



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude de l'expression et du rôle de l'Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (HB-EGF) en réponse au stress dans les kératinocytes épidermiques

Giltaire, Séverine

Award date:
2006

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des Sciences

**ETUDE DE L'EXPRESSION ET DU ROLE DE L'HEPARIN-BINDING EPIDERMAL
GROWTH FACTOR (HB-EGF) EN REPONSE AU STRESS DANS LES
KERATINOCYTES EPIDERMiques.**

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

Séverine GILTAIRE

Juin 2006

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 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude de l'expression et du rôle de l'Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (HB-EGF) en réponse au stress dans les kératinocytes épidermiques.

GILTAIRE Séverine

Résumé

HB-EGF est un facteur de croissance de la famille EGF qui est synthétisé sous forme d'un précurseur en membrane proHB-EGF. Ce facteur intervient dans la croissance autocrine des kératinocytes épidermiques humains en culture et de plus, HB-EGF joue un rôle durant la phase de ré-épithélialisation de la cicatrisation cutanée en stimulant la migration des kératinocytes.

Notre travail consiste en une caractérisation de l'expression de HB-EGF au niveau ARNm et protéique chez des kératinocytes épidermiques humains en culture autocrine, en réponse à différents stress cellulaires. Nos résultats ont montré que des traitements par l'ester de phorbol TPA (12-O-tétradecanoylphorbol-13-acétate), une déplétion en cholestérol par la M β CD (méthyl- β -cyclodextrine) et un stress oxydatif par H₂O₂ induisent l'expression de HB-EGF dans des cultures de kératinocytes. Suite à un traitement court par la M β CD et en présence de l'inhibiteur PD169316 (inhibiteur de la MAPK p38) nous avons montré que l'activation de la MAPK p38 est liée à l'expression du facteur de croissance HB-EGF. De plus, nos résultats suggèrent que les kératinocytes traités par la M β CD (1h) libèrent des facteurs de croissance dans leur milieu de culture.

A l'aide d'un immunomarquage sur des coupes de peaux brûlées en cicatrisation, nous avons confirmé la localisation de proHB-EGF dans la marge de la ré-épithélialisation de brûlure. Nos résultats montrent également que proHB-EGF peut-être stimulé sur un épiderme scindé en plusieurs morceaux. Ces résultats suggèrent donc bien l'implication de HB-EGF dans la réponse à un stress cutané. Des études complémentaires seront nécessaires afin d'éclaircir les fonctions exactes de proHB-EGF dans des cultures soumises à différents stress cellulaires.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2006

Promoteur: Y. Poumay

Co-promoteur : M. Hérin

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier particulièrement Monsieur le Professeur Yves Poumay pour son accueil dans le laboratoire LabCeTi, ses conseils avisés, sa grande disponibilité et l'enthousiasme qu'il m'a communiqué pour la recherche scientifique.

Je remercie également, mon co-promoteur, Monsieur le Professeur Michel Hérin pour ses réflexions pertinentes données au cours des réunions du laboratoire.

Merci aussi à,

Françoise Herphelin pour sa grande disponibilité, ses bons conseils et son soutien.

Conny Mathay, toujours à l'écoute, disponible et patiente face aux nombreuses questions que j'ai pu lui poser.

Sylvianne Lambert, pour son savoir-faire et sa bonne humeur qui rend l'ambiance de travail agréable.

Emilie Bera, pour sa gentillesse, sa joie de vivre et ses coups de mains par-ci par-là.

Frédéric Minner pour ses remarques et sa sympathie.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire, notamment Madame Michèle Leclercq-Smekens, mais aussi Raphael Deom et Daniel Van Vlaender pour leurs chaleureuses compagnies ainsi que tous les autres membres du département.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille et surtout mes parents pour m'avoir permis la réalisation de mes projets. Merci de tout cœur à Renaud pour m'avoir supportée et encouragée, à Rafi, avec qui j'ai partagé toute cette expérience, au laboratoire et au kot, ainsi qu'à Emilie, précieuse confidente, toujours à l'écoute.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1. La peau	1
1.1. Fonctions de la peau	1
1.2. Structure de la peau	1
1.2.1. L'épiderme	1
1.2.1.1. Les kératinocytes.....	2
1.2.2. Le derme	3
1.2.3. L'hypoderme	3
1.3. La différenciation épidermique et ses marqueurs.....	3
1.3.1. Les protéines des filaments intermédiaires	3
1.3.2. Les marqueurs de différenciation épidermique	4
1.4. Les modèles de cultures in vitro des kératinocytes humains	4
2. La cicatrisation de la peau	6
2.1. Types de blessures	6
2.2. Mécanisme de la cicatrisation cutanée	6
2.2.1. L'inflammation	6
2.2.2. La formation du tissu de granulation et la ré-épithélialisation	7
2.2.3. Le remodelage des tissus vers une structure cutanée normale	8
3. Les facteurs de croissance épidermique et HB-EGF	9
3.1. Généralités	9
3.2. La famille EGF	9
3.3. EGF	9
3.4. HB-EGF	10
3.4.1. Présentation	10
3.4.2. Rôles de proHB-EGF et HB-EGF	10
3.4.3. Le shedding de proHB-EGF	10
3.4.4. Stimuli induisant le shedding de proHB-EGF	11
3.4.5. Mécanismes régulateurs des facteurs de croissance de la famille EGF par auto et cross-induction chez les kératinocytes humains	12
3.5. Amphiréguline	13
4. Récepteurs HER et signalisation	14
4.1. Les récepteurs HER	14
4.1.1. Généralités	14
4.1.2. Rôle du domaine "heparin binding" du facteur de croissance HB-EGF	14
4.1.3. Signalisation	14
4.2. Les MAPK	15
5. Induction de la signalisation par les stress	16
5.1. Généralités	16
5.2. Stress induit par l'extraction du cholestérol	16
5.2.1. Généralités	16
5.2.2. Extraction du cholestérol	16
5.3. Le stress cellulaire induit par les UV et H ₂ O ₂	17
5.4. Le stress cellulaire induit par le TPA	18

6. Objectifs	19
---------------------------	-----------

MATERIEL ET METHODES

1. La culture cellulaire	20
1.1 Culture des kératinocytes humains épidermiques	20
1.1.1. Matériel	20
1.1.2. Méthode	20
2. Traitement des kératinocytes	22
2.1. Extraction du cholestérol par la méthyl- β -cyclodextrine	22
2.2. Traitement des kératinocytes par le peroxyde d'Hydrogène (H ₂ O ₂)	22
2.3. Traitement des kératinocytes par le 12-O-tetradecanoylphorbol (TPA).....	22
2.4. Inhibition de la MAPK p38 par l'inhibiteur PD169316	22
3. Test MTT	23
4. Analyse des protéines	23
4.1. Matériel	23
4.2. Méthode	24
4.2.1. Extraction des protéines	24
4.2.2. Electrophorèse et transfert	24
4.2.3. Révélation de la membrane	24
5. Analyse des ARN messagers	25
5.1. Extraction des ARNm	25
5.1.1. Matériel utilisé	25
5.1.2. Méthode	25
5.2. Northern blot	26
5.2.1. Matériel utilisé	26
5.2.2. Méthode	27
5.3. Révélation du Northern blot	27
5.3.1. Matériel	27
5.3.2. Méthode	27
5.4. Real time PCR	28
5.4.1. Reverse transcription polymerase	28
5.4.2. Real Time PCR	29
6. Test de migration	29
6.1. Test de migration sur or colloïdal	29
6.1.1. Matériel	29
6.1.2. Méthode	30
6.2. Test de migration avec scratch	30
7. Marquage immunohistochimique	30
7.1. Matériel	30
7.2. Méthode	31
8. Détection proHB-EGF sur un épiderme	31

1. Expression du facteur de croissance HB-EGF suites à différents stress	32
1.1. Analyse morphologique	32
1.2. Analyse protéique	33
1.3. Analyse transcriptionnelle	33
1.4. Conclusion	34
2. Analyse de l'activation de p38 et de l'expression de HB-EGF en réponse à une cinétique de traitement H₂O₂	35
2.1. Expérience	35
2.2. Analyse de la toxicité des traitements	35
2.3. Analyse protéique.....	36
2.4. Conclusions.....	36
2.5. Au niveau ARNm.....	36
2.6. Conclusions.....	36
3. Analyse de l'expression de HB-EGF en réponse à une cinétique par la MβCD	37
3.1. Expérience	37
3.2. Analyse de la toxicité du traitement	37
3.3. Analyse protéique.....	37
3.4. Conclusions.....	37
4. Inhibition de la MAPK p38 par PD169316, lors d'un traitement par la MβCD	38
4.1. Expérience	38
4.2. Analyse protéique	38
5. Détection de HB-EGF dans les milieux conditionnés par la cinétique MβCD	39
5.1. Détection de la phosphorylation du récepteur HER1	39
5.1.1. Expérience	39
5.1.2. Résultats	40
5.1.3. Conclusion	40
5.2. Test de migration à l'aide de scratch	41
5.2.1. Expérience	41
5.2.2. Résultats	41
5.3. Migration sur or colloïdal	41
5.3.1. Expérience	42
5.3.2. Résultats	42
5.4. Conclusion	42
6. Détection de proHB-EGF sur des coupes de peau brûlée	42
7. Détection de l'expression du facteur de croissance HB-EGF dans des épidermes normaux et coupés	43
7.1. Expérience	43
7.2. Résultats.....	43
7.3. Conclusions	43

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. HB-EGF est exprimé suite à une déplétion en cholestérol, un stress oxydatif ou un traitement par un ester de phorbol (TPA)	44
2. HB-EGF et le psoriasis	45
3. HB-EGF et la cicatrisation cutanée	46
4. Conclusions	47
BIBLIOGRAPHIE.....	48

Liste des abréviations:

ADAM : A Disintegrin and Metalloprotease
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
APS: Ammonium persulfate
AR : Amphiréguline
ARN : Acide ribonucléique
BPE: Bovin Pituitary Extract
DEPC: Diéthyl pyrocarbonate
DMSO: Diméthylsulfoxyde
EGF: Epidermal Growth Factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
FGF : Fibroblast Growth Factor
HB-EGF: Heparin-Binding EGF like Growth Factor
HER: Human EGR Receptor
HGF: Hépatocyte Growth Factor
HMG-Coa : Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A
HRG: Hé réguline
HRP : Horse Raddish Peroxydase
IFP : protéines de filaments intermédiaires
IGF : Insulin Growth Factor
IgG: Immunoglobuline G
IL : Interleukine
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
kDa: Kilo Dalton
M β CD: Methyl- β -Cyclodextrine
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MEK: Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular signal-regulated Kinase family
MMP: Matrix Metalloprotease
MTT: 3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide
NDF: Neu Differentiation Factor
NGR: Neuréguline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PKC: Protein kinase C
RTK: Receptor Tyrosin Kinase
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SH2: Src Homology 2
siRNA: Short Interfering RNA
TGF- α : Transforming Growth Factor- α
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TNF- α : Tumor Necrosis Factor
TPA: 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
UV: Ultra-Violet
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCTION

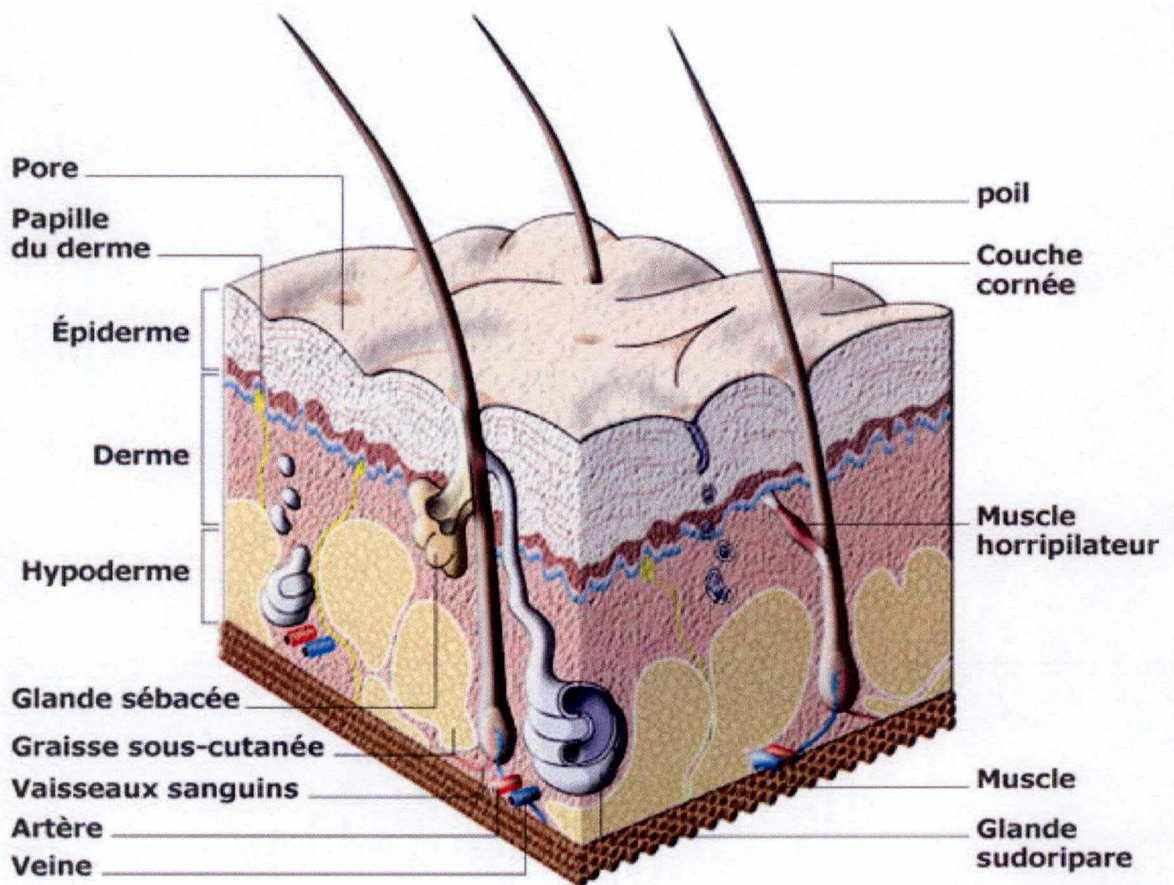


Figure 1.1. : Représentation des trois couches de la peau : épiderme, derme et hypoderme. On peut également observer les annexes épithéliales cutanées.
 (www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/imgArt/peau/coupe_peau01_gde.jpg)

1. La peau :

1.1. Fonctions de la peau :

La peau constitue l'enveloppe extérieure des organismes vertébrés. Avec une épaisseur moyenne de 2mm, la peau présente chez un homme adulte une surface d'environ 2m² et une masse approximative de 4kg (7% de la masse corporelle totale). Cette membrane résistante et imperméable est un organe à part entière, qui est en continuité avec les muqueuses au niveau des orifices naturels. Cet organe vital assure plusieurs fonctions :

- ☛ **Une fonction de protection** : la peau protège l'organisme en jouant le rôle d'une barrière contre les agents traumatiques externes, par exemple en empêchant les micro-organismes de pénétrer. Cette barrière permet également d'éviter la perte des fluides corporels.
- ☛ **Une fonction de thermorégulation** : au niveau de la peau se trouvent les glandes sudoripares et un réseau vasculaire qui permettent d'éviter une élévation trop importante de la température corporelle. Parallèlement, la présence de tissu adipeux au niveau de l'hypoderme et des anastomoses artério-veineuses empêchent une trop grande déperdition de chaleur.
- ☛ **Une fonction sensorielle** : la peau contient de nombreuses terminaisons nerveuses qui transmettent des sensations thermiques, tactiles et douloureuses.
- ☛ **Une fonction métabolique** : la synthèse de la vitamine D se fait au niveau de la peau, grâce à une photoréaction. De plus, l'hypoderme contient une réserve énergétique (triglycérides, acides gras).

Histologiquement, la peau est constituée de trois couches superposées de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, le derme puis l'hypoderme (figure 1.1)

L'épiderme et ses annexes sont d'origine ectodermique, alors que le derme et l'hypoderme proviennent du mésoderme.

1.2. Structure de la peau :

1.2.1. L'épiderme :

L'épiderme, couche superficielle de la peau, est en contact avec l'environnement extérieur. Son épaisseur varie de 75µm à 150µm, sauf au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds où il est plus épais. C'est un épithélium pavimenteux, pluristratifié et kératinisé, composé de quatre types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Merkel et les cellules de Langerhans. Ce tissu se renouvelle constamment, bien que son épaisseur reste plus ou moins constante. Ce phénomène s'explique par le fait que le taux de cellules perdues à la surface est contrebalancé par le taux de cellules générées au niveau de la couche basale.

L'épiderme ne contient aucun vaisseau sanguin ou lymphatique mais est parcouru par de nombreuses terminaisons nerveuses libres.

Dans notre travail, nous nous intéresserons aux kératinocytes qui constituent le type cellulaire majoritaire (90%) de l'épiderme. Le pourcentage cellulaire restant est constitué par les cellules de Langerhans, les mélanocytes et les cellules de Merkel.

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques mobiles qui jouent un rôle immunitaire important. Elles se localisent principalement dans la couche épineuse.

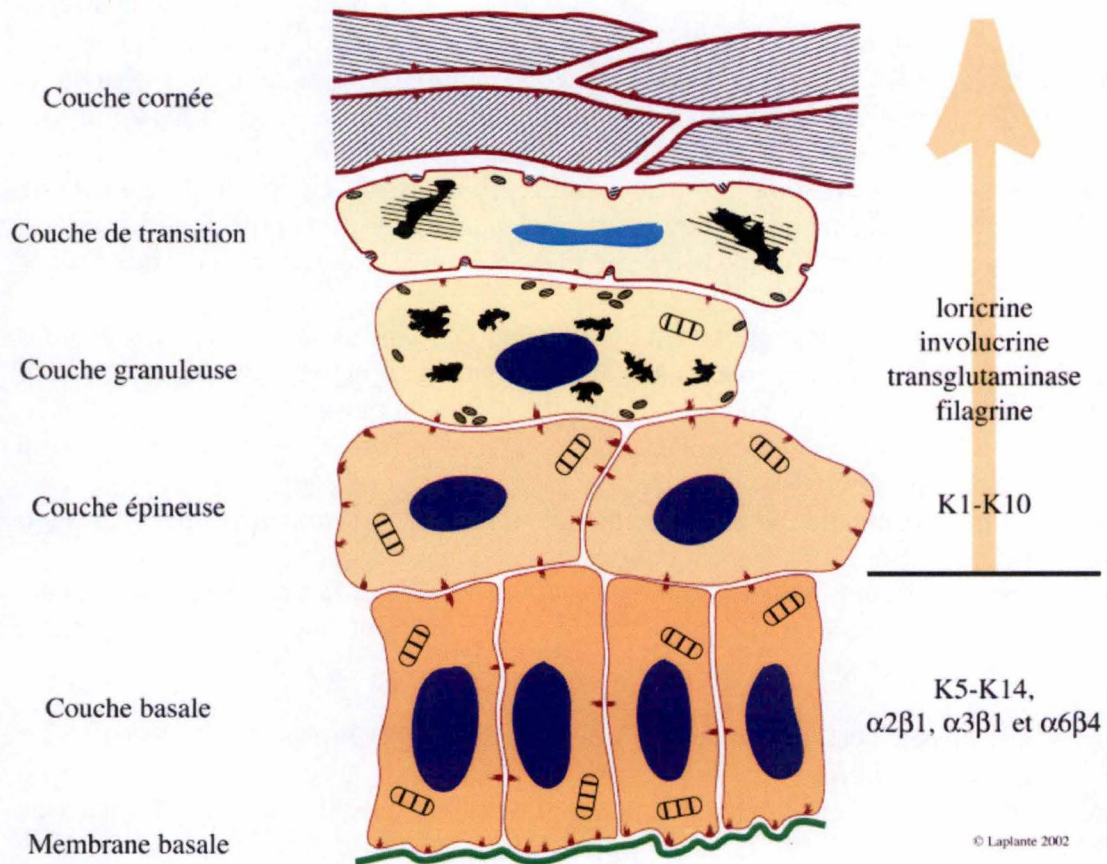


Figure 1.2. : Représentation des différentes couches constituant l'épiderme. Les kératinocytes s'organisent en couches jointives et se différencient de manière progressive. Les marqueurs de différenciation épidermique permettent de caractériser l'état de différenciation.
(www.theses.ulaval.ca)

Les cellules de Merkel, présentes dans la couche basale, ont essentiellement un rôle de récepteur sensoriel en contact avec une terminaison nerveuse.

Les mélanocytes produisent la mélanine qui, par des extensions cytoplasmiques sera transférée aux kératinocytes. Lors d'une irradiation aux UV prolongée, la production de ce pigment protecteur est induite et la mélanine se regroupe au-dessus du noyau de manière à protéger le matériel génétique de la cellule.

1.2.1.1. Les kératinocytes :

Les kératinocytes sont des cellules épithéliales qui subissent une différenciation morphologique et biochimique particulière appelée la kératinisation (figure 2). Celle-ci aboutit à la formation de cellules anucléées, aplaties (les cornéocytes) qui desquament à la surface cutanée. Quatre couches superposées caractérisent cette évolution (de la profondeur vers la surface) : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (figure 1.2).

☛ la couche basale (ou germinative) :

La couche basale est constituée d'une seule assise de cellules. Les kératinocytes y sont cylindriques ou cubiques et sont implantés, grâce aux hémidesmosomes, perpendiculairement à la lame basale sous-jacente.

Les kératinocytes peuvent être classés suivant leur potentiel prolifératif. On distingue les cellules souches, les cellules amplificatrices et les cellules post-mitotiques. Les cellules souches se divisent lentement mais ont une durée de vie apparemment illimitée, elles permettent le renouvellement continu de l'épiderme. Les cellules amplificatrices, qui proviennent d'une cellule souche, se divisent rapidement mais sont limitées dans leur durée de vie. Quant aux cellules post-mitotiques, provenant de la division de cellules amplificatrices, elles ne possèdent plus de potentiel prolifératif et elles entament le processus de différenciation. Les cellules post-mitotiques se trouvent aussi bien dans la couche basale que dans la couche épineuse, contrairement aux cellules souches et amplificatrices qui ne se trouvent que dans la couche basale.

☛ la couche épineuse :

La couche épineuse comprend 3 à 4 couches de cellules qui s'aplatissent dans la partie supérieure de celle-ci. Les cellules sont jointes par des sortes d'épines (ponts d'union) constituées de prolongements cellulaires solidarisés par des desmosomes contenant des faisceaux de tonofilaments ancrés sur les desmosomes.

Dès de la dernière assise de la couche épineuse, on observe des granules lamellaires (ou corps d'Odland) de 300 à 500 nm de diamètre, contenant des lipides, des hydrates de carbone complexés avec des protéines et des lipides, ainsi que des enzymes hydrolytiques qui joueront un rôle dans les couches supérieures de l'épiderme.

☛ La couche granuleuse :

En sortant de la couche épineuse, les cellules (1 à 3 assises) deviennent très aplaties et les noyaux entrent en pycnose. Le cytoplasme se remplit de grains de kératohyaline composés de profilaggrine (précurseur de la filaggrine). Ces grains grossissent au fur et à mesure que l'on se rapproche de la couche cornée. Les kératinocytes comprennent également de nombreux tonofilaments.

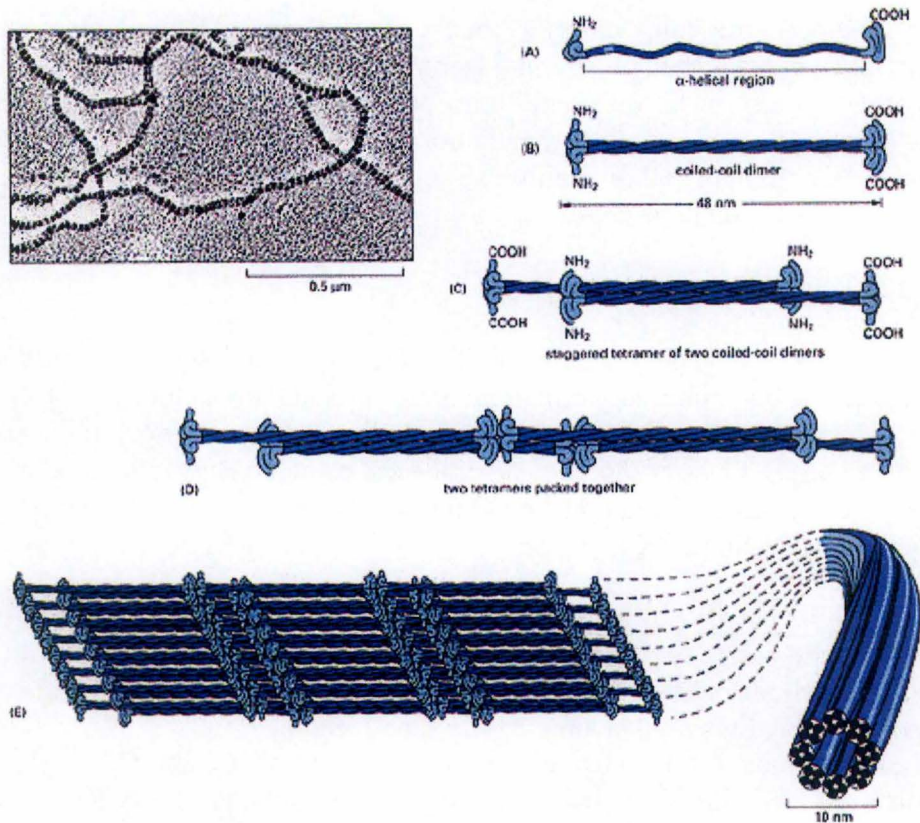


Figure 1.3: Représentation de la formation de filaments intermédiaires de kératine. Deux monomères identiques s'associent pour former dimère (B). Deux dimères s'assemblent ensuite pour former un tétramère ou protofilament (C). L'association hélicoïdale de huit tétramères forme le filament intermédiaire de kératine de 10 nm de diamètre (E) (Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J., The cytoskeleton. In: Molecular Biology of the Cell, third edition, 1994).

• **La couche cornée :**

Cette couche est formée de cellules mortes, emplies de kératine (cornéocytes) et anucléées. Le nombre d'assises cellulaires varie suivant la localisation anatomique (élevé au niveau des paumes des mains et des pieds), les individus et le sexe. On observe dans cette couche la dernière étape de la différenciation qui assure l'imperméabilité de la peau. Les corps d'Odland ont fusionné avec la membrane plasmique et ont déversé leur contenu dans l'espace intracellulaire, ce qui va jouer le rôle de "ciment" intercellulaire.

1.2.2. Le derme :

Le derme, couche intermédiaire sur laquelle repose l'épiderme, est un tissu conjonctif fibro-élastique constitué de fibroblastes baignant dans une matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire est composée de fibres de collagène (principalement les types I, III et V), de fibres élastiques (élastine) et de substance fondamentale amorphe (constituée de glycoprotéines de structure et protéoglycanes). Le derme contient les annexes cutanées (poils, ongles, glandes sébacées et sudoripares), le réseau vasculaire principal de la peau, le réseau nerveux et le réseau lymphatique.

1.2.3. L'hypoderme :

L'hypoderme, couche la plus profonde de la peau, est constitué principalement de tissu adipeux. Les adipocytes jouent un rôle dans le stockage énergétique sous la forme de graisses (triglycérides et acides gras). L'hypoderme est un isolant thermique et joue également un rôle de protection mécanique en absorbant les chocs.

1.3. La différenciation épidermique et ses marqueurs :

La différenciation commence lorsque les kératinocytes perdent leur adhésion à la jonction épidermo-dermique. Au cours de cette différenciation, les kératinocytes subissent des modifications phénotypiques qui mèneront à la production de cellules mortes qui seront éliminées à la surface de la peau.

1.3.1. Les protéines des filaments intermédiaires :

Les kératines sont des protéines du cytosquelette appartenant à la famille des protéines de filaments intermédiaires (IFP). Il existe plus de 35 kératines différentes. Les kératines acides (K1 à K8) représentent les IFP de type I tandis que les kératines basiques (K9 à K20) sont les IFP de type II. Dans l'épiderme, 30% du poids sec des cellules basales est représenté par les filaments intermédiaires. Ce pourcentage atteint 80% au niveau des cornéocytes.

Les protéines des filaments intermédiaires possèdent une même organisation structurale à savoir un domaine central en hélice α d'environ 310 acides aminés, encadré par un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal non hélicoïdaux de tailles variables. La polymérisation des filaments de kératine débute par la formation d'un hétérodimère comprenant une kératine acide et une kératine basique (figure 1.3). Une paire d'hétérodimères s'assemble pour former le protofilament, sous-unité de base du filament intermédiaire. Huit

protofilaments forment un filament intermédiaire de 10nm de diamètre, qui peut s'assembler avec d'autres filaments intermédiaires pour former un réseau reliant la membrane nucléaire à la membrane cytoplasmique.

1.3.2. Les marqueurs de différenciation épidermique :

Il est possible de discriminer les cellules non différenciées des cellules différenciées via l'analyse de la composition des filaments intermédiaires de kératines.

On retrouve habituellement dans l'épiderme, 4 types de kératines constituant des marqueurs de la différenciation épidermique: K5, K14, K1 et K10. Durant la différenciation normale d'un kératinocyte, les kératines K5 (58 kDa, kératine basique) et K14 (50 kDa, kératine acide) sont exprimées dans la couche basale de l'épiderme et constituent par conséquent des marqueurs pour des cellules peu ou pas différenciées. Par contre K1 (67 kDa, kératine basique) et K10 (56,5 kDa, kératine acide) sont exprimées dans les couches suprabasales et constituent des marqueurs de différenciation précoce (figure 1.2).

Certains changements physiologiques et pathologiques se traduisent par une expression différente de kératines. Par exemple, lors de dommages à la peau, comme la cicatrisation épidermique, ou le psoriasis, les kératines K6 et K16 sont présentes dans l'épiderme.

Au niveau de la couche granuleuse, les cellules synthétisent de la filaggrine et de la loricrine (Eckert et al., 1997). La filaggrine est une protéine basique qui compacte les filaments de kératine au sein de la matrice cornéocytaire. Elle est rapidement dégradée par des protéases en acides aminés qui vont retenir l'eau et donc jouer un rôle d'hydratation de la couche cornée.

L'involucrine, qui est une protéine riche en glutamine et en lysine, est exprimée au niveau de la couche épineuse et granuleuse. L'involucrine et la loricrine sont des marqueurs de différenciation tardive. Ces protéines jouent en effet un rôle dans la formation de l'enveloppe cornée.

1.4. **Les modèles de cultures *in vitro* des kératinocytes humains :**

Différentes techniques de cultures *in vitro* ont été mises au point pour permettre d'étudier les kératinocytes.

En 1975, Rheinwald et Green ont établi une première procédure permettant la multiplication *in vitro* de kératinocytes épidermiques humains. Pour ce faire, ils ont utilisé comme lit nourricier des fibroblastes 3T3 irradiés aux rayons gamma. Ensuite, ils ont inoculé ces cultures avec des cellules épidermiques. Celles-ci se multiplient et éliminent progressivement les fibroblastes de la "couche nourricière". Dans ce modèle de culture, le milieu contient du sérum de veau fœtal ainsi que de nombreux facteurs de croissance. Malheureusement, ce modèle présente des inconvénients. Le premier désavantage est de ne pas pouvoir contrôler la composition du milieu de culture. En effet, les fibroblastes irradiés produisent une série de facteurs de croissance et donc, la composition du sérum est mal définie. Ensuite, les kératinocytes engendrés par ce modèle n'expriment pas les marqueurs de différenciation K10 et K1, ce qui suggère une différenciation anormale.

Afin d'éviter ces problèmes, Boyce et Ham (1983) ont mis au point des conditions de culture où les cellules nourricières et le sérum ne sont pas nécessaires pour la croissance et la différenciation des kératinocytes *in vitro*.

Boyce et Ham utilisent comme milieu le MCDB 153 (contenant notamment de l'EGF) et de l'extrait pituitaire bovin. Cet extrait sert lors de l'ensemencement de la culture.

Utilisant un modèle similaire, Cook et al. ont démontré en 1991 que les kératinocytes ayant atteint une densité cellulaire de 40 à 50% sécrètent des facteurs de croissance qui permettent une croissance autocrine (ou paracrine), c'est-à-dire où les kératinocytes produisent des facteurs de croissance et se stimulent eux-mêmes (Cook et al., 1991a). Les facteurs de croissance exogènes ne sont donc plus nécessaires, sauf pour l'initiation de la culture. De plus, les milieux conditionnés de ces cultures (sans sérum) contiennent une activité mitogène qui se trouve inhibée par de l'héparane sulfate ou des anticorps monoclonaux produits contre le récepteur de l'EGF et capables d'empêcher la liaison d'un ligand. Ces observations leur permirent la même année de démontrer que les kératinocytes produisent en culture autocrine un facteur de la famille EGF liant l'héparine : l'amphiréguline (Cook et al., 1991b).

Pittelkow et al., ont montré en 1993 que la prolifération autonome des kératinocytes n'est pas bloquée par un anticorps contre le TGF- α mais bien par un anticorps contre le récepteur de l'EGF. L'anticorps agit comme un antagoniste pour la liaison du ligand. Ce groupe démontra ainsi l'importance de l'activation du récepteur de l'EGF dans la croissance autocrine du kératinocyte (Pittelkow et al., 1993).

Le type de culture permettant la prolifération autocrine des kératinocytes permet donc de contrôler totalement la composition du milieu. De plus, dans ces conditions, les cellules se différencient avec l'augmentation de la densité cellulaire, ce qui permet d'imiter les mécanismes d'initiation de la différenciation *in vivo* (Poumay et Pittelkow, 1995).

2. La cicatrisation de la peau :

2.1. Types de blessures :

La peau, exposée de façon directe à l'environnement, est dès lors particulièrement sujette aux agressions de toutes sortes. La peau peut subir des dommages lors de brûlures, de coupures, de déchirures, de frottements, ... Le degré de gravité de la blessure varie selon certains facteurs comme :

- la profondeur, qui est classifiée en trois degrés d'atteinte.
 - Les plaies du premier degré (plaies partielles) ne touchent que l'épiderme. Elles proviennent le plus souvent d'un coup de soleil, d'une légère brûlure ou d'une petite entaille.
 - Les plaies du deuxième degré sont plus profondes. L'épiderme, la membrane basale et une partie du derme sont détruits mais les annexes épithéliales subsistent.
 - Les plaies du troisième degré proviennent entre autres de coupures, de brûlures beaucoup plus profondes. Dans le cas présent, une destruction totale de l'épiderme et du derme, y compris les annexes épithéliales, est observée.

- l'étendue en surface corporelle.

Afin de maintenir les fonctions essentielles de la peau et notamment son rôle de barrière, il est important de reconstruire la portion du tissu endommagé. La réparation tissulaire requiert une coordination précise de la ré-épithélialisation, de la réparation dermique et de l'angiogenèse. La ré-épithélialisation est caractérisée par la régénération de l'épiderme qui permettra de reformer la barrière protectrice de la peau. Ce processus consiste plus particulièrement en une migration, une prolifération et enfin une différenciation des kératinocytes.

2.2. Mécanisme de la cicatrisation cutanée :

La cicatrisation n'est pas un simple processus dans lequel différents facteurs de croissance libérés vont activer la migration et la prolifération des cellules dans le tissu endommagé. Non, il s'agit d'un ensemble de processus dynamiques impliquant de nombreux médiateurs solubles, des cellules sanguines, la matrice extracellulaire, etc.

Successivement, on peut caractériser la cicatrisation en 3 phases, qui se chevauchent dans le temps :

- l'inflammation,
- la formation du tissu de granulation et la ré-épithélialisation,
- le remodelage des tissus vers une structure cutanée normale.

2.2.1 L'inflammation :

Une blessure ou une brûlure cutanée dépassant l'épaisseur de l'épiderme provoque la lésion d'un vaisseau sanguin et une hémorragie plus ou moins importante. Suite à l'agrégation des plaquettes et à la coagulation du sang, le clou plaquettaire va rapidement se former. Cette première réaction est destinée à maintenir l'homéostasie de l'organe et réunit lâchement les bords de la plaie. Le clou plaquettaire constitue de plus, une matrice provisoire sur laquelle

les cellules endothéliales, les cellules inflammatoires, les fibroblastes et les kératinocytes vont pouvoir migrer. Les plaquettes ont également un second rôle lorsqu'elles sont activées : elles sécrètent de nombreux médiateurs biochimiques, notamment des facteurs de croissance. Ceux-ci sont chémoattractants pour les cellules inflammatoires et sont également des facteurs très mitogènes pour les fibroblastes et les cellules endothéliales.

Des neutrophiles et des monocytes envahissent ensuite la plaie et vont la "nettoyer". Ils sécrètent de plus des médiateurs vasodilatateurs et des cytokines qui activent les fibroblastes et les kératinocytes et enfin, attirent les macrophages. Ces derniers vont, en plus de leur rôle de phagocyter les pathogènes, sécréter des facteurs de croissance tels le FGF (fibroblast growth factor), EGF (épithélial growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), TNF- α (tumor necrosis factor), etc.

2.2.2. La formation du tissu de granulation et la ré-épithélialisation :

Cette phase commence dans les heures qui suivent la blessure. En effet, une fois le caillot formé et rétracté, la régénération des tissus peut rapidement commencer. En même temps qu'un tissu conjonctif jeune, fortement vascularisé (le tissu de granulation) se met en place, les kératinocytes sains migrent, prolifèrent et se différencient afin de recouvrir la plaie le plus rapidement possible.

▪ Formation du tissu de granulation :

Sous l'action de cytokines, les fibroblastes synthétisent une nouvelle matrice extracellulaire composée dans un premier temps de collagène III, puis de collagène I, de fibronectine et de protéoglycanes. Ils synthétisent également des enzymes protéolytiques dont les métalloprotéases qui participent au remodelage matriciel et permettent aux cellules (kératinocytes, cellules endothéliales, cellules inflammatoires et également fibroblastes) de se frayer un chemin dans la matrice.

▪ La migration des kératinocytes :

La migration est activée par plusieurs mécanismes : la perte de l'inhibition de contact, la présence de médiateurs produits lors de la phase inflammatoire et de plus, le fait d'être en contact avec des fibrines et fibronectines et la présence de collagénase.

Parmi les facteurs contrôlant la migration des kératinocytes, on retrouve de nombreux facteurs de croissance, par exemple, ceux de la famille de l'EGF.

▪ La prolifération des kératinocytes :

Suite à la blessure, une vague mitotique va se produire afin de combler l'espace créé par la migration des kératinocytes adjacents à la plaie. Les facteurs impliqués sont l'IL-1, l'EGF et le FGF produits par les plaquettes et les macrophages. Les kératinocytes stimulent également leur prolifération par un mécanisme autocrine. Depuis quelques années, on sait qu'un autre membre de la famille de l'EGF, en l'occurrence HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) ayant de l'affinité pour l'héparine, jouerait également un rôle important dans le mécanisme de réparation tissulaire (Marikovsky et al., 1993).

Enfin, les fibroblastes et les leucocytes, par un mécanisme paracrine, libèrent aussi des facteurs (par exemple le KGF), ce qui induit également la prolifération des kératinocytes.

2.2.3. Le remodelage des tissus vers une structure cutanée normale :

Une semaine après la blessure, sous l'action de facteurs de croissance, une proportion des fibroblastes se transforment en myofibroblastes et ont dès lors, la capacité de générer des forces contractiles. Cette étape permet de réunir les bords de la plaie.

Peu à peu, le tissu de granulation va se raréfier en fibroblastes et une structure collagénique plus dense apparaît, tandis que le réseau vasculaire s'organise (Singer et al., 1999 ; Martin 1997).

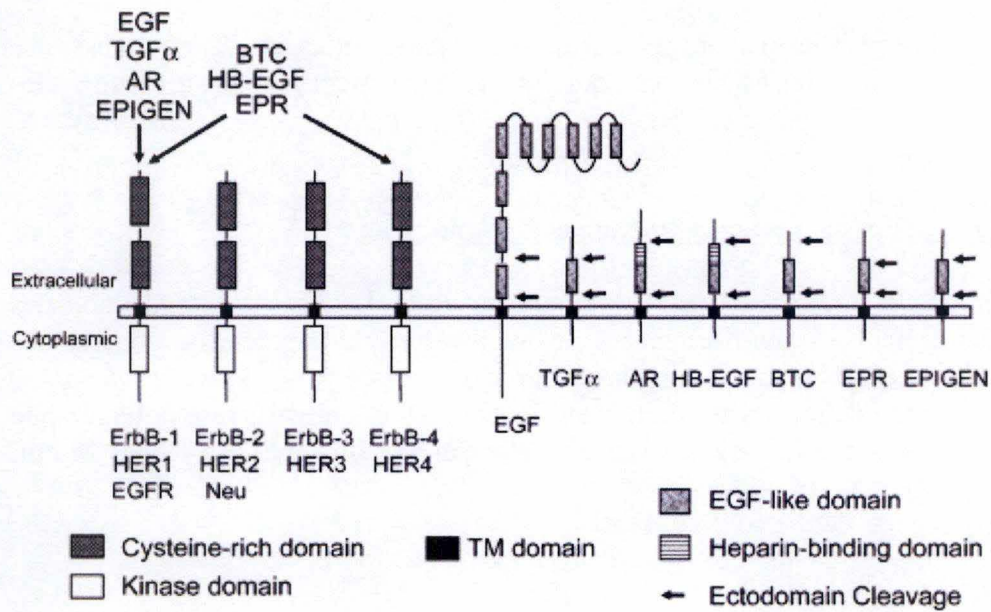


Figure 1.4 : Schéma représentant les facteurs de croissance de la famille EGF et leurs récepteurs. EGF (epidermal growth factor), TGF α (transforming growth factor α), AR (amphiréguline), HB-EGF (heparin binding EGF-like growth factor), BTC (betacelluline), EPR (épiréguline) et EPG (épigène) font partie de la famille EGF. Tous ces facteurs de croissance ont des précurseurs transmembranaires et sont caractérisés par un ou plusieurs domaines EGF. Pour pouvoir se lier au récepteur, les facteurs doivent être clivés. Les flèches indiquent les sites de clivage des facteurs transmembranaires (Harris et al., 2003).

3. Les facteurs de croissance épidermique et HB-EGF :

3.1. Généralités :

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'épiderme est un tissu qui se renouvelle constamment, mais paradoxalement son épaisseur reste plus ou moins constante. De plus, lors de blessure cutanée, l'épiderme est capable d'hyperproliférer et de se régénérer assez rapidement. Le contrôle du taux de prolifération et la différenciation sont donc des phénomènes très régulés, grâce à différents signaux tels l'activation des récepteurs à tyrosines kinases par les facteurs de croissance et l'adhésion des kératinocytes à la matrice extracellulaire ou à d'autres kératinocytes. La migration des kératinocytes est également régulée via ces processus (Hashimoto, 2000).

Différents types de familles de facteurs de croissance ont été identifiés à ce jour: EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin growth factor), NGF (Nerves Growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), TGF- β (transforming growth factor β). Parmi ceux-ci, les familles EGF et TGF- β semblent jouer des rôles centraux. Les membres de la famille EGF permettent en effet la prolifération des kératinocytes tandis que TGF- β inhibe la prolifération et favorise la production de tissus conjonctifs (Hashimoto, 2000). Nous nous intéresserons dans ce travail à la famille EGF et plus particulièrement à HB-EGF, vu son rôle crucial lors de la réparation de l'épiderme.

3.2. La famille EGF :

La famille EGF comprend principalement: EGF (epidermal growth factor), TGF- α (transforming growth factor- α), HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), AR (amphiréguline), EPR (épiréguline), BTC (bétacelluline) et NGR (neurégulines 1, 2, 3, 4). Ces facteurs de croissance partagent quelques points communs. Premièrement, ils possèdent tous un ou plusieurs motifs de 6 résidus cystéines, ou domaine EGF, ainsi qu'un domaine transmembranaire (Nishi et al., 2004). Les cystéines forment entre elles 3 ponts disulfures : C1-C3, C2-C4 et C5-C6 (Harris et al., 2003).

Ensuite, tous les facteurs de croissance de la famille EGF sont synthétisés en membrane sous forme de précurseurs puis, le domaine extracellulaire de ces précurseurs est clivé par des protéases afin de libérer les facteurs de croissance qui peuvent se lier sur leurs récepteurs (figure 1.4).

L'HB-EGF et l'amphiréguline ont une caractéristique supplémentaire, ils possèdent un domaine liant l'héparine ou "amino-terminal heparin binding domain".

3.3. EGF :

Ce facteur de croissance fut isolé en 1960 par Stanley Cohen, à partir d'un extrait de glandes sous-maxillaires de souris. Cohen montra la capacité de EGF à stimuler l'éruption des incisives et l'ouverture des paupières de souriceaux (Cohen, 1962). Plus récemment, plusieurs études indiquèrent le rôle de EGF dans la cicatrisation cutanée (Gibbs et al., 2000; Haase et al., 2003).

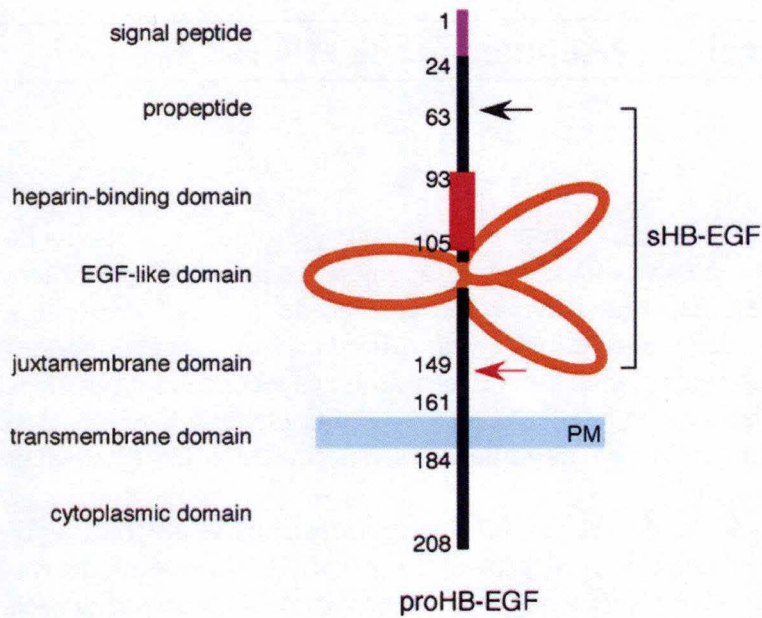


Figure 1.5. : Schéma de la structure de proHB-EGF. La forme mature du facteur de croissance (sHB-EGF) est constitué du propeptide, d'un domaine heparin-binding (domaine liant l'héparine), d'un domaine EGF et du domaine juxtamembranaire. Cette forme sHB-EGF est générée par clivages protéolytiques au niveau du domaine juxtamembranaire (flèche rouge) et au niveau du propeptide N terminal (flèche noire) (Iwamoto et al., 2006).

Au niveau structural, l'EGF (epidermal growth factor) est un polypeptide de 53 acides aminés qui est synthétisé sous forme d'un précurseur en membrane de 1207 acides aminés chez l'humain. Les métalloprotéases impliquées dans le clivage n'ont pas encore été identifiées (Harris et al., 2003).

3.4. HB-EGF :

3.4.1. Présentation :

HB-EGF fut pour la première fois identifié dans un milieu conditionné par des macrophages (Higashiyama et al., 1991). Comme les autres membres de la famille EGF, ce facteur de croissance est synthétisé sous forme d'un précurseur en membrane, proHB-EGF (Davis-Fleischer et al., 1998). Ce précurseur de 208 acides aminés est composé d'un peptide signal, d'un propeptide, d'un domaine de liaison à l'héparine, d'un domaine EGF-like, d'un domaine juxtamembranaire, transmembranaire et cytoplasmique (figure 1.5).

Suite à un stimulus, proHB-EGF peut être clivé, ce qui permet de libérer la forme soluble du facteur de croissance, HB-EGF (ou sHB-EGF). Différentes isoformes de HB-EGF varient de 68 à 87 acides aminés (Higashiyama et al., 1992).

Le locus du gène HB-EGF se trouve sur le chromosome 5 (5q23 chez l'homme) et contient 6 exons et 5 introns (Nishi et Klagsburn, 2004). L'expression de HB-EGF est très régulée et un nombre important de régulateurs a déjà été identifié, citons par exemple: des cytokines inflammatoires (par exemple l'IL-1), des facteurs de croissance (par exemple le FGF), des agonistes des protéines G couplés aux récepteurs (par exemple la thrombine) ainsi que des lipides athérogéniques (par exemple le lysophosphatidylcholine). Différents stress, notamment des stress hyperosmotiques, semblent également réguler l'expression de HB-EGF (Raab et Klagsburn, 1997).

3.4.2. Rôles de proHB-EGF et HB-EGF :

Au niveau cellulaire, Hashimoto et al. ont montré que HB-EGF est un facteur produit durant la croissance autocrine des kératinocytes (Hashimoto et al., 1994). HB-EGF serait également mitogène pour les fibroblastes et les cellules musculaires lisses ainsi que chémoattractant pour les cellules musculaires lisses. Aux niveaux physiologique et pathologique, HB-EGF est impliqué dans la cicatrisation tissulaire (Marikovsky et al., 1993), l'implantation du blastocyste (proHB-EGF serait un facteur d'adhésion pour le blastocyste) (Raab et al., 1996), l'hypertrophie cardiaque, l'hyperplasie telle que rencontrée dans l'athérosclérose (Miyagawa et al., 1995 ; Nishi et Klagsburn, 2004) ou après un traitement par des rétinoïdes dans l'épiderme (Rittié et al., 2006).

3.4.3. Le "shedding" de proHB-EGF :

Comme nous l'avons mentionné, HB-EGF est synthétisé sous forme d'un précurseur membranaire avant d'être clivé et libéré sous forme soluble. Ce clivage de la forme précurseur proHB-EGF en sHB-EGF est appelé "ectodomain shedding" ou "shedding". Ce processus change la localisation, le destin ainsi que le mode d'action du facteur de croissance. ProHB-EGF n'est pas simplement un précurseur en membrane mais est une molécule biologiquement

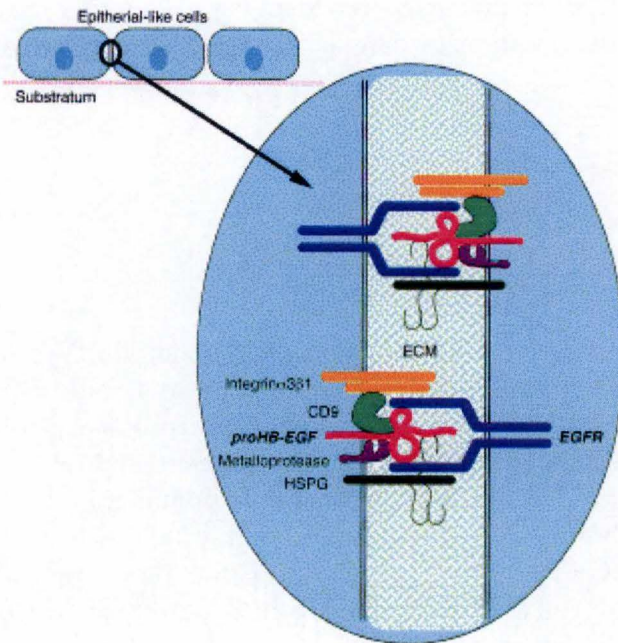


Figure 1.6. : Modèle hypothétique du complexe formé par proHB-EGF dans les cellules épithéliales confluentes. ProHB-EGF forme un complexe avec CD9, l'intégrine $\alpha3\beta1$, une métalloprotéase et HSPG (héparine sulfate protéoglycane). En situation normale, on pense que ce complexe est lié au récepteur de l'EGF (EGFR) et que cette interaction inhibe la prolifération cellulaire (Iwamoto and Mekada, 2000).

active. En effet, il forme des complexes avec CD9, l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ et les héparanes sulfate protéoglycanes (HSPG) (figure 1.6.). Ce précurseur constitue aussi le site d'ancrage cellulaire pour la toxine diphtérique (Naglish et al., 1992). Enfin, contrairement à HB-EGF, proHB-EGF agit comme un régulateur de la prolifération cellulaire. Le "shedding" permet donc de passer d'un mode juxtacrine, c'est-à-dire un mode où le facteur se trouve en membrane et ne peut agir que sur les cellules voisines, à un mode paracrine, c'est-à-dire où le facteur est synthétisé au sein d'un tissu et agit sur différents types cellulaires (Iwamoto et Mekada, 2000).

Ces constatations ont permis au groupe de chercheurs japonais d'émettre un modèle du rôle de HB-EGF lors de la cicatrisation cutanée (Iwamoto et Mekada, 2000), (figure 1.7). En situation normale, c'est-à-dire lorsqu'un tissu est intact, les cellules ne prolifèrent pas, grâce à la régulation de proHB-EGF. Lorsque le tissu est endommagé, les plaquettes, monocytes, macrophages et autres cellules libèrent différents facteurs dont le LPA (lysophosphatidic acid) qui induit le "shedding" de proHB-EGF et donc la libération du facteur de croissance. HB-EGF peut donc ainsi stimuler la prolifération et la migration de cellules telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes, ce qui permettra de reformer le tissu lésé. Enfin, quand le tissu est réparé, l'interaction entre proHB-EGF et son récepteur est de nouveau possible et donc la prolifération est arrêtée (Iwamoto et Mekada, 2000).

3.4.4. Stimuli induisant le shedding de proHB-EGF :

ProHB-EGF et sHB-EGF ont vraisemblablement des actions opposées, ce qui suggère l'importance des mécanismes régulateurs du "shedding" (ou clivage). Plusieurs études révèlent l'implication de différentes voies de signalisation lors du clivage proHB-EGF en HB-EGF. Différentes métalloprotéases seraient impliquées dans le "shedding" dont la classe des MMP ("matrix métalloprotéases") et la classe des ADAM (a disintegrin and metalloprotease). Les métalloprotéases de la matrice ou MMP possèdent une structure zinc dépendante et sont classées selon la matrice extracellulaire qu'elles dégradent. Les ADAM, quant à elles, sont des protéines membranaires possédant une métalloprotéase extracellulaire et un site de liaison aux intégrines. Les mécanismes par lesquelles ADAM sont activées sont en cours d'étude. Penchons-nous donc d'abord sur les stimuli induisant le "shedding" ou clivage.

A ce jour, plusieurs métalloprotéases (MMP3, MMP7, ADAM9, ADAM 10, ADAM11, ADAM12 et ADAM17) impliquées dans le shedding ont été définies. En effet, chez les cellules Vero (cellules de rein de singe), si l'on traite avec des inhibiteurs de métalloprotéases, le shedding ne se fait plus (Lanzrein et al., 1995). Les protéases impliquées dans le clivage de proHB-EGF dépendent du type cellulaire et de l'environnement biologique. Par exemple, la MMP7 est impliquée dans le "shedding" pour les cellules épithéliales, plus spécifiquement la surface apicale des cellules. ADAM12 semble, quant à lui, être responsable du "shedding" chez les cardiomyocytes (Goishi et al., 1995). Mais un aspect important dans la compréhension du clivage est bien sûr de savoir quels sont les activateurs de ces protéases.

En fait, de nombreuses études révèlent que différentes voies de signalisation entrent en jeu. En 1995, Goishi et al., montrèrent que le clivage de proHB-EGF peut être induit en traitant des cellules Vero avec l'ester de phorbol TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) (Goishi et al., 1995). Les résultats de ce traitement suggèrent que le mécanisme est dépendant des PKC, puisque le TPA est un activateur de celles-ci. Plus précisément, ce serait l'isoforme PKC γ qui contribuerait au "shedding". Cet isoforme se lie en effet au domaine cytoplasmique

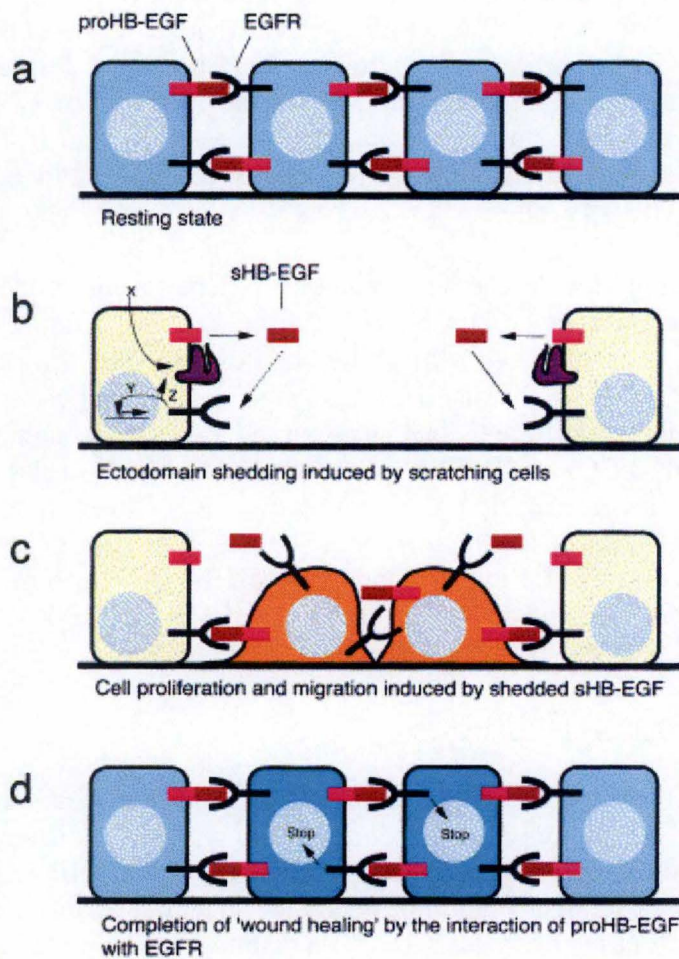


Figure 1.7. : Modèle de cicatrisation cutanée.

a : En conditions normales, les cellules expriment proHB-EGF en membrane. La prolifération des cellules est inhibée par l'interaction entre proHB-EGF et EGFR (le récepteur de l'EGF).

b : Lors d'une blessure, il y a sécrétion de plusieurs facteurs tels le LPA (acide lysophosphatidique), la thrombine et des cytokines (IL-1,...), ce qui induit le shedding de proHB-EGF en HB-EGF par des métalloprotéases.

c : La sécrétion de HB-EGF active le récepteur de l'EGF de manière paracrine et autocrine. Cette activation induit un feed-back positif, en effet, il permet la libération de HB-EGF supplémentaire ainsi que l'expression d'autres gènes permettant la prolifération cellulaire et la migration.

d : Lorsque les cellules ont re-colonisés la blessure, l'interaction entre proHB-EGF et EGFR contribue à inhiber l'hyperprolifération cellulaire, qui n'est plus nécessaire lorsque l'intégrité cutanée est rétablie.

(Iwamoto & Mekada, 2000)

de MDC9/ADAM9, une métalloprotéase de la famille ADAM (Weskamp et al., 1996; Izumi et al., 1998).

En 2001, Hirata montra sur les cellules Vero que le LPA (acide lysophosphatidique) stimule les récepteurs couplés aux protéines G, ce qui induit également le "shedding". (Hirata et al, 2001) Cependant, cette voie de signalisation est différente de celle médiée par le TPA et passerait probablement par la voie des MAPK (figure 1.8).

Enfin, par un mécanisme de cross- et auto-induction (cf. 3.4.5.), la liaison et l'activation par un facteur de croissance de la famille EGF sur son récepteur pourraient, par un mécanisme dépendant des MAPK, induire le "shedding" ou clivage de proHB-EGF. Les MAPK en effet permettraient l'expression de protéases (Stoll et al., 2002; Umata et al, 2001) (figure 1.8)

3.4.5. Mécanismes régulateurs des facteurs de croissance de la famille EGF par auto et cross-induction chez les kératinocytes humains :

Le concept de croissance autocrine est défini par le fait qu'une cellule produit et sécrète elle-même un ou plusieurs facteurs de croissance, lesquels stimulent ou inhibent ensuite la prolifération d'autres cellules du même type. A l'origine, ce processus fut invoqué pour expliquer la prolifération des cellules malignes (Sporn et Todaro, 1980). Par la suite, on se rendit compte que la croissance des cellules normales était également stimulée par un mécanisme autocrine lors de différentes situations telles que la réparation tissulaire (Marikovsky et al., 1993) ou lors de culture de kératinocytes (Piepkorn et al., 1994).

Comme mentionné précédemment, les kératinocytes sont les principales cellules constituant l'épiderme humain. Leur croissance est stimulée par une variété de facteurs de croissance, les plus importants étant ceux faisant partie de la famille EGF (Hashimoto et al., 1994). En 1987, Coffey et al. démontrèrent que le TGF- α était sécrété de façon autocrine par les kératinocytes. De par cette découverte, on s'intéressa alors aux autres membres de la famille EGF. L'amphiréguline (Cook et al., 1991) est également synthétisée et sécrétée par les kératinocytes de façon autocrine. En 1994, Hashimoto et al. se concentrèrent sur HB-EGF. Pour caractériser la nature autocrine de ce facteur de croissance dans une culture de kératinocytes, ils examinèrent l'effet d'un anticorps anti-HB-EGF sur la croissance de la culture. Ils observèrent une diminution d'environ 30% par rapport aux cellules contrôles (non traitées avec un anticorps ou traitées avec un anticorps anti-chèvre IgG). Ceci permit d'indiquer la nature autocrine de HB-EGF. En 2000, les mêmes auteurs démontrèrent que l'épiréguline était le quatrième facteur de croissance de la famille EGF à agir de façon autocrine (Hashimoto et al., 2000).

La mise en évidence du caractère autocrine des kératinocytes était un pas en avant dans la compréhension de la prolifération cellulaire. Plus tard, on démontra que les facteurs de croissance de la famille EGF sont aussi capables d'induire leurs propres expressions ou l'expression d'autres facteurs de la famille EGF. Ce processus s'appelle "auto-induction" ou "cross-induction". L'addition de HB-EGF (1ng/ml) au milieu de culture d'une population de kératinocytes à sous-confluence et à confluence permet ainsi d'augmenter le taux d'ARNm de HB-EGF de 5,4 fois après 1 heure (Hashimoto et al., 1994). De plus, la même concentration de HB-EGF augmente aussi l'expression du TGF- α (au niveau ARNm) de 3,1 fois après 3 heures. De façon similaire, l'addition de TGF- α (1ng/ml) augmente de 10,2 fois l'expression de HB-EGF 6 heures après le traitement et l'EGF, 10,9 fois l'expression de HB-EGF après

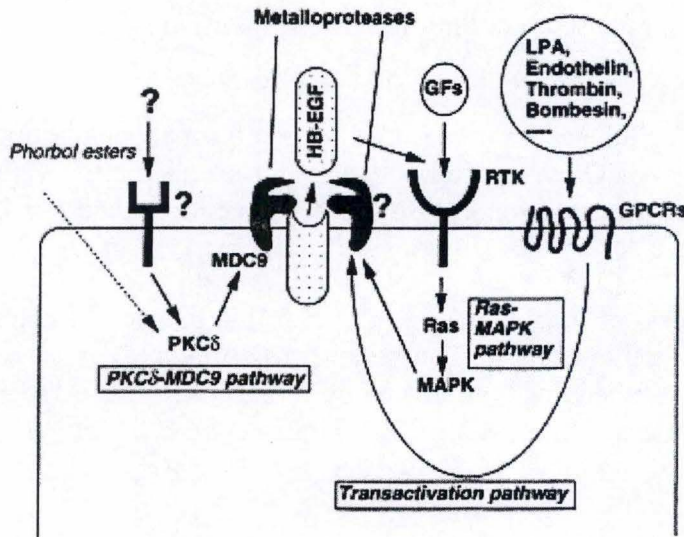


Figure 1.8. : Modèle du clivage de proHB-EGF en HB-EGF. Différentes voies de signalisation permettent le "shedding". Un traitement par le TPA active PKC δ , ce qui permet alors l'activation de la métalloprotéase MDC9. Une autre voie induisant le shedding de proHB-EGF passe par la voie de signalisation Ras-MAPK. Plusieurs facteurs de croissance (y compris HB-EGF) pourraient activer le récepteur à tyrosine kinase (par exemple EGFR) et permettre ainsi l'activation des MAPK. Les MAPK activent alors les métalloprotéases. La troisième voie de signalisation induisant le shedding passe par l'activation de GPCRs par différents ligands (Iwamoto et Mekada, 2000).

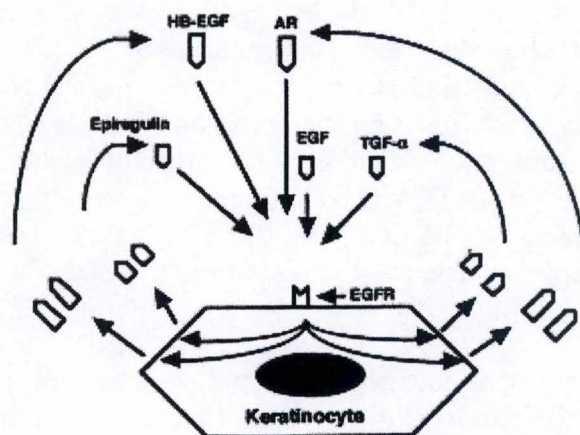


Figure 1.9. : Mécanisme d'auto- et cross-induction des facteurs de croissance TGF- α , amphiréguline, HB-EGF et épiréguline chez les kératinocytes humains (Hashimoto, 1994).

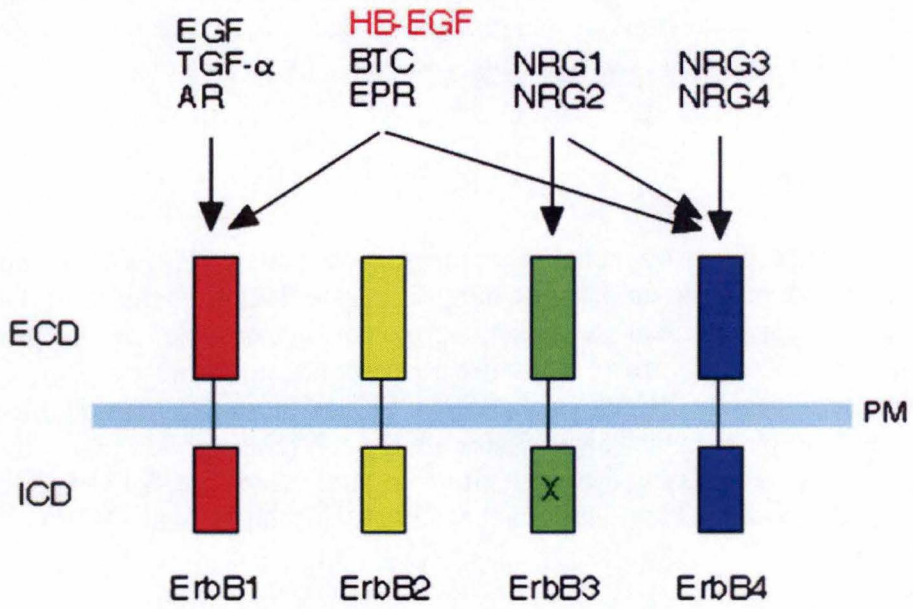
1h. D'autres résultats similaires avec l'épiréguline et HB-EGF ont été obtenus (Hashimoto et al., 2000). Ces différentes données permettent de démontrer la régulation de la croissance des kératinocytes par les facteurs de croissance de la famille EGF suivant des mécanismes auto- et cross-inducteurs (Hashimoto et al., 2000) (figure 1.9).

3.5. Amphiréguline :

L'amphiréguline partage de fortes homologies de séquence avec HB-EGF et tout comme celui-ci, l'amphiréguline possède un domaine liant l'héparine (Higashiyama et al., 1992).

L'amphiréguline est apparemment le facteur principal responsable de la prolifération autocrine des kératinocytes in vitro (c'est-à-dire sans sérum, ni extrait de glande pituitaire fœtal de veau, ni autre peptide) (Cook et al., 1991). Si l'on bloque l'amphiréguline à l'aide d'un anticorps anti-amphiréguline dans une culture de kératinocytes, on observe une diminution de 70% de la croissance de la culture (comparativement à l'HB-EGF où l'on observe une baisse d'environ 30%) (Piepkorn et al., 1998, Hashimoto et al., 1994).

A



B

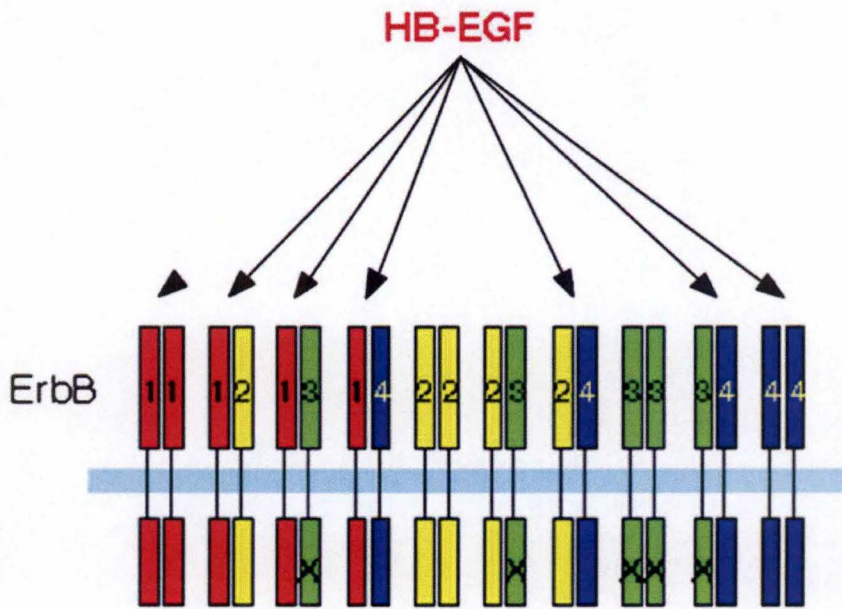


Figure 1.10 : A : Représentation de la liaison des ligands aux récepteurs HER (ErbB). Les ligands de la famille EGF peuvent être séparés en 4 catégories suivant leurs spécificités de liaison aux récepteurs HER (ou ErbB). B : Activation des récepteurs HER suite à la liaison du facteur de croissance HB-EGF. Chez les kératinocytes, HER4 n'est pas présent (Iwamoto et al., 2006)

4. Récepteurs HER et signalisation :

4.1. Les récepteurs HER :

4.1.1. Généralités :

Les facteurs de croissance de la famille EGF exercent leurs activités biologiques en se liant à des récepteurs tyrosine kinase (RTK), lesquels sont des protéines transmembranaires qui convertissent le signal extracellulaire (facteur de croissance) en signal intracellulaire (Elenius et al., 1997). La partie extracellulaire du récepteur sert de site de liaison pour le ligand, tandis que la partie intracellulaire comporte le domaine tyrosine kinase. Quatre récepteurs de la famille du récepteur de l'EGF ont été identifiés : HER1 (ou EGFR, EGF receptor) HER2, HER3 et HER4 (pour "human EGF receptor"). On nomme également erbB1, erbB2, erbB3 et erbB4 les gènes codant ces récepteurs, en raison de la similitude de ce gène avec le gène du virus de l'érythroblastome aviaire (v-erbB). Point de vue localisation, EGFR, erbB2 et erbB3 sont exprimés au niveau de l'épiderme humain mais pas erbB4 (De Potter et al., 2001).

Chez les vertébrés, les facteurs de croissance de la famille EGF se lient aux récepteurs HER's suivant différents degrés de préférence (Iwamoto et al., 2006) (figure 1.10, A). Une fois soluble et mature, HB-EGF libéré dans le milieu se lie à HER1 et HER4. Le facteur de croissance peut également activer HER2 et HER3 mais de façon indirecte, par hétérodimérisation entre HER1 ou HER4 et soit HER2, soit HER3 (figure 1.10, B).

4.1.2. Rôle du domaine "heparin binding" du facteur de croissance HB-EGF :

Comme nous l'avons mentionné, le facteur de croissance HB-EGF a de l'affinité pour les héparines et les héparanes sulfates se trouvant en membrane. Des études ont montré que si l'expression des héparanes sulfates est diminuée à la surface cellulaire, la capacité de liaison du facteur de croissance HB-EGF à son récepteur est diminuée également, ainsi que l'activité du facteur de croissance. Récemment, Takazaki et al. ont montré que le domaine "heparin binding" de HB-EGF agit en fait comme un régulateur négatif (Takazaki et al., 2004). En effet, tant que HB-EGF n'est pas lié aux héparanes sulfates, ce domaine supprime la capacité de liaison du domaine de l'EGF du facteur de croissance au récepteur HER. La liaison du domaine "heparin binding" permet de supprimer cette régulation négative (figure 1.11). Ce groupe de recherche a d'ailleurs montré que le domaine "heparin binding" n'était pas absolument nécessaire pour l'activité de HB-EGF.

4.1.3. Signalisation :

La liaison du ligand sur le récepteur EGF induit une homo- ou hétérodimérisation du récepteur, ce qui active les tyrosines kinases et stimule ainsi la transphosphorylation sur des résidus tyrosine spécifiques du domaine cytoplasmique du récepteur. C'est à partir de cette étape de phosphorylation des tyrosines que différentes voies de signalisation vont être enclenchées (Wiley, 2003).

Les résidus tyrosine phosphorylés recrutent et permettent la liaison de protéines qui possèdent un ou plusieurs domaines SH2 (src homology 2), par exemple la protéine adaptatrice Grb2

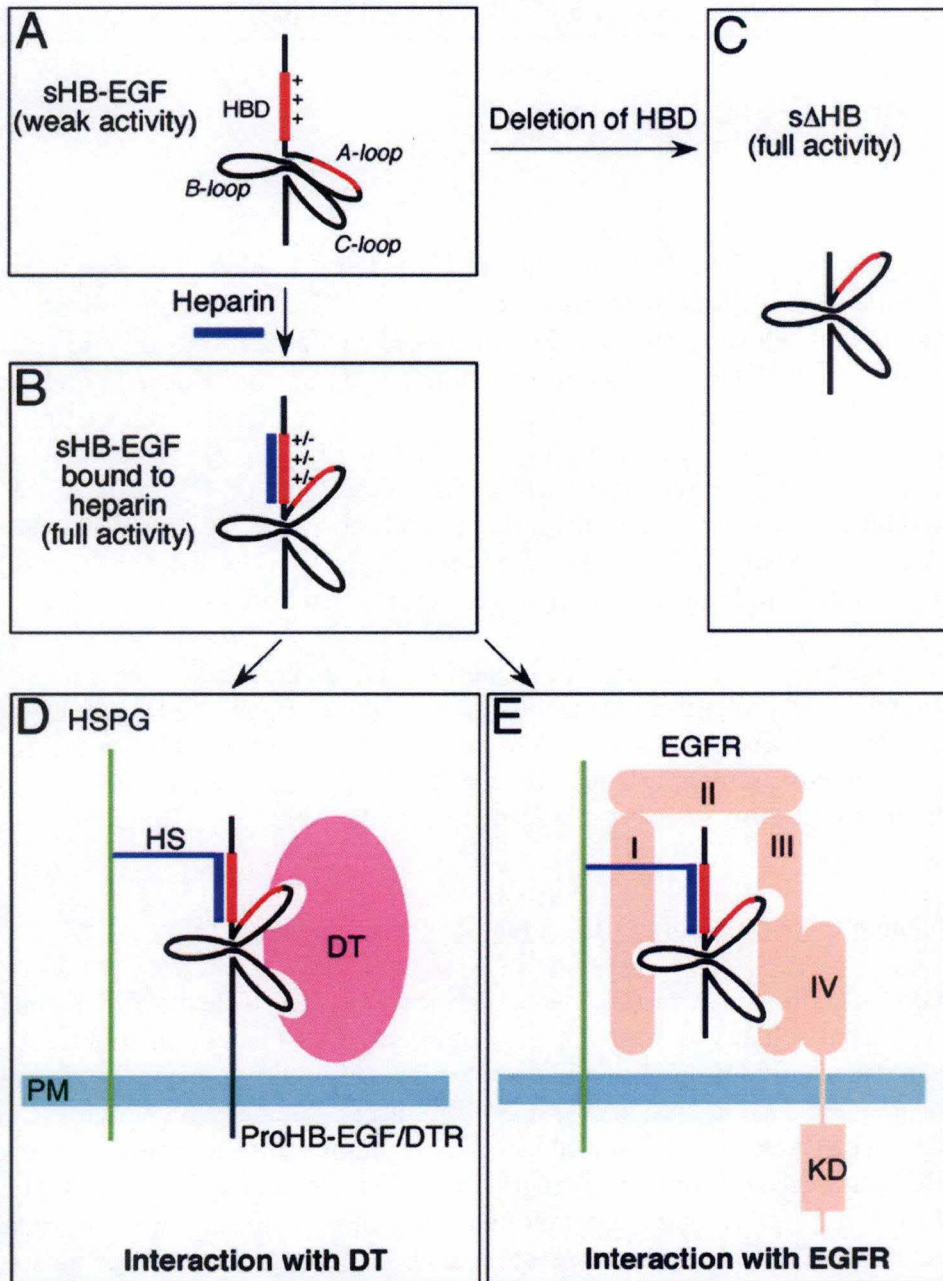


Figure 1.11: A : la structure du domaine "EGF-like" de HB-EGF est composée de trois boucles (A, B et C). Les acides aminés de la boucle A sont basiques (représentés par la ligne rouge), de même, le domaine "heparin-binding" est aussi constitué d'acides aminés basiques chargés positivement. B : l'interaction avec l'héparine (qui est acide) et le domaine "heparin-binding" neutralise les charges positives de celui-ci, ce qui induit un changement de conformation de la boucle A, puisque la répulsion ne se fait plus. Le facteur de croissance peut alors interagir avec son récepteur. C : la délétion du domaine "heparin-binding" diminue la répulsion électrostatique et donc, mime la situation de liaison avec l'héparine. D : la toxine diphtérique peut se lier à proHB-EGF. E : lorsque HB-EGF se lie au récepteur de l'EGF, toutes les boucles du domaine "EGF-like" interagissent avec le récepteur (Takazaki et al., 2004)

(figure 1.12.). Cette protéine possède un domaine SH2 ainsi que 2 domaines SH3 (Jorissen et al., 2003).

Grb2 lie, grâce au domaine SH3, le facteur SOS (guanine nucleotide exchange factor) qui se trouve dans le cytosol en situation normale. Ras est ensuite activé grâce à SOS qui échange le GDP de ras par du GTP. Une fois ras activé, celui-ci permet à son tour d'activer la sérine/thréonine kinase raf-1, qui à travers une série d'activations de kinases mène à la phosphorylation, l'activation et la translocation de MAP kinases (mitogen-activated protein kinase) dans le noyau (figure 1.12). Les MAPK phosphorylent différents facteurs de transcription. L'activation de la MAPK constitue de plus un feedback négatif (ou boucle de rétroaction négative) car elle dissocie le complexe Grb2-SOS (Pike et al., 2005).

Il existe d'autres protéines qui peuvent se lier aux tyrosines phosphorylées, citons par exemple la phospholipase C γ (PLC- γ), Shc, GTPase-activating protein (GAP) et qui peuvent déclencher d'autres voies de signalisation (Jorissen et al., 2003).

4.2. Les MAPK :

Les MAPK (mitogen-activated protein kinase) sont activées par une variété de stimuli et sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation de processus tels que l'activation du cycle cellulaire, arrêt du cycle cellulaire, différenciation, ... (Robinson et Cobb, 1997)

La cascade des MAP kinases consiste en une série de trois kinases successives. La première kinase, une MEK kinase (ou MAPK Kinase Kinase) est activée suite à la phosphorylation d'un récepteur membranaire. La MEK kinase activée va alors phosphoryler une MEK (ou MAPK kinase) qui va à son tour phosphoryler une MAPK. Les MAPK, une fois activées, peuvent être transloquées dans le noyau et activer des facteurs de transcription. (figure 1.13). Les MAPK ont de nombreuses cibles et leurs voies de signalisation sont souvent interconnectées. En conséquence, il est parfois difficile d'attribuer les effets à l'une ou l'autre kinase (Kyriakis et Avruch, 2001).

Les MAPK sont classées en 3 catégories : ERK(extracellular signal-regulated kinase), JNK (ou SAPK1, stress activated protein K) et p38.

- ERK joue un rôle central dans la transduction du signal des facteurs de croissance dans l'épiderme. Cette MAPK influence la prolifération des kératinocytes ainsi que leur survie.
- JNK est activé en réponse aux stress cellulaires.
- La famille p38 comprend 4 isoformes : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . Seuls p38 α , p38 β et p38 δ sont exprimés au niveau des kératinocytes (Ono et Han, 1999). p38 est également activée par des stress environnementaux ainsi que par de nombreux autres stimuli. Il faut savoir que l'activation de p38 dépend également du type cellulaire.

Cette MAPK est impliquée dans l'inflammation, la croissance cellulaire, la différenciation, le cycle cellulaire et la mort cellulaire.

Une fois activée, la MAPK p38 peut activer différents substrats : des protéines kinases, des facteurs de transcription (tableau 1) et d'autres protéines, telle que par exemple cPLA2.

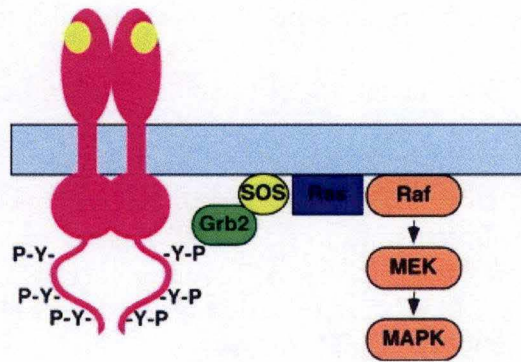


Figure 1.12. : Activation de la MAPK engendrée par la liaison d'un ligand de la famille EGF sur le récepteur HER1. Cette liaison induit la phosphorylation sur les tyrosines kinases, ce qui recrute la protéine adaptatrice Grb2, qui forme un complexe avec SOS. Celui-ci recrute ras en membrane qui active raf. Raf phosphoryle et active MEK qui peut activer la MAPK (Pike, 2005).

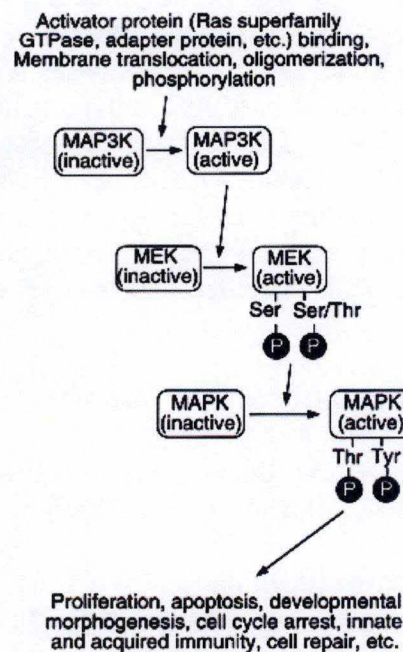


Figure 1.13.: Les MAP kinases.

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

5. Induction de la signalisation par les stress :

5.1. Généralités :

La peau représente l'interface entre l'organisme et l'environnement qui l'entoure. Il s'agit donc de l'organe qui est le plus sujet à être agressé. La couche cornée constitue dès lors une barrière très importante. Cependant, il arrive que l'agression soit telle que l'homéostasie du tissu est perturbée. Suite à cela, les kératinocytes produisent toutes une série de cytokines et autres molécules. Il s'en suit alors différentes voies de signalisation en réponse à ce stress et aux molécules produites par ce stress.

L'activation de la MAPK p38 est en général observée, elle est dès lors nommée stress kinase ou SAPK2. Elle peut en effet être activée par un traitement par les UVB (Wong et al., 2000), la méthyl- β -cyclodextrine (Jans et al., 2004), des stress oxydatifs et des chocs osmotiques (Fischer et al., 2004), etc.

Une fois activée, p38 phosphoryle et active de nombreux facteurs de transcription (tableau 1.) permettant l'expression de différents gènes, par exemple, l'involucrine.

5.2 Stress induit par l'extraction du cholestérol :

5.2.1. Généralités :

Le cholestérol est un lipide membranaire qui permet notamment de réguler la flexibilité et la stabilité mécanique de la bicouche membranaire. Il joue également un rôle important dans l'assemblage de microdomaines lipidiques appelés lipid rafts (ou radeaux lipidiques). Ces radeaux lipidiques sont constitués de sphingolipides (comprenant des gangliosides), de phospholipides avec des chaînes hydrocarbonées saturées et de cholestérol (Lafont et Van der Goot, 2005). On observe également plusieurs types de protéines : des protéines transmembranaires, des protéines insérées à la surface externe de la cellule par un groupement glycosyl phosphatidylinositol, appelées aussi protéines à ancras GPI et enfin, des protéines reliées à la surface interne par des chaînes d'acides gras (protéines myristoylées et palmitoylées) (Wang et Paller, 2006).

Le cholestérol et les lipid rafts sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires : la ségrégation de protéines membranaires et leurs concentrations, le transport intracellulaire. Mais le rôle le plus important des lipid rafts semble être leur fonction dans la transduction du signal.

5.2.2. Extraction du cholestérol :

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides qui comprennent 6, 7 ou 8 unités de glucopyranose, qui respectivement se nomment α -, β -, γ -cyclodextrine.

La méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) est donc un heptasaccharide cyclique (figure 1.14).

Les molécules cyclodextrines possèdent toutes une cavité hydrophobe, dont la taille est fonction du nombre de sous-unités de glucopyranose.

Facteurs de transcription activés par p38 :

- ATF-2 (activating transcription factor-2)
- ATF-1
- SAP1 (SRF accessory protein 1)
- CHOP (growth arrest and DNA damage inducible gene 153 ou GADD153)
- P53
- C/EBP β
- MEF2C (myocyte enhance factor 2C)
- MEF2A

Tableau 1 : Les facteurs de transcription activés par p38 (Ono et Han, 2000).

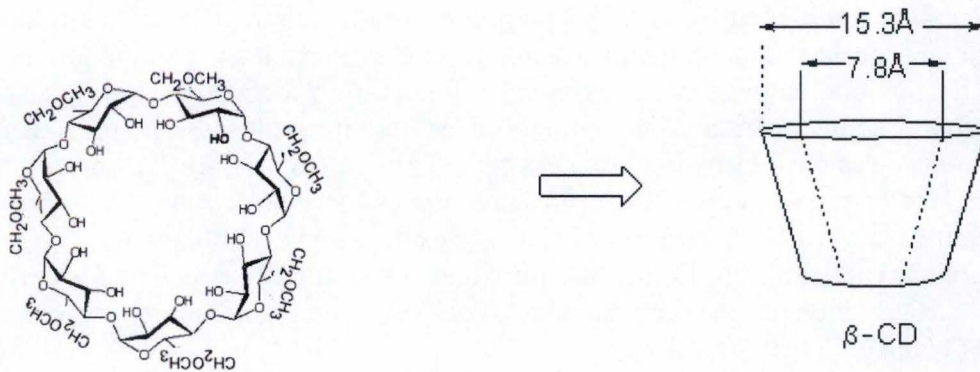


Figure 1-14 : Structure de la méthyl- β -cyclodextrine. Le centre hydrophobe de la molécule permet la séquestration du cholestérol.

La M β CD permet d'enlever le cholestérol membranaire d'une cellule. Un traitement de M β CD à une concentration de 2% pendant 1 heure permet de réduire 40% du cholestérol en membrane de cellules COS-1 (Chen et Resh, 2002). Une diminution du cholestérol en membrane est également observée chez les kératinocytes après un traitement d'une concentration 7,5mM (ou 1%) de M β CD pendant 1h (Jans et al. 2004). Différentes études démontrent que la déplétion en cholestérol par la M β CD perturbe les lipid rafts.

De plus, le traitement de cellules COS-1, NIH3T3 et de kératinocytes par la M β CD permet la phosphorylation sur des tyrosines de plusieurs protéines dont le récepteur de l'EGF (EGFR). Cette phosphorylation de EGFR permet la dimérisation et donc l'activation du récepteur sans ligand. La phosphorylation de SHC, PLC- γ , Gab-1 et ERK est également observée. Toutes ces phosphorylations sont bloquées lors d'ajout de AG4178, un inhibiteur spécifique de la kinase du récepteur EGFR. Ce qui confirme le fait que c'est bien le traitement par la M β CD qui induit la transduction du signal. Cette voie de signalisation dépend de PI3K et ras (Chen et Resh, 2002).

Récemment, Lambert a montré que le traitement par la M β CD induit la phosphorylation de EGFR chez les kératinocytes immortalisés HaCaT mais pas la phosphorylation de ERK (Lambert et al., 2006).

Par contre, l'activité de p38, une autre MAPK, est modulée lors de la déplétion en cholestérol. En effet, la M β CD induit la phosphorylation et donc l'activation de p38 indépendamment de l'activation de EGFR (Jans et al., 2004). Chez les kératinocytes, p38 α et/ou p38 β sont impliquées dans les réponses aux stress cellulaires tels les UVB, le stress oxydatif, le stress osmotique. L'activation de p38 α par la déplétion en cholestérol pourrait également constituer un stress cellulaire.

Suite au traitement par la M β CD, on observe également que l'expression de certains gènes est modulée. Par exemple, l'expression de l'involucrine, marqueur de la différenciation est augmentée tandis que l'expression de K10 est diminuée (Jans et al., 2004)

5.3 Le stress cellulaire induit par les UV et H₂O₂ :

On classe les ultra-violets en 3 classes : les UVA (320-400nm), UVB (290-320 nm), UVC (260-290 nm). Lorsque les kératinocytes humains sont exposés aux UVB, le récepteur de l'EGF est phosphorylé.

Parallèlement, un stress osmotique ou oxydatif stimule l'autophosphorylation d'une variété de récepteurs tyrosine kinase, incluant le récepteur de l'EGF (Fischer et al., 2004). Cette activation indépendante d'un ligand semblerait résulter d'une inactivation de phosphotyrosine phosphatase. Celle-ci serait due à une oxydation de résidus cystéines se trouvant dans la poche catalytique de la phosphatase (Rhee et al., 2000).

Le traitement aux UVB (200 J par m²) de kératinocytes humains à confluence, induit l'activation de ERK1/2 après 5 minutes et de p38 après 30 minutes. Parallèlement, les kératinocytes traités avec une concentration de 200 μ M de H₂O₂ montrent un profil similaire. En effet, les UVB induisent la production de peroxyde d'hydrogène qui va ensuite activer la phosphorylation du récepteur de l'EGF. De plus, ces activations sont dose-dépendantes. L'activation de ERK1/2 et p38 est probablement différente lors de traitement aux UV et H₂O₂. On sait que ERK est activé par MEK 1 et MEK 2 tandis que p38 est activée par MKK3, MKK4 et MKK6. Cependant, le fait de choisir la voie p38 ou ERK lors de stress n'est pas encore très clair. (Peus et al., 1999)

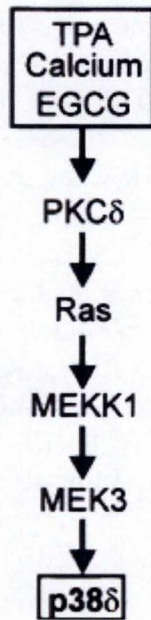


Figure 1.15 : Un traitement par de TPA permet l'activation de la PKC δ qui, par l'intermédiaire de ras, MEKK1, MEK3, active p38 δ (Eckert et al., 2003).

Récemment, Takenobu et al. (2003) ont montré que les stress cellulaires induisaient le shedding de proHB-EGF via l'activation de la MAPK p38. Par la suite, Fischer et al. suggérèrent un mécanisme par lequel l'activation de la MAPK p38 permettrait l'expression de métalloprotéases qui cliveraient proHB-EGF et permettraient ainsi l'activation du récepteur de l'EGF (Fischer et al., 2004)

5.4. Le stress cellulaire induit par le TPA :

Le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) est un ester de phorbol qui permet d'activer les PKC, des sérine/thréonine protéine kinases (figure 1.15). Cet agent chimique agit de façon spécifique en se liant sur le site de reconnaissance du diacylglycérol (DAG) qui permet ainsi l'activation des PKC. En effet, pour rappel, la phospholipase C (PLC) une fois activée, hydrolyse les lipides membranaires PIP2 en IP3 et DAG. IP3 est libéré dans le cytoplasme et permet l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} tandis que le DAG reste en membrane et suite à l'augmentation de Ca^{2+} , permet alors l'activation des PKC. PKC une fois activée, intervient dans la prolifération cellulaire et l'activation d'autres voies de signalisation notamment les MAPK p38 (Eckert et al., 1998). En 1995, Goishi et al. ont montré que chez des cellules Vero, un traitement au TPA induit rapidement le clivage de proHB-EGF en HB-EGF. Il semblerait que ce mécanisme dépend de l'activation d'un membre de la famille ADAM (MDC9/meltrin- γ /ADAM9) (Izumi et al., 1998).

6. Objectifs :

La peau est l'organe le plus externe du corps humain. Elle est, dès lors, sujette à toutes sortes d'agressions : physiques, chimiques, thermiques... Pour maintenir son homéostasie, il est capital, en cas de traumatisme, que la régénération se fasse le plus rapidement possible. Les facteurs de croissance de la famille EGF sont connus pour jouer un rôle important lors de la cicatrisation. Parmi ces facteurs, nous nous sommes intéressés à HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) qui, en plus de son rôle dans la cicatrisation, intervient dans la croissance autocrine des kératinocytes et semble être un facteur clé dans certaines pathologies dont le psoriasis.

Notre objectif a été de voir si les kératinocytes ayant subi des stress produisent HB-EGF et de plus, quel est l'effet de ce facteur de croissance sur les kératinocytes épidermiques.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de HB-EGF tant au niveau transcriptionnel que traductionnel, en réponse à différents stress. Quels stress induisent ce facteur et par quels intermédiaires ? Nous nous sommes penchés sur la voie de signalisation en tentant de voir l'éventuelle implication de la MAPK p38 lors de l'expression de HB-EGF en condition de stress.

La cicatrisation comprend une phase de ré-épithélialisation caractérisée par une prolifération et une migration des kératinocytes. HB-EGF semble être un facteur primordial pour cette phase de ré-épithélialisation. Nous avons, dans un deuxième temps, testé son impact sur la migration de kératinocytes *in vitro* et réalisé un marquage *in vivo* sur des coupes de peau brûlée en cicatrisation. Finalement, nous nous sommes demandés s'il était possible de détecter HB-EGF dans un épiderme en culture d'organe en condition de stress.

MATERIEL ET METHODES

1. La culture cellulaire :

1.1. Culture des kératinocytes humains épidermiques :

1.1.1. Matériel :

Milieu complet KGM-2 (keratinocyte growth medium)

- KBM-2 (keratinocyte, basal medium) (Clonetics, Cambrex)
- Suppléments:
 - BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0,2%
 - Hydrocortisone 5×10^{-7} M
 - EGF (Epidermal Growth Factor) 0,2 ng/ml
 - Insuline 5 µg/ml
 - Transferrine 5 µg/ml
 - Epinéphrine
 - Pénicilline G 50 unités/ml
 - Streptomycine 50 µg/ml

Milieu complet Epilife®+

- Epilife medium (Cascade)
- Suppléments:
 - BPE à 0,2%
 - EGF 0,2 g/ml
 - Insuline 5 µg/ml
 - Hydrocortisone 5×10^{-7}
 - Transferrine 5 µg/ml
 - Pénicilline G 50 unités/ml
 - Streptomycine 50 µg/ml

Milieu autocrine Epilife®-

- Epilife medium (Cascade)
- Suppléments:
 - L-histidine 2.4×10^{-4} M
 - L-isoleucine 7.5×10^{-4} M
 - L-méthionine 9×10^{-4} M
 - L-phénylalanine 9×10^{-4} M
 - L-tryptophane 4.5×10^{-4} M
 - Hydrocortisone 5×10^{-7} M
 - Pénicilline G 50 unités/ml
 - Streptomycine 50 µg/ml

Solution A

- Glucose 10mM
- KCl 3mM
- 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 Tétracétate (EDTA) 0,01%

Solution dFCS 2% (solution bloquante)

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

Milieu de congélation

- Milieu complet Epilife + à 80%
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) 10%
- DFCS 10%

1.1.2. Méthode :

➤ Culture primaire :

Les kératinocytes épidermiques humains sont obtenus à partir de prélèvements de peau humaine lors d'abdominoplasties (opérations chirurgicales réalisées par le Docteur Bienfait, Clinique Saint Luc, Bouge). Immédiatement après l'intervention, la couche superficielle du prélèvement est récupérée à l'aide d'un dermatome et placée dans du liquide physiologique. L'isolement des kératinocytes se fait au laboratoire en conditions stériles (sous hotte à flux laminaire vertical). Les kératinocytes isolés à partir d'un patient constituent dès lors une nouvelle souche : NAK pour Normal Abdominoplasty

Keratinocyte. Toutes les étapes de cette manipulation se font à 4°C, avec du matériel stérile et nécessitent le port de gants. Les morceaux de peau sont déposés sur une boîte de Pétri contenant une solution de trypsine T17 avec 0,25 µg/ml de fungizone et 50 µg/ml de gentamycine et sont découpés en carrés de 1 centimètre de côté. Ensuite, ceux-ci sont incubés une nuit à 4°C pour permettre à la trypsine de séparer le derme de l'épiderme. Le lendemain, l'épiderme est détaché du derme à l'aide de pinces et est placé dans un milieu KGM-2 avec 2% de Fœtal Calf Serum dialysé (dFCS), ce qui permet de neutraliser l'action de la trypsine. Les morceaux d'épiderme sont triturés et passés plusieurs fois dans une pipette afin de dissocier les cellules prolifératives de la lame basale. Ensuite, cette suspension cellulaire est filtrée (filtre de 70 µm Nylon stérile) de manière à ne récupérer que les cellules isolées. Le filtrat est centrifugé pendant 10 minutes à 1000 rpm à 4°C. Le surnageant est enlevé tandis que le culot qui contient les cellules est resuspendu dans du milieu KGM-2.

Les cellules sont ensemencées à raison de 46000 cellules par cm² dans des boîtes T175 avec du milieu complet contenant 0,1% de dFCS, de la gentamycine, de l'ampicilline et de la fungizone. Les boîtes de culture sont placées dans un incubateur à 37°C, avec une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé 3 jours plus tard et ensuite tous les 2 jours.

➤ Culture secondaire :

Les cellules de la culture primaire sont détachées de la boîte à l'aide d'une solution de T25. Cette étape se déroule avant que la culture n'arrive à confluence, de manière à préserver le pouvoir prolifératif des cellules. La culture est incubée 5 minutes avec cette solution T25 afin de décrocher les éventuels mélanocytes et fibroblastes. Ensuite, on procède à une trypsinisation de 10 à 15 minutes pour décrocher les kératinocytes. La solution bloquante permet d'inhiber l'action de la trypsine. Les cellules détachées par cette trypsinisation sont récupérées et centrifugées 5 minutes à 1000 RPM et à 4°C. Le culot est resuspendu et les cellules sont ensemencées à 10000 cellules par cm² dans du milieu complet Epilife[®] + avec une faible concentration en ions Ca²⁺ (0,06mM), ce qui permet de favoriser la prolifération. Cette culture secondaire est amenée à un état proche de la confluence de manière à obtenir le plus grand nombre de cellules mais en évitant la différenciation des cellules.

Lorsque les kératinocytes sont en phase de prolifération (stade de sous-confluence avancée), les cellules sont trypsinisées, centrifugées et comptées. Le culot est resuspendu dans du milieu KGM-2 de manière à obtenir une densité de cellules double de celle voulue *in fine*. Une quantité équivalente de milieu de congélation deux fois concentré (20% DMSO, 20% dFCS, 60% milieu complet) est ajoutée afin d'obtenir une concentration finale de 1 ou de 2 millions de cellules par ml. Cette suspension cellulaire est répartie dans des cryotubes de 1,5 ml (NUNC) qui sont congelés à -80°C pendant une nuit avant d'être transférés dans de l'azote liquide à -180°C.

➤ Culture tertiaire :

Cette culture se réalise à partir de cultures secondaires congelées. Le nombre de cryotubes nécessaire pour l'expérience est prélevé et déposé rapidement dans un bain à 37°C. Lorsque le contenu du tube est décongelé, les cellules sont rassemblées dans un tube stérile et placées sur glace. Ensuite, celles-ci sont comptées et ensemencées à une densité cellulaire de 6.10³ à 10.10³ cellules par cm² dans du milieu KGM-2. Le lendemain, ce milieu est remplacé par du milieu Epilife[®] + afin d'éliminer les traces de DMSO qui est

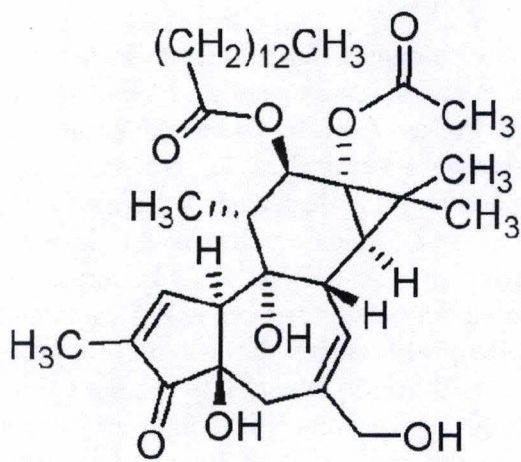


Figure 2.1. : structure du 12-O-tétradécanoylphorbol (TPA)

toxique pour les cellules en culture. Le milieu est ensuite remplacé tous les 2 jours. Lorsque 60% de la boîte de culture sont recouverts par les cellules, les kératinocytes de la culture sont rincés 2 fois à la solution A de manière à éliminer les facteurs de croissance exogènes et du milieu Epilife[®] – est ajouté. Les cellules sont dès lors cultivées en culture autocrine. Ce milieu est également renouvelé tous les deux jours.

2. Traitement des kératinocytes :

2.1. Extraction du cholestérol par la méthyl-β-cyclodextrine :

Les cellules sont amenées jusqu'au stade de la confluence et sont traitées avec une solution de méthyl-β-cyclodextrine (MβCD) à une concentration de 7,5mM. La MβCD (Sigma-Aldrich) se présente sous forme d'une poudre et la quantité adéquate est pesée et dissoute dans du milieu Epilife[®]. Ensuite la solution est filtrée à travers un filtre de 0,22μm (Millex-GP, Millipore) de manière à rendre la solution stérile. Le milieu des kératinocytes est remplacé par le milieu de culture contenant la MβCD. Le traitement dure 1h et les cellules sont incubées à 37°C.

Après 1h, le milieu contenant la MβCD est enlevé et les kératinocytes sont rincés deux fois avec la solution A. Ensuite, afin d'éviter la néosynthèse du cholestérol, une solution de lovastatine (Sigma-Aldrich) est déposée sur les kératinocytes. La lovastatine inhibe l'HMG-CoA réductase, une enzyme nécessaire à la voie de synthèse du cholestérol. Cette solution est préparée dans du milieu Epilife[®] à une concentration de 10μM. A la fin du traitement, les kératinocytes sont rincés deux fois avec la solution A et analysés immédiatement ou bien congelés à -80°C.

La lovastatine étant dissoute dans du DMSO, le milieu des cellules contrôles contient également du DMSO à la même concentration.

2.2. Traitement des kératinocytes par le peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂) :

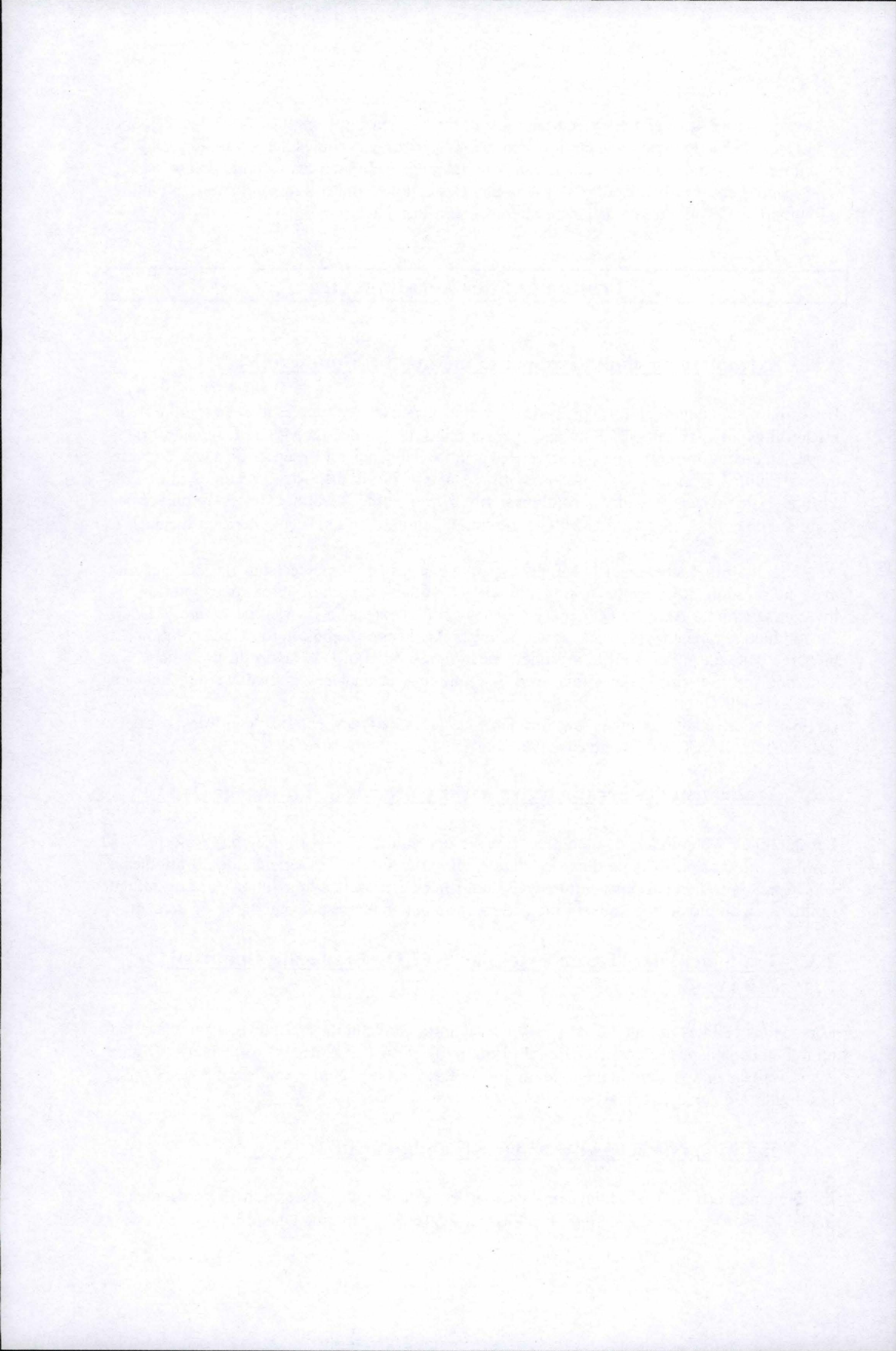
Les kératinocytes sont traités à confluence avec une solution de H₂O₂ (Sigma) concentrée à 1mM du milieu Epilife[®]. La durée de traitement varie suivant l'expérience de 20 minutes à 18h. Après le traitement, les kératinocytes sont rincés deux fois à la solution A et du milieu Epilife[®] - est ajouté ou non (suivant l'expérience) durant un temps pouvant varier également.

2.3. Traitement des kératinocytes par le 12-O-tetradecanoylphorbol (TPA) :

Lorsque les cellules ont atteint la confluence, le milieu de culture est enlevé et remplacé par un milieu contenant une concentration de 10ng/ml de TPA (Calbiochem) pendant 18h (figure 2.1.). Après le temps de traitement, le milieu est enlevé et les cellules sont rincées deux fois à la solution A avant d'être analysées.

2.4. Inhibition de la MAPK p38 par l'inhibiteur PD169316 :

L'inhibiteur PD169316 (Calbiochem) fait partie de la famille des pyridinyl imidazoles et inhibe les isoformes α et β de p38. L'inhibiteur PD169316 est dilué dans du milieu Epilife[®] -



de manière à obtenir une concentration de 15 μ M. Lors de l'expérience, l'inhibiteur est ajouté 30 minutes avant l'extraction du cholestérol par la M β CD (1h, 7,5 mM). La durée de l'inhibition varie de 1h à 18h selon l'expérience.

L'inhibiteur étant dissous dans du DMSO, une quantité équivalente de DMSO est ajoutée dans le milieu Epilife[®] - des cellules contrôles.

3. Test MTT :

Le test MTT nous renseigne sur la viabilité cellulaire d'une culture, par exemple après un traitement. C'est un test colorimétrique basé sur une réaction d'oxydo-réduction réalisée par la succinate déshydrogénase, une enzyme qui se trouve au niveau des mitochondries. Cette déshydrogénase mitochondriale est capable de convertir le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) (substrat jaune, soluble dans l'eau) en formazan, un produit bleu foncé insoluble dans l'eau chez les cellules vivantes dont l'activité mitochondriale est intacte. La quantité de formazan produite est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

De manière pratique, le MTT (Sigma), poudre jaune, est pesé et dissous dans du milieu de culture Epilife- afin d'obtenir une concentration de 0,5 mg/ml. La solution est filtrée à l'aide d'un filtre Millex-GP 0,22 μ M (Millipore) et maintenue à l'abri de la lumière. Les cellules à tester sont cultivées dans des plaques 12 puits. Après avoir préalablement retiré le milieu, la solution MTT est ajoutée à raison de 1 ml par puits. Les plaques sont incubées pendant 1h dans l'étuve à 37°C dans l'obscurité. Après cette incubation, le MTT est enlevé et remplacé par 500 μ l d'isopropanol par puits. L'isopropanol va permettre de lyser les cellules et de libérer et dissoudre le formazan. Les plaques 12 puits sont agitées pendant 30 minutes de façon à obtenir une solution homogène. Ensuite, 150 μ l d'isopropanol sont prélevés puis déposés dans une plaque 96 puits ainsi que 50 μ l de lysat cellulaire contenant le formazan dissous. La densité optique est mesurée à 570 nm (BioRad, Ultramark imaging system). Plus la valeur est grande, plus la viabilité est élevée. Une perte de viabilité suite à un traitement se traduit donc par une coloration bleue plus faible.

4. Analyse des protéines :

4.1. Matériel :

Sample buffer 2x (tampon de lyse) :

- Tris HCl 62.5mM
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 2%
- Glycérol 8.7%
- Bleu de bromophénol 0.05%
- DTT (dithiothreitol) 0.2%

Running 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 192mM
- 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
- Na₂HPO₄·2H₂O 8 mM
- KCl 2.7 mM

<u>Anticorps primaire</u>	<u>Dilution</u>	<u>Source</u>	<u>Spécificité</u>
HB-EGF	1/2000	IgG polyclonal de chèvre	ProHB-EGF et HB-EGF
MAP kinase p38	1/1000	IgG polyclonal de lapin	p38 total
MAP kinase p38 phosphorylée	1/1000	IgG polyclonal de lapin	p38 phosphorylée
LA1	1/1000	IgG monoclonal de souris	HER1 phosphorylé et non phosphorylé
HER1 phosphorylé	1/500	IgG polyclonal de lapin	HER1 phosphorylé

<u>Anticorps primaire</u>	<u>Dilution</u>	<u>Source</u>	<u>Spécificité</u>
Ac secondaire anti-lapin HRP (Dakocytomation)	1/1000	IgG de chèvre	IgG de lapin
Ac secondaire anti-chèvre HRP (Dakocytomation)	1/1000	IgG de lapin	IgG de chèvre
Ac secondaire anti-souris (Dakocytomation)	1/1000	IgG polyclonal de chèvre	IgG souris

Tableau 2.1. : Liste et caractéristiques des différents anticorps utilisés pour l'immunodétection de protéines par la technique de Western Blot.

Stacking gel:

- Tris base 125 mM à pH 6.8
- SDS 0.1%
- Acrylamide/bisacrylamide 4%
- APS (persulfate d'ammonium) 0.05%
- TEMED 0.1%

- K_2HPO_4 1,5 mM

Solution de saturation:

- Tampon PBS/tween
- lait gloria, Nestlé 5%

4.2. Méthode :

4.2.1. Extraction des protéines :

Les boîtes de culture dont le milieu a été préalablement enlevé sont disposées sur glace. Les cellules sont lysées grâce à 200µl de tampon de lyse. Le contenu de la boîte est rassemblé à l'aide d'un petit racloir et transféré dans un tube eppendorf. Ensuite, ces tubes sont déposés dans un bain à ébullition pendant 5 minutes et centrifugés à 4°C à 10000 RPM pendant 3 minutes. Les échantillons sont alors conservés à -20°C.

4.2.2. Electrophorèse et transfert :

La quantité de protéine (25 µl) est prélevée dans les tubes eppendorfs préalablement congelés à -20°C. Ensuite, il faut ajouter 10% de ce volume en colorant (Bleu de bromophénol) et faire bouillir pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines. Le mélange est centrifugé 3 minutes à 10000 RPM pour rassembler tout le liquide à prélever.

Les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide 12,5 % coulé dans le dispositif adéquat (Biorad). L'électrophorèse se fait en conditions dénaturantes en présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) qui en se liant aux protéines, leur donne des charges négatives et provoque leur déploiement. La séparation des protéines dans le gel se fait donc en fonction de leur poids moléculaire. Ces derniers seront renseignés par un marqueur de poids moléculaire ou "ladder" qui migre simultanément sur une autre piste. L'électrophorèse se fait à 120 volts jusqu'à ce que le front de migration parvienne au bout du gel.

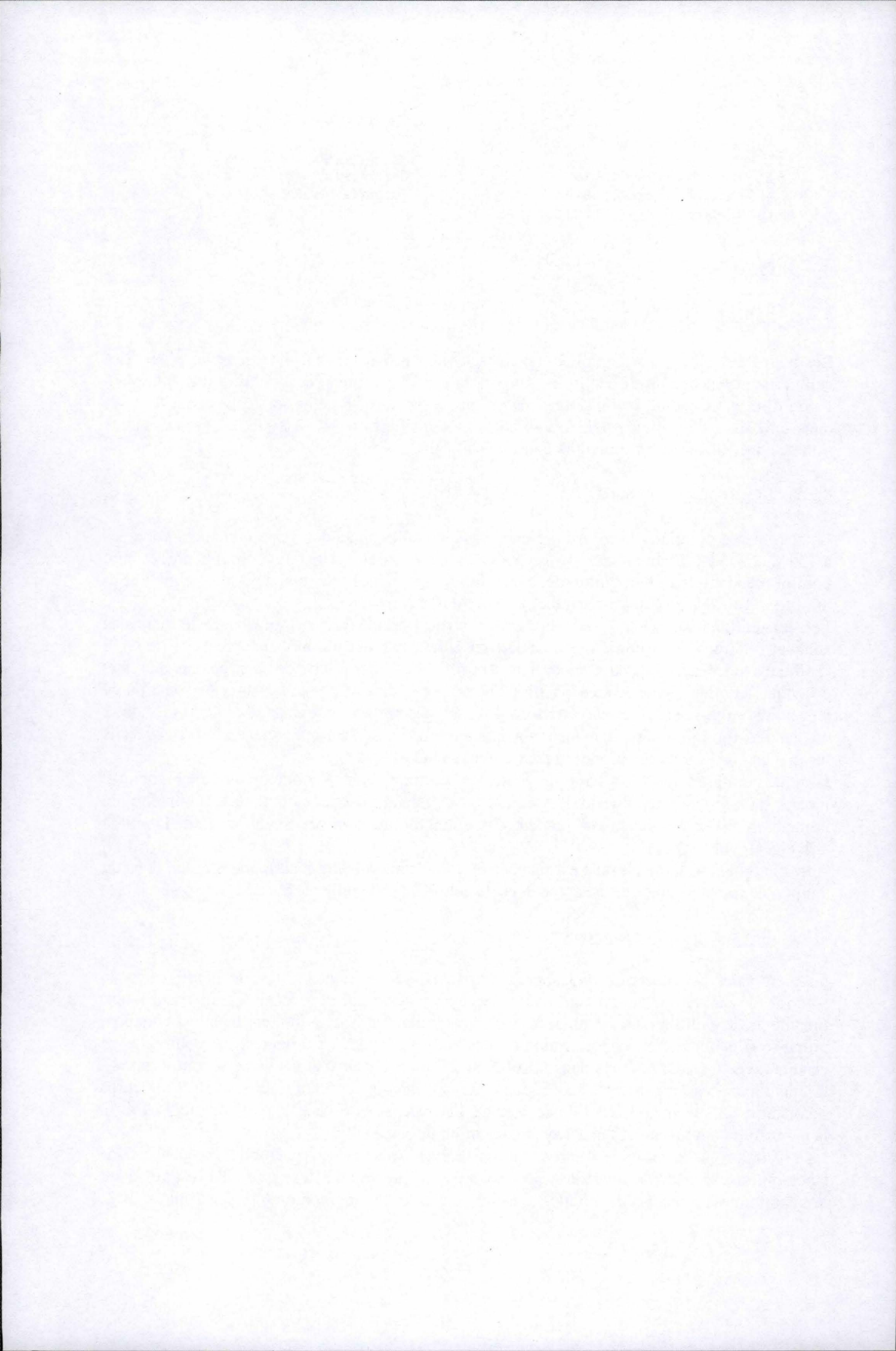
Lorsque la migration est terminée, les protéines sont transférées sur une membrane Hybond-P PVDF (polyvinylidenedifluorure) 0,45 µm (Amersham). Cette technique de transfert en immersion utilise de nouveau un procédé électrophorétique et se réalise durant toute la nuit, à 4°C et à 60 volts (Biorad).

Après le transfert, la membrane est récupérée et doit toujours être maintenue humide dans du tampon de transfert ou être conservée dans du cellophane et congelée à -20°C.

4.2.3. Révélation de la membrane :

La membrane est placée avec les protéines transférées, orientées vers le dessus dans la solution de saturation durant une heure. Ceci permet de saturer les sites non spécifiques. Ensuite cette solution est remplacée par la solution de saturation contenant l'anticorps primaire dilué à la bonne concentration (tableau 2.1.) pendant 1 à 3 heures. La membrane est ensuite lavée 4 fois 6 minutes dans la solution de rinçage. Lorsque les lavages sont terminés, la membrane est incubée 1 heure dans la solution de saturation contenant l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase) (tableau 2.1.). Ensuite, 4 fois 6 lavages sont de nouveau effectués avec la solution de rinçage.

La révélation de la protéine d'intérêt se fait par une réaction de chémoluminescence (BM Chemoluminescence Blotting Substrate, Roche). Le substrat de l'enzyme HRP est versé sur la membrane et incubé 1 minute. Ensuite, un film photographique (HyperfilmTM ECL,



Amersham) est placé sur la membrane durant un temps d'exposition adéquat (variable suivant la protéine) et le film est ensuite développé.

5. Analyse des ARN messagers :

L'analyse des ARN messagers(ARNm) se fait par deux techniques au laboratoire : par Northern Blot et par Real Time PCR (RT PCR).

5.1. Extraction des ARNm :

5.1.1. Matériel utilisé :

H₂O traitée DEPC

- 500ml d'H₂O
- 0,1% de diéthyl pyrocarbonate (DEPC) et autoclavé.

Lysis buffer (tampon de lyse)

- Tris-HCl 0,01M
- NaCl 0,1M
- EDTA 0,0002M
- SDS (sodium dodécyl sulfate) 1%
- 0,1% de DEPC et autoclavé

High salt buffer (tampon riche en sels)

- Tris-HCl 0,01M
- NaCl 0,5M
- EDTA 0,001M
- SDS 0,2%
- 0,1% de DEPC et autoclavé

Low Salt Buffer (tampon pauvre en sels)

- Tris-HCl 0,01M
- NaCl 0,1M
- EDTA 0,001M
- SDS 0,2%
- 0,1% de DEPC et autoclavé

No Salt Buffer (tampon sans sel)

- Tris-HCl 0,005M
- EDTA 0,001M
- SDS 0,2%
- 0,1% de DEPC et autoclavé

Tampon TE

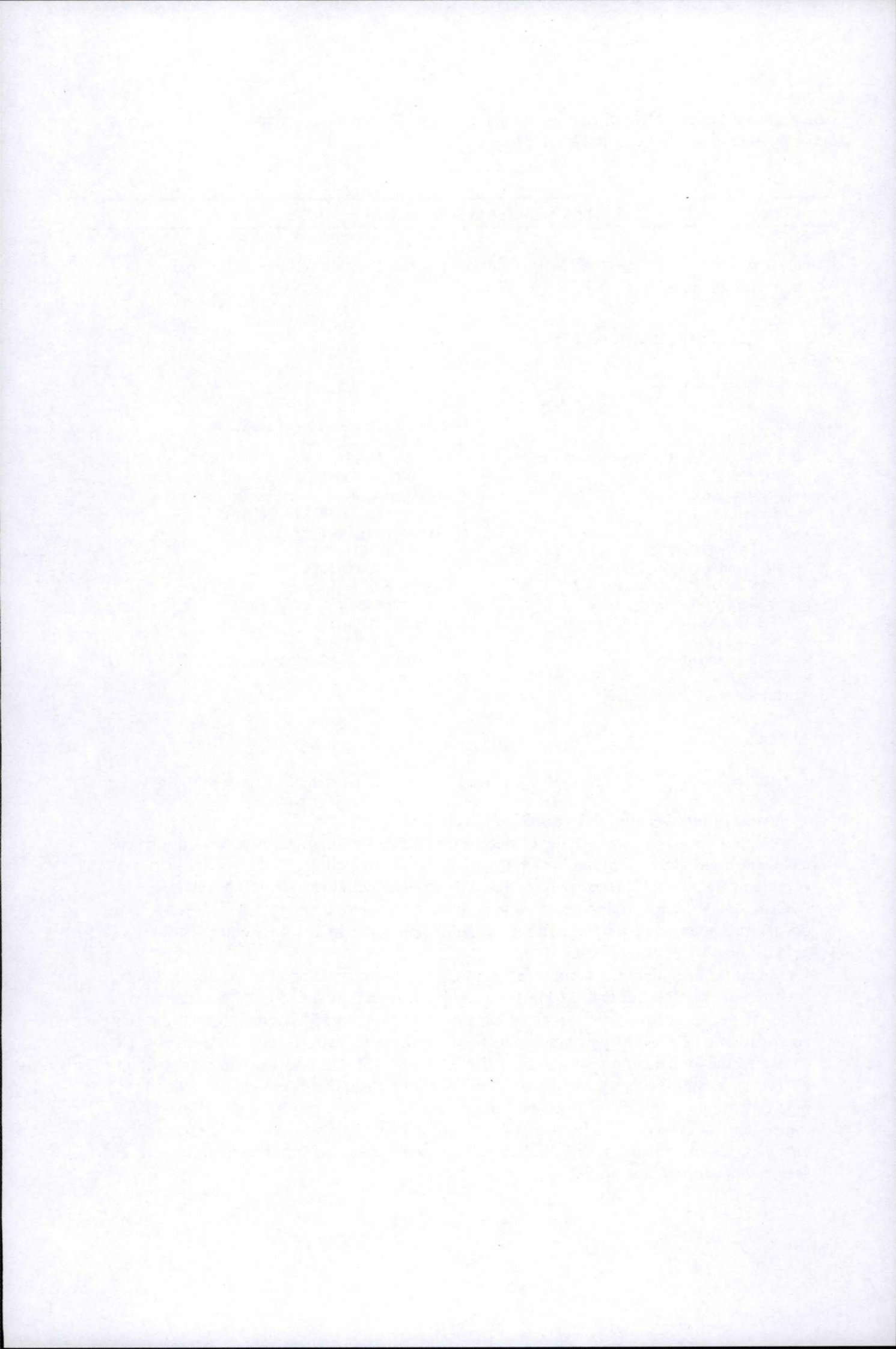
- Tris base 9mM
- EDTA - 2H₂O 0,9mM
- pH8

5.1.2. Méthode :

☛ **Préparation des oligo-dT couplés à la cellulose.**

Les oligo-dT sont des chaînes de 30 nucléotides de désoxythymine, attachés de manière covalente par leur extrémité 5' phosphate à de la cellulose. Ces oligo-dT sont complémentaires aux queues poly-A des ARNm et la cellulose permet de récupérer les ARNm qui se seront appariés. Cet appariement se déroule en présence d'une forte concentration en sels pour permettre la formation des ponts hydrogènes entre les oligo-dT et la queue poly-A des ARNm.

La quantité adéquate de complexe oligo-dT/cellulose (poudre) (Oligo-dT cellulose, Invitrogen) est pesée : il faut 0,025g pour une boîte de culture de 75 cm². Les complexes oligo-dT/cellulose sont ensuite lavés plusieurs fois et après chaque lavage, ils sont centrifugés à 1200 RPM pendant 1 minute. Tout d'abord, deux lavages de NaOH 0,1M sont effectués ainsi qu'un lavage avec de l'eau distillée. Ensuite les complexes oligo-dT/cellulose sont incubés pendant 30 minutes dans de l'eau distillée avec 0,1% de DEPC puis centrifugés (1200 RPM pendant 1 minute). Enfin, trois lavages avec de l'eau DEPC traitée sont effectués et un lavage avec du tampon riche en sels. Une fois les rinçages terminés, les complexes oligo-dT/cellulose sont resuspendus dans 2ml de tampon riche en sels et sont conservés au frigo.



☛ **Extraction d'ARNm.**

Le milieu de culture cellulaire est aspiré et le tampon de lyse contenant 25µg de protéinase K (Roche)/ml est déposé sur les cellules. Le lysat cellulaire est récolté et fluidifié à travers une seringue avec une aiguille stérile de 21Gauge (Braun). La concentration en protéinase K est ajustée à 75µg/ml et le tout est incubé pendant 30 minutes à une température de 37°C, ce qui permet à la protéinase K d'agir de manière optimale. Ensuite, pour que les conditions d'appariement entre poly-A et oligo-dT soient favorables, la concentration en sels passe de 0,1M à 0,5M en ajoutant du NaCl 5M. Enfin, 2ml d'oligo-dT préalablement préparés sont ajoutés et les complexes oligo-dT-ARNm sont agités au minimum 2h, au maximum 24h, pour permettre l'hybridation.

Les complexes oligo-dT-ARNm sont récoltés par centrifugation à 1200 RPM pendant 1 minute. Le culot est rincé deux fois avec du tampon riche en sels (ou "High salt buffer") puis il est mis en suspension dans 10 ml du même tampon. Cette suspension est ensuite passée sur une colonne munie d'un filtre retenant les oligo-dT cellulose-ARNm (filtre en polymère poreux, poly-Prep Chromatography column, Bio-Rad, traité DEPC). La colonne est rincée deux fois avec le tampon riche en sels et ensuite par deux autres lavages avec le tampon à faible concentration en sels de manière à décrocher les hybridations non spécifiques. Le dernier lavage avec un tampon sans sel préchauffé à 55°C permet de désapparier les ARNm qui sont récoltés dans un tube tandis que les oligo-dT restent sur le filtre grâce à la cellulose. La concentration en sels de l'éluat est ajustée à 0,5M par l'ajout de NaCl 5 M. On ajoute ensuite 2 fois le volume d'éthanol 95% stocké à -20°C et on laisse précipiter les ARNm toute la nuit à -20°C.

☛ **Concentration des ARNm.**

Les échantillons d'ARNm précipités sont centrifugés à 12000 RPM pendant 15 minutes. Ensuite, les culots sont séchés et resuspendus dans 25µl de tampon TE puis placés sur glace pendant 30 minutes. La concentration en ARNm est alors mesurée à une densité optique de 260nm. L'éventuelle contamination protéique est, quant à elle, mesurée à 280nm. Les échantillons d'ARNm sont stockés à -80°C.

5.2. Northern blot :

5.2.1. Matériel utilisé :

MOPS 10X

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

Solution tamponnée

- MOPS 0.2M
- Acétate de sodium trihydraté
- EDTA 10mM
- pH7

Gel d'électrophorèse

- Agarose pure à 1,2% (Gibco-BRL) dans de l'H₂O DEPC traitée
- MOPS 1X
- Formaldéhyde 6,5%

Formamide désionisée

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

Sample Buffer

- Formamide désionisée
- Formaldéhyde à 6,5%
- MOPS x1

Tampon d'électrophorèse

- MOPS 1X
- Formaldéhyde 3,3%

Solution 20xSSC (tampon de transfert)

- NaCl 2.9m
- Citrate de sodium 0,29M

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

Sample Loading Buffer

- 50% glycérol
- 1mM Na₂EDTA
- Xylène Cyanol 0,4%
- Bleu de bromophénol 0,4%

<u>Sondes ADNc</u>	<u>Sites de restriction</u>	<u>Taille (pb)</u>	<u>Plasmide</u>	<u>Références</u>
Involucrine	Pst I	852	PSPORT	Eckert & Green, 1986
K10	Pst I	2039	PGem-3	Roop et al., 1998
K14	BstxI	503	PGem-3	Roop et al., 1998
36B4	Pst I	700	p-Gem-4	Laborda, 1991
HB-EGF	EcoRI-SpeI	868	pNoTA	P.Cook (Oregon, Portland)
Amphiréguline	X-ba1-BMH1	726	p-Gem-T-easy	P.Cook (Oregon, Portland)

Tableau 2.2. : Liste des sondes d'ADN complémentaire utilisées en Northern Blot.

5.2.2. Méthode :

A partir de la valeur densitométrique des échantillons, le volume de l'échantillon d'ARNm à prélever est calculé, pour charger 1µg d'ARNm par puits. Les échantillons prélevés sont séchés au Speedvac (Speedvac sc 100, Savant). Ensuite, chaque échantillon est resuspendu dans 20 µl de "sample buffer" et chauffé à 65°C pendant 15 minutes. Ce tampon contient de la formamide et de la formaldéhyde, ce qui permet de désapparier les structures secondaires des ARNm. Après l'incubation, les échantillons sont "vortexés" puis replacés à 65°C pendant 20 minutes. Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 12000 RPM pendant 4 minutes et déposés sur glace où 2µl de "sample loading buffer" (tampon de chargement) sont ajoutés.

Le gel d'électrophorèse est polarisé pendant 10 minutes à 75 Volts avant de charger les échantillons dans les puits. La migration dure 3 heures à 75 Volts et les ARNm migrent selon leur poids moléculaire. Lorsque la migration est terminée, le gel est lavé 3 fois 10 minutes avec de l'eau ultra pure de manière à éliminer au maximum la formaldéhyde.

Une membrane de nylon (Zeta probe, GT Bio Rad) sur laquelle s'effectue le transfert des ARNm est préalablement humidifiée dans de l'eau distillée puis dans le tampon de transfert 20X SSC. Le transfert se fait par capillarité dans un tampon de transfert grâce au système « Turbo blotter » (Schleider et Schuell).

Le lendemain, les ARNm transférés sur la membrane sont fixés de manière covalente grâce à une exposition aux UV (1500 joules/cm²).

5.3. Révélation du Northern blot :

5.3.1 Matériel :

Solution d'hybridation :

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

Solution 20xSSC

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

5.3.2. Méthode :

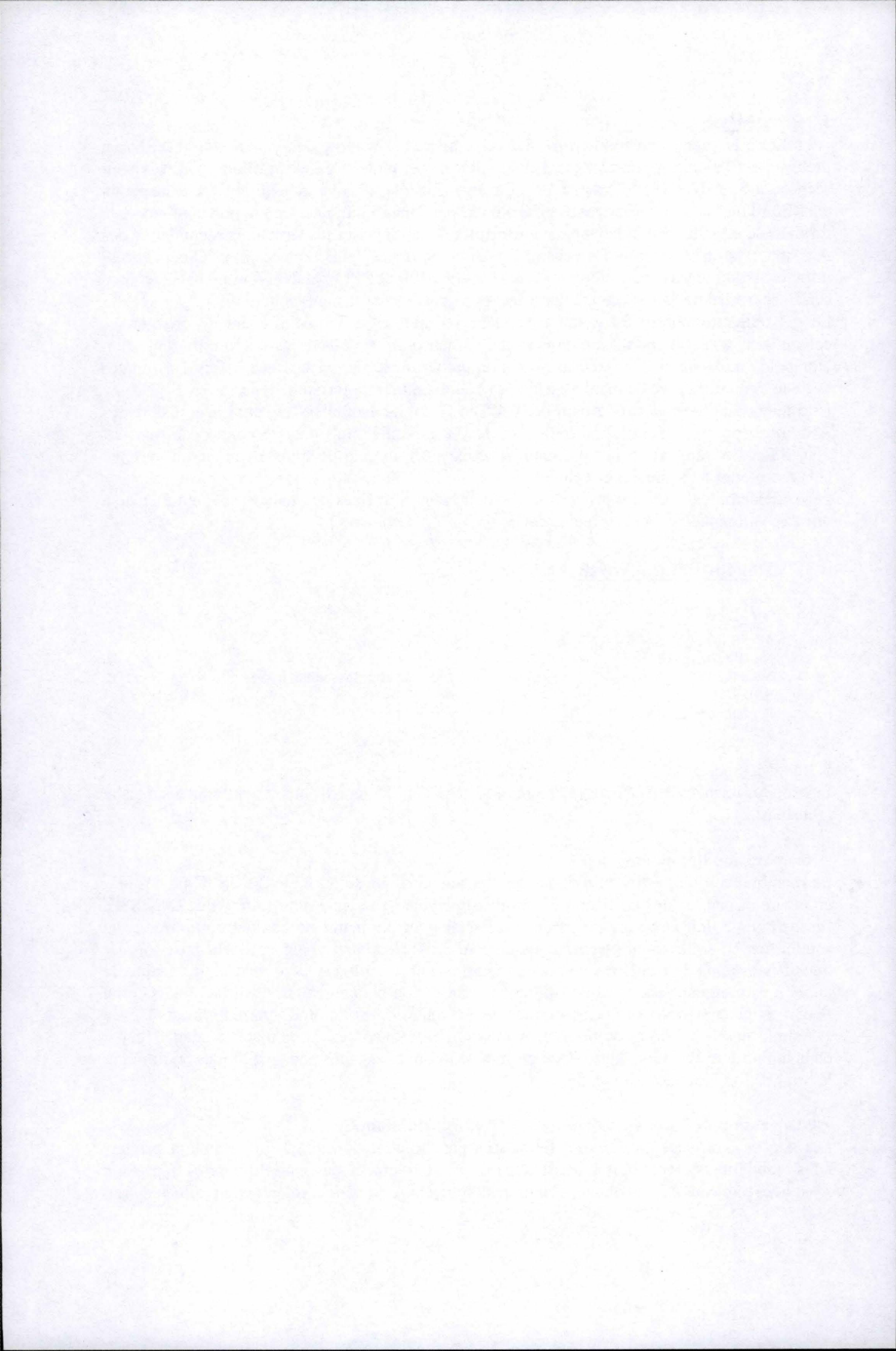
Les sondes formées d'ADN complémentaire à l'ARNm du gène d'intérêt sont reprises dans le tableau (2.2).

☛ **Préparation des membranes :**

La membrane et un treillis en nylon sont déposés dans une solution de 20X SSC puis roulés en cigare et placés dans un flacon à hybridation Hybaid contenant une solution de 20X SSC. La membrane doit être vers l'intérieur du flacon pour permettre un contact optimal avec la sonde. Les bouteilles sont placées dans un four à hybridation Hybaid et il faut faire tourner quelques instants de manière à ce que la membrane et le treillis se déroulent bien. Ensuite, le tampon est remplacé par 5 ml de solution d'hybridation préalablement chauffée à 43°C et le flacon est placé dans le four pendant quelques secondes. La solution d'hybridation est enlevée et remplacée par 10 ml de solution d'hybridation et le flacon est alors placé pendant 1 heure dans le four à hybridation, cette étape permet de masquer les sites non spécifiques et diminuer le bruit de fond lors de la révélation.

☛ **Préparation des sondes marquées au ³²P et hybridation :**

Les sondes marquées au ³²P sont fabriquées par "Random priming" (kit "Random primers DNA labelling system", Invitrogen) à partir d'un fragment de restriction provenant d'un plasmide (tableau 2.2) servant de matrice. 20ng cDNA du gène d'intérêt sont dilués dans



19µl d'eau stérile puis dénaturés dans un bain d'eau bouillante durant 5 minutes. Après les 5 minutes, l'ADN dilué est directement replacé sur glace pour éviter un éventuel réappariement. On ajoute ensuite les nucléotides non marqués (dATP, dTTP et dGTP), les amorces aléatoires (random primers, Kit Random Primers DNA, Invitrogen), l'ADN-polymérase Klenow (Kit Random Primers DNA, Invitrogen) et les nucléotides (dCTP) marqués au ³²P (Amersham). Ce mélange est incubé pendant 1h30 min à température ambiante. Les amorces aléatoires s'hybrident à différents endroits de la sonde et servent de point de départ pour la polymérase. Après 1h30, la réaction est arrêtée par le stop buffer (Kit Random Primers DNA, Invitrogen). Les nucléotides en excès ainsi que les fragments inférieurs à 200 pb sont éliminés en passant sur une colonne de chromatographie Bio-spin 30 (Bio rad). Cette étape se fait grâce à une centrifugation de la colonne à 2500 RPM pendant 4 minutes. Ensuite, la sonde est de nouveau bouillie pendant 5 minutes pour désapparier les brins puis la sonde est ajoutée dans 10 ml solution d'hybridation. Ce mélange est alors mis toute la nuit en présence de la membrane dans le four à hybridation à 43°C.

☛ **Lavages de la membrane :**

Le lendemain, la membrane est lavée afin d'éliminer les sondes accrochées de manière non spécifique. Dans un premier temps, la membrane est lavée 3 fois avec une solution 2x SSC/0,1% SDS à 25°C. Ensuite la température est augmentée à 43°C et la membrane subit 3 lavages avec une solution de 0,5x SSC 0,1% SDS. Les deux derniers lavages se font à 65°C avec une solution 0,5x SSC 0,1% SDS. Les kératines ayant des séquences nucléotidiques très semblables, 3 lavages supplémentaires avec une solution 0,1x SSC 0,1% SDS à 65°C sont effectués, pour augmenter la spécificité d'hybridation.

☛ **Révélation :**

La membrane est enlevée du flacon d'hybridation et emballée dans un cellophane. Suivant l'intensité du signal radioactif mesurée avec le compteur à scintillation BECKMAN LS 6000 IC, la membrane est exposée plus ou moins longtemps sur un écran de phosphore (storage phosphore screen, Packard). Cet écran est alors scanné par l'appareil CYCLONE (Packard). La membrane est ensuite utilisée éventuellement pour une autre détection ou bien stockée à -20°C.

5.4. PCR en temps réel (Real time PCR):

La PCR en temps réel requiert l'utilisation d'une ADN polymérase ADN dépendante. Avant d'analyser les échantillons en Real Time PCR, il est nécessaire de convertir les ARNm en ADN complémentaire grâce à la "reverse transcription" ou transcription inverse.

5.4.1. Reverse transcription polymerase :

➤ 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 10mM, SuperScript™ II Rnase H reverse Transcriptase 2000 unités/µl	- Mix RT (pour 20 µl) : 0,5 µg d'oligo dT, 111x First Strand Buffer, 0,1µg d'ARN poly-A, 0,01 M DTT, 0,5mM dNTP Mix, 200 unités de Superscript™ II RT
--	---

➤ Méthode :

La transcription inverse est réalisée à l'aide du *Kit Super Script H Reverse transcriptase* (Invitrogen). Les oligo-dT reconnaissent la queue poly-A des ARNm et font office

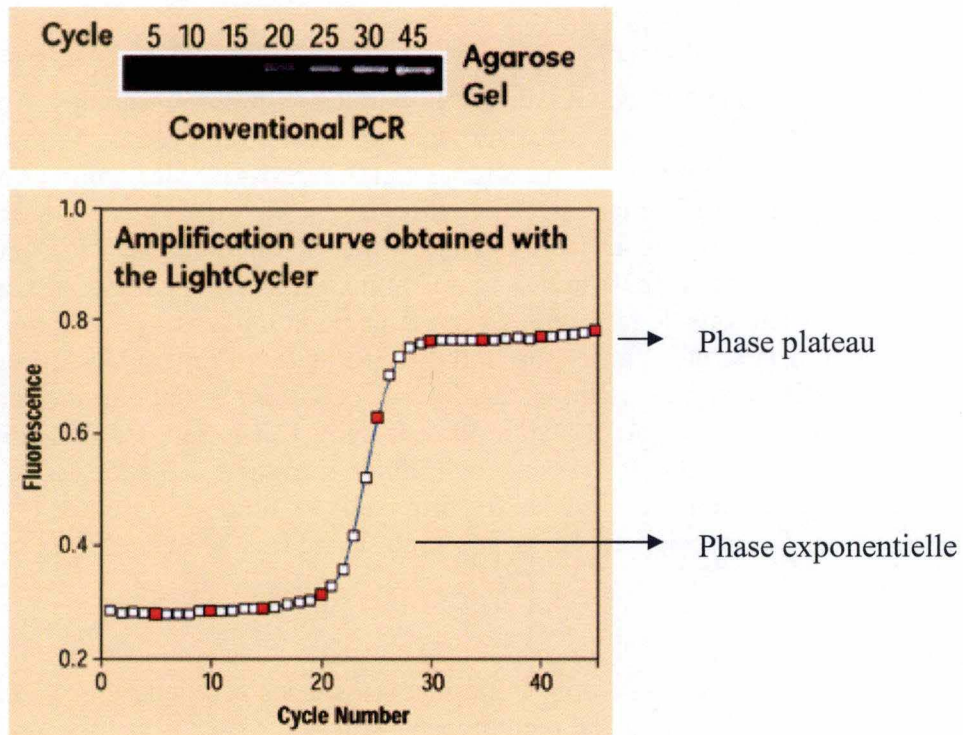


Figure 2.2 : Courbe représentant la cinétique d'amplification de l'ADN cycle par cycle.

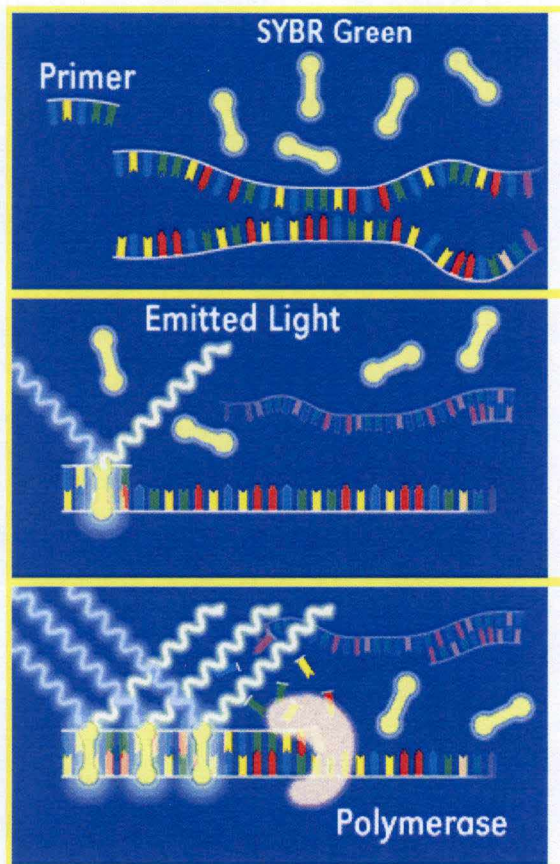


Figure 2.3. : Figures représentant le Sybr Green s'intercalant dans de l'ADN (www.thaiscience.com)

d'amorce pour l'enzyme. La reverse transcriptase (*SuperScript™ II*) va synthétiser les brins d'ADN complémentaire à l'ARNm. Ensuite, à partir de 100 ng d'ARNm, la manipulation se déroule suivant le protocole du fournisseur *Kit Super Script H Reverse transcriptase*.

5.4.2. Real Time PCR:

➤ Matériel:

Mélange PCR: Power Sybr Green PCR Master Mix (2x)
Amorce sens et antisens (300 mM) (tableau 2.3)

➤ Principe:

La PCR (polymerase chain reaction) correspond à l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces. La courbe (figure 2.2) permet de représenter l'évolution de cette amplification. Cette courbe peut être divisée en 2 phases : une phase exponentielle qui est modélisable et une phase de plateau qui est difficilement modélisable et qui correspond à un ralentissement de l'amplification.

La PCR en temps réel est une PCR classique mais dont on peut suivre l'évolution au cours du temps. Cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. La quantification repose sur la phase exponentielle mais exploite de plus un nouveau paramètre : le Ct (Cycle Threshold). Le Ct correspond au nombre de cycles nécessaires pour que l'amplification produite soit significative et distinguable du bruit de fond.

➤ Méthode :

Nous utilisons au laboratoire le "power Sybr Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems). Le Sybr Green est un colorant qui ne devient fluorescent que lorsqu'il s'intercale dans l'ADN double brin (figure 2.3.). Il permet ainsi de mesurer la quantité de produits amplifiés.

De manière pratique, nous utilisons des plaques MicroAmp (Applied biosystem) pour déposer les différents constituants nécessaires à la réaction. Nous préparons tout d'abord le mélange PCR qui contient le "power Sybr Green PCR Master Mix" ainsi que les amorces sens et antisens spécifiques de notre gène à amplifier (tableau 2.3).

Nous déposons ce mélange dans chaque puits. Ensuite, nous ajoutons 1 ng d'ADNc et nous centrifugeons la plaque à 1000 RPM pendant 2 minutes. Ensuite, la plaque est introduite dans le système d'analyse pour la PCR (Applied Biosystems, 7300 Real Time PCR system) . Afin de désapparier les brins d'ADN, la réaction débute à 95°C durant une période de 10 minutes. Ensuite, cette température est maintenue pendant 15 secondes, puis diminue à 60°C durant 1 minute, ce qui correspond à un cycle. La réaction se termine après 40 cycles.

6. Test de migration :

6.1. Test de migration sur or colloïdal :

6.1.1. Matériel :

Solution d'or :

- AuCl₄H 14,5mM
- NaCO₃ 36,5 mM
- H₂O distillée
- Porter à ébullition

Solution de fixation (2x):

- PBS
- Formaldéhyde 7,4%

NOM	SEQUENCE
36B4-sense	ATCAACGGGTACAAACGAGTC
36B4-antisense	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG
Involucrin- sense	TGAAACAGCCAACTCCAC
Involucrin- antisense	TTCCTCTTGCTTTGATGGG
K10-sense	AATCAGATTCTCAACCTAACAAC
K10-antisense	CTCATCCAGCACCCCTACG
K14-sense	CGATGGCAAGGTGGTGTC
K14-antisense	GGGTGAAGCAGGGTCCAG
HBEGF-sense	TGGCCCTCCACTCCTCATC
HBEGF-antisense	GGGTCACAGAACCATCCTAGCT

Tableau 2.3. : Liste des amorces utilisées pour la Real Time PCR

- Formaldéhyde 0,1%

Solution de Collagène I :

- PBS
- Collagène I (15µg/ml) (Cellon)

Trypsine 25

- Solution A
- Trypsine à 0,025%
- Ethylène Diamine Tétra-Acétate (EDTA) 0,01%

Solution bloquante

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

6.1.2. Méthode :

La préparation de l'or colloïdal et le "coating" des lamelles couvre-objets s'effectuent selon la méthode mise au point par Albrecht-Buehler (1977).

En effet, 1ml de la solution d'or est déposée sur des lamelles en verres qui sont trempées dans de la BSA pendant 15 secondes puis dans de l'éthanol à 100% pendant 1 seconde, et ensuite on sèche les lamelles au sèche-cheveux et on dépose dans des plaques 12 puits. Par après, on prépare la solution d'or extemporanément et on la dépose encore bouillante sur les lamelles. On laisse ensuite incuber 1 heure à température ambiante. Après l'incubation, les lamelles sont rincées avec du PBS stérile puis on ajoute 1ml de collagène I 15µg/ml. Ensuite, les lamelles sont placées à 4°C durant toute la nuit.

Le lendemain, les lamelles sont rincées une fois avec du milieu de culture (Epilife®-) et les kératinocytes sont ensemencés à une densité de 1500 cellules par cm². Ces kératinocytes proviennent d'une culture arrivée à sous-confluence, donc proliférative, et ont été détachés par de la trypsine T25 suivant le protocole du point 1.1.2. de ce chapitre.

La migration sur or colloïdal dure 18 à 20 heures puis les cellules sont fixées par 1ml de la solution de fixation durant 20 minutes. Ensuite, on rince deux fois 5 minutes avec du PBS. Finalement, les lamelles sont montées au Glycergel et les coupes sont observées au microscope en microscopie à fond noir (Olympus Provis).

6.2. Test de migration par "scratch" :

Ce test s'effectue sur une culture de kératinocytes confluente 90%. A l'aide d'un tips bleu 1ml, on gratte avec la même pression du début à la fin la boîte de culture contenant les kératinocytes, ce qui correspond à un "scratch". Ensuite, on aspire le milieu de culture et on effectue deux lavages avec de la solution A, puis on ajoute les différents milieux de culture à tester et on replace les boîtes de culture dans l'incubateur à 37°C. Après 4, 8, 12 et 18h, les cellules sont observées au microscope en contraste de phase et photographiées (Olympus).

7. Marquage immunohistochimique :

7.1. Matériel :

PBS :

- 2,7 mM de KCl
- 15 mM de KH₂PO₄
- 140 mM de NaCl
- 8,1 mM de Na₂HPO₄.2H₂O
- pH 7,2

PBS/BSA:

- PBS
- BSA (fraction V): 0,1%
- Triton-X-100 : 0,02%

Solution d'AEC :

- 15µg de 3-Amino-9-ethylcarbazole
- 0,64 M de NN-diméthyleformamide

- 94 μ M de Tampon acétate, pH 5,2
- 0,03% de H₂O₂

7.2. Méthode :

Les échantillons de peau en cicatrisation sont obtenus à l'I.M.T.R. de Loverval, par le Dr Fauville. Des marges de brûlure ont été excisées au dermatome lors d'intervention chirurgicale visant la pose de greffes cutanées. Ce sont ces marges que nous récupérons. Des coupes de 6 μ m sont effectuées au cryostat sur les prélèvements de peau préalablement congelés. Ces coupes sont recueillies sur des lames Superfrost traitées à l'aminosilane.

On fixe les coupes dans du PBS/ PFA 4% pendant 15 minutes puis on les passe 3 fois 2 minutes dans de la glycine 0,1M. Ensuite, on rince les coupes dans du PBS 3 fois 5 minutes. Pour inhiber les peroxydases, une incubation supplémentaire est nécessaire dans de l'H₂O₂ à 3%. Ensuite, des rinçages sont effectués dans du PBS/BSA (3x5minutes) et pour saturer les sites non spécifiques, les coupes sont placées 30 minutes dans du PBS/BSA. Puis, durant 1 heure, les coupes sont incubées en chambre humide à température ambiante, avec l'anticorps primaire adéquat dilué (1/20) dans du PBS/BSA. Après l'incubation, on rince 3x5 minutes dans du PBS/BSA puis l'anticorps secondaire couplé à la biotine (Dako LSAB + System HRP) est déposé et incubé durant 1h, en chambre humide également. Cette étape permet d'amplifier le signal. Après avoir préalablement rincé les coupes 3x5 minutes dans du PBS/BSA, celles-ci sont incubées, 15 minutes à température ambiante et en chambre humide, avec de la streptavidine couplée à des peroxydases (la streptavidine se lie spécifiquement à la biotine).

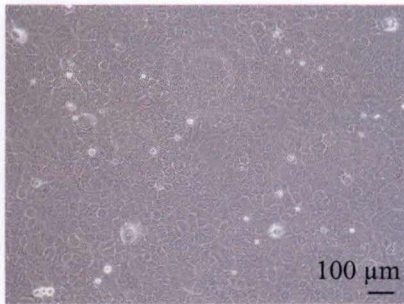
Finalement, la présence de ces enzymes est révélée par l'AEC (Dakocytomation) (4 minutes) et les coupes plongées 10 secondes dans l'hémalum puis rincées 10 minutes avec de l'H₂O pour obtenir un meilleur contraste et enfin montées au glycergel (Dakocytomation Mounting Medium).

8. Détection proHB-EGF sur un épiderme :

Les morceaux de peau sont obtenus à partir d'abdominoplasties réalisées à la clinique Saint Luc de Bouge. Les lambeaux de peau sont découpés en 6 carrés d'environ 4 cm sur 4, à l'aide de bistouri stérile puis sont incubés dans de la trypsine T17 (cf 1.1.) durant une nuit à 4°C. Le lendemain, le derme est séparé de l'épiderme et l'action de la trypsine est bloquée puis, les morceaux sont déposés dans de l'Epilife[®]. Ensuite, 3 des 6 carrés épidermiques sont coupés en 16 petits morceaux et le tout est placé dans l'incubateur à 37°C durant 24h, 48h ou 72h.

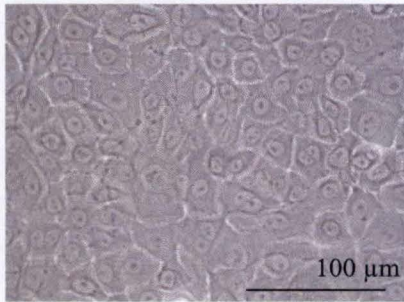
RESULTATS ET DISCUSSION

Cellules contrôles DMSO 17h



A

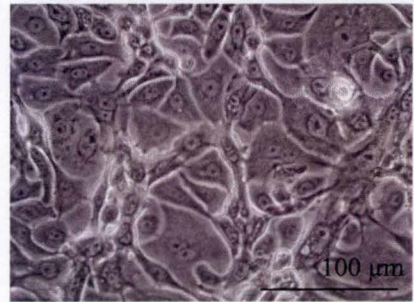
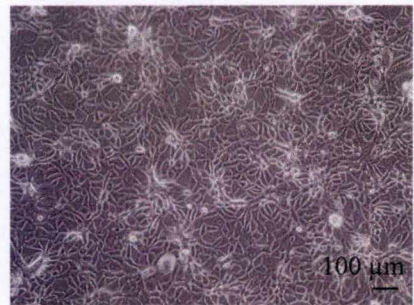
Grossissement 10x



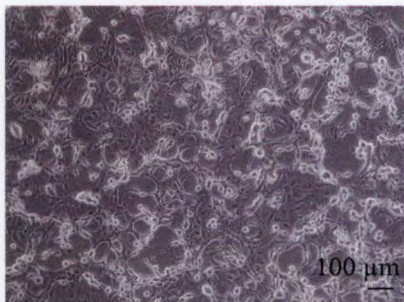
Grossissement 40x

Cellules traitées 1h par la M β CD+
17h de lovastatine.

B

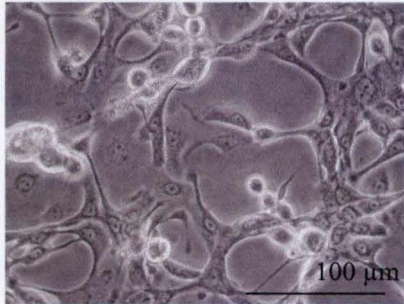


Cellules traitées par le TPA



C

Grossissement 10x



Grossissement 40x

Cellules traitées par H₂O₂

D

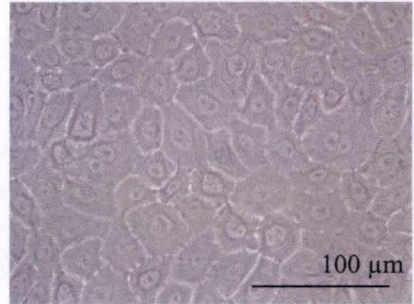
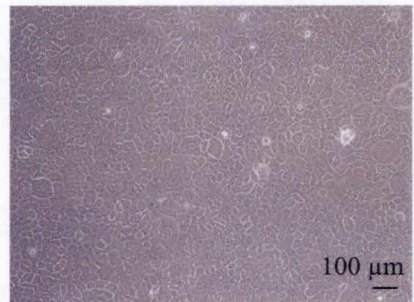


Figure 3-1 : Morphologie de kératinocytes épidermiques humains observés au microscope en contraste de phase, après différents traitements. **A. Cellules contrôles** : Ces cellules sont 1h dans de l'Epilife[®] - puis sont mises en présence de milieu Epilife[®] - contenant 0,02% DMSO durant 17h. La morphologie des kératinocytes à confluence est tout à fait attendue ; les cellules forment un tapis cellulaire, se tassent les unes contre les autres et les contacts intercellulaires sont peu réfringents. **B. Cellules traitées M β CD et lovastatine** : Les kératinocytes sont traités 1h avec de la M β CD (7,5 mM) puis 17h avec de la lovastatine (10 μ M). La morphologie est fortement altérée par rapport à celle des cellules contrôles. **C. Cellules traitées par le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate)** : Après un traitement de 18h par le TPA (10ng/ml), les kératinocytes se sont rétractés. **D. Cellules traitées 20 minutes par H₂O₂** : Les cellules sont traitées 20 minutes avec de l'H₂O₂ (1 mM) puis du milieu autocrine Epilife[®] - est ajouté. Leur morphologie est comparable à celle du contrôle DMSO.

1. Analyse de l'expression du facteur de croissance HB-EGF suite à différents stress :

Le premier volet de notre travail a été de caractériser l'expression de HB-EGF (au niveau traductionnel et transcriptionnel) chez des kératinocytes humains, suite à différents stress. Nous savions, par des études menées préalablement au laboratoire, qu'un traitement de 1h par la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) permet l'activation de la MAPK p38 (Jans et al., 2004), de même qu'un traitement court (20 minutes) avec du peroxyde d'hydrogène permet également la phosphorylation de la MAPK p38.

Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à la réponse cellulaire suite à des traitements plus longs (18h). Nous avons entrepris de traiter les cellules soit par la M β CD 1h suivi de 17h de lovastatine, soit par de l'ester de phorbol 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) durant 18h, soit par de l'H₂O₂ pendant 20 minutes suivi de 17h40 dans le milieu autocrine Epilife[®] -.

1.1. Analyse morphologique :

La figure 3-1 présente la morphologie des kératinocytes suite aux différents traitements. Les cellules contrôles montrent que la culture se trouve à confluence. Le stade de confluence correspond au moment où les cellules remplissent toute la surface de culture et passent d'une phase proliférative vers une phase de différenciation. Les cellules sont polyédriques et il n'y a plus d'espaces visibles entre elles.

Dans notre travail, toutes les expériences se sont faites sur des cultures de kératinocytes à confluence et nous avons utilisé une souche de kératinocytes humains adultes (NAK148).

La morphologie des cellules traitées par la M β CD et la lovastatine est très différente de celle des cellules contrôles. Les cellules sont allongées, les espaces intercellulaires sont réfringents et les cellules ne sont plus serrées les unes contre les autres.

De même, suite au traitement par le TPA, les kératinocytes sont rétractés, les espaces entre les cellules sont bien visibles.

Par contre, la morphologie des cellules traitées avec H₂O₂ est comparable à celle des cellules contrôles non traitées.

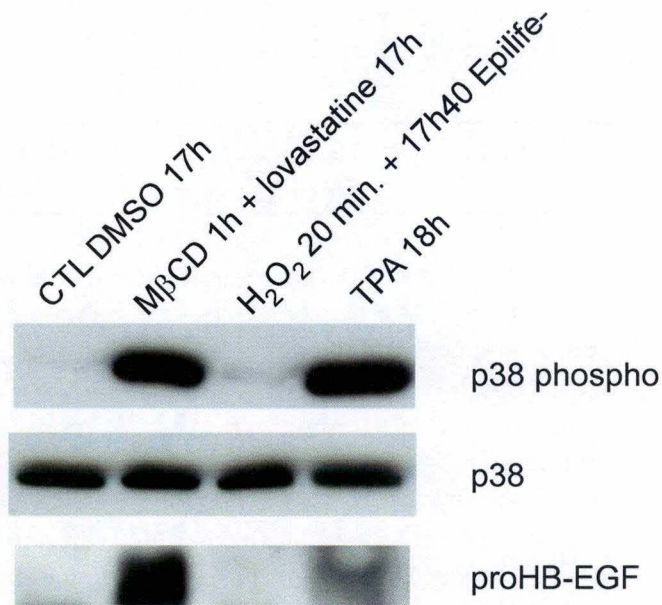


Figure 3-2: Détection de l'activation de p38 et de l'expression de proHB-EGF dans des cultures de kératinocytes à confluence. Ces cultures de kératinocytes ont été traitées soit par 1h de MβCD (7,5 mM) suivi de 17h de lovastatine (10 μM), soit 20 minutes avec de l'H₂O₂ (1 mM) suivi de 17h40 de milieu Epilife[®]-, soit 18h par du TPA (10ng/ml). La lovastatine étant diluée dans du DMSO, nous ajoutons un contrôle DMSO de 17h, avec la même concentration. Les protéines sont analysées par Western Blot et p38 total représente le contrôle de charge.

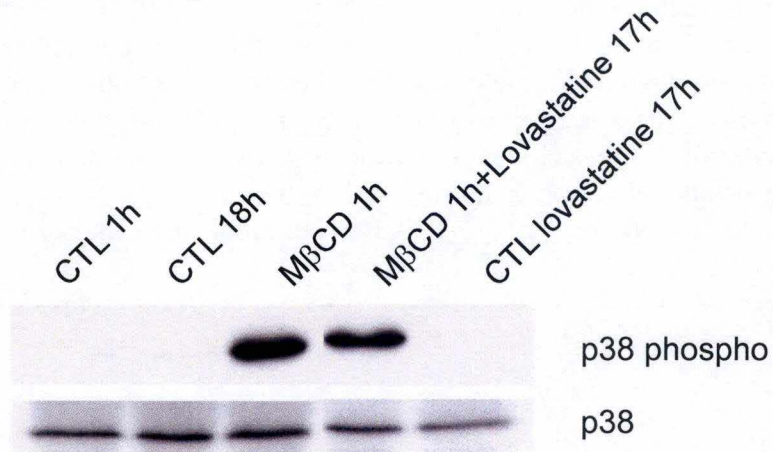


Figure 3-3: Contrôle du rôle éventuel de la lovastatine. Détection de la phosphorylation de p38 suite à un traitement par la MβCD (7,5 mM) 1h, un traitement par la MβCD (7,5 mM) 1h suivi de 17h de lovastatine (10 μM) ou un traitement par de la lovastatine 17h (10 μM). Un contrôle de 1h non traité est analysé ainsi qu'un contrôle de 18h (1h non traité, 17h DMSO). L'analyse de l'expression de p38 total constitue le contrôle de charge.

1.2. Analyse protéique :

A la fin des traitements, les kératinocytes ont été lysés et les protéines ont été analysées par la technique du Western blot (figure 3-2).

On peut observer que la déplétion en cholestérol et le traitement par le TPA activent la MAPK p38. Par contre, le traitement par l' H_2O_2 ne permet pas la phosphorylation de p38 tout comme le contrôle DMSO.

L'absence de phosphorylation de la MAPK p38 lors du stress oxydatif est peut-être due au fait que les cellules se trouvent 17h40 dans un milieu normal (Epilife[®]-) après le traitement de 20 minutes par H_2O_2 , ce qui constitue probablement un temps assez long pour permettre aux cellules de "récupérer" suite au stress.

La déplétion en cholestérol permet non seulement l'activation de p38 mais également l'expression de proHB-EGF tout comme les kératinocytes traités par le TPA. Notons que cette expression est plus faible par rapport à celle engendrée par le traitement M β CD et lovastatine. Quant aux cellules traitées par H_2O_2 , nous n'observons pas l'expression de proHB-EGF.

Remarquons que dans le cas d'une analyse protéique, nous parlerons du précurseur proHB-EGF qui est membranaire et non du facteur HB-EGF puisque celui-ci est libéré dans le milieu, après avoir été clivé.

Dans cette expérience, la lovastatine est utilisée pour inhiber la néosynthèse du cholestérol. En effet, la M β CD permet d'enlever le cholestérol en membrane mais ne permet pas d'inhiber sa synthèse. Pour montrer que la réponse cellulaire est bien induite par la déplétion en cholestérol et non par le traitement long par la lovastatine, nous avons traité des kératinocytes avec de la lovastatine seule (10 μ M) (résultat 3-3). Le résultat nous montre bien qu'un traitement de 17h par la lovastatine n'active pas p38 et ne semble donc pas constituer un stress cellulaire.

1.3. Analyse transcriptionnelle :

L'analyse transcriptionnelle s'est réalisée par deux techniques : le Northern Blot et la PCR en temps réel. Les résultats se trouvent à la page suivante en vis-à-vis (figure 3-4-A et figure 3-4-B).

Parallèlement à l'analyse protéique, le Northern blot montre une expression induite de HB-EGF suite aux traitements par la M β CD et par le TPA mais pas par H_2O_2 . De même, la PCR en temps réel confirme ce résultat mais en montrant une légère augmentation de l'expression de HB-EGF suite au traitement par H_2O_2 . Nous remarquons cependant que dans le cas de l'analyse transcriptionnelle, l'expression de HB-EGF est plus importante lorsque les kératinocytes sont traités par le TPA que par la M β CD. Or, nous observons l'inverse lors de l'analyse protéique. Cette différence est peut-être due au fait que le TPA est un inducteur du "shedding" (clivage de proHB-EGF en HB-EGF) (Goishi et al., 1995), ce qui pourrait expliquer que l'expression de proHB-EGF en membrane diminue. Par ailleurs, le TPA induit l'expression génique de HB-EGF et selon Goishi et al. (1995), le "shedding", qui est maximal après 30 minutes de traitement par le TPA (chez les cellules Vero) et l'induction génique par le TPA passeraient par deux mécanismes distincts. Nous pensons qu'après 18h, le proHB-EGF détecté par le Western blot est en fait déjà la réponse induite par l'expression génique stimulée par le TPA.

Analyse des ARNm par Northern Blot.

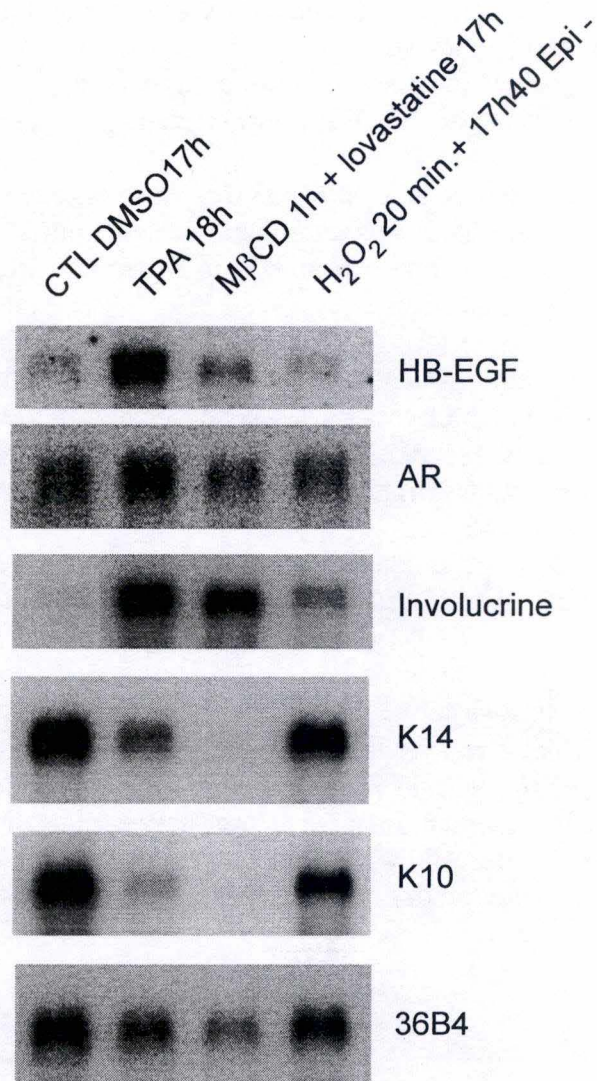


Figure 3-4A: Analyse par Northern blot de l'effet de différents traitements sur l'expression de HB-EGF, amphiréguline (AR) et les marqueurs de différenciation épidermique (Involucrine, K10 et K14). Les kératinocytes ont été traités soit par du TPA (10ng/ml) durant 18h, soit par de la MβCD (7,5 mM) durant 1h suivi de 17h de lovastatine (10 μM), soit par de l'H₂O₂ (1 mM) durant 20 minutes suivi de 17h40 de milieu Epilife®-. L'expression de l'ARNm de 36B4 sert de contrôle de charge.

Analyse des ARNm par PCR en temps réel.

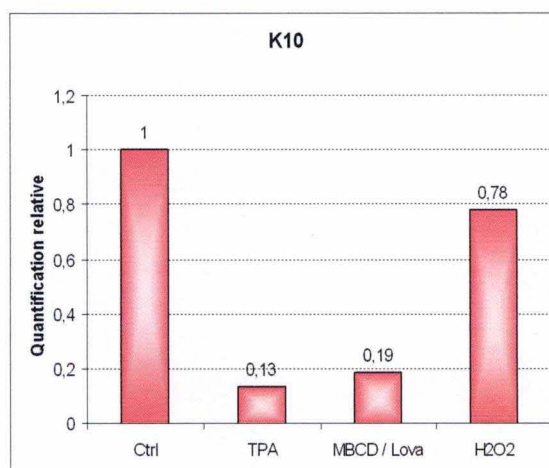
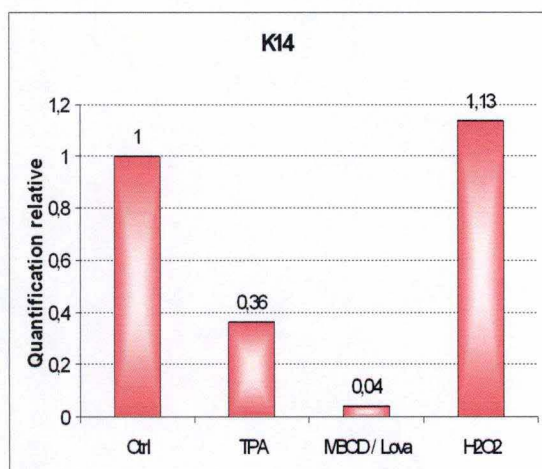
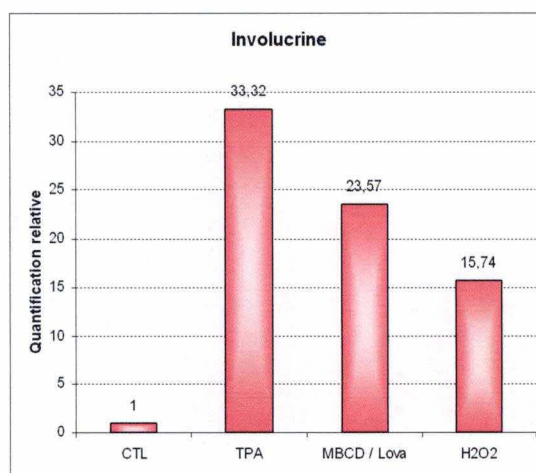
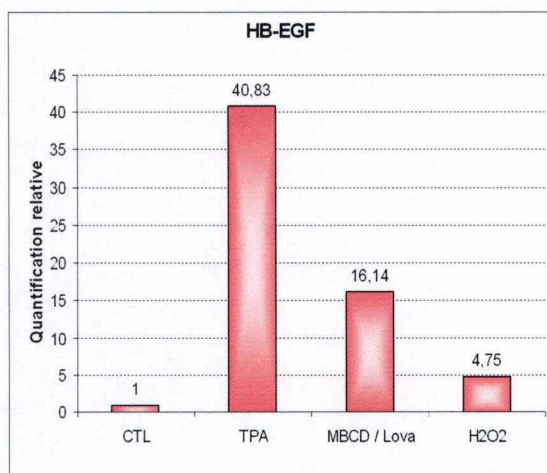


Figure 3-4-B: Représentation graphique de l'analyse de l'expression relative de HB-EGF et des marqueurs de différenciation épidermique (K10, K14, involucrine) par la PCR en temps réel. Les kératinocytes ont été traités soit par du TPA (10ng/ml) durant 18h, soit par de la MBCD (7,5 mM) durant 1h suivi de 17h de lovastatine (10 μ M), soit par de l'H₂O₂ (1 mM) durant 20 minutes suivi de 17h40 de milieu Epilife[®].

Suite à l'article de Hashimoto (1994) décrivant les phénomènes de cross-induction entre l'HB-EGF et l'amphiréguline, nous nous sommes intéressés à l'expression génique de l'amphiréguline. L'expression de l'amphiréguline suite aux différents traitements a été analysée par la technique du Northern blot (figure 3-4-A). Nous observons une augmentation de l'expression de l'amphiréguline pour les traitements par la M β CD et le TPA, mais cette augmentation est plus faible que pour HB-EGF. Ce résultat semble confirmer les données de Hashimoto.

Nous avons analysé ensuite si les différents traitements avaient un effet sur les marqueurs de différenciation épidermique. De manière générale, nous observons une augmentation de l'expression de l'involucrine et une diminution de l'expression des kératines K10 et K14 suite aux traitements par la M β CD et le TPA. Cette observation suggère que ces deux traitements induisent une différenciation tardive. Par ailleurs, nous savons que p38 activée permet l'expression de l'involucrine (Jans et al., 2004), ce qui concorde avec nos résultats.

Le traitement par H₂O₂ permet une augmentation de l'expression de l'involucrine, mais de façon moins importante que par la déplétion en cholestérol et le traitement par le TPA. Quant à l'expression des kératines K10 et K14, elles varient peu par rapport au contrôle.

1.4. Conclusions :

Suite à ces premières expériences, nous pouvons conclure que la déplétion en cholestérol et le traitement par le TPA constituent des stress pour les kératinocytes. Ces stress activent la MAPK p38. Nous observons de plus, suite à ces deux traitements, une augmentation de l'expression du facteur croissance HB-EGF et une expression de l'involucrine, marqueur de différenciation tardive. Il faut souligner cependant que les voies de signalisation pour l'expression de l'involucrine sont sans doute différentes, puisque la M β CD active p38 α /p38 β (Jans et al., 2004), tandis qu'un traitement par le TPA permet l'activation de p38 δ (Eckert et al., 2003).

Lors de traitements de 20 minutes par H₂O₂, après 17h40 dans du milieu Epilife[®]-, ni la phosphorylation de la MAPK p38, ni l'expression de HB-EGF ne sont observées. Or, nous savons que 20 minutes de traitement par H₂O₂ activent la MAPK p38. Dès lors, nous nous sommes demandé ce qui se passe durant le temps où les cellules se trouvent 17h40 dans le milieu Epilife[®]- ? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons entrepris une expérience de cinétique comportant différents traitements par H₂O₂.

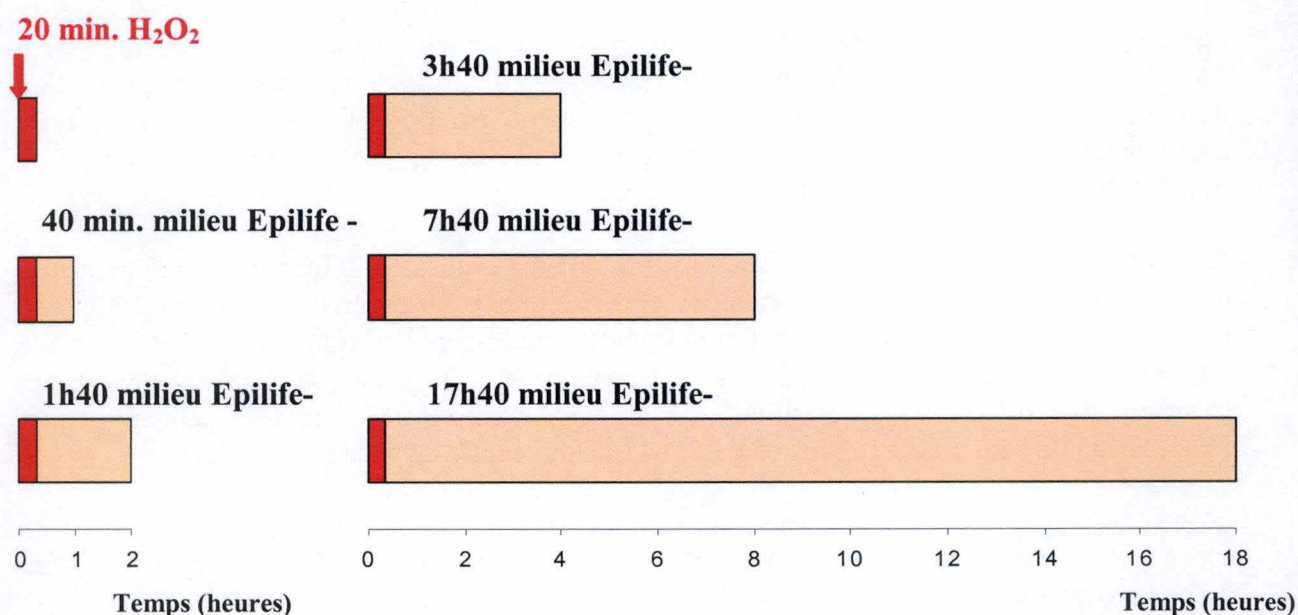


Figure 3-5-A: Représentation schématique de la cinétique (1) par H₂O₂. Des cultures de kératinocytes à confluence ont été traitées 20 minutes par de l'H₂O₂ (1 mM). Ensuite, le traitement est arrêté pour toutes les cultures cellulaires et les cellules sont replacées dans du milieu Epilife[®], à l'exception d'une boîte de culture qui est directement congelée (condition 20 minutes H₂O₂). Le temps de récupération dans de l'Epilife[®] varie de 40 minutes, 1h40, 3h40, 7h40 et 17h40.

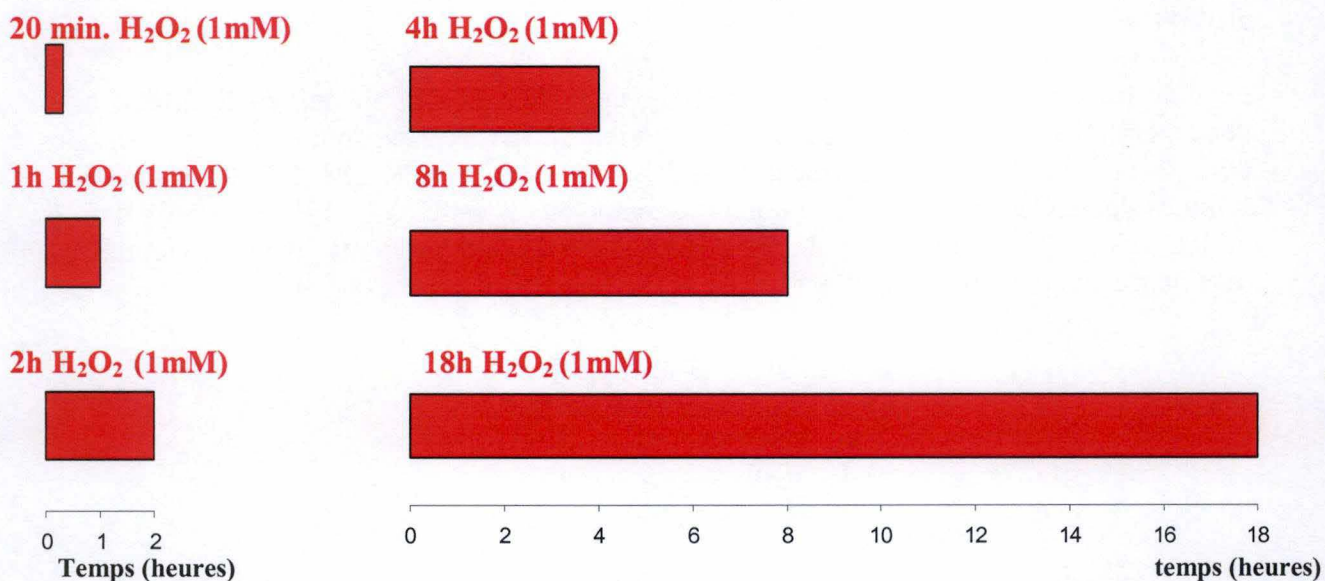


Figure 3-5-B : Représentation schématique de la cinétique (2) par H₂O₂. Des cultures de kératinocytes à confluence sont traitées par de l'H₂O₂ (1 mM) durant différentes périodes : 20 minutes, 1h, 2h, 4h, 8h et 18h.

2. Analyse de l'activation de p38 et de l'expression de HB-EGF en réponse à une cinétique de traitement H₂O₂ :

2.1. Expérience :

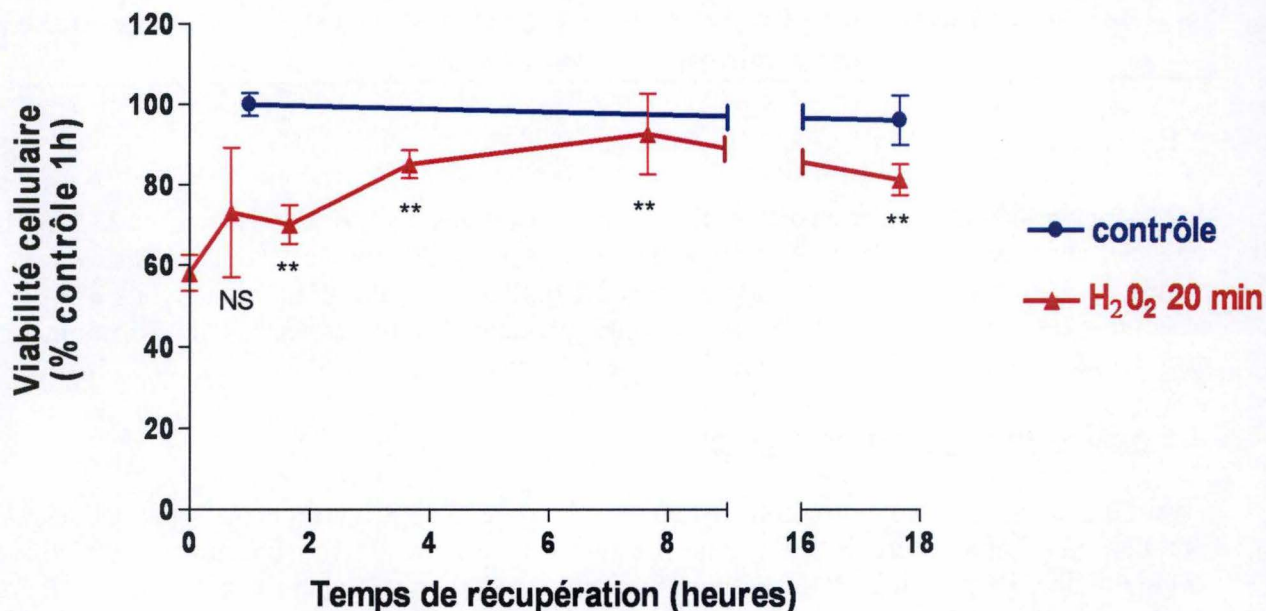
L'expérience comporte deux volets : d'un côté, nous avons analysé l'activation de la MAPK p38 et l'expression de HB-EGF suite à un traitement de 20 minutes par H₂O₂ et avec des temps de récupération variant de 20 minutes à 17h40. D'un autre côté, nous avons traité les kératinocytes par de l'H₂O₂ de façon continue, pendant des durées variant de 20 minutes à 18h. Ces deux cinétiques sont schématisées par la figure 3-5-A et 3-5-B.

2.2. Analyse de la toxicité des traitements :

Avant d'analyser les protéines, nous avons testé la toxicité de nos traitements grâce au test de viabilité MTT. La figure 3-6 nous montre que 20 minutes d'H₂O₂ diminuent la viabilité cellulaire de 40% par rapport aux cellules non traitées. Ensuite, la viabilité augmente au fur et à mesure que les cellules récupèrent dans l'Epilife[®]-. Après 7h40 dans de l'Epilife[®]-, les cellules ont un pourcentage de viabilité proche de celui du contrôle. Cependant, ce pourcentage diminue légèrement après un temps de récupération de 18h.

Les résultats MTT réalisés sur la deuxième cinétique (figure 3-6) montrent que la perte de viabilité cellulaire (hautement significative) est d'autant plus importante que le traitement par H₂O₂ est long. Après 18h de traitement, on observe une chute d'environ 60% par rapport au contrôle. Cette chute de viabilité cellulaire n'est pas surprenante au vu de la morphologie des kératinocytes (figure 3-7).

A.



B.

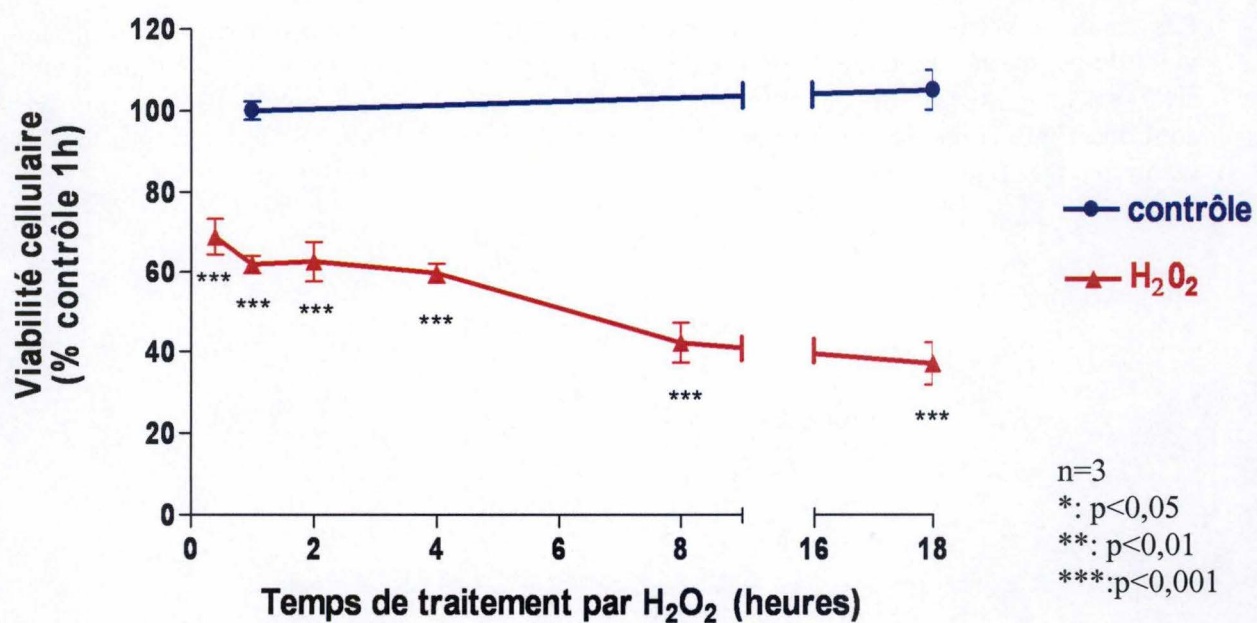
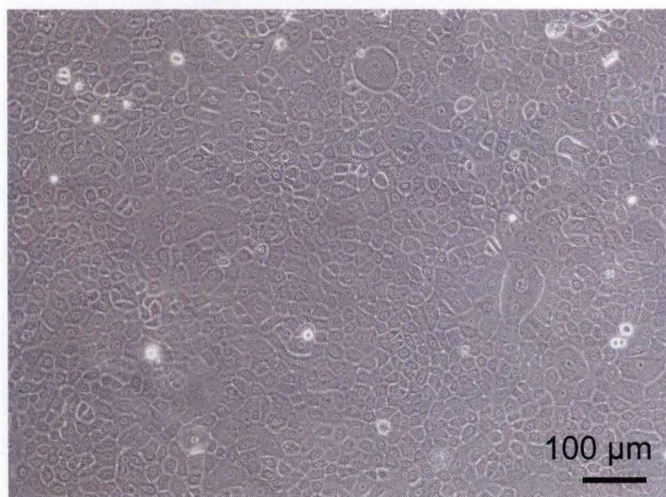


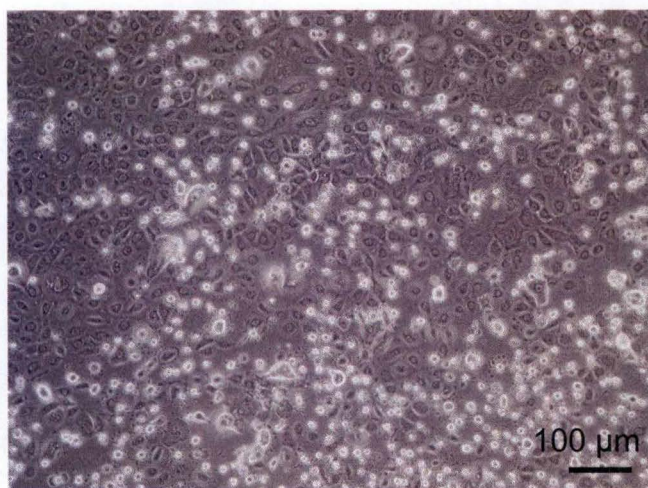
Figure 3-6: Etude de la viabilité cellulaire suite aux traitements des kératinocytes avec de l'H₂O₂ (1 mM). **A. Cinétique (1)** : le test MTT se fait sur des kératinocytes traités 20 minutes par H₂O₂ (1 mM) et dont le temps de récupération varie de 0 à 18h (0, 40 minutes, 1h40, 3h40, 7h40 et 17h40) dans de l'Epilife®-. Nous comparons, au moyen d'un test de t Student, la viabilité cellulaire suite aux différents temps de récupération par rapport à la culture de kératinocytes traités 20 minutes sans temps de récupération. **B. Cinétique (2)** : le test MTT est réalisé sur des kératinocytes traités par de l'H₂O₂ (1 mM) durant différentes périodes : 20 minutes, 1h, 2h, 4h, 8h et 18h. La viabilité cellulaire est comparée, au moyen d'un test de student, au contrôle 1h.

Grossissement 10x

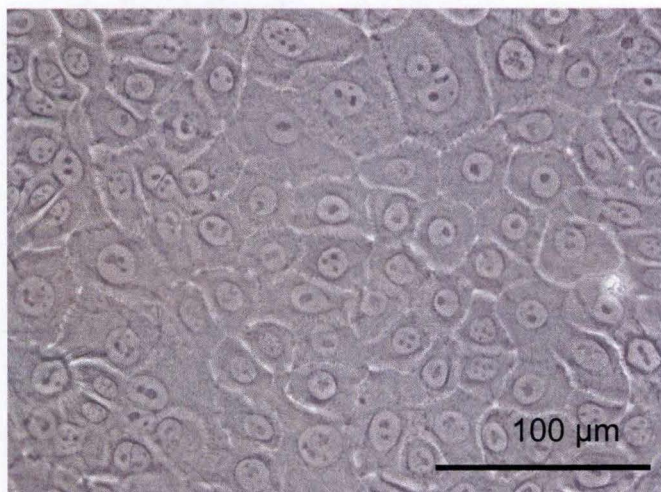


Cellules contrôles non traitées

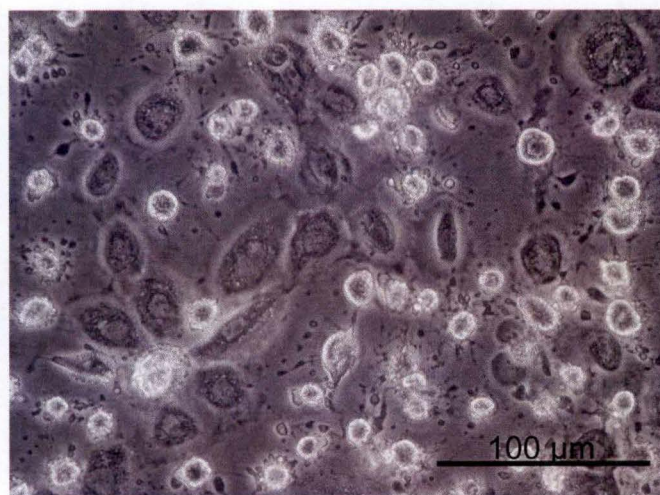
Grossissement 10x



Cellules traitées 18h par H₂O₂



Grossissement 40x



Grossissement 40x

Figure 3-7: Morphologie des kératinocytes non traités par rapport aux kératinocytes traités 18h par de l'H₂O₂. La morphologie des kératinocytes est très altérée par rapport à celle des cellules contrôles. En effet, les cellules traitées sont rétractées et les espaces entre les cellules sont visibles.

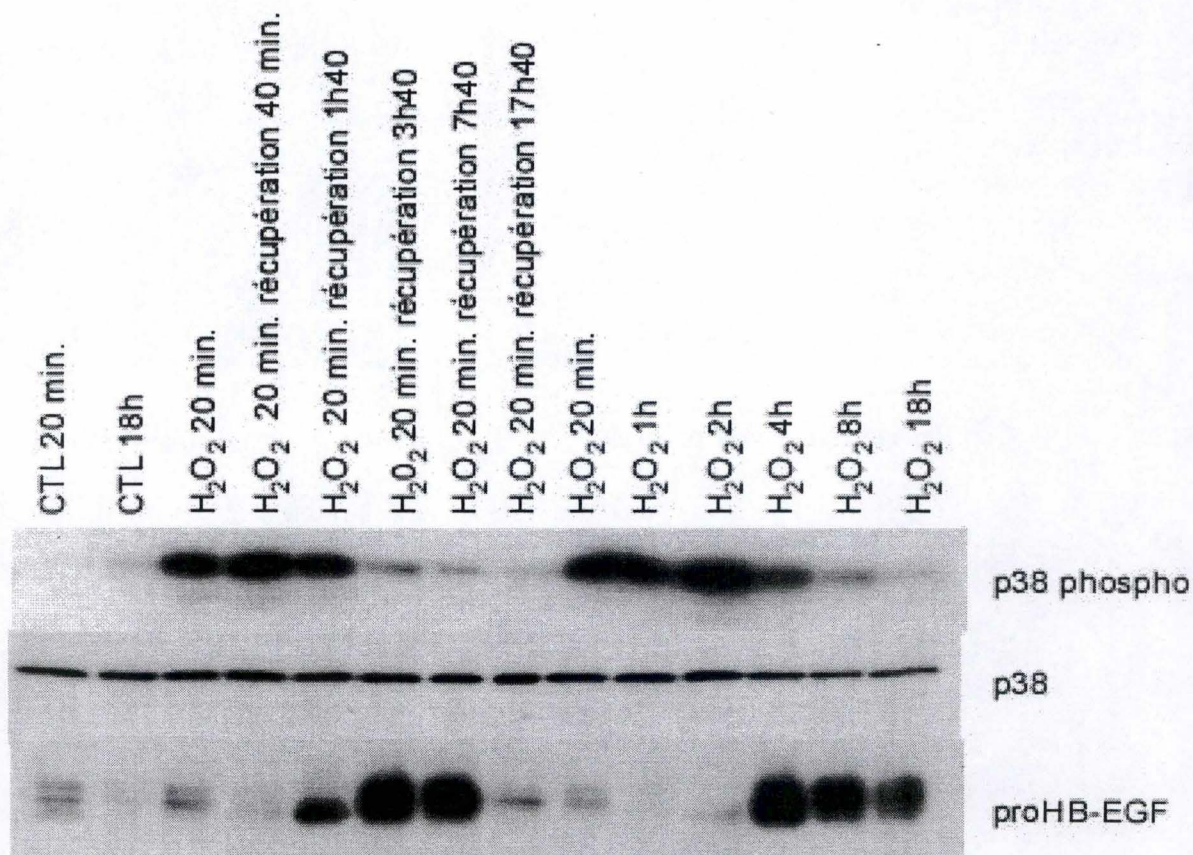


Figure 3-8-A: Analyse par Western blot de l'activation de p38 et de l'expression de HB-EGF, chez des kératinocytes humains à confluence traités par H₂O₂ (1 mM) suivant deux cinétiques. Pour la première cinétique (avec temps de récupération), nous observons une activation de p38 après 20 minutes d'H₂O₂ sans récupération et 20 minutes d'H₂O₂ avec récupération de 40 minutes et de 1h40 dans de l'Epilife®. HB-EGF est exprimé quant à lui à partir de 20 minutes d'H₂O₂ avec une récupération de 1h40, 3h40 et 7h40. Pour la deuxième cinétique (sans temps de récupération), après 20 minutes d'H₂O₂, p38 est activée et cette phosphorylation se maintient jusque 4h de traitement puis diminue légèrement à 8h. proHB-EGF est exprimé à partir de 4h de traitement jusque 18h. Le contrôle de charge est représenté par l'expression de p38 total.

2.3. Analyse protéique :

La figure 3-8-A présente l'analyse protéique effectuée par Western Blot.

Comme nous l'avons renseigné au point 1., un traitement de 20 minutes par H₂O₂ permet la phosphorylation de p38. La première cinétique montre qu'après 40 minutes et 1h40 dans de l'Epilife[®]-, cette phosphorylation est toujours bien présente mais diminue à partir de 3h40 pour être presque négligeable après 17h40 d'Epilife[®]-.

La seconde cinétique montre un profil similaire mais avec une phosphorylation de p38 qui se maintient jusqu'à 4h de traitement par H₂O₂, puis ce niveau d'activation chute à partir de 8h, pour atteindre un niveau similaire au contrôle 18h.

La présence de proHB-EGF est détectée à partir de 20 minutes de traitement et 1h40 d'Epilife[®]-. Cette expression augmente après 3h40 et 7h40 dans de l'Epilife[®]- puis chute brusquement.

Dans la deuxième cinétique (traitements longs par H₂O₂), proHB-EGF est détectée dans les lysats cellulaires à partir de 4h et 8h de traitement et se maintient jusqu'à 18h de traitement.

2.4. Conclusions:

Ces deux cinétiques nous montrent qu'il existe une concordance entre l'activation de la MAPK p38 et la présence de proHB-EGF dans les lysats cellulaires. Cette concordance peut être représentée par un graphique, réalisée à l'aide du programme « Image J » qui permet de quantifier les « spots » obtenus par le Western blot (figure 3-8-B). Ces graphiques nous font penser qu'il existe probablement un lien entre l'activité de la MAPK p38 et l'expression de proHB-EGF. Nous émettons comme hypothèse que les stress oxydatifs activent la MAPK p38 et qu'il faut vraisemblablement un certain temps avant que celle-ci n'induisse l'expression du facteur de croissance. En effet, il faut probablement un certain temps avant de produire la protéine, d'où le décalage entre l'activation de p38 et l'expression de proHB-EGF.

2.5. Au niveau ARNm :

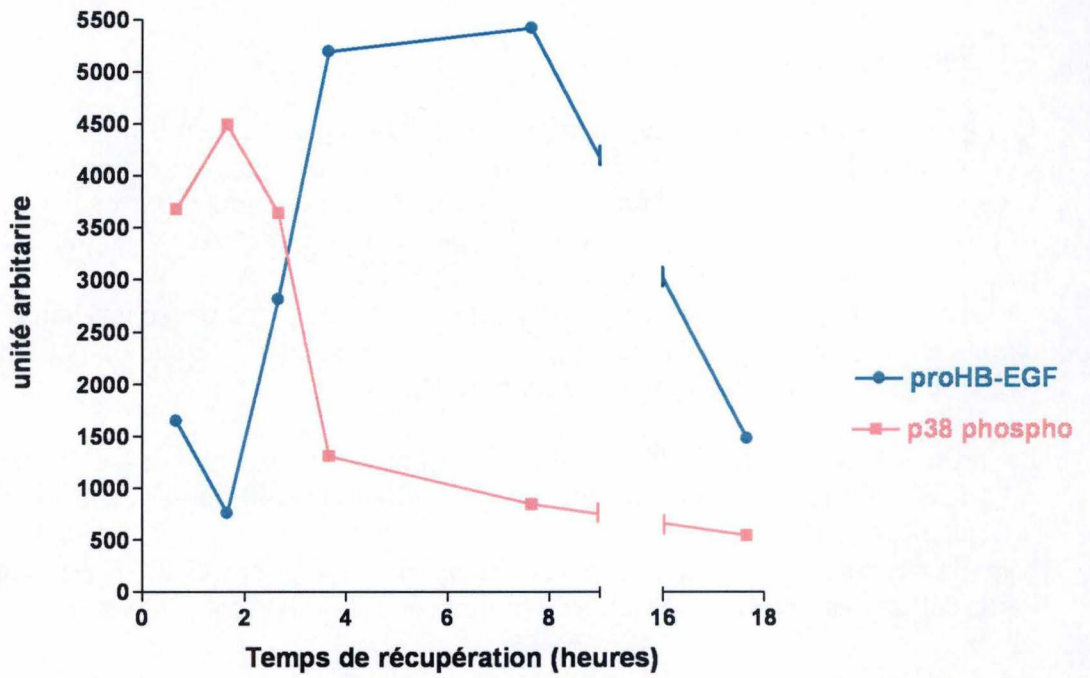
Les résultats de la PCR en temps réel (figure 3-9) montrent une induction du gène HB-EGF lorsque les kératinocytes sont traités avec H₂O₂ durant 20 minutes. Le premier graphique de la figure 3-9 indique les résultats obtenus par les traitements de 20 minutes. Le niveau d'expression de HB-EGF est augmenté de 3,3 fois par rapport au contrôle non traité. Cette augmentation atteint un pic après 20 minutes de traitement et 1h40 de récupération puis chute pour arriver à la valeur de 0,02 après 17h40 de récupération.

Dans la deuxième cinétique (figure 3-9-B), cette induction est augmentée jusqu'à 7,5 fois par rapport au contrôle non traité puis diminue petit à petit pour se stabiliser, après 8h de traitement, aux alentours de 5 fois par rapport au contrôle.

2.6. Conclusions :

Ces expressions de transcrits correspondent avec l'analyse des protéines obtenue à la figure 3-8. Mieux encore, ces inductions géniques correspondent à l'activation de p38, ce qui est un argument en faveur d'un lien éventuel entre l'activation de cette MAPK et l'expression de HB-EGF.

Kératinocytes traités 20 minutes avec H₂O₂ (1 mM)



Kératinocytes traités avec H₂O₂ (1 mM)

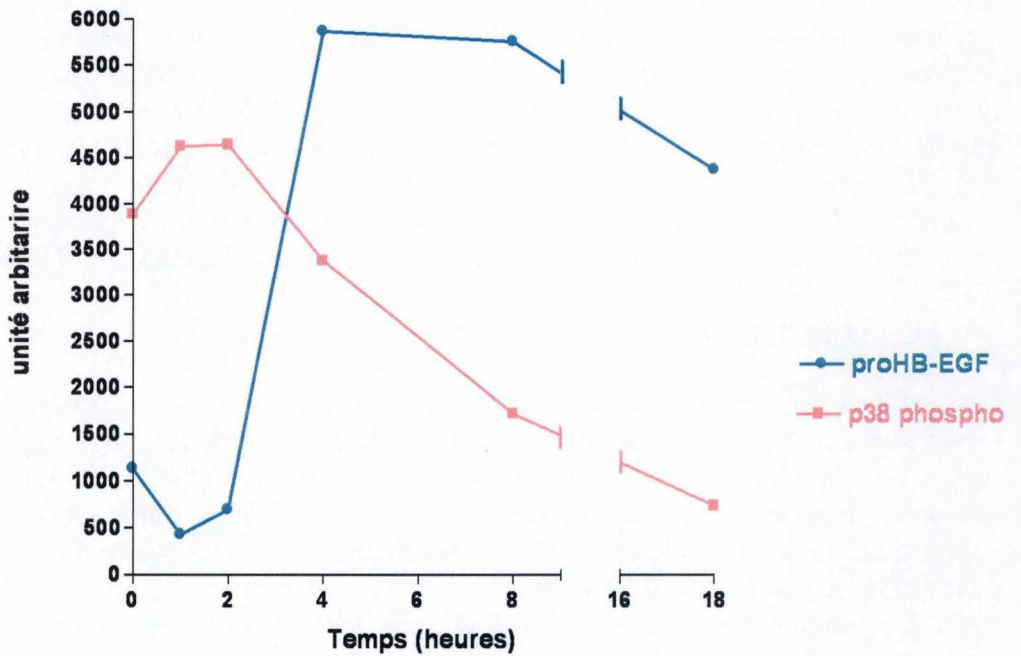


Figure 3-8-B: Représentation graphique de la quantification des résultats du Western blot. Nous remarquons que lorsque le niveau d'activation de p38 est élevé, le niveau d'expression de HB-EGF est plus faible et vice-versa. La quantification se fait à l'aide du programme "Image J".

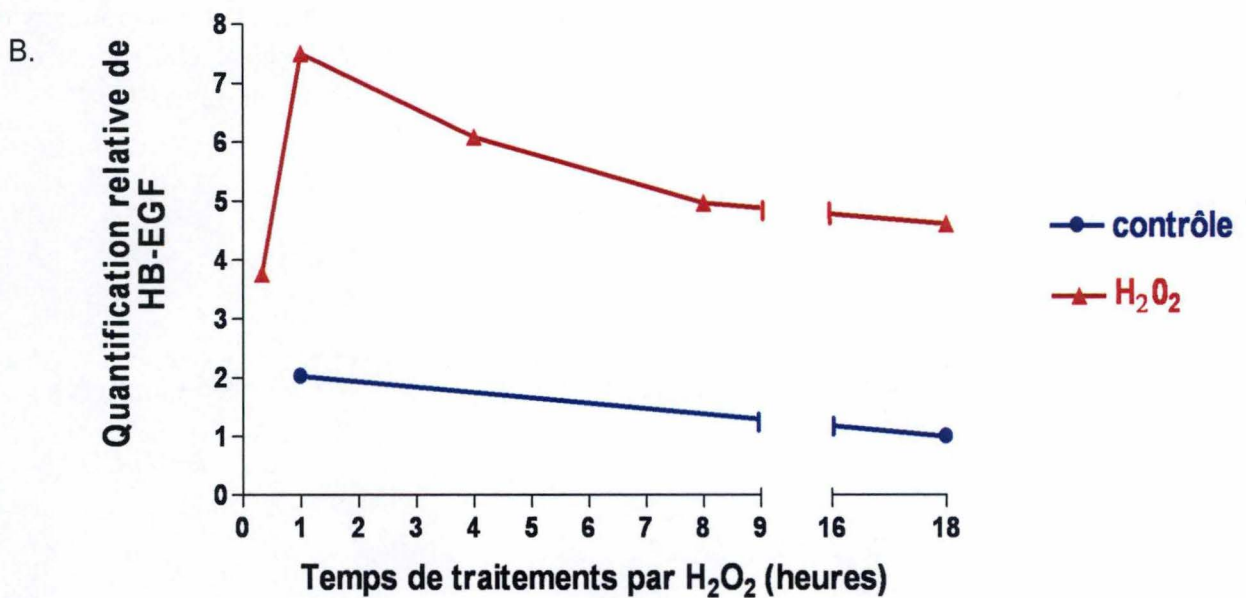
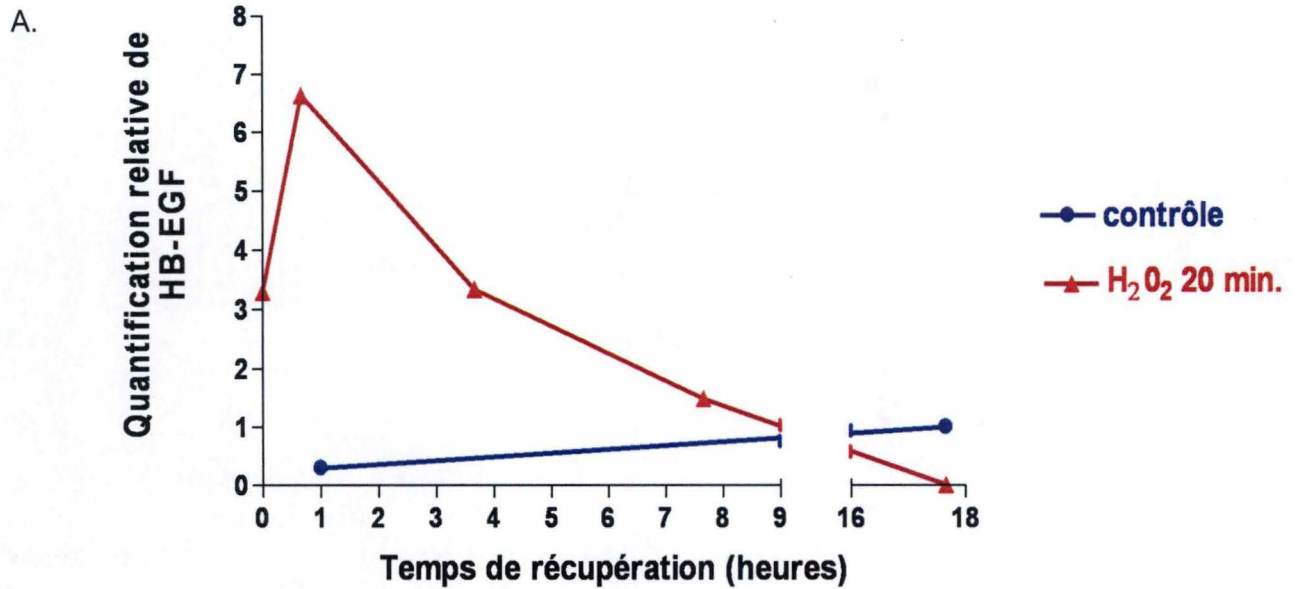


Figure 3-9: Analyse de l'expression de HB-EGF par PCR en temps réel. **A.** Après 20 minutes de traitement, l'expression de HB-EGF est environ 3 fois supérieure par rapport au contrôle 18h. Cette expression génique augmente jusque 7 fois après 40 minutes de récupération dans du milieu Epilife®- puis chute après 1h40 de récupération pour finalement frôler le 0 après 17h40 de récupération. **B.** Dans la deuxième cinétique, l'expression génique de HB-EGF après 20 minutes de traitement par H₂O₂ est similaire au point A. Cette expression atteint ensuite un pic après 1h de traitement puis diminue petit à petit, au fur et à mesure, pour finalement se stabiliser entre 8h et 18h.

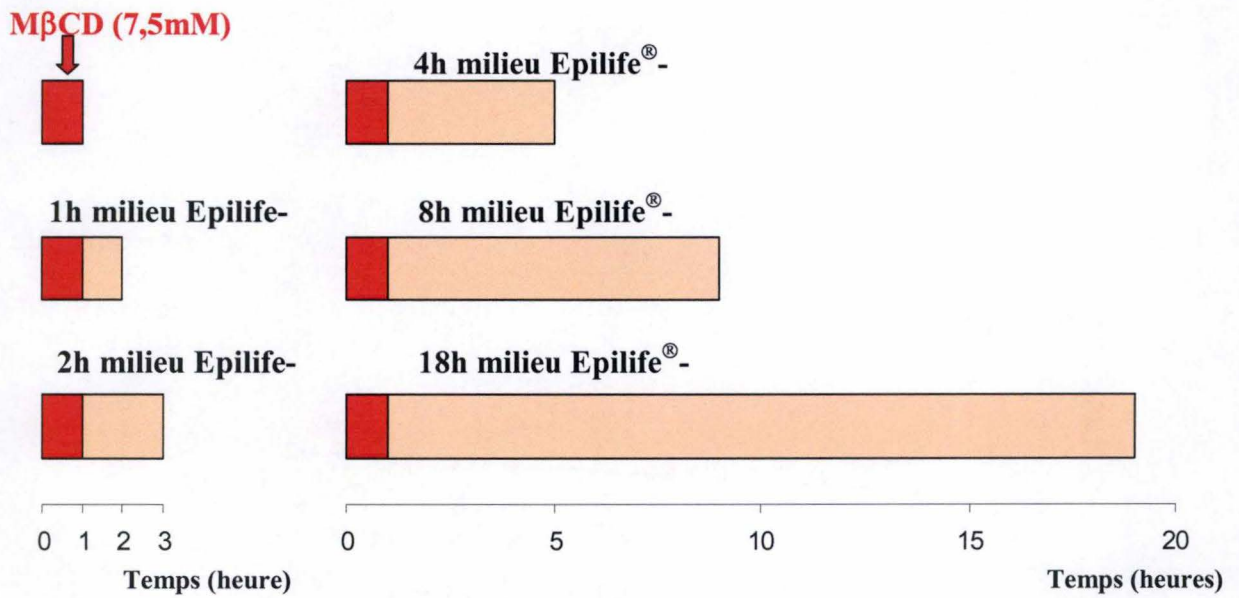


Figure 3-10 : Représentation schématique de la cinétique par la MβCD. Les kératinocytes confluents sont traités 1h par de la MβCD (7,5 mM). Ensuite les cellules récupèrent (ou non) durant différentes périodes allant de 1h à 18h. Les cellules contrôles ne sont pas traitées.

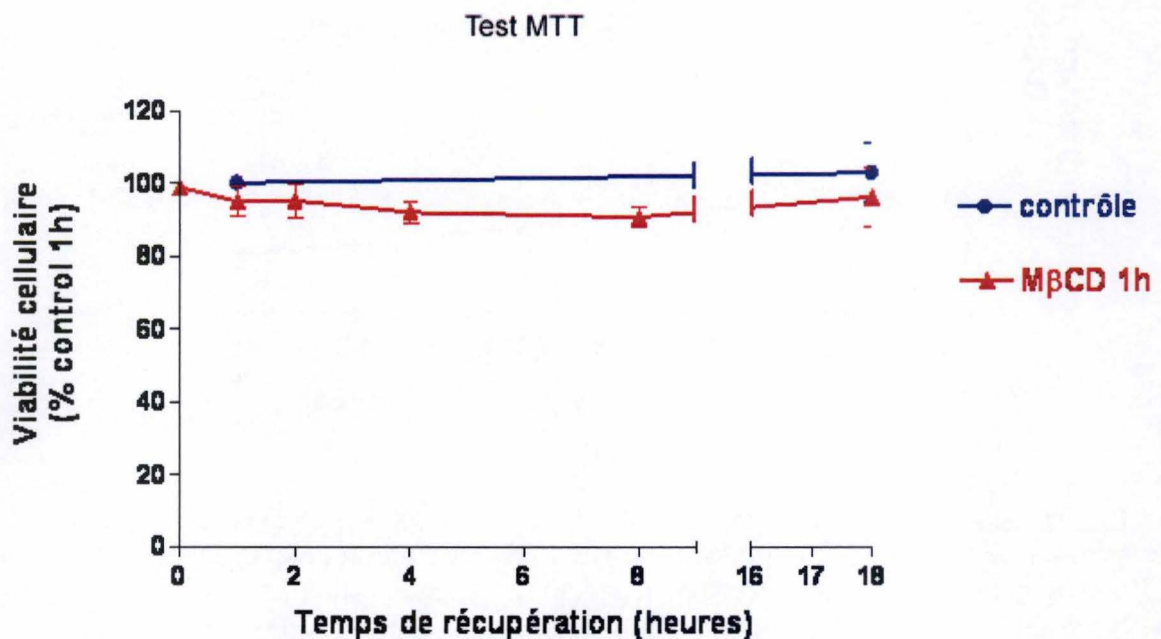


Figure 3-11 : Etude de la toxicité d'un traitement de 1h par de la MβCD (7,5 mM) suivi de différentes périodes de récupération. Les résultats du test MTT ne montrent pas de toxicité liée au traitement de 1h par la MβCD (7,5 mM).

3. Analyse de l'expression de HB-EGF en réponse à une cinétique par la M β CD :

3.1. Expérience :

Au vu des résultats obtenus par la cinétique de traitement par H₂O₂, nous avons voulu voir comment les cellules se comporteraient face à un traitement court (1h) par de la M β CD, suivi d'une récupération dans de l'Epilife[®]-. Nous espérons ainsi par cette expérience, obtenir le même profil que celui pour la cinétique de traitement par H₂O₂, à savoir une concordance entre l'activation de p38 et l'expression de HB-EGF.

De manière pratique, des kératinocytes à confluence ont été traités par de la M β CD durant 1h. Ensuite, la M β CD est remplacée par du milieu autocrine Epilife[®]- pendant différentes périodes variant de 1h à 18h (figure 3-10).

3.2. Analyse de la toxicité du traitement :

Avant d'analyser les protéines, nous avons testé la toxicité de notre expérience par un test MTT. Les résultats (figure 3-11) nous montrent que 1h de M β CD n'affecte guère la viabilité cellulaire. La morphologie des kératinocytes est en effet semblable à celle des cellules contrôles non traitées (résultats non montrés).

3.3. Analyse protéique :

L'analyse protéique (par Western Blot, figure 3-12-A) montre qu'après 1h de M β CD, p38 est phosphorylée. Cette phosphorylation se maintient lorsque les cellules se trouvent dans l'Epilife[®]- et ce, durant 2h. Ensuite, le niveau d'activation de la MAPK p38 rejoint celui des cellules contrôles lorsque les kératinocytes se trouvent depuis 4h dans le milieu autocrine. On observe enfin une légère ré-augmentation du niveau d'activité de p38 pour les cellules se trouvant depuis 18h dans l'Epilife[®]-.

Après 1h de M β CD, une légère expression de proHB-EGF est déjà détectable puis cette expression augmente et se maintient jusque 8h dans de l'Epilife[®]-. Finalement, après 18h dans le milieu autocrine, l'expression de proHB-EGF chute, mais garde tout de même un niveau basal très faible, supérieur aux deux contrôles non traités.

3.4. Conclusions :

Plusieurs informations sont à tirer de cette expérience. Premièrement, nous suggérons qu'il existe peut-être deux vagues d'activation de p38. L'activation de p38 est due dans un premier temps à la déplétion en cholestérol (Jans et al., 2004). Mais la deuxième vague de phosphorylation fait ensuite penser qu'il existe un autre mécanisme d'activation. Nous pourrions imaginer que cette activation est due au "shedding" (ou clivage) de proHB-EGF. De 1h à 8h nous observons, en effet, l'expression de proHB-EGF mais à 18h cette expression chute. Que se passe-t-il de 8h à 18h ? Il est possible que proHB-EGF soit clivé en HB-EGF (d'où la diminution de l'expression du facteur de croissance après 18h) et celui-ci pourrait ensuite se lier et activer le récepteur HER1 et permettre ainsi la transduction d'un signal qui activerait p38.

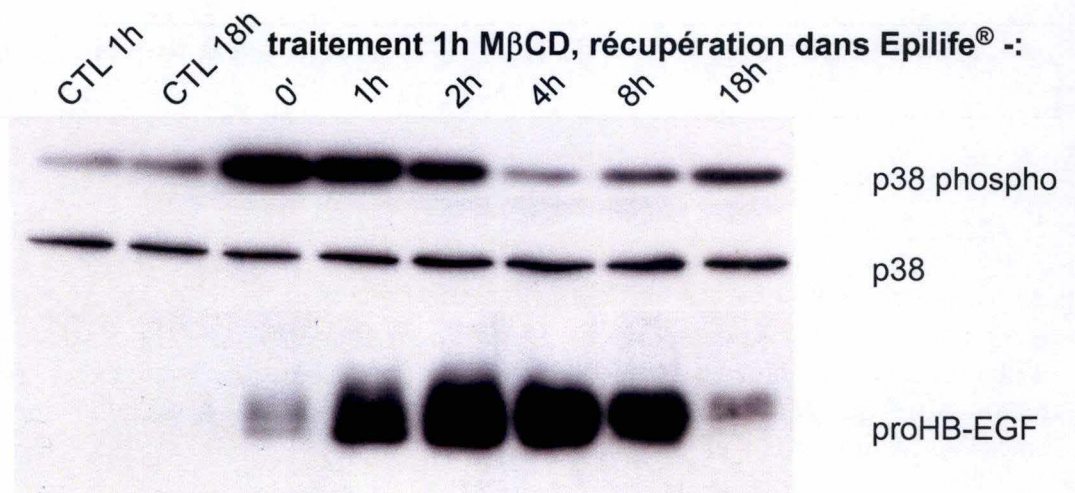


Figure 3-12-A: Détection de l'activité de p38 et de l'expression de HB-EGF dans des cultures de kératinocytes traités 1h par de la MβCD (7,5 mM) suivi de différents temps de récupération dans du milieu Epilife®-. Nous observons une concordance entre l'activation de p38 et l'expression d'HB-EGF. L'expression de p38 représente le contrôle de charge.

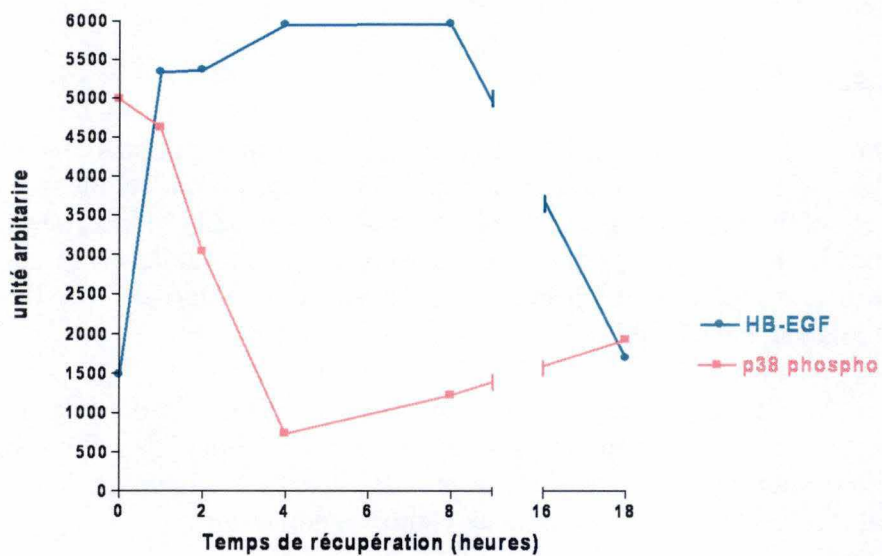


Figure 3-12-B: Quantification densitométrique du Western blot de la cinétique MβCD (figure 3-12-A) à l'aide du programme "Image J". L'expression de HB-EGF augmente lorsque l'activation de p38 diminue.

Cependant, il est possible également que le proHB-EGF produit en membrane se trouve dégradé après 18h de récupération dans de l'Epilife®-. Pour éclaircir cette étape, il faudrait, soit empêcher le "shedding" de proHB-EGF (à l'aide d'inhibiteur de métalloprotéases), pour voir si la diminution de l'expression de proHB-EGF à 18h est inhibée, soit bloquer la liaison au récepteur HER1 pour voir si nous observons une diminution de l'activité de p38.

Par ailleurs, cette analyse protéique nous montre surtout que, de façon similaire à la cinétique par H₂O₂, l'activation de la MAPK p38 précède dans le temps l'expression de proHB-EGF (figure 3-12-B). Cette expérience ne fait donc que renforcer notre idée sur l'implication de p38 dans l'expression de proHB-EGF. Pour en avoir enfin le cœur net, nous avons entrepris d'inhiber la MAPK p38 par l'inhibiteur PD169316.

4. Inhibition de la MAPK p38 par PD169316, lors d'un traitement par la MβCD :

4.1. Expérience :

Cette expérience va investiguer si l'activité de p38 est nécessaire pour induire l'expression de HB-EGF. Pour ce faire, nous avons inhibé cette MAPK à l'aide de l'inhibiteur PD169316. Cet inhibiteur empêche la MAPK de phosphoryler ses substrats et de plus, empêche son autophosphorylation.

Nous avons traité des kératinocytes pendant 1h par la MβCD, puis juste après avoir arrêté le traitement, nous avons placé les cellules dans de l'Epilife®- contenant l'inhibiteur PD169316, pendant les mêmes périodes que l'expérience précédente.

4.2. Analyse protéique :

Les cellules contrôles non traitées par la MβCD, en présence ou non de l'inhibiteur PD169316 présentent une légère phosphorylation de p38 (figure 3-13). Après 1h de MβCD, p38 est phosphorylée et ce niveau de phosphorylation se maintient lorsque les cellules se trouvent depuis 1h dans de l'Epilife®-. En général, en présence de l'inhibiteur, le taux de phosphorylation diminue si l'on compare condition par condition c'est-à-dire avec ou sans inhibiteur, sauf pour la condition 18h où le taux de phosphorylation est plus élevé lors de la présence de l'inhibiteur. L'hypothèse que nous avons suggérée sur une deuxième voie d'activation de la MAPK p38 pourrait expliquer cette différence par rapport aux autres conditions. En effet, si après 18h, proHB-EGF est clivé et vient se lier et activer son récepteur comme nous l'avons suggéré, ceci constitue une deuxième voie d'activation de la MAPK p38. Une autre explication pourrait venir du fait qu'un traitement de 18h avec l'inhibiteur PD169316 serait peut-être toxique pour les kératinocytes et donc constituerait, pour les cellules, un stress qui activerait p38.

Intéressons-nous maintenant à l'expression de proHB-EGF. Aux conditions contrôles, nous n'observons pas l'expression du facteur de croissance. Lorsque les kératinocytes sont traités 1h avec la MβCD, proHB-EGF est exprimé et cette expression diminue légèrement lorsque les cellules sont placées 1h dans l'Epilife®-, pour reprendre ensuite jusqu'à la condition 18h. Enfin, si l'on compare chaque condition sans inhibiteur par rapport à la même condition avec inhibiteur, nous observons une diminution de l'expression de HB-EGF dans chaque cas, ce

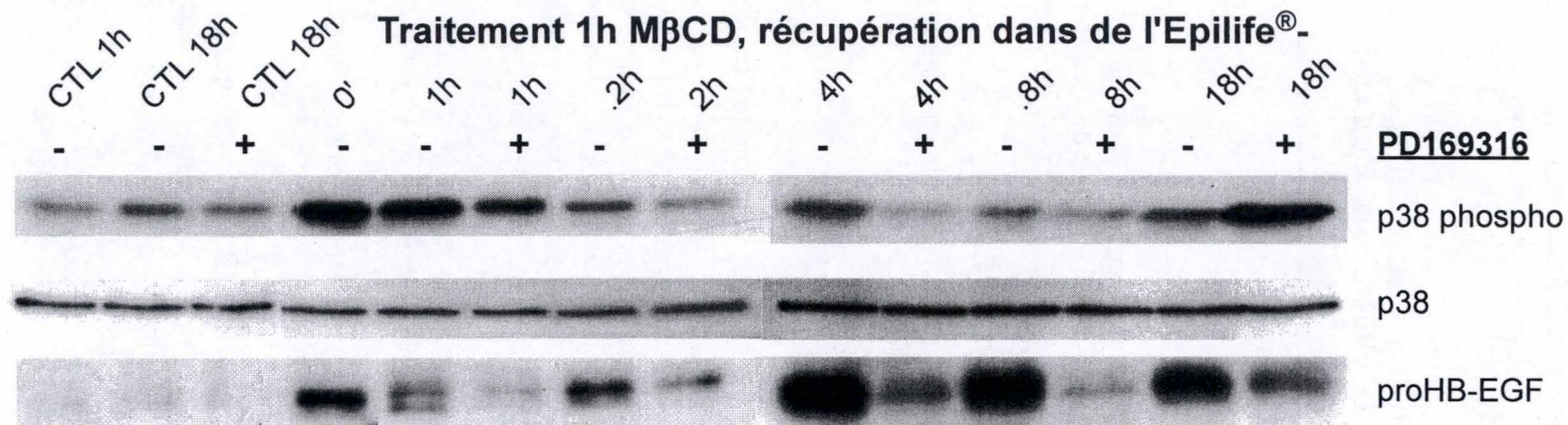


Figure 3-13: Détection de l'activation de p38 et de l'expression de proHB-EGF dans des cultures de kératinocytes à confluence en présence ou non de l'inhibiteur PD169316 (inhibiteur de p38). Il y a une diminution de l'activation de p38 dans presque chaque condition (sauf après 18h de récupération). L'expression de HB-EGF diminue en présence de l'inhibiteur de p38.

qui suggère que notre hypothèse faisant de p38 un activateur de l'expression d'HB-EGF est correcte.

Toutefois, le fait que lors de l'inhibition de p38, l'expression de proHB-EGF n'est pas totalement anéantie, nous suggère qu'il existe probablement d'autres voies induisant HB-EGF. En 2002, Stoll et al. suggérèrent l'implication de la MAPK ERK pour activer l'expression de HB-EGF. Il serait probablement aussi intéressant d'inhiber également cette MAPK.

Une autre explication pourrait venir de l'inhibition de p38, qui ne serait peut-être que partielle dans les conditions d'utilisation de l'inhibiteur.

5. Détection de HB-EGF dans les milieux conditionnés par la cinétique MβCD :

La première partie de ce travail s'est focalisée sur l'expression de HB-EGF tant au niveau transcriptionnel que traductionnel chez des kératinocytes ayant subi des stress notamment par la déplétion en cholestérol. En analysant l'activation MAPK p38 (protéine de stress), nous avons constaté que celle-ci précédait l'expression du facteur de croissance. Par la suite, en inhibant l'activité de cette kinase, nous avons montré qu'effectivement, p38 phosphorylé permettait l'expression de HB-EGF.

La littérature nous apprend que le facteur de croissance HB-EGF est synthétisé sous forme d'un précurseur en membrane, proHB-EGF. La libération de ce facteur de croissance dans le milieu nécessite dès lors un clivage (ou "shedding") de la forme précurseur. Le TPA est un agent bien connu pour stimuler ce clivage (Goishi et al., 1995 ; Izumi et al., 1998). Mais qu'en est-il de la MβCD ? Les résultats obtenus par la cinétique MβCD nous montrent qu'après 1h de MβCD suivi de 1h dans le milieu Epilife[®]-, proHB-EGF est exprimé et ce, jusqu'à 8h de récupération. Au vu de ces résultats, nous nous sommes demandés si ce précurseur transmembranaire pouvait être clivé. De plus, la diminution de l'expression entre les conditions 8h et 18h, nous fait penser qu'une quantité de proHB-EGF pourrait avoir été clivée et libérée dans le milieu. Dans la deuxième partie de notre travail, les milieux Epilife[®]- de la cinétique par la MβCD ont donc été conservés et dans le but de tester une éventuelle activité, nous avons réalisé 3 expériences :

- Une détection de la phosphorylation du récepteur HER1.
- Un test de migration à l'aide de "scratches".
- Un test de migration sur or colloïdal.

5.1. Détection de la phosphorylation du récepteur HER1 :

Lorsqu'il est libéré, le facteur de croissance HB-EGF peut se lier sur le récepteur HER1 et l'activer, ce qui se traduit par une phosphorylation sur les résidus tyrosines. Il est donc possible de détecter l'activité de ce récepteur à l'aide d'un anticorps dirigé contre les tyrosines phosphorylées de HER1.

5.1.1. Expérience :

Pour rappel, lors de l'expérience de la cinétique MβCD, les cellules étaient traitées 1h par la MβCD puis étaient replacées dans du milieu Epilife -. Ce sont ces milieux Epilife[®]- qui ont

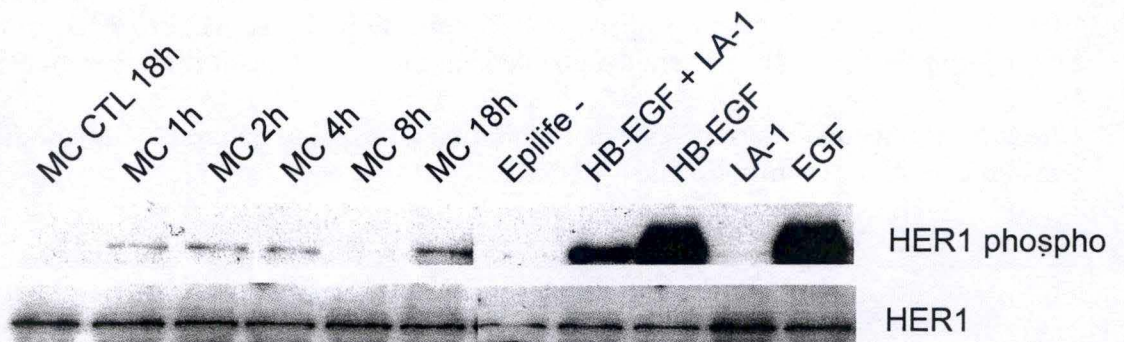


Figure 3-14: Détection de la phosphorylation du récepteur HER1.

Les kératinocytes ont été mis en présence des différents milieux conditionnés et des différentes conditions durant 10 minutes. HB-EGF et EGF activent le récepteur HER1 et nous détectons une phosphorylation lorsque les cellules sont mises en présence du milieu conditionné 18h ainsi qu'une légère phosphorylation pour les milieux conditionnés 1h, 2h et 4h. En présence de l'anticorps LA-1(anticorps anti-HER 1 total), la phosphorylation du récepteur diminue lorsque les cellules sont mises en présence de HB-EGF. HER1 total représente le contrôle de charge.

été récupérés et qui ont été mis en présence de cultures de kératinocytes à confluence durant 10 minutes (temps suffisant pour permettre l'éventuelle activation du récepteur). Ensuite les protéines ont été extraites et analysées par Western blot.

5.1.2. Résultats :

Les résultats se trouvent à la figure 3-14. Nous n'observons pas de phosphorylation du récepteur HER1 pour la condition contrôle et le milieu conditionné 8h. Par contre, une légère phosphorylation est détectée pour les conditions milieux conditionnés 1h, 2h, 4h comparativement au contrôle Epilife[®]. Le milieu conditionné 18h permet également la phosphorylation de HER1 et nous constatons que cette activation est supérieure aux autres phosphorylations engendrées par les milieux conditionnés.

Nous avons également mis les cellules en présence des facteurs de croissance rhEGF ou rhHB-EGF (R&D) et dans ces deux conditions, les phosphorylations attendues des récepteurs sont observées. Enfin pour vérifier que HB-EGF se lie directement sur le récepteur HER1 et l'active, nous avons utilisé un anticorps bloquant le récepteur, ce qui provoque une nette diminution de la phosphorylation du récepteur.

5.1.3. Conclusions :

La phosphorylation du récepteur HER1 par le milieu conditionné 18h est certes faible, comparée à celle détectée lorsque les cellules sont mises en présence de l'EGF ou de l'HB-EGF mais ceci nous indique qu'il y a bien des facteurs qui sont libérés dans le milieu. Nous ne pouvons cependant pas affirmer qu'il s'agit du facteur de croissance HB-EGF. En tout cas, ce qui active le récepteur de l'EGF dans les milieux conditionnés (HB-EGF ?) est faiblement exprimé et certainement très dilué dans le milieu Epilife[®]. De plus, s'il s'agit de HB-EGF, il est possible qu'une partie des facteurs de croissance HB-EGF libérés par le "shedding" se soient directement liés sur le récepteur HER1, et permettent une transduction du signal (qui expliquerait une activation de p38 après 18h?). Cette liaison sur le récepteur HER1 pourrait dans ce cas diminuer la quantité de facteurs de croissance restant disponibles dans les milieux conditionnés et expliquer la faible activation obtenue sur la figure 3-14.

Quoi qu'il en soit, il faudrait pouvoir détecter de façon directe le facteur HB-EGF dans le milieu conditionné mais malheureusement, plusieurs tentatives ont déjà été réalisées au laboratoire sur d'autres milieux conditionnés, mais sans succès actuellement.

5.2. Test de migration par des "scratches" :

5.2.1. Expérience :

Nous avons également testé les effets des milieux conditionnés sur la migration cellulaire. Pour ce faire, nous avons réalisé des "scratches" (voir matériel et méthodes) sur des kératinocytes 90% confluent dans les boîtes de cultures. Nous avons ensuite laissé migrer les cellules durant 12 heures pour ensuite les observer au microscope à contraste de phase (Olympus).

5.2.2. Résultats :

Vu les résultats obtenus sur l'activation de HER1, nous avons décidé de ne tester que les milieux conditionnés pendant 18h.

HB-EGF est un facteur qui joue un rôle lors de la cicatrisation cutanée (Nishi et Klagsbrun, 2004). Nous avons donc testé l'effet de ce facteur sur les "scratches" (figure 3-15). Après 12h, à une concentration de 10ng/ml de HB-EGF, on ne discerne presque plus le scratch. Remarquons que lorsque la concentration diminue de moitié, la migration est moins accentuée. Ce résultat confirme bien l'impact du facteur de croissance sur la migration cellulaire.

En présence d'EGF (10ng/ml), les cellules migrent également de manière importante. Le facteur de croissance rhEGF (R&D), bien que n'étant pas produit par les kératinocytes eux-mêmes, peut jouer un rôle très important dans la cicatrisation cutanée (Gibbs et al., 2000).

Enfin, lorsque les cellules sont en présence de d'amphiréguline (10ng/ml) (R&D), les kératinocytes ont migré, mais cette migration est plus faible et comparable à celle obtenue par le milieu contenant HB-EGF à une concentration de 5ng/ml.

Après 12 heures, les cellules mises en présence du milieu conditionné 18h ont re-colonisé près de la moitié de la surface du "scratch" (figure 3-15). Cette migration est beaucoup plus importante comparée au milieu conditionné contrôle 18h, ce qui suggère que des facteurs relâchés dans le milieu conditionné 18h favorisent la migration.

Cependant, nous observons pour la condition contrôle milieu Epilife[®], que les kératinocytes migrent plus que lorsque les cellules sont en présence de milieux conditionnés 18h. Ce résultat inattendu suggère peut-être que les cellules traitées par la M β CD libèrent non seulement des facteurs de croissance (HB-EGF et peut-être d'autres), mais sans doute aussi d'autres signaux qui pourraient inhiber la migration ou la prolifération cellulaire.

Nous émettons comme deuxième hypothèse l'effet d'une congélation/décongélation du milieu conditionné 18h qui aurait des conséquences néfastes pour les facteurs présents dans le milieu.

5.3. Test de migration sur or colloïdal :

5.3.1 Expérience :

Pour mesurer la migration des kératinocytes en culture, nous avons adapté la technique décrite par Albrecht-Buehler (1977). Lorsque les cellules migrent sur une matrice d'or colloïdal, elles

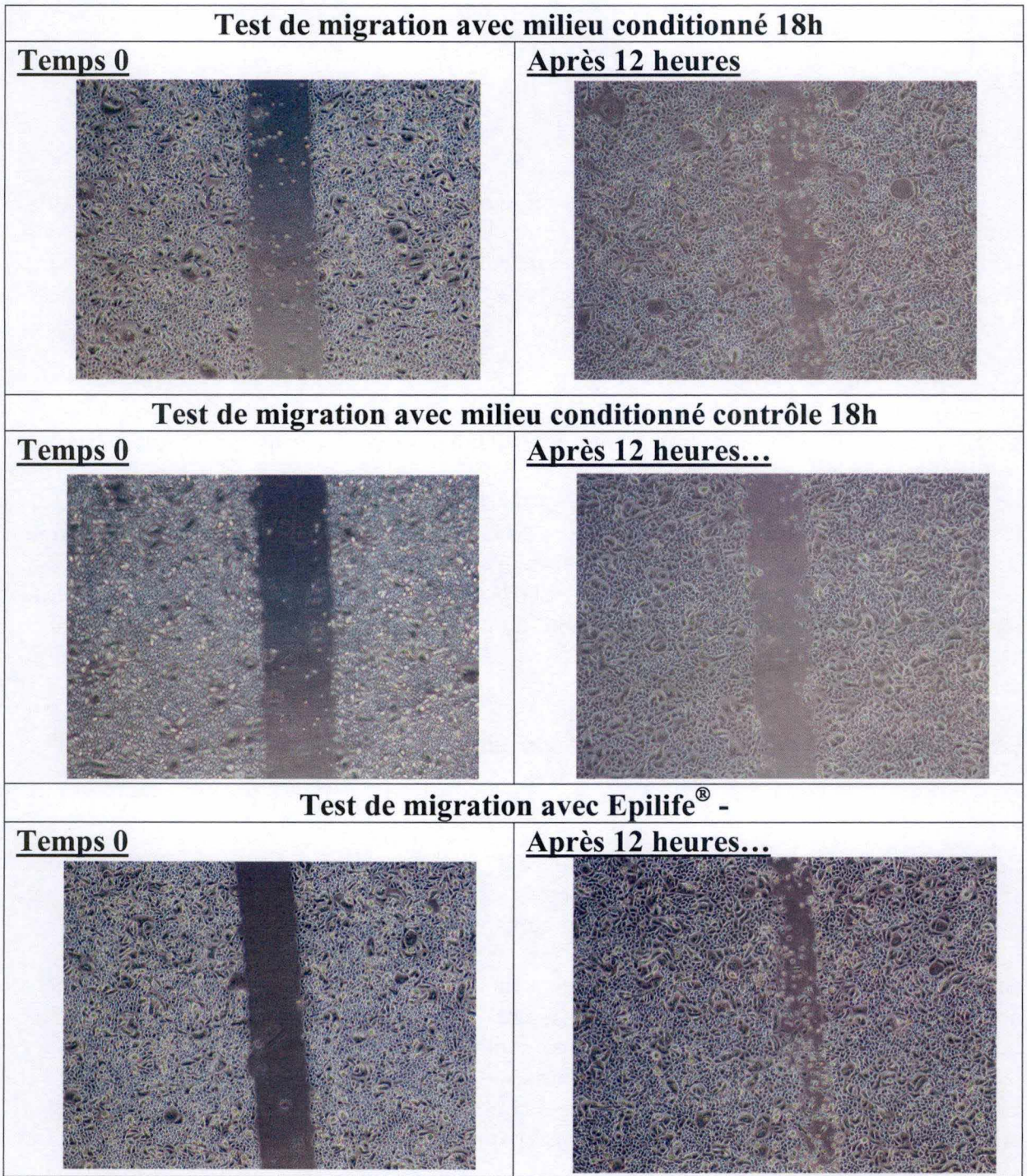
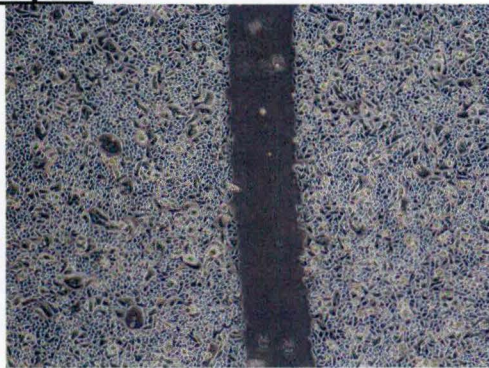


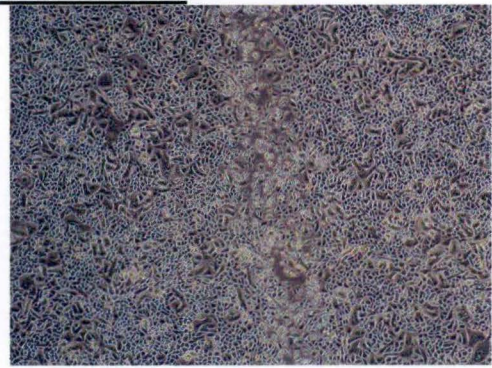
Figure 3-15: Test de migration à l'aide de "scratches" ou test de ré-épithélialisation in vitro. Les cultures de kératinocytes sont à 90% de confluence. A l'aide d'un tips bleu de 1ml, nous réalisons un "scratch" sur la boîte de culture et laissons les cellules migrer durant 12h.

Test de migration avec HB-EGF (10ng/ml)

Temps 0

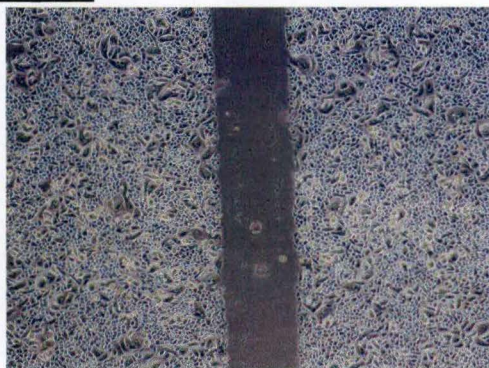


Après 12 heures

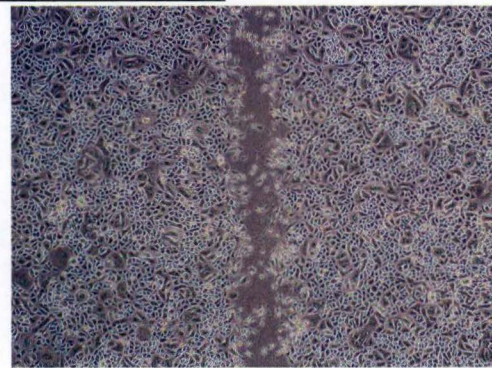


Test de migration avec HB-EGF (5ng/ml)

Temps 0

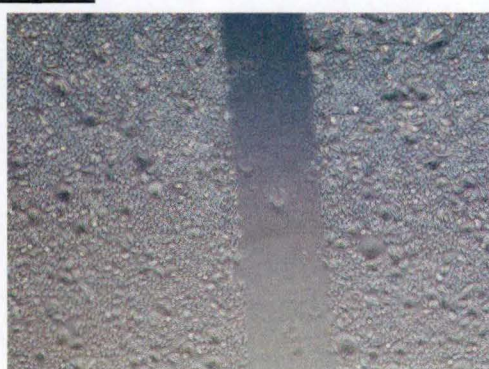


Après 12 heures...

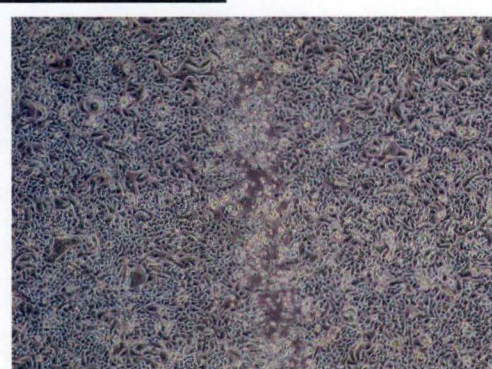


Test de migration avec EGF (10ng/ml)

Temps 0

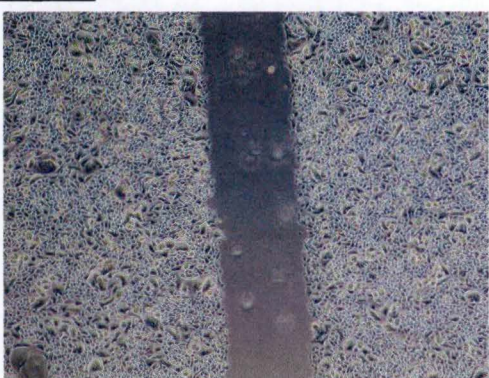


Après 12 heures...

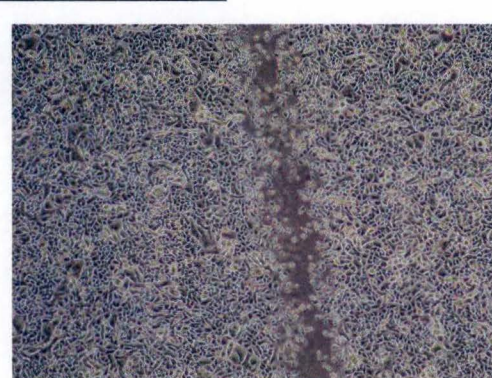


Test de migration avec AR (10ng/ml)

Temps 0



Après 12 heures...



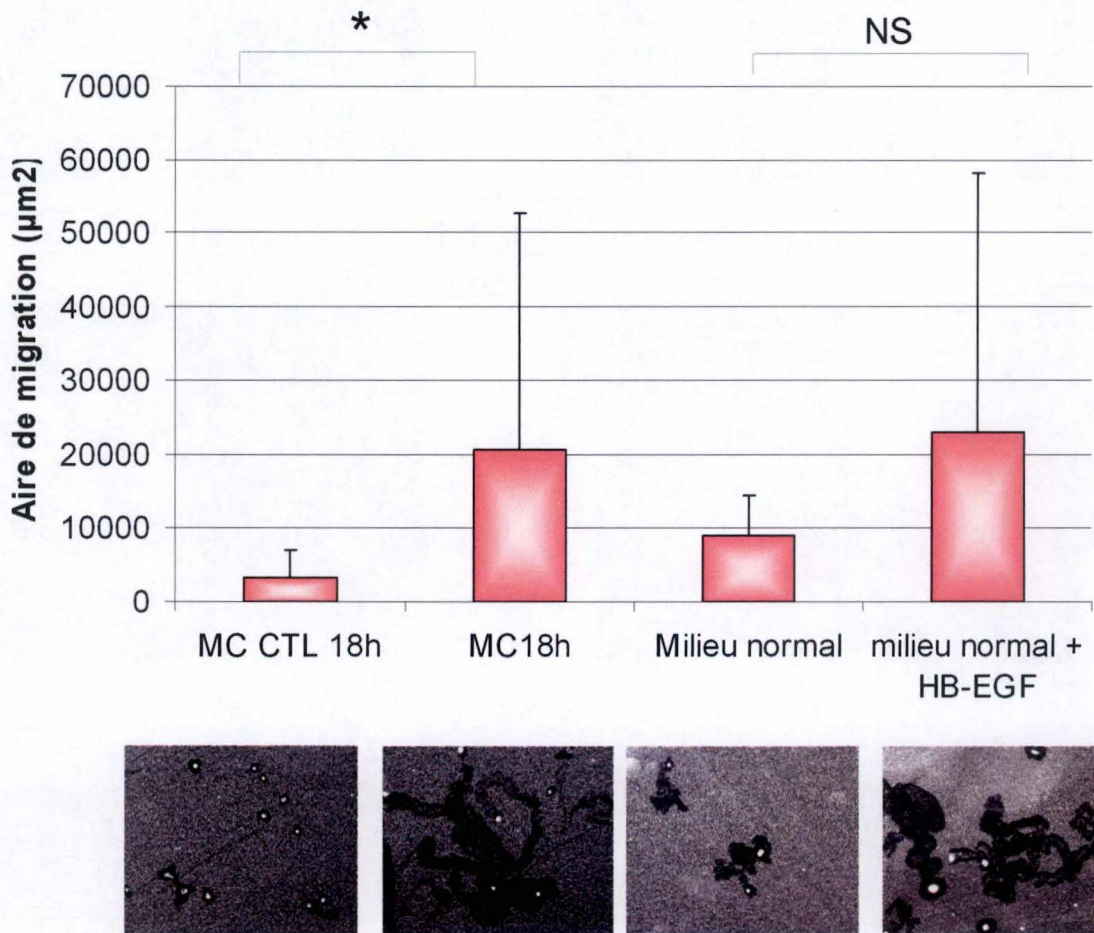


Figure 3-16: Test de migration sur or colloïdal.

L'expérience a été menée en ensemencant des kératinocytes à 1500 cellules /cm² sur de l'or colloïdal coâté au collagène I (15µg/ml). L'aire des traces phagocinétiques (µm²) a été quantifiée par le programme d'analyse AnalySIS. L'analyse statistique a été réalisé via un test de Student T en comparant le milieu conditionné pendant 18h (MC CTL 18h) avec le milieu conditionné pendant 18h suite à un traitement par la MβCD 1h (MC 18h) ainsi que le milieu normal (Epilife[®]-) avec le milieu normal contenant HB-EGF (10ng/ml).

n=15

NS: p>0,05

*: p<0,05

** : p<0,01

***: p<0,001

phagocytent ou déplacent les particules d'or et laissent alors une trace dite phagocinétique, qui apparaît noire en microscopie à fond noir.

5.3.2. Résultats :

Après 20h d'incubation, nous pouvons observer que les kératinocytes ne migrent pas (ou très peu) lorsqu'ils sont en présence de milieu conditionné contrôle 18h. La grande majorité des kératinocytes n'ont produit qu'une petite trace phagocinétique circulaire à peine plus large que la cellule (figure 3-16).

Par contre, le milieu conditionné 18h induit la migration cellulaire. Nous observons en effet que l'aire moyenne de migration passe d'environ $3500 \mu\text{m}^2$ (MC contrôle 18h) à $20500 \mu\text{m}^2$ (MC 18h). Remarquons que nous obtenons un écart-type assez élevé. Ceci est le résultat d'une grande hétérogénéité de réponses des kératinocytes considérés individuellement. En effet, tous les kératinocytes ne migrent pas de la même manière.

Lorsque nous incubons les cellules avec de l'Epilife[®], les kératinocytes migrent un peu plus ($8900 \mu\text{m}^2$) par rapport aux cellules incubées dans le milieu conditionné contrôle 18h, toutefois lorsque nous ajoutons le facteur de croissance rhHB-EGF (10ng/ml) (R&D), l'aire de migration augmente pour atteindre en moyenne $23000 \mu\text{m}^2$. Cependant, en raison de l'importance de l'écart-type, la différence entre la condition Epilife[®] et la condition Epilife[®] contenant HB-EGF n'est pas significative.

5.4. Conclusions :

Par ces trois expériences, nous avons testé l'activité des milieux conditionnés par la cinétique de traitement par la M β CD. Le milieu conditionné 18h (MC18h) possède une légère activité sur la phosphorylation de HER1 et la migration cellulaire. Toutefois, dans les expériences de migration, si nous comparons les conditions milieux conditionnés entre eux, nous constatons que le milieu conditionné 18h a un impact sur la migration des kératinocytes. Ces résultats suggèrent qu'il s'agit peut-être de HB-EGF. Cependant, d'autres expériences sont nécessaires pour le prouver. Il serait intéressant, dans les trois expériences, de bloquer l'action du facteur de croissance par un anticorps neutralisant HB-EGF et de tester ensuite le pouvoir prolifératif des milieux conditionnés.

6. Détection de proHB-EGF sur des coupes de peau brûlée :

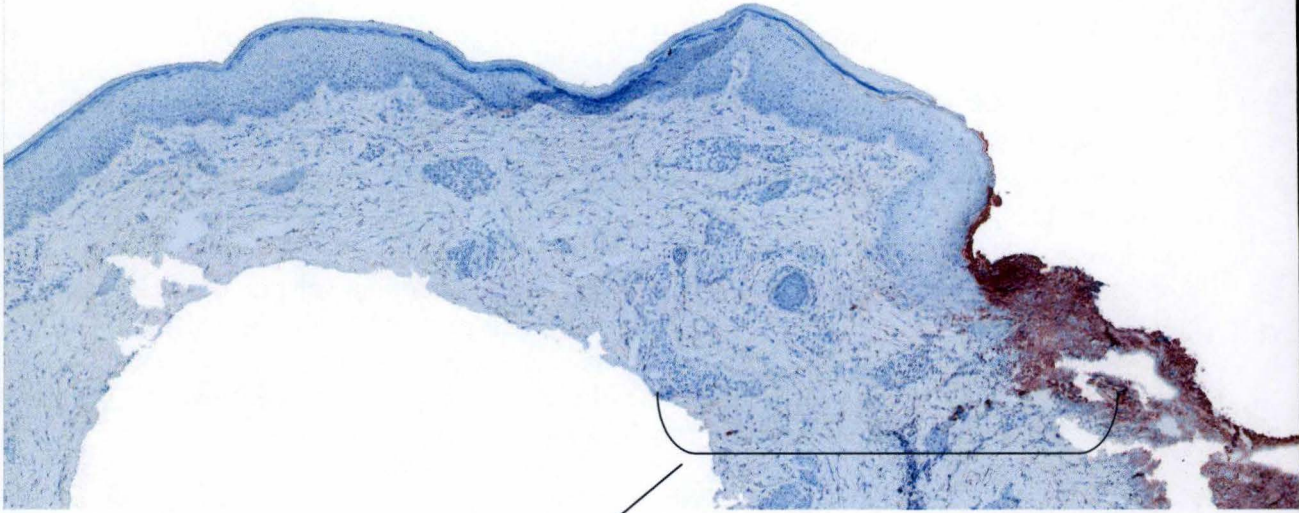
Les expériences précédentes ont confirmé que HB-EGF induit la migration des kératinocytes. Or, plusieurs études ont suggéré le rôle de HB-EGF dans la cicatrisation au niveau de la ré-épithélialisation (migration et prolifération).

Nous avons voulu détecter une production de HB-EGF *in vivo* lors de la cicatrisation épidermique. Pour ce faire, nous avons réalisé un marquage de proHB-EGF (12,5 $\mu\text{g/ml}$) sur un prélèvement de peau brûlée.

En utilisant un anticorps reconnaissant proHB-EGF sur des coupes de peau brûlée et à l'aide du système de détection LSAB, nous pouvons observer que le précurseur du facteur de croissance est bien présent en membrane des kératinocytes des couches suprabasales et aux alentours de la zone de ré-épithélialisation (3-17).

Remarquons que l'épiderme abîmé par la lésion d'origine thermique a sans doute "pompé" l'anticorps, ce qui se traduit par un marquage non spécifique au niveau de la lésion cutanée.

A.



Agrandissement de la zone sélectionnée ci-dessus :

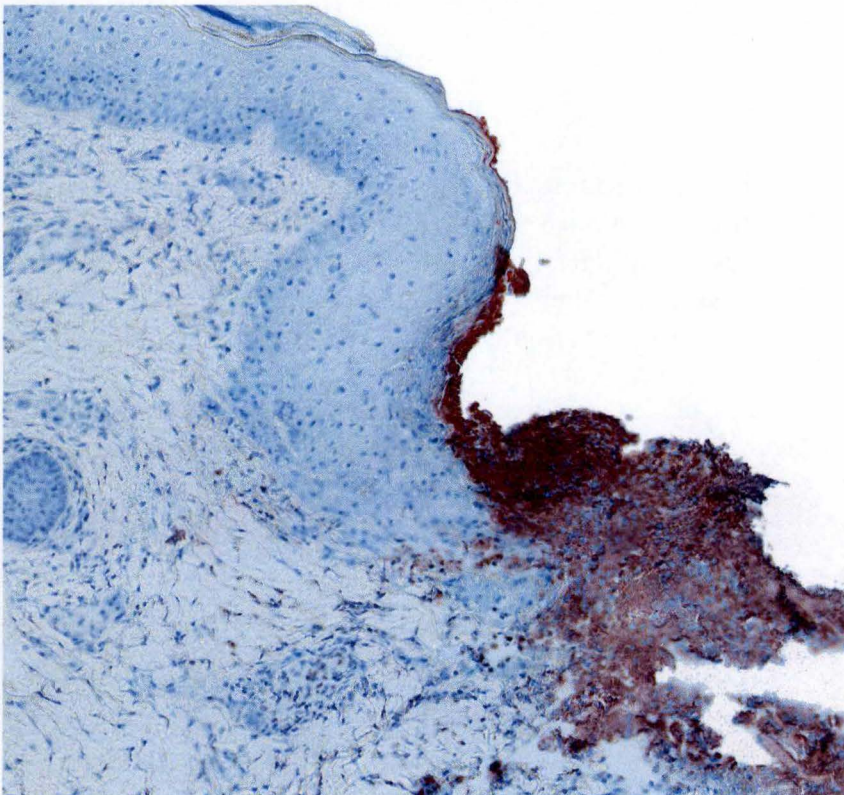
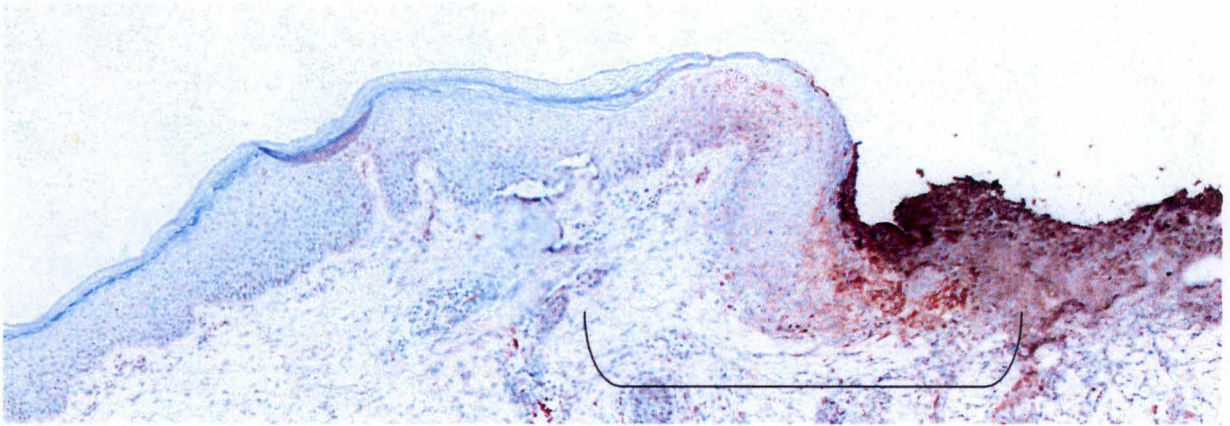


Figure 3-17 : Marquage de proHB-EGF sur une coupe de peau brûlée en cicatrisation. La détection se fait à l'aide du système LSAB.

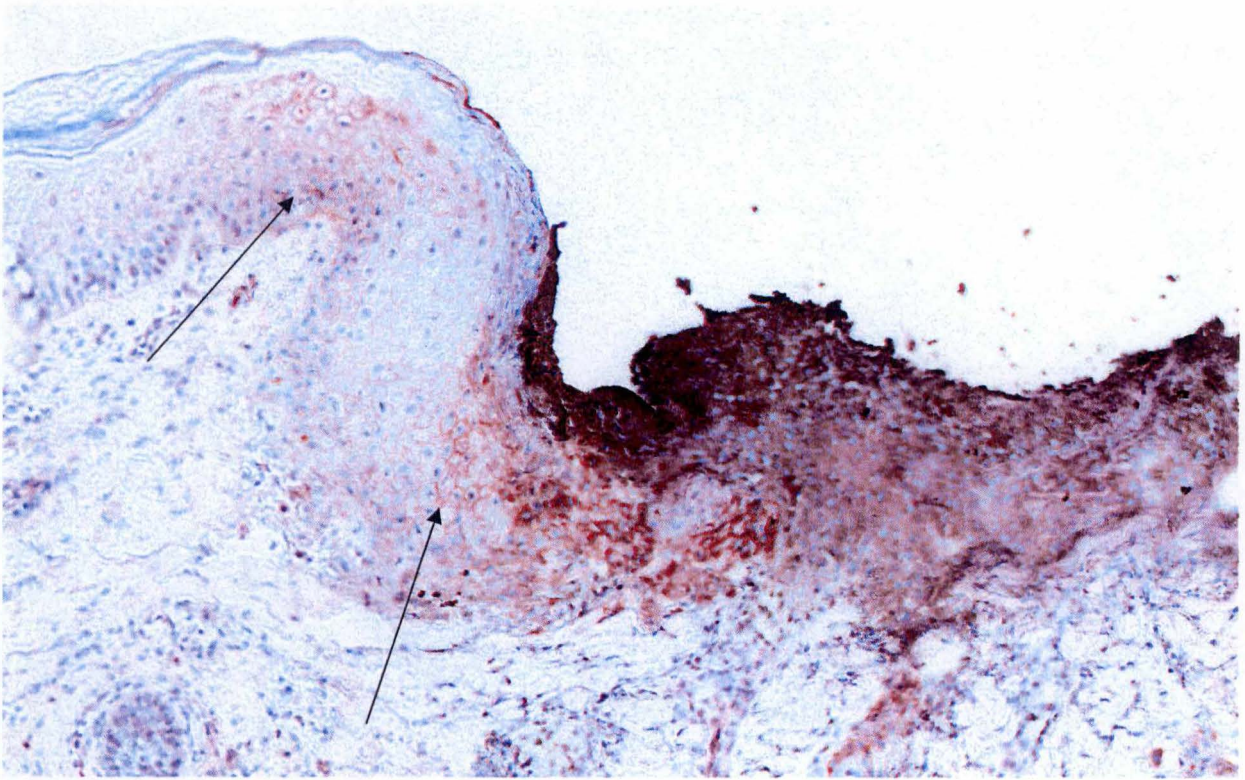
A : contrôle négatif (sans anticorps primaire).

B : détection de proHB-EGF (12,5 $\mu\text{g/ml}$) dans la marge de ré-épithélialisation indiquée par les flèches

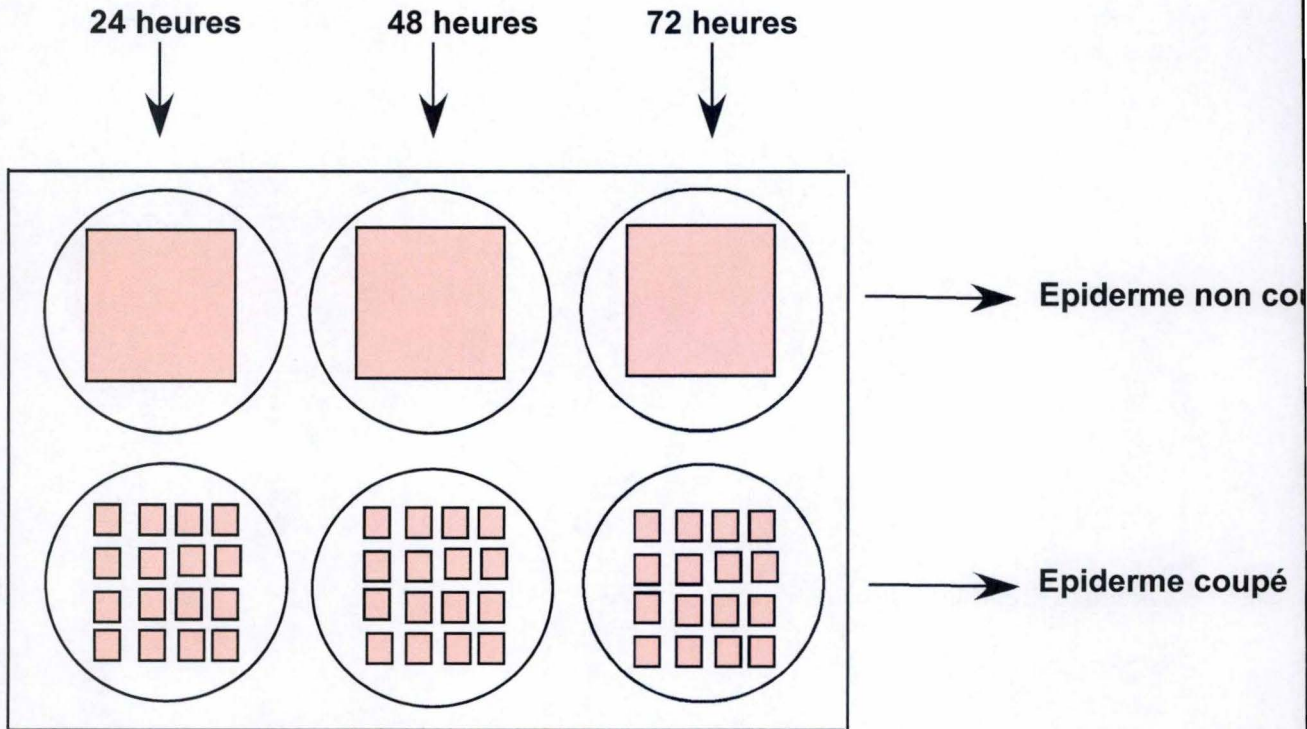
B.



Agrandissement de la zone sélectionnée ci-dessus :



A.



B.

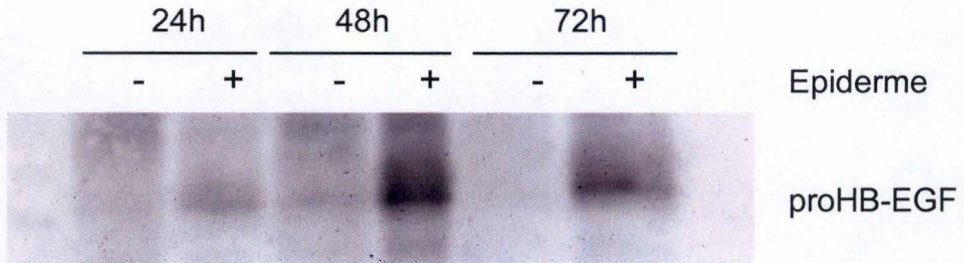


Figure 3-18 : A. Représentation schématique de l'expérience. 6 morceaux d'épiderme sont incubés dans de l'Epilife-. 3 de ces morceaux sont coupés. Les temps d'incubation sont de 24h, 48h et 72h. B. Détection de proHB-EGF sur les épidermes non coupés (-) et coupés (+). Nous observons une augmentation de proHB-EGF aux conditions 48 et 72h dans le cas de l'épiderme coupé.

La localisation épidermique d'une production de proHB-EGF proche d'une zone de ré-épithélialisation, confirme que ce facteur de croissance est produit par les kératinocytes lors du processus de cicatrisation.

7. Détection de l'expression du facteur de croissance HB-EGF dans des épidermes normaux et coupés :

Suite au résultat obtenu par le marquage de proHB-EGF sur une peau brûlée en cicatrisation, nous nous sommes alors demandés s'il était possible de détecter proHB-EGF dans un épiderme en culture d'organe. Etant donné que HB-EGF est produit lors de la cicatrisation (figure 3-17 et Marikovsky et al., 2003), nous avons alors coupé l'épiderme en 16 petits morceaux, de manière à multiplier la surface de contact par 4. Nous espérons ainsi augmenter la réponse cellulaire face à un stress, soit ici une blessure cutanée et donc voir l'expression de HB-EGF augmentée (figure 3-18)

7.1. Expérience :

La figure 3-18 représente l'expérience de manière schématique. Une partie des morceaux d'épiderme est coupée en 16 morceaux (épiderme coupé) tandis que l'autre partie reste intacte, de manière à comparer les deux conditions. Les temps d'incubation sont de 24h, 48h et 72h. L'expérience a été réalisée trois fois.

7.2. Résultats :

Après chaque temps d'incubation, le morceau d'épiderme non coupé et le morceau d'épiderme coupé sont récoltés et broyés dans du tampon de lyse à l'aide de l'Ultraturax. Ensuite chaque condition est centrifugée et les protéines sont congelées en attendant les conditions 48h et 72h. Les protéines sont ensuite dosées et analysées par la technique du Western blot. Les résultats se trouvent à la figure 3-18.

Nous observons que lorsque l'épiderme n'est pas coupé et est incubé 24h dans du milieu Epilife[®]-, il y a une légère expression de proHB-EGF, puis celle-ci diminue. Cette expression est probablement due au stress de la culture d'organe. Après 48h d'incubation, nous détectons une expression augmentée de proHB-EGF dans le cas de l'épiderme coupé et à 72h cette expression diminue légèrement.

7.3. Conclusions :

De par cette expérience, nous avons montré que les kératinocytes semblent bien produire proHB-EGF lors d'une blessure cutanée. Cette expression est probablement due au stress cellulaire mais n'ayant pas analysé les MAPK, nous ne savons dire quelles MAPK entre en jeu. Stoll et al. (2002), ont démontré que l'activation de la MAPK ERK était une étape importante dans la signalisation menant à l'expression de gènes dans la cicatrisation cutanée. Cependant, ils ont montré également que d'autres voies intervenaient également et ont suggéré notamment la voie de la MAPK p38 (Stoll et al., 2002).

DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES

Notre étude s'est penchée sur l'analyse de l'expression du facteur de croissance HB-EGF en réponse au stress chez les kératinocytes épidermiques à confluence.

1. HB-EGF est exprimé suite à une déplétion en cholestérol, un stress oxydatif ou un traitement par un ester de phorbol (TPA)

Dans ce travail, nous avons montré que les kératinocytes traités par le TPA, la M β CD (avec ou sans lovastatine) et l'H₂O₂ induisent une expression de proHB-EGF. Nous avons également démontré que lors du traitement par la M β CD, cette expression dépend notamment de la MAPK p38 (ou MAPK de stress). En effet, l'inhibition de celle-ci par PD169316 diminue l'expression de proHB-EGF. En 2002, Stoll et al. ont montré que l'expression de HB-EGF était dépendante de l'activation de la MAPK ERK, tout en n'écartant pas l'implication des autres voies de signalisation telles p38, JAK/STAT et PI3K dans la régulation de l'expression du facteur de croissance HB-EGF (Stoll et al., 2002). Pour préciser ces régulations, une perspective intéressante serait dès lors d'inhiber les voies JAK/STATS et PI3K de manière à analyser leur éventuelle implication dans l'expression de HB-EGF. De plus, en combinant nos résultats et ceux de Stoll, il serait utile d'inhiber les deux MAPK p38 et ERK lors de nos traitements pour établir leurs responsabilités respectives.

En 2004, Fischer et al., ont suggéré qu'un stress oxydatif, chez des cellules Cos-7 et des cellules de carcinome humain, active les MAPK p38, ce qui permet l'expression de HB-EGF et permet en plus l'expression et l'activation de métalloprotéases qui vont cliver proHB-EGF en membrane. Fischer suggère que HB-EGF clivé permet ensuite d'activer le récepteur de l'EGF (Fischer et al., 2004). Les résultats que nous avons obtenus lors de la cinétique de traitement par la M β CD chez des kératinocytes épidermiques humains, nous font penser que proHB-EGF est probablement clivé après 18h de récupération dans du milieu normal Epilife®-. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait pouvoir détecter HB-EGF dans le milieu. Malheureusement, des expériences réalisées précédemment au laboratoire n'ont pu détecter, pour des raisons encore inconnues, la présence du facteur de croissance HB-EGF dans un milieu conditionné. Fischer et al. ont montré que chez les cellules COS-7, les stress oxydatifs induisent le clivage de proHB-EGF en HB-EGF. Pour le prouver, ils ont détecté les facteurs libérés à l'aide d'une précipitation à l'acide trichlorique (TCA) puis d'une révélation par immunoblot sur un gel d'électrophorèse tricine-SDS. Il serait intéressant d'utiliser cette technique pour détecter HB-EGF dans les milieux conditionnés suite à une cinétique de traitements par la M β CD ou H₂O₂.

Les résultats obtenus au laboratoire ainsi que les articles de Stoll et de Fischer, nous permettent d'émettre le modèle exposé à la figure 4.1. Chez les kératinocytes humains, un stress cellulaire par la M β CD, le TPA ou l'H₂O₂, permet d'activer la MAPK p38. Cette activation va ensuite induire l'expression de HB-EGF et de plus, nous émettons l'hypothèse que cela va permettre l'expression de métalloprotéases. Ensuite, une fois activées, ces métalloprotéases pourraient aller cliver proHB-EGF en membrane et libérer le facteur de croissance dans le milieu. Il est possible que HB-EGF se lie ensuite sur son récepteur et permette son activation. Nous proposons, au vu de nos résultats concernant l'activation de p38 en réponse à une cinétique de traitements par la M β CD, que cette dernière étape d'activation de EGFR participe à l'activation de la voie des MAPK p38. Il est plus que probable que la liaison du facteur de croissance active d'autres voies de signalisation mais celles-ci restent à déterminer.

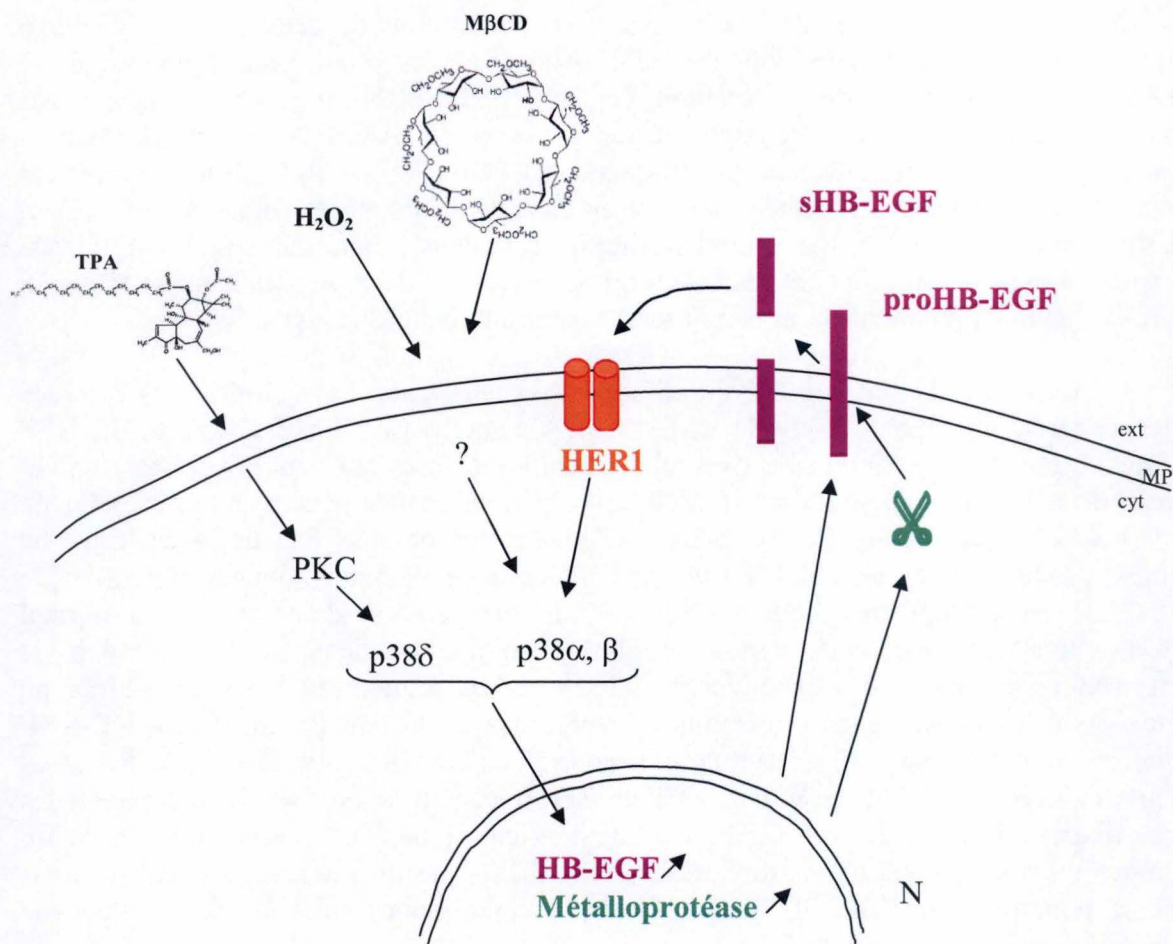


Figure 4.1. : Modèle représentant les voies de signalisation engendrées lors d'un stress par le TPA, la MβCD et H₂O₂.

Ce modèle soulève bon nombre de questions. Premièrement, nous savons qu'un traitement par le TPA induit l'activation de p38 par l'intermédiaire de l'activation de la PKC δ (Eckert et al., 2003). Cependant, nous ne savons pas de quelle manière un traitement par la M β CD (avec ou sans lovastatine) et un traitement par H₂O₂ activent p38. En 2002, Cheng et al., ont montré que les RhoGTPases régulent de manière négative l'activité des MAPK p38 (Cheng et al., 2002). Il est possible que l'activation de la MAPK p38 en cas d'un traitement par la M β CD se fasse par l'intermédiaire des RhoGTPases. La M β CD est en effet connue pour perturber les lipids rafts (ou microdomaines lipidiques) en enlevant le cholestérol membranaire. Or les rhoGTPases sont associées en membrane et il est dès lors possible que la déplétion en cholestérol perturbe et inactive les RhoGTPases, ce qui permettrait l'activation de la MAPK p38. Dans le cas d'un stress oxydatif, certaines protéines kinases, notamment des MAPKKK, par exemple ASK1, sont activées par H₂O₂ par un mécanisme d'inhibition de phosphatases qui est dû à une oxydation de résidus cystéines se trouvant dans la poche catalytique de la phosphatase (Rhee et al. 2000). La MAPKKK ASK1 activée peut ensuite, par l'intermédiaire de MEK, activer p38 et JNK (Rhee et al., 2000). De plus, il semble qu'un stress par H₂O₂ active différentes isoformes des PKC en induisant la phosphorylation des résidus tyrosines de la kinase (Rhee et al., 2000). Or, nous savons que la MAPK p38 peut être activée par PKC dans les kératinocytes (Eckert et al., 2003).

Le mécanisme d'activation de la MAPK p38 doit donc encore être élucidé pour la compréhension de notre modèle. De même, l'étude des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de HB-EGF pourrait s'avérer également intéressante.

Enfin, il reste à découvrir les métalloprotéases impliquées dans le clivage de proHB-EGF en HB-EGF soluble chez les kératinocytes humains. L'utilisation de siRNA spécifiques pourrait être un moyen de déterminer ces métalloprotéases. En effet, Fischer et al., ont montré que l'inhibition des métalloprotéases empêche la libération dans le milieu de proHB-EGF en HB-EGF chez les cellules COS 7 et de plus, Stoll et al. montrent que cette inhibition par l'inhibiteur BB2516 diminue la phosphorylation de Erk et l'expression de HB-EGF (Fischer et al., 2004 ; Stoll et al., 2002). Par conséquent, ces résultats nous indiquent les changements à détecter lors d'une inhibition des métalloprotéases. L'inhibition des métalloprotéases par les transfections de siRNA spécifiques nous permettraient de connaître la ou les métalloprotéases impliquées dans le "shedding", dans le cas du kératinocyte humain. De plus, il est probable que celles-ci soient différentes suivant les traitements infligés aux kératinocytes. Enfin, en bloquant la libération du facteur de croissance dans le milieu, nous pourrions analyser la phosphorylation du récepteur HER1, de manière à voir si HB-EGF une fois libéré se lie bel et bien sur son récepteur. Parallèlement, nous pourrions tester les milieux conditionnés en présence d'inhibiteurs des métalloprotéases sur la migration cellulaire et sur l'activation du récepteur HER1, afin d'évaluer les conséquences des inhibitions sur les propriétés de ces milieux.

2. HB-EGF et le psoriasis :

Le psoriasis est une maladie de la peau qui affecte environ 1 à 3 % de la population mondiale. Cette pathologie est caractérisée par une hyperprolifération et une différenciation altérée des kératinocytes. Pour lutter contre cette maladie, différents traitements existent (corticostéroïdes, rétinoïdes, ...) mais sont malheureusement insuffisants. Bien que l'origine de la maladie ne soit pas encore bien élucidée (origine immunitaire ou dérégulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire du kératinocyte), on sait qu'une expression aberrante de l'amphiréguline (AR) et de HB-EGF cause l'hyperprolifération des

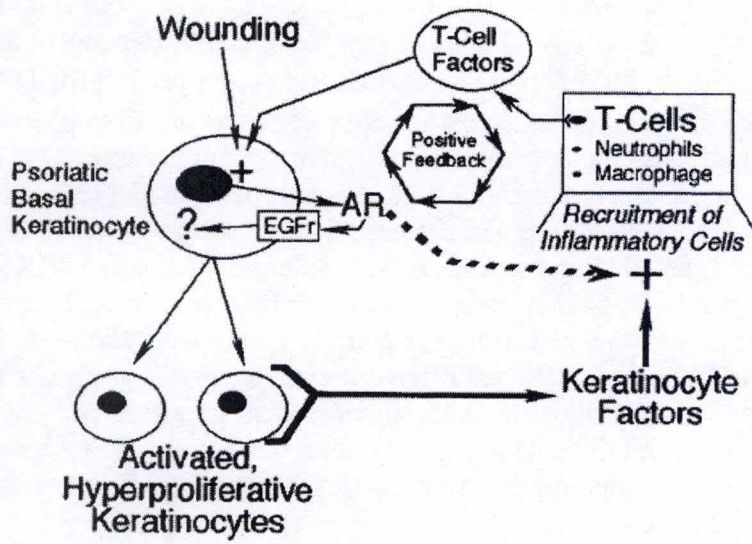


Figure 4.2. : Modèle représentant le mécanisme d'autorégulation positif dans la pathologie du psoriasis (Piepkorn et al., 1998)

kératinocytes. En 1998, Piepkorn et al., ont proposé qu'il existait un mécanisme d'autorégulation positif qui fait intervenir des cellules inflammatoires amplifiant encore la synthèse de HB-EGF et AR (figure 4.2) (Piepkorn et al., 1998). L'auteur suggère que l'induction autocrine des facteurs de croissance HB-EGF et AR soit associée avec le recrutement des cellules inflammatoires et que les cellules T recrutées par HB-EGF et AR activent la signalisation autocrine des kératinocytes, selon un feedback positif (ou boucle de rétroaction positive).

En 2001, Sawa et al., proposèrent un traitement contre le psoriasis à l'aide d'inhibiteurs de métalloprotéases (Sawa et al., 2001). En effet, un traitement par les métalloprotéases empêche le shedding de proHB-EGF et donc diminue les effets d'hyperprolifération.

Au vu de nos résultats, on pourrait envisager de tester des traitements contenant des inhibiteurs de p38. Nous avons en effet montré qu'une inhibition de p38 diminue l'expression de proHB-EGF, ce qui pourrait dès lors diminuer l'hyperprolifération rencontrée dans la pathologie. De la même manière, selon les résultats de Stoll, un traitement inhibant la MAPK ERK aurait peut-être un effet sur la prolifération cellulaire. Actuellement, des inhibiteurs de p38 sont utilisés en essais cliniques.

Les rétinoïdes sont des agents qui sont utilisés lors de traitements dans différentes pathologies dont le psoriasis, comme nous l'avons mentionné. Toutefois, paradoxalement, les rétinoïdes induisent la prolifération épidermique *in vivo*. Le mécanisme n'est pas encore très bien compris mais on pense que HB-EGF et l'amphiréguline jouent un rôle important. En 1998, Stoll et Elder ont montré *in vitro* qu'un traitement par les rétinoïdes induit la prolifération des kératinocytes grâce à l'activation du récepteur de l'EGF par son ligand HB-EGF (Stoll et Elder, 1998). Récemment Rittié et al., ont montré qu'un traitement par les rétinoïdes augmente l'expression de proHB-EGF et de l'amphiréguline, permet le clivage des précurseurs en membrane (ou "shedding") et de plus active la MAPK ERK1/2 dans des peaux humaines *in vivo*. De plus, ce groupe de recherche a montré que le blocage de l'activation du récepteur de l'EGF diminue la croissance cellulaire dans la peau humaine *in vivo* (Rittié et al., 2006). Leurs résultats confirment donc *in vivo* ce que Stoll et Elder avaient découvert en 1998.

3. HB-EGF et la cicatrisation cutanée ;

La cicatrisation cutanée est un processus qui requiert une coordination précise de la ré-épithélialisation, de la réparation dermique et de l'angiogenèse (Singer et Clark, 1999). La ré-épithélialisation dépend de la migration et de la prolifération des kératinocytes épidermiques qui sont principalement régulées par les facteurs de croissance de la famille EGF dont HB-EGF. Le facteur de croissance HB-EGF joue probablement un rôle important dans la cicatrisation, puisqu'il a été retrouvé dans les fluides sécrétés lors d'une blessure cutanée chez le porc (Marikovskiy et al., 1993). De plus, Mc Carthy a montré que ce facteur se trouve aux bords des marges de ré-épithélialisation sur des peaux brûlées humaines ce qui confirme les résultats que nous avons obtenus (Mc Carthy et al., 1994). Enfin, HB-EGF induit la prolifération et la migration des kératinocytes en se liant à son récepteur et en l'activant (Hashimoto, 2000 ; Iwamoto et Mekada, 2000 ; Davis-Fleischer et Besner, 1998). De plus, nos résultats ont montré qu'il y a une induction de l'expression de proHB-EGF lorsque nous coupons un épiderme en plusieurs morceaux de manière à augmenter la longueur des bordures blessées. En 2005, Shirakata et al., ont testé *in vivo* le rôle de HB-EGF lors la ré-épithélialisation en générant des souris knock-out pour HB-EGF et ont montré que la

migration des kératinocytes lors de la ré-épithélialisation est inhibée mais pas la prolifération (Shirakata et al., 2005). Shirakata et al., proposent donc que HB-EGF serait le facteur important dans l'étape de ré-épithélialisation en agissant sur la migration cellulaire mais pas sur la prolifération (Shirakata et al., 2005). Ce résultat est assez surprenant vu le nombre d'études montrant le caractère proprolifératif de HB-EGF. Hashimoto et al., ont en effet montré que HB-EGF est un facteur impliqué lors de la croissance autocrine des kératinocytes (Hashimoto et al., 1994). La cicatrisation étant un processus fort complexe, il est possible que les données *in vitro* ne soient pas applicables *in vivo*. Le résultat de Shirakata nous suggère quand même qu'il serait intéressant de réaliser un test clonal sur des kératinocytes mis en présence de HB-EGF et parallèlement nous pourrions également tester les milieux conditionnés par la cinétique de traitement par la M β CD. Ces milieux conditionnés nous avaient en effet montré une induction de la migration cellulaire lors des tests de "scratch" et sur l'or colloïdal.

De plus, nous pourrions générer des souris surexprimant HB-EGF, de la même manière que l'a fait Cook en 1997, mais pour l'amphiréguline (Cook et al., 1997). Les expériences de Cook ont permis de montrer l'importance de l'amphiréguline lors de psoriasis. Le phénotype de la souris transgénique ressemble en effet fortement à la pathologie du psoriasis. En générant des souris surexprimant HB-EGF, nous pourrions non seulement découvrir l'impact de ce facteur de croissance sur la prolifération mais de plus, confirmer son impact dans la pathologie du psoriasis. Puisque l'extraction du cholestérol induit HB-EGF, nous pourrions aussi analyser si les souris qui ne produisent pas de cholestérol (Mirza et al., 2006) ont une production modifiée d'HB-EGF.

4. Conclusions

Les stress que nous avons étudiés dans notre travail semblent à priori tous différents. Nous avons induit une déplétion en cholestérol par la M β CD, un stress oxydatif par H₂O₂ et enfin, nous avons traité les kératinocytes par le TPA. Tous ces traitements semblent en fait perturber la membrane plasmique des kératinocytes épidermiques. La M β CD est connue en effet pour disrupter les microdomaines lipidiques (ou lipid rafts); or, l'intégrité de ceux-ci est indispensable pour la survie des kératinocytes. En effet, Bang et al. (2005) ont montré que l'extraction de cholestérol membranaire par la M β CD dans les kératinocytes induit la mort cellulaire par l'apoptose. Dans le cas d'un traitement par le peroxyde d'hydrogène, une peroxydation membranaire a probablement lieu, ce qui risque aussi de perturber la membrane plasmique. Enfin, le TPA est connu pour activer la PKC en mimant le diacylglycérol en membrane, ce qui pourrait induire des changements dans la structure de la membrane plasmique. Ces changements sont-ils liés à l'activation de p38 et d'HB-EGF ?

En conclusion, il serait intéressant de poursuivre une étude plus générale sur les stress cellulaires. Nous pourrions essayer de voir si d'autres stress cellulaires (provoquant ou non des perturbations membranaires) induisent l'expression de HB-EGF et de plus préciser les effets de HB-EGF sur les kératinocytes au niveau de la migration cellulaire, la prolifération cellulaire (à l'aide d'un test clonal) et de l'activation du récepteur de l'EGF. Enfin, il serait intéressant de préciser si cette réponse concerne non seulement les kératinocytes épidermiques mais aussi d'autres types cellulaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Albrecht-Buehler, G. Phagokinetic tracks of 3T3 cells: parallels between the orientation of track segments and of cellular structures which contain actin or tubulin. *Cell* **12**, 333-9 (1977)
- Bang, B., Gniadecki, R. & Gajkowska, B. Disruption of lipid rafts causes apoptotic cell death in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* **14**, 266-72 (2005)
- 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)
- Chen, X. & Resh, M. D. Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **277**, 49631-7 (2002)
- Cheng, H. et al. Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol. *J Cell Physiol* **192**, 234-43 (2002)
- Cohen, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* **237**, 1555-62 (1962)
- Cook, P. W. et al. A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol Cell Biol* **11**, 2547-57 (1991)
- Cook, P. W., Pittelkow, M. R. & Shipley, G. D. Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors. *J Cell Physiol* **146**, 277-89 (1991)
- Davis-Fleischer, K. M. & Besner, G. E. Structure and function of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). *Front Biosci* **3**, d288-99 (1998)
- De Potter, I. Y., Poumay, Y., Squillace, K. A. & Pittelkow, M. R. Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation. *Exp Cell Res* **271**, 315-28 (2001)
- Eckert, R. L. et al. p38 Mitogen-activated protein kinases on the body surface--a function for p38 delta. *J Invest Dermatol* **120**, 823-8 (2003)
- Eckert, R.L. J.F. Crish & Robinson Nancy, A. The Epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Review* **77**, 397-424 (1997)
- Elenius, K., Paul, S., Allison, G., Sun, J. & Klagsbrun, M. Activation of HER4 by heparin-binding EGF-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation. *Embo J* **16**, 1268-78 (1997)
- Fischer, O. M., Hart, S., Gschwind, A., Prenzel, N. & Ullrich, A. Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **24**, 5172-83 (2004)

- Gibbs, S. et al. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair Regen* **8**, 192-203 (2000)
- Goishi, K. et al. Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity. *Mol Biol Cell* **6**, 967-80 (1995)
- Haase, I., Evans, R., Pofahl, R. & Watt, F. M. Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci* **116**, 3227-38 (2003)
- Harris, R. C., Chung, E. & Coffey, R. J. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* **284**, 2-13 (2003)
- Hashimoto, K. Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Dermatol Sci* **24 Suppl 1**, S46-50 (2000)
- Hashimoto, K. et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J Biol Chem* **269**, 20060-6 (1994)
- Higashiyama, S., Lau, K., Besner, G. E., Abraham, J. A. & Klagsbrun, M. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J Biol Chem* **267**, 6205-12 (1992)
- Higashiyama, S., Abraham JA, Miller JC, Klagsburn M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Sciences* **251**, 936-9 (1991)
- Hirata, M. et al. Identification of serum factor inducing ectodomain shedding of proHB-EGF and sStudies of noncleavable mutants of proHB-EGF. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 915-22 (2001)
- Iwamoto, R. & Mekada, E. Heparin-binding EGF-like growth factor: a juxtacrine growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 335-44 (2000)
- Iwamoto, R. & Mekada, E. ErbB and HB-EGF signaling in heart development and function. *Cell Struct Funct* **31**, 1-14 (2006)
- Izumi, Y. & al. A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Embo J* **17**, 7260-72 (1998)
- Jans, R., Atanasova, G., Jadot, M. & Poumay, Y. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J Invest Dermatol* **123**, 564-73 (2004)
- Jorissen, R. N. et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* **284**, 31-53 (2003)
- Kyriaskis, J. & Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Review* **81**, 807-69 (2001)

- Lambert, S., Vind-Kezunovic, D., Karvinen, S. & Gniadecki, R. Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J Invest Dermatol* **126**, 954-62 (2006)
- Martin, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81 (1997)
- McCarthy, D. W. et al. Production of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) at sites of thermal injury in pediatric patients. *J Invest Dermatol* **106**, 49-56 (1996)
- Mirza et al. DHCR24 Gene Knockout Mice Demonstrate Lethal Dermopathy with differentiation and maturation defects in the epidermis. *J Invest Dermatol*, **126** (3), 638-47 (2006)
- Miyagawa, J. et al. Localization of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **95**, 404-11 (1995)
- Nishi, E. & Klagsbrun, M. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) is a mediator of multiple physiological and pathological pathways. *Growth Factors* **22**, 253-60 (2004)
- Ono, K. & Han, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**, 1-13 (2000)
- Peus, D. et al. UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* **112**, 751-6 (1999)
- Piepkorn, M., Pittelkow, M. R. & Cook, P. W. Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. *J Invest Dermatol* **111**, 715-21 (1998)
- Piepkorn, M., Lo Q, 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**, 114-120 (1994)
- Pike, L. J. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 260-73 (2005)
- 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)
- 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)
- Raab, G. & Klagsbrun, M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta* **1333**, F179-99 (1997)

- Raab, G. & al. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* **122**, 637-45 (1996)
- Rhee, S. G., Bae, Y. S., Lee, S. R. & Kwon, J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* **2000**, PE1 (2000)
- 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)
- Rittie, L., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J. J. & Fisher, G. J. Retinoid-induced epidermal hyperplasia is mediated by epidermal growth factor receptor activation via specific induction of its ligands heparin-binding EGF and amphiregulin in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* **126**, 732-9 (2006)
- Robinson, M. J. & Cobb, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 180-6 (1997)
- Sawa, M. et al. New strategy for antedrug application: development of metalloproteinase inhibitors as antipsoriatic drugs. *J Med Chem* **45**, 930-6 (2002)
- Shirakata, Y. et al. Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci* **118**, 2363-70 (2005)
- Singer, A. J. & Clark, R. A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* **341**, 738-46 (1999)
- Stoll, S., Garner, W. & Elder, J. Heparin-binding ligands mediate autocrine epidermal growth factor receptor activation in skin organ culture. *J Clin Invest* **100**, 1271-81 (1997)
- Stoll, S. W. & Elder, J. T. Retinoid regulation of heparin-binding EGF-like growth factor gene expression in human keratinocytes and skin. *Exp Dermatol* **7**, 391-7 (1998)
- Stoll, S. W. & Elder, J. T. Differential regulation of EGF-like growth factor genes in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 214-21 (1999)
- Stoll, S. W., Kansra, S. & Elder, J. T. Metalloproteinases stimulate ErbB-dependent ERK signaling in human skin organ culture. *J Biol Chem* **277**, 26839-45 (2002)
- Stoll, S. W., Kansra, S. & Elder, J. T. Keratinocyte outgrowth from human skin explant cultures is dependent upon p38 signaling. *Wound Repair Regen* **11**, 346-53 (2003)
- Takazaki, R., Shishido, Y., Iwamoto, R. & Mekada, E. Suppression of the biological activities of the epidermal growth factor (EGF)-like domain by the heparin-binding domain of heparin-binding EGF-like Growth Factor. *J Biol Chem* **279**, 47335-43 (2004)
- Takenobu, H., Yamazaki, A., Hirata, M., Umata, T. & Mekada, E. The stress- and inflammatory cytokine-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is mediated by p38 MAPK, distinct from the 12-O-

tetradecanoylphorbol-13-acetate- and lysophosphatidic acid-induced signaling cascades. *J Biol Chem* **278**, 17255-62 (2003)

Tokumaru, S. et al. Ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands is required for keratinocyte migration in cutaneous wound healing. *J Cell Biol* **151**, 209-20 (2000)

Umata, T. et al. A dual signaling cascade that regulates the ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J Biol Chem* **276**, 30475-82 (2001)

Wang, X. & Paller. Lipids Rafts: Membrane Triage Centers. *J Invest Dermatol* **126**, 951-953 (2006)

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

Weskamp, G., Kratzschmar, J., Reid, M.S. and Blobel, C.P. MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J Cell. Biol.* **132**, 717-726 (1996)

Wong, J.W. et al. Ultraviolet B-mediated phosphorylation of the small heat shock protein HSP27 in human keratinocytes. *J invest Dermatol* **115**, 427-34 (2000)