



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude de l'implication des enzymes DHCR24 et DHCR7 dans la physiologie des kératinocytes épidermiques humains

Ruban, Emily

Award date:
2009

[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'IMPLICATION DES ENZYMES DHCR-24 et DHCR-7 DANS LA
PHYSIOLOGIE DES KERATINOCYTES EPIDERMiques HUMAINS.**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire**

Emily RUBAN

Janvier 2009

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

Etude de l'implication des enzymes DHCR-24 et DHCR-7 dans la physiologie des kératinocytes épidermiques humains

RUBAN Emily

Résumé

Les lipid rafts, en tant que plate-forme de la signalisation cellulaire, sont impliqués dans la physiologie des kératinocytes épidermiques. Le cholestérol, constituant membranaire essentiel, participe au maintien de la structure de ces lipid rafts. Nous savons qu'une extraction du cholestérol membranaire induit des modifications des voies de signalisation des kératinocytes suggérant que le cholestérol est nécessaire au bon fonctionnement physiologique du kératinocyte. Par conséquent, une inhibition d'enzymes nécessaires à la synthèse du cholestérol peut également perturber la physiologie du kératinocyte. Il se trouve que l'absence fonctionnelle (suite à une mutation génétique) de DHCR-24 ou de DHCR-7, deux enzymes de la voie de biosynthèse du cholestérol, provoque l'apparition de pathologies cutanées graves.

Dans un premier temps, nous avons donc essayé d'inhiber DHCR-24 et DHCR-7 à l'aide de composés pharmacologiques. Nous n'observons que de faibles modifications des voies de signalisation MAPK p38 et AKT avec ces inhibiteurs utilisés seuls. L'association de ces inhibiteurs avec un stress oxydatif ne nous apporte pas plus de réponses.

Ensuite, une approche d'inhibition par ARN interférent (ARNi) a été tentée. Après les étapes de mises au point nécessaires, nous observons que les siRNA ciblant les enzymes DHCR-24 et DHCR-7 semblent induire un arrêt de la prolifération cellulaire tout en empêchant la mise en place du mécanisme de différenciation épidermique.

Au vu des résultats obtenus, nous préconisons d'employer l'inhibition par siRNA après avoir effectué une extraction de cholestérol membranaire afin de pouvoir observer d'avantages de modifications de la physiologie du kératinocyte.

Mémoire de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

Promoteur: Y. Poumay

Co-promoteur : M. Héryn

Remerciements :

« Ce n'est pas dans la connaissance qu'est le bonheur, mais dans l'acquisition de la connaissance »

Edgar Allan Poe, Tales of the Grotesque and Arabesque, The Power of Words.

Après presque une année à travailler sur ce mémoire, il me paraît important de remercier les personnes qui m'ont aidé dans l'acquisition d'un bout de cette connaissance.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon promoteur Monsieur le Professeur Yves Poumay pour m'avoir permis d'effectuer ce mémoire au sein de son laboratoire ainsi que pour ses conseils et recommandations. Un grand merci également pour les corrections rapides et éclairées des nombreuses versions de ce mémoire.

Je remercie également mon co-promoteur Monsieur le Professeur Michel Hérin pour son accueil.

A HUGE THANKS à mon tuteur Frédéric Minner pour m'avoir épaulée (voir supportée à certains moments ;-)) tout au long de cette année. Merci d'avoir pris le temps de répondre à mes innombrables questions et remarques et pour m'avoir initiée à de nombreuses techniques de labo, y compris la technologie inédite de R.I.F.T.L (Recherche Intensive de Fred à Travers tous les Labos ;-)).

J'adresse également ma reconnaissance à :

Ma coloc' de bureau Séverine Giltaire pour son aide et son énergie communicative. J'ai finalement décidé de te laisser la garde de l'agrafeuse, prends-en bien soin ;-)) et encore merci pour les Schocobons.

Conny Mathay pour avoir toujours répondu à mes questions soudaines et inopinées (désolée pour les fréquents « chapardages » de chaise de bureau ;-)).

Auréli Frankart pour sa gentillesse et pour avoir supporté mes envahissements de paillasse réguliers ;-))

Sylviane Lambert pour ses réponses claires et pour avoir toujours répondu présente lors de mes nombreux appels à l'aide (bonbonnes qui sifflent, recherche d'agrafes...)

Françoise Herphelin pour sa bienveillance et pour m'avoir guidé dans mes premiers pas dans le laboratoire.

Valérie De Glas et Daniel Van Vlaender pour leur aide et leur disponibilité.

Patrick Glesner pour son aide informatique, notamment lorsque mon mac me faisait de mauvaises blagues.

Aux autres membres du laboratoire : Madame Annie Degen pour sa bonne humeur et son énergie légendaire, Caroline Canon pour son sourire quotidien et Madame Michèle Lerclercq-Smekens.

Si la partie laboratoire était le côté pile, il y avait bien entendu un côté face que je remercie tout aussi chaleureusement :

Mes confrères cobayes biologistes (se reconnaîtront les principaux intéressés ;-)) pour avoir partagé toutes ces années laborieuses et celle-ci en particulier.

Mon arrière-garde anti-prise de tête : Nico, RV, Alex et Sammy, pour tout simplement vous être montré présents lorsqu'il le fallait au cours de toutes ces années.

Enfin, last but not least : mes parents pour m'avoir permis d'aller le plus loin possible dans mes études. Un merci tout particulier à mon daddy pour m'avoir soutenue envers et contre tout (voir parfois contre tous) et pour vouloir me protéger à tout prix dans la tempête que nous traversons depuis maintenant 4 ans.

Pour terminer, j'aimerais adresser mes remerciements aux membres de mon jury pour leur lecture et pour l'attention portée à ce travail.

Table des Matières

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 La couche basale	2
1.2.1.2 La couche épineuse	2
1.2.1.3 La couche granuleuse	2
1.2.1.4 La couche cornée	2
1.2.2 Le derme	3
1.2.3 L'hypoderme	3
1.3 Processus de prolifération, migration et différenciation	3
1.3.1 Etapes clés de la différenciation épidermique	3
1.3.2 Les marqueurs de différenciation	4
1.3.3 Le contrôle de la physiologie des kératinocytes : les voies de signalisation et les lipid rafts	4
2. Le cholestérol membranaire	5
2.1 Le cholestérol et son importance au niveau des membranes	5
2.1.1 Définition et structure	5
2.1.2 Cholestérol et différenciation	5
2.1.3 Cholestérol, signalisation et lipid rafts	6
2.2 La voie de biosynthèse du cholestérol	6
2.2.1 DHCR-24	7
2.2.2 DHCR-7	8
2.3 Les maladies cutanées liées à un défaut dans la biosynthèse du cholestérol	8
2.3.1 La desmostérolose	8
2.3.2 Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS)	9
3. La technologie de l'ARN interférant	10
3.1 Définition et Historique	10
3.2 Principe et Mécanismes de l'interférence ARN	11
3.2.1 Première étape : phase d'assemblage	11
3.2.2 Deuxième étape : phase effectrice	11
4. Objectif du mémoire	12

Matériel et Méthode

1. Culture de kératinocytes épidermiques humains	13
1.1 Matériel :	13
1.2 Méthode :	13
1.2.1 Cultures primaires à partir de prélèvements de peau	13
1.2.2 Cultures secondaires	14
1.2.3 Cultures tertiaires	15

2. Traitement des Kératinocytes.....	15
2.1 Matériel :	15
2.2 Méthode :	15
2.2.1 Inhibiteurs pharmacologiques.....	15
2.2.2 Stress Oxydatif au peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	15
2.2.3 Test de viabilité MTT	15
3. Analyse des protéines par Western blot.....	16
3.1 Matériel :	16
3.2 Méthodes :	17
3.2.1 Extraction de protéines.....	17
3.2.2 Electrophorèse et transfert.....	17
3.2.3 Marquage et détection des protéines d'intérêt.....	17
3.2.4 Révélation	17
4. Analyse de l'expression de gènes par RT-PCR quantitative (q-PCR)	18
4.1 Extraction des ARN messagers (ARNm)	18
4.1.1 Matériel :	18
4.1.2 Méthode :	18
4.2 Transcription Inverse.....	18
4.2.1 Matériel :	19
4.2.2 Méthode :	19
4.3 PCR quantitative (PCR en temps réel)	19
4.3.1 Principe :	19
4.3.2 Matériel :	20
4.3.3 Méthode :	20
5. La technologie de l'ARN interférant synthétique (Short Interfering RNA ou siRNA)	21
5.1 Matériel :	21
5.2 Méthode :	21
5.2.1 Optimisation de la technique de transfection	21
5.2.2 Transfection des cultures cellulaires	21

Résultats

1. Analyse d'un traitement de 17 heures sur la signalisation et sur la différenciation des kératinocytes.	22
1.1 Expérience.....	22
1.2 Observations (voir Figure III-1).....	22
1.2.1 Analyses Protéiques	22
1.3 Conclusion	23
2. Analyse cinétique de la signalisation cellulaire chez les kératinocytes après une incubation de 5 minutes à 2 heures avec des inhibiteurs pharmacologiques.....	23
2.1 Expérience.....	23
2.2 Observations (voir Figure III-2).....	23

3. Association d'inhibiteurs pharmacologiques TR et BM15766 avec un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène H₂O₂.	24
3.1 Expérience.....	24
3.2 Observations (voir Figure III-4).....	24
3.3 Conclusion	25
4. Comparaison de l'impact des inhibiteurs pharmacologiques associés au stress oxydatif sur des périodes allant de 20 minutes à 4 heures.	25
4.1 Expérience.....	25
4.2 Observations (voir Figure III-6).....	26
4.2.1 Phosphorylation de p38	26
4.2.2 Production de HB-EGF.....	26
4.3 Conclusion	26
5. Comparaison d'une incubation inférieure à 20 minutes d'inhibiteurs pharmacologiques couplés à un stress oxydatif.	26
5.1 Expérience.....	26
5.2 Observations (voir Figure III-8).....	27
5.2.1 Phosphorylation de p38	27
5.2.2 Déphosphorylation de AKT.....	27
5.3 Conclusion	27
6. Comparaison des effets dus aux inhibiteurs pharmacologiques des effets dus au stress oxydatif après 5 minutes d'exposition.	28
6.1 Observations.....	28
6.2 Conclusion	28
7. Analyse de l'inhibition des enzymes DHCR-7 et DHCR-24 par la technique d'ARN interférents.....	28
7.1 Mises au point	29
7.1.1 Importance des conditions de culture.....	29
7.1.2 Choix d'un agent de transfection	29
7.1.3 Choix du siRNA le plus efficace.....	30
7.2 Estimation de l'efficacité de la transfection.....	30
7.3 Impact sur les autres gènes	31
7.3.1 Les marqueurs de différenciation	31
7.3.2 Les marqueurs de prolifération	31
7.3.3 La production de HB-EGF.....	31
7.4 Conclusion	32

Discussion, conclusion et perspectives

1. Discussion	33
2. Conclusion.....	35
3. Perspectives	35

Liste d'abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
7-DHC	7-déhydrocholestérol
ADNc	ADN complémentaire
APP	Amyéloïde Peptide Precursor
APS	Ammonium Persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
A β	Amyéloïde peptide β
BACE	β -sécrétase
BM15766	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiasol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)
BPE	Bovine Pituitary Extract
CAT	Cellule Amplificatrice Transitoire
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
cPLA2	Phospholipase A2
Ct	Cycle treshold
dFCS	dialysed Fœtal Calf Serum
DHCR-24	Déhydrocholestérol-réductase-24
DHCR-7	Déhydrocholestérol-réductase-7
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dsRNA	double strand RNA
DTT	DL-Dithiothréitol
EDTA	Ethylène Diamine Tetra Acétate
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPSK	Epithélium Pavimenteux Stratifié Kératinisé
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAD	Flavine Adénine Dinuléotide
FIL	Filaggrine
GDP	Guanosine diphosphate
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HKGS	Human Keratinocyte Growth Supplements
HMG-CoA réductase	Hydroxyméthyl glutaryl coenzyme A réductase
HRP	Horse Radish Peroxidase
INV	Involucrine
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase
KBM	Keratinocytes Basal Medium
KGM	Keratinocyte Growth Medium
KRT	Kératine
LOR	Loricrine
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase

MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MTT	4-(2-(4-(4-cinnamyl)pipérazine-7-yl)etyl)-benzoic acid)
M β CD	Méthyl- β -cyclodextrine
NAK	Normal Abdominal Keratinocyte
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
qPCR	PCR quantitative
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
ROS	Reactive Oxygen Species
RQ	Relative Quantification
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
seladin-1	Selective Alzheimer disease indicator-1
siRNA	short interfering RNA
SLOS	Smith-Lemli-Opitz Syndrome
T17	Trypsine 0,17%
T25	Trypsine 0,25
TGM-1	Transglutaminase-1
TR	Triparanol
UVA	Ultraviolets A
UVB	Ultraviolets B

Introduction

1. La peau

1.1 FONCTIONS DE LA PEAU

La peau est l'organe qui recouvre la surface externe du corps humain. Chez un adulte, elle présente une surface comprise entre 1,8 et 2m² et son épaisseur varie de 0,5 mm sur les paupières à 4 mm sur les talons.

La peau remplit de nombreuses fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie du corps humain. L'une de ces fonctions est la barrière qu'elle procure au reste de l'organisme face à l'environnement extérieur. La peau constitue une barrière physique efficace contre les agents bactériens et viraux présents dans l'environnement mais également contre les agressions chimiques et physiques. Elle joue un rôle crucial dans le phénomène de thermorégulation : la présence de tissu adipeux sous-cutané limite les pertes de chaleur tandis que les glandes sudoripares dermiques permettent d'éviter que la température interne de l'organisme ne s'élève de manière trop importante. Cela permet de garder les fluides corporels ainsi que les électrolytes à l'intérieur de l'organisme. La peau permet également à l'organisme d'interagir avec son environnement ; elle contient différents récepteurs sensoriels qui seront sensibles soit à la pression (mécanorécepteurs), à la chaleur (thermorécepteurs) ou à la douleur (nocicepteurs). Enfin, la synthèse de la vitamine D s'effectue en partie au niveau de la peau par photo-réaction (Holick, 1988).

1.2 STRUCTURE DE LA PEAU

Sur un plan structural, la peau est constituée de 3 parties superposées, avec de haut en bas l'épiderme, le derme et l'hypoderme. (Voir Figure I-1).

1.2.1 *L'épiderme*

L'**épiderme** est un épithélium stratifié pavimenteux kératinisé (EPSK) et il constitue la couche la plus externe de la peau, celle qui est en contact avec l'environnement. Il se régénère tous les 28 jours et mesure en moyenne 0,1 mm d'épaisseur. L'épiderme n'est pas vascularisé, son approvisionnement en nutriments et en oxygène est assuré par le derme sous-jacent grâce au phénomène de diffusion.

L'épiderme contient 4 types cellulaires :

- Les mélanocytes : cellules responsables de la pigmentation et de la photoprotection de la peau
- Les cellules de Merkel, localisées au niveau de la couche basale et qui jouent le rôle de mécanorécepteurs
- Les cellules de Langerhans qui sont des cellules dendritiques. Elles font office de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dans l'épiderme et remplissent donc un rôle immunitaire
- Les kératinocytes : population cellulaire majoritaire (environ 90%)

L'épiderme comprend plusieurs couches que l'on pourra distinguer selon la morphologie et la composition des cellules qui les composent.

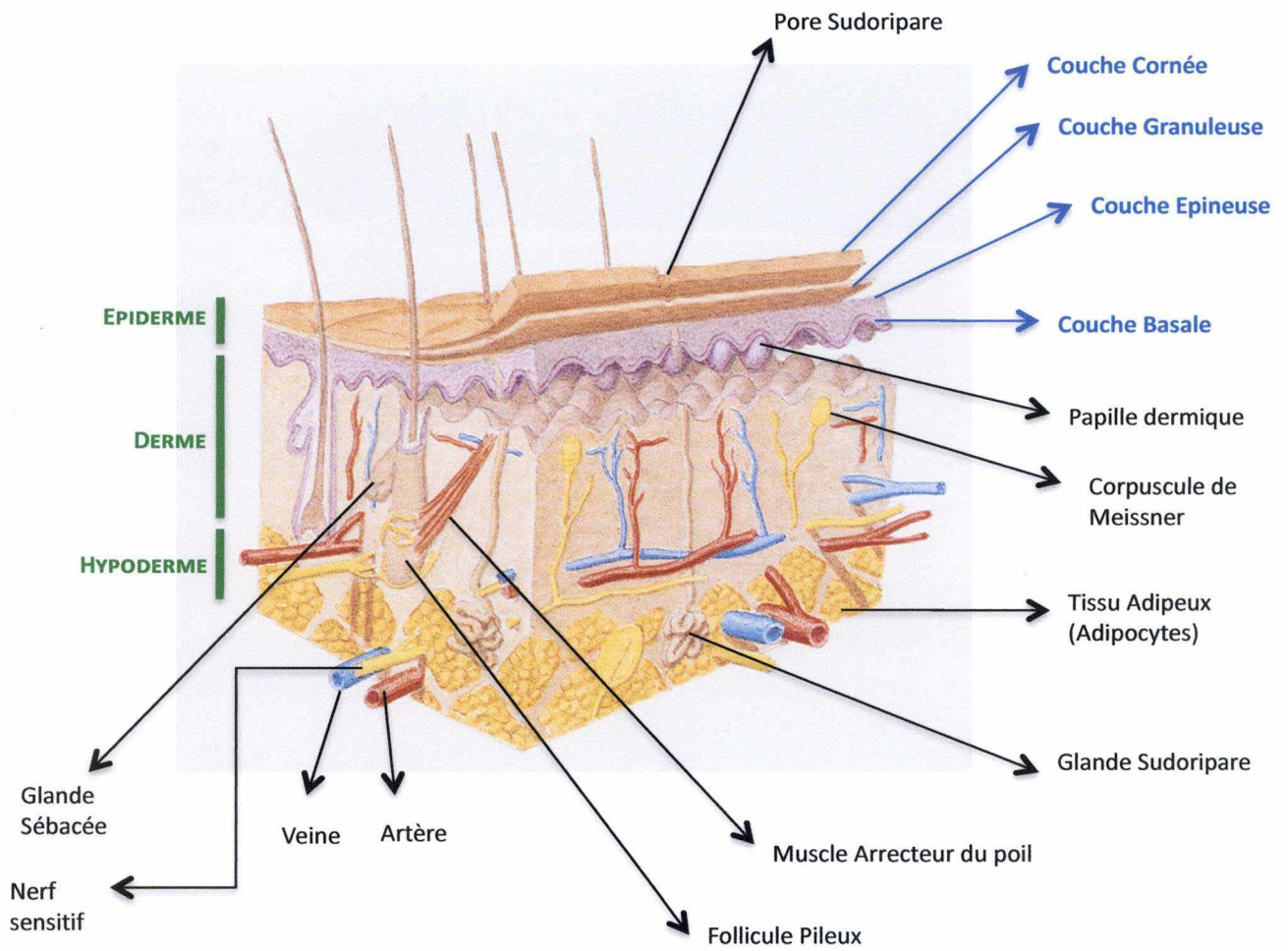


Figure I-1 : Illustration de la peau humaine.

1.2.1.1 La couche basale

La **couche basale** (ou *stratum basale*) est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle se compose d'une seule assise de kératinocytes cylindriques non différenciés et attachés au derme au niveau de la jonction épidermo-dermique par des jonctions d'ancrage que l'on appelle hémidesmosomes et contacts focaux.

Les kératinocytes de cette couche basale se caractérisent notamment par l'expression au niveau des filaments intermédiaires, de 2 types de kératines : 5 et 14 (KRT5 et KRT14).

On peut distinguer dans la couche basale 2 sous-populations de kératinocytes : les cellules souches et les **cellules amplificatrices transitoires (CATs)**. Les cellules souches possèdent un potentiel de prolifération illimité. Elles sont donc responsables de la production de nouvelles cellules souches ainsi que de nouvelles CATs. (Watt F.M, 2001). Ces cellules CATs sont destinées à se détacher de la membrane basale et à subir le processus de différenciation.

1.2.1.2 La couche épineuse

La **couche épineuse** (ou *stratum spinosum*) comporte quant à elle entre 3 et 5 couches de kératinocytes. Ceux-ci sont polyédriques et plus grands que ceux de la couche basale et comportent des filaments intermédiaires de kératine. Ces cellules sont reliées entre elles par de nombreux desmosomes. Observé au microscope, ce système d'ancrage confère aux cellules un contour cellulaire en « épines », aspect à l'origine du nom de cette couche. Au fur et à mesure qu'ils évoluent vers la couche granuleuse, les kératinocytes s'aplatissent. Les organites des kératinocytes de la couche épineuse sont fonctionnels et sont responsables de la synthèse active de protéines. Dans cette couche, l'expression de KRT5 et de KRT14 est réprimée et ce sont principalement KRT1 et KRT10 qui caractérisent les kératinocytes à ce niveau.

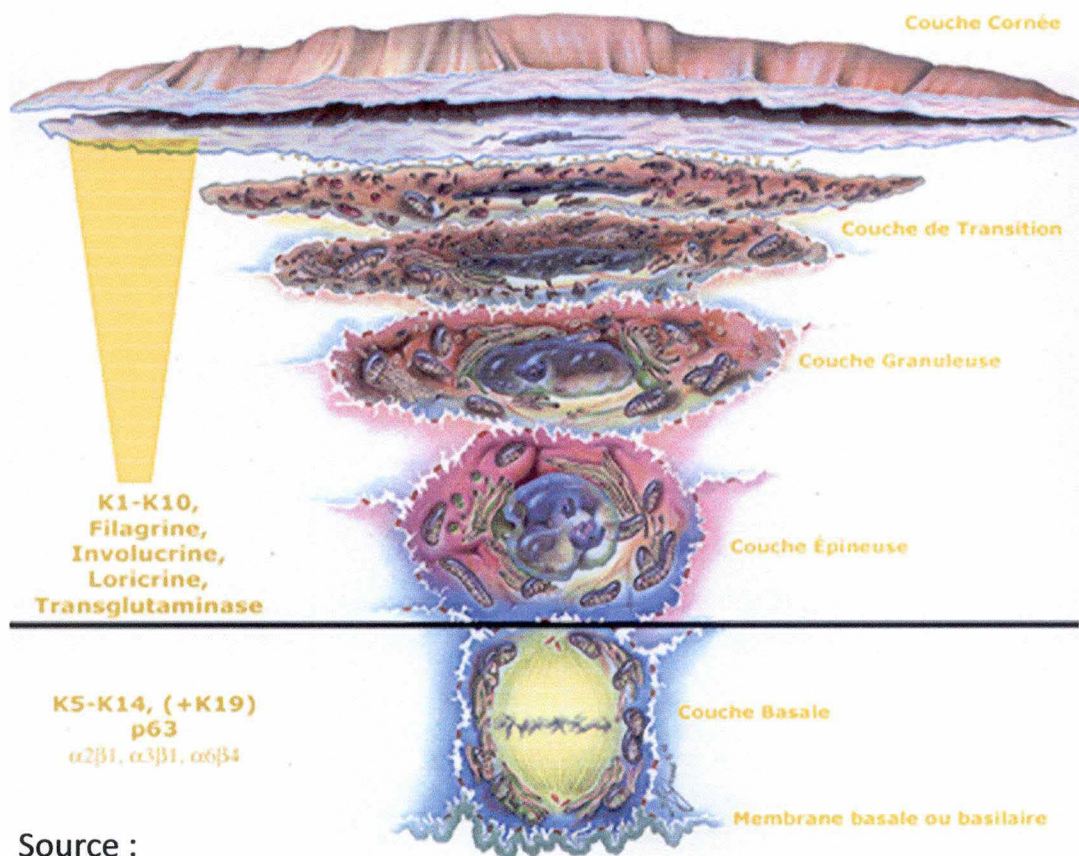
1.2.1.3 La couche granuleuse

La **couche granuleuse** (ou *stratum granulosum*) est formée de 1 à 2 assises de kératinocytes aplatis et correspond à la dernière couche vivante de l'épiderme. Cette couche doit son nom au contenu des cellules en grains de kératohyaline. Ce sont de petits corps basophiles arrondis qui contiennent de la profilaggrine, protéine précurseur de la filaggrine, protéine qui intervient dans le phénomène de kératinisation épidermique. Les kératinocytes de cette couche contiennent aussi des « corps lamellaires » ou « corps d'Odland » qui contiennent des céramides et des phospholipides, lesquels interviendront dans l'imperméabilisation de la couche cornée.

1.2.1.4 La couche cornée

La **couche cornée** (*stratum corneum*) est une couche inerte composée de kératinocytes morts, les cornéocytes, qui proviennent de la couche sous-jacente. Elle est formée d'un assemblage dense et compact de 15 à 20 couches de cornéocytes bourrés de filaments intermédiaires de kératine et de protéines qui leur sont associées. La couche cornée a pour rôle d'isoler l'organisme de son environnement en formant une barrière contre les agressions externes tout en évitant la déshydratation de l'organisme. Cette fonctionnalité est assurée par le processus de kératinisation amorcé dans les couches précédentes et qui se déroule en 4 étapes :

- pycnose du noyau
- destruction enzymatique des organites et agrégation des filaments intermédiaires par la filaggrine libérée depuis les grains de kératohyaline
- formation de l'enveloppe cornée suite à l'activation de l'enzyme transglutaminase-I (TGM-I)



Source :
Université de Laval

Figure I-2 : Illustration du mécanisme de différenciation épidermique.
Le relevé des marqueurs de différenciation épidermique permet la distinction des couches épidermiques.

- fusion des corps d'Odland avec la membrane plasmique et déversement de leur contenu lipidique dans l'espace intercellulaire. Cela crée un « ciment » entre les cornéocytes qui permet l'imperméabilisation de la couche cornée.

Ensuite, par l'activation d'hydrolases acides, les desmosomes vont se rompre et les cornéocytes vont se détacher de la surface de l'épiderme. Ce processus invisible et continu est appelé desquamation.

1.2.2 *Le derme*

Le **derme**, la seconde couche de la peau, est aussi la plus épaisse. Il est séparé des kératinocytes de l'épiderme par une lame basale. Le derme comprend des fibres de collagène et des fibres élastiques ainsi que de nombreuses annexes cutanées telles que des vaisseaux sanguins, des glandes, des nerfs et des follicules pileux. L'association de fibres de collagène et de fibres élastiques confère à la peau sa résistance, son extensibilité, c'est-à-dire sa capacité à s'étirer et son élasticité, sa capacité à reprendre sa forme initiale après un étirement.

1.2.3 *L'hypoderme*

L'**hypoderme** est la couche la plus profonde de la peau. Situé sous le derme, ce tissu conjonctif est riche en lobules remplis de cellules graisseuses, les adipocytes. Ces lobules graisseux sont séparés par des cloisons conjonctivo-élastiques qui renferment des vaisseaux et des nerfs de plus gros calibre. L'hypoderme assure un rôle de protection thermique et mécanique mais il sert aussi de réserve énergétique.

1.3 PROCESSUS DE PROLIFERATION, MIGRATION ET DIFFERENCIATION

L'épiderme est un tissu soumis à un renouvellement constant. En effet, la desquamation des kératinocytes morts de la couche cornée nécessite le renouvellement de la population cellulaire de l'épiderme afin de garantir l'homéostasie du tissu. Ce renouvellement est assuré par la prolifération cellulaire.

1.3.1 *Etapes clés de la différenciation épidermique*

La différenciation épidermique commence par une division asymétrique de cellules souches épidermiques au niveau de la couche basale. Cette division conduit à la production de cellules amplificatrices transitoires (CATs). Bien qu'ayant un potentiel de prolifération limité, ces CATs possèdent une capacité de division plus rapide que les cellules souches. Ce sont les cellules qui proviennent des CATs qui, une fois au niveau des couches supérieures de l'épiderme, commencent à subir un processus de différenciation épidermique. Ce phénomène s'accompagne de l'arrêt de l'expression de KRT5 et de KRT14 tandis que l'expression de KRT1 et KRT10 sera induite.

Depuis la base jusqu'à la surface de l'épiderme, le kératinocyte subit un processus de différenciation qui induit la stratification et la kératinisation de l'épiderme. Cette différenciation s'accompagne d'une migration cellulaire qui voit passer le kératinocyte de la couche basale vers les couches épineuses et granuleuses avant de constituer une cellule de la couche cornée où se produit le phénomène de desquamation (voir Figure I-2).

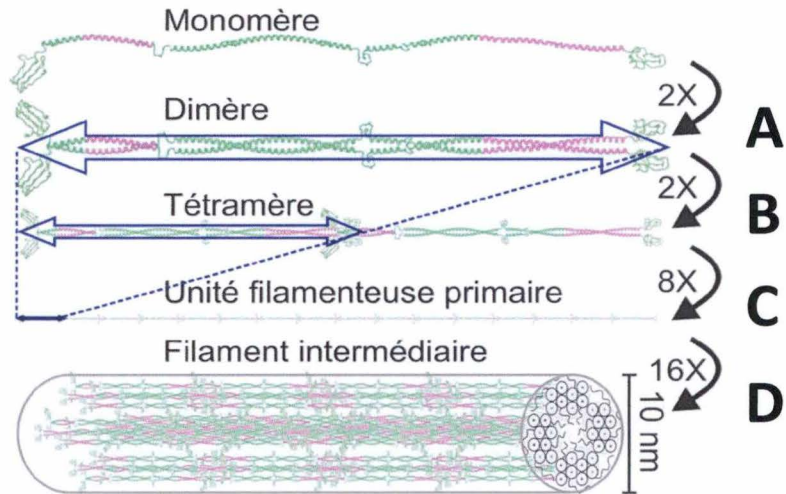


Figure I-3 : Illustration de la formation des filaments intermédiaires de kératine.

Deux monomères (A) s'associent pour former un dimère (B). Deux dimères s'assemblent pour constituer un tétramère (C). Le filament intermédiaire de kératine résulte finalement de l'association de huit tétramères (D).

(Source : Université de Laval).

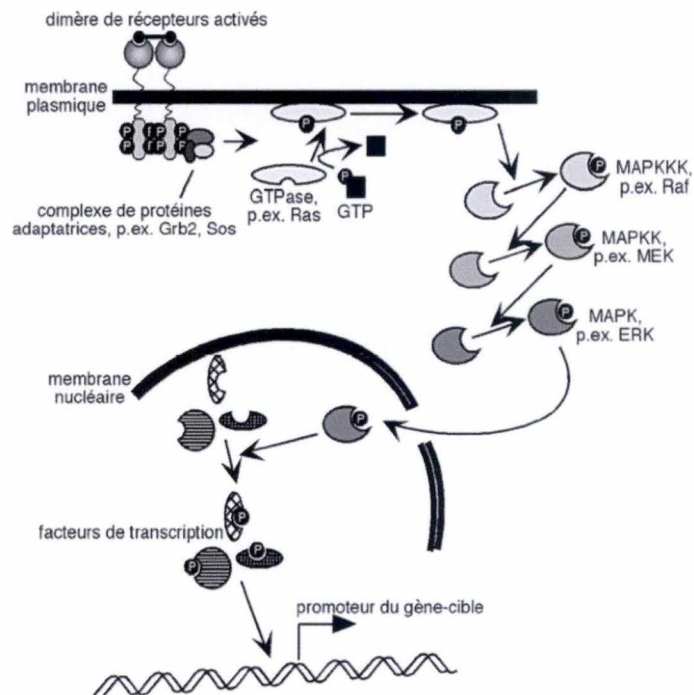


Figure I-4 : Illustration d'une voie de transduction du signal MAPK.

(Source : Jans, 2004).

Afin de garantir un nombre constant de cellules à l'épiderme, il est nécessaire de maintenir une coordination très fine entre différenciation et prolifération.

1.3.2 Les marqueurs de différenciation

En fonction de sa localisation dans les couches cellulaires et donc de son degré de différenciation, le kératinocyte présente différentes expressions de protéines spécifiques. Ces protéines portent le nom de marqueurs de différenciation épidermique. Grâce à ces marqueurs, on peut distinguer des cellules qui viennent d'amorcer le processus de différenciation et des cellules qui sont à un stade beaucoup plus avancé.

Les cellules non-différenciées de la couche basale expriment les KRT5 et KRT14 tandis qu'au niveau de la couche épineuse, les cellules expriment les KRT1 et KRT10.

Les **kératines** sont des protéines fibreuses appartenant à la famille des filaments intermédiaires. Elles sont codées par une vingtaine de gènes dont l'expression varie selon l'épithélium considéré. On peut les classer en 2 catégories : kératines acides ou de type I (1 à 8) et kératines basiques ou de type II (9 à 20). Une kératine acide et une kératine basique s'enroulent ensemble pour former un hétérodimère. Deux de ces hétérodimères vont s'aligner en position tête-bêche afin de former une unité tétramérique de 70 nm de long que l'on appelle le protofilament. Ensuite, l'assemblage en octamère de ces protofilaments donnera le filament intermédiaire de 10 nm d'épaisseur (Eichner et al, 1984) (voir Figure I-3).

Dans le cytosol, les filaments de kératine sont associés entre eux par d'autres protéines, comme la **filaggrine**, afin de former tout un réseau de filaments intermédiaires. Un tel réseau est lié à la membrane plasmique par la desmoplakine et la plakoglobine au niveau des desmosomes. Par l'intermédiaire de ces derniers, les filaments intermédiaires de kératines forment ainsi un réseau qui parcourt tout le tissu.

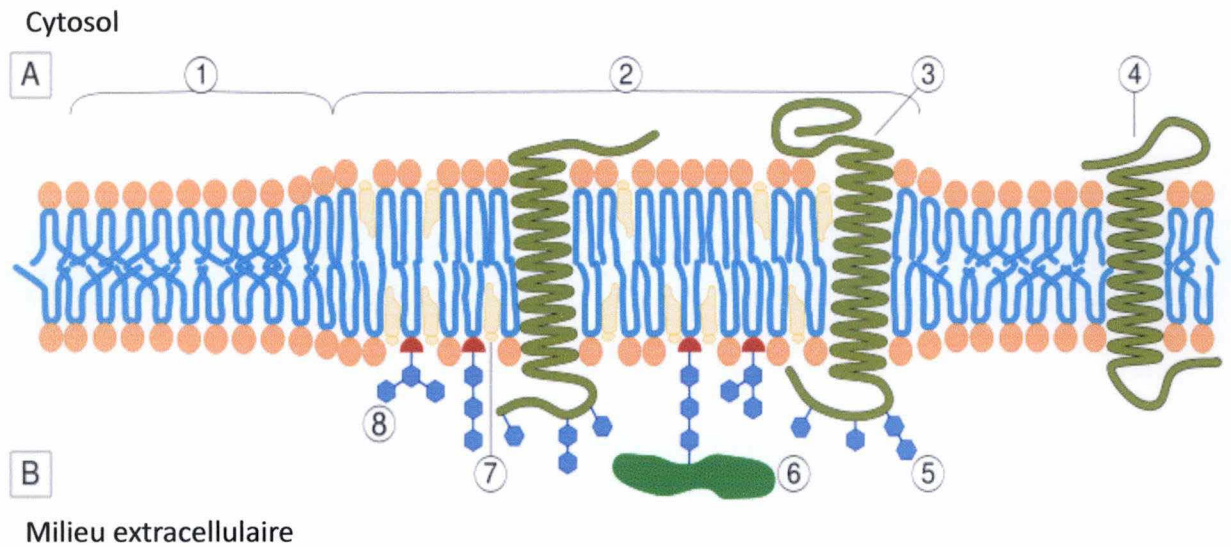
Au niveau des cellules de la couche épineuse supérieure, on observe l'apparition progressive de précurseurs protéiques de l'enveloppe cornée comme la **loricrine** ou l'**involucrine**. Ces 2 protéines se retrouvent conjuguées au niveau de la transition entre les couches granuleuse et cornée par la **transglutaminase-I** afin de former l'enveloppe cornée sous-jacente à la membrane plasmique. On appelle ces protéines des marqueurs de différenciation tardive.

1.3.3 Le contrôle de la physiologie des kératinocytes : les voies de signalisation et les lipid rafts

Le contrôle et la régulation des processus de prolifération, différenciation et d'apoptose des kératinocytes est assuré par des voies de signalisation intracellulaires spécifiques.

L'association en surface des cellules de molécules extracellulaires, comme l'Epidermal Growth Factor (EGF) à leur récepteur permet l'activation de plusieurs protéines cytosoliques. Par des cascades d'activation de protéines, les signaux extracellulaires sont amenés de la surface cellulaire vers le noyau où ils peuvent induire l'activation de facteurs de transcription afin de réguler la transcription de gènes cibles.

Parmi les voies de signalisation les plus importantes pour les kératinocytes se trouvent les voies **Mitogen-Activated Protein Kinase** ou **MAP Kinases** (voir Figure I-4). Il s'agit d'une famille de protéines kinases intracellulaires qui assure et amplifie la transmission d'un signal perçu par la cellule et permet ainsi l'élaboration d'une réponse physiologique appropriée. Une cascade MAPK consiste en au moins 3 enzymes kinases activées successivement. Tout d'abord une enzyme MAPK Kinase Kinase (MAPKKK ou MEK Kinase) comme Raf-1, est activée suite à une phosphorylation d'un récepteur membranaire. Cette MAP Kinase Kinase activée pourra alors phosphoryler une MAPK kinase (MAPKK ou MEK) comme MEK1.



1. Membrane non *lipid raft*
2. Membrane *lipid raft*
3. Protéine transmembranaire associée au *lipid raft*
4. Protéine transmembranaire non associée au *lipid raft*
5. Glycosylation (sur protéine/lipides)
6. Ancre GPI
7. Cholestérol
8. Glycolipide

Figure I-5 : Illustration d'un *lipid raft*.
(Source : Wikipedia)

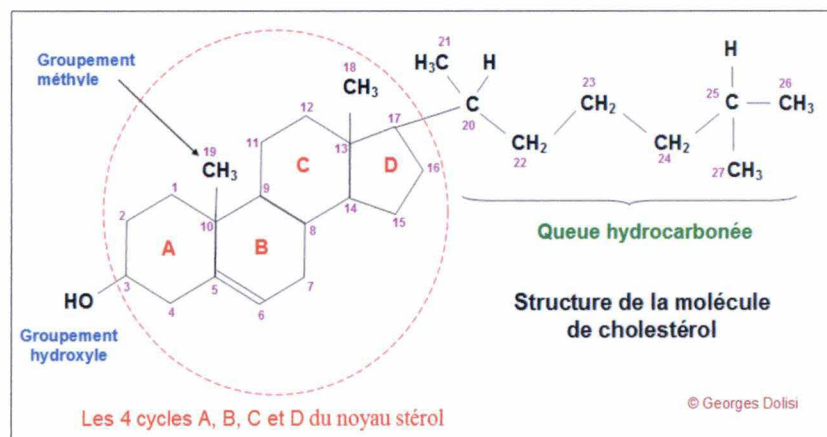


Figure I-6 : Représentation d'une molécule de cholestérol.

Finalement une MAP kinase (MAPK) sera phosphorylée à son tour et pourra alors être transloquée dans le noyau et ainsi activer des facteurs de transcription. Il existe 3 types de MAPK : *Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2* (ERK1 et ERK2) qui joue un rôle dans la prolifération et la survie des kératinocytes, *c-Jun NH2-terminal Kinase* (JNK) qui est activée en cas de stress et les isoformes p38 (α , β et δ) que l'on appelle aussi MAPK14 et qui sont également activés en cas de stress et impliqués dans la croissance, la différenciation et la mort cellulaire des kératinocytes.

Au sein des membranes plasmiques, il existe des zones particulières où on retrouve des récepteurs membranaires en très grande concentration. On appelle ces zones des radeaux lipidiques ou **lipid rafts** (voir Figure I-5). Il s'agit de microdomaines, très nombreux chez les kératinocytes, présents dans la membrane au niveau du feuillet externe et qui comportent de grandes quantités de cholestérol, de sphingolipides et de gangliosides. De nombreuses protéines impliquées dans les cascades de signalisation sont également présentes, comme des protéines G qui assurent le transfert d'information à l'intérieur de la cellule à l'aide d'un échange de GDP en GTP ; divers récepteurs de surface, comme EGFR1, le récepteur de l'EGF ainsi que des ancras GPI.

Ces radeaux lipidiques sont très impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la mobilité cellulaire ainsi que l'apoptose (Gniadecki et bang, 2003).

2. Le cholestérol membranaire

2.1 LE CHOLESTEROL ET SON IMPORTANCE AU NIVEAU DES MEMBRANES

2.1.1 *Définition et structure*

Le cholestérol est le stérol le plus abondant (environ 99%) dans les cellules eucaryotes. Il s'agit d'une molécule amphiphile formée de 4 cycles accolés ainsi que d'une courte queue hydrocarbonée. Un groupement hydroxyle attaché en C₃ constitue la partie hydrophile de la molécule (voir Figure I-6).

Le cholestérol est synthétisé de manière endogène dans plusieurs tissus à partir de l'acétyl-CoA pour finalement être éliminé de l'organisme au niveau du foie sous forme d'acides biliaires.

Le cholestérol est un constituant membranaire essentiel. Il s'insère dans la membrane en présentant sa partie hydrophile vers l'extérieur et sa partie hydrophobe reste intercalée entre les chaînes d'acide gras des phospholipides. De cette manière, il joue un rôle dans la fluidité membranaire car il limite les mouvements des phospholipides adjacents. Par sa présence, la membrane se retrouve moins fluide.

2.1.2 *Cholestérol et différenciation*

L'épiderme étant un tissu non vascularisé, il synthétise lui-même le cholestérol dont il a besoin.

Des études menées au sein du laboratoire suggèrent que le cholestérol est impliqué dans la régulation de la différenciation des kératinocytes. En effet, une déplétion de cholestérol induite par traitement via la Méthyl- β -Cyclodextrine (M β CD) modifie l'expression de marqueurs de différenciation tels que KRT10, KRT14 et l'involucrine. Une répression de

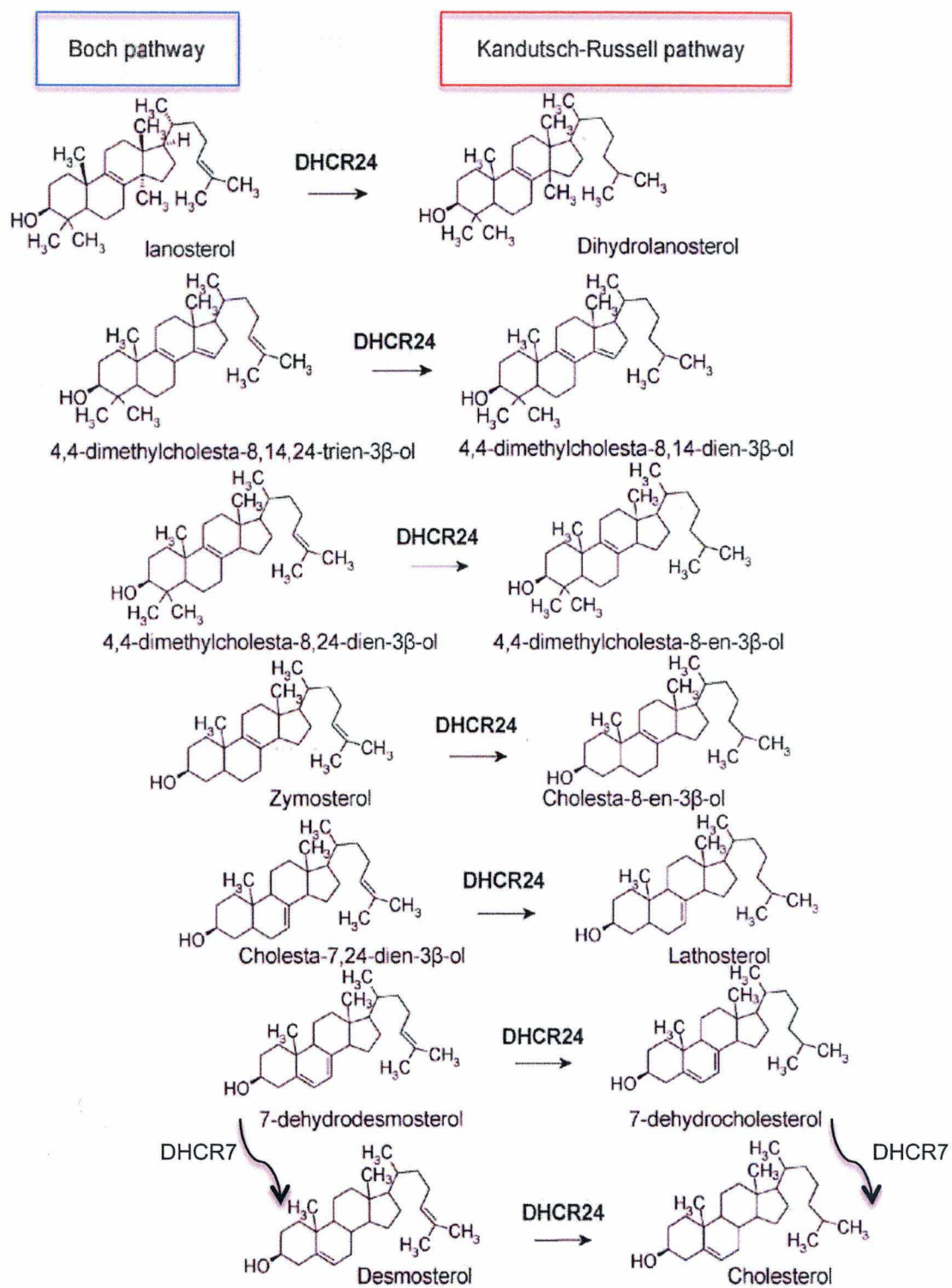


Figure I-8 : Schéma de la deuxième partie de la biosynthèse du cholestérol.

A partir du lanostérol, il existe deux voies biochimiques pour aboutir à la production de cholestérol : la voie de Bloch (à gauche) et la voie de Kandutsch-Russel (à droite).

l'expression de KRT10 et KRT14 est observée tandis que l'expression de l'involucrine est au contraire favorisée (Jans et al, 2004).

2.1.3 Cholestérol, signalisation et lipid rafts

Certaines observations suggèrent également qu'une déplétion en cholestérol entraîne une activation du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) chez les kératinocytes. Cette activation provoque ensuite l'activation de la MAPK ERK qui est impliquée dans la prolifération et la survie des kératinocytes (Jans et al, 2004 ; Lambert et al, 2006).

Par ailleurs, les mêmes études montrent qu'une déplétion en cholestérol induit aussi une phosphorylation de la MAPK p38 (malgré un phénomène d'autophosphorylation de p38 très important).

Il semble donc que le cholestérol joue un rôle non négligeable dans la régulation de la signalisation cellulaire, ce qui n'est pas étonnant quand on voit qu'il est un des composants majoritaires des **lipid rafts**. On appelle aussi ces lipid rafts des DRM (Detergent-Resistant Membrane domains) car ils résistent aux effets des détergents à 4°C.

Une déplétion en cholestérol induit la désorganisation de ces lipid rafts ainsi que des modifications d'activation de certaines voies de signalisation qui leur sont associées, comme la voie ERK (Lambert et al, 2006).

Il est intéressant de noter que les lipid rafts jouent aussi un rôle dans la défense de survie des cellules soumises à un stress oxydatif à l'H₂O₂ (Yang et al, 2006).

Ce phénomène de transduction du signal est donc très influencé par la composition lipidique des membranes plasmiques.

2.2 LA VOIE DE BIOSYNTHESE DU CHOLESTEROL

Pratiquement tous les tissus contenant des cellules nucléées peuvent synthétiser le cholestérol. Cette synthèse se fait au niveau du réticulum endoplasmique et dans le cytosol de la cellule.

La synthèse du cholestérol comprend 5 étapes principales. La première consiste à former du **mévalonate**, une molécule à six atomes de carbone à partir de la condensation de deux molécules à deux atomes de carbone : l'acétyl-CoA. Après décarboxylation et phosphorylation, il y aura formation d'**unités isopréniques** (5C), lesquelles se condensent ensuite pour donner du **squalène** contenant 30 atomes de carbone. Enfin, il y aura cyclisation de ce squalène pour donner naissance à un stéroïde : le **lanostérol** (voir Figure I-7).

La génération de cholestérol à partir du lanostérol prend place dans les membranes du réticulum endoplasmique et donne lieu à des changements dans le noyau stéroïde et dans la chaîne latérale. Cela nécessite plusieurs réactions enzymatiques : déméthylation des carbones 14 (1) et 4 (2), isomérisation des doubles liaisons $\Delta 8(9)$ et réduction de la double liaison en $\Delta 24$, $\Delta 14$ et $\Delta 7$.

Cette formation du cholestérol peut se faire selon 2 voies (voir Figure I-8) : la voie de Bloch et la voie de Kandutsch-Russel. Ces 2 voies diffèrent selon le timing de l'étape de réduction de la double liaison $\Delta 24$. Le dernier précurseur de la voie de Bloch est le desmostérol. Ce dernier sera converti en cholestérol suite à la réduction de la double liaison $\Delta 24$ par la **3 β -hydroxystérol $\Delta 24$ -réductase** ou **déhydrocholestérol-réductase-24 (DHCR-24)**.

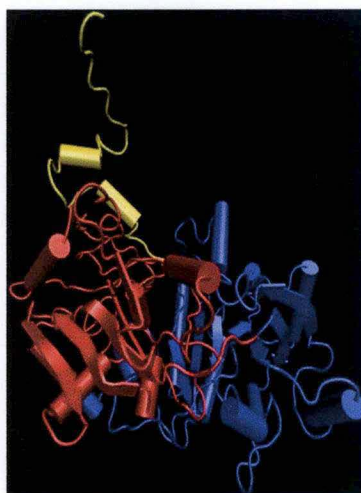


Figure I-9 : Représentation de la structure de DHCR-24 en 3D.

La partie jaune représente le segment transmembranaire qui fait office de crochet insérant la molécule en membrane ; la partie rouge détermine la zone semblable du domaine de liaison au FAD ; la partie bleue représente la partie qui se lie au substrat. (Source : Pedretti et al, 2008).

La voie de Kandutsch-Russel débute directement par l'action de la DHCR-24 et se termine par la conversion du 7-déhydrocholestérol en cholestérol par la **3 β -hydroxystérol Δ 7-réductase** ou **déhydrocholestérol-réductase-7 (DHCR-7)**.

A tout moment, on peut passer d'une voie vers l'autres grâce à la DHCR-24.

2.2.1 DHCR-24

La DHCR-24 est l'enzyme oxydoréductase qui catalyse la réduction de la double liaison Δ 24 des intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol.

Le gène *DHCR-24*, situé chez l'homme sur le chromosome 1, code pour un polypeptide de 516 acides aminés qui présente en N-terminal un peptide signal potentiel et un segment transmembranaire. Sa séquence présente des zones de similarités avec la famille des réductases dépendantes du cofacteur FAD (flavin adenin dinucleotide) (Pedretti et al, 2008) (voir Figure I-9). DHCR-24 est le gène humain homologue du gène Diminuto/Dwarf1 que l'on trouve chez les plantes et qui intervient dans la synthèse des brassinostéroïdes.

DHCR-24 est une protéine multifonctionnelle car elle se retrouve décrite dans différents contextes : il semble qu'elle soit sous-exprimée dans les régions du cerveau touchées par la maladie d'Alzheimer (Greeve et al, 2000). Pour cette raison, elle porte aussi le nom de Seladin-1 (SELECTive Alzheimer's Disease Indicator-1). La maladie d'Alzheimer se caractérise notamment par l'accumulation de peptide amyloïde β ($A\beta$) au niveau du cortex cérébral. Ces $A\beta$ résultent du clivage d'une protéine précurseur amyloïde (APP) suite à l'action d'une enzyme β -sécrétase (BACE). DHCR-24 s'avère nécessaire pour le bon fonctionnement des domaines membranaires particuliers que sont les lipid rafts. Ces lipid rafts empêchent l'interaction de l'APP et de BACE, et ainsi la production de $A\beta$. DHCR-24 aurait donc une activité protectrice contre la toxicité induite par les $A\beta$ (Cramer et al, 2006). DHCR-24 jouerait un rôle de neuroprotecteur.

DHCR-24 semble également jouer un rôle contre la mise en place de processus oncogènes et oxydatifs (Wu et al, 2004). En se liant au suppresseur de tumeurs p53, DHCR-24 empêche l'ubiquitination de p53 et donc sa destruction. L'accumulation de p53 qui en résulte favorise l'arrêt de la croissance cellulaire ainsi qu'une sénescence précoce. Dans ce cas, il a été démontré que l'activité oxydoréductrice de DHCR-24, qui lui permet de convertir le desmostérol en cholestérol, n'est pas nécessaire ici.

De même, des taux élevés de DHCR-24 confèrent une résistance contre les stress oxydatifs et la mort cellulaire qui en résulte. Par ailleurs, DHCR-24 joue un rôle anti-apoptotique en inhibant aussi l'activation de la caspase-3. (Greeve et al, 2000 ; Luciani et al, 2005).

Le cholestérol joue un rôle non-négligeable dans les défenses contre le stress oxydatif induit par H_2O_2 (Yang et al, 2006). Récemment, Kuehnle et al (2006) ont démontré que DHCR-24 est sur-exprimée lors d'une exposition aigue à l' H_2O_2 tandis qu'elle est sous-exprimée lors d'une exposition chronique.

DHCR-24 est une enzyme qui peut être inhibée par le Triparanol (aussi appelé Mer-29). Cette molécule fut utilisée aux Etats Unis à partir de 1959 comme agent diminuant le cholestérol. Cependant, comme elle provoque des effets secondaires néfastes, comme des cataractes, elle fut retirée du marché en 1962 (Coleman V, 1994). En 1960, Daniel Steinberg et son équipe affinent le principe d'action de cette molécule : le Triparanol agit comme un inhibiteur de l'étape de réduction du desmostérol en cholestérol, aboutissant à une diminution globale du taux de cholestérol (Steinberg et al, 1960). Donc si on ne connaissait pas encore l'enzyme responsable de cette réaction, on savait déjà comment l'inhiber.

2.2.2 *DHCR-7*

L'enzyme déhydrocholestérol-réductase-7 est l'enzyme qui catalyse la dernière étape au niveau de la voie de Kandutsch-Russel : la conversion du 7-déhydrocholestérol en cholestérol. Elle sert aussi à transformer le 7-déhydrodesmostérol en desmostérol (avant-dernière étape de la voie de Bloch).

DHCR-7 catalyse la réduction de la double liaison Δ^7 mais elle a besoin du co-facteur NADPH pour le transport des électrons ainsi que de l'ion hydride (Nishino and Ishibashi, 1999).

Le gène *DHCR-7* qui code pour l'enzyme se trouve sur le chromosome 11 chez l'homme et code pour un polypeptide qui fera 425 acides aminés pour une masse attendue de 55,5 kDa.

On peut inhiber *DHCR-7* avec les inhibiteurs pharmacologiques BM15766 (4-(2-(4-(4-cinnamyl)pipérazine-7-yl)ethyl)-benzoic acid) ou AY9944 (1,4-bis-(2-chlorobenzylaminométhyl)cyclohexane) (Roux et al, 1980 ; Xu et al, 1995).

2.3 LES MALADIES CUTANÉES LIÉES A UN DÉFAUT DANS LA BIOSYNTHESE DU CHOLESTEROL

Compte tenu de l'importance du cholestérol au niveau des membranes biologiques, il n'est pas étonnant que de faibles changements du contenu en cholestérol de ces membranes puisse entraîner des altérations conséquentes des propriétés membranaires ainsi que des fonctions biologiques essentielles pour l'homéostasie de la cellule.

Au niveau de la voie de biosynthèse du cholestérol, il existe 8 maladies génétiques dont les mutations entraînent la non-fonctionnalité des enzymes spécifiques de cette voie. Cela aura pour effet d'augmenter la quantité de certains intermédiaires du cholestérol tout en diminuant la quantité de ce cholestérol. Parmi les gènes touchés, on retrouve *DHCR-24* et *DHCR-7*.

2.3.1 *La desmostérolose*

La desmostérolose (MIM 602398) est une maladie congénitale autosomale récessive rare. Elle consiste en une altération du gène *DHCR-24* entraînant ainsi une déficience de l'enzyme et un blocage dans la voie de biosynthèse du cholestérol. Cela se traduit par une augmentation spectaculaire du précurseur desmostérol dans le sang et dans les tissus des individus atteints. A ce jour, 4 mutations « missense » ont été répertoriées (E191K, N294T, K306N et Y471S) (Pedretti et al, 2008).

En 1998, un article (Fitzpatrick et al, 1998) relate la découverte de taux très élevés de desmostérol au niveau du cerveau, du foie et des reins chez un enfant atteint de desmostérolose, né prématurément et mort une heure après la naissance. Des taux de desmostérol supérieurs à la normale avaient aussi été observés chez les parents. On considère qu'il s'agit là du premier cas observé de desmostérolose. En 2002, une autre équipe (Andersson et al, 2002) décrit l'étude du premier patient vivant avec la desmostérolose. Il présente entre autres de nombreuses dysmorphologies (microcéphalie, micrognathisme, pied-bot..), une absence du corps calleux (commissure du cerveau qui relie les 4 lobes entre eux) ainsi qu'un retard mental très conséquent. A l'âge de 2 ans, l'analyse sérologique révèle un taux de cholestérol normal, mais celui du desmostérol est 100 fois supérieur à la normale (60 mcg/ml contre 0,5-0,3 mcg/ml). Là aussi les parents présentent des taux de desmostérol

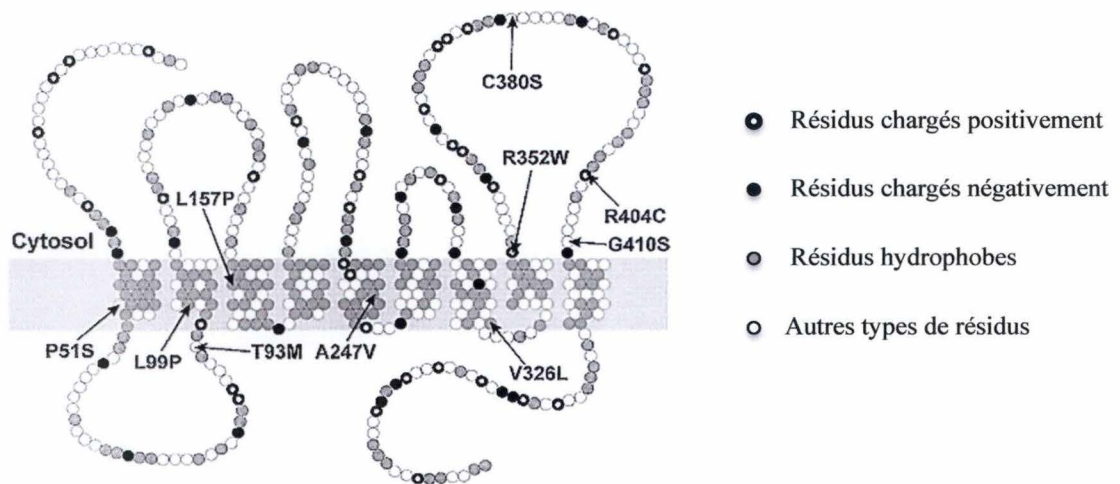


Figure I-10 : Modèle topologique de l'enzyme DHCR-7 proposé.

Les changements d'acides aminés suite aux mutations génétiques identifiées chez les patients atteints de SLOS sont représentées à l'aide de flèches.

(Source : Fitzky et al, 1998).

également très élevés (1,4 mcg/ml et 1,8 mcg/ml), soulignant le caractère héréditaire de la maladie.

Les effets de la desmostérolase peuvent être estimés par la création de souris Knock-out (KO) pour le gène *DHCR-24* (Wechsler et al, 2003 ; Mirza et al, 2006). Si l'équipe de Wechsler démontre que les souris *DHCR-24*^{-/-} peuvent survivre jusqu'à l'âge adulte si on les sépare des souris contrôle (*DHCR-24*^{+/+}) qui sont plus grandes ; l'équipe de Mirza rapporte que les souris *DHCR-24*^{-/-} ne survivent que quelques heures après leur naissance. Toutes les deux observent cependant une diminution radicale du cholestérol au niveau de l'épiderme des souris *DHCR-24*^{-/-} tandis que le desmostérol passe du non-déTECTABLE à des valeurs comparables à celles du cholestérol chez les souris contrôles. L'équipe de Wechsler rapporte également de très faibles déTECTIONS des autres intermédiaires de la voie de synthèse du cholestérol, indiquant ainsi l'importance de *DHCR-24* dans cette voie de biosynthèse. L'étude de Mirza aura été plus loin en montrant les modifications cellulaires dans le cas des souris *DHCR-24*^{-/-} : l'absence de grains de kératohyaline et diminution de l'organisation des filaments de kératine au niveau de la couche cornée, modification de la répartition des marqueurs de différenciation dans l'épiderme. L'accumulation de ces modifications altère donc les processus de prolifération et de différenciation des kératinocytes et mène ainsi à une perte de la fonction de barrière protectrice de l'épiderme.

Il semble que le desmostérol puisse remplacer le cholestérol pour quelques fonctions mais pas pour toutes. Il semble par exemple que le desmostérol puisse servir sans problème de substrat pour la production de sels biliaires (Heverin et al, 2007) mais le remplacement efficace du cholestérol membranaire par du desmostérol n'est pas encore avéré. Une étude menée par Daniel Huster montre que les interactions entre lipides au sein des membranes biologiques sont très similaires entre le cholestérol et le desmostérol. La double liaison supplémentaire du desmostérol occupe un volume plus important dans la région hydrophobe de la membrane, lui conférant ainsi une condensation lipidique semblable à celle produite par le cholestérol (Huster et al, 2005). Par contre, Saara Vainio et son équipe rapportent que la capacité du desmostérol à promouvoir la formation et la stabilité des lipid rafts est beaucoup moins importante que celle du cholestérol. De plus, le desmostérol ne semble pas permettre l'activation des récepteurs associés à ces lipid rafts. Leur étude suggère que c'est la différence d'orientation entre les 2 stérols qui serait responsable de cette différence de fonctionnalité (Vainio et al, 2006). Ces résultats ont par ailleurs été confirmés dans le cadre d'une autre étude (Bakht & London, 2006).

2.3.2 *Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS)*

Le syndrome de Smith-Lemli-Opitz, communément appelé SLOS, est une maladie autosomale récessive. La fréquence de ce syndrome oscille entre 1/20.000 et 1/70.000 et présente un très large éventail de malformations tant physiologiques qu'au niveau du comportement. Il existe aussi plusieurs degrés différents d'expression de ce syndrome.

Le SLOS fut décrit pour la première fois en 1964 par les docteurs D.W. Smith, L. Lemli et J.M. Opitz (Smith et al, 1964) mais le lien avec l'anomalie génétique sous-jacente ne fut établi qu'en 1997. Il s'agit de mutations au niveau du gène codant pour l'enzyme déhydroxycholestérol-réductase-7, ou *DHCR-7*, qui convertit le 7-déhydrocholestérol, ou 7-DHC, en cholestérol (voir Figure I-10). Ce manque enzymatique entraîne ainsi des taux plasmatique et tissulaire élevés de 7-DHC tandis que ces mêmes taux en cholestérol seront faibles. Les dosages sanguins de ces 2 composés représentent un argument crucial pour poser le diagnostic du SLOS.

Une telle altération de la composition en stérols de la membrane plasmique n'est pas sans conséquences. Le 7-DHC, contrairement au desmostérol, offre une plus grande stabilité des lipid rafts que ne le fait le cholestérol (Bakht & London, 2006). Malgré cela, une étude menée sur des fibroblastes de patients atteints de SLOS montre une augmentation de la fluidité membranaire d'environ 20% (Tulenko et al, 2006). De plus, le 7-DHC et les métabolites qui en découlent peuvent avoir des effets toxiques. C'est ainsi qu'une accumulation de 7-DHC dans les fibroblastes perturbe le métabolisme et le transport du cholestérol LDL de manière à former des inclusions similaires à celles observées dans les lysosomes de la maladie de Niemann-Pick de type C (Wassif et al, 2001). Enfin, il semble que le 7-DHC favorise la dégradation de l'hydroxyméthyl glutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), enzyme catalysant l'étape limitante entre le HMG-CoA et le mévalonate dans la première partie de la voie de synthèse du cholestérol (Fitzky et al, 2001). Cette augmentation de la dégradation enzymatique de la HMG-CoA réductase pourrait contribuer à la diminution globale de stérols observée chez les patients atteints de SLOS (Steiner et al, 2000).

En plus des nombreux symptômes déjà évoqués, une grande majorité des personnes atteintes du SLOS (environ 60%) présentent une photo-sensibilité anormale aux ultraviolets A, ou UVA (320-400 nm dans le spectre solaire). Après quelques minutes d'exposition aux rayons du soleil, ces patients développent un érythème exagéré semblable à un coup de soleil. Cette réponse peut durer jusqu'à 48 heures après l'exposition. Des tests de lumière monochromatique révèlent que cette sensibilité engendre une réponse maximale à 350 nm (Anstey et al, 1999). Chez ces patients, les rayons UVA provoquent une rapide production de **Reactive Oxygen Species (ROS)**, de l'ordre de 5 fois la normale en 2 minutes. Ces ROS vont à leur tour provoquer différentes réponses chez les kératinocytes comme l'oxydation des phospholipides et du cholestérol membranaires, ce qui désorganise les lipid rafts et les voies de transduction du signal qui leur sont associées. Les ROS permettent aussi l'augmentation du calcium intracellulaire, lequel est nécessaire pour l'activation de la phospholipase A2 (cPLA₂). Cette cPLA₂ se trouve être la phospholipase la plus commune chez les kératinocytes pour la production de Prostaglandine E₂ (PGE₂), un médiateur inflammatoire. Les UVA provoquent ainsi la synthèse d'intermédiaires inflammatoires via la production de ROS et l'augmentation de calcium intracellulaire (Valencia et al, 2006).

Ce type de réaction de photosensibilité n'est pas quelque chose de menaçant pour la vie des patients mais cela reste très inconfortable. Cependant, lorsque l'on administre des suppléments de cholestérol chez ce type de patients, on peut observer une diminution de cette photosensibilité (Azurdia et al, 2001).

3. La technologie de l'ARN interférant

3.1 DEFINITION ET HISTORIQUE

Depuis les années 1980, les chercheurs en biologie végétale connaissent le phénomène de gene-silencing, qu'il soit induit par un virus (virus-induced gene silencing, ou VIGS) ou via le mécanisme de co-suppression, notamment chez le pétunia. On sait aujourd'hui que ces phénomènes de gene-silencing sont dus à l'ARN double brin.

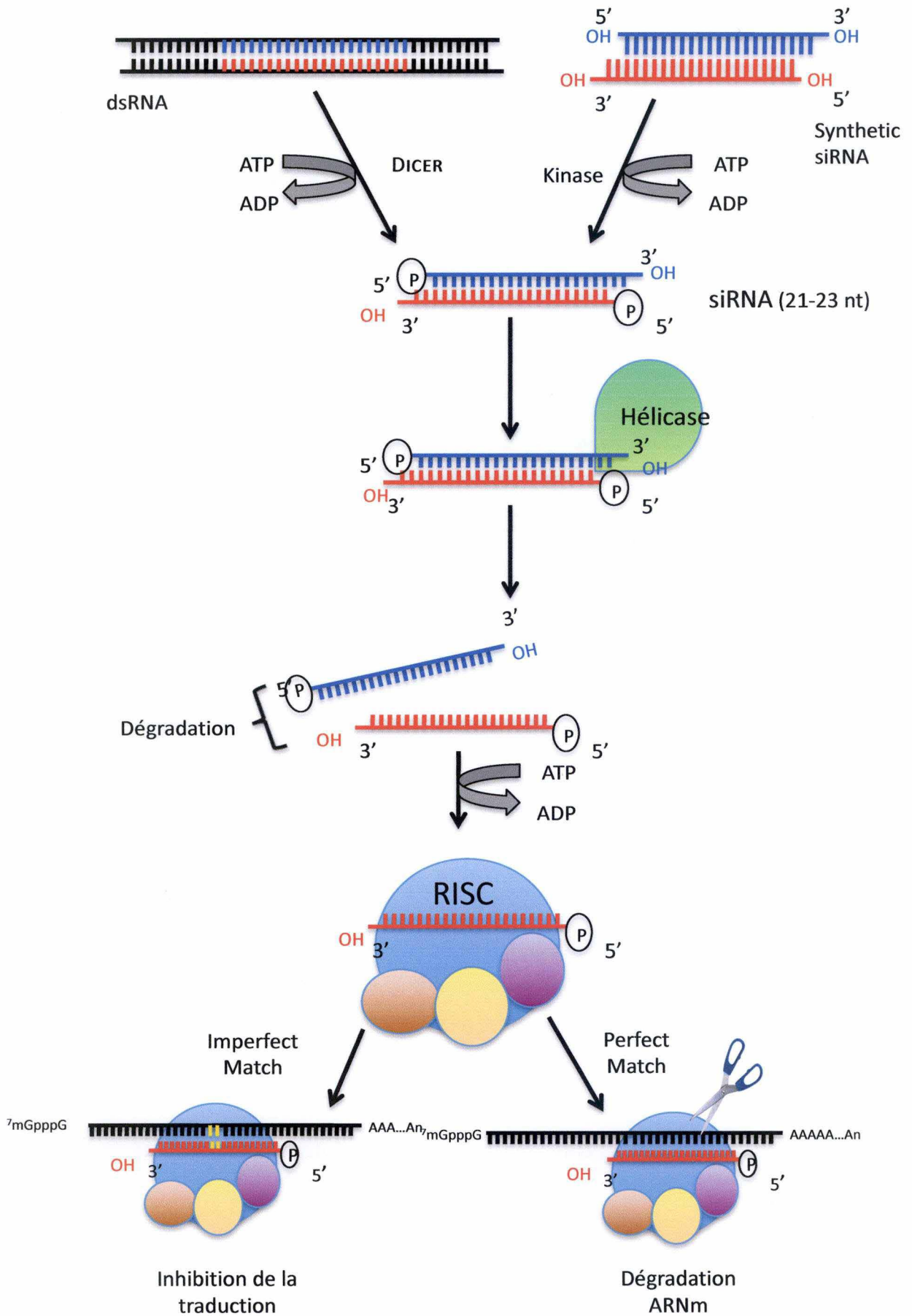


Figure I-11 : Illustration des mécanismes d'action de l'interférence ARN.
 (A) : Phase d'assemblage. Formation de fragments d'environ 21 nucléotides
 (B) : Phase effectrice. Le siRNA simple brin qui se trouve

En 1998, le groupe d'Andrew Fire met en évidence la capacité de l'ARN double brin d'induire la dégradation des ARN simples brins contenant les mêmes séquences chez le ver nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire et al, 1998). Depuis, les découvertes, toujours effectuées chez *C.elegans*, mais également chez les plantes, chez le champignon ascomycète *Neurospora crassa*, chez la drosophile et plus récemment chez les mammifères, ont permis de tracer les grandes lignes de ce mécanisme d'inhibition.

De nos jours, le phénomène d'interférence de l'ARN (RNA interférence ou RNAi) est utilisé comme technique de gene-silencing à la fois chez les plantes et chez les invertébrés. Cela en fait un outil très intéressant pour se rendre compte plus rapidement et plus facilement de la perte de fonction d'un gène sans avoir à pratiquer un KO (ou mutation du gène).

Il s'agit d'un puissant mécanisme de régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Cela consiste en de courtes séquences d'ARN double brin (dsRNA) qui vont marquer (se fixer) sur un ARNm pour le dégrader ou inhiber sa traduction en protéines.

C'est une technique hautement spécifique puisqu'elle ne cible que l'ARNm choisi et n'interagit pas du tout avec l'expression des autres gènes. Cela donne une suppression spécifique de protéine choisie.

3.2 PRINCIPE ET MECANISMES DE L'INTERFERANCE ARN (VOIR FIGURE I-11)

3.2.1 *Première étape : phase d'assemblage*

Les molécules d'ARN double brin sont d'abord découpés par un complexe de 2 homoenzymes à activité RNase III appelé **DICER**, produisant des fragments d'environ 21 nucléotides, les **petits ARN interférants** ou **short interfering RNA (siRNA)**. Ces siRNA double brin sont ensuite incorporés dans un complexe ribonucléoprotéique composé d'une vingtaine de protéines argonautes : le RNA-Induced Silencing Complex ou **RISC**. Les 2 brins siRNA sont désappariés par l'activité hélicase de RISC et ce, selon le profil thermodynamique de l'extrémité 5'-phosphate du siRNA. Le brin qui aura le moins de guanine et de cytosine sera favorisé et gardé au niveau de RISC, on l'appellera le « brin guide ». L'autre brin, que l'on appelle le « brin passager », sera dégradé (Khvorova et al, 2003 ; Schwarz et al, 2003). Afin que cette manœuvre soit optimale, il est nécessaire que le brin passager soit clivé à un site particulier, à savoir 10 nucléotides à partir de l'extrémité 5'-phosphate du brin guide. Si cette étape de clivage est bloquée, le duplex de siRNA reste incorporé au niveau du RISC mais cela le rend inefficace pour la suite (Leuschner et al, 2006).

3.2.2 *Deuxième étape : phase effectrice*

C'est le siRNA simple brin maintenu dans RISC qui va servir de guide pour la reconnaissance de l'ARNm cible. Une parfaite complémentarité entre le brin siRNA guide et l'ARNm-cible entraîne une destruction de cet ARNm cible grâce à l'activité RNase de RISC. Par contre, si un à deux nucléotides sont non-complémentaires avec l'ARNm cible et on assistera plutôt à une inhibition de la traduction (Shi et al, 2003).

4. Objectif du mémoire

Le cholestérol est un composant membranaire essentiel et en particulier dans le maintien de la structure des domaines *lipid rafts*, véritables plate-formes de la signalisation intracellulaire. Une extraction de ce cholestérol membranaire semble d'ailleurs induire des modifications de voies de signalisation chez le kératinocyte. De plus, lorsque la voie de biosynthèse endogène du cholestérol est altérée suite à une absence d'enzymes-clé, on observe l'apparition de phénotypes cutanés pathologiques. C'est le cas de la desmostérolose qui est caractérisée par une absence de l'enzyme DHCR-24 tandis que le manque de l'enzyme DHCR-7 est responsable du syndrome de Smith-Lemli-Optiz (SLOS).

Notre objectif est d'investiguer le rôle exact du cholestérol dans la physiologie et la signalisation des kératinocytes épidermiques. Nous avons donc décidé d'empêcher la production de cholestérol endogène afin de voir si cela peut produire des effets semblables à l'extraction du cholestérol membranaire ou à l'absence d'enzymes-clé. Pour cela, nous allons procéder à une inhibition des enzymes DHCR-24 et DHCR-7.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'inhiber l'activité fonctionnelle de ces enzymes à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques : le Triparanol (TR) pour DHCR-24 et le composé BM15766 pour DHCR-7. L'analyse des voies de signalisation AKT et p38 ainsi que la production du facteur HB-EGF à pour but de nous renseigner sur les modifications engendrées par cette inhibition.

Ensuite, l'utilisation d'une autre technique, l'inhibition par ARN interférent, sera aussi étudiée afin d'avoir un aperçu de ce qui se passe en amont.

Matériel & Méthode

1. Culture de kératinocytes épidermiques humains

1.1 MATERIEL :

Milieu Complet KGM-2 (Keratinocyte Growth Medium)

KBM-2 (Keratinocyte Basal Medium, Clonetics)

Suppléments :

BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0,2%

hEGF (Human Epidermal Growth Factor) 0,2 ng/ml

Insuline 5 µg/ml

Hydrocortisone 5×10^{-7} M

Epinéphrine

Transferrine 5 µg/ml

Streptomycine 50 µg/ml

Pénicilline G 50 unités/ml

Solution A

Glucose 10 mM

KCl 3 mM

NaCl 130 mM

Na₂HPO₄ 1 mM

Rouge Phénol 0,0033 mM

HEPES 30 mM

pH 7,4

Stérilisation par filtration sur Stérivex- GV 0,22 µM

Milieu Complet Epilife®+

Epilife Medium® (Cascade)

HKGS (Human Keratinocyte Growth Supplements) :

BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0,2%

hEGF (Human Epidermal Growth Factor) 0,2 ng/ml

Insuline 5 µg/ml

Hydrocortisone 5×10^{-7} M

Transferrine 5 µg/ml

Streptomycine 50 µg/ml

Pénicilline G 50 unités/ml

Trypsine T17

Solution A

Trypsine à 0,17%

Trypsine T25

Solution A

Trypsine à 0,025%

EDTA (Ethylen Diamine Tétra Acetic Acid) 0,01%

Milieu autocrine Epilife® -

Epilife Medium® (Cascade)

Suppléments :

L-histidine $2,4 \times 10^{-4}$ M

L-isoleucine $7,5 \times 10^{-4}$ M

L-méthionine 9×10^{-4} M

L-phénylalanine 9×10^{-4} M

L-tryptophane $4,5 \times 10^{-4}$ M

L-tyrosine $7,5 \times 10^{-4}$ M

Hydrocortisone 5×10^{-7} M

Streptomycine 50 µg/ml

Pénicilline G 50 unité/ml

Milieu de congélation

Milieu complet Epilife® + à 80%

DMSO (Diméthylsulfoxyde) à 10%

dFCS 10%

Solution dFCS 2% (solution bloquante)

Solution A

Fœtal Calf Serum dialysé (contre un tampon sans ions calcium et magnésium) à 2%

1.2 METHODE :

1.2.1 *Cultures primaires à partir de prélèvements de peau*

Les kératinocytes que nous utilisons proviennent de prélèvements de peau humaine lors d'abdominoplasties (clinique Saint-Luc de Bouge, Belgique). Immédiatement après l'intervention chirurgicale, les couches superficielles de la peau (derme et épiderme) sont prélevées à l'aide d'un dermatome et conservées à 4°C dans une solution physiologique. Les kératinocytes contenus dans le prélèvement de peau sont isolés sous hotte à flux laminaire et constituent dès lors une souche cellulaire NAK (Normal Abdominal Keratinocyte).

Les prélèvements de peau sont découpés en petits carrés de 1 cm de côté environ dans la solution A afin d'enlever le sang. Les morceaux sont déposés face dermique vers le bas dans une solution de trypsine de pancréas bovin 0,17% (T17) pendant une nuit à 4°C afin de séparer le derme de l'épiderme. Le lendemain, l'épiderme est détaché du derme à l'aide de pinces fines et les morceaux d'épiderme sont étalés, flottant sur du milieu complet KGM-2 contenant 2% de dFCS, ce qui permet de neutraliser l'action de la trypsine.

Les cellules seront alors détachées les unes des autres grâce à des frottements successifs à l'aide de pinces ainsi que par le passage à travers une pipette. La suspension cellulaire est ensuite passée sur un tamis de 70 µm (BD Falcon) pour éliminer les cellules de la couche cornée ainsi que les cellules non dissociées avant d'être récupérée et centrifugée à 1000 rpm pendant 10 min à 4°C. On ôte le surnageant et les cellules sont resuspendues dans du milieu complet KGM-2 contenant tous les facteurs de croissance et toutes les hormones nécessaires à la prolifération des kératinocytes. L'ajout de 0,1% de dFCS à ce milieu complet permet une meilleure adhésion des kératinocytes au substrat.

Ce sont ces kératinocytes épidermiques qui vont constituer la culture primaire. Ils sontensemencés dans des boîtes de 175 cm² (T175) à très forte densité (46.000 cellules par cm²) et placés dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

Le premier changement de milieu se fait 3 jours après la mise en culture avec KGM-2 sans dFCS, le milieu est ensuite renouvelé tous les 2 jours.

1.2.2 Cultures secondaires

Le but de la culture secondaire est d'amplifier de façon importante le nombre de kératinocytes mais il faut cependant veiller à ce qu'ils n'atteignent pas pour autant le stade de confluence (de manière à préserver leur pouvoir prolifératif et éviter la mise en place du processus de différenciation).

Les cellules de la culture primaire sont donc détachées de leur boîte à l'aide d'une solution de trypsine T25. Cette solution se compose de trypsine (0,025%) et d'EDTA qui est un chélateur de calcium. Ensuite, une solution bloquante de trypsine est appliquée et on récupère, centrifuge (5 min à 1000 rpm à 4°C) et compte les cellules qui se seront détachées lors de cette opération.

Ces cellules sont remises en culture dans des boîtes de 175 cm² avec du milieu Epilife® + avec une faible concentration en ions calcium (0,06 mM) afin de favoriser leur prolifération cellulaire.

Cette culture secondaire sera donc amenée à un état proche de la confluence. Lorsque c'est le cas, on détache les cellules avec une solution de trypsine T25. Après application de la solution bloquante, les cellules sont récoltées, centrifugées pendant 5 min à 1000 rpm à 4°C et comptées. Après resuspension du culot dans du milieu KGM-2, les cellules sont ensuite congelées dans des cryotubes NUNC à une densité de 1.10⁶ cellules dans une solution composée de 60% de milieu Epilife®, 20% de diméthylsulfoxyde (DMSO) et 20% de dFCS. Ces cryotubes sont immédiatement placés une nuit à -80°C et sont ensuite transférés dans de l'azote liquide à -180°C.

1.2.3 Cultures tertiaires

Ce type de culture se réalise à partir de cultures secondaires congelées. L'ensemencement des cellules se fait dans du milieu KGM-2 froid à une densité comprise entre 7000 et 12000 cellules par cm^2 . 24 heures après, ce milieu est remplacé par un milieu Epilife®+. Le changement de milieu se fera ensuite tous les 2 jours. Lorsque les cellules occupent entre 40 à 60% de la surface de la boîte, on les rince 2 fois avec de la solution A et on les place ensuite dans du milieu autocrine Epilife®-. A ce moment, les kératinocytes sont capables de produire leurs propres facteurs de croissance. Le milieu est également changé tous les 2 jours jusqu'à ce que les cellules atteignent le stade de confluence.

2. Traitement des Kératinocytes

2.1 MATERIEL :

DMSO

Solution Stock des inhibiteurs : 5 mM (Sigma)

Epilife®-

Solution Stock de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 : 8,82 M (Sigma)

Substrat MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiasol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) (Sigma)

Spectrophotomètre à plaques (VersaMax™, Molecular Devices)

2.2 METHODE :

2.2.1 *Inhibiteurs pharmacologiques*

Les kératinocytes sont incubés avec différents inhibiteurs pharmacologiques de la voie de biosynthèse du cholestérol : le Triparanol, qui inhibe la DHCR-24 ainsi que le composé BM15766 qui inhibe DHCR-7. Ces inhibiteurs se trouvent en solution stock de 5 mM dans du DMSO. Dans un premier temps, on va procéder à des dilutions dans du DMSO pour atteindre des concentrations de 500 μM , 50 μM et 5 μM . Ensuite, on dilue encore 500x, dans du milieu Epilife®- pour obtenir respectivement des concentrations finales de 10 μM , 1 μM , 0,1 μM et 0,01 μM qui comprendront 0,2% de DMSO.

Les cultures sont incubées avec ces différentes concentrations entre 5 minutes et 2 heures ou pendant 17 heures.

2.2.2 *Stress Oxydatif au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)*

Le peroxyde d'hydrogène se présente sous forme de solution stock de 8,82 M. On effectue une dilution dans du milieu Epilife®- pour atteindre des concentrations de 1mM et de 200 μM . L'incubation avec ces concentrations de H_2O_2 sera respectivement de 20 minutes et de 5 minutes à 24 heures.

2.2.3 *Test de viabilité MTT*

Le test MTT est un test colorimétrique qui permet d'évaluer la viabilité d'une culture cellulaire. Il est basé sur la réaction de réduction catalysée par la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale dont l'activité est ainsi représentative de la viabilité cellulaire puisque les mitochondries ne sont plus fonctionnelles chez les cellules mortes. La succinate

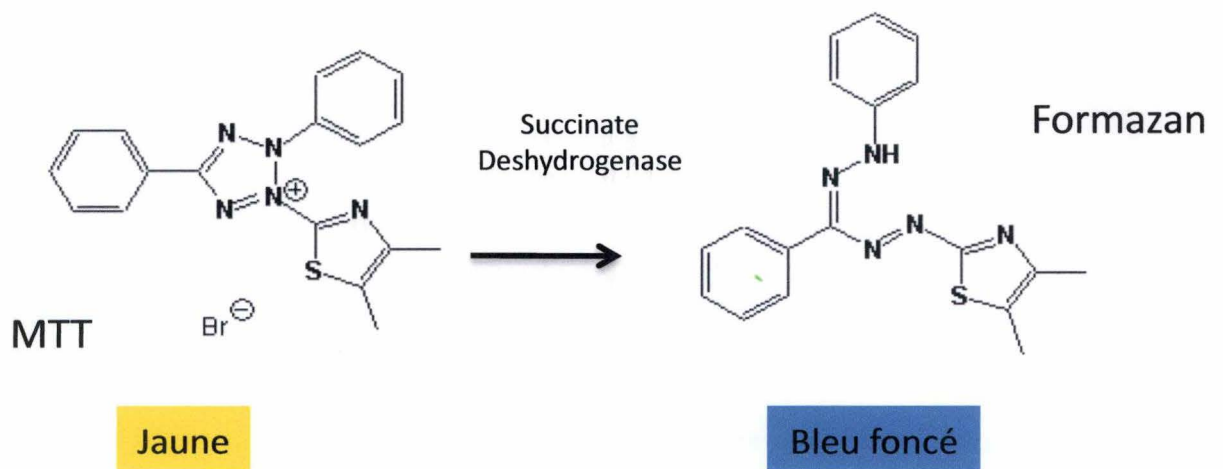


Figure II-1 : Illustration du principe du test colorimétrique MTT.

La succinate déshydrogénase catalyse la réaction de transformation du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiasol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium), un substrat de couleur jaune, en formazan qui est composant bleu foncé.

déshydrogénase réduit le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiasol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), un substrat jaune soluble dans l'eau en formazan qui est un produit bleu foncé (voir Figure II-1). L'intensité de cette coloration bleue est proportionnelle au nombre de cellules vivantes ainsi qu'à leur activité métabolique mitochondriale.

Lorsqu'on traite les cellules avec un inhibiteur pharmacologique ou avec le peroxyde d'hydrogène, on influence négativement la viabilité cellulaire et la coloration bleue sera moins prononcée.

Le MTT (Sigma) se présente sous forme de poudre jaunâtre. On le pèse et on le dissout dans du milieu Epilife®- pour atteindre une concentration finale de 0,5 mg/ml. Cette solution est ensuite filtrée avec un filtre Millex-GP 0,22µm (Millipore) et est maintenue à l'abri de la lumière.

Après le traitement, on aspire le milieu de culture dans chaque puits et on le remplace par 500 µl de la solution MTT. Les boîtes de culture sont ensuite incubées durant 1 heure à 37°C dans l'obscurité. Après cette période, la solution MTT est retirée et remplacée par 500 µl d'isopropanol. Cet isopropanol sert à lyser les cellules et permet ainsi la libération du formazan produit par réduction au niveau des mitochondries.

Finalement, on mélange 50 µl de ce lysat cellulaire (contenant le formazan) à 150 µl d'isopropanol afin d'effectuer la mesure de densité optique. Cette mesure s'effectue à l'aide d'un spectrophotomètre à plaques.

3. Analyse des protéines par Western blot

3.1 MATERIEL :

Tampon de lyse (Sample Buffer 2x)

Tris-HCl 62,5 mM
SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 2%
Glycérol 8,7%
DTT (DL-Dithiothréitol, Sigma) 0,2 M

Running Gel (10%)

Tris-base 375 mM à pH 8,8
SDS 0,1%
Acrylamide/Bisacrylamide 10%
APS (Ammonium persulfate) 0,05%
TEMED 0,1%

Stacking Gel

Tris-base 125 mM à pH 6,8
SDS 0,1%
Acrylamide/Bisacrylamide 4%
APS 0,05%
TEMED 0,1%

Tampon d'électrophorèse

Tris-base 25 mM
Glycine 192 mM
SDS 0,1%

Tampon de transfert

Tris-base 25 mM
Glycine 192 mM
Méthanol 20%

Solution de rinçage

0,1% Tween-20
NaCl 137 mM
Na₂HPO₄ + 2H₂O 8mM

Solution de saturation

Solution de rinçage
Lait Nestlé 5%

A

Anticorps primaires	Poids moléculaire	Dilution	Source	Fournisseur
MAP Kinase p38 phosphorylée	43 kDa	1/1000	Rabbit polyclonal	Cell Signaling (#9211)
MAP Kinase p38	43 kDa	1/1000	Rabbit polyclonal	Cell Signaling (#9212)
AKT phosphorylé	60 kDa	1/1000	Rabbit polyclonal	Cell Signaling (#4058)
AKT total	60 kDa	1/1000	Rabbit polyclonal	Cell Signaling (#9272)
HB-EGF	22 kDa	1/2000	Goat polyclonal	R&D
Kératine 10		1/1000	Mouse monoclonal	Dakocytomation
Involucrine		1/1000	Rabbit polyclonal	Harbo bioproducts
β -actine	48 kDa	1/200.000	Mouse monoclonal	
α -tubuline	54 kDa	1/1000	Mouse monoclonal	

B

Anticorps Secondaire	Dilution	Cible	Source	Fournisseur
Horse anti-mouse HRP	1/1000	Mouse	Horse	Cell Signaling (#7076)
Goat anti-rabbit HRP	1/1000	Rabbit	Goat	Cell Signaling (#7074)
Rabbit anti-goat HRP	1/1000	Goat	Rabbit	Dakocytomation

Tableau II-1 : Liste et caractéristiques des anticorps utilisés pour l'immunodétection de protéine par la technique de Western blot.

(A) : Anticorps primaires

(B) : Anticorps secondaires.

3.2 METHODES :

3.2.1 *Extraction de protéines*

Après application des divers traitements, les kératinocytes sont lysés dans 150 µl de tampon de lyse 2x concentré. Les lysats cellulaires sont ensuite recueillis à l'aide d'un racloir dans des Eppendorf stériles avant d'être portés à 100°C pendant 5 min et puis centrifugés à 10.000 rpm pendant 3 min. Cette centrifugation a pour but de faire sédimenter les débris cellulaires tandis que les protéines solubles restent dans le surnageant. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

3.2.2 *Electrophorèse et transfert*

Un volume de 12 ou 15 µl de l'échantillon concerné, auquel on ajoute un volume de 10% (1,2 ou 1,5 µl) de bleu de bromophénol 1% est porté à 100°C pendant 5 min afin de bien dénaturer les protéines. Les échantillons sont ensuite centrifugés 30 secondes pour rassembler le contenu au fond du tube avant d'être chargés sur un gel de polyacrylamide 10%.

L'électrophorèse PAGE s'effectue à 120 volts et en présence de détergent (SDS), lequel déplie les protéines grâce à la répulsion des charges négatives qu'il porte. La séparation de ces protéines se fera donc sur base de leur poids moléculaire qui peut être déterminé par référence à un étalon (Precision Plus Protein Standards, Dual Color, Bio Rad) qui migre simultanément sur le gel.

Après cette migration électrophorétique, les protéines sont transférées du gel sur une membrane poreuse de 0,45 µm de PVDF (polyvinylidène difluorure) (Hybond-P, Amersham). Ce transfert se fait en immersion dans du tampon transfert à 4°C, sous un voltage de 60 volts et durant toute la nuit.

3.2.3 *Marquage et détection des protéines d'intérêt*

Après l'étape de transfert, on récupère la membrane que l'on place dans la solution de rinçage pendant environ 15 min. Ensuite, on y place la solution de saturation durant une heure. Cette étape permet de bloquer les sites non-spécifiques de la membrane.

Vient ensuite l'étape d'incubation de la membrane avec l'anticorps primaire (voir Tableau II-1) dirigé contre la protéine recherchée et dilué dans la solution de saturation. Cette incubation dure environ une heure et une fois terminée, on rince la membrane avec la solution de rinçage. On incube ensuite encore une heure avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase) (voir Tableau II-2). Des rinçages permettront d'éliminer les anticorps secondaires en excédent.

3.2.4 *Révélation*

La visualisation de ce marquage est réalisée par chemoluminescence (POD Chemoluminescence Blotting Substrate, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) sur un film photographique (hyperfilm ECL, Amersham).

4. Analyse de l'expression de gènes par RT-PCR quantitative (q-PCR)

4.1 EXTRACTION DES ARN MESSAGERS (ARNM)

4.1.1 *Matériel :*

Kit mini RNeasy et Kit QIAshredder (Qiagen)

Colonnes RNeasy
Colonnes QIAshredder
Tampon RLT
Tampon RW1
Tampon RPE
Eau RNase free
 β -mercaptoéthanol

4.1.2 *Méthode :*

Après avoir appliqué les différents traitements aux cultures cellulaires, on aspire les milieux et on congèle les boîtes de cultures à -80°C .

Lorsqu'on veut extraire les ARN, on pose ces boîtes sur glace et on y dépose le tampon lyse (350 μl par puits) préparé à partir du tampon RLT fourni dans le kit auquel on ajoute 10 μl de β -mercaptoéthanol par ml de tampon RLT. Les lysats cellulaires sont récoltés à l'aide d'un racloir et déposés à l'aide d'une pipette sur les colonnes d'homogénéisation QIAshredder, elles mêmes placées dans des tubes collecteurs. On centrifuge ces colonnes pendant 2 min à 13.000 rpm. Ensuite, on enlève les colonnes (qui doivent avoir retenu les déchets cellulaires) et on y ajoute 350 μl d'éthanol 70%. On homogénéise bien et on transfère ce volume de 700 μl dans des colonnes de séparation RNeasy également placées dans des tubes collecteurs. Ces colonnes RNeasy comportent des filtres composés de billes de silice qui vont fixer les ARN constitués de plus de 200 paires de bases en présence d'éthanol 70%. On centrifuge pendant 15 secondes, on jette ce qui se retrouve dans les tubes collecteurs et on garde les colonnes auxquelles les ARN sont associés. On réalise un rinçage à l'aide de 650 μl de tampon RW1 contenant de l'alcool et on réalise une centrifugation de 15 secondes. On vide de nouveau les tubes collecteurs, on ajoute 500 μl de tampon RPE à chaque colonne afin de les laver et on centrifuge encore 15 secondes. Après avoir réitéré cette étape une deuxième fois, on centrifuge 2 min. On place ensuite les colonnes dans de nouveaux tubes collecteurs et on centrifuge encore 1 min. Cette étape a pour but d'éliminer tout restant de tampon RPE. Les colonnes sont ensuite déposées dans de nouveaux tubes collecteurs et on leur dépose entre 30 et 50 μl d'eau RNase free qui décrochera les ARN de la colonne. On centrifuge une dernière fois 1 min à 10.000 rpm pour bien éluer tout l'ARN.

On mesure ensuite les concentrations d'ARN à l'aide d'un spectrophotomètre.

4.2 TRANSCRIPTION INVERSE

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique qui amplifie des fragments d'ADN. Par conséquent, pour pouvoir étudier l'ARN par PCR, il faut passer par une étape intermédiaire : la transcription inverse ou *reverse transcription* (RT). Cette étape transforme l'ARN en son ADN complémentaire (ADNc). On pourra ensuite réaliser une PCR.

4.2.1 Matériel :

5x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 375 mM KCl ; 15 mM MgCl₂) (Invitrogen)
DDT 0,1 M (Invitrogen)
dNTP 100 mM chacun (Invitrogen)
SuperScript™ II Reverse Transcriptase 200 unités/μl (Invitrogen)
Oligo dT (0,5 μg/μl) (Invitrogen)
Eau RNase free

4.2.2 Méthode :

Avant d'effectuer cette RT proprement dite, on prépare les échantillons d'ARN pour qu'ils soient à une dilution de 100ng/μl. Ensuite, pour chaque échantillon, la réaction de RT se réalisera dans un volume de 20 μl.

La reverse transcription se fait en 2 temps : tout d'abord, on prépare un premier mix contenant :

- 1 μl d'oligo dT dilués 10x
- 1 μl de mix de dNTP à 10 mM chacun
- 1 μl d'eau RNase free
- 10 μl d'échantillon d'ARN à 100 ng/μl

On met ce mix 5 min à 65°C et puis on pose sur glace.

On prépare ensuite le second mix qui comprendra :

- 4 μl de First Strand Buffer [5x]
- 2 μl de DTT à 0,1 M
- 1 μl d'enzyme SuperScript Transcriptase™ II diluée 20x

On ajoute ces 7 μl au premier mix. On place ensuite les tubes dans l'appareil PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR system 2400) et on les porte successivement 50 min à 42°C et puis 15 min à 70°C. On les met sur glace tout de suite après.

On obtient ainsi du cDNA (ADN complémentaire) à 50 ng/μl.

4.3 PCR QUANTITATIVE (PCR EN TEMPS REEL)

4.3.1 Principe :

Comme mentionné plus haut, la PCR ou Polymerase Chain réaction, est une technique qui permet d'amplifier un fragment d'ADN spécifique.

Le principe de la PCR en temps réel (Real-time PCR) est fondé sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés pendant la PCR. A l'inverse des techniques utilisant la PCR « classique » dont les étapes d'amplification et d'analyse du produit amplifié sont séparées, la PCR en temps réel est réalisée en une seule étape. Enfin, comparée aux autres techniques de PCR, la PCR en temps réel est dotée d'une grande sensibilité et d'une grande spécificité.

Au cours de cette réaction de quantification en temps réel, la PCR est suivie cycle par cycle pendant toute la durée de l'amplification par mesure du signal fluorescent. La courbe de fluorescence ainsi obtenue est de forme sigmoïde. Des quantifications de gènes différents (et présents en quantités différentes dans l'échantillon) en même temps permettra l'observation de déplacement de ces courbes. Ces déplacements de courbes sont donc fonction de la

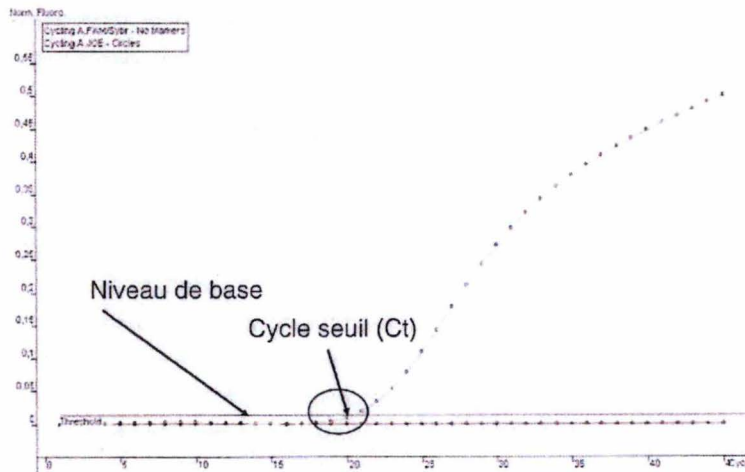


Figure II-2 : Illustration d'un résultat d'amplification en temps réel.

Il existe une relation entre le nombre de cycle (axe des abscisses) et l'intensité de la fluorescence (axe des ordonnées) : l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés. Le cycle seuil (ou cycle threshold, Ct) correspond à une valeur d'un nombre de cycle pour lequel l'intensité de la fluorescence correspondante est significativement plus élevée que celle du niveau de base. Dans cet exemple, la valeur de Ct est de 20 cycles.

(Source : Amerziane N., Bogard M. et Lamoril J. : PRINCIPES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE EN BIOLOGIE CLINIQUE, p.276).

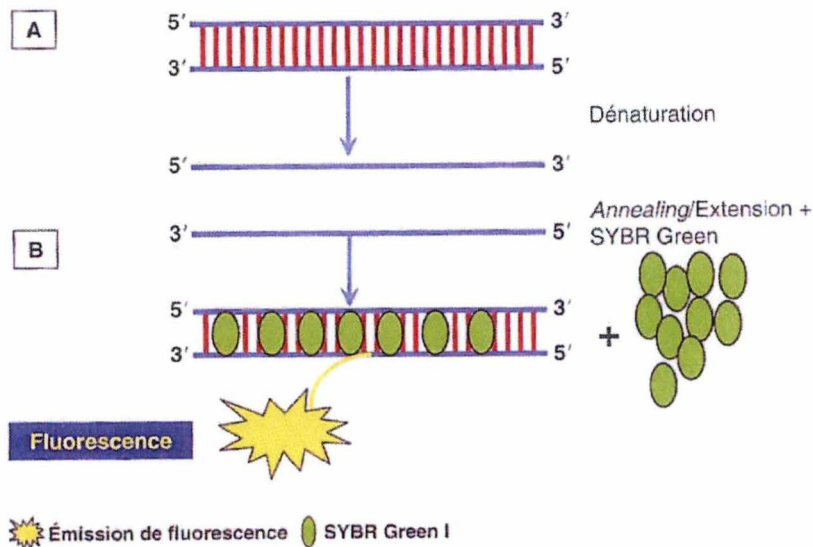


Figure II-3 : Illustration du principe de la real-time PCR utilisant l'agent intercalant SYBRTMGreen I.

Pendant les étape d'hybridation et d'élongation, les molécules de SYBRTMGreen s'intercalent progressivement aux doubles brins d'ADN nouvellement formés (B). C'est cette accumulation progressive de fluorescence qui est observée en temps réel.

(Source : Amerziane N., Bogard M. et Lamoril J. : PRINCIPES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE EN BIOLOGIE CLINIQUE, p.255).

Nom	Séquence	Référence GeneBank
36B4-forward 36B4-reverse	5'-ATCAACGGGTACAAACGAGTC-3' 5'-CAGATGGATCAGCCAAGAAGG-3'	NM_001002
TBP-forward TBP-reverse	5'-TCAAACCCAGAATTGTTCTCCTTAT-3' 5'-CCTGAATCCCTTTAGAAATAGGGTAGA-3'	NM_003194
RPL13-forward RPL13-reverse	5'-CTCAAGGTCGTGCGTCTGAA-3' 5'-TGGCTGTCACTGCCTGGTACT-3'	NM_000977
GAPDH-forward GAPDH-reverse	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3' 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	NM_002046
Keratine 10-forward Keratine 10-reverse	5'-AATCAGATTCTCAACCTAACAAC-3' 5'-CTCATCCAGCACCTACG-3'	NM_000421
Keratine 14-forward Keratine 14-reverse	5'-CGATGGCAAGGTGGTGTGTC-3' 5'-GGGTGAAGCAGGGTCCAG-3'	NM_000526
Involucrin-forward Involucrin-reverse	5'-TGAAACAGCCAACTCCAC-3' 5'-TTCCTCTTGCTTTGATGGG-3'	NM_005547
DHCR-7 -forward DHCR-7 -reverse	5'-GAAAGCCGCCAGCTCTATA-3' 5'-GGGAGAGACGTGTACAGAAGCA-3'	NM_001360
DHCR-24 -forward DHCR-24 -reverse	5'-ATGGCAGCTTTGTGCGATG-3' 5'-CACCAGGAAACCCAGCGT-3'	NM_014762
hPCNA-forward hPCNA-reverse	5'-CCACTCTCTTCAACGGTGACT-3' 5'-TCCCATATCCGCAATTTTATACTCT-3'	NM_002583
hTGM-forward hTGM-reverse	5'-GTCGTCTCCGGCTCGAA-3' 5'-TCACTGTTTCATTGCCTCCAAT-3'	NM_000359

Tableau II-2 : Liste et séquence des primers utilisées en real-time PCR.

concentration initiale des fragments à amplifier : plus il y a de gènes cibles au départ et plus l'amplification se fera précocement.

Dans les premiers cycles, le signal fluorescent est faible mais à partir d'un certain nombre de cycles, une détection significative de ce signal va apparaître. Ce moment où le signal fluorescent sort du « bruit de fond » et qui correspond à un certain nombre de cycles est appelé Cycle Threshold (Ct). Ce Ct apparaît toujours au cours de la phase exponentielle de la PCR et, par conséquent, la quantification n'est affectée par aucun composant de la réaction pouvant être limitant et responsable de la phase plateau (voir Figure II-2).

4.3.2 Matériel :

Power SYBR® Green PCR Master Mix, 5ml (Applied Biosystems)

Primers Reverse et Primers Forward à 2,4 µM (Sigma) (voir Tableau II-2)

Plaque 96 puits (MicroAmp, Applied Biosystems)

Système d'analyse pour Real-Time PCR (7300 Real Time PCR system, Applied Biosystems)

Study Gene Expression Analysis Software v1.3.1 (Applied Biosystems)

Le mix Power SYBR® Green utilisé contient un colorant qui appartient à la catégorie des agents intercalant. Au cours de l'hybridation des amorces et puis de l'extension réalisée par la polymérase, ce colorant SYBR® Green s'intercale entre les 2 brins d'ADN nouvellement synthétisés et émet une fluorescence. La quantité de ce signal fluorescent augmente de façon proportionnelle avec le nombre de produits amplifiés formés. La mesure de cette fluorescence est réalisée une fois par cycle (voir Figure II-3).

4.3.3 Méthode :

On commence par préparer un mix qui contient les amorces sens et antisens spécifiques du gène cible (1/8 du volume final chacune) ainsi que du power SYBR® Green Master Mix (1/2 du volume final). Dans chaque puits de la plaque PCR, on dépose 15 µl de ce mix et 5 µl d'ADNc dilué à une concentration de 1 ng/µl. Les mesures sont réalisées en duplicats ou en triplicats.

Une fois que le mix et l'ADNc ont été déposés, la plaque PCR est centrifugée 3 min à 1000 rpm. Ensuite, elle est introduite dans l'appareil d'analyse pour la PCR. Les données obtenues après le run sont analysées grâce au logiciel fourni avec l'appareil.

GÈNE	SÉQUENCE
DHCR-24/834	5'-GAAGTACGTCAAGCTGCGTTT-3'
DHCR-24/1005	5'-GCTGAATAGCATTGGCAAT-3'
DHCR-7/887	5'-GCGCCAGAGACTGCAAATT-3'
DHCR-7/1229	5'-CGCTGCAGGGTCTGTACTT-3'
Rac1/447	5'-CCGGTGAATCTGGGCTTAT-3'
Rac1/663	5'-GATAAAGACACGATCGAGA-3'

Tableau II-3 : Liste et séquence des primers siRNA utilisés.

5. La technologie de l'ARN interférant synthétique (Short Interfering RNA ou siRNA)

5.1 MATERIEL :

Boîte de culture 12 puits (Greiner)

Primers siRNA (Eurogentec) : 100 μ M (voir Tableau II-4)

Agents de transfection :

Oligofectamine™ (Invitrogen)

ICAFectin™ (Eurogentec)

siPORT™ NeoFX™ (Applied)

N-TER™ (Sigma)

Milieu de culture Epilife®- sans antibiotique :

Epilife Medium® (Cascade)

Hydrocortisone : 1/1000

Acides aminés : 1/33

Eau RNase free (UltraPure Distilled Water, DNase, RNase free, GIBCO, Invitrogen)

5.2 METHODE :

5.2.1 *Optimisation de la technique de transfection*

Avant de transfecter des cellules de cultures secondaires que l'on vient de décongeler, on leur permet de reprendre une prolifération cellulaire. Pour cela, on dépose environ 1 million de cellules décongelées dans une bouteille de culture T175 avec 35 ml de milieu KGM. Après 24 heures de culture, on incube les cellules en milieu Epilife®+ et on renouvelle ce milieu toutes les 48 heures. Lorsque les cellules atteignent un état proche de la confluence, on les trypsinise et on ensemence dans des puits de culture à raison de 50.000 cellules par cm^2 .

La transfection doit avoir lieu le lendemain.

5.2.2 *Transfection des cultures cellulaires*

Avant la transfection en tant que telle, on rince les cellules 2x avec de la solution A pour enlever toute trace d'antibiotique. Puis on les incube dans du milieu frais Epilife®- sans antibiotiques (400 μ l par puits d'une boîte 12 puits) pendant une heure à 37°C.

Pendant ce laps de temps, on prépare les dilutions respectives de siRNA et d'agents de transfection ainsi que leur complexation. Les primers siRNA, spécifiquement choisis (voir Tableau II-3) se trouvent en solution stock de 100 μ M. Dans un premier temps, on dilue cette solution stock 10x dans de l'eau RNase free pour obtenir des primers siRNA à une concentration de 10 μ M. On effectue ensuite d'autres dilutions avec du milieu Epilife®- sans antibiotique pour finalement obtenir 3 μ l d'agent de transfection et 5 μ l de siRNA (10 μ M) dans chaque puits. On se retrouve ainsi avec une concentration finale de siRNA de 100 nM.

Lorsqu'on dilue séparément les agents de transfection et les siRNA, on les laisse reposer 5 min à température ambiante. De même, lorsqu'on forme les complexes Agent de transfection-siRNA, on veillera à les laisser incuber 20 min à température ambiante. On dépose ensuite 100 μ l de ces complexes dans chaque puits, en laissant les 400 μ l d'Epilife®- sans antibiotique ajoutés une heure auparavant. On laisse incuber les cellules pendant 4 heures à 37°C.

Après ces 4 heures de transfection, on aspire les milieux en veillant à bien changer de pipette pasteur entre chaque condition siRNA différente et on remet du milieu Epilife®- sans antibiotique. On cultive les cellules ainsi pendant 48 heures avant d'à nouveau aspirer le milieu et de congeler les cellules avant analyse par qPCR ou par Western blot à -80°C.

Résultats

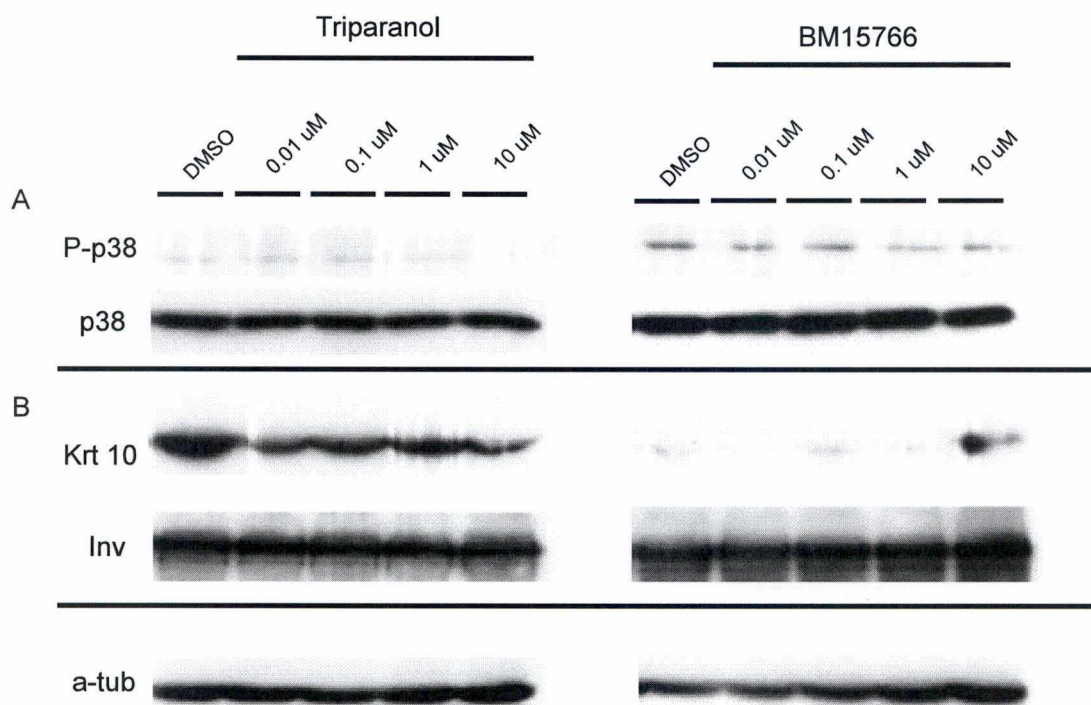


Figure III-1 : Analyse protéique par Western blot des effets d'une exposition longue aux inhibiteurs pharmacologiques BM15766 et Triparanol (TR).

Des cultures cellulaires au stade de confluence sont incubées pendant 17 heures avec du milieu Epilife®- comprenant respectivement 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ou 10 μM de BM15766 ou de TR. Une culture nous servira de contrôle en recevant pour le même timing du DMSO 0,2% (véhicule des inhibiteurs). Le contrôle de charge est représenté par l'α-tubuline.

On observe les effets d'un tel traitement sur la transduction du signal via l'étude de la voie MAPK p38 (A) et sur le processus de différenciation grâce à l'étude des marqueurs Krt10 et Inv (B).

Pour étudier l'importance du cholestérol endogène dans la physiologie et la signalisation du kératinocyte épidermique, nous avons choisi d'inhiber la synthèse de cholestérol endogène et d'observer les modifications engendrées par ce traitement sur certaines voies de signalisation et sur l'expression de marqueurs de différenciation.

Nous savons en effet, par une étude précédente, qu'une déplétion du cholestérol membranaire à l'aide de Méthyl- β -cyclodextrine (ou M β CD) entraîne des modifications de ces voies de signalisation ainsi que des altérations de la différenciation et de la prolifération des kératinocytes épidermiques (Jans et al, 2004).

Nous nous sommes donc demandés si l'inhibition de la production endogène de cholestérol chez le kératinocyte induirait des effets similaires à une extraction du cholestérol membranaire.

Pour ce faire, nous avons choisi d'inhiber l'activité catalytique de 2 enzymes de la deuxième partie de la voie de biosynthèse du cholestérol. La déhydrocholestérol-réductase-24 (DHCR-24) permet de réduire la double liaison Δ 24 des composés intermédiaires à la formation du cholestérol. Elle est inhibée par le composé pharmacologique Triparanol (TR). Quant à la déhydroxycholestérol-réductase-7 (DHCR-7), elle est responsable de la conversion du 7-déhydrocholestérol en cholestérol au niveau de la voie de Kandutsch-Russel ainsi que de la transformation de 7-déhydrodesmostérol en desmostérol dans la voie de Bloch. La DHCR-7 est inhibée par le composé pharmacologique BM15766.

Ces 2 enzymes ont été choisies car on sait que leur absence fonctionnelle suite à des mutations génétiques entraîne l'apparition de lourdes pathologies cutanées : la desmostérose dans le cas de DHCR-24 et le Syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) pour la DHCR-7.

1. Analyse d'un traitement de 17 heures sur la signalisation et sur la différenciation des kératinocytes.

1.1 EXPERIENCE

Les cultures cellulaires de kératinocytes humains à confluence sont incubées pendant 17 heures avec du milieu Epilife®- contenant différentes concentrations (0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M ou 10 μ M) d'inhibiteurs pharmacologiques. Le contrôle est assuré avec du milieu Epilife®- contenant le véhicule des inhibiteur : du DMSO 0,2%.

1.2 OBSERVATIONS (VOIR FIGURE III-1).

1.2.1 Analyses Protéiques

Après écoulement du temps d'incubation, les cultures de kératinocytes sont lysées et les protéines sont analysées selon la technique de Western blot décrite au point 3 dans la partie « Matériel & méthode ». Lors d'une précédente étude (Delescaille, 2008), une incubation de 18 heures de TR à hautes concentrations (1 μ M et 10 μ M) sur les voies de signalisation et sur la différenciation des kératinocytes avait déjà été explorée.

Nous observons qu'un traitement de 17 heures avec le TR ne semble pas induire de phosphorylation de la MAPK p38, ce qui avait déjà été démontré lors de cette étude précédente.

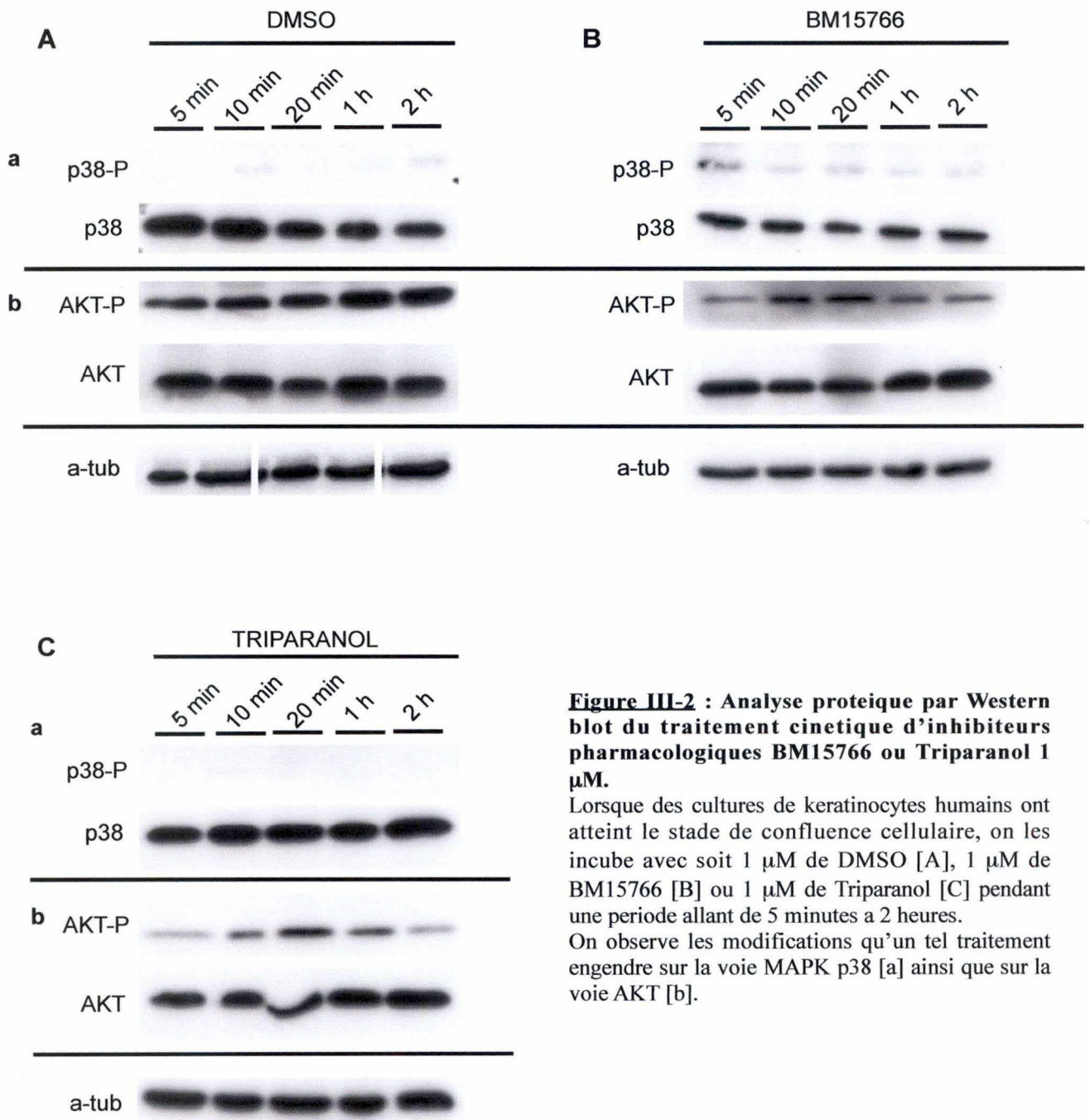


Figure III-2 : Analyse proteique par Western blot du traitement cinetique d'inhibiteurs pharmacologiques BM15766 ou Triparanol 1 μ M.

Lorsque des cultures de keratinocytes humains ont atteint le stade de confluence cellulaire, on les incube avec soit 1 μ M de DMSO [A], 1 μ M de BM15766 [B] ou 1 μ M de Triparanol [C] pendant une periode allant de 5 minutes a 2 heures.

On observe les modifications qu'un tel traitement engendre sur la voie MAPK p38 [a] ainsi que sur la voie AKT [b].

Lorsque l'on regarde le marqueur de différenciation précoce Kératine 10 (KRT 10), on observe une diminution progressive de son expression suivant l'augmentation des concentrations de TR. Dans le cas du BM15766, on ne détecte pas la présence de KRT 10 lorsque l'on utilise de faibles concentrations (de 0,01 à 1 μ M). Par contre, une forte concentration de BM15766 (10 μ M) semble induire une production de KRT 10.

1.3 CONCLUSION

Comme le traitement de 17 heures avec les inhibiteurs pharmacologiques ne montre pas de résultats intéressants au niveau de l'activation de la voie MAPK p38, c'est peut être parce que l'on regarde trop tard. Nous avons donc décidé d'étudier les effets des inhibiteurs sur des temps d'incubation beaucoup plus courts.

2. Analyse cinétique de la signalisation cellulaire chez les kératinocytes après une incubation de 5 minutes à 2 heures avec des inhibiteurs pharmacologiques.

2.1 EXPERIENCE

Nous avons incubé nos cultures cellulaires avec une concentration d'inhibiteurs de 1 μ M sur des temps allant de 5 minutes à 2h. Les cinétiques avec les inhibiteurs TR et BM15766 sont comparées avec une cinétique contrôle (milieu Epilife®- avec le véhicule DMSO 0,2%).

2.2 OBSERVATIONS (VOIR FIGURE III-2)

Sur ces temps plus courts, le TR ne semble toujours pas induire de phosphorylation de p38. Par contre BM15766 montre un faible signal d'activation de cette MAPK après 5 minutes pour ensuite diminuer.

Par contre, le TR semble induire une déphosphorylation de AKT après 5 minutes d'incubation. Or nous savons qu'une déplétion en cholestérol induit un phénomène de déphosphorylation de cette protéine (Lambert et al, 2008). Entre 10 minutes et 1 heure d'incubation avec le TR, le signal de phosphorylation de AKT augmente pour de nouveau diminuer après 2 heures d'incubation. En ce qui concerne le traitement avec BM15766, la diminution du signal de phosphorylation de AKT après 5 minutes d'incubation est plus faible que dans le cas du TR. Là aussi, la quantité d'AKT-P augmente dès 10 minutes d'incubation.

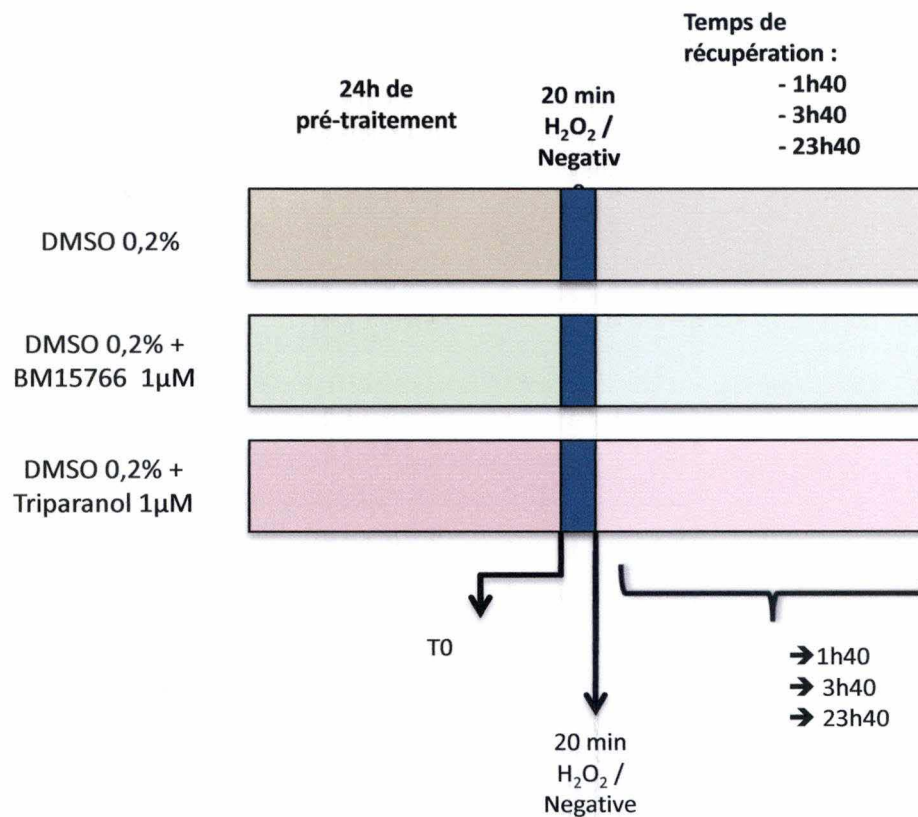


Figure III-3 : Illustration schématique du déroulement de l'expérience associant les inhibiteurs pharmacologiques Triparanol et BM15766 avec un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène H₂O₂ suivi de temps de récupération.

« T0 » correspond aux cultures qui n'ont reçu que le pré-traitement. « Negative » désigne les cultures cellulaires qui ont été incubées pendant 20 minutes dans du milieu frais et non dans H₂O₂.

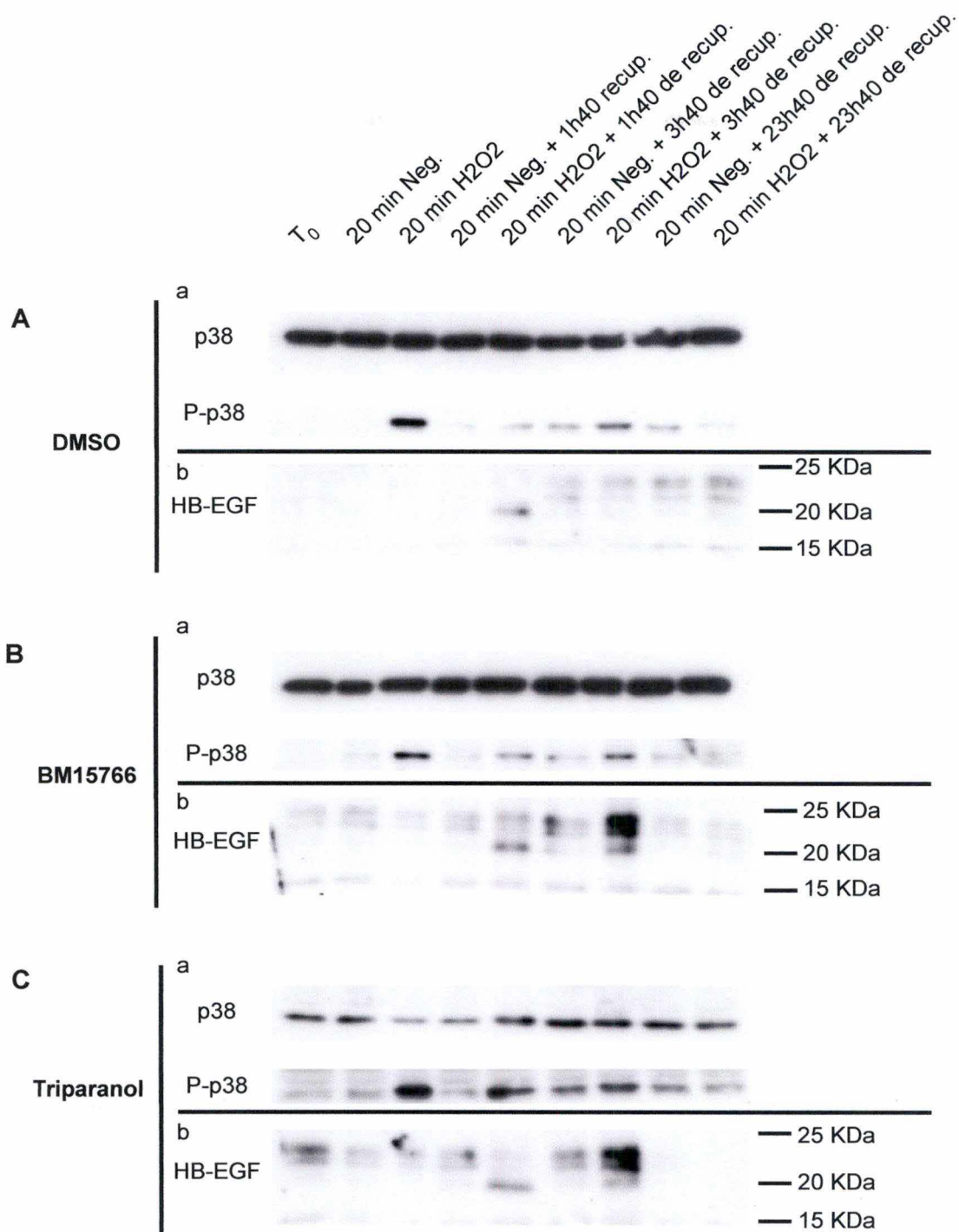


Figure III-4 : Analyse protéique par Western blot illustrant les effets de l'association d'un inhibiteur pharmacologique (BM15766 ou Triparanol) et d'un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sur la voie MAPK p38 ainsi que sur la production de HB-EGF.

Lorsque les cultures de kératinocytes sont proches du stade de confluence, elles sont incubées pendant 24 heures avec du milieu Epilife®- contenant soit (A) du DMSO 0,2%, soit (B) du DMSO 0,2% + BM15766 à 1µM ou (C) du DMSO 0,2% + Triparanol à 1µM. Après ce pré-traitement, une boîte de culture sera congelée à -80°C et servira de contrôle T₀. Les autres cultures reçoivent du milieu frais de même composition (avec ou sans inhibiteurs) avec ou sans H₂O₂ à 1 mM pour une durée de 20 minutes. Ce temps d'exposition écoulé, les milieux de culture sont à nouveaux remplacés par des milieux frais (toujours de même composition) pour des périodes de récupération de respectivement 1h40, 3h40 et 23h40.

3. Association d'inhibiteurs pharmacologiques TR et BM15766 avec un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

Devant le peu de résultats ainsi observés lors de traitement avec les inhibiteurs pharmacologiques seuls, nous avons décidé d'y associer un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène H₂O₂. En effet, en tant que constituant essentiel des lipid rafts, le cholestérol joue un rôle modulateur dans la réponse du kératinocytes au stress. Le peroxyde d'hydrogène est une des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS) les plus communes. Il peut être généré de manière constante et faible dans un métabolisme aérobie normal. Lors d'un dysfonctionnement des cellules scavenger ou suite à une exposition aux radiations UVB (Chang et al, 2003), l'organisme se retrouve avec des quantités de ROS beaucoup plus importantes. Un excès de H₂O₂ peut, de manière directe, entraîner des dommages à l'ADN (Marnett, 2000) ainsi qu'aux protéines et lipides membranaires. On observe également des effets indirects comme des activations des voies de transduction du signal MAPK p38, c-Jun (Benhar et al, 2001) ou ERK (Peus et al, 1999).

Il a été démontré récemment dans notre laboratoire qu'un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène produit une phosphorylation transitoire de la MAPK p38 similaire à celle induite par déplétion de cholestérol membranaire. De cette activation de p38 découle une production du facteur de croissance HB-EGF (Mathay et al, 2008).

Il a aussi été démontré dernièrement qu'une des enzymes qui nous intéresse, la DHCR-24, confère une protection contre le stress H₂O₂ chez le fibroblaste (Lu et al, 2008).

3.1 EXPERIENCE

Lorsque nos cultures cellulaires sont en passe d'atteindre le stade de confluence, nous les incubons avec du milieu Epilife contenant 0,2% de DMSO (véhicule) avec ou sans inhibiteur BM15766 ou TR (à 1 µM) pour une durée de 24 heures.

Après ce pré-traitement, on aspire les milieux de culture et on remet du milieu frais de même composition (DMSO seul/ DMSO + BM/ DMSO + TR) avec ou sans H₂O₂ à 1mM et ce, pendant 20 minutes. L'appellation « 20 min Negative » désigne les cultures cellulaires incubées sans H₂O₂ pendant 20 minutes.

Une fois que ce temps d'exposition est écoulé, les milieux sont de nouveau remplacés par du milieu frais, toujours de même composition (DMSO seul ou avec inhibiteurs) mais surtout sans H₂O₂ pour des temps de récupération allant de 1h40 à 23h40 (voir Figure III-3).

Les cellules qui n'auront subi aucun autre traitement que les 24 heures de pré-traitement serviront de contrôle et sont nommées « T0 ».

3.2 OBSERVATIONS (VOIR FIGURE III-4)

Comme attendu, les 20 minutes d'exposition au peroxyde d'hydrogène provoquent une phosphorylation de la MAPK p38. Lorsque ce stress à l'H₂O₂ est associé à l'inhibiteur pharmacologique BM15766, le signal de phosphorylation semble diminuer (comparativement au DMSO). Tandis que dans le cas d'une association entre le stress à l'H₂O₂ et l'inhibiteur TR, le signal de p38-P augmente.

Après les temps de récupération qui ont suivi les 20 minutes de traitement à H₂O₂, on observe que, dans le cas des conditions contrôle (DMSO 0,2%), le signal de phosphorylation diminue après 1h40 de récupération pour remonter un peu après 3h40 de récupération et finalement disparaître après 23h40 de récupération. Par contre, dans le cas où les inhibiteurs

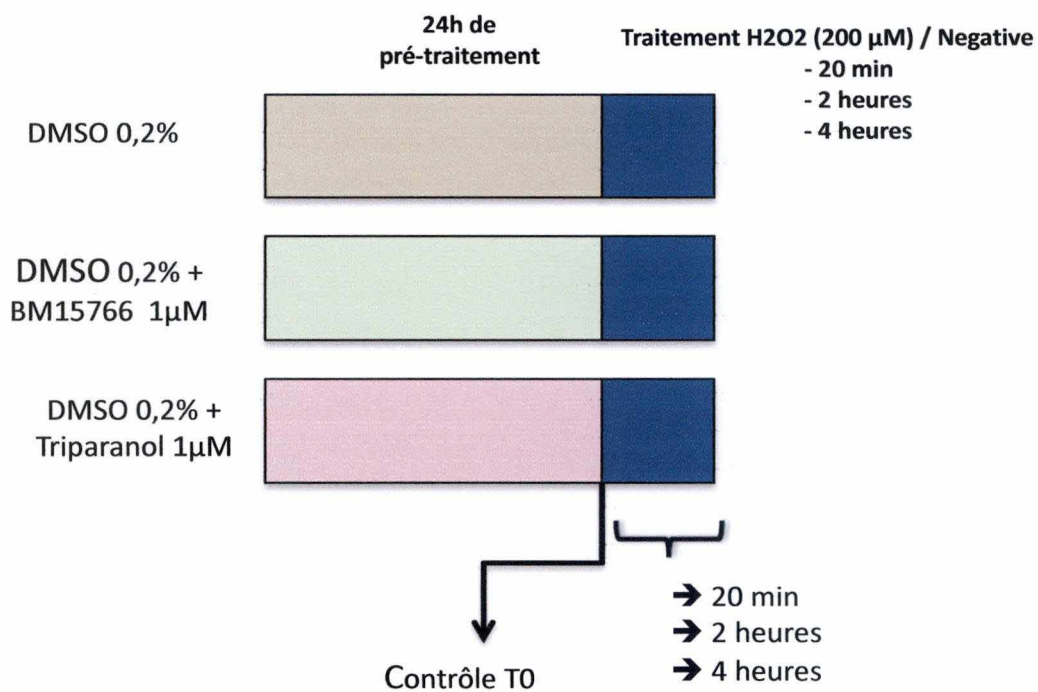


Figure III-5 : Illustration schématique du déroulement de l'expérience associant les inhibiteurs pharmacologiques Triparanol et BM15766 au stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène H₂O₂ pendant des période allant de 20 minutes à 4 heures.

« T0 » correspond aux cultures qui n'ont pas reçu le pré-traitement.
« Negative » désigne les cultures cellulaires qui ont été incubées pendant 20 minutes dans du milieu frais et non dans H₂O₂.

pharmacologiques sont utilisés, les quantités de p38-P semblent rester constantes entre 1h40 et 3h40 de récupération. Après 23h40 de récupération, on n'observe plus de forme phosphorylée de p38 avec l'inhibiteur BM15766, tandis qu'une faible quantité de p38-P peut encore être observée dans le cas du TR.

Ces observations correspondent avec les résultats publiés récemment par notre laboratoire (Mathay et al, 2008) ; les 20 minutes de traitement avec H₂O₂ induisent bien une réponse cellulaire sous forme de phosphorylation de la MAPK p38. Cette activation de p38 se maintient ensuite lors des temps de récupération ; mais là où notre précédente publication montre des quantités de p38-P qui restent constantes et ne diminuent qu'à partir de 3h40 de récupération, nous observons ici des fluctuations de p38-P entre l'exposition à H₂O₂ et les 3h40 de récupération.

Parallèlement à cette activation de p38, on observe aussi une production du facteur de croissance HB-EGF après 3h40 de récupération, dans les conditions comportant les inhibiteurs pharmacologiques BM15766 et TR. Ici aussi, ces observations corroborent les résultats déjà obtenu précédemment au laboratoire (Mathay et al, 2008).

Cependant, il est intéressant de noter la faible détection de HB-EGF dans les conditions contrôle T0 avec le TR. Il s'agit des cellules qui n'ont subi que les 24 heures de pré-traitement avec l'inhibiteur TR, sans peroxyde d'hydrogène.

3.3 CONCLUSION

Il semble donc que le fait de soumettre nos cultures de kératinocytes à un stress oxydatif, tout en inhibant de manière enzymatique la biosynthèse du cholestérol, provoque des réponses cellulaires similaires à une extraction du cholestérol membranaire.

Cependant, ces réponses cellulaires ne sont pas les mêmes selon que l'on utilise le TR ou le BM15766. Nous avons donc décidé de comparer les effets de ces deux inhibiteurs couplés au stress oxydatif.

Nous nous sommes aussi demandé ce qu'il se passerait si on prolongeait ce traitement associant le stress H₂O₂ aux inhibiteurs pharmacologiques.

4. Comparaison de l'impact des inhibiteurs pharmacologiques associés au stress oxydatif sur des périodes allant de 20 minutes à 4 heures.

4.1 EXPERIENCE

De la même manière que dans l'expérience précédente, nous avons incubé pendant 24 heures nos cellules dans du milieu de culture contenant 0,2% de DMSO, avec ou sans inhibiteurs BM15766 ou TR à 1 µM. Après ce pré-traitement, les milieux sont remplacés par des milieux similaires qui contiendront ou non 200 µM de peroxyde d'hydrogène. La durée d'exposition varie entre 20 minutes et 4 heures (voir Figure III-5).

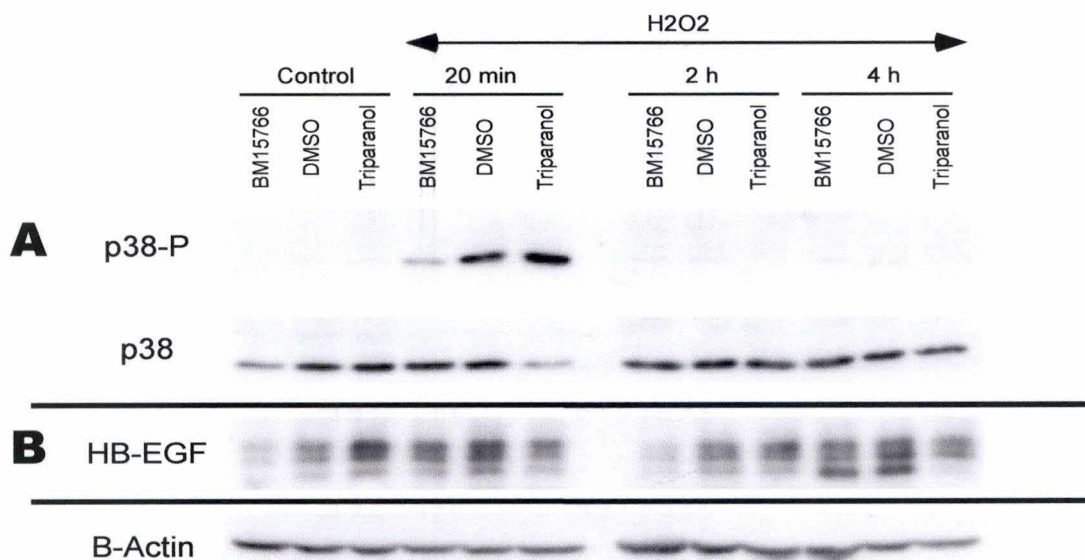


Figure III-6 : Analyse protéique par Western blot de l'association d'inhibiteurs pharmacologiques (BM15766 ou TR) et d'une exposition plus ou moins longue au stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Des cultures de kératinocytes humains approchant de l'état de confluence, subissent un pré-traitement de 24 heures dans du milieu Epilife®- qui comprend soit du DMSO 0,2% seul (qui servira de contrôle de l'effet inhibiteur), soit du DMSO 0,2% avec un inhibiteur pharmacologique (BM15766 ou TR) à 1 µM. Après ce pré-traitement, les cellules reçoivent du milieu frais de même composition avec 200 µM de H₂O₂ pendant respectivement 20 minutes, 2 heures et 4 heures. On gardera des cultures, que l'on nommera T0, qui ne verront pas de H₂O₂ et qui serviront de contrôle de l'effet H₂O₂.

On analyse les effets d'un tel traitement sur la voie MAPK p38 (A) et sur la production de HB-EGF (B). Le contrôle de charge est effectué par la β-actine.

4.2 OBSERVATIONS (VOIR FIGURE III-6)

4.2.1 *Phosphorylation de p38*

Nous venons de voir qu'une incubation de 20 minutes avec du peroxyde d'hydrogène à 1 mM pouvait induire une phosphorylation de la MAPK p38. Il apparaît non seulement que ce phénomène est aussi possible avec une concentration plus faible de H₂O₂ (200 µM). Cette activation de p38 n'est plus observable dès 2 heures d'incubation avec le peroxyde d'hydrogène. C'est donc un phénomène qui se produit très rapidement.

Comme dans l'expérience précédente, on observe des différences dans la quantité de p38-P selon l'utilisation d'un inhibiteur particulier ou non. Lorsqu'on compare avec la condition contrôle (DMSO), l'inhibiteur BM15766 semble atténuer cette phosphorylation alors qu'au contraire, le TR semble la favoriser.

Afin de s'assurer que cette phosphorylation de p38 est bien due au stress oxydatif, nous avons également analysé les cultures qui n'avaient pas reçu d'exposition à H₂O₂ (Negative) (résultats non montrés). Il n'y a strictement aucun signal d'activation de p38.

4.2.2 *Production de HB-EGF*

Concernant le facteur de croissance HB-EGF, nous avons pu observer le même effet que lors de l'expérience précédente, à savoir une production de HB-EGF en présence de l'inhibiteur TR (et dans une moindre mesure en condition DMSO) mais sans application de stress avec H₂O₂.

Dans le cas où les cellules sont incubées en présence de H₂O₂, la production de HB-EGF est effective dès 20 minutes. Cependant, les cultures incubées en présence de l'inhibiteur TR présentent un signal moins important que dans les conditions contrôle DMSO. Après 2 heures d'incubation, les signaux HB-EGF des 3 conditions (BM15766, DMSO et TR) semblent plus faibles qu'après 20 minutes. Néanmoins, après 4 heures, on retrouve des quantités de HB-EGF similaires à celles observées après 20 minutes.

4.3 CONCLUSION

Il s'avère donc que, dans le cas d'une association d'inhibiteurs pharmacologique avec un stress oxydatif, la réaction de phosphorylation de la MAPK p38 est quelque chose de très rapide. Dans cette optique, une même étude portant sur des temps d'exposition inférieurs à 20 minutes serait intéressante.

5. Comparaison d'une incubation inférieure à 20 minutes d'inhibiteurs pharmacologiques couplés à un stress oxydatif.

5.1 EXPERIENCE

D'une manière générale, il s'agit de reproduire l'expérience décrite au point 4.1 mais avec quelques différences. Premièrement, au moment d'effectuer le pré-traitement de 24 heures, une culture sera maintenue sans inhibiteur, sans DMSO et sans H₂O₂. Il s'agit d'une culture contrôle pour étudier l'effet du pré-traitement (DMSO / DMSO + TR / DMSO + BM15766)

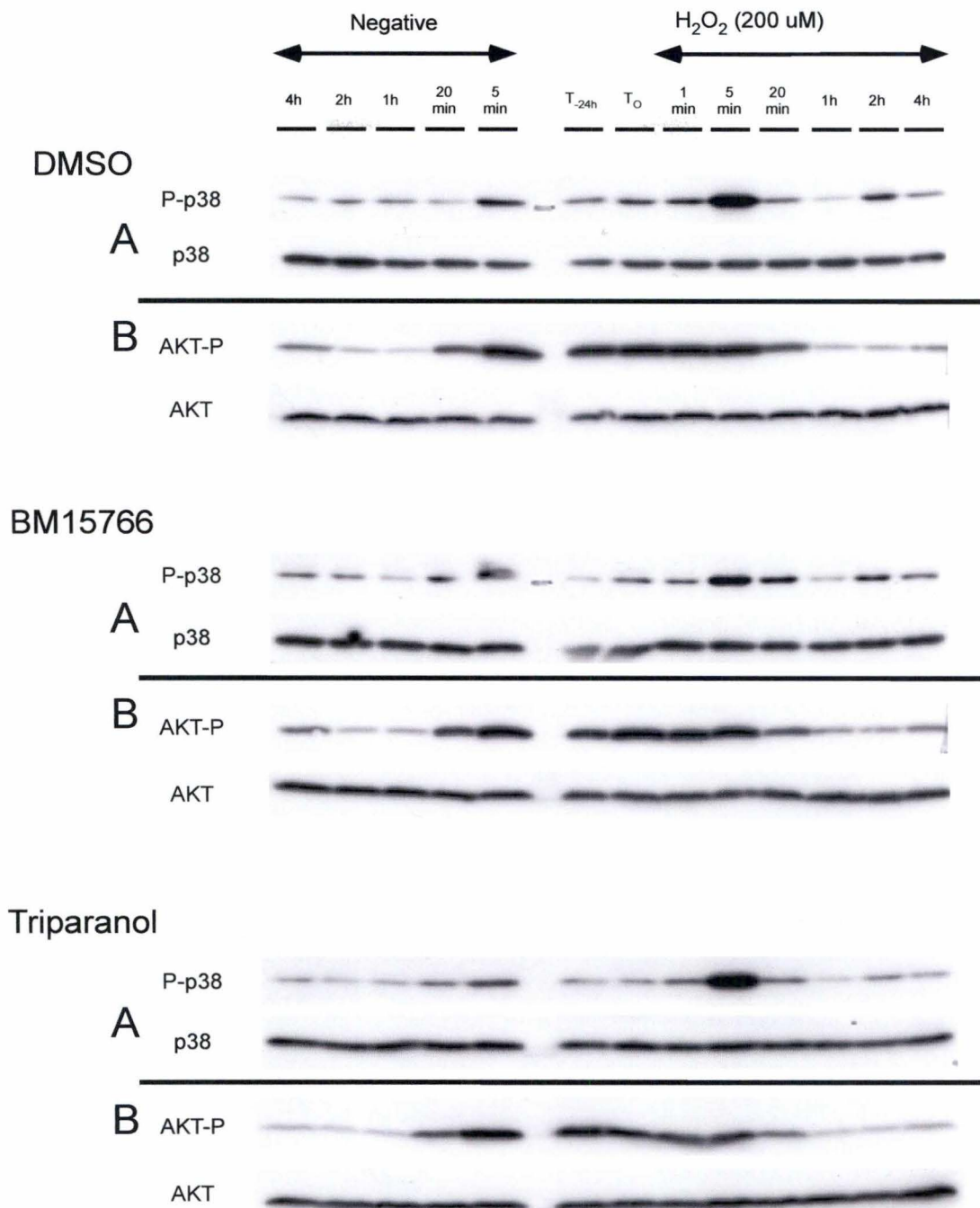


Figure III-8 : Analyse Protéique par Western blot de l'association d'inhibiteurs pharmacologiques (BM15766 ou TR) et d'un stress oxydatif court.

Lorsque les cultures cellulaires de kératinocytes humains approchent de l'état de confluence, elles subissent un pré-traitement de 24 heures dans du milieu Epilife®- qui comporte du DMSO 0,2% soit seul (contrôle de l'effet inhibiteur), soit avec un inhibiteur (BM15766 ou TR). Afin de contrôler l'incidence de ce pré-traitement, des cultures, que l'on nommera T_{-24h}, ne le recevront pas. Les cellules qui ne verront que ce pré-traitement seront quant à elles appelées T₀. Pour les autres cultures cellulaires, on les incube avec du nouveau milieu de même composition (DMSO 0,2% seul ou avec un inhibiteur) accompagné ou non de H₂O₂ à 200 µM pour des périodes allant de 1 minute à 4 heures.

On étudie ainsi les effets d'un tel traitement sur la voie MAPK p38 (A) et sur la voie AKT (B) selon le timing d'exposition à H₂O₂ ou au milieu frais (Negative).

sur les cellules. On l'appellera « T-24h ». Ensuite, des temps d'incubation avec le peroxyde d'hydrogène beaucoup plus courts sont étudiés (1 minute et 5 minutes) (voir Figure III-7).

5.2 OBSERVATIONS (VOIR FIGURE III-8)

5.2.1 *Phosphorylation de p38*

Tout d'abord, on s'aperçoit que, à l'exception de BM15766, les 24 heures de pré-traitement ne semblent pas jouer un rôle dans la phosphorylation de p38.

Ensuite, il semble que le temps de mise en place de cette réponse au stress se produise après 5 minutes d'incubation. Après 1 minute, on n'observe pas de grande différence avec les contrôles T0 et T-24h.

Enfin, comme nous l'avions déjà remarqué au point précédent, le rôle du peroxyde d'hydrogène dans ce phénomène de phosphorylation semble varier selon l'inhibiteur. Dans le cas du contrôle DMSO et de l'inhibiteur TR pour une exposition de 5 minutes (temps le plus intéressant), il est clair que H₂O₂ favorise l'activation de la MAPK p38 en comparaison avec la condition négative (pas de H₂O₂) pour une même période. Cependant, dans le cas de l'inhibiteur BM15766, il ne semble pas y avoir de différence entre la condition négative 5 minutes et la condition H₂O₂ 5 minutes. De plus, si on compare le spot H₂O₂ 5 minutes en condition DMSO avec son homologue traité avec BM15766, il semble que ce dernier soit moins important. BM15766 aurait donc un effet inhibant l'activation de p38 contrairement au TR. Pour s'en assurer, ces échantillons vont être déposés sur un même gel afin de pouvoir être comparés.

5.2.2 *Déphosphorylation de AKT*

Comme mentionné précédemment, le facteur AKT présente un phénomène de déphosphorylation dans le cas d'extraction du cholestérol membranaire.

Il semble que, dans le cas d'une exposition au peroxyde d'hydrogène comme dans contrôle (Negative), on puisse observer pour nos trois conditions (DMSO / BM15766 / TR) un tel phénomène de déphosphorylation de AKT. Les formes AKT-P, lors d'expositions de 1 minute et 5 minutes, apparaissent similaires aux contrôles T0 et T-24h. On observe ensuite, pour toutes conditions d'inhibiteur et de stress oxydatif confondus, une légère diminution du signal après 20 minutes de traitement pour diminuer plus franchement par la suite.

5.3 CONCLUSION

Ces résultats nous confirment ce que nous avons déjà observé : l'association d'inhibiteurs avec un stress oxydatif semble induire un type de réponse cellulaire similaire à celui observé dans le cas de la déplétion du cholestérol membranaire. Cette réponse cellulaire semble se mettre en place de manière très rapide : on observe une activation de p38 et une déphosphorylation de AKT après 5 minutes d'exposition. Par ailleurs, dans le cas contrôle comme pour la condition TR, il apparaît que le pré-traitement de 24 heures à lui seul ne suffit pas pour induire des modifications sur l'état de phosphorylation de p38 ou de AKT. Ce qui ne semble pas le cas de la condition BM15766, mais on se rappellera que l'utilisation seule de cet inhibiteur (à une concentration de 1 µM) avait induit une faible activation de p38 ainsi qu'une faible déphosphorylation de AKT (voir point 2).

Il serait cependant judicieux de pouvoir distinguer les effets dus aux inhibiteurs pharmacologiques des effets dus au stress oxydatif.

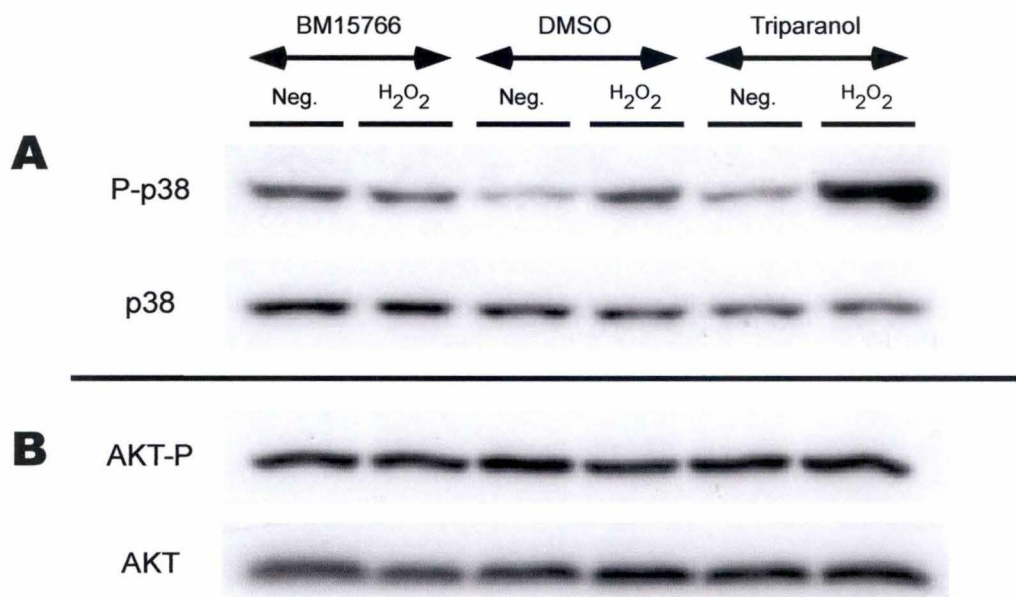


Figure III-9 : Analyse protéique par Western blot de l'association d'inhibiteurs pharmacologiques (BM15766 ou TR) et de stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène à très court terme (5 minutes).

Après 24 heures de traitement (DMSO 0,2% avec ou sans inhibiteur) sur des cellules proches de la confluence, on leur change le milieu pour les incuber avec du milieu frais de même composition avec ou sans peroxyde hydrogène à 200 μ M pour une durée de 5 minutes.

On compare ainsi les effets que peuvent avoir les inhibiteurs pharmacologiques, avec ou sans H₂O₂ sur la voie de signalisation MAPK p38 (A) et sur la voie AKT (B).

6. Comparaison des effets dus aux inhibiteurs pharmacologiques des effets dus au stress oxydatif après 5 minutes d'exposition.

En reprenant les mêmes extraits protéiques qu'au point précédent, et en les déposant sur le gel de Western blot de manière à pouvoir directement comparer les cultures ayant subi ou non un stress oxydatif et ce, selon les inhibiteurs ; il y a moyen de vérifier les différences d'action entre les inhibiteurs dans la phosphorylation de p38 (voir Figure III-9).

6.1 OBSERVATIONS

Comme déjà observé à deux reprises, le traitement au peroxyde d'hydrogène semble favoriser la phosphorylation de p38 pour les conditions DMSO et TR.

Quant à AKT, il reste sous forme phosphorylé, quelles que soient les conditions d'inhibiteur ou de stress oxydatif.

6.2 CONCLUSION

On pourrait même ajouter que le TR jouerait également un rôle dans cette activation de p38. Par contre, les quantités de formes phosphorylées de p38 semblent constantes dans le cas de l'utilisation de l'inhibiteur BM15766, que l'on soit dans le cas d'une exposition au stress oxydatif ou pas. On dirait même que le peroxyde d'hydrogène n'active pas plus p38 qu'il ne l'est déjà par l'action seule de l'inhibiteur. Comme rappelé au point précédent, il avait déjà été remarqué que BM15766 seul pouvait induire une faible phosphorylation de p38.

Globalement, on peut se demander si l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques est une technique assez efficace pour empêcher la production de cholestérol. En effet, pour pouvoir apprécier correctement l'importance et le rôle du cholestérol au niveau de la physiologie des kératinocytes, il est utile de voir ce que l'absence de cholestérol provoque. Mais, jusqu'à présent, et sauf apparemment dans le cas de l'inhibition de DHCR-7, les effets observables sont surtout le résultat de l'exposition au stress oxydatif. Ajoutons à cela que l'on ne sait pas non plus si ces inhibiteurs ne vont pas créer d'autres interactions au sein de la cellule.

Afin de s'assurer d'une totale inactivité des enzymes DHCR-7 et DHCR-24, nous avons décidé de tenter une autre approche : empêcher leur production en détruisant leurs ARNm correspondant par la technique d'ARN interférents.

7. Analyse de l'inhibition des enzymes DHCR-7 et DHCR-24 par la technique d'ARN interférents.

La technique d'ARN interférents permet de ne cibler spécifiquement que le transcrit ARNm qui correspond aux enzymes qui nous intéressent. C'est donc une technique très spécifique. De cette manière, on évite tous les effets collatéraux des inhibiteurs pharmacologiques sur la physiologie de la cellule.

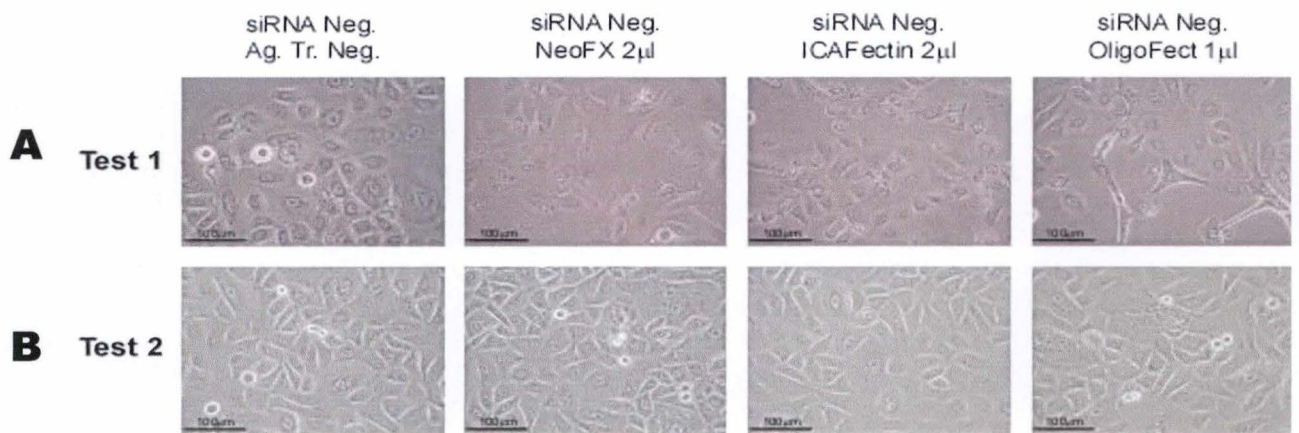


Figure III-10 : Morphologie des kératinocytes observés au microscope en contraste de phase au grossissement 40x après la transfection avec le volume le plus important d'agent de transfection (2 μ l). Trois agents de transfusions étaient comparés (NeoFX, ICAfectine et Oligofectamine). Le siRNA négatif est sensé ne rien reconnaître, donc ne pas affecter la cellule. Il sert de contrôle négatif.

(A) Lors du premier test de transfection (Test 1), les cellules issues de cultures secondaires ont été directementensemencées dans les puits.

(B) Lors du deuxième essai (Test 2), on a remis ces cellules en culture avant de les ensemenecer afin qu'elles puissent re- proliférer.

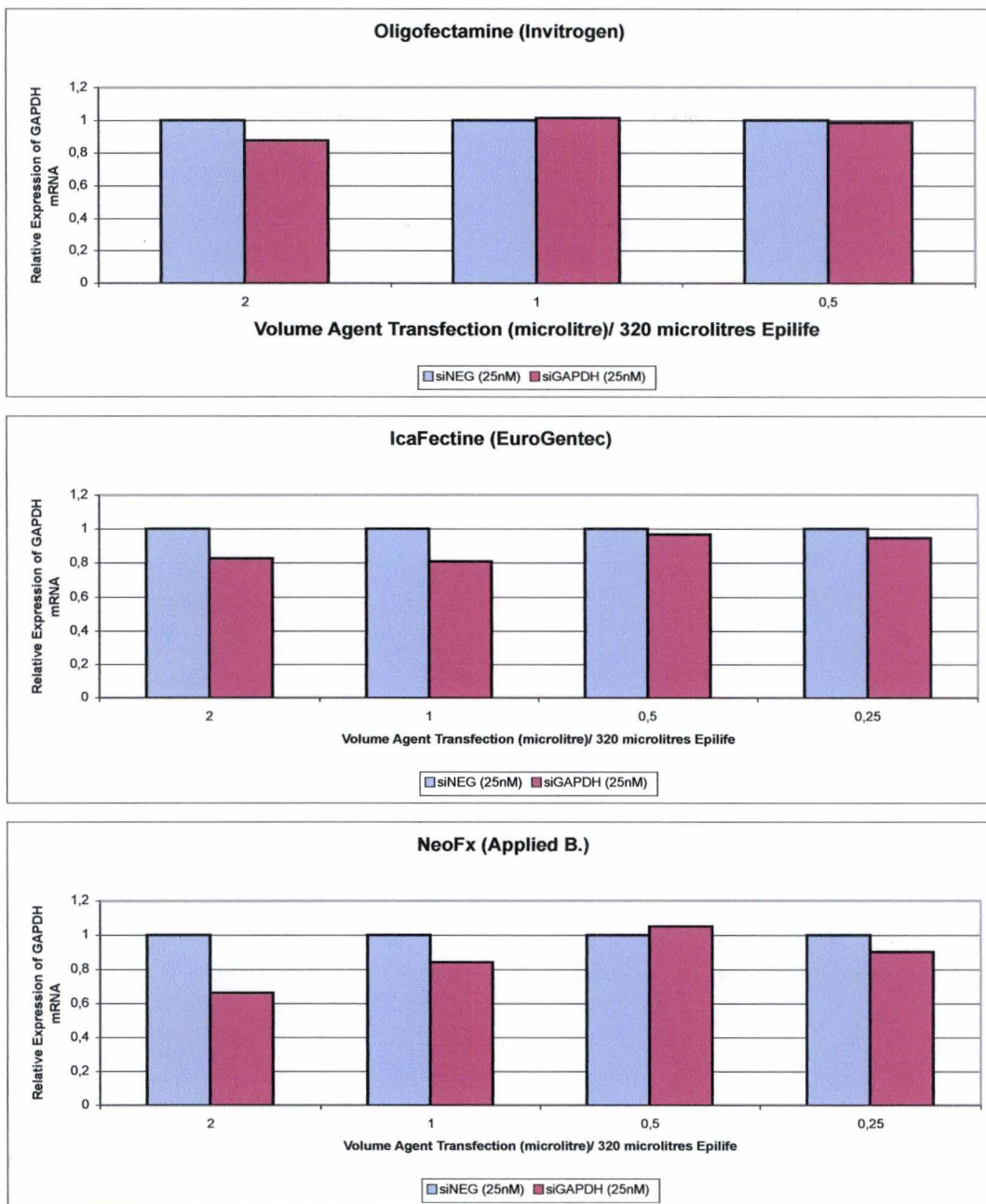


Figure III-11 : Analyse par real-time PCR des résultats de la transfection des siRNA GAPDH et Négatifs.

Comparaison des résultats obtenus selon les différents volumes (2 µl, 1 µl, 0.5 µl et 0.25 µl) de 3 agents de transfection : Oligofectamine (A), NeoFX (B) et ICAfectine (C).

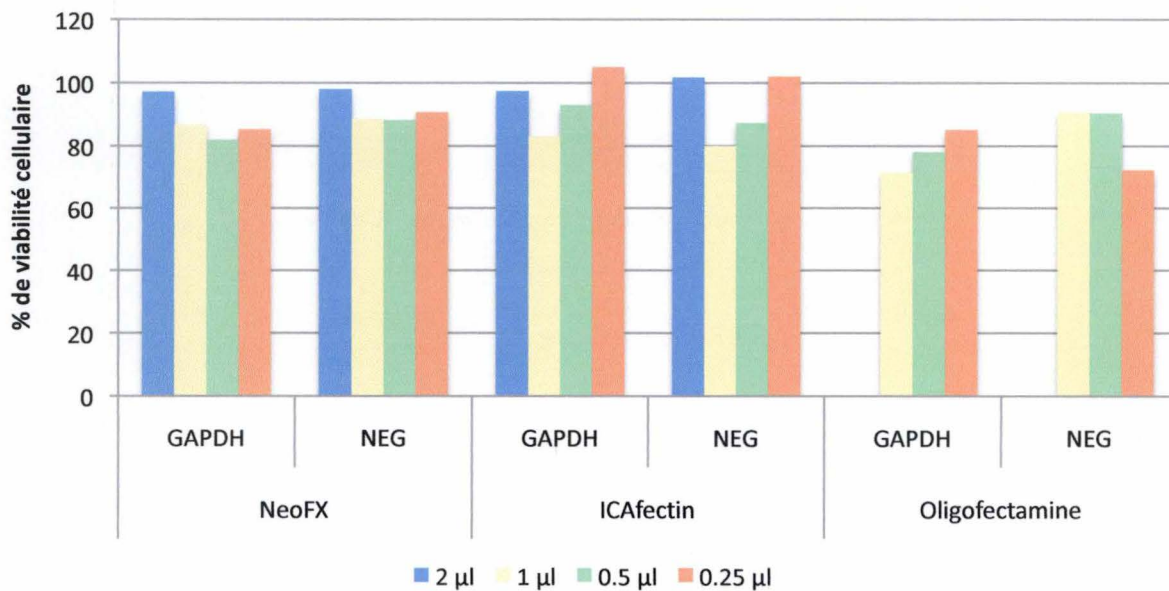


Figure III-12 : Etude de la viabilité cellulaire de cultures confluentes de kératinocytes suite à la transfection de siRNA.

Les cellules ont été transfectées 6 heures avec 25 nM de siRNA GAPDH ou Négatif et selon différents volumes (2 µl, 1 µl, 0.5 µl ou 0.25 µl) de 3 agents de transfection (NeoFX, ICAfectin et Oligofectamine). L'analyse de ces résultats obtenus par le test MTT se fait en comparaison avec des cellules sans agent de transfection.

7.1 MISES AU POINT

Comme on démarre avec une nouvelle technique, il est important d'effectuer des mises au point afin d'affiner et de perfectionner les conditions d'expérimentation. Trois champs variables s'offrent à nous : les conditions de culture de nos kératinocytes, l'agent de transfection et le volume de ce dernier par puits. En effet, l'état dans lequel se trouvent les cellules qui vont être transfectées est primordial pour la tenue de la manipulation. De même la nature et le volume de l'agent de transfection peuvent jouer un rôle plus ou moins néfaste sur la viabilité des cellules.

7.1.1 *Importance des conditions de culture*

Lors d'un premier essai de transfection, les cellules de culture secondaires congelées ont été directementensemencées dans les puits. Lorsque ces cultures arrivent à confluence, elles sont transfectées durant 6 heures avec un des 2 siRNA testés : soit celui de la GAPDH, soit un siRNA négatif qui ne doit rien cibler et qui servira ainsi de contrôle négatif. On a également choisi de tester 3 agents de transfection : Oligofectamine (Invitrogen), NeoFX (Applied) et ICAfectine (Eurogentec) et selon différents volumes par puits (2 µl, 1 µl, 0.5 µl et 0.25 µl).

L'analyse de l'expression relative de quantité d'ARNm de la GAPDH est ensuite réalisée par real-time PCR (résultats non-montrés). Aucune différence significative n'est observée. Par ailleurs, l'observation des cultures au microscope nous montre des cellules à la morphologie affectée et qui présentent une rétraction cellulaire (voir Figure III-10, A).

Parce que l'état prolifératif favorise la transfection de cellules en culture, nous avons décidé de laisser les cellules issues de cultures secondaires retrouver leur pouvoir de prolifération. Pour cela, on démarre une mise en culture tertiaire dans un grand volume (T175) et, lorsque les cellules sont en passe d'atteindre le stade de confluence, on les trypsinise et on les ensemece dans les puits.

Lors du deuxième test, avec les mêmes conditions de transfection mais avec des conditions de culture différentes, l'analyse morphologique des cellules montre qu'elles ont un aspect moins étiré et une forme plus polyédrique (voir Figure III-10, B).

7.1.2 *Choix d'un agent de transfection*

Une fois les conditions de cultures établies, il reste à choisir l'agent de transfection le plus adapté ainsi que son volume.

L'analyse par PCR en temps réel de l'expression relative d'ARNm de la GAPDH sur les échantillons de ce Test 2 nous montre un effet -faible- de diminution, principalement avec les agents NeoFX et Oligofectamine. L'agent ICAfectine ne montre aucun effet significatif (voir Figure III-11).

Un autre choix reste à déterminer : le volume d'agent de transfection utilisé. Les données real-time nous montrent que c'est avec les plus grands volumes de NeoFX et d'Oligofectamine que les effets de diminution les plus intéressants sont observés. Mais ces grands volumes d'agents de transfection ne portent-ils pas atteinte à la viabilité cellulaire ?

Pour s'en assurer, un test MTT a été réalisé. La Figure III-12, qui reprend les résultats de pourcentage de viabilité cellulaire en fonction des différentes conditions de transfection (agent de transfection et volume utilisé), montre que l'utilisation de grands volumes (2 µl) de NeoFX ne semble pas induire de mort cellulaire, quel que soit le siRNA employé. Par contre, dans le cas de l'Oligofectamine, où le plus grand volume utilisé est 1 µl, on observe une diminution plus importante de la viabilité cellulaire.

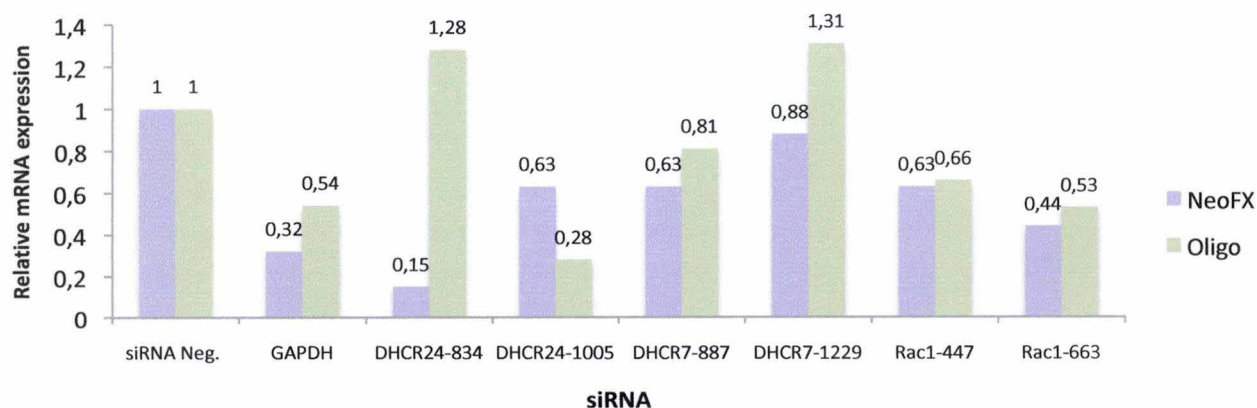


Figure III-13 : Expression relative de la quantité de transcrits selon l'agent de transfection utilisé et selon le type de siRNA employé.

Des cellules congelées à -180°C sont mises en culture dans des bouteilles T175. Lorsqu'elles sont en passe d'atteindre le stade de confluence, on les trypsinise et on les enseme. Elles sont transfectées 24 heures après.

Deux agents de transfection sont comparés : NeoFX(Applied) et Oligofectamin (Invitrogen). Deux siRNA par ARNm ciblés sont conçus et testés : DHCR24-834 et DHCR24-1005 pour DHCR-24, DHCR7-887 et DHCR7-1229 pour DHCR-7 ainsi que Rac1-447 et Rac1-663 pour Rac-1. Le siRNA Negative sert de contrôle, il s'agit d'un siRNA conçu pour ne rien reconnaître.

Les valeurs obtenue lors de l'analyse real-time sont normalisées par rapport à l'HKG 36B4.

Au vu de ces résultats, il semble que l'agent de transfection NeoFX avec les volumes les plus importants conseillés soit le plus intéressant. L'Oligofectamine ne peut cependant pas être écartée pour autant.

Afin d'arrêter un choix définitif, nous avons décidé d'effectuer une nouvelle transfection avec non seulement le siRNA qui cible la GAPDH mais aussi des siRNA visant nos enzymes DHCR-24 et DHCR-7, ou des siRNA ciblant la protéine G Rac1. Pour chaque ARNm que l'on veut atteindre, deux siRNA vont être construits. Chacun ciblera une partie différente du messenger.

La figure III-13 représente les variations d'expression des différents gènes cibles en fonction des siRNA sensés les inhiber et selon l'agent de transfection utilisé. Il apparaît clairement que les quantités relatives d'expression des gènes cibles sont moins conséquentes lorsqu'on transfecte avec l'agent NeoFX. Cela confirme nos précédentes observations. L'agent de transfection NeoFX est donc définitivement choisi.

7.1.3 Choix du siRNA le plus efficace

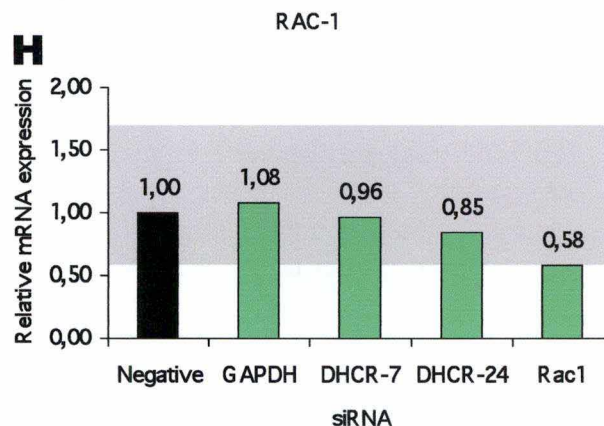
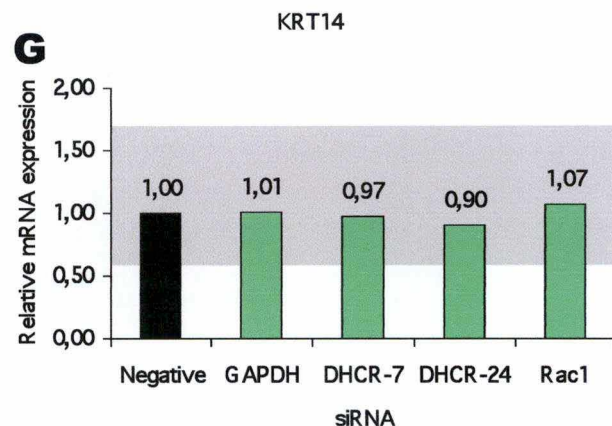
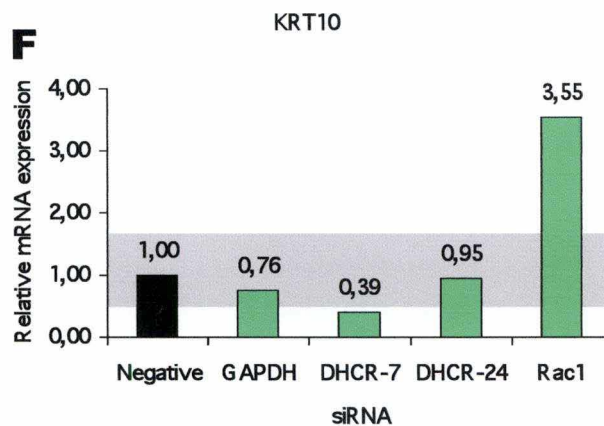
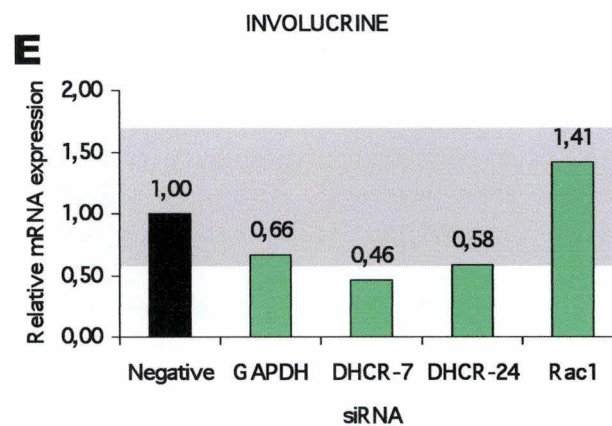
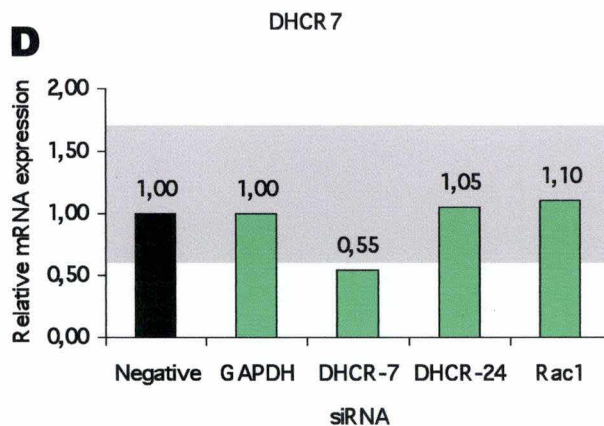
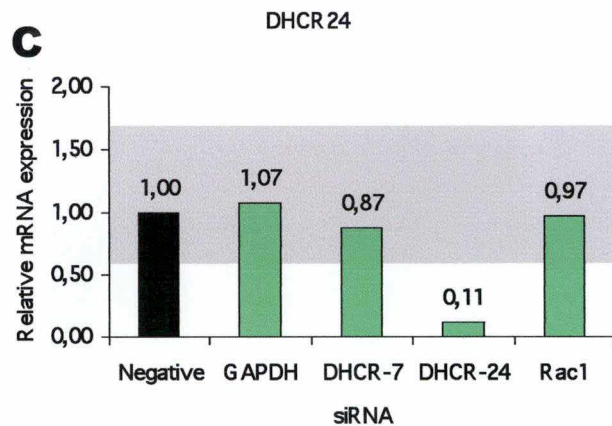
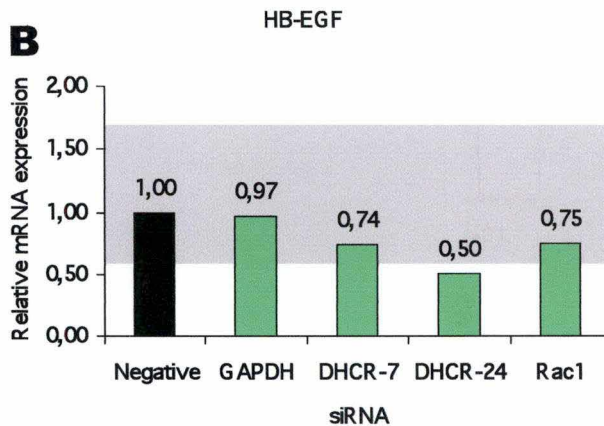
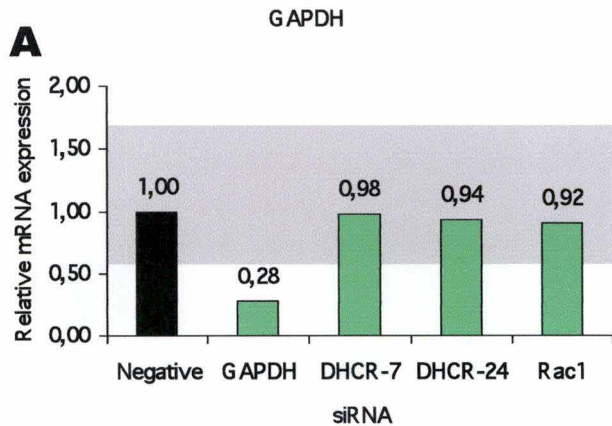
Comme mentionné ci-dessus, nous utilisons deux sortes de siRNA par ARNm que l'on veut cibler. Ces siRNA sont conçus pour reconnaître une partie différente du messenger. Outre les transcrits de DHCR-7 et DHCR-24, nous allons également analyser les modulations d'expression transcriptionnelle de Rac1. Il s'agit d'une petite protéine G qui appartient à la famille des Rho GTPases et qui régule des fonctions cellulaires comme l'adhésion cellulaire ou la différenciation épidermique. L'inhibition de Rac1 par siRNA a déjà été investiguée dans notre laboratoire (Nikolova et al, 2007 et 2008) et elle l'est encore à l'heure actuelle. La comparaison de nos résultats inhibant Rac1 avec les données déjà récoltées est une manière supplémentaire de nous assurer de l'efficacité de la transfection.

La Figure III-13 montre également les différentes variations d'expression d'un même transcrit selon la partie de l'ARNm qui est ciblée. Il s'en dégage que certains siRNA semblent plus efficaces que leurs « alter ego ». Dans le cas de DHCR-24, nous choisissons le siRNA DHCR24-834, tandis que pour DHCR-7, ce sera le siRNA DHCR7-887 qui est sélectionné. Enfin, pour Rac1, nous allons favoriser le siRNA Rac1-663. Dorénavant, dès que nous mentionnerons les siRNA pour ces trois gènes, il s'agira de ces trois-là.

Maintenant que les grandes lignes des conditions de transfection semblent tracées, il est intéressant de pouvoir vérifier l'efficacité de cette transfection. On effectue cela en analysant les quantifications relatives de l'expression de gènes cibles après la transfection par real-time PCR (voir Figure III-14).

7.2 ESTIMATION DE L'EFFICACITE DE LA TRANSFECTION

Afin de nous assurer que les variations de quantités d'ARNm observées sont bien dues à l'action de siRNA, nous avons calculé une « zone de sécurité », représenté en gris sur les graphes de la figure III-14. Il s'agit d'une zone dans laquelle les expressions d'ARNm sont susceptibles d'être influencées par la variation naturelle des housekeeping genes employés pour la normalisation des données. Lorsque les valeurs se trouvent en dehors de cette zone grise, alors on peut estimer que leur variation est bien due à l'effet des siRNA. On pourra alors dire que les siRNA ont un effet certain sur le gène étudié.



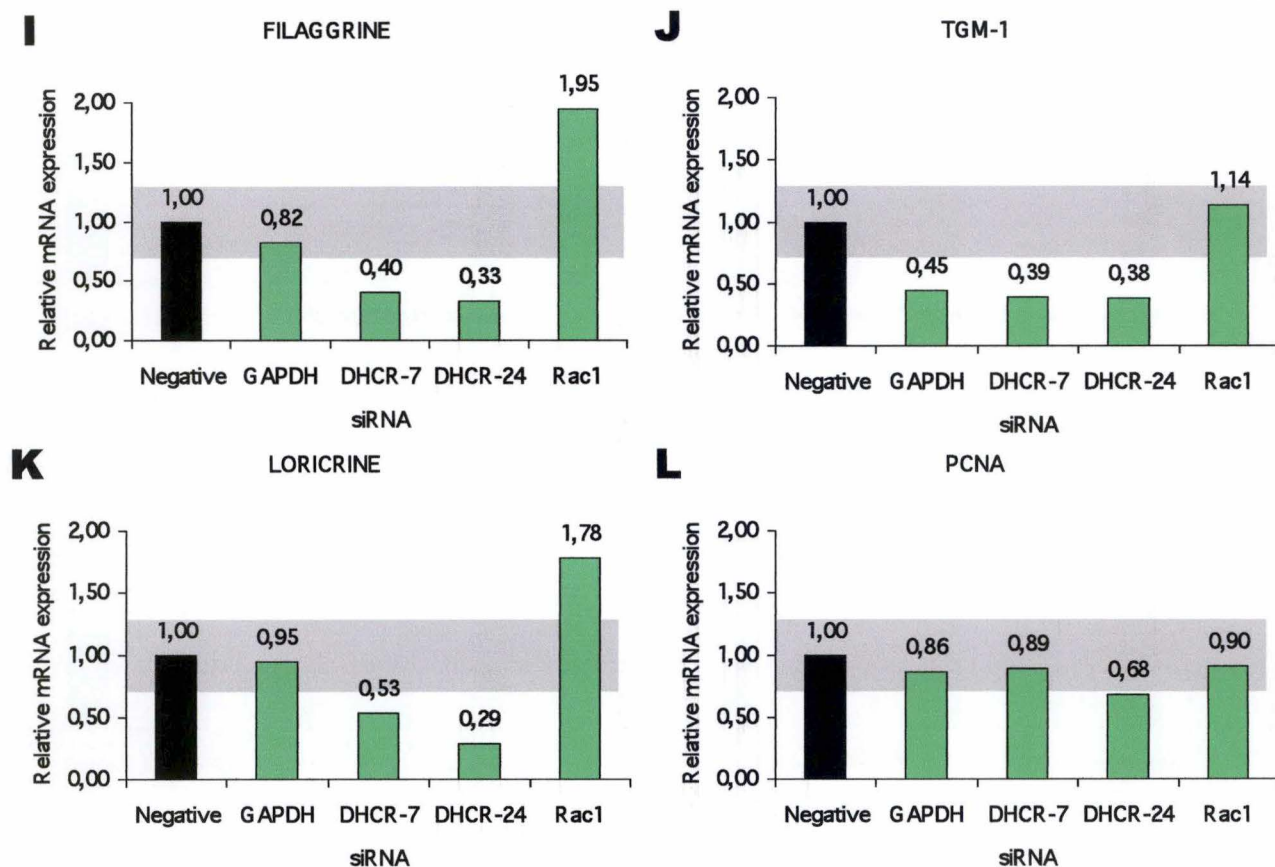


Figure III-14 : Représentations graphiques de l'expression transcriptionnelle relative d'ARN messager de différents gènes suite à une transfection de différents siRNA (siRNA Negative, siRNA GAPDH, siRNA DHCR-7, siRNA DHCR-24 et siRNA Rac1) avec l'agent de transfection NeoFX (Applied).

Des cellules congelées à -180°C sont remises en culture dans une T175 afin qu'elles puissent re-proliférer. Lorsque le stade de confluence est presque atteint, elles sont trypsinisées et ensemencées. On effectue la transfection 24 heures après. Les cellules sont transfectées 4 heures à 37°C avec les différents siRNA. Une fois ce laps de temps écoulé, on aspire le milieu et elles reçoivent du milieu Epilife®- sans antibiotique frais qu'on laisse en place 48 heures.

Les valeurs d'expression relative obtenues lors de l'analyse real-time sont normalisées avec trois housekeeping genes (TBP, 36B4 et RPL13).

La zone grise correspond à la zone dans laquelle les valeurs des quantités d'ARNm sont susceptibles d'être influencées par la variation naturelle des housekeeping genes utilisés pour la normalisation des données. En dehors de cette zone, on considère que les variations d'expression transcriptionnelles observées sont dues aux siRNA.

En regardant l'expression du transcrite de la GAPDH, nous pouvons observer l'amélioration de cette inhibition au fur et à mesure des mises au point : de 30% d'inhibition lors des premières expériences, nous arrivons à atteindre un taux de plus de 70% d'inhibition. Nous pouvons aussi voir que l'utilisation des autres siRNA ne semble pas avoir d'impact sur l'expression de la GAPDH (voir Figure III-14 A).

La transfection avec le siRNA DHCR-24 confère une diminution intéressante de l'expression de cette enzyme : on observe une inhibition de près de 90% (voir Figure III-14 C). Par contre, le siRNA DHCR-7 présente seulement 45% d'inhibition sur l'expression de DHCR-7 (voir Figure III-14 D).

Quant à l'expression de Rac1, on n'observe de diminution certaine (en dehors de la zone de sécurité) que dans le cas de l'utilisation du siRNA Rac1. Cette diminution est de l'ordre de 42% (voir Figure III-14 H)

7.3 IMPACT SUR LES AUTRES GENES

7.3.1 *Les marqueurs de différenciation*

Le marqueur de différenciation précoce KRT14 présente une expression assez stable et ce, quel que soit le siRNA employé (voir Figure III-14 G).

Lorsque l'on regarde les marqueurs de différenciation tardive (KRT10, involucrine, loricrine ou filagrine), on s'aperçoit que l'utilisation du siRNA GAPDH peut provoquer une diminution de l'expression de ces marqueurs, mais elle se trouve toujours dans la zone grise (voir Figure III-14 E, F, I et K). On remarque que l'utilisation du siRNA DHCR-7 induit une diminution certaine de l'expression pour les 4 marqueurs étudiés, tandis que le siRNA DHCR-24 n'apporte de modification que dans le cas de la loricrine et de la filagrine. Enfin, l'emploi du siRNA Rac1 semble quant à lui provoquer l'effet inverse, on observe ainsi une augmentation de l'expression des marqueurs étudiés (bien qu'il ne quitte pas la zone grise dans le cas de l'involucrine). Il est à noter que l'augmentation importante de l'expression de KRT10 sous l'emploi de siRNA Rac1 correspond à ce qui avait déjà été observé lors de l'étude menée dans notre laboratoire (Nikolova et al, 2008).

7.3.2 *Les marqueurs de prolifération*

A l'exception du siRNA DHCR-24, aucun siRNA ne semble avoir d'influence sur PCNA (voir Figure III-14 L). Par contre, on observe une diminution d'environ 60% de l'expression de TGM-1 lors de l'utilisation des siRNA GAPDH, DHCR-7 et DHCR-24 (voir Figure III-14 J).

7.3.3 *La production de HB-EGF*

Puisque nous avons observé la production du facteur HB-EGF lors de l'association d'inhibiteurs pharmacologiques des enzymes cibles avec un stress oxydatif, nous nous sommes demandé ce qu'il en était si on utilisait maintenant des siRNA DHCR-7 et DHCR-24. Nous n'observons qu'une diminution de moitié de l'expression de HB-EGF dans le cas de l'utilisation du siRNA DHCR-24 (voir Figure III-14 B).

7.4 CONCLUSION

Une inhibition à l'aide de siRNA ciblant les enzymes DHCR-24 et DHCR-7 semble induire un arrêt de la prolifération cellulaire tout en empêchant la mise en place du processus de différenciation épidermique.

**Discussion, Conclusion &
Perspectives**

1. Discussion

Le but de ce mémoire consiste à investiguer le rôle potentiel des enzymes de la voie de biosynthèse du cholestérol sur la physiologie et sur la signalisation des kératinocytes épidermiques humains. En effet, le cholestérol, en tant que composant des plates-formes de signalisation que sont les lipid rafts, est un composant essentiel dans le processus de régulation de la physiologie des kératinocytes épidermiques. Toute perturbation de sa synthèse risque donc de perturber ces régulations.

Nous savons qu'une déplétion du cholestérol membranaire par la méthy- β -cyclodextrine (M β CD) entraîne des altérations des voies de transduction du signal. Nous nous sommes demandés si l'inhibition d'enzymes-clés de cette voie de biosynthèse du cholestérol pourrait induire des effets similaires à une déplétion de cholestérol membranaire. La première enzyme choisie est la déhydrocholestérol-réductase-7 (DHCR-7) qui catalyse la transformation de 7-déhydrocholestérol (7-DHC) en cholestérol au niveau de la voie de Kandutsch-Russel ainsi que la conversion de 7-déhydrodesmostérol en desmostérol dans la voie de Bloch. L'activité enzymatique de la DHCR-7 est inhibée par l'action de composés pharmacologiques comme le BM15766. L'autre enzyme étudiée est la déhydrocholestérol-réductase-24 (DHCR-24) qui permet la réduction de la double liaison Δ 24, transformant ainsi le desmostérol en cholestérol. La DHCR-24 permet aussi de passer de la voie de Bloch à celle de Kandutsch-Russel et est inhibée par le Triparanol (TR). Nous avons donc observé l'impact de tels inhibiteurs sur la physiologie des kératinocytes.

De précédents travaux menés au sein du laboratoire (Jans et al, 2004) font état de l'activation de voies de signalisation, comme les voies MAPK p38 et ERK1/2, lors d'un traitement par la M β CD. Nous avons incubé nos cultures cellulaires avec les inhibiteurs pharmacologiques TR et BM15766 à une concentration de 1 μ M pendant des temps variables. Seule l'inhibition de DHCR-7 a présenté une faible activation de p38 après 5 minutes de traitement (voir Figure III-2). Par ailleurs, une autre étude effectuée dans notre laboratoire montre qu'une exposition à un stress oxydatif comme le peroxyde d'hydrogène provoque des effets similaires à une déplétion en cholestérol membranaire (Mathay et al, 2008).

Lorsque nous associons l'inhibiteur pharmacologique TR avec H₂O₂, nous avons observé une activation plus marquée de p38 après 5 minutes de traitement. Cet effet est moins évident avec l'inhibiteur BM15766. Dans ce cas, nos résultats suggèrent que la phosphorylation de p38 serait due à l'inhibiteur seul, plutôt qu'à l'association inhibiteur-H₂O₂. Les effets de l'inhibiteur pharmacologique Triparanol au niveau des voies de signalisation ne sont donc observables que lorsqu'on y associe le stress oxydatif. L'inhibiteur BM15766 peut suffire à lui seul pour induire une faible activation de la voie MAPK p38.

Une étude antérieure menée dans notre laboratoire avec le Triparanol (Delescaille, 2008) montrait la nécessité d'appliquer un traitement à la M β CD pour pouvoir observer des modifications au niveau de la différenciation des kératinocytes épidermiques. Une analyse des marqueurs de différenciation lors des traitements mixtes H₂O₂-inhibiteurs pharmacologiques pourrait peut-être autoriser l'observation de modifications similaires, mais cette analyse n'a pas encore été réalisée.

Dans une deuxième partie de notre travail, pour nous démarquer des approches précédentes visant à établir le rôle de ces enzymes, nous avons changé de technique d'inhibition. Au lieu d'inhiber l'activité enzymatique de DHCR-7 et DHCR-24 de façon pharmacologique, nous

avons utilisé des siRNA capables de reconnaître et conduire vers la dégradation les transcrits de ces deux enzymes.

D'une manière générale, à l'exception de la KRT 14, l'emploi de siRNA DHCR-24 et DHCR-7 semble induire une inhibition de l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation. Cela indique que les kératinocytes dans ce cas sont dans un état d'arrêt de prolifération cellulaire, mais sans pour autant avoir enclenché le processus de différenciation. Dans l'avenir, une étude de l'impact de ces siRNA sur les voies de signalisation du kératinocyte serait intéressante à effectuer. Elle nous permettrait de comparer les siRNA avec les inhibiteurs pharmacologiques sur de mêmes bases.

Mais que sait-on de ces enzymes dans l'épiderme *in vivo* ? L'absence *in vivo* de ces deux enzymes a déjà été étudiée : plusieurs modèles de souris Knock-out pour DHCR-7 sont répertoriés (Wassif et al, 2002 ; Fitzky et al, 2001 ; Yu et al, 2004), mais tous présentent des similitudes de symptômes avec les patients atteints de SLOS. Ces souris Knock-out pour le gène *dhcr7* meurent toutes dans les 24 heures après la naissance. Bien que ces souris *dhcr7*^{-/-} présentent de nombreuses malformations structurales et biochimiques, une des causes de la mort prématurée semble liée au développement anormal des poumons. C'est ainsi que l'on observe au niveau de cet organe, une altération de la prolifération cellulaire ainsi qu'une différenciation anormale (Yu et al, 2004). Une autre hypothèse de cette létalité précoce serait l'atteinte du système nerveux central. Les cerveaux des rongeurs continuent à se développer après la naissance. Etant donné que le cholestérol est un constituant majeur de la myéline, le manque de ce stérol pourrait provoquer des déficiences dans la maturation finale du SNC. Il semble que lorsque l'on croise ces souris *dhcr7*^{-/-} avec des souris transgéniques qui expriment DHCR-7 sous le contrôle d'un promoteur spécifique du SNC, on obtient un « sauvetage » temporel des souriceaux *dhcr7*^{-/-}. En effet, ces derniers survivent entre 3 et 17 jours après leur naissance (Yu et al, 2005). Ce type d'étude nous montre qu'une des causes majeures de mort chez les souris modèles pour le SLOS se situerait dans un dysfonctionnement du SNC et ne concernait pas directement l'épiderme.

L'inhibition *in vivo* de DHCR-24 a été étudiée dès 2003 par l'équipe de Wechsler. Les souris *dhcr24*^{-/-} qu'ils ont générées sont caractérisées par une absence de cholestérol et par un taux de desmostérol proche de 99% des stérols totaux, à la fois aux niveaux sanguin et tissulaire (Wechsler et al, 2003). En 2006, une équipe japonaise a aussi créé des souris Knock-out pour le gène *dhcr24* (Mirza et al, 2006). Ces auteurs observent aussi la disparition de cholestérol et de hauts taux de desmostérol chez les souris *dhcr24*^{-/-}. Leur étude fait également état d'altérations de l'expression de marqueurs de prolifération et de différenciation au niveau de l'épiderme de ces souris KO. Ils observent en effet une répartition de l'involucrine pour le moins étonnante : marqueur de différenciation tardif, on retrouve l'involucrine exprimée dans tout l'épiderme. Quant à la filaggrine et à la loricrine, elles sont présentes en quantités très faibles. Ces auteurs observent également la présence du marqueur de prolifération PCNA, habituellement cantonné à la couche basale, au niveau de la couche épineuse. De même, les KRT 6 et 14 sont retrouvées en grandes quantités dans tout l'épiderme. Les souris *dhcr24*^{-/-} de cette étude possèdent donc un épiderme apparemment constitué de kératinocytes immatures et en état d'hyperprolifération. Les différentes anomalies de différenciation entraînent un déficit de la fonction de barrière protectrice de l'épiderme. Il semble que cette hyperprolifération soit destinée à contrer les altérations engendrées par l'absence de *dhcr24*.

On retrouve l'enzyme DHCR-24, sous le nom de la protéine (Séladin-1), dans le cadre de la recherche sur la maladie d'Alzheimer. Les personnes atteintes de cette maladie neurodégénérative présentent une sous-expression de *dhcr24* au niveau des neurones de leurs zones cérébrales touchées (Greeve et al, 2000). Il semblerait en effet qu'une quantité

particulière de cholestérol membranaire soit nécessaire pour empêcher la production du peptide amyéloïde A β , marque histopathologique de la maladie d'Alzheimer (Cramer et al, 2006). Une autre étude démontre que le rôle neuroprotecteur de DHCR-24 ne s'arrête pas simplement à la synthèse du cholestérol membranaire, mais concerne aussi la protection de la cellule contre la toxicité induite par les peptides amyéloïdes (Cecchi et al, 2007).

Par ailleurs, il semble que DHCR-24 intervienne aussi dans la régulation de la survie cellulaire. En effet, il a été rapporté que DHCR-24 empêcherait l'ubiquitination de la protéine suppresseur de tumeur p53, ce qui provoquerait une accumulation de p53 et la mise en place du mécanisme de sénescence induite par Ras. DHCR-24 aurait donc un rôle potentiel de suppression de tumeur en permettant à p53 d'enclencher un mécanisme d'apoptose (Wu et al, 2004). Au contraire, il semble également que DHCR-24 possède une activité anti-apoptotique qui inhibe l'activité de la caspase 3 au niveau de neurones (Luciani et al, 2004).

De plus, dans le cadre d'une exposition à un stress oxydatif, DHCR-24 pourrait montrer un rôle très particulier dans la mise en place de la réponse cellulaire. En cas d'exposition aiguë à un stress oxydatif, on assiste à une augmentation de l'expression de l'enzyme (et de la production de cholestérol sous-jacente), tandis qu'une exposition chronique provoque plutôt une diminution de l'expression de DHCR-24 (Kuehnle et al, 2007). Fait intéressant, des cellules présentant ainsi de faibles taux de DHCR-24 semblent également présenter des quantités réduites de p53. Il semble donc que DHCR-24 présente un double visage dans la protection contre les stress oxydatifs. Alors que la réponse suite à une exposition aiguë apparaît être liée au rôle de l'enzyme dans la production du cholestérol membranaire, l'impact d'un stress chronique viserait à diminuer l'apoptose induite par p53.

On le voit, l'implication de DHCR-24 dans la régulation du phénotype cellulaire et dans la réponse aux stress semble dépasser le simple rôle qu'on lui attribue dans la synthèse du cholestérol membranaire.

2. Conclusion

Nos observations semblent montrer qu'une inhibition pharmacologique seule de la synthèse du cholestérol n'induit pas de modifications des kératinocytes, que ce soit au niveau des voies de signalisation ou au niveau de l'expression des marqueurs de différenciation.

Par contre, une inhibition par siRNA semble induire une altération au niveau de la différenciation de l'épiderme. Cependant, les effets observés ne semblent pas suffisants pour affirmer que la voie de biosynthèse du cholestérol, et plus particulièrement les enzymes DHCR-7 et DHCR-24, interviennent de manière indiscutable dans la physiologie du kératinocyte épidermique.

3. Perspectives

Nous avons vu que l'association de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ au Triparanol permettait d'accentuer les effets de l'inhibiteur sur les voies de signalisation. Il serait instructif de vérifier ce que provoquerait l'adjonction de H₂O₂ avec les siRNA DHCR-7 et DHCR-24.

Cependant, d'après les différentes études menées au sein de notre laboratoire, la désorganisation des lipid rafts via un traitement à la M β CD participe à la mise en place de certaines réponses cellulaires au sein du kératinocyte. En effet, lorsque l'on effectue une extraction du cholestérol membranaire et qu'on laisse ensuite la cellule récupérer, on observe des modifications comme l'activation de la voie MAPK p38 (Jans et al, 2004), l'activation ligand-indépendante de l'EGFR (Jans et al, 2004 ; Lambert et al, 2006) ou encore la production de HB-EGF (Mathay et al, 2008). Par ailleurs, la précédente étude portant sur le Triparanol avait fait état de la nécessité d'un traitement préalable à la M β CD afin de pouvoir observer des altérations au niveau de la différenciation des kératinocytes (Delescaille, 2007).

Il apparaît donc intéressant de commencer par extraire le cholestérol membranaire et ensuite, lors des temps de récupération, de venir inhiber la voie de biosynthèse du cholestérol. En effet, l'inhibition de la production de « nouveau » cholestérol ne risque pas d'être préjudiciable à la cellule tant que le cholestérol membranaire reste en place et garantit le bon fonctionnement des lipid rafts. Pour cette phase d'inhibition, il semble que la technique des siRNA soit à privilégier par rapport aux inhibiteurs pharmacologiques classiques car les siRNA contrecarrent la formation des enzymes cibles de la voie de biosynthèse du cholestérol au lieu d'empêcher ces enzymes d'agir.

De cette manière, le « ré-approvisionnement » en cholestérol des membranes préalablement déplétées se trouve empêché et cela devrait permettre d'observer d'avantage de modifications de la physiologie du kératinocyte épidermique.

Bibliographie

- Anstey A (2001). Photomedicine : lessons from the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 62:123-127.
- Azurdia R M, Antsey A V and Rhodes L E (2001). Cholesterol supplementation objectively reduces photosensitivity in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *The British Journal of Dermatology* 144:143-145.
- Benhar M, Dalyot I, Engelberg D and Levitzki A (2001). Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol. Cell. Biol.* 21:6913-6926.
- Cramer A, Biondi E, Kuehnle K, Lütjohann D, Thele, K M, Perga S, Dotti C G, Nitsch R M, Ledesma M D and Mohajeri M H (2006). The rôle of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and A β generation in vivo. *The EMBO Journal*, 25:432-443.
- Cecchi C, Rosati F, Pensalfini A, Formigli L, Nosi D, Liguri G, Dichiarà F, Morello M, Danza G, Pieraccini G, Peri A, Serio M and Stefani M (2007). Seladin-1/DHCR24 protects neuroblastoma cells against A β toxicity by increasing membrane cholesterol content. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00216.x
- Delescaille P (2007). Desmostérol et physiologie du kératinocyte épidermique (Mémoire)
- Eichner R, Bonitz P and Sun T-T (1984). Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J. Cell. Biol.* 98:1388-1396.
- Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E and Mello C C (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806-811.
- Fitzky B U, Moebius F F, Asaoka H, Waage-Baudet H, Xu L, Xu, G, Maeda N, Kluckman K, Hiller S, Yu H, Batta A K, Shefer S, Chen T, Salen G, Sulik K, Simoni R D, Ness G C, Glossmann H, Patel S B and Tint G S (2001). 7-dehydrocholesterol-dependant proteolysis of HMG-CoA reductase suppresses sterol biosynthesis in a mouse model of Smith-Lemli-Opitz/RSH syndrome. *J. Clin. Invest* 108:905-915.
- Fitzky B U, Wirsch-Baumgartner M, Erdel M, Lee J N, Paik Y-K, Glossmann H, Utermann G and Moebius F F (1998). Mutations in the $\Delta 7$ -sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8181-8186.
- FitzPatrick R D et al (1998). Clinical phenotype of desmosterolosis. *Am. J. Med. Genet.* 75:145-152.
- Gniadecki R and Bang B (2003). Flotillas of lipid rafts in transit amplifying cell-like kératinocytes. *J. Invest. Dermatol* 121:522-528.
- Greeve I, Hermans-Borgmeyer I, Brellinger C, Kasper D, Gomez-Isla T, Behl C, Levkau B and Nitsch R M (2000). The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers résistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress. *The Journal of Neuroscience*, 20:7345-7352.

- Heverin M, Meaney S, Brafman A, Shafir M, Olin M, Shafaati M, von Bahr S, Larsson L, Lövgren-Sandblom A, Diczfalusy U, Parini P, Feinstein E and Björkhem I (2007). Studies of the cholesterol-free mouse: strong activation of LXR-regulated hepatic genes when replacing cholesterol with desmosterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:2191-2197.
- Holick M F (1988). Skin: site of the synthesis of vitamin D and a target tissue for the active form, 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Annals New York Academy of Science.*
- Huster D, Scheidt H A, Arnold K, Herrmann and Müller P (2005). Desmosterol may replace cholesterol in lipid membranes. *Biophysical Journal*, 88:1838-1844.
- Jans R, Atanasova G, Jadot M and Poumay Y (2004). Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *J. Invest. Dermatol.*, 123:564-573.
- Kelman Z (1997). PCNA: structure, function and interactions. *Oncogenes*, 14 : 629-640.
- Khvorova A, Reynolds A and Sumedddha D J (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115:209-216.
- Kuehnle K, Cramer A, Kälin R E, Luciani P, Benvenuti S, Peri A, Ratti F, Rodolfo M, Kulic L, Heppner F L, Nitsch R M and Mohajeri M H (2008). Prosurvival effect of DHCR24/seladin-1 in acute and chronic response to oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.*, 28:539-550.
- Lambert S, Ameels H, Gniadecki R, Hérin M and Poumay Y (2008). Internalization of EGF receptor following lipid rafts disruption in keratinocytes is delayed and dependant on p38 MAPK activation. *J. Cell. Physiol.* 217:834-845.
- Lambert S, Vind-Kezunovic D, Karvinen S and Gniadecki R (2006). Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *J. Invest. Dermatol.*, 126 : 954-962.
- Leuschner P J F, Ameres S L, Kueng S and Martinez J (2006). Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO reports*, 7 : 314-320.
- Lu X, Kambe F, Cao X, Kozaki Y, Kaji T, Ishii T and Sao H (2008). DHCR24 is a hydrogen peroxide scavenger, protecting cells from oxidative-stress-induced apoptosis doi/10.1210/en.2008-0024.
- Luciani P, Gelmini S, Ferrante E, Lania A, Benvenuti S, Baglioni S, Mantovani G, Cellai I, Ammannati F, Spada A, Serio M and Peri A (2005). Expression of the anti-apoptotic gene Selandin-1 and octreotide)induced apoptosis in GH-secreting and in non-functioning pituitary adenomas. *Journal of Clinical endocrinology & Metabolism*. Doi:10.1210/jc.2005-0633.
- Marnett L J (2000). Oxiradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361-370.
- Mathay C, Giltaire S, Minner F, Bera E, Hérin M and Poumay Y (2008). Heparin-Binding EGF-like Growth factor is induced by disruption of lipid rafts and oxidative stress in keratinocytes and participates in the epidermal response to cutaneous wounds. *J. Invest. Dermatol.*, 128:717-727.

- Minner F and Poumay Y (2008). Candidate housekeeping genes require evaluation before their selection for studies of human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, doi/10.1038/jid.2008.247.
- Mirza R, Hayasaka S, Takagishi Y, Kambe F, Ohmori S, Maki K, Yamamoto M, Murakami K, Kaji T, Zadworny D, Murata Y and Seo H (2006). *DHCR24* gene knockout mice demonstrate lethal dermatopathy with differentiation and maturation defects in the epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 126:638-647.
- Nikolova E, Mitev V, Minner F, Deroanne C F and Poumay Y (2008). The inhibition of the expression of the Small Rho GTPase Rac1 induces differentiation with no effect on cell proliferation in growing human adult keratinocytes. *J. Cell. Biochem.*, 103:857-864.
- Nikolova E, Mitev V, Zhelev N, Deroanne C F and Poumay Y (2007). The small Rho GTPase Rac1 controls normal human dermal fibroblasts proliferation with phosphorylation of the oncoprotein c-myc. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359:834-839.
- Nishino H and Ishibashi T (2000). Evidence for requirement of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in the microsomal NADPH-sterol Δ^7 -reductase system. *Biochem. Biophys.* 374:293-298.
- Pedretti A, Bocci E, Maggi and Vistoli G (2008). Homology modelling of human *DHCR24* (seladin-1) and analysis of its binding properties through molecular docking and dynamics simulations. *Steroids*, 73:708-719.
- Peus D, Vasa R A, Beyerle A, Meves A, Krautmacher C and Pittelkow M R (1999). UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 112:751-756.
- Roux Ch, Dupuis R, Horvath C and Talbot J-N (1980). Teratogenic effect of an inhibitor of cholesterol synthesis (AY9944) in rats: correlation with maternal cholesterolemia. *J. Nutri.* 110:2310-2312.
- Schwarz D S, Hutvagner G, Du T, Zuoshang X, Aronin N and Zamore P D (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115:199-208.
- Shi Y (2003). Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet.* 19:9-12.
- Steinberg D, Avigan J and Feigelson E B (1961). Effects of triparanol (Mer-29) on cholesterol biosynthesis and on blood sterol levels in man.
- Steiner R D, Linck L M, Flavell D P, Lin D S and Connor W E (2000). Sterol balance in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: reduction in whole body cholesterol synthesis and normal bile acid production. *J. Lipid. Res.* 41:1437-1447.
- Tulenko T N, Boeze-Battaglia K, Mason R P, Tint G S, Steiner R D, Connor W E and Labelle E F (2006). A membrane defect in the pathogenesis of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J. Lipid. Res.* 47:134-143.
- Vainio S, Jansen M, Koivusalo M, Rög T, Karttunen M, Vattulainen I and Ikonen E (2006). Significance of sterol structural specificity. *J. Biol. Chem.*, 281:348-355.
- Valecia A, Rajadurai A, Carle A B and Kochevar I E (2006). 7-dehydrocholesterol enhances ultraviolet A-induced oxidative stress in keratinocytes : roles of NADPH oxidase, mitochondria and lipid rafts. *Free Radical Biology and Medicine* 41:1704-1718.

- Wassif C A, Veid D, Tsokos M, Connor W E, Steiner R D and Porter F D (2002). Cholesterol storage defect in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome fibroblasts. *Molecular Genetics and Metabolism* 75:325-334.
- Waterham H R, Koster J, Romeijn G J, Hennekam R C Vreken P, Andersson H C, Fitzpatrick D R, Kelley R I and Wanders R J (2001). Mutations in the 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am. J. Hum. Genet.*, 69:685-694.
- Watt F M (2001). Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr. Opin. Gene. Dev.* 11:410-417.
- Wechsler A, Brafman A, Shafir M, Heverin M, Gottlieb H, Damari G, Gozlan-Kelner S, Spivak I, Moshkin O, Fridman E, Becker Y, Skaliter R, Einat P, Faerman A, Björkhem I and Feinstein E (2003). Generation of viable cholesterol-free mice. *Science*, 302:2087.
- Wu C, Miloslavskaya I, Demontis S, Maestro R and Galaktinov K (2004). Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by *seladin-1*. *Nature*, 432 : 640-645.
- Xu guorong, Salen G, Shefer S, Ness G C, Chen T S, Zhao Z and Tint G S (1995). Reproducing abnormal cholesterol biosynthesis as seen in the Smith-Lemli-Opitz syndrome by inhibiting the conversion of 7-dehydrocholesterol to cholesterol in rats. *J. Clin. Invest.* 95:76-81.
- Yang B, Oo T N and Rizzo V (2006). Lipid rafts mediate H₂O₂ pro-survival effects in cultured endothelial cells. *FASEB J.* 20:E688-E697.
- Yu H, Wessels A, Chen J, Phelps A L, Oatis H, Tint G S and Patel S B (2004). Late gestational lung hypoplasia in a mouse model of the Smith-Lemli-Opitz syndrome.
- Yu H, Wessels A, Tint G S and Patel S B (2005). Partial rescue of neonatal lethality of *DHCR-7* null mice by a nestin promoter-driven *DHCR-7* transgene expression. *Developmental Brain Research* 156:46-60.