et la formation d'oligomères plus petits empêcheraient l'activité de chaperonne. En tout cas HSP27 phosphorylée ne semble pas agir de façon efficace en temps que chaperonne (c'est-à-dire qu'elle n'empêche pas bien l'agrégation thermique et ne remplit pas bien sa fonction de « refolding » après une dénaturation.).

1.4.4 Transduction du signal

La *figure I.13* représente de manière simplifiée les voies de transduction du signal découvertes et dans lesquelles HSP27 est impliquée. La kinase qui phosphoryle HSP27 a été identifiée, il s'agit de la **MAPKAP Kinase 2** pour « mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase2 » chez les cellules de souris et de hamster (Stokoe et al., 1992 ; Huot et al., 1995). Il s'agit d'une protéine sérine/threonine kinase de 45 et 54kDa (p45-54). On ne sait pas très bien s'il s'agit de deux isoformes codées par le même gène ou par deux gènes distincts.
Chez l'humain, une protéine kinase de HSP27 supplémentaire a été découverte : **MAPKAP kinase 3**. Elle exerce la même fonction que la MAPKAP kinase 2 et présente 70% d'homologie de séquence avec elle (McLaughlin et al., 1996).

Cette dernière est elle-même phosphorylée par une protéine kinase activée par les stimuli mitogènes (MAP kinase) (Stokoe et al., 1992a,b ; Rouse et al., 1994). Il semblerait que l'HSP27 se retrouve en aval de la cascade de **p38** impliquée notament dans la signalisation induite par IL-1, les stress et les chocs thermiques (Freshney et al., 1994 ;Rouse et al., 1994). L'utilisation d'un inhibiteur de p38 diminue la phosphorylation de HSP27 due aux UVB, mais également dûe à H_2O_2, au choc thermique et à l'arsenite de sodium (Wong et al., 2000).

Par ailleurs, les sHSP peuvent être déphosphorylées de manière efficace par **PP2A** (protéine phosphatase 2A) (Carins et al., 1994) et **PP2B** (protéine phosphatase 2B) (Gaestel et al,1994).

1.5 OBJECTIF

Notre objectif dans ce travail est, dans un premier temps, la caractérisation de l'expression au niveau ARNm et protéine ainsi que de la phosphorylation et de la localisation intracellulaire de HSP27 au sein de notre modèle de kératinocytes épidermiques en immersion. Comment cette protéine est-elle régulée à ces divers niveaux par les kératinocytes en fonction de la différenciation épidermique et dans des conditions de cultures induisant un stress ? Par exemple, nous avons recherché quelles sont les régulations subies par HSP27 suite à diverses modifications de l'environnement de culture telles que la concentration en calcium, un choc thermique ou le traitement avec un ester de phorbol.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'expression au niveau ARNm et protéines ainsi que la phosphorylation de HSP27 lors de la réponse des kératinocytes épidermiques face à un stress irritant provoqué par le chlorure de benzalkonium. Nous avons ainsi recherché si HSP27 est une protéine pouvant être utilisée en tant que marqueur d'irritation cutanée. Nous avons aussi analysé si sa régulation est corrélée avec la concentration en irritant. Ces informations permettent d'élargir les connaissances sur les phénomènes moléculaires survenant suite à une irritation cutanée mais permettent également d'avancer dans le développement de modèle de peau *in vitro* qui remplaceront les tests d'irritation appliqués *in vivo*.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 CULTURE CELLULAIRE

2.1.1 Culture des kératinocytes épidermiques humains

2.1.1.1 Matériel

Milieu complet Epilife® +
- Epilife Medium® (Cascade)
+ supplements:
  - BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0.2 %
  - hEGF 0.2 ng/ml
  - Insuline 5 µg/ml
  - Hydrocortisone 5x 10^{-7} M
  - Transférine 5 µg/ml
  - Pénicilline G 50 unités/ml
  - Streptomycine 50 µg/ml

Milieu complet KGM-2 (Keratinocyte Growth Medium)
- KBM-2(Keratinocyte Basal Medium)
+ supplements:
  - BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0.2 %
  - hEGF 0.2 ng/ml
  - Insuline 5 µg/ml
  - Hydrocortisone 5x 10^{-7} M
  - Epinéphrine
  - Pénicilline G 50 unités/ml
  - Streptomycine 50 µg/ml

Milieu autocrine Epilife® -
-Epilife Medium® (Cascade)
+ supplements:
  - L-histidine 2.4x10^{-4} M
  - L-isoleucine 7.5x10^{-4} M
  - L-méthionine 9x10^{-4} M
  - L-phénylalanine 9x10^{-4} M
  - L-tryptophane 4.5x10-$^{-4}$ M
  - L-tyrosine 7.5x10^{-4} M
  - Hydrocortisone 5x10^{-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-GP 0.22 µm

Trypsine T17
- Solution A
- Trypsine à 0.17 %

Trypsine T25
- Solution A
- Trypsine à 0.025 %
- Ethylène Diamine Tétra-acétate (EDTA) 0.01%

Solution dFCS 2 % (solution bloquante)
- Solution A
- Sérum de veau fœtal dialysé (dFCS) à 2 %

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

2.1.1.2 Méthode

2.1.1.2.1 Les cultures primaires

Les kératinocytes épidermiques humains sont obtenus à partir de prélèvements de peau humaine obtenus suite à des abdominoplasties réalisées par le Docteur Bienfait (Clinique de Saint Luc, Bouge). Les prélèvements sont réalisés à l'aide d'un dermatome immédiatement

après l'opération et stockés à 4°C dans la solution A. L'isolement des kératinocytes épidermiques est réalisé au laboratoire sous des hottes à flux laminaire vertical et suit le protocole modifié de Wille et al (1984). Les kératinocytes récoltés depuis une abdominoplastie constituent une souche (NAK pour Normal abdominal keratinocyte).

Toutes les étapes de cette manipulation se font à 4°C, à l'aide de matériel stérile et avec des gants. Les prélèvements de peau sont déposés dans la solution A et découpés en carrés d'approximativement 1 cm de coté. Ces morceaux sont placés sur une solution de trypsine de pancréas bovin 0,017% (T17) contenant 0,25 µg/ml de fungizone et 50 µg/ml de gentamycine. Les prélèvements sont ainsi incubés toute la nuit à 4°C. Le lendemain, l'épiderme est détaché du derme et placé dans la solution bloquante contenant le milieu complet KGM-2 et 2% de fœtal calf serum dialysé (FCSd) qui neutralise l'action de la trypsine. Les morceaux d'épiderme sont triturés dans le milieu complet et passés plusieurs fois dans une pipette afin de dissocier les cellules prolifératives de la couche basale. Cette suspension cellulaire est alors filtrée (FALCON 70 µm Nylon stérile) pour ne laisser passer que les cellules isolées. Le filtrat récupéré est centrifugé à 1000 RPM durant 10 min à 4°C. Le surnageant est ôté et le culot est resuspendu dans le milieu complet.

Les cellules sont ensemencées à 46000 cellules/cm^2 dans des boîtes de culture T175cm^2 avec le milieu complet contenant 0,1% de FCSd, de la gentamycine et de la fungizone. Les boîtes de cultures sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2 et immobilisées 24 heures. Le milieu est changé 3 jours plus tard et ensuite tous les 2 jours.

2.1.1.2.2 Culture secondaire

Avant d'atteindre la confluence, les cellules d'une culture primaire sont détachées de la boîte à l'aide d'une solution de trypsine de pancréas bovin 0,025% et 0,01% EDTA (T 25). On procède d'abord à une trypsinisation courte de 5 min afin de décrocher les fibroblastes dont on veut se débarrasser et ensuite une trypsinisation longue entre 10 et 15 min (dès que les cellules se décrochent) pour décrocher les keratinocytes. L'action de la trypsine est inhibée par la solution bloquante. Les cellules détachées par la longue trypsinisation sont récupérées et centrifugées à 1000 RPM pendant 10 min à 4°C. Le culot est resuspendu et les cellules sont comptées pour être réensemencées à une densité de 5000 cellules par cm^2 dans un milieu complet Epilife faible en calcium afin de favoriser la prolifération. La culture est menée à un état de sous-confluence pour éviter la différenciation des cellules, mais proche de la confluence pour obtenir un nombre important de cellules.

Arrivés à cette densité, les kératinocytes peuvent être détachés comme précédemment, centrifugés, comptés et le culot est resuspendu dans une quantité de milieu adéquate pour obtenir 2 millions de cellules par ml. Une quantité équivalente de milieu de congélation deux fois concentré est ajoutée (20% DMSO, 20% dFCS, 60% milieu complet) afin d'obtenir une concentration de 1 million de cellules par ml. La suspension cellulaire est répartie dans des cryotubes de 1ml (NUNC). Les tubes sont placés à -80°C dans une boite de frigolite pendant une nuit minimum, avant d'être transférés dans l'azote liquide à -180°C.

2.1.1.2.3 La culture tertiaire

La culture tertiaire se réalise à partir des cultures secondaires congelées. Le nombre de cryotubes désirés est prélevé de l'azote liquide et placé rapidement dans un bain à 37°C

environ une minute, temps nécessaire pour la décongélation du contenu. Les cellules sont alors rassemblées et placées sur glace. Elles sont comptées et ensemencées à une densité cellulaire d'environ 7000 cellules/cm^2 dans le milieu complet KGM-2 favorisant l'attachement au support. Le lendemain, le milieu complet KGM-2 est remplacé par du milieu complet Epilife. Le milieu est remplacé tous les 2 jours. Quand les cellules ont recouvert 60% de la boîte de culture, les cellules sont cultivées en condition autocrine : les cellules sont rincées 2 fois à la solution A pour éliminer les facteurs de croissance exogènes puis immergées dans le milieu Epilife exempt de facteurs de croissance.

2.1.1.2.4 Cultures et traitements spécifiques

- **Densité cellulaire**

Les cellules sont étudiées à 3 stades cellulaires caractérisés chacun par un phénotype différent. Il s'agit de la *sous-confluence* (SC) lorsque les cellules sont toujours en prolifération et ont rempli approximativement 80% de la boîte, de la *confluence* (C) lorsque les cellules, en arrêt de croissance ont couvert la boîte et la *post-confluence* (PC) que l'on définit quatre jours après la confluence. Ayant atteint ces stades, les cellules sont analysées de diverses manières : test de la viabilité, analyse des ARNm ou protéines.

- **Augmentation de la concentration en calcium**

La concentration en calcium du milieu peut être augmentée dans les dernières 24 heures avant la SC, C et PC. On passe alors du milieu ayant une concentration en calcium de 0,06 mM (une concentration favorisant la prolifération des kéreatinocytes) à un milieu contenant 1.5 mM de calcium. Les cellules sont incubées à 37°C.

- **Choc thermique**

Lorsque les cellules sont arrivées à SC, C et PC, leur milieu est renouvelé, remplacé par un milieu préchauffé à 43°C et elles sont incubées à 43°C en atmosphère humide et 5% de CO_2 pendant 4h avant d'être analysées.

- **Traitement au TPA**

Lorsque les cellules ont atteint la SC, C et PC, leur milieu est remplacé par un milieu contenant une concentration de 10 ng/ml de 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) (Calbiochem) et sont incubées à 37 °C pendant 18h. Après les 18h, les cellules sont rincées à la solution A avant d'être analysées.

- **Traitement au chlorure de benzalkonium**

Lorsque les cellules ont atteint la SC, leur milieu est remplacé par un milieu contenant une concentration désirée en chlorure de benzalkonium (Sigma). Les cellules sont incubées pendant 4h ou pendant 18h. Avant d'être analysées, elles sont rincées 2 fois à la solution A.

2.1.2 Culture des MCF-7

Cette lignée cellulaire provient d'un adénocarcinome humain du sein. Ces cellules ont une morphologie de type épithéliale. Ces cellules proviennent du laboratoire du professeur J-M Foidart (ULG) par l'intermédiaire du docteur Alain Colige. Elles sont ensemencées à une densité cellulaire de 20 000 cellules/cm^2 et cultivées dans le milieu DMEM (Dulbelcco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal.

Ces cellules sont utilisées, pour les traitements, en prolifération juste avant d'atteindre la confluence. Il faut également ajouter qu'avant d'être analysées les cellules sont rincées deux fois à la solution A afin d'enlever un maximum de sérum présent dans le milieu.

2.2 TEST DE VIABILITÉ CELLULAIRE : TEST MTT

Le test MTT est un test colorimétrique permettant de tester la viabilité des cellules. Ce test est basé sur la capacité d'une déhydrogénase mitochondriale de convertir le 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) (substrat jaune soluble dans l'eau) en un produit formazan bleu foncé insoluble dans l'eau. La quantité de bleu est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Contrairement aux cellules vivantes, les cellules mortes n'auront pas pu convertir le substrat jaune en bleu.

Le MTT (SIGMA) est dissout dans le milieu de culture pour obtenir une solution d'une concentration de 0,5 mg/ml. Les cellules sont cultivées dans des plaques de 12 puits. On dépose 1 ml de la solution MTT par puit. Les plaques sont incubées 1h dans l'obscurité à 37°C. Après cette incubation, le MTT est ôté et on introduit 500 µl d'isopropanol par puits afin de dissoudre le formazan. Les puits sont légèrement agité pendant 15-30 minutes afin d'obtenir une solution bleue homogène. Si nécessaire, la solution trop bleue est diluée pour rester dans des mesures d'absorbance valables. L'absorbance est ensuite mesurée à 570 nm (microplates manager, BioRad).

2.3 ANALYSE DES PROTÉINES

2.3.1 Western Blot

2.3.1.1 Matériel

Sample buffer 2x:
- Tris-HCl 62,5 mM
- SDS (sodium dodécyl sulfate) 2 %
- Glycérol 8,7 %
- Bleu de bromophénol 0,05%
- DTT (dithiothreitol) 0,2 M

Runnning gel:
- Tris base 375 mM à pH 8.8
- SDS 0,1 %
- Acrylamide/Bisacrylamide 10 %
- 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/ Tween-20
- 0,1 % Tween
- NaCl 137 mM
- $Na_2HPO_4\,2H_2O$ 8 mM

Anticorps 1aire	Dilution	Source	Spécificité
Hsp27 totale (Tebu-bio)	1/5000	IgG polyclonal de chèvre	Hsp27 totale
Hsp27 phosphorylée sérine 82 (Upstate)	1/1000	IgG polyclonal de lapin	Hsp27 phosphorylée, sérine 82
β-Actine (Sigma)	1/20000	IgG polyclonal de souris	β-Actine
Anticorps 2aire	**Dilution**	**Source**	**Spécificité**
Ac 2aire-anti lapin-HRP (DakoCymation)	1/1000	IgG de chèvre	IgG de lapin
Ac 2aire-anti chèvre-HRP (DakoCymation)	1/1000	IgG de lapin	IgG de chèvre
Ac 2aire-anti souris-HRP (DakoCymation)	1/1000	IgG de chèvre	Ig de souris

Tableau M.I : Anticorps utilisés pour le Western blot.

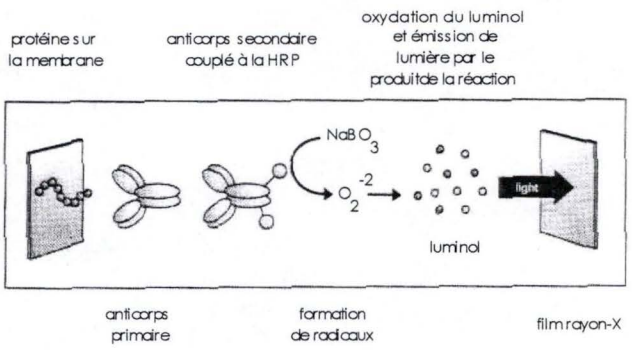


Figure M.1 : Principe de la détection par chémoluminescence des protéines au niveau des membranes de Western blot (Roche applied science).

Stacking gel:
- Tris base 125 mM à pH 6.8
- SDS 0,1 %
- Acrylamide/Bisacrylamide 4 %
- APS (persulfate d'ammonium) 0.05 %
- TEMED (N,N,N,N-tetramethylethylethylenediamine) 0.1 %

- KCl 2,7 mM
- KH_2PO_4 1,5 mM

Solution de saturation
- Tampon PBS/Tween
- 5% lait gloria, Nestlé

2.3.1.2 Méthode

2.3.1.2.1 Extraction et Western Blot proprement dit

Les cellules sont lysées sur glace avec le tampon de lyse 2 fois concentré à raison de 5,3 µl/cm^2 pour les cellules à sous confluence et de 7,1 µl/cm^2 pour les cellules à confluence et post-confluence. Les lysats cellulaires sont transférés dans des eppendorfs respectifs à chaque échantillon et sont chauffés 5 min à 100 °C. Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 13000 RPM, 10 min, à 4 °C. Les surnageants sont conservés à –20°C.

La quantité désirée de protéines est prélevée. On y ajoute le sample buffer 2x contenant du colorant. L'échantillon est chauffé 5 min à 100 °C, afin de dénaturer les protéines, avant d'être chargé sur un gel de polyacrylamide à 12,5% coulé dans le dispositif adéquat (BioRad). Lors de leur migration, les échantillons sont premièrement tassés par le stacking gel avant de se déplacer à travers le running gel où ils seront séparés. L'électrophorèse sur ce gel se fait en condition dénaturante en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate) contenu dans le tampon de lyse. Le SDS donne aux protéines une charge négative. La répulsion électrostatique de ces charges provoque le déploiement et la dénaturation des protéines. Ces charges négatives permettent également aux protéines de migrer vers le pôle positif du dispositif d'électrophorèse. Ces dernières migrent à travers le gel en fonction de leur poids moléculaire renseigné par un ladder (Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range, Bio-Rad) migrant simultanément.

Cette électrophorèse s'effectue sous une tension de 150 Volts jusqu'à ce que le front de migration ait atteint la distance désirée. Durant l'électrophorèse, le gel est immergé dans le tampon d'électrophorèse dans le dispositif prévu (Bio-Rad). Les protéines ayant migré au sein du gel subissent ensuite un transfert sur une membrane Hybond-P PVDF (polyvinylidenedifluoride) 0,45 µm (Amersham). Ce transfert est réalisé pendant une nuit à 60 Volts, à 4 °C, en immersion dans le tampon de transfert, au moyen du dispositif approprié (BioRad). Le lendemain, la membrane portant dès lors les protéines est récupérée. Elle est conservée dans une feuille de cellophane à 4°C pour éviter qu'elle ne sèche.

2.3.1.2.2 Révélation du Western Blot par chemoluminescence

La membrane portant les protéines est incubée 1 heure dans la solution de saturation afin de masquer les sites non spécifiques. On procède alors à une incubation de 1 heure (ce paramètre peut varier selon l'anticorps primaire) en présene de l'anticorps primaire dilué à bonne concentration dans la solution de saturation (*Tableau M.I*). La membrane est ensuite lavée 3 fois 10 min dans la solution de PBS/Tween-20. Après ces lavages, on l'incube pendant 1h en

Anticorps 1aire	**Dilution**	**Source**	**Spécificité**
Hsp27 totale (Tebu-bio)	1/100	IgG polyclonal de chèvre	Hsp27 totale
Hsp27 phosphorylée serine 82 (Upstate)	1/500	IgG polyclonal de lapin	Hsp27 phosphorylée, sérine 82
Involucrine	1/40	IgG polyclonal de lapin	Involucrine
Anticorps secondaire	**Dilution**	**Source**	**Spécificité**
Ac 2aire-anti lapin-Alexa 488 (Molecular Prob)	1/200	IgG polyclonal de chèvre	IgG de lapin
Ac 2aire-anti chèvre-Alexa 488 (Molecular Prob)	1/200	IgG polyclonal de lapin	IgG de chèvre

Tableau M.II : Anticorps utilisés en immunohistochimie

présence de l'anticorps secondaire couplé à la HRP (horse raddish peroxydase). La membrane est une dernière fois rincée à l'aide de la solution PBS/Tween-20 comme précédemment.

La révélation se fait par chémoluminescence (*figure M.1*) (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche). Le substrat de la HRP est versé sur la membrane pendant 1 min. Un film photographique « hyperfilm^{Tm} ECL » (Amersham) est posé sur la membrane et est ensuite développé.

La membrane peut-être réutilisée pour l'incubation d'autres anticorps. A moins que la nouvelle protéine à identifier ne soit de poids moléculaire fort différent, la membrane doit être débarrassée des anticorps précédents avant réutilisation. Les anticorps sont décrochés à l'aide de la solution *re-Blot Plus* (CHEMICON).

2.3.2 Localisation protéique intracellulaire par immunofluorescence

Il s'agit de localiser les protéines d'intérêt au sein des cellules en cultures immergées. Ceci permet de détecter une éventuelle relocalisation de la protéine suite à un traitement particulier des cellules, ou d'identifier les cellules exprimant la protéine d'intérêt dans une culture.

2.3.2.1 Matériel

Tampon PBS/ABC :
- $CaCl_2$ 0.9 mM
- KCl 2 mM
- KH_2PO_4 1.4 mM
- $MgCl_2$ 0.5 mM
- NaCl 0.13 M
- Na_2HPO_4 $2H_2O$ 8 mM
- pH 7.2
- Na_3VO_4 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

2.3.2.2 Méthode

Les cellules utilisées pour ce marquage sont cultivées sur des lamelles de verre. La première étape consiste à fixer les cellules avec du paraformaldéhyde 3,7 % pendant 15 min après avoir rincé les lamelles 3 fois 5 min dans le tampon PBS/ABC. Les lamelles sont alors rincées 3 fois en 5 min avec le tampon glycine pour saturer les liens fonctions aldéhydes. Les lamelles sont ensuite rincées 3 fois 5 min dans le tampon PBS/ABC. Après ces rinçages, on incube les lamelles 30 min dans la solution de saturation PBS/BSA pour masquer les sites non-spécifiques. Si des protéines phosphorylées sont mises en évidence, il s'agira d'ajouter à cette solution de saturation de l'orthovanadate à une concentration finale de 0.1 mM. Cette substance inhibe les phosphatases. Les lamelles sont incubées 1h dans une chambre humide avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon PBS/BSA à la concentration voulue (*tableau M.II*). Une fois le temps d'incubation écoulé, on effectue 3 rinçages de 5 min des lamelles avec le tampon PBS/BSA. On incube ensuite 1 heure, dans une chambre humide, les lamelles

dans l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Les lamelles sont à nouveau rincées 3 fois 5 min après cette incubation de 1 heure. Après ce dernier rinçage, les lamelles sont montées sur lame à chaud au Mowiol (40-88, Sigma) préchauffé à 56°C. Les lamelles sont conservées à 4°C à l'obscurité pour préserver la fluorescence. Les coupes sont observées au microscope confocal.

2.4 ANALYSE DES ARN MESSAGER (POLY-A)

La manipulation des ARN requiert plusieurs précautions afin de protéger ceux-ci contre les ARNase. Le port de gants prévient de la contamination par les ARNases de la peau. Les solutions utilisées sont autoclavées et traitées au diéthyl pyrocarbonate (DEPC). Ces solutions contiennent 0,1% de DEPC incubé une nuit et sont ensuite autoclavées pour détruire le DEPC. Le matériel utilisé est également traité au DEPC, c'est-à-dire incubé 1 nuit dans de l'eau 0,1% DEPC et autoclavé.

2.4.1 Extraction des ARNm

La cellule contient divers types d'ARN tels que les ARN messagers, ARN de transfert et ARN ribosomiaux. Pour isoler les ARNm des autres types d'ARN, on se base sur une de leurs particularités qui est de se terminer par une queue poly-A, c'est-à-dire faite d'une succession d'adénines. Cet oligonucléotide adénilique est complémentaire d'un oligonucléotide constitué de thymines (polyT) qui permettra de capturer sélectivement les ARN messager parmi les autres ARN dans un lysat cellulaire.

2.4.1.1 Matériel

H_2O traitée DEPC
- 500ml H_2O
- 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 sel
- Tris-HCl 0,005 M
- EDTA 0,001 M
- 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-$2H_2O$ 0,9 mM
- pH 8

2.4.1.2 Méthode

2.4.1.2.1 Préparation des oligo-dT cellulose

Les oligo-dT sont des chaînes de 30 nucléotides de déoxythymine, les polydT complémentaires de chaînes d'adénines telles que les poly-A des ARNm. Les oligo-dT sont attachés de manière covalente à de la cellulose par leur extrémité 5'-phosphate. Les particules de cellulose servent de support pour récupérer les ARNm dont la queue poly-A est appariée aux oligo-dT. Avant leur utilisation, les oligo-dT cellulose doivent subir différents traitements pour finalement se retrouver dans le tampon approprié. La concentration en sel de ce tampon est élevée, ce qui fournit les conditions ioniques adéquates à la formation de ponts hydrogènes entre les oligo-dT et la queue poly-A des ARNm.
Les oligo-dT cellulose se présentent sous forme d'une poudre conservée a -20°C. On prépare 0,025g d'oligo-dT par boîte de 75cm^2 ou 0,05g par boîte de 175 cm^2. Plusieurs lavages sont effectués et pour tous, la centrifugation se fait à 1200 RPM pendant 1 min. Les oligo-dT sont lavés 2 fois dans du NaOH 0.1 M et 1 fois dans de l'eau distillée afin d'être rincés. Ensuite les oligo-dT sont incubés 30 min dans de l'eau distillée contenant 0.1% de DEPC. Après les 30 min, on centrifuge à 1200 RPM pendant 1 min. On procède ensuite à 3 lavages avec de l'eau traitée au DEPC et à un lavage dans le tampon riche en sels. Finalement, les oligo-dT cellulose sont resuspendus dans le tampon riche en sels à une concentration telle que l'on puisse utiliser 2 ml par boîte de culture 75 cm^2 ou 175 cm^2. Ils sont conservés à 4°C pendant un temps maximum de 2 semaines.

2.4.1.2.2 Extraction proprement dite

Le milieu de culture cellulaire des boîtes est aspiré. Les cellules sont lysées rapidement par un tampon de lyse ayant une concentration de 25 µg/ml en protéinase K. Cette dernière est une sérine protéase non spécifique, résistante au SDS. Elle inactive les nucléases endogènes comme les ARNases ou ADNases. Si le milieu de culture contient du sérum, les cellules sont rincées avec de la solution A avant d'être lysées, afin d'éliminer un maximum de protéines. Le lysat cellulaire est récolté et passé 6 à 8 fois à travers une seringue munie d'une aiguille de 21-gauge. Cette étape fluidifie le lysat et casse l'ADN. La concentration en protéinase K du lysat est ensuite ajustée à 75 µl/ml et celui-ci est incubé à 37°C. Afin d'avoir les conditions ioniques favorables à l'hybridation des bases de thymines et d'adénines, la concentration en sels du lysat est augmentée par ajout de NaCl 5,0 M jusqu'à obtention d'une concentration de 0,5 M. A cela, on ajoute 2 ml d'oligo-dT cellulose préparés. On laisse agiter doucement le tout un minimum de 2 heures à température ambiante. Ceci est le temps nécessaire pour l'appariement des oligo-dT aux queues poly-A des ARNm.

Les oligo-dT cellulose maintenant appariés aux queues poly-A des ARNm, sont centrifugés à 1200 RPM pendant 1 min et ensuite rincés avec le tampon riche en sel. Le culot est finalement resuspendu dans le tampon riche en sels et passé sur une colonne munie d'un filtre en polymère poreux (poly-Prep Chromatography column, Bio-Rad, traitée avec le DEPC). Ce filtre retient les oligo-dT cellulose-ARNm. On réalise un premier lavage avec le tampon riche en sels et ensuite un deuxième lavage avec un tampon pauvre en sels pour permettre le décrochage des hybridations non spécifiques. Enfin, le dernier lavage avec un tampon sans sel et préchauffé à 55°C désapparie les queues poly-A des ARNm des oligo-dT cellulose. Ces

derniers restent sur le filtre tandis que les ARNm sont élués et récupérés. On ajuste la concentration en sel de l'éluat à 0,5 M par ajout de NaCl 5 M. On ajoute alors 2 fois le volume d'éthanol 95% stocké à -20°C et on laisse précipiter pendant la nuit à -20°C. Les échantillons peuvent ainsi être stockés pendant plusieurs semaines.

Pour récupérer les ARN précipités, les échantillons sont centrifugés à 13 000 RPM pendant 15 min. Les culots sont séchés et resuspendus dans 25 µl de tampon TE. La concentration en ARN est mesurée à partir d'une dilution 35 ou 40 fois à l'aide d'un spectrophotomètre (GeneQuant, Pharmacia). On mesure la densité optique à 260 nm pour déterminer la concentration en ARN et à 280 nm pour évaluer la contamination protéique éventuelle. Les échantillons sont stockés à -80°C.

2.4.2 ***Northern blot***

Pour analyser les divers ARN messagers qui nous intéressent, il s'agit de les séparer par migration électrophorétique sur un gel d'agarose 1,2%. Selon leurs tailles, les ARN migreront plus ou moins loin à travers les mailles du gel.

2.4.2.1 Northern Blot proprement dit

2.4.2.1.1 Matériel

MOPS 10x
- 3-(Nmorpholino)-propane sulfonic acid (MOPS) 0.2 M
- Acétate de sodium 50 mM
- EDTA 10 mM

Solution tamponée
- MOPS 0.2 M
- Acétate de sodium trihydratée
- EDTA 10 mM
- ph 7

Gel délectrophorèse
- Agarose pure à 1,2% (Gibco-BRL) dans de l'H_2O DEPC traitée
-MOPS 1x
- Formaldéhyde 6.5%

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

Sample Buffer
- Formamide désionisée
- Formaldéhyde à 6.5%
- MOPS x1

Tampon déléctrophorèse
- MOPS 1x
- Formaldéhyde 3.3%

20xSSC
- NaCl 2.9 M
- Citrate de sodium 0.29 M

Etalon ARN (RNA Ladder 0.24-9.5 kb, Gibco-BRL)

Sample loading Buffer
- 50% glycérol
- 1 mM Na_2 EDTA
- 0.4% Xylene cyanol
- 0.4% Bromophenol blue

2.4.2.1.2 Méthode

Les échantillons sont maintenus sur glace lors des manipulations. Les quantités égales d'ARN des échantillons à analyser, contenues dans des eppendorfs respectifs, sont séchées au speedvac (Le temps d'évaporation est approximativement de 1 min par µl). Chaque échantillon est resuspendu dans 20 µl de « sample buffer » et placés à 65°C pendant 15 min. Cette étape permet d'ouvrir les éventuelles structures secondaires des ARNm. Après

Sondes cDNA	Taille	Plasmide	Source	Sites de restriction
Hsp 27	286	TOPO	Laboratoire Histologie-Embriologie Namur	EcoRI
K 10	2039	pGem-3	D.Roop Houston	Pst I
Involucrine	852	pSPORT	R. Eckert Cleveland	Pst I
36B4	700	pGem-4	J. Schalkwijk Nijmegen	Pst I

Tableau M.III : Sondes utilisées pour l'hybridation des Northern blot

l'incubation de 15 min, les échantillons sont vortexés et réincubés pendant 20 min à 65°C. Les échantillons sont ensuite placés sur glace et on y ajoute 2 µl de « sample loading buffer ».

Avant de charger les échantillons sur le gel, celui-ci est polarisé pendant 10 min à 75 Volts. Les échantillons sont déposés dans les puits et migrent pendant 3 heures à 75 Volts. Cette migration permet leur séparation. Après la migration, le gel est lavé 3 fois 10 min dans de l'eau ultra pure afin d'éliminer au maximum le formaldéhyde.

Les ARN sont transférés sur une membrane de nylon (Zeta Probe, GT Bio Rad). Avant son utilisation, La membrane est humidifiée dans l'eau distillée et ensuite dans le tampon de transfert 20X SSC. Le transfert se fait à l'aide du « turbo blotter » (appareillage et filtre Schleicher et Schuell) durant une nuit dans le tampon 20xSSC.

Le lendemain les ARN sont fixés de manière covalente à la membrane par une exposition à des UV à raison de 1500 joules par cm^2 pendant 2min. La membrane est ensuite séchée dans du papier filtre pour sa conservation. La membrane peut aussi être directement utilisée pour l'hybridation de sondes.

2.4.2.2 Révélations des Northern blots : hybridation des membranes par de sondes ADN marquées au ^{32}P

2.4.2.2.1 Matériel

Solution d'hybridation
- Na_2HPO_4 0,12 M
- NaCL 0,25 M
- SDS 7%
- Formamide désionisée 50%
- pH 7,2

20xSSC
- NaCl 2,9 M
- Citrate de sodium 0,29 M

2.4.2.2.2 Méthode

Les ARN messager recherchés sont identifiés sur la membrane par hybridation avec des sondes formées d'ADN complémentaires aux séquences des ARN et dont les dCTP sont marqués par du phosphore 32 en position α (*Tableau M.III*). On peut révéler ces ARN hybridés aux sondes spécifiques par exposition sur un écran de phosphore (storage phosphore screen, Packard). On peut ainsi faire une détection qualitative et quantitative dans un appareil CYCLONE (Packard).

- **Préparation des membranes**

Une fois mouillée, la membrane ne peut sécher, elle est donc emballée dans une feuille de cellophane et est stockée à –20°C. Dans le 2X SSC, la membrane et un treillis en nylon sont superposés. S'il y a plusieurs membranes, on superpose à la première un autre treillis de nylon suivi d'une autre membrane et ainsi de suite. Le treillis permet de laisser passer les différentes solutions utilisées par la suite. Le tout est roulé en cigare de manière à ce que la membrane soit vers l'intérieur du cigare. Le cigare est inséré dans un flacon à hybridation Hybaid contenant un peu de 2X SSC. Le cigare est déroulé afin de bien adhérer sur les parois du flacon. Le flacon est placé sur le rôtisseur dans le four à hybridation (Hybaid) à 43°C. Le

2X SSC est remplacé par 10 ml de solution d'hybridation chauffée à 43°C qui est renouvelée après 2-3 min pour laver le 2X SSC. Cette solution d'hybridation agit pendant 1h à 43°C. Elle va recouvrir les sites non spécifiques de la membrane avant l'hybridation. Ceci permet de diminuer le bruit de fond.

- **Préparation des sondes marquées au ^{32}P**

Les fragments de restrictions, utilisées comme modèle à la fabrication des sondes, sont repris dans le *tableau M.III.*

Les sondes marquées au ^{32}P sont fabriquées par "random priming" (Kit « Random primers DNA labelling system », Invitrogen) à partir de fragments de restriction servant de matrice. 20 ng de fragment de restriction sont dénaturés dans un bain d'eau bouillante pendant 5 min puis immédiatement placés sur glace pour empêcher la réhybridation des deux brins d'ADN. Afin d'obtenir une polymérisation, ces fragments d'ADN déshybridés sont incubés avec des amorces (hexamères synthétisés de manière aléatoire qui pourront s'hybrider au hasard à différents endroits de ces simples brins d'ADN), des nucléotides non marqués (dATP, dGTP, dTTP), des nucléotides marqués au phosphore 32 ((α-^{32}P) dCTP, 500 µCi, Amersham) et une DNA polymérase (le grand fragment de la polymérase I ou fragment de klenow) qui amplifiera les amorces hybridées. On incube ce mélange pendant 1h30 à température ambiante.

La réaction est arrêtée à l'aide du stop buffer (Invitrogen). La radioactivité non incorporée est éliminée par passage du mélange sur une colonne de chromatographie Bio-spin 30 (BioRad). Ceci s'effectue par centrifugation de la colonne à 2500 RPM. La solution récoltée contient la sonde marquée au phosphore 32. Un µl de cette sonde est prélevé mélangé à 100 µl d'eau et 4ml d'Aqualuma pour estimer l'activité incorporée grâce à un compteur à scintillation BECKMAN LS 6000 IC. Une bonne incorporation varie entre 10^5 et 5 x 10^5 cpm.

- **Hybridation de la sonde**

La sonde est prête à être utilisée pour l'hybridation sur la membrane. La sonde est placée 5min dans un bain à ébullition afin de déshybrider les deux brins d'ADN. Elle est directement placée sur glace pour empêcher la réhybridation. La sonde est ensuite mélangée à 10 ml de solution d'hybridation. Après l'heure d'incubation, on remplace la solution d'hybridation se trouvant dans le flacon à hybridation par la solution contenant la sonde. L'hybridation se déroule durant une nuit à 43°C sur le rôtisseur du four à hybridation.

- **Lavage des membranes**

La membrane subit plusieurs lavages après hybridation :
- 3 lavages de 15 min avec de la solution 2X SSC /0,1% SDS à 25°C
- 2 lavages de 15 min avec de la solution 0,5X SSC/0,1% SDS à 43°C
- 2 lavages de 15 min avec de la solution 0,5X SSC/0,1% SDS à 65°C
- L'hybridation des kératines requiert des lavages supplémentaires et plus astringents c'est à dire 3 lavages avec de la solution 0,1X SSC/0,1% SDS à 65°C

Ces lavages se font dans le flacon à hybridation. Ces lavages permettent d'éliminer les sondes accrochées de manière non spécifique.

- **Révélation**

La membrane est ôtée du flacon à hybridation et emballée dans un cellophane. Les membranes sont exposées sur un écran de phosphore (storage phosphore screen, Packard), puis éventuellement, elles sont stockées dans une cellophane à –20°C pour éviter qu'elles ne sèchent.

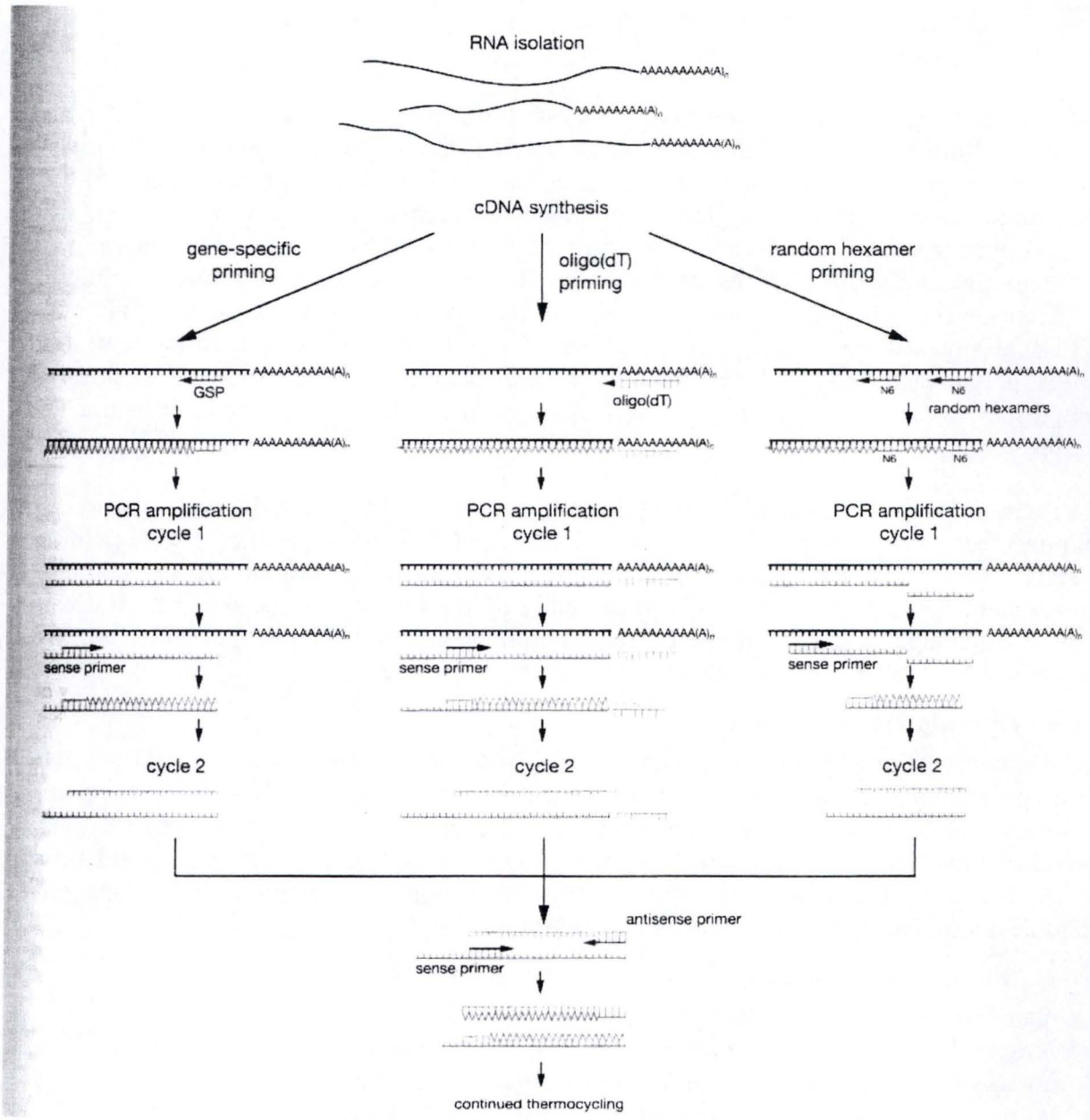


Figure M.2 : Principe de la technique RT-PCR (Reverse transcription plolymerase chain reaction) utilisée dans le but de fabriquer une sonde cDNA spécifique d'un ARNm (Molecular Cloning, 3ème édition, Sambrook et Rusell, 2001).

- **Déshybridation des membranes**

Avant d'effectuer l'hybridation d'une autre sonde, la membrane doit être débarrassée de la sonde précédente. Pour déshybrider la sonde, Les membranes et les treillis de nylon sont superposés et placés dans le flacon à hybridation contenant du 2X SSC comme mentionné ci-avant. Le 2X SSC est vidé et le flacon est rempli de solution de « stripping » préchauffée jusqu'à recouvrir toute la membrane. Le flacon est disposé dans un bain à ébullition 5 min et ceci est répété à nouveau. Après ce deuxième lavage par la solution de « stripping », on rince la membrane avec du 2X SSC. Ensuite la membrane est rincée avec la solution d'hybridation chauffée à 43°C. Finalement une nouvelle solution d'hybridation chauffée à 43°C sera incubée pendant 1h et rendra la membrane réutilisable pour la nouvelle hybridation d'une sonde.

2.5 RT-PCR DE HSP 27

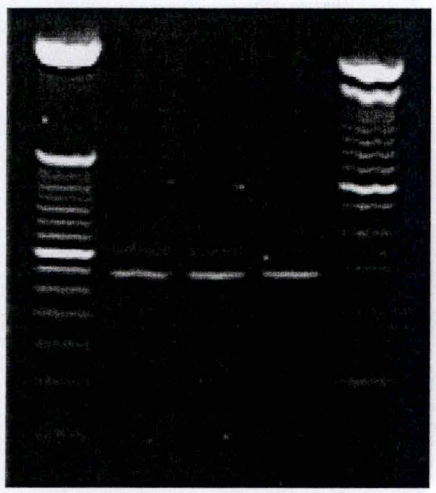
2.5.1 *Matériel*

- Kit RT (Invitrogen) : 5x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCL(ph 8.3), 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), DDT 0.1M, dNTP 10 mM, SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase 200 unités/µl
- Kit PCR (Invitrogen) : PCR Buffer 10x (200 mM Tris-HCl (ph 8.4, 500 mM KCl), dNTP 0.5mM, $MgCl_2$ 50 mM, Taq DNA polymerase 5 unités/µl
- Mix RT (pour 20µl) : 0,1 µg ARN poly-A, 111x First-Strand Buffer, 0.01 M DDT, 0.5 µg Oligo dT, 0.5 mM dNTP Mix, 200 unité SuperScript™ II RT
- Mix PCR (pour 100µl) : 20µl produit RT, PCR Buffer 1x, 0.2 mM dNTP mixture, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 µM primer Mix (pour anti-sens et sens), Taq polymerase 2.5 unités

2.5.2 *Méthode*

La RT-PCR ou « Reverse transcription polymerase chain reaction » consiste à convertir un brin d'ARN en ADN grâce à la RT et d'amplifier cet ADN par PCR (*figure M.2*). Pour notre étude de la HSP27, nous souhaitions disposer une sonde d'ADN pour détecter les ARN messagers au niveau du Northern blot détaillé ci-avant.

La RT-PCR est réalisée grace au *kit Super Script H⁻ Reverse Transcriptase* (Invitrogen). La RT utilise l'ARN, provenant d'extraits cellulaires humains d'ARN messager poly-A, comme matrice pour produire l'ADN complémentaire à partir des amorces sens et anti-sens déterminés préalablement (*figure M.3*). Le bon déroulement de cette opération requiert différents réactifs et conditions d'expérience précises : La **RT** va synthétiser les brins d'ADN complémentaires des **ARNm d'extraits cellulaires** à partir de **dNTP**. Les **oligodT** reconnaissent la queue poly-A des ARNm et font office d'amorce permettant à la RT d'avoir un point de départ. L'activité de la RT est optimale dans des concentrations en **sels** idéales et des conditions réductrices établies par ajout de **DTT**. La réaction se déroule pendant 50 min à 42°C (*figure M.2*).



— 286 bp

Primer sens :
CACGAGGAGCGGCAGGACGAG

Primer anti-sens :
CAGTGGCGGCAGCAGGGGTGG

Figure M.3 : Amplification par RT-PCR d'une séquence de 286 bp spécifique de l'ARNm codant pour HSP27 à partir d'amorces prédéfinies (primer sens et primer anti-sens)

Ensuite, 20 µl du produit de la RT sont utilisés pour la PCR, réalisée à l'aide du kit *Taq DNA Polymerase, recombinant* (Invitrogen). La Taq polymérase va amplifier spécifiquement l'ARNm de HSP27. Cet ARN est reconnu par des amorces sens et anti-sens spécifiques (*figure M.3*) à partir desquelles la taq débute sa polymérisation. La PCR se réalise en plusieurs cycles. Tout d'abord l'échantillon est chauffé à 94°C pendant 5 min afin de deshybrider les brins ARN-cDNA. Après cette première incubation une série de cycles répétitifs suivent et engendrent une augmentation exponentielle du fragment d'intérêt :

1. 94°C, 30 secondes (désappariement des brins)
2. 55°C, 30 secondes (hybridation des amorces)
3. 72°C, 1 min (élongation, température optimale pour la Taq polymerase)

Après le dernier cycle, une dernière étape de 7 min se déroule à 72°C pour compléter les brins incomplets.

Le produit de cette PCR est déposé sur un gel d'agarose pour vérifier la nature du produit d'amplification en vérifiant sa taille (*figure M.3*). La bande peut être prélevée, purifiée (Nucleo Trap Machinery-Nagel) et utilisée telle quelle pour servir de sonde lors de la révélation des Northern Blots. Nous avons cloné le produit de PCR dans E. Coli par l'intermédiaire du vecteur TOPO (Topo® Cloning, Invitrogen™) ce qui nous permet d'amplifier la sonde de HSP27 à volonté. Nous avons également vérifié la séquence de ce fragment. Le séquencage nous a permis de vérifier que le cDNA Cloné est bien spécique à la séquence de la HSP27 humaine.

3. RESULTATS

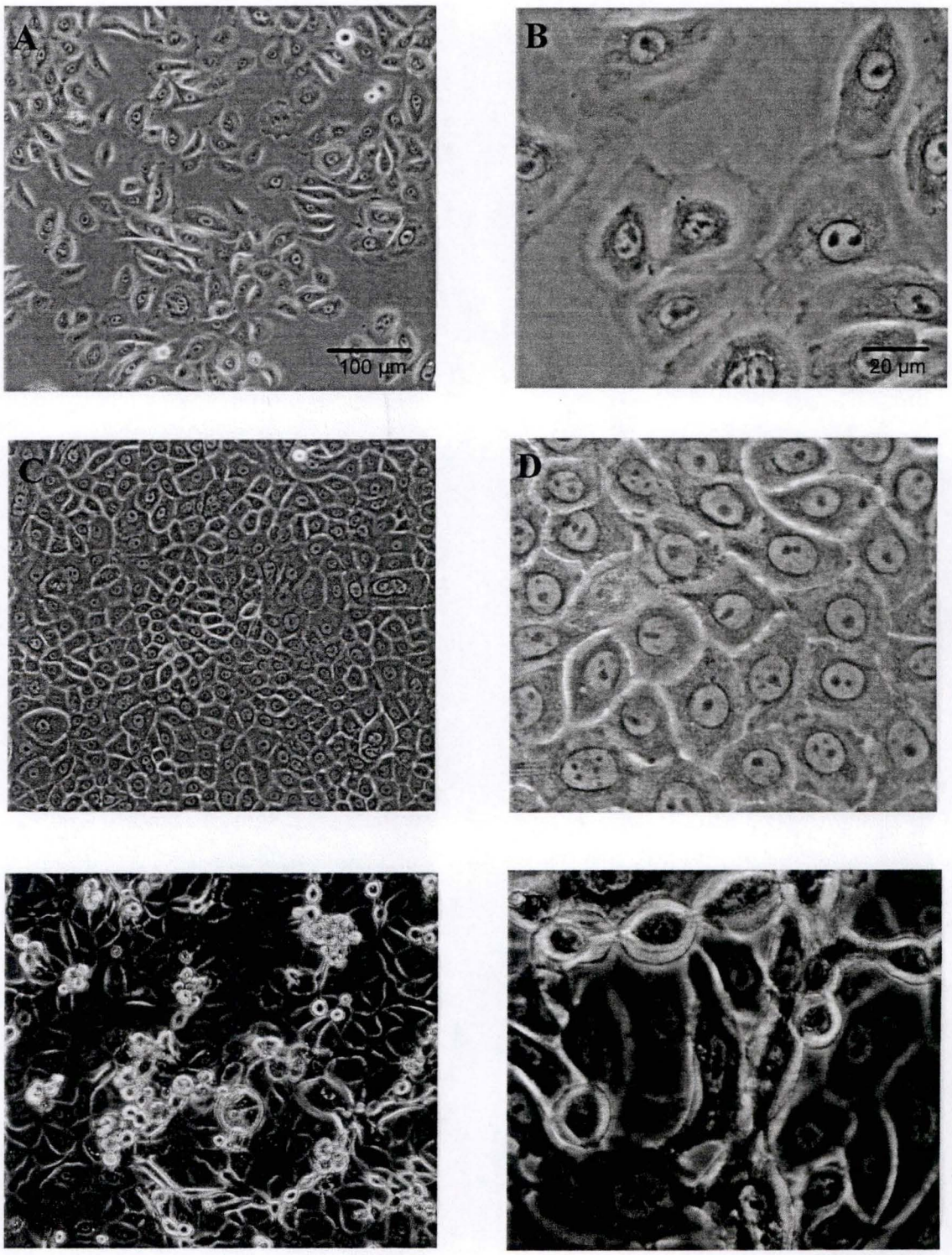


Figure R.1 : Evolution d'une culture de kératinocytes épidermiques humains en immersion au cours du temps. On définit l'état de sous-confluence au moment ou les kératinocytes ont recouvert environ 70-80% de la boîte de culture (**A, B**). Lorsque les cellules recouvrent toute la surface de la boîte, la culture est au stade dit de confluence (**C, D**). Le stade de post-confluence est définit comme étant 4 jours après la confluence (**E, F**). A, C, D : grossissement 10X et B, D, F : grossissement 40X.

3.1 CARACTÉRISATION DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVATION DE HSP27 DANS NOTRE MODÈLE DE CULTURE DE KÉRATINOCYTES ÉPIDERMIQUES HUMAINS EN IMMERSION

Dans cette première partie, nous avons étudié l'expression au niveau ARNm et protéines et l'activation par phosphorylation de HSP27 par les kératinocytes épidermiques au cours de leur différenciation sans aucun traitement particulier. Ensuite, nous avons appliqué divers traitements (modification de la concentration en calcium du milieu, choc thermique, TPA) aux kératinocytes et en avons observé les impacts sur l'expression au niveau des ARNm et protéines ainsi que sur la phosphorylation de HSP27.

Dans les Western blot et les Northern blot portant sur HSP27, nous avons utilisé les cellules MCF-7 en tant que contrôle positif. Cette lignée cellulaire surexprime HSP27. Le TPA a, lui, été utilisé comme contrôle positif de la phosphorylation de HSP27 (Horman et al., 1997).

Au niveau des Western blot, HSP27 est détectée sous deux formes : une forme phosphorylée et une forme totale. L'anticorps utilisé pour la forme phosphorylée reconnaît spécifiquement la sérine 82 phosphorylée qui représente le site de phosphorylation le plus fréquent de cette protéine.

3.1.1 Analyse de l'expression et de l'activation de HSP27 en fonction de la différenciation des kératinocytes épidermiques humains

La différenciation des kératinocytes épidermiques a été étudiée de deux manières : selon la **densité cellulaire** (sous-confluence SC, confluence C et post-confluence PC) et en fonction de la **concentration en calcium du milieu** (0,06 mM et 1,5 mM) tel que Kindas-Mügge et Trautinger (1994) l'ont entrepris.

3.1.1.1 Caractérisation de la différenciation

3.1.1.1.1 Morphologie en microscopie à contraste de phase

Les kératinocytes sont observés régulièrement sous microscope à contraste de phase afin d'observer l'évolution des cultures et de déterminer les divers stades de densité cellulaire à étudier. La *figure R.1* nous montre les caractéristiques d'une culture aux stades de sous-confluence (SC), de confluence (C) et de post-confluence (PC).
A **sous-confluence**, les cellules recouvrent une superficie avoisinant les 80% de la boîte de culture. Les contacts intercellulaires sont réfringents. On détecte la présence de nombreuses

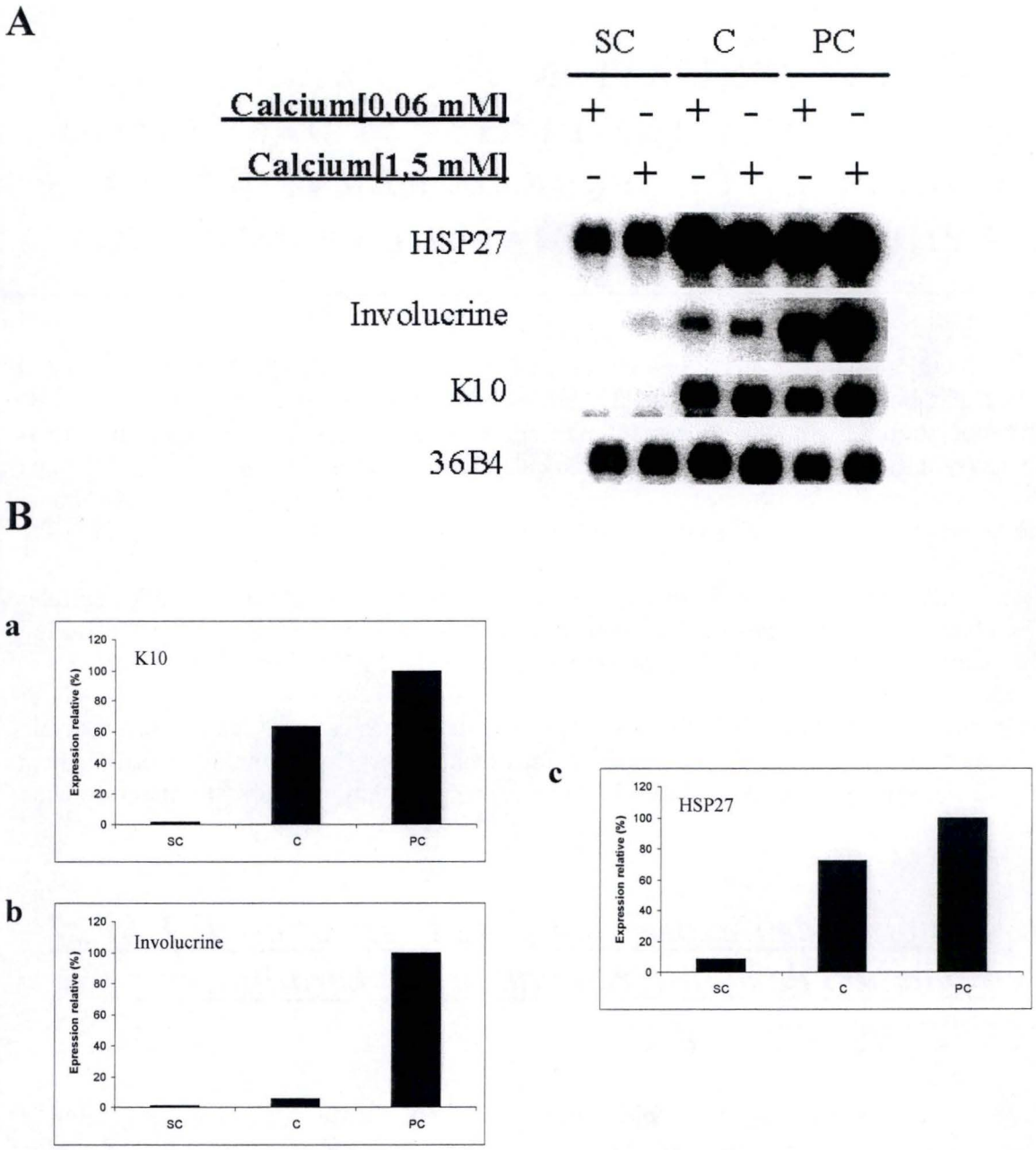


Figure R.2 :
(**A**) Analyse par Northern blot de l'expression des ARNm de kératinocytes épidermiques humains en immersion en fonction de la concentration en calcium du milieu (0,06 mM, condition de base et 1,5 mM, condition test) et de divers stades de culture à savoir la sous-confluence (SC), la confluence (C) et la post-confluence (PC). Sur la même membrane, ont été hybridées les sondes spécifiques pour HSP27, l'involucrine, la kératine 10 (K10) et le 36B4 (utilisé comme contrôle de charge).
(**B**) Quantification densitométrique du taux d'ARNm de la kératine 10 (**a**), de l'involuicrine (**b**) et de HSP27 (**c**) en fonction de divers stades de culture à savoir la sous-confluence, la confluence et la post-confluence à une concentration en calcium de base (0.06mM). Cette quantification a été réalisée à partir de l'intensité des spots du Northern blot du point A. Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression des transcrits du gène 36B4 utilisé comme contrôle de charge. L'expression relative a été calculée en attribuant la valeur de 100 % à l'état de PC.

mitoses indiquant l'état de prolifération des cellules. Les cellules sont plutôt de forme ovale. Elles semblent aussi mobiles pour migrer vers les espaces encore vides (*figure R.1 A, B*).
A **confluence**, les keratinocytes ont recouvert toute la surface de la boîte de culture. Ils sont tassés et de forme polyédrique. Les contacts intercellulaires sont moins réfringents qu'au stade de SC et on peut y déceler des jonctions d'ancrage (*figure R.1 C, D*).
A **post-confluence**, définie comme étant 4 jours après la C, les cellules ont partiellement perdu leur forme polyédrique. Les kératinocytes se stratifient en certains endroits plus réfringents et « desquament » (*figure R.1 E, F*).

3.1.1.1.2 Expression des ARNm des marqueurs de différenciation épidermique

La détermination morphologique des stades de culture atteints est en corrélation avec l'expression de divers marqueurs de différenciation (Poumay et Pittelkow, 1995). Dans cette étude, la kératine 10 et l'involucrine sont les marqueurs de différenciation indicateurs de l'état des cultures de kératinocytes. L'expression des ARNm de ces 2 marqueurs de différenciation par les kératinocytes en fonction de leur densité cellulaire, dans le milieu de base ayant une concentration en calcium de 0,06 mM, est représentée au *point A de la figure R.2.* (les pistes correspondant à une concentration 1,5 mM en calcium sont analysées).

A **sous-confluence**, les kératinocytes n'expriment ni les ARNm codant pour la K10 ni ceux codant pour l'involucrine. Ceci est une caractéristique des cellules de la couche basale de l'épiderme. A **confluence**, la K10, marqueur précoce de la différenciation, est exprimée de manière plus prononcée que ne l'est l'involucrine, marqueur exprimé plus tardivement durant la différenciation épidermique. Ces deux marqueurs sont en effet produits par les kératinocytes en différenciation dans les couches suprabasales. A **post-confluence**, par rapport à la K10, l'involucrine voit son expression fortement augmentée.

Afin de mieux observer l'évolution du taux d'ARNm de ces deux marqueurs de différenciation, Les résultats obtenus pour ce Northern blot sont représentés de manière quantitative sous la forme d'histogrammes. Cette quantification résulte de l'analyse densitométrique de l'expression des ARNm, standardisée par le contrôle de charge représenté par le gène 36B4 (*figure R.2 B*).

3.1.1.2 Expression des ARNm codant pour HSP27 en fonction de la différenciation

3.1.1.2.1 Les états de SC, C et PC

Dans notre modèle de culture de base dont la concentration en calcium du milieu est de 0,06 mM, nous observons qu'une expression basale des ARNm est mise en évidence à SC par hybridation des Northern blots avec l'ADNc spécifique de HSP27 (*figure R.2 A*, les pistes correspondant aux concentrations de 1,5 mM en calcium sont analysées plus loin). Les ARNm de HSP27 sont donc déjà exprimés à SC. Nous remarquons une augmentation du niveau des transcrits de HSP27 lorsque les kératinocytes ont atteint la confluence, c'est-à-dire lorsqu'ils entament le processus de différenciation. Le niveau des transcrits de HSP27 à PC est également plus élevé qu'à SC. Cependant, nous pouvons noter que le taux élevé d'ARNm de HSP27 à C ne semble que peu augmenter lorsque les cellules passent au stade de PC. Ceci

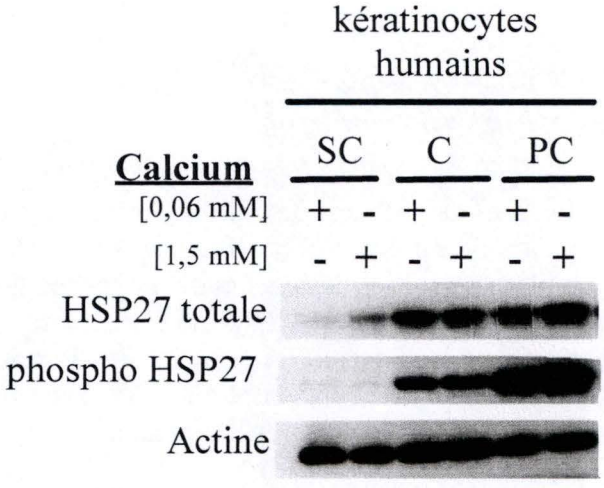


Figure R.3 : Analyse par Western blot de l'expression protéique et de la phosphorylation de HSP27 par des kératinocytes épidermiques humains en immersion en fonction de la concentration en calcium du milieu (0,06 mM, condition de base et 1,5 mM, condition test) et divers stades de la culture à savoir la sous-confluence (SC), la confluence (C) et la post-confluence (PC). L'actine est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier l'homogénéité de la quantité en protéine de chaque piste.

suggère que les ARNm codant pour HSP27 arrivent à un taux maximum dans ces conditions. Ces résultats ont été obtenus 3 fois sur une même souche

Cette augmentation de la quantité d'ARNm codant pour HSP27 entre les états de SC d'une part et d'autre part ceux de C et PC a également été quantifiée par densitométrie des spots du Northern blot dont la représentation sous la forme d'histogrammes est présentée au *point B de la figure R.2*. Ces quantifications nous permettent de mieux apprécier la quantité croissante d'ARNm codant pour HSP27 en fonction de la différenciation de kératinocytes épidermiques.

En résumé, HSP27 est exprimée de manière constitutive dans les kératinocytes normaux étudiés aux divers stades de culture. La quantité relative d'ARNm codant pour HSP27 est plus élevée dans les kératinocytes en différenciation que dans les kératinocytes en prolifération.

3.1.1.2.2 Effet d'une concentration élevée en Ca^{++} du milieu de culture

Pour mimer la différenciation des kératinocytes, Kindas-Mügge et al. (1994) ont exploité une caractéristique de l'épiderme qui serait la présence d'un gradient de concentration en Ca^{++} dans le milieu extracellulaire depuis les couches basales jusqu'à la couche cornée. Ils ont ainsi pu montrer dans leur modèle en immersion que l'augmentation de la concentration en Ca^{++} du milieu induit une augmentation du taux d'ARNm codant pour HSP27 au sein des kératinocytes. Dans notre modèle de culture de kératinocytes épidermiques humains en conditions autocrines, nous utilisons une concentration en Ca^{++} de 0,06 mM. Ces cultures représentent nos conditions de base. Dans nos conditions tests, nous avons élevé la concentration en Ca^{++} du milieu à 1,5 mM durant les dernières 24 heures avant l'extraction des ARNm aux trois stades de culture étudiés. Les résultats obtenus en analysant le taux d'ARNm de HSP27 dans les cultures contrôles et tests, nous montrent que les kératinocytes ne modifient pas clairement l'expression de HSP27 lorsqu'on augmente la concentration en Ca^{++} du milieu que les cellules soient à SC, C ou PC (*figure R.2 A*). Ainsi, nos conditions de travail ne reproduisent pas l'expérience menée par Kindas-Mügge et son équipe (1994), puisque l'augmentation de Ca^{++} ne modifie pratiquement pas l'expression des marqueurs de différenciation épidermiques, une observation récente de Banno et al. (2004) avec les larges microdamiers à ADN. Ces résultats ont été obtenus une fois sur une souche de kératinocytes.

3.1.1.3 Expression protéique et modification post-traductionnelle de HSP27 en fonction de la différenciation

3.1.1.3.1 Les états de SC,C et PC

HSP27 est une protéine présente au sein des kératinocytes mais elle est exprimée et activée de façons différentes en fonction de l'état de la culture comme nous le montre la *figure R.3*. A SC, **HSP27 totale** est exprimée faiblement, mais de manière détectable. L'expression de la forme totale augmente lorsque la culture arrive à des stades de différenciation plus avancés (C et PC). La **forme phosphorylée de HSP27** est également modifiée de façon croissante en fonction du stade d'avancement de la culture. On observe clairement que HSP27 est plus phosphorylée à C qu'à SC et encore davantage, à PC (*figure R.3*). Ces résultats ont été obtenus 5 fois en tout sur 2 souches de kératinocytes différentes.

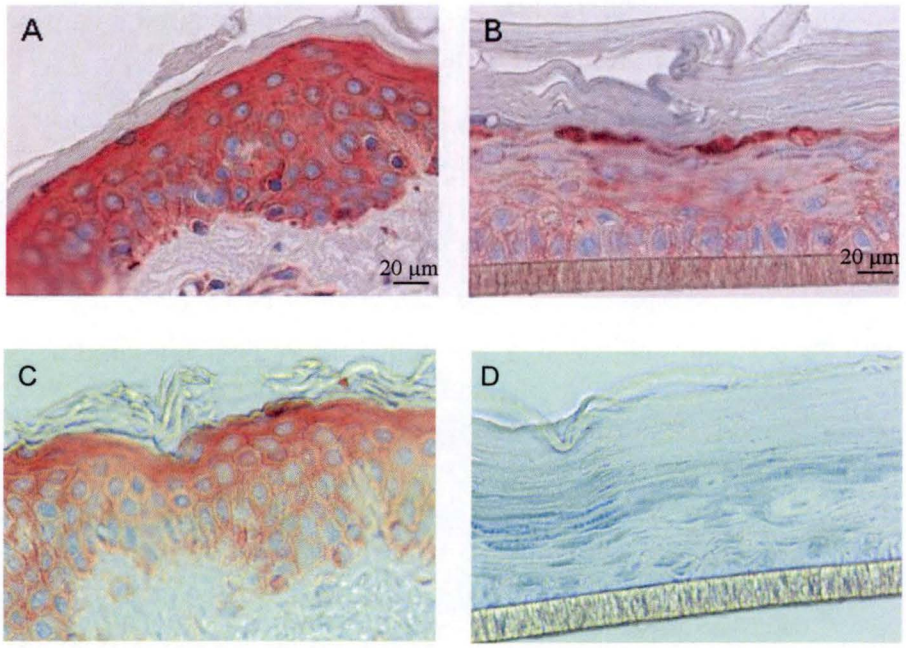


Figure R.4 : Marquage par immunoperoxydase de HSP27 totale au niveau de l'épiderme d'une coupe de peau humaine (**A**) et d'une coupe d'épiderme humain reconstitué *in vitro* (**B**). les contrôles négatifs correspondant : peau humaine (C), peau humaine reconstituée *in vitro* (**D**) (Frédéric Dupont, département d'Histologie-Embryologie, Namur) .

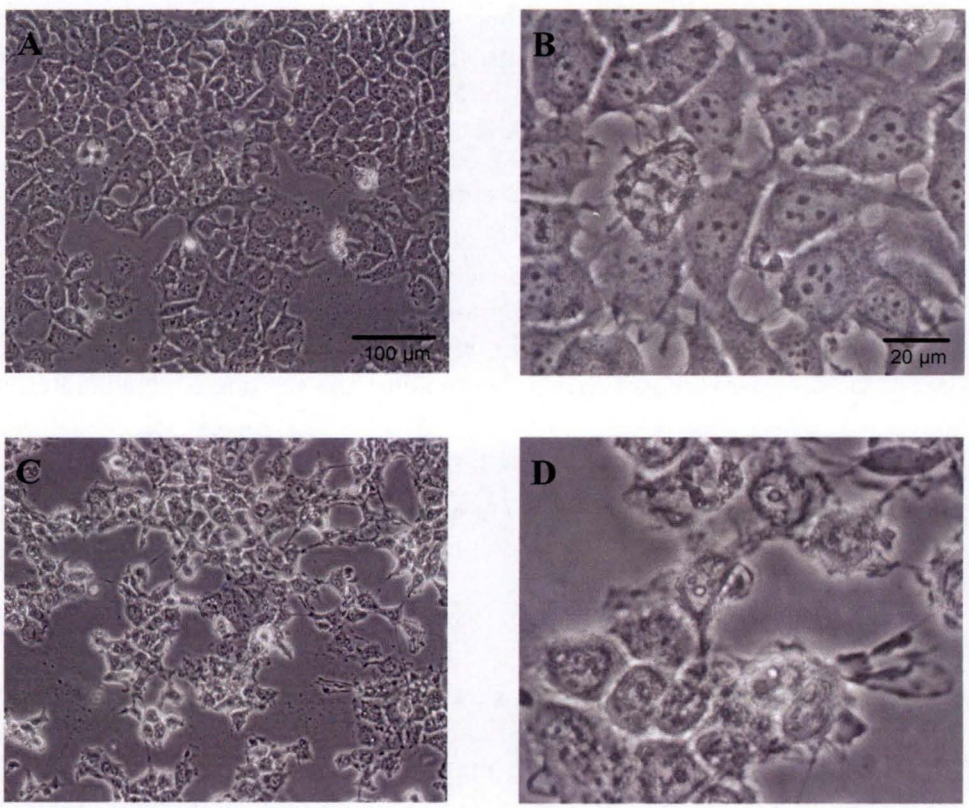


Figure R.5 : Cellules MCF-7 observées en microscopie à contraste de phase. Lorsque ces cellules subissent un choc thermique de quatre heures à 43°C (**C, D**), leur morphologie est modifiée par rapport aux cellules n'ayant pas subi de choc thermique (**A, B**). A, C : grossissement 10X et B, D : grossissement 40X.

3.1.1.3.2 Effet d'une concentration élevée en calcium du milieu de culture

Kindas-Mügge et Trautinger (1994) ont également observé une augmentation de HSP27 au niveau protéique après avoir augmenté la concentration en Ca^{++} du milieu de culture pour induire la différenciation. A nouveau dans notre modèle de culture autocrine de kératinocytes épidermiques en immersion, nous n'avons pas pu mettre en évidence une modification de l'expression protéique de HSP27 par l'augmentation de la concentration en Ca^{++} quel que soit le stade de la culture et quelle que soit la forme (phosphorylée ou non) de HSP27 analysée (*figure R.*3). Tout au plus à SC, HSP27 totale serait augmentée avec l'augmentation de la concentration en Ca^{++}. Cependant dans ce cas, nous soupçonnons que le substrat de révélation n'ait pas été réparti de façon homogène sur l'entièreté des pistes de la membrane. Les résultats de ce Western blot sont donc en corrélation avec ceux que nous avons obtenus au niveau du Northern blot de la *figure R.2*. Ces résultats ont été obtenus une fois à partir de une souche.

En résumé, dans notre modèle de culture, les variations de la concentration en calcium ne semblent pas modifier les taux d'ARNm et de protéines ni l'activation par phosphorylation de HSP27. Cette divergence de nos résultats avec les résultats de Kindas-Mügge et son équipe pourrait résulter d'une différence dans la durée de l'incubation des kératinocytes dans le milieu à haute concentration de calcium. Cette durée est plus longue dans leur protocole (elle est de 8-10 jours).

Cependant, notre étude utilisant différents stades de culture qui imitent la différenciation progressive des kératinocytes épidermiques, nous a permis d'identifier une augmentation de l'expression de HSP27 tant au niveau des transcrits que des protéines mais aussi au niveau de la phosphorylation de HSP27 lors de la différenciation. Ceci rejoint les observations immunohistochimiques faites par Trautinger et al. (1993) ainsi que par Boxman et al. (2002) au niveau de coupes de biopsies de peau. En effet, ces auteurs observent une augmentation de l'expression de la protéine HSP27 depuis la couche basale vers les couches suprabasales de l'épiderme. De même, des marquages de peaux humaines et d'épidermes humains reconstruits sur membrane de polycarbonate réalisés au sein de notre laboratoire montrent également un marquage de HSP27 totale dont l'intensité augmente dans les couches suprabasales (*figure R.4*).

3.1.2 Analyse de l'expression et de l'activation de HSP27 par les kératinocytes épidermiques humains en condition de stress

Pour vérifier l'induction de HSP27 dans les kératinocytes épidermiques, nous avons soumis les cellules à un stress connu pour induire HSP27 dans d'autres cellules. La condition de stress que nous avons sélectionnée est le choc thermique. Pour réaliser ce stress, les kératinocytes (et des cellules MCF-7) arrivés aux stades de culture désirés sont incubés pendant quatre heures à 43°C (Gatto et al., 1992, Maytin et al., 1990). Les contrôles sont représentés par des cultures identiques à SC, C et PC et incubées à 37°C.

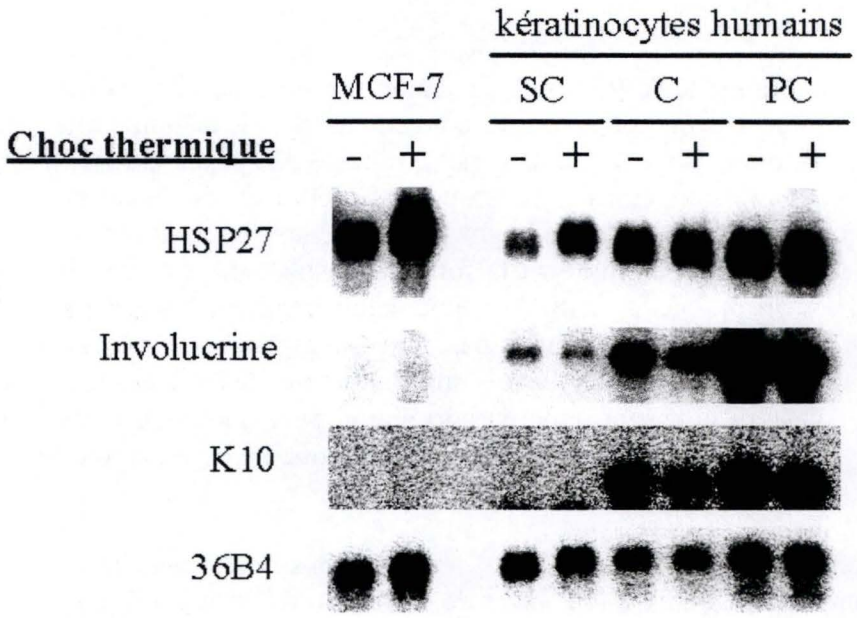


Figure R.6 : Analyse par Northern blot de l'expression des ARNm de kératinocytes épidermiques humains et de cellules cancéreuses (MCF-7) en immersion suite à un choc thermique de 4 heures à 43°C. Les kératinocytes ont été étudiés à divers stades de culture à savoir la sous-confluence (SC), la confluence (C) et la post-confluence (PC). Sur la même membrane, ont été hybridées les sondes spécifiques pour HSP27, l'involucrine, la kératine 10 (K10) et 36B4 (utilisé comme contrôle de charge).

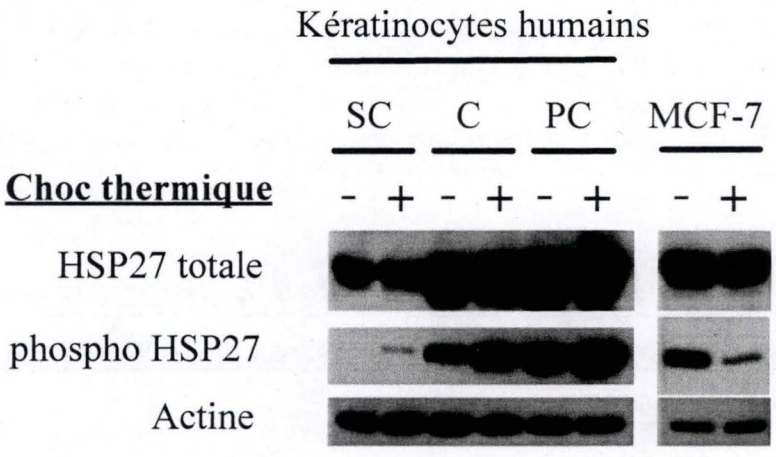


Figure R.7 : Analyse par Western blot de l'expression protéique et de la phosphorylation de HSP27 par des kératinocytes épidermiques humains et des cellules cancéreuses (MCF-7) en immersion suite à un choc thermique de 43°C pendant 4 heures. Les kératinocytes ont été étudiés à divers états de culture à savoir la sous-confluence (SC), la confluence (C) et la post-confluence (PC). L'actine est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier l'homogénéité de la quantité en protéines de chaque pistes.

3.1.2.1 Observation morphologique en microscopie à contraste de phase

En général, la morphologie des kératinocytes n'est pas modifiée après une incubation à 43°C pendant 4 heures, quel que soit le stade de culture auquel ils se trouvent. Une seule souche semblait montrer des contacts intercellulaires plus réfringents suite à ce stress (résultats non montrés).

Par contre, au niveau des cellules MCF-7, nous avons pu voir des différences morphologiques suite à ce choc thermique. Ceci est illustré par les photos de microscopie en contraste de phase de la *figure R.5*. Après un traitement de quatre heures à 43°C, les cellules MCF-7 prennent une forme plus rétractée déjà observable à faible grossissement.

3.1.2.2 Expression des ARNm codant pour HSP27 en réponse à un choc thermique

Notons d'abord que comme obtenu précédemment, l'analyse par Northern blot montre (*figure R.6*) une augmentation de l'expression des ARNm codant pour HSP27 lorsque les kératinocytes passent des stades de SC, C à PC, autrement dit, au cours de leur différenciation.

Lorsque nous comparons les ARNm des kératinocytes incubés à 37°C aux ARNm des kératinocytes en condition de stress thermique, nous remarquons qu'à SC les kératinocytes ayant subi le choc thermique ont un taux ARNm de HSP27 plus élevé que les kératinocytes contrôles (*figure R.6*). A partir du moment où les kératinocytes ont atteint la C, les cellules n'augmentent pas davantage le taux de transcrits de HSP27 après avoir subi un choc thermique. Ainsi, que les kératinocytes se trouvent à C ou à PC, nous ne détectons pas d'induction appréciable au niveau de la quantité en ARNm de HSP27 entre les conditions contrôles à 37°C et de stress à 43°C (*figure R.6*). Ceci peut suggérer que les kératinocytes expriment déjà fortement HSP27 dans ces stades de différenciation et qu'une augmentation supplémentaire de l'expression n'est pas possible (ou détectable). Par contre, le taux d'ARNm de HSP27 à SC étant plus faible, les kératinocytes répondent par une augmentation détectable de l'expression des transcrits suite à ce stress. Ces résultats ont été obtenus une fois à partir d'une souche.

Les cellules MCF-7 ont subi les mêmes conditions de stress que les kératinocytes. Le taux d'ARNm codant pour HSP27 au niveau de ces cellules est fortement augmenté suite au choc thermique (*figure R.6*). Cependant, la littérature nous apprend que ces cellules, surexprimant déjà HSP27, n'augmenteraient pas davantage son expression suite à un choc thermique (Horman et al., 1997). A ce propos, une autre observation intéressante est que, à quantité comparable d'ARNm, vérifiée par le taux d'ARNm du gène 36B4 utilisé comme contrôle de charge, l'expression de HSP27 est semblable ou plus élevée dans les kératinocytes en différenciation que dans les cellules MCF-7 (*figure R.6*). Ces résultats ont été obtenus trois fois.

Cette analyse par Northern blot (*figure R.6*) nous apprend aussi que l'expression des ARNm codant pour l'involucrine semble diminuer en condition de choc thermique, tant au stade de C que de PC. Ce résultat était inattendu, en effet Jans et al. (2004) ont proposé que les

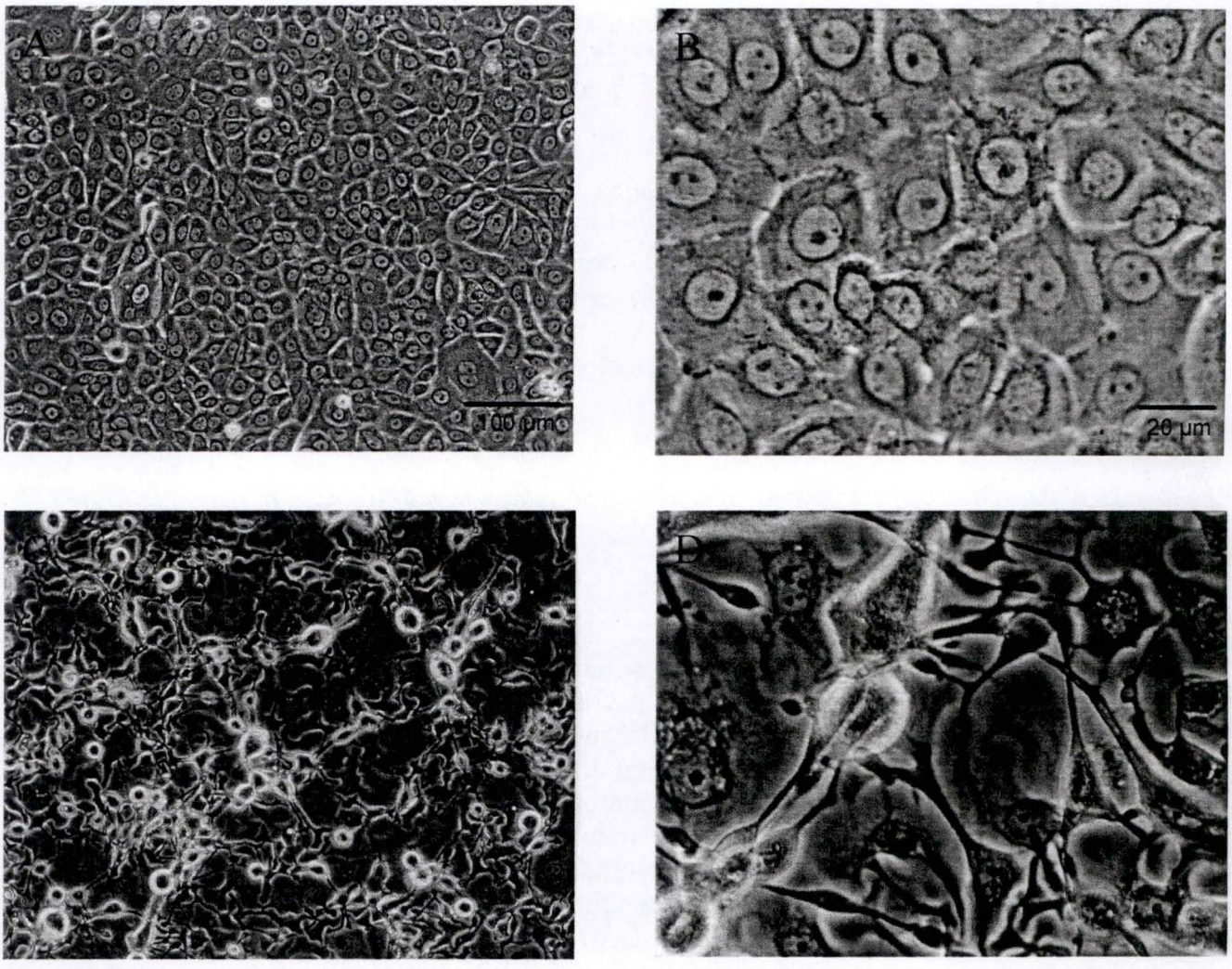


Figure R.8 : Kératinocytes épidermiques humains en immersion au stade de confluence observés en microscopie à contraste de phase. Après un traitement par le 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA) à une concentration de 10 ng/ml pendant 18 heures, les kératinocytes voient leur morphologie altérée (**C, D**) par rapport à la situation contrôle non traitée (**A, B**). A,C : grossissement 10X et B,D : grossissement 40X.

kératinocytes répondent par une augmentation de l'involucrine, lorsqu'ils se trouvent en condition de stress.

3.1.2.3 Expression protéique et modification post-traductionnelle de HSP27 en réponse à un choc thermique

Le Western blot présenté à la *figure R.7*, nous confirme que l'expression de HSP27 totale augmente avec la différenciation des kératinocytes. La différence d'expression protéique est surtout marquée entre la SC et les états de C et PC. Les résultats obtenus précédemment (*figure R.3*) sont reproduits en ce qui concerne l'expression de HSP27 phosphorylée qui augmente également avec la différenciation (*figure R.7*).

Les cellules ayant subi un choc thermique ne semblent pas augmenter l'expression protéique de HSP27 totale lorsqu'on observe un même stade de culture. Au contraire, en ce qui concerne la phosphorylation de HSP27, nous pouvons remarquer une induction entre la situation contrôle et la situation de stress. Cette induction est la plus évidente au niveau des cellules à SC exprimant faiblement HSP27. L'induction est moins nette lorsque les kératinocytes ont atteint la C et la PC caractérisées par des taux plus élevés de HSP27. Les résultats de ce Western blot sont en corrélation avec ceux obtenus par le Northern blot (figure 6). Ceci nous suggère la même remarque : le niveau de HSP27 étant déjà fortement élevé au stade de C et PC, une augmentation n'est pas détectable au contraire de l'état de SC. Ces résultats ont été obtenus deux fois en tout sur deux souches différentes.

En ce qui concerne les cellules MCF-7, le Western blot nous a dévoilé des résultats inattendus, mais reproduits trois fois. L'expression de HSP27 totale n'est pas modifiée par le choc thermique au contraire de la phosphorylation de cette protéine. Cependant nos résultats montrent que la phosphorylation de HSP27 diminue suite à ce choc thermique. Cette observation paraît surprenante, mais est peut-être liée aux changements de morphologie décrits ci-avant (*figure R.5*) qui traduisent peut-être une altération des cellules devenues incapables dans nos conditions de répondre « normalement » à ce stress. Mais rien ne nous permet de l'affirmer.

3.1.3 Analyse de l'expression et de l'activation de HSP27 par les kératinocytes épidermiques humains en réponse à un traitement par le TPA

Le 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA) fait partie des facteurs inducteurs de la différenciation épidermique qui provoquent l'augmentation de l'expression de l'involucrine (Poumay et al., 1999). La littérature suggère que HSP27 est impliquée dans la différenciation des cellules (Mishishita et al., 1991; Shakoori et al., 1992 ; Spector et al., 1993 ; Spector et al., 1994 ; Kindas-Mügge et al., 1994). Comme, dans notre modèle nous observons une augmentation de l'expression de HSP27 dans les stades de différenciation épidermiques les plus avancés (à savoir C et PC), nous avons traité les kératinocytes en immersion par ce stimulateur de la différenciation qu'est le TPA à une concentration de 10 ng/ml pendant 18 heures et nous avons analysé les changements de l'expression et de l'activation de HSP27 suite à ce traitement.

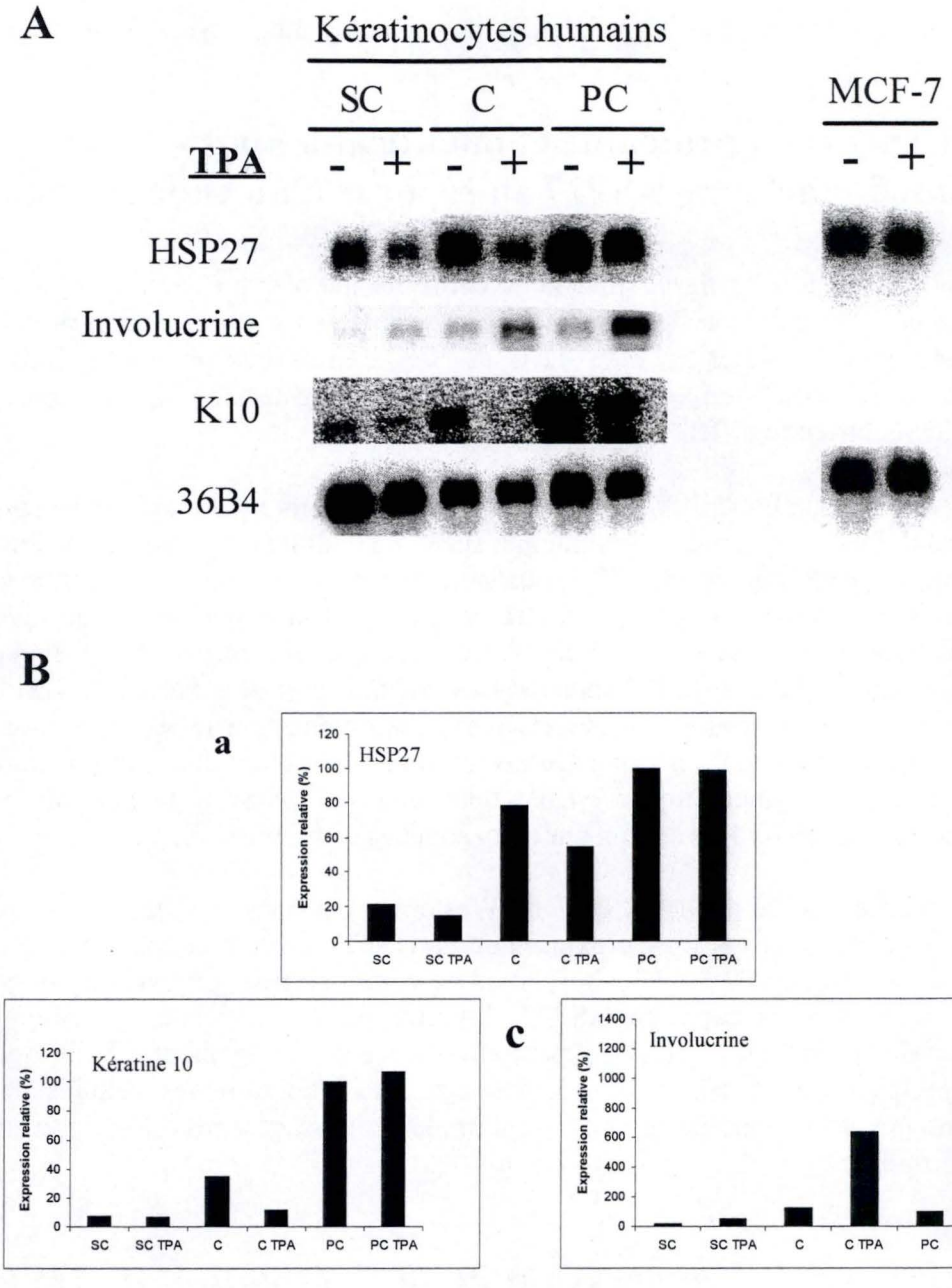


Figure R.9 :

(**A**) Analyse par Northern blot de l'expression des ARNm de kératinocytes épidermiques humains et de cellules cancéreuses (MCF-7) en immersion traités au 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA) à une concentration de 10 ng/ml pendant 18 heures. Les kératinocytes ont été étudiés à divers stades de culture à savoir la sous-confluence (SC), la confluence (C) et la post-confluence (PC). Sur la même membrane, ont été hybridées les sondes marquées spécifiques pour HSP27, l'involucrine, la kératine 10 (K10) et le 36B4 (utilisé comme contrôle de charge).

(**B**) Quantification densitométrique de l'expression des ARNm de HSP27 (**a**), de la kératine 10 (**b**) et de l'involucrine (**c**) en fonction de l'état de la culture (sous-confluence SC, confluence C et post-confluence (PC)) et d'un traitement par le TPA. Cette quantification a été réalisée à partir de l'intensité des spots du Northern blot du point A. Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'expression des transcrits du gène 36B4 utilisé comme contrôle de charge. L'expression relative a été calculée en attribuant la valeur de 100 % à l'état de PC.

3.1.3.1 Observation morphologique en microscopie à contraste de phase

Les effets du traitement par TPA sont d'abord observés au niveau de la morphologie des kératinocytes. C'est au niveau du stade de la C que les effets sont les plus spectaculaires (*figure R.8*). Les cellules, suite à ce traitement au TPA de 18 heures, prennent un aspect allongé et en fuseau. A SC, on observe un grand nombre de cellules dont la morphologie reste comparable à celle des cellules du contrôle, mais d'autres ont l'aspect allongé caractéristique du traitement (résultats non montrés). Mais à C (*figure R.8*), l'effet du TPA est manifeste et la grande majorité des cellules y répondent. A PC, l'effet du TPA est également moins marqué car les cellules post-confluentes présentent déjà une morphologie plus allongée (résultats non montrés).

3.1.3.2 Expression des ARNm codant pour HSP27 en réponse à un traitement au TPA

Il faut tout d'abord noter que l'expression de l'involucrine dans la situation contrôle semble faible au stade de PC par rapport à ce qui est généralement attendu. (*figure R.9 A et B*). L'explication de ceci pourrait être que le stade de C aurait été déterminé un peu trop tôt. L'involucrine, marqueur tardif de la différenciation, ne voit ainsi pas son expression augmentée comme d'habitude à PC. Aussi, l'expression de la kératine 10 est plus faible à C par rapport à la PC que ce que l'on observe généralement.

L'augmentation des ARNm de HSP27 avec la différenciation des kératinocytes est toujours bien détectable. On remarque qu'un traitement par le TPA n'a pas d'effet très marqué sur la synthèse des ARNm de HSP27, mais le TPA semble tout de même diminuer faiblement l'expression des transcrits de HSP27. Ce traitement stimule pourtant la différenciation des kératinocytes car nous observons un taux d'involucrine fortement augmenté par rapport aux situations contrôles. L'expression des ARNm de HSP27 ne serait donc pas strictement liée à la différenciation épidermique. Ces résultats ont été obtenus une fois à partir d'une souche de kératinocytes.

Ces données sont représentées de manière quantitative, sous la forme d'histogrammes (*figure R.9 B*). Ils ont été obtenus par quantification des spots du Northern blot et standardisation par rapport à l'expression en ARNm du gène 36 B4 utilisé comme contrôle de charge.

Remarquons par ailleurs que le traitement par le TPA des cellules MCF-7 (*figure R.9 A*) ne modifie pas le taux des ARNm codant pour HSP27.

3.1.3.3 Expression protéique et modification post-traductionnelle de HSP27 en réponse à un traitement au TPA

A nouveau dans ces résultats nous reproduisons l'augmentation de l'expression de la protéine HSP27 et de sa phosphorylation au cours de la différenciation des kératinocytes (*figure R.10*).

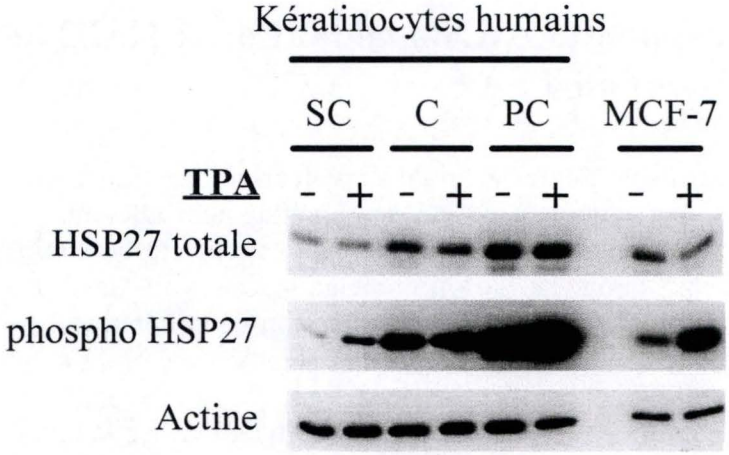


Figure R.10 : Analyse par Western blot de l'expression protéique et de la phosphorylation de HSP27 par des kératinocytes épidermiques humains et des cellules cancéreuses (MCF-7) en immersion suite à un traitement au 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA) pendant 18 heures. Les kératinocytes ont été étudiés a divers stades de culture à savoir la sous-confluence (SC), la confluence (C) et la post-confluence (PC). L'actine est utilisée comme contrôle de charge afin de vérifier l'homogénéité de la quantité en protéine de chaque puits.

Les résultats obtenus pour le TPA au niveau protéique sont assez semblables aux effets obtenus par le choc thermique. Le traitement par le TPA des kératinocytes ne modifie pas l'expression protéique de HSP27, quel que soit le stade de la culture qui est atteint. Nous observons néanmoins une augmentation de la phosphorylation de HSP27 en réponse à un traitement par le TPA. Lorsque les cellules sont encore au stade de SC, la différence est la plus marquée : une augmentation manifeste de la phosphorylation est observable suite à un traitement par le TPA. Cet effet du TPA sur la phosphorylation de HSP27 est moins évident lorsque les cellules sont à C et PC (*figure R.10*). Ces résultats ont été obtenus deux fois en tout sur deux souches différentes de kératinocytes.

Les cellules MCF-7, comme nous le montre la *figure R.10*, répondent également à ce traitement par une phosphorylation de HSP27, alors que le niveau de HSP27 totale n'est pas modifié par le TPA. Ceci correspond à des résultats déjà publiés pour ces cellules (Horman et al., 1997). Ces résultats ont été obtenus trois fois.

3.1.4 Localisation intracellulaire de HSP27 dans les kératinocytes en réponse à un traitement par le TPA et à un choc thermique

Pour terminer la caractérisation de HSP27 dans les kératinocytes cultivés en immersion, nous avons localisé cette protéine dans les différentes conditions étudiées précédemment. La littérature nous informe sur une relocalisation nucléaire de HSP27 dans les kératinocytes en réponse à divers stress (Wong et al., 2000 ; McClaren et al., 1994 ; Shi et al., 2003). Nous avons étudié cette éventuelle relocalisation suite à un choc thermique ou suite à un traitement par le TPA.

La culture marquée a été menée à un état environnant la C car sur les lamelles les kératinocytes se répartissent de manière moins homogène que dans les boîtes de culture. Dès lors à certains endroits de la lamelle (principallement les bords), les kératinocytes ne sont pas encore à C alors qu'à d'autres endroits (le centre), les cellules ont déjà dépassé la C. Notons que le marquage était hétérogène au sein des lamelles. C'est au niveau des bords de lame, où les cellules sont juste à confluence et parfois pas encore, que nous avons observé des marquages plus ciblés. Au centre de la lamelle, où les kératinocytes sont déjà à post-confluence, le marquage était assez homogène mais diffus au sein des cellules.

Notre première constatation est donc d'observer une présence de HSP27, diffuse à travers toute la cellule dans les kératinocytes à des stades avancés de différenciation (résultats non montrés). Au contraire, dans les stades de confluence moins avancés, HSP27 semble localisée en certains endroits plus précis de la cellule (*Figure R.11*).

Dans les **cultures contrôles** (*figure 11 A et B*), la forme totale de HSP27 est localisée dans le cytoplasme et semble concentrée sous forme de granules dans les parties corticales des kératinocytes. Ceci pourrait s'expliquer par le rôle qu'on attribue à HSP27 au niveau du cytosquelette d'actine (Lavoie et al., 1995). Les noyaux sont quant à eux exempts de marquage (*figure R.11 A*). La forme phosphorylée de HSP27 est présente principalement dans le cytoplasme et ne semble pas concentrée en périphérie comme nous l'observons pour la forme totale. Les noyaux ne sont pas marqués. On remarque également que le cytoplasme de

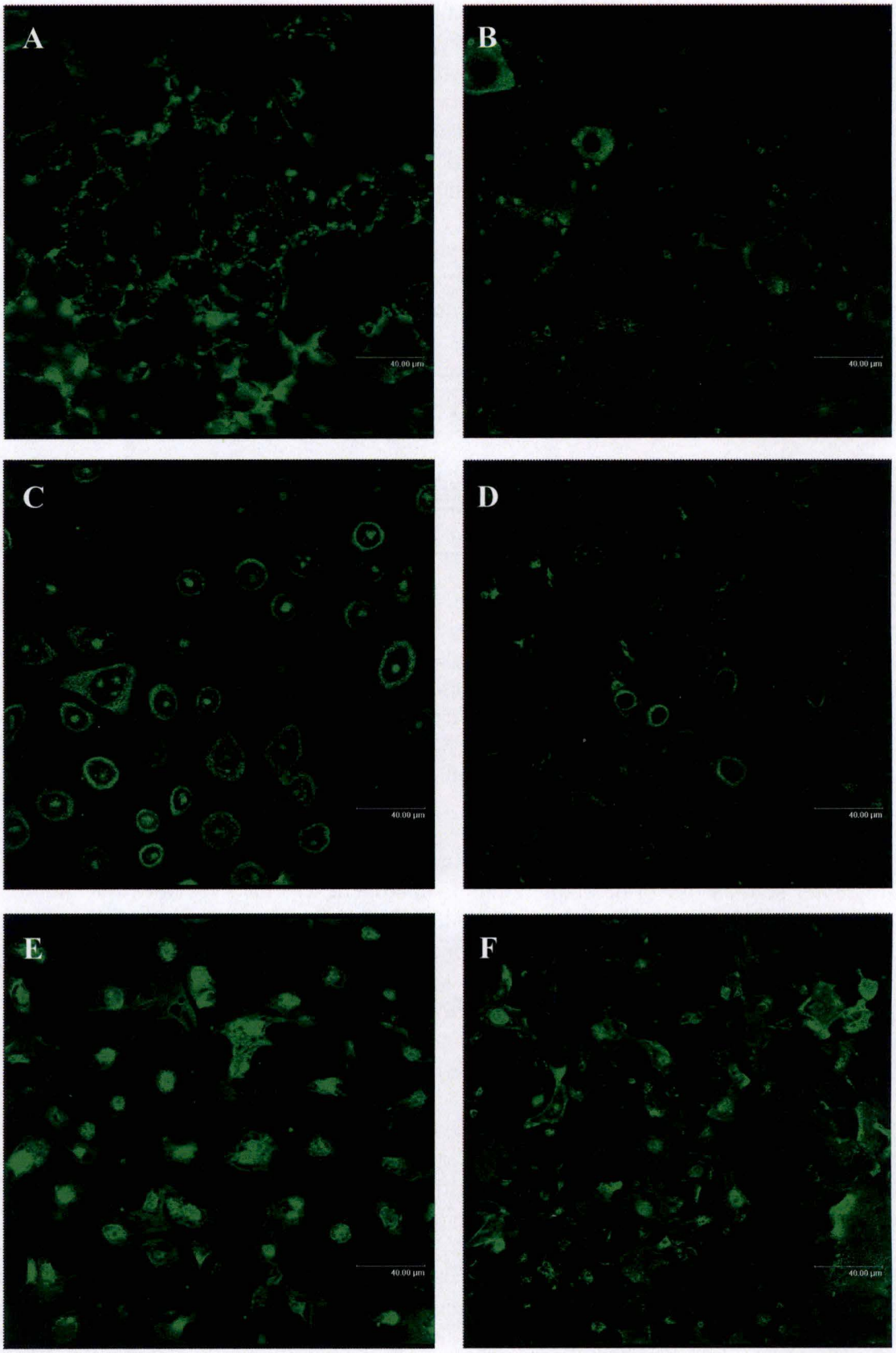


Figure R.11: Marquage de HSP27 totale (**A, C, E**) et de HSP27 phosphorylée (**B, D, F**) en immunofluorescence dans des kératinocytes épidermiques humains à confluence : (**A, B**) les kératinocytes n'ont subi aucun traitement ; (**C, D**) les kératinocytes ont subi un choc thermique de quatre heures à 43°C; (**E, F**) Les kératinocytes ont été traités 18 heures au TPA. Le grossissement est le même pour toutes les figures.

certaines cellules est légèrement plus marqué que celui d'autres cellules par l'anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de HSP27 (*figure R.11 B*). Après un **choc thermique** (*figure R.11 C et D*), HSP27 sous sa forme totale et phosphorylée est observée sous forme d'agrégats partiellement dans les noyaux, qui ne sont donc plus tout à fait exempts de marquage. Ceci rejoint les résultats obtenus sur des kératinocytes suite à un traitement aux UV et à l'arsenite de sodium par Wong et al. (2000) ainsi que Shi et al. (2003). Suite au choc thermique, HSP27 sous sa forme totale et phosphorylée est également relocalisée dans la région périnucléaire (*figure R.11 C et D*). Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Lavoie et al. (1995) sur une lignée cellulaire de hamsters chinois (CCL39) suite à un choc thermique. Notons encore que HSP 27, après un choc thermique, n'est plus concentrée en périphérie de la cellule (*figure R11 C et D*). Lorsque les kératinocytes ont été traités par le **TPA**, nous observons une relocalisation claire de HSP27 sous sa forme totale et phosphorylée dans le noyau des kératinocytes (*figure R.11 E et F*). Le cytoplasme est cependant également marqué dans ces cellules mais de manière moins intense que les noyaux.

En conclusion, HSP27 totale est observée en périphérie dans les cellules non traitées où elle pourrait être couplée à l'actine et empêcherait sa polymérisation. Elle se trouve également dans le cytoplasme. En dehors de stress, HSP27 phosphorylée est dans le cytoplasme. En effet, lorsqu'elle est phosphorylée HSP27 se détache de l'actine (Lavoie et al, 1995), nous ne la retrouvons donc plus en périphérie. En condition de stress HSP27 est phosphorylée et se détache ainsi de l'actine, elle n'est plus présente dans les régions corticales. HSP27 en condition de stress est également relocalisée dans le noyau et autour de celui-ci. La localisation périnucléaire pourrait peut-être être expliquée par l'effet dénaturant du choc thermique sur les protéines. Comme l'ont déjà montré plusieurs auteurs, les protéines seraient alors associées à des structures nucléaires suite à l'effet dénaturant du choc thermique (Lavoie et al., 1995). Mais cette hypothèse nous semble peu probable.

HSP27 est présente dans la périphérie des kératinocytes non traités, dans les cellules les moins confluentes qui sont encore migratrices. Dans les kératinocytes les plus confluents, HSP27, beaucoup plus exprimée, semble présente partout dans la cellule et les cellules, ayant déjà bien entamé le processus de différenciation, ne sont plus migratrices.

3.1.5 Synthèse des observations

Au vu des résultats obtenus ci-avant, nous avons retenu plusieurs informations importantes afin d'entreprendre la deuxième partie de ce travail. HSP27 voit son niveau d'ARNm, de protéines et de phosphorylation augmenter lorsque les kératinocytes évoluent vers des stades de culture de plus en plus avancés (SC, C et PC), autrement dit lorsque les kératinocytes se différencient. L'atteinte de la confluence induit l'augmentation de l'expression des transcrits, de l'expression protéique ainsi que de la phosphorylation de HSP27. Ces résultats sont également vérifiés par les marquages immunohistochimiques des coupes de peau humaine et d'épiderme humain reconstitué.

Le choc thermique augmente le taux d'ARNm codant pour HSP27 dans les kératinocytes sous-confluents. Dans les états de C et de PC, le taux d'ARNm étant déjà élevé, le choc thermique ne semble pas l'augmenter davantage. Un traitement des kératinocytes par le TPA ne modifie pas de façon claire les niveaux d'expression d'ARNm codant pour HSP27, que les kératinocytes soient en prolifération ou en différenciation. Bien que cette substance induise

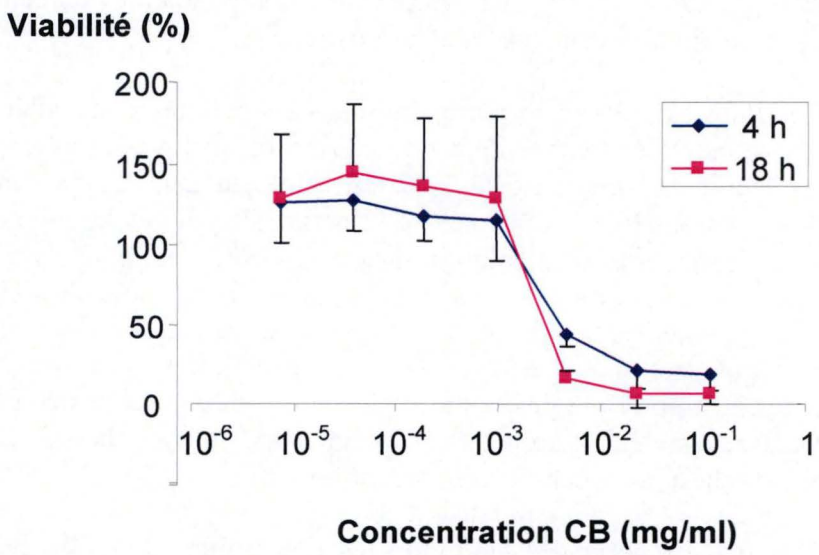


Figure R.12 : Viabilité de kératinocytes épidermiques humains à sous-confluence en fonction de diverses concentrations en chlorure de benzalkonium dans le milieu de culture (CB) et du temps d'incubation des cellules à ces concentrations (4 heures et 18 heures).

l'expression de l'involucrine, marqueur tardif de la différenciation, elle n'induit pas pour autant l'expression de HSP27.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence que la phosphorylation de HSP27 était augmentée lorsque les kératinocytes subissent un choc thermique ou un traitement par le TPA. L'expression de la forme totale de HSP27 n'est pas modifiée par ces stress. Les modifications que nous avons détectées au niveau des transcrits et des protéines sont les plus manifestes lorsque les kératinocytes sont encore au stade de SC, autrement dit en état de prolifération.

3.2 ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVATION DE HSP27 DANS LES KÉRATINOCYTES ÉPIDERMIQUES HUMAINS EN IMMERSION EN RÉPONSE À UN TRAITEMENT PAR LE CHLORURE DE BENZALKONIUM

Dans la deuxième partie de notre travail, nous analysons les effets d'un irritant cutané, le chlorure de benzalkonium (CB), sur l'expression et l'activation de HSP27 par les kératinocytes épidermiques. Ces résultats nous donneront des indications sur la potentialité de HSP27 en tant que marqueur d'irritation cutanée. Nous voudrions savoir si l'expression et/ou l'activation de HSP27 par les kératinocytes sont modifiées suite à un traitement par le chlorure de benzalkonium.

Au vu des résultats précédents, nous avons décidé de traiter les kératinocytes par l'irritant lorsque ces cellules sont au stade de la **sous-confluence,** autrement dit lorsque les kératinocytes sont toujours en prolifération. En effet, c'est à ce stade que nous avons vu les réponses les plus nettes et détectables quant à la phosphorylation de HSP27 et quant à son expression, lorsque des kératinocytes ont été stressés par un choc thermique ou par le TPA.
Les durées de traitement par le chlorure de benzalkonium ont été fixées à **4 heures** et à **18 heures**. Un traitement de 4 heures permet de faire un parallélisme avec le choc thermique de 4 heures appliqué précédemment, au bout duquel une réponse au niveau des ARNm et de la phosphorylation de HSP27 peut déjà être observée. Un traitement de 18 heures est la durée utilisée classiquement avec le TPA, pour laisser le temps aux cellules de produire de nouveaux ARNm et engendrer la synthèse de nouvelles protéines.

En premier lieu, nous avons déterminé, via des tests MTT qui nous renseignent sur la viabilité cellulaire, les concentrations en chlorure de benzalkonium auxquelles nous traiterons les kératinocytes sous-confluents. Ensuite, nous avons observé la réponse cellulaire en étudiant les taux d'ARNm par Northern blot, et en analysant les protéines par Western blot.

Traitement de 4 heures Traitement de 18 heures

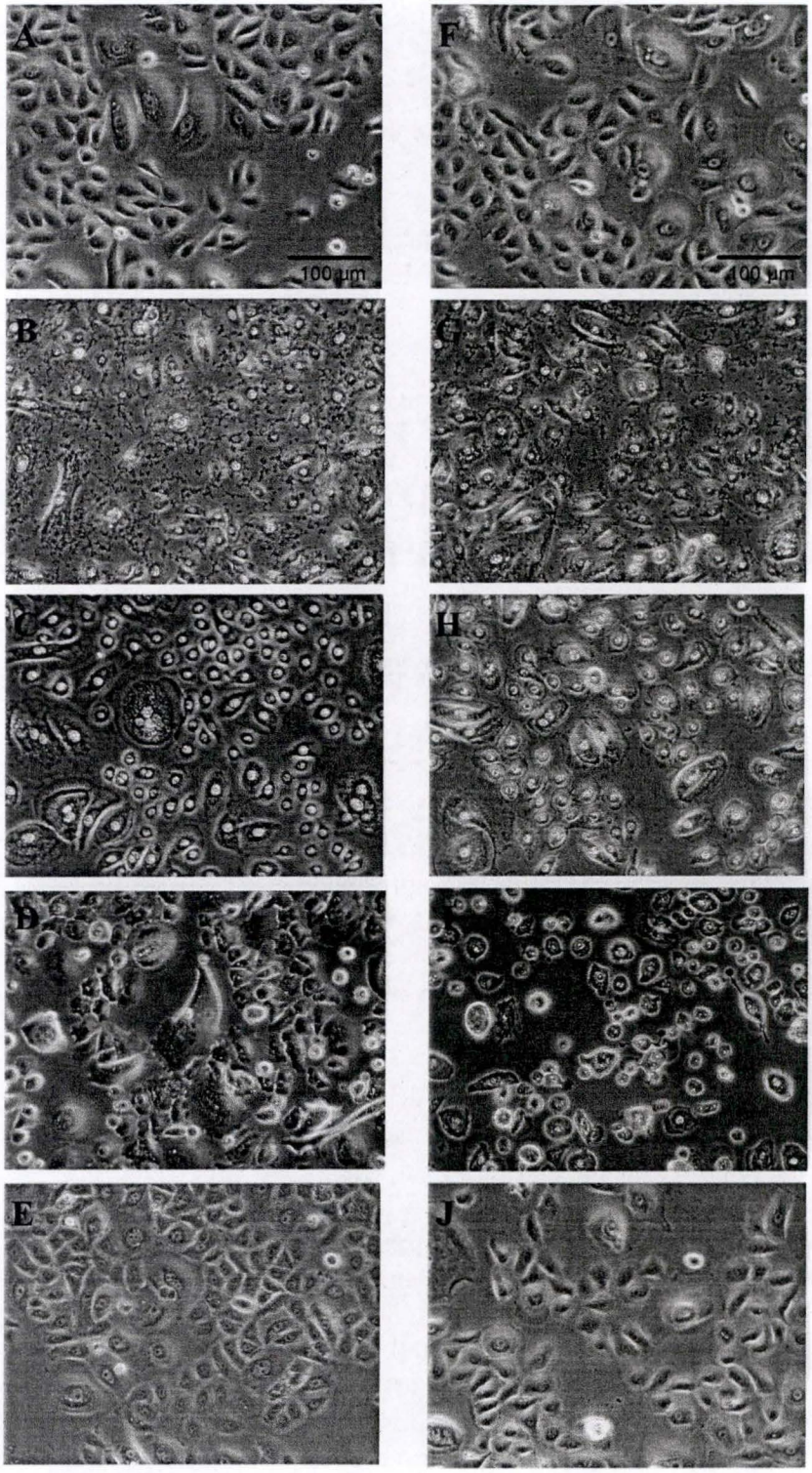


Figure R.13 : Kératinocytes épidermiques humains observés en microscopie à contraste de phase ayant subit un traitement de 4 (**A, B, C, D, E**) ou 18 (**F, G, H, I, J**) heures à diverses concentrations en chlorure de benzalkonium (mg/ml): 0 (**A, F**) ; $1{,}17 \times 10^{-1}$ (**B, G**) ; $2{,}34 \times 10^{-2}$ (**C, H**); $4{,}69 \times 10^{-3}$ (**D, I**) ; $9{,}38 \times 10^{-4}$ (**E, J**). Le grossissement est de 10X pour toutes les figures.

3.2.1 Etude de la viabilité cellulaire en fonction de la concentration en chlorure de benzalkonium : détermination des concentrations à utiliser

Comme précisé lors de l'introduction de ce travail, nous souhaitons traiter les kératinocytes à des concentrations en chlorure de benzalkonium (CB) ne modifiant pas la viabilité cellulaire et donc ne provoquant pas la libération d'IL-1 et la mort cellulaire. Les concentrations en CB à choisir sont donc juste inférieures aux concentrations altérant la viabilité des kératinocytes. Avec de telles concentrations de chlorure de benzalkonium, nous espérons obtenir des modifications moléculaires quant à l'expression et l'activation de HSP27 sans toutefois modifier la viabilité des kératinocytes. En effet, rappelons que des résultats concernant des irritants utilisés à des concentrations n'altérant pas la morphologie cellulaire (sodium lauryl sulfate ou SLS et CB) et appliqués sur des prélèvements de peau ont permis de soulever que HSP27 serait un marqueur potentiel de l'irritation cutanée (Boxman et al., 2002).

La *figure R.12*, obtenue à partir des tests MTT, représente la viabilité de kératinocytes à SC en fonction de différentes concentrations en chlorure de benzalkonium. Cette viabilité a été étudiée pour deux durées de traitement différentes à savoir 4 heures et 18 heures. Les concentrations en chlorure de benzalkonium utilisées pour ces tests sont les suivantes : $1{,}17x10^{-1}$; $2{,}34x10^{-2}$; $4{,}69x10^{-3}$; $9{,}38x10^{-4}$; $1{,}8x10^{-4}$; $3{,}7x10^{-5}$ et $7{,}5x10^{-6}$ (mg/ml). Ces valeurs sont séparées les unes des autres par un facteur de dilution cinq. Nous observons sur ce graphique une nette chute de la viabilité entre $4{,}69x10^{-3}$ et $2{,}34x10^{-2}$ mg/ml de CB. Que le traitement ait duré 4 heures ou 18 heures, cette perte de viabilité importante est observable. Nous pouvons remarquer qu'avec 4 heures de traitement au CB, dans les gammes de concentration pour lesquelles la viabilité diminue, cette perte de viabilité est plus modérée que pour 18 heures de traitement au CB. Autrement dit, la viabilité cellulaire en fonction de la concentration en CB semble diminuer moins brutalement lorsque le traitement a une durée de 4 heures par rapport à un traitement d'une durée de 18 heures.

Ces résultats chiffrés peuvent être mis en parallèle avec les images morphologiques correspondantes observées en microscopie à contraste de phase (*figure R.13*). Que le traitement ait duré 4 heures ou 18 heures, la morphologie des cellules traitées par rapport à celle des cellules non traitées faisant office de contrôle se voit modifiée à partir de la concentration de $4{,}69x10^{-3}$ mg/ml en CB (*figure R. 13 D et I*). Pour les concentrations plus faibles, la morphologie est inchangée (*figure R.13 E et J*). Lorsque les cellules sont traitées avec la concentration la plus élevée en CB, nous observons la présence de débris cytoplasmiques dans le milieu extracellullaire (*figure R.13 B et G*). Lorsque la concentration en CB est cinq fois plus diluée, elle est de $2{,}34x10^{-2}$ mg/ml, les cellules sont arrondies et complètement détachées les unes des autres (*figure R.13 C et H*). On peut remarquer une différence de la morphologie des cellules pour la concentration en CB de $4{,}69x10^{-3}$ mg/ml entre les kératinocytes ayant subit un traitement de 4 heures et ceux ayant subit un traitement de 18h. Après 18h pour une concentration en CB de $4{,}69x10^{-3}$ mg/ml, l'aspect des kératinocytes ressemble à celui observé pour la concentration de $2{,}34x10^{-2}$ mg/ml. Par contre, après seulement 4 heures de traitement, les kératinocytes n'ont pas encore atteint cet aspect de cellules arrondies et détachées. Ils semblent encore jointifs les uns aux autres en certains endroits et présentent un aspect sinueux, voire dentelé, au niveau de leur membrane (*figure R.13 D et I*). Une observation plus régulière des kératinocytes, traités au CB à une concentration de $4{,}69x10^{-3}$ au fil du temps à partir du début du traitement jusqu'à ce que les

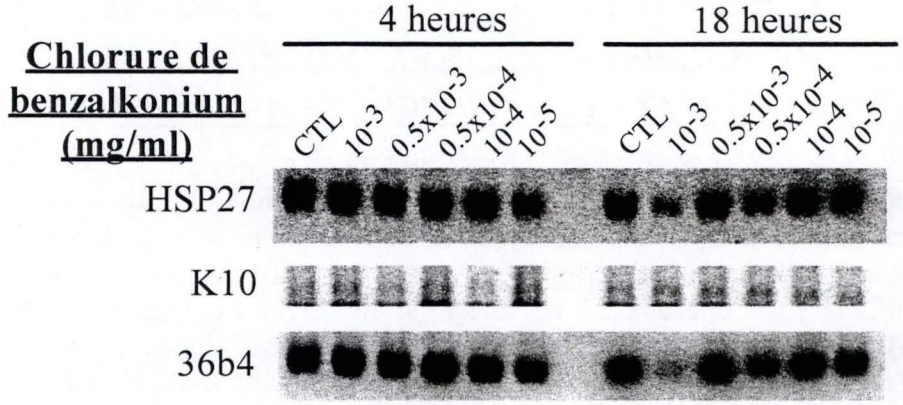


Figure R.14 : Analyse par Northern blot de l'expression des ARNm de kératinocytes épidermiques humains en immersion au stade de sous-confluence traités au chlorure de benzalkonium à diverses concentrations pendant des temps différents (4h et 18h). Sur la même membrane, ont été hybridées les sondes spécifiques pour HSP27, kératine 10 (K10) et 36B4 (utilisé comme contrôle de charge).

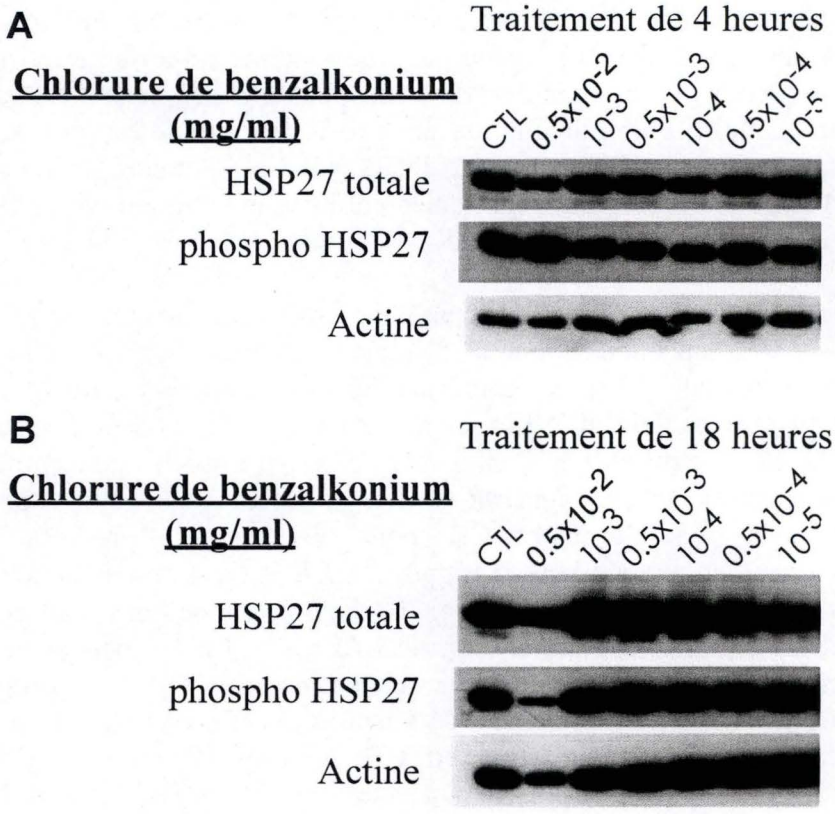


Figure R.15 : Analyse par Western blot de l'expression protéique de HSP27 sous ses formes totale et phosphorylée par des kératinocytes épidermiques humains en fonction de la concentration en chlorure de benzalkonium (CB) et de la longueur du traitement, à savoir 4 heures (**A**) et 18 heures (**B**).

cellules soient complètement détachées les unes des autres, pourrait nous en apprendre plus sur ce phénomène.

D'après les résultats des tests MTT obtenus avec les kératinocytes à SC, pour observer les éventuelles modifications de l'expression de HSP27 lors d'un stress irritant, nous avons décidé de traiter les cellules à SC aux concentrations en CB suivantes: $1x10^{-3}$; $0,5x10^{-3}$; $1x10^{-4}$; $0,5x10^{-4}$; $1x10^{-5}$ mg/ml.

3.2.2 Analyse de l'expression et de l'activation de HSP27 par les kératinocytes épidermiques humains en réponse à un traitement par le chlorure de benzalkonium

3.2.2.1 Observation morphologique en microscopie à contraste de phase

Les kératinocytes traités aux concentrations $1x10^{-3}$; $0,5x10^{-3}$; $1x10^{-4}$; $0,5x10^{-4}$; $1x10^{-5}$ mg/ml en chlorure de benzalkonium ne présentent pas de changement au niveau de leur morphologie, que ce soit après 4 heures ou 18 heures de traitement.

3.2.2.2 Expression des ARNm codant pour HSP27 en réponse à un traitement par le chlorure de benzalkonium

L'analyse par Northern blot des ARNm codant pour HSP27, présenté à la *figure R.14*, nous informe que l'expression des transcrits de HSP27 n'est pas modifiée par les concentrations en CB que nous avons testées sur les kératinocytes au stade de la SC. Que le traitement ait duré 4 heures ou 18 heures, le taux d'ARN reste inchangé par rapport à la situation contrôle n'ayant pas subi de traitement. Le niveau d'ARNm codant pour HSP27 ne peut donc pas, dans ces conditions, nous informer sur la présence du CB au contact des cellules.

3.2.2.3 Expression protéique et modification post-traductionnelle de HSP27 en réponse à un traitement au chlorure de benzalkonium

Une première souche de kératinocytes étudiée ne nous a pas permis de mettre en évidence une modification de la quantité de la protéine HSP27 totale, ni de sa phosphorylation, après traitement des cellules avec le chlorure de benzalkonium aux temps et concentrations déterminées et pendant les durées d'incubation choisies (résultats non montrés).
Nous avons ensuite reproduit ces expériences sur une deuxième souche de kératinocytes afin de confirmer ces résultats. Nous avons de plus ajouté dans cette expérience une concentration en chlorure de benzalkonium, que nous savions cytotoxique pour les kératinocytes, il s'agit de $0,5x10^{-2}$ mg/ml, afin de détecter une éventuelle réponse dans l'expression de HSP27.

Comme le montre la *figure R.15*, nous ne détectons pas de différence au niveau de HSP27 totale ni de sa phosphorylation pour les cinq concentrations en CB déjà testées sur la première

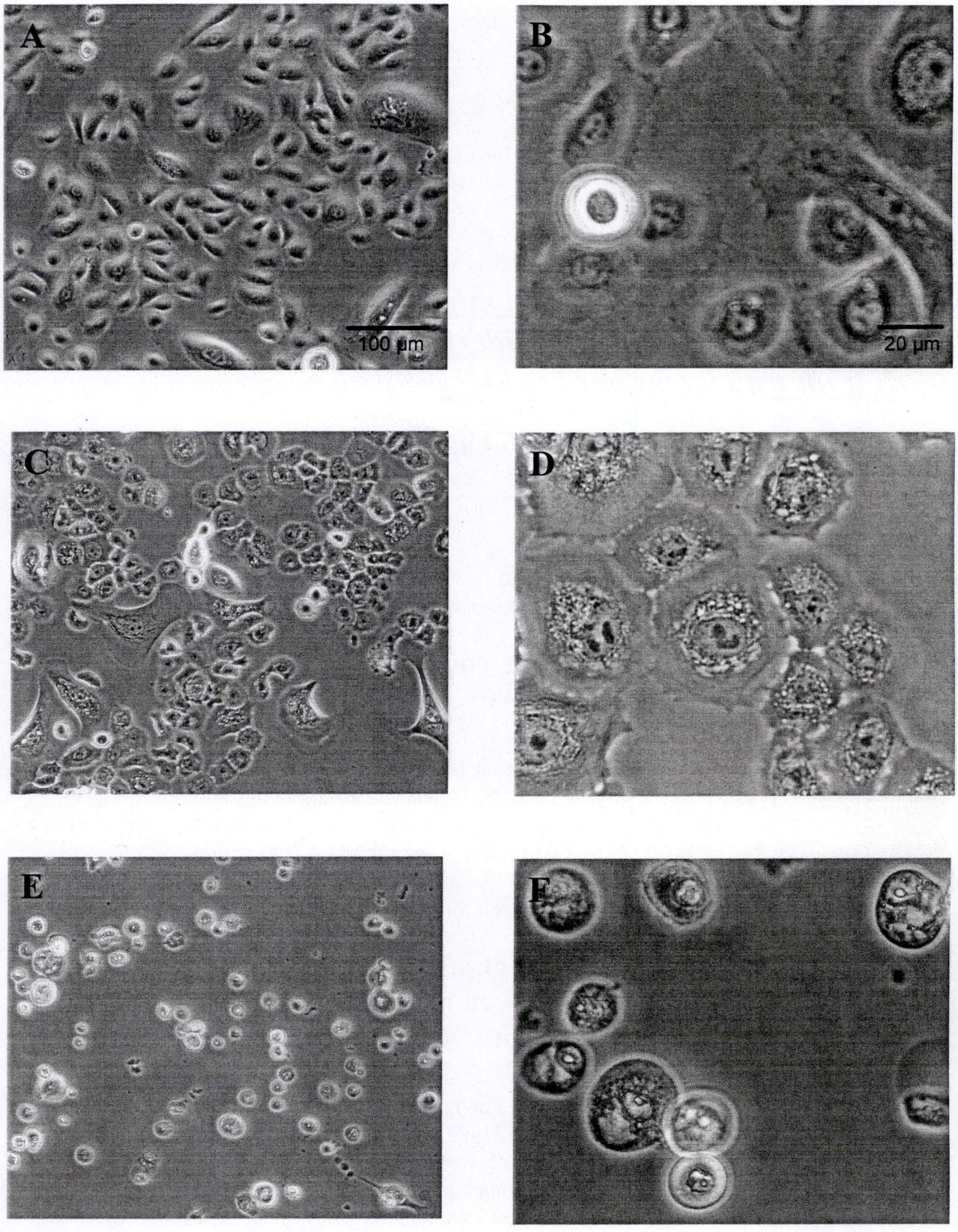


Figure 16 : Kératinocytes épidermiques humains en immersion à sous-confluence observés en microscopie à contraste de phase : condition contrôle (**A, B**), traitement au chlorure de benzalkonium à une concentration de $0,5x10^{-2}$ mg/ml durant 4 heures (**C, D**) et 18 heures (**E, F**). A, C, E : grossissement 10X et B, D, F : grossissement 40X.

souche de kératinocytes, que le traitement soit de 18 heures ou de 4 heures. Nous confirmons donc ces résultats. Par contre, au niveau de la concentration la plus élevée que nous avons ajoutée, à savoir $0,5x10^{-2}$ mg/ml, après 4 heures de traitement à cette concentration, HSP27 semble être davantage phosphorylée que dans le contrôle. Cependant après 18 heures de traitement, les détections de HSP27 totale et phosphorylée semblent être diminuées par rapport à la situation contrôle. Lorsque nous observons le contrôle de charge, c'est-à-dire l'actine, nous nous rendons compte qu'il y a également un peu moins de matériel que dans les autres pistes. Lorsque la morphologie des kératinocytes pour ces deux extraits cellulaires (correspondant à la concentration $0,5 \times 10^{-2}$ pendant 4 heures et 18 heures) est observée (*figure R.16*), nous retrouvons la situation discutée au point 2.1. : après 4 heures de traitement, les cellules à l'aspect étoilé semblent se détacher les unes des autres et être en souffrance. Après 18 heures, les kératinocytes sont complètement détachés les uns des autres et morts. Ceci explique les quantités faibles de matériel retrouvées dans cet extrait cellulaire après un traitement d'une durée de 18 heures. La phosphorylation observée après 4 heures de traitement pourrait être un signe de détresse des kératinocytes.

En resumé, une certaine phosphorylation de HSP27 peut apparaître dans les cellules dont la viabilité est diminuée et dont la mort surviendra endéans les heures suivantes. Elle n'est malheureusement pas détectable dans les cellules traitées par une concentration en irritant qui n'affecte pas la viabilité cellulaire.

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail réalisé en deux parties a permis d'ouvrir les portes de deux champs d'investigation dans lesquels la protéine de choc thermique HSP27 et les kératinocytes sont impliqués. Nous avons premièrement caractérisé l'expression de HSP27 au sein de notre modèle de culture de kératinocytes épidermiques humains en immersion. Deuxièmement, nous avons tenté de déterminer si HSP27 pouvait être un marqueur de l'irritation cutanée dans un tel modèle.

- **L'expression et l'activation de HSP27 augmentent avec la différenciation**

Pour commencer, en ce qui concerne la caractérisation de l'expression et de l'activation de HSP27 au niveau des cultures de kératinocytes épidermiques humains en immersion, nous pouvons certainement retenir plusieurs informations. Nous avons constaté que les kératinocytes exhibent un taux d'expression élevé de HSP27, tant au niveau ARNm que protéine, comparable à celui observé dans les cellules MCF-7 reconnues comme surexprimant cette protéine (Horman et al., 1997). Nous avons observé que HSP27 voit son niveau d'ARNm et de protéines, ainsi que sa phosphorylation, augmenté lorsque les kératinocytes expriment des marqueurs (K10, involucrine) caractéristiques de la différenciation épidermique. Cette modulation marquée et ces taux élevés d'expression et d'activation de HSP27 suggèrent que cette protéine joue un rôle important dans la physiologie normale des kératinocytes épidermiques. A l'état de prolifération, les kératinocytes expriment déjà cette protéine, mais ils augmentent son expression et sa phosphorylation lorsqu'ils entrent en différenciation. Plusieurs auteurs ayant travaillé sur divers types cellulaires ont suggéré une implication de HSP27 dans le processus de différenciation cellulaire, y compris la différenciation des kératinocytes (Kindas-Mügge et al., 1994 ; Michishita et al., 1991 ; Spector et al., 1992 ; Stahl et al., 1992 ; Shakoori et al., 1992). Cependant, Arrigo (2002) a entrepris une étude sur les cellules HaCaT, des kératinocytes immortalisés capables de se différencier et de se dédifférencier par modulation de la concentration en calcium du milieu. Il a pu remarquer une accumulation de HSP27 sous forme de larges oligomères avec la différenciation des cellules HaCaT. Il observe également ce phénomène avec la dédifférenciation des cellules HaCaT. La formation d'oligomères est attribuée à l'activité chaperonne de HSP27 (Rogalla et al., 1999). L'intensification de l'expression de HSP27 pourrait donc ne pas être liée directement au processus de différenciation cellulaire, mais à tout phénomène plus général accompagné d'un bouleversement du contenu en protéines de la cellule. Lors de la différenciation, épidermique notamment, le profil protéique est remanié et le besoin d'une protéine exhibant une activité de chaperonne pourrait se justifier (Jackob et al., 1993).

- **L'expression des transcrits et la phosphorylation de HSP27 dans les kératinocytes augmentent suite à un choc thermique**

Un choc thermique de 4 heures à 43°C augmente l'expression des transcrits et la phosphorylation de HSP27 par les kératinocytes épidermiques. Une augmentation du niveau total de la protéine HSP27 n'a cependant pas été observée suite à cette hyperthermie. Ceci pourrait s'expliquer en supposant que le laps de temps entre le début et la fin du traitement ne permet pas aux cellules d'accumuler une quantité détectable de protéine. Une durée d'incubation plus longue ou un temps de récupération à 37°C après le choc thermique permettrait peut-être d'observer une augmentation de la synthèse protéique de HSP27. Plus adéquate, l'utilisation de « radiolabelling » ou marquage radioactif avant de détecter HSP27 par immunoprécipitation pourrait nous apprendre si la synthèse de la protéine est

effectivement augmentée dans ces conditions. L'augmentation de l'expression protéique dans ce cas pourrait être consécutive à l'élévation observée du taux d'ARNm codant pour HSP27. Une autre hypothèse à prendre en compte est que le choc thermique pourrait avoir un effet sur HSP27 elle-même, augmentant par exemple sa dégradation protéique et masquant ainsi l'éventuelle augmentation de sa traduction.

- **La phosphorylation de HSP27 augmente suite à un traitement par le TPA**

L'influence du TPA sur HSP27 n'a été détectée qu'au niveau de la phosphorylation de cette protéine. L'augmentation de l'involucrine révèle toutefois le caractère inducteur du TPA sur la différenciation des kératinocytes. La stimulation de la différenciation par cet ester de phorbol ne modifie pas la traduction et la transcription de HSP27. Ceci est différent des résultats obtenus lorsque c'est l'atteinte de la confluence par les kératinocytes, autrement dit leur densité cellulaire, qui induit la différenciation épidermique. Cette différence est en faveur de l'hypothèse de Arrigo (2002) qui suggère que l'augmentation de HSP27 serait une réponse à un bouleversement protéique et non à l'induction de la différenciation.

Les réponses des kératinocytes, en terme d'expression de transcrits et de protéines et en terme de phosphorylation de HSP27, obtenus par les deux traitements de stress que sont le choc thermique et le TPA convergent pour certaines caractéristiques mais divergent pour d'autres.

- **HSP27 subit une relocalisation intracellulaire suite au choc thermique et au traitement par le TPA**

La localisation intracellulaire de HSP27 observée sous sa forme totale est concentrée en périphérie des kératinocytes non stressés mais se retrouve aussi plus diffuse dans le cytoplasme. Le marquage de la forme phosphorylée est diffus dans le cytoplasme. HSP27 détectée sous ses deux formes subit une relocalisation en partie dans le noyau mais principalement dans la région périnucléaire des kératinocytes ayant subi un choc thermique. Afin de mieux comprendre ces observations, il faut évoquer le rôle de HSP27 au niveau du cytosquelette d'actine. En dehors de condition de stress, HSP27 est lié à l'actine et inhibe sa polymérisation. Après un stress tel que le choc thermique, HSP27 est phosphorylée, se détache de l'actine et permet ainsi à l'actine de se polymériser. De cette manière la phosphorylation de HSP27 participe à la stabilisation des microfilaments d'actine qui se trouvent altérés lors d'un choc thermique (Lavoie et al., 1995). La présence de HSP27 en périphérie serait due à sa liaison à l'actine au niveau de structures membranaires mobiles et de lamellipodes (Lavoie et al., 1995). Il a été montré que pour remplir sa fonction de thermotolérance et de stabilisation du cytosquelette d'actine, HSP27 doit être phosphorylable et capable de former des oligomères (Roggala et al., 1999). Par contre, La phosphorylation de HSP27 n'est pas nécessaire à sa relocalisation (Lavoie et al., 1995).

Le traitement des kératinocytes au TPA relocalise irrévocablement HSP27 (détectée sous sa forme totale et phosphorylée) vers le noyau. Ainsi la relocalisation de HSP27 au sein des kératinocytes apparaît différente lorsque ceux-ci ont subi un stress par un choc thermique et lorsqu'ils ont été traités par le TPA.

- **Perspectives au vu des constatations concernant la caractérisation de HSP27 au sein de notre modèle de culture de kératinocytes en immersion**

La réalisation de ce projet, suite à nos interrogations initiales concernant la caractérisation de HSP27 dans notre modèle de culture des kératinocytes, nous a ouverts à un grand nombre de nouvelles questions à son sujet et nous suggère de nouvelles perspectives. Ainsi, pour améliorer la caractérisation de l'expression de HSP27 au sein de notre modèle de culture des kératinocytes épidermiques humains en immersion et de mieux comprendre son rôle dans ces cellules, pas mal de recherches peuvent être envisagées. Nous pourrions étudier l'expression d'autres HSP, présentes dans l'épiderme, au cours de la différenciation des kératinocytes. En effet, si Arrigo (2002) suggère que HSP27 participe au remaniement du profil protéique lors de la différenciation, HSP27 n'étant pas la seule chaperonne présente au sein de l'épiderme, nous pouvons nous attendre à voir une élévation de l'expression des autres HSP dans les kératinocytes en différenciation. Pour caractériser HSP27, il serait intéressant d'observer plus précisément son expression de transcrits et protéique ainsi que sa phosphorylation au cours du temps, depuis la mise en culture jusque l'atteinte de stades de culture avancés. Cette étude cinétique nous apporterait une meilleure connaissance quant à la modulation de l'expression de HSP27 par les kératinocytes entre l'état de prolifération et de différenciation ainsi qu'à des stades de cultures fort avancés.

D'autres modulateurs de l'expression de HSP27 et de sa phosphorylation pourraient être étudiés pour caractériser la réponse des kératinocytes face à diverses situations. L'induction de HSP27 pourrait être spécifique à certains types de stress. La littérature nous rapporte que le sérum influence HSP27 dans des cultures privées de sérum. L'effet du sérum sur HSP27 dans nos cultures autocrines de kératinocytes pourrait être investigué.

En ce qui concerne l'étude de la localisation cellulaire de HSP27, il serait intéressant de traiter les cellules par l'arsenite de sodium pour vérifier si nous pouvons induire la relocalisation nucléaire de HSP27 dans notre modèle de culture des kératinocytes telle que plusieurs équipes l'ont rapportée (Shi et al., 2003 ; Wong et al., 2000 ; McClaren et al. 1994). Un double marquage de HSP27 et du noyau permettrait de localiser HSP27 avec plus de précision. De manière à éclaircir l'influence de HSP27 au niveau des microfilaments d'actine, la réalisation d'un double marquage immunohistochimique actine-HSP27 s'avère pertinente.

Reste aussi à comprendre la signalisation cellulaire située en amont de HSP27 et qui régule son activation. La signalisation cellulaire est un domaine complexe, en vogue et en pleine expansion qui permet d'élucider de nombreux phénomènes cellulaires, mais ouvre aussi la porte à de nombreuses questions. La littérature nous apprend que HSP27 se trouve en aval des MAPKAP K2 et 3, deux kinases phosphorylées par la MAP kinase p38 (Stokoe et al., 1992 ; Huot et al., 1995). Cependant HSP27 semble également pouvoir être phosphorylée par une autre kinase également substrat de la MAP kinase p38 (Rous et al., 1994). Il s'agit de PRAK pour « p38 regulated/activated kinase ». Il serait intéressant d'identifier la voie de transduction du signal qui aboutit à la phosphorylation de HSP27 dans nos conditions de travail. Les résultats divergents, obtenus pour le choc thermique et le traitement au TPA, suggèrent que la régulation de HSP27 suite à ces stress ne passe peut-être pas par la même voie de transduction. Nous avons investigué la voie conduisant à la phosphorylation de HSP27 lors d'un passage des kératinocytes de l'état de prolifération à la différenciation. En effet la phosphorylation de HSP27 augmente avec la différenciation et il est connu que la MAP kinase p38 est responsable de la phosphorylation de HSP27. Cependant, dans notre laboratoire, nous n'observons pas d'augmentation de l'activation (phosphorylation) de la

MAP kinase p38 avec l'état de la culture des kératinocytes (Conny Mathay, mémoire 2004). Pour en savoir plus, l'étude de ces différentes voies de transduction du signal peut se faire par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de familles de kinase se trouvant en amont de la protéine étudiée. Par cette approche, Conny Mathay, lors de la réalisation de son mémoire (2004), a montré une activation de la MAP kinase p38 induisant la phosphorylation de HSP27, suite à un traitement des kératinocytes par la molécule de méthyl-β-cyclodextrine provoquant l'extraction du cholestérol membranaire. Via l'utilisation de l'inhibiteur PD169316 de p38, elle a mis en évidence une annulation de la phosphorylation de HSP27 suite à ce traitement par la méthyl-β-cyclodextrine , démontrant dans ce cas le rôle de la MAP kinase p38.

Les divers rôles et fonctions remplis par HSP27 au niveau des kératinocytes sont encore relativement peu étudiés en comparaison aux lignées et autres types cellulaires. Il s'agit donc d'un domaine dans lequel beaucoup reste à découvrir.

- **La phosphorylation de HSP27 est augmentée par application de concentrations en CB cytotoxiques sur des cultures de kératinocytes en immersion**

Dans la deuxième partie de ce travail, les résultats concernant le chlorure de benzalkonium ne nous ont pas permis d'obtenir des réponses claires quant à nos questions de départ qui concernaient l'utilisation de HSP27 comme marqueur d'une réponse face à un irritant cutané. Le chlorure de benzalkonium, aux concentrations et durées de traitement étudiées, n'influence pas l'expression des transcrits et protéique de HSP27. Seule la plus haute concentration utilisée paraît induire une phosphorylation de HSP27 après un traitement de 4 heures affectant la viabilité cellulaire. Ceci n'est plus observé après 18 heures, ce traitement engendrant la mort de la plupart des cellules. Une prudence est bien sûr requise pour l'interprétation de ces résultats qui demandent à être reproduits. La phosphorylation semble être la voie à investiguer en ce qui concerne sa potentialité comme marqueur d'un stress irritant. La phosphorylation de HSP27 est un phénomène apparaissant dans les minutes qui suivent un stress et qui peut s'estomper ou persister. Il faudrait donc étudier la cinétique de la phosphorylation de HSP27 par un inducteur tel que le TPA. Ceci permettra d'établir le meilleur moment, où la phosphorylation est la plus intense. En plus de jouer sur la concentration en chlorure de benzalkonium, il serait peut-être judicieux de modifier la durée du traitement qui semble, selon nos résultats, également modifier la viabilité des kératinocytes. L'étude de la viabilité cellulaire pour de courtes périodes de traitement permettrait sans doute de nous éclairer. Ainsi, l'observation de la phosphorylation de HSP27 par des kératinocytes traités au chlorure de benzalkonium à des concentrations plus élevées, mais durant un court laps de temps, est peut-être la voie d'investigation pour établir un marqueur de réponse à l'irritation cutanée. Remarquons encore que le TPA utilisé dans notre étude est en partie une substance ayant des propriétés irritantes. Le TPA nous a permis d'observer une réponse au niveau de la phosphorylation de HSP27 dans les kératinocytes. Nous avons plus de connaissances et d'expérience a propos de l'utilisation du TPA sur des cultures immergées que pour le chlorure de benzalkonium. L'utilisation du chlorure de benzalkonium sur des cultures en immersion reste encore à affiner. Il faut également ajouter que d'autres méthodes plus fines que les études par Western blot pour quantifier des protéines existent. Plusieurs firmes (notamment BioSource) mettent à disposition des tests ELISA autant pour HSP27 totale que pour sa forme phosphorylée.

- **Le traitement de peau humaine reconstituée *in vitro* au CB ne modifie pas l'expression et l'activation de HSP27**

Une autre suite à ce projet serait d'appliquer les expériences réalisées sur des cultures de kératinocytes humains en immersion à des épidermes humains reconstitués *in vitro*. Ces expériences viseront bien sûr à améliorer et valider un modèle d'irritation cutanée *in vitro* qui devra remplacer les modèles animaux *in vivo*. De telles expériences ont été réalisées ou sont en cours au sein de notre laboratoire (Frédéric Dupont). Actuellement, les traitements des épidermes reconstitués *in vitro* au chlorure de benzalkonium ne montrent pas de modification de l'expression de HSP27. Ceci n'est pas vraiment surprenant au vu de nos résultats obtenus en cultures immergées. En effet, nous observons un niveau d'expression plus élevé de HSP27 par les kératinocytes en différenciation que par les kératinocytes en prolifération. Or, des taux élevés de HSP27 ne nous ont pas permis d'obtenir de modulation marquée de ces taux quand les kératinocytes sont différenciés. C'est à sous-confluence que les modulations de l'expression de HSP27 étaient manifestes. L'épiderme reconstitué *in vitro* est principalement constitué de cellules en différenciation et les cellules en prolifération sont représentées en minorité au niveau de la couche basale. Ainsi l'effet éventuel que l'on pourrait observer au niveau des cellules basales risque fort d'être masqué par le taux élevé d'expression des cellules suprabasales. Des études immunohistochimiques par marquage de HSP27 sur des épidermes reconstitués *in vitro* et traités au chlorure de benzalkonium pourront peut-être nous apporter plus d'informations concernant ces hypothèses. Les expériences réalisées sur des prélèvements de peau par Boxman et al. (2002), étudiant également HSP27 comme marqueur potentiel à l'irritation cutanée, pourraient ainsi peut-être se trouver reproduites sur des épidermes reconstruits *in vitro*.

- **Identification de plusieurs marqueurs de l'irritation cutanée**

Pour identifier des phénomènes caractéristiques et spécifiques à une irritation cutanée, il faut mettre en évidence des paramètres se modifiant en corrélation avec la dose d'irritant. La relation entre la viabilité cellulaire diminuée, la libération accrue d'IL-1α et la concentration croissante en irritant a déjà été caractérisée par Coquette et al. (1999 et 2003). Toute réponse caractéristique de l'établissement d'un stress cellulaire est toutefois potentiellement intéressante à étudier. A travers notre travail, nous avons tenté d'apporter des données concernant HSP27 au sein des kératinocytes épidermiques et l'influence des stress irritants sur cette protéine de stress. Cette démarche ne s'arrête bien sûr pas à l'étude de HSP27, mais est à poursuivre et à appliquer à d'autres candidats marqueurs. Les autres protéines de stress, présentes au sein de l'épiderme, ont peut-être une réponse plus précoce et spécifique face à un stress irritant. La MAP kinase p38 ou d'autres kinases en amont de HSP27 peuvent également s'ajouter en tant que marqueurs de la réponse des kératinocytes face à un stress irritant.

L'identification de plusieurs paramètres, de plusieurs marqueurs, influencés par la concentration en irritant appliquée sur les cellules de la peau permettra d'augmenter les chances d'identifier une réponse cellulaire induite par un irritant. La découverte de marqueurs et la caractérisation spécifique de cette réponse permettront d'avancer dans l'élaboration d'une méthode alternative à l'expérimentation animale et de sa validation au niveau légal.

5. BIBLIOGRAPHIE

Aaronson, S. A., Rubin, J. S., Finch, P. W., Wong, J., Marchese, C., Falco, J., Taylor, W. G., and Kraus, M. H. Growth factor-regulated pathways in epithelial cell proliferation. Am Rev Respir Dis 142, S7-S10 (1990).

Arrigo, A. P. Tumor necrosis factor induces the rapid phosphorylation of the mammalian heat shock protein hsp28. *Mol Cell Biol* **10**, 1276-80 (1990).

Arrigo, A. P. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol Chem* **379**, 19-26 (1998).

Arrigo, A. P. Hsp27: novel regulator of intracellular redox state. *IUBMB Life* **52**, 303-7 (2001).

Bader, S. B., Price, B. D., Mannheim-Rodman, L. A., and Calderwood, S. K. Inhibition of heat shock gene expression does not block the development of thermotolerance. *J Cell Physiol* **151**, 56-62 (1992).

Banno, T., Gazel, A. & Blumenberg, M. Effects of TNFa in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem* (2004).

Barrandon, Y. & Green, H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. Cell 50, 1131-7 (1987).

Basketter, D. A. Toxicology of contact dermatis. In : Basketter, D. A., Gerberick, F., kimber, I., Willis, G. (Eds.), Allergy, Irritancy and Urticaria. John Wiley and Sons, Chichester, UK (1999).

Boxman, I. L., Hensbergen, P. J., Van Der Schors, R. C., Bruynzeel, D. P., Tensen, C. P. & Ponec, M. Proteomic analysis of skin irritation reveals the induction of HSP27 by sodium lauryl sulphate in human skin. *Br J Dermatol* **146**, 777-85 (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).

Brosin, A., Wolf, V., Mattheus, A. & Heise, H. Use of XTT-assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salts in human keratinocytes (HaCaT). A feasible method for in vitro testing of skin irritants. *Acta Derm Venereol* **77**, 26-8 (1997).

Cairns, J., Qin, S., Philp, R., Tan, Y. H., Guy, G. R. Dephosphorylation of the small heat shock protein Hsp27 in vivo by protein phosphatase 2A. J Biol Chem 12, 9176-9183 (1994).

Charveron, M., Calvo, M. & Gall, Y. Cell stress and implications of the heat-shock response in skin. *Cell Biol Toxicol* **11**, 161-5 (1995).

Chen, J. D., Kim, J. P., Zhang, K., Sarret, Y., Wynn, K. C., Kramer, R. H. & Woodley, D. T. Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the alpha 2 integrin subunit. *Exp Cell Res* **209**, 216-23 (1993).

Ciocca, D. R., Oesterreich, S., Chamness, G. C., McGuire, W. L. & Fuqua, S. A. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst* **85**, 1558-70 (1993).

Cook, P. W., Mattox, P. A., Keeble, W. W., Pittelkow, M. R., Plowman, G. D., Shoyab, M., Adelman, J. P. & Shipley, G. D. A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol* **11**, 2547-57 (1991).

Coquette, A., Berna, N., Vandenbosch, A., Rosdy, M. & Poumay, Y. Differential expression and release of cytokines by an in vitro reconstructed human epidermis following exposure to skin irritant and sensitizing chemicals. *Toxicol In Vitro* **13**, 867-77 (1999).

Coquette, A., Berna, N., Poumay, Y., Pittelkow, M. The keratinocyte in cutaneous irritation and sensitization. In: BBiochemical Modulation of Skin Reactions (kydonieus, A.F., Will, J.J., eds), pp. 125-143, CRC Press, London (2000).

Coquette, A., Berna, N., Vandenbosch, A., Rosdy, M., De Wever, B. & Poumay, Y. Analysis of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicol In Vitro* **17**, 311-21 (2003).

Corsini, E., Bruccoleri, A., Marinovich, M. & Galli, C. L. Endogenous interleukin-1 alpha associated with skin irritation induced by tributyltin. *Toxicol Appl Pharmacol* **138**, 268-74 (1996).

Dinarello, C. A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* **16**, 457-99 (1998).

Draize, J. H., Woodard, G., Calvery, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharmacol Exp Ther 82, 377-390 (1944).

Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M. & Buchner, J. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *Embo J* **16**, 221-9 (1997).

Ernesti, A. M., Swiderek, M. & Gay, R. Absorption and metabolism of topically applied testosterone in an organotypic skin culture. *Skin Pharmacol* **5**, 146-53 (1992).

Fleischmajer, R., MacDonald, E. D., 2nd, Contard, P. & Perlish, J. S. Immunochemistry of a keratinocyte-fibroblast co-culture model for reconstruction of human skin. *J Histochem Cytochem* **41**, 1359-66 (1993).

Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. & Saklatvala, J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**, 1039-49 (1994).

Fuchs, E. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl* **17**, 197-208 (1993).

Gaestel, M., Benndorf, R., Hayess, K., Priemer, E., Engel, K. Dephosphorylation of the small heat shock protein hsp25 by calcium/calmodulin-dependent (type 2B) protein phosphatase. J Biol Chem 30, 21607-21611 (1992).

Gaestel, M., Schroder, W., Benndorf, R., Lippmann, C., Buchner, K., Hucho, F., Erdmann, V. A. & Bielka, H. Identification of the phosphorylation sites of the murine small heat shock protein hsp25. *J Biol Chem* **266**, 14721-4 (1991).

Gatto, H., Viac, J., Chaveron, M., Schmitt, D. Effects of thermal shocks on interleukin-1 levels and heat shock protein 72 (HSP72) expression in normal human keratinocytes. Arch Dermatol Res 284, 7-414 (1992).

Guesdon, F., Freshney, N., Waller, R. J., Rawlinson, L. & Saklatvala, J. Interleukin 1 and tumor necrosis factor stimulate two novel protein kinases that phosphorylate the heat shock protein hsp27 and beta-casein. *J Biol Chem* **268**, 4236-43 (1993).

Gusev, N. B., Bogatcheva, N. V. & Marston, S. B. Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Mosc)* **67**, 511-9 (2002).

Hall, P. A. & Watt, F. M. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* **106**, 619-33 (1989).

Harvell, J. D., Lammintausta, K., Maibach, H.I.,. Irritant contact dermatitis. In : Guin, J. D. (Ed.), Practical Contact Dermatitis. McGraw-Hill, New Yorq, 7-8 (1995).

Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K. & Yuspa, S. H. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**, 245-54 (1980).

Hines, M. D., Jin, H. C., Wheelock, M. J. & Jensen, P. J. Inhibition of cadherin function differentially affects markers of terminal differentiation in cultured human keratinocytes. *J Cell Sci* **112 (Pt 24)**, 4569-79 (1999).

Holbrook, K. A. Ultrastructure of the epidermis. The keratinocyte Handbook (1994).

Horman, S., Galand, P., Mosselmans, R., Legros, N., Leclercq, G. & Mairesse, N. Changes in the phosphorylation status of the 27 kDa heat shock protein (HSP27) associated with the modulation of growth and/or differentiation in MCF-7 cells. *Cell Prolif* **30**, 21-35 (1997).

Huot, J., Lambert, H., Lavoie, J. N., Guimond, A., Houle, F. & Landry, J. Characterization of 45-kDa/54-kDa HSP27 kinase, a stress-sensitive kinase which may activate the phosphorylation-dependent protective function of mammalian 27-kDa heat-shock protein HSP27. *Eur J Biochem* **227**, 416-27 (1995).

Huot, J., Houle, F., Spitz, D. R. & Landry, J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* **56**, 273-9 (1996).

Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. & Buchner, J. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* **268**, 1517-20 (1993).

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.0022-202x2004.23221.x online May 26, 2004.

Jones, P. H., Harper, S. & Watt, F. M. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* **80**, 83-93 (1995).

Kato, K., Ito, H. & Okamoto, K. Modulation of the arsenite-induced expression of stress proteins by reducing agents. *Cell Stress Chaperones* **2**, 199-209 (1997).

Kindas-Mugge, I., Hammerle, A. H., Frohlich, I., Oismuller, C., Micksche, M. & Trautinger, F. Granulocytes of critically ill patients spontaneously express the 72 kD heat shock protein. *Circ Shock* **39**, 247-52 (1993).

Kindas-Mugge, I. & Trautinger, F. Increased expression of the M(r) 27,000 heat shock protein (hsp27) in in vitro differentiated normal human keratinocytes. *Cell Growth Differ* **5**, 777-81 (1994).

Knauf, U., Bielka, H. & Gaestel, M. Over-expression of the small heat-shock protein, hsp25, inhibits growth of Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett* **309**, 297-302 (1992).

Krane, J. F., Murphy, D. P., Carter, D. M. & Krueger, J. G. Synergistic effects of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor I/somatomedin C (IGF-I) on keratinocyte proliferation may be mediated by IGF-I transmodulation of the EGF receptor. *J Invest Dermatol* **96**, 419-24 (1991).

Kregel, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* **92**, 2177-86 (2002).

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

Landry, J., Chretien, P., Lambert, H., Hickey, E. & Weber, L. A. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol* **109**, 7-15 (1989).

Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A. & Anderson, C. W. Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem* **267**, 794-803 (1992).

Lavoie, J. N., Gingras-Breton, G., Tanguay, R. M. & Landry, J. Induction of Chinese hamster HSP27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. HSP27 stabilization of the microfilament organization. *J Biol Chem* **268**, 3420-9 (1993).

Lavoie, J. N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L. A. & Landry, J. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced

changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* **15**, 505-16 (1995).

Lindquist, S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* **55**, 1151-91 (1986).

Lindquist, S. & Craig, E. A. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**, 631-77 (1988).

Maytin, E. V., Wimberly, J. M. & Anderson, R. R. Thermotolerance and the heat shock response in normal human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* **95**, 635-42 (1990).

Maytin, E. V. Heat shock proteins and molecular chaperones: implications for adaptive responses in the skin. *J Invest Dermatol* **104**, 448-55 (1995).

McClaren, M. & Isseroff, R. R. Dynamic changes in intracellular localization and isoforms of the 27-kD stress protein in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **102**, 375-81 (1994).

McLaughlin, M. M., Kumar, S., McDonnell, P. C., Van Horn, S., Lee, J. C., Livi, G. P. & Young, P. R. Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem* **271**, 8488-92 (1996).

Mehlen, P., Schulze-Osthoff, K. & Arrigo, A. P. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem* **271**, 16510-4 (1996).

Menon, G. K., Grayson, S. & Elias, P. M. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* **84**, 508-12 (1985).

Michishita, M., Satoh, M., Yamaguchi, M., Hirayoshi, K., Okuma, M. & Nagata, K. Phosphorylation of the stress protein hsp27 is an early event in murine myelomonocytic leukemic cell differentiation induced by leukemia inhibitory factor/D-factor. *Biochem Biophys Res Commun* **176**, 979-84 (1991).

Minowada, G. & Welch, W. J. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* **95**, 3-12 (1995).

Miron, T., Vancompernolle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M. & Geiger, B. A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J Cell Biol* **114**, 255-61 (1991).

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

Nixon, G. A., Tyson, C. A. & Wertz, W. C. Interspecies comparisons of skin irritancy. *Toxicol Appl Pharmacol* **31**, 481-90 (1975).

Nover, L., Scharf, K. D. & Neumann, D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol Cell Biol* **3**, 1648-55 (1983).

Nozaki, J., Takehana, M. & Kobayashi, S. UVB irradiation induces changes in cellular localization and phosphorylation of mouse HSP27. *Photochem Photobiol* **65**, 843-8 (1997).

Piepkorn, M., Lo, C. & Plowman, G. Amphiregulin-dependent proliferation of cultured human keratinocytes: autocrine growth, the effects of exogenous recombinant cytokine, and apparent requirement for heparin-like glycosaminoglycans. *J Cell Physiol* **159**, 114-20 (1994).

Pietenpol, J. A., Stein, R. W., Moran, E., Yaciuk, P., Schlegel, R., Lyons, R. M., Pittelkow, M. R., Munger, K., Howley, P. M. & Moses, H. L. TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell* **61**, 777-85 (1990).

Pineau, N., Dossou, K. G., De Silvia, O. antigen presentation by murine epidermal cells in vitro. In : Rougier, A., Goldgerg, A. M., -aibach, H. I. (Eds.), In Vitro Skin

Toxicology. Irritation, Phototoxicity, Sensitisation. Mary Ann Liebert, New York, USA, 325-331 (1994)

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).

Polla, B. S. A role for heat shock proteins in inflammation? *Immunol Today* **9**, 134-7 (1988).

Ponec, M. In vitro cultured human skin cells as alternatives to animal for skin irritancy screening. International Journal of Cosmetology 14, 245-264 (1992).

Ponec, M. & Kempenaar, J. Use of human skin recombinants as an in vitro model for testing the irritation potential of cutaneous irritants. *Skin Pharmacol* **8**, 49-59 (1995).

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

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

Rambukkana, A., Pistoor, F. H., Bos, J. D., Kapsenberg, M. L. & Das, P. K. Effects of contact allergens on human Langerhans cells in skin organ culture: migration, modulation of cell surface molecules, and early expression of interleukin-1 beta protein. *Lab Invest* **74**, 422-36 (1996).

Rheinwald, J. G. & Green, H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* **6**, 317-30 (1975).

Rice, R. H. & Green, H. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* **18**, 681-94 (1979).

Ritossa, F. A. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Experimentia 18, 571-573 (1962).

Rogalla, T., Ehrnsperger, M., Preville, X., Kotlyarov, A., Lutsch, G., Ducasse, C., Paul, C., Wieske, M., Arrigo, A. P., Buchner, J. & Gaestel, M. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* **274**, 18947-56 (1999).

Rosdy, M. & Clauss, L. C. Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol* **95**, 409-14 (1990).

Rosdy, M., Pisani, A. & Ortonne, J. P. Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors. *Br J Dermatol* **129**, 227-34 (1993).

Rosenthal, D.S., Griffiths, C. E. M., Yupsa, S. H., Roop, D. R., and Voorhees, J. J. Acute or chronic topical retinoic acid treatment of human skin in vivo alters the expression of epidermal transglutaminase, loricrin, involucrin, filagrin and keratins 6 and 13 but not keratins 1, 10 and 14. J Invest Dermatol 98, 343-350 (1992).

Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T. & Nebreda, A. R. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**, 1027-37 (1994).

Saunders, N. A. & Jetten, A. M. Control of growth regulatory and differentiation-specific genes in human epidermal keratinocytes by interferon gamma. Antagonism by retinoic acid and transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem* **269**, 2016-22 (1994).

Shakoori, A. R., Oberdorf, A. M., Owen, T. A., Weber, L. A., Hickey, E., Stein, J. L., Lian, J. B. & Stein, G. S. Expression of heat shock genes during differentiation of mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. *J Cell Biochem* **48**, 277-87 (1992).

Shi, B., Farboud, B., Nuccitelli, R. & Isseroff, R. R. Power-line frequency electromagnetic fields do not induce changes in phosphorylation, localization, or expression of the 27-kilodalton heat shock protein in human keratinocytes. *Environ Health Perspect* **111**, 281-8 (2003).

Spector, N. L., Mehlen, P., Ryan, C., Hardy, L., Samson, W., Levine, H., Nadler, L. M., Fabre, N. & Arrigo, A. P. Regulation of the 28 kDa heat shock protein by retinoic acid during differentiation of human leukemic HL-60 cells. *FEBS Lett* **337**, 184-8 (1994).

Stahl, J., Wobus, A. M., Ihrig, S., Lutsch, G. & Bielka, H. The small heat shock protein hsp25 is accumulated in P19 embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells of line BLC6 during differentiation. *Differentiation* **51**, 33-7 (1992).

Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P. & Gaestel, M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett* **313**, 307-13 (1992).

Thacher, S. M. & Rice, R. H. Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* **40**, 685-95 (1985).

Trautinger, F., Trautinger, I., Kindas-Mugge, I., Metze, D. & Luger, T. A. Human keratinocytes in vivo and in vitro constitutively express the 72-kD heat shock protein. *J Invest Dermatol* **101**, 334-8 (1993).

Trautinger, F., Kindas-Mugge, I., Dekrout, B., Knobler, R. M. & Metze, D. Expression of the 27-kDa heat shock protein in human epidermis and in epidermal neoplasms: an immunohistological study. *Br J Dermatol* **133**, 194-202 (1995).

Trautinger, F., Kindas-Mugge, I., Knobler, R. M. & Honigsmann, H. Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation. *J Photochem Photobiol B* **35**, 141-8 (1996).

Watt, F. M. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr Opin Cell Biol* **1**, 1107-15 (1989).

Welch, W. J. Phorbol ester, calcium ionophore, or serum added to quiescent rat embryo fibroblast cells all result in the elevated phosphorylation of two 28,000-dalton mammalian stress proteins. *J Biol Chem* **260**, 3058-62 (1985).

Welss, T., Basketter, D. A. & Schroder, K. R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro* **18**, 231-43 (2004)

Wille, J. J., Jr., Pittelkow, M. R., Shipley, G. D. & Scott, R. E. Integrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium: clonal analyses, growth kinetics, and cell cycle studies. J Cell Physiol 121, 31-44 (1984).

Williams, I. R. & Kupper, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life Sci* **58**, 1485-507 (1996).

Wilson, N., McArdle, A., Guerin, D., Tasker, H., Wareing, P., Foster, C. S., Jackson, M. J. & Rhodes, L. E. Hyperthermia to normal human skin in vivo upregulates heat shock proteins 27, 60, 72i and 90. *J Cutan Pathol* **27**, 176-82 (2000).

Wong, J. W., Shi, B., Farboud, B., McClaren, M., Shibamoto, T., Cross, C. E. & Isseroff, R. R. Ultraviolet B-mediated phosphorylation of the small heat shock protein HSP27 in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **115**, 427-34 (2000).

York, M., Griffiths, H. A., Whittle, E. & Basketter, D. A. Evaluation of a human patch test for the identification and classification of skin irritation potential. *Contact Dermatitis* **34**, 204-12 (1996).

Yuspa, S. H., Kilkenny, A. E., Steinert, P. M. & Roop, D. R. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol* **109**, 1207-17 (1989).