



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ et de sa relocalisation dans les kératinocytes basaux détachés du substrat de culture

Grailly, Sabrina

Award date:
1992

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

Etude de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ et de sa relocalisation dans les kératinocytes basaux détachés du substrat de culture.

Grailly Sabrina

Résumé

L'intégrine $\alpha_6\beta_4$, polarisée sur la surface basale des kératinocytes en culture est associée aux hémidesmosomes, systèmes d'attaches immatures en culture cellulaire. Après un détachement par la dispase à 37°C, l'immunofluorescence permet d'observer une internalisation spécifique de l' $\alpha_6\beta_4$, les autres intégrines demeurant en surface des cellules. Un marquage Immunogold de la sous-unité α_6 confirme cette internalisation et suggère une heure après le détachement, un recyclage partiel de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ vers les faces latérales. Une autre conséquence du détachement à 37°C, est la contraction rapide du feuillet épidermique. L'utilisation de cytochalasine D et de nocodazole, inhibiteurs respectifs des microfilaments et des microtubules, montre que les microfilaments sont impliqués dans le phénomène de contraction. L'immunofluorescence et le marquage par Immunogold de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ suggèrent que la cytochalasine D, à l'opposé du nocodazole permet rarement une pénétration de l'intégrine à plus de 0,7 μm dans la cellule. L'internalisation des particules d'or se limitant probablement à des replis membranaires et non à de véritables vésicules, on ne peut exclure dès lors une association entre microfilaments, rétraction cellulaire et internalisation de l' $\alpha_6\beta_4$.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1992

Promoteur : Professeur R. Leloup

Co-promoteur : M. Leclercq-Smekens

Au terme de ce mémoire, je tiens d'abord à remercier le Professeur R. Leloup pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir encouragée tout au long de cette année.

J'exprime toute ma gratitude à Madame M. Leclercq-Smekens, copromoteur de ce mémoire pour m'avoir conseillée judicieusement au cours de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Monsieur Y. Poumay qui par ses grandes compétences et son éternelle disponibilité m'a particulièrement suivie et aidée tout au long de mes recherches.

Je voudrais également exprimer toute ma reconnaissance à :

Madame A. Degen, pour m'avoir initiée au monde de la culture cellulaire;

Madame N. Fievet-Henry pour sa compétence remarquable dans la réalisation des coupes de microscopie électronique;

Monsieur R. Déom qui à travers son éternelle bonne humeur m'a initiée aux techniques de la microscopie optique;

Monsieur M. Lombet pour sa contribution dans la réalisation du travail photographique en microscopie optique et la qualité de son iconographie, pour sa compétence et sa sympathie;

Madame F. Zune -Mossoux pour son aide précieuse dans la dactylographie de ce travail ainsi que pour ses encouragements et sa remarquable complicité;

Madame F. de Bosch-Kemper-Herphelin pour sa grande disponibilité et sa collaboration toujours appréciée;

Messieurs J.M. Pirson et Y. Houbion pour leur aide technique fort demandée;

Monsieur D. Van Acker pour la qualité de son travail dans la réalisation des développements photographiques.

Je remercie le département de Madame M.F Ronveaux pour avoir mis son matériel à notre disposition.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce travail.

Je me tourne finalement vers mes parents, pour m'avoir donné la possibilité d'entamer ces études et pour la confiance qu'ils ont toujours manifestée à mon égard.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Caractéristiques histologiques de la peau in vivo	1
1.1.1. Généralités	
structure générale de l'organe peau.....	1
1.1.2. Epiderme.....	1
1.1.2.1. Histologie.....	1
1.1.2.1.1. Les différents types cellulaires.....	1
1.1.2.1.2. La stratification des kératinocytes	
épidermiques	2
1.1.2.2. Organisation fonctionnelle des kératinocytes dans	
l'épiderme.....	3
1.1.2.2.1. Compartiment de prolifération	3
1.1.2.2.2. Compartiment de différenciation	4
1.1.3. Jonction épidermo-dermique (JED).....	6
1.1.3.1. Morphologie et constituants biochimiques de la JED	
.....	6
1.1.3.1.1. La membrane plasmique.....	6
1.1.3.1.2. La lamina lucida	6
1.1.3.1.3. La lamina densa	7
1.1.3.1.4. La lamina subbasale (couche	
fibroréticulaire).....	8
1.1.3.2. Fonctions de la "jonction épidermo-dermique".....	8
1.2. Culture des kératinocytes épidermiques.....	9
1.2.1. Généralités.....	9
1.2.2. Histologie et organisation de l'épiderme obtenu par culture sur	
3T3	10
1.2.3. Contrôles de la différenciation et de la stratification	11
1.2.4. Utilisations des cultures de peau.....	12
1.2.4.1. Détachement par la dispase.....	12
1.2.4.2. Conséquences du détachement.....	13
1.3. Les intégrines.....	14
1.3.1. Introduction.....	14
1.3.2. Structure biochimique des intégrines.....	14
1.3.3. Hétérogénéité des intégrines et spécificité du ligand.....	15
1.3.3.1. Sous-famille β 1.....	15
1.3.3.2. Sous-famille β 2.....	16

1.3.3.3. Sous-famille β 3.....	16
1.3.3.4. Intégrines et structures d'adhésion	17
1.3.3.5 Ligands hypothétiques de l' $\alpha_6\beta_4$	17
1.4. L'hémidesmosome	18
1.4.1. Constituants de l'hémidesmosome.....	18
1.4.1.1. Les antigènes de la pemphigoïde bulleuse	18
1.4.1.2. La HD1.....	19
1.4.1.3. Intégrine $\alpha_6\beta_4$	19
1.4.1.4. La kalinine.....	20
1.4.2. Comparaison de l'hémidesmosome et du desmosome	
l'hémidesmosome n'est pas un demi-desmosome	20
1.4.2.1. $\alpha_6\beta_4$ et desmogléine-desmocolline	20
1.4.2.2. APB et desmoplakine	21
1.5. But du travail	22
2. MATERIEL ET METHODES.....	23
2.1. Matériel de culture.....	23
2.1.1. Milieu de culture des cellules 3T3 (milieu 3T3)	23
2.1.2. Milieu de culture pour les kératinocytes humains (milieu CE).....	23
2.2. Méthode de culture.....	23
2.2.1. Culture des cellules 3T3	23
2.2.2. Cultures des kératinocytes.....	24
2.2.2.1. Cultures primaires des kératinocytes.....	24
2.2.2.2. Cultures secondaires des kératinocytes.....	24
2.3. Détachement par la dispase	25
2.3.1. Dispase seule	25
2.3.2. Dispase et inhibiteurs du cytosquelette	25
2.4. Analyse de la rétraction cellulaire.....	25
2.5. Techniques histologiques	26
2.5.1. Fixation.....	26
2.5.1.1. Cryofixation pour la microscopie à immunofluorescence.....	26
2.5.1.2. Fixation et postfixation pour la microscopie électronique à transmission.....	26
2.5.2. Déshydratation.....	27
2.5.3. Pré-infiltration.....	27
2.5.4. Infiltration	27
2.5.5. Polymérisation.....	27

2.6. Colorations topographiques	27
2.6.1. Microscopie optique.....	27
2.7. Colorations immunohisto et cytochimiques.....	28
2.7.1. En microscopie optique.....	28
2.7.1.1. Marquages immunofluorescents des intégrines et de l'involucrine.....	28
2.7.1.1.1. Méthode en général.....	28
2.7.1.1.2. Marquage proprement dit.....	28
2.7.1.2. Marquage du cytosquelette avec ou sans inhibiteur dans un milieu avec ou sans Ca ⁺⁺	29
2.7.1.2.1. Etapes précédant le marquage	29
2.7.1.2.2. Marquage proprement dit.....	29
2.7.2. En microscopie électronique à transmission	30
2.7.2.1. Marquage à 4°C, de la sous-unité α_6 par Immunogold.....	30
3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	31
3.1. Résultats.....	31
3.1.1. Détachement par la dispase des cultures de kératinocytes épidermiques humains.....	31
3.1.1.1. Observations en microscopie optique et électronique	31
3.1.1.2. Influence de la température sur le diamètre du feuillet de culture détaché.....	32
3.1.1.3. Localisation des intégrines après détachement par la dispase.....	32
3.1.1.4. Internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ et de la structure de type hémidesmosomale à laquelle elle appartient.....	33
3.1.1.4.1. L'hémidesmosome immature des kératinocytes en culture.....	33
3.1.1.4.2. Internalisation et recyclage de la sous-unité α_6	33
3.1.1.4.3. Marquage de l'espace extracellulaire par le rouge de ruthénium.....	35
3.1.1.4.4. Marquage de la sous-unité α_6 dans les espaces intercellulaires	35
3.1.1.5. Localisation d'autres constituants des hémidesmosomes (HD1 et APB) dans les feuillets épidermiques détachés par la dispase.....	35

3.1.2. Contraction, internalisation et cytosquelette.....	36
3.1.2.1. Visualisation de l'efficacité des inhibiteurs du cytosquelette par immunofluorescence.....	36
3.1.2.2. Actions des inhibiteurs du cytosquelette sur la contraction du feuillet épidermique.....	37
3.1.2.3. Actions des inhibiteurs du cytosquelette sur la morphologie cellulaire après détachement par la dispase.....	38
3.1.2.4. Cytosquelette, rétraction cellulaire et internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$	39
3.1.2.4.1. Visualisation par immunofluorescence.....	39
3.1.2.4.2. Localisation en ultrastructure de la sous-unité α_6 dans des feuillets épidermiques détachés et traités par la cytochalasine D.....	40
3.2. Discussion.....	41
3.2.1. Evolution de la structure hémidesmosomale et de ses différents constituants après détachement par la dispase et différents temps d'incubation	41
3.2.2. Les vésicules associées aux particules d'or colloïdal sont-elles de véritables vésicules ou de simples replis membranaires ?	44
3.2.3. Comparaison de l'internalisation de la sous-unité α_6 avec l'endocytose par récepteur.....	44
3.2.4. Implications du cytosquelette dans la rétraction cellulaire et l'internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$	46
4. PERSPECTIVES ET CONCLUSION	49
5. BIBLIOGRAPHIE	50

INTRODUCTION

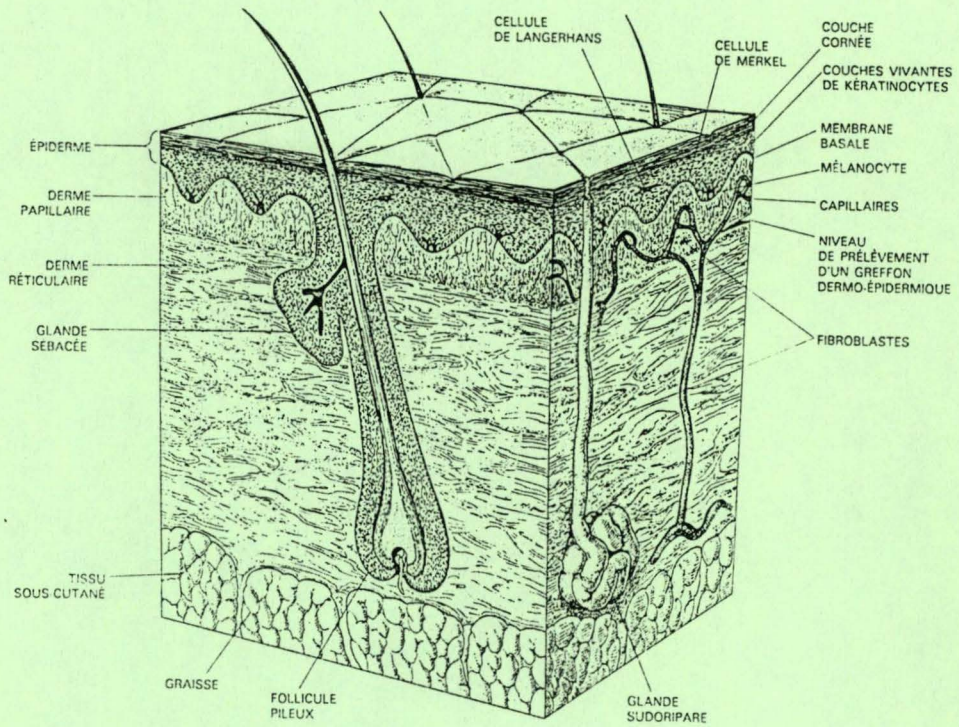


Fig. 1. Structure générale de la peau (Green , 1992).

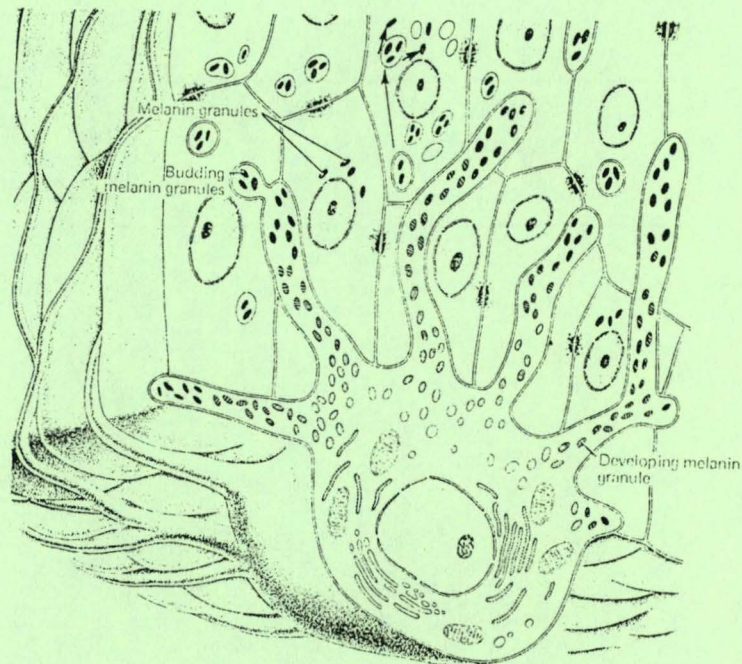


Fig. 2. Schéma d'un mélanocyte dont les prolongements s'étendent dans les interstices entre les cellules épithéliales. Les grains de mélanine migrent dans ces bras et sont transférés dans le cytoplasme des cellules épithéliales (Junqueira & Carneiro, 1983).

1. INTRODUCTION

1.1. Caractéristiques histologiques de la peau in vivo

1.1.1. Généralités : structure générale de l'organe peau

La peau est constituée de trois couches tissulaires qui sont l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme, épithélium pavimenteux stratifié kératinisé d'origine ectoblastique comprend 4 types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Merkel et les cellules de Langerhans. L'épiderme repose sur un tissu conjonctif spécialisé d'origine mésoblastique qu'on appelle le derme dont les fibroblastes synthétisent les constituants de la matrice extracellulaire. Le derme renferme différentes annexes épithéliales comme les follicules pileux, les glandes sudoripares, les glandes sébacées ainsi qu'un réseau organisé de vaisseaux capillaires et diverses terminaisons nerveuses. Sous le derme se trouve l'hypoderme, un tissu conjonctif riche en lobules adipeux (Fig. 1).

1.1.2. Epiderme

1.1.2.1. Histologie

1.1.2.1.1. Les différents types cellulaires

Les kératinocytes, d'origine ectodermique représentent 85 à 90% des cellules de l'épiderme et se stratifient en plusieurs couches. Lors de cette stratification, ils subissent la maturation kératosique, définie comme étant un ensemble de variations morphologiques et moléculaires qui mèneront les kératinocytes de l'assise germinative, où ils prolifèrent, jusqu'au sommet de l'épiderme où les cellules mortes kératinisées vont former une couche de protection imperméable, la couche cornée (Wheater et al., 1979).

Les mélanocytes, dérivant de la crête neurale, sont après les kératinocytes les cellules les plus abondantes de l'épiderme : on trouve un mélanocyte pour 36 kératinocytes environ (Alberts et al. , 1983). Ils ont la forme d'une véritable "pieuvre" dont les bras viennent s'intercaler entre les kératinocytes des couches basale et épineuse, sans toutefois établir de jonctions avec ces cellules (Fig. 2). Le mélanocyte produit les pigments cutanés de mélanine.

Les cellules de Langerhans sont des cellules d'origine monocytaire, de forme étoilée, observées dans la couche de Malpighi. Ces cellules possèdent un type particulier de granules en forme de raquette : les granules de Birbeck (Fig. 3).



Fig. 3. Micrographie à petit grossissement (x16000) d'une cellule de Langerhans dans un épiderme humain. Les flèches sont orientées sur les granules de Bierbeck (photographiés à un plus gros grossissement (X49000) dans un coin de la figure) (Stingl et Alberer, 1983).

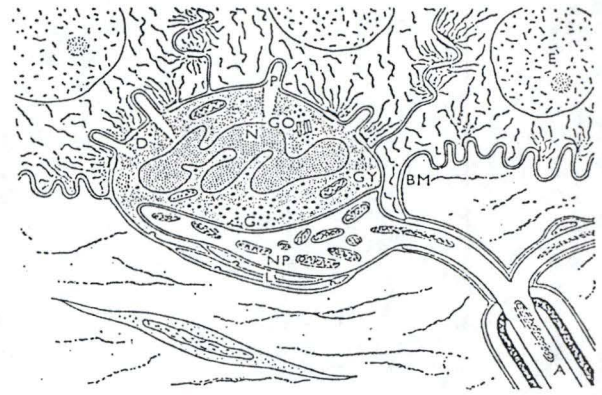


Fig. 4. Schéma d'une cellule de Merkel.
A : axone myélinisé, BM : lame basale; D : desmosome, E : noyau d'un kératinocyte; G : granules de type neurosécrétoire; NP : terminaison nerveuse; GO : appareil de Golgi; GY : glycogène; N : noyau multilobulé; P : prolongements cytoplasmiques.

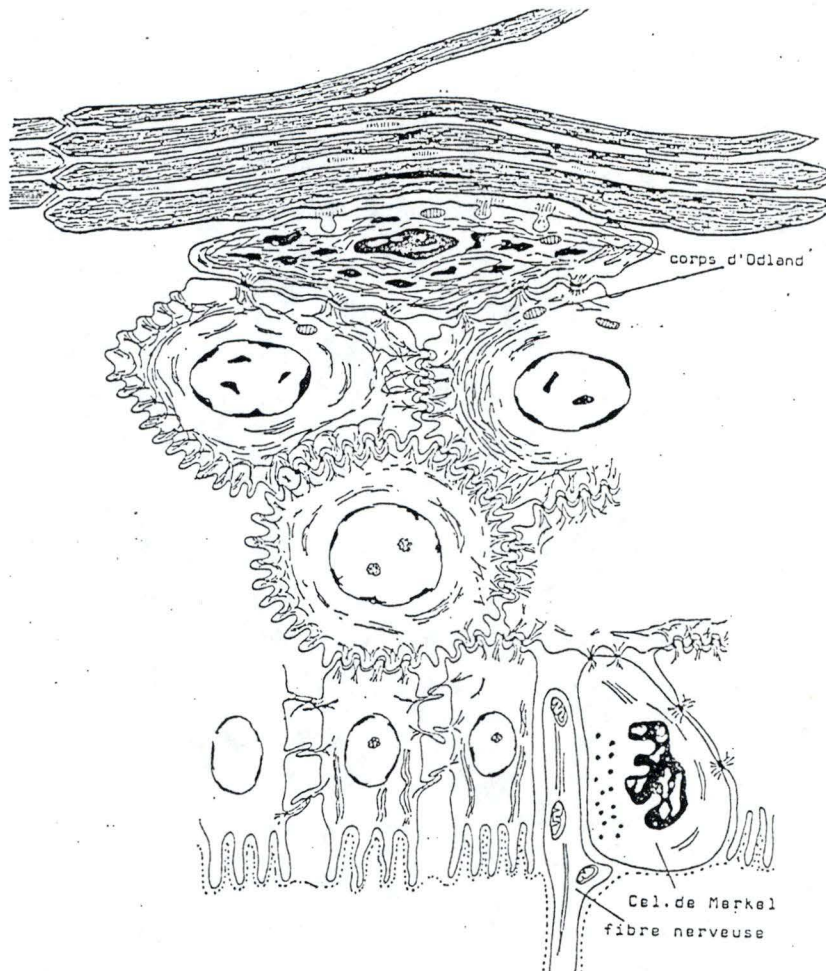


Fig. 5. Différenciation des kératinocytes (d'après R. Leloup).

Les techniques immunohistochimiques ont permis d'affirmer que les cellules de Langerhans interviennent dans le système immunitaire. Elles reconnaissent notamment des antigènes de classe II pour les présenter à un lymphocyte T. Par ce fait, les cellules de Langerhans sont responsables des rejets des greffes cutanées, c'est-à-dire de l'hypersensibilité retardée de contact (Edelson et Finck, 1985; Schmitt, 1989).

Les cellules de Merkel sont les cellules épidermiques les moins abondantes de l'épiderme. Elles sont en relation avec des terminaisons nerveuses et se caractérisent par un noyau indenté, par l'établissement de desmosomes avec les kératinocytes, par des tonofilaments et par la présence de granules de type neuro sécrétoire qui les rattachent au système neuroendocrinien diffus (Fig. 4).

1.1.2.1.2. La stratification des kératinocytes épidermiques (Fig. 5)

La couche basale est formée d'une seule assise de cellules prismatiques, présentant à leur base, de nombreuses radicules leur permettant, via les hémidesmosomes, de s'accrocher au tissu sous-jacent par l'intermédiaire de la jonction épidermo-dermique (JED). Ces cellules possèdent latéralement des prolongements cytoplasmiques interconnectés qui attachent les cellules entre elles par des desmosomes. Ces cellules possèdent un cytoplasme basophile et un noyau ovale occupant presque l'entièreté du volume cellulaire (Wheater et al., 1979; Junqueira et Carneiro, 1983).

La couche épineuse (Alberts et al., 1989). Au dessus des cellules basales se trouvent plusieurs couches de cellules épineuses, volumineuses, de forme polygonale et à noyau arrondi. Elles tirent leur nom de leur aspect typique observé en microscopie optique.: de minuscules épines hérissent la surface cellulaire et correspondent à d'épais faisceaux de filaments de kératine (tonofilaments) se rejoignant au niveau de nombreux desmosomes. Le noyau et le cytoplasme basophile indiquent une synthèse protéique importante. L'absence de centriole suggère qu'il n'y a plus d'activité mitotique.

La couche granuleuse est formée de 5 à 6 assises de cellules polygonales s'aplatissant de plus en plus en s'élevant dans les strates cellulaires jusqu'à devenir pavimenteuses mais possédant encore un noyau central. Les cellules de cette couche sont caractérisées par de nombreux granules cytoplasmiques basophiles qui représentent les granules de kératohyaline. Le processus de maturation kératosique implique la combinaison des tonofilaments et des éléments présents dans la kératohyaline. De plus, les cellules de la couche granuleuse synthétisent, via leur appareil de Golgi, des granules ovoïdes appelés corps d'Odland. Ceux-ci vont fusionner avec la membrane plasmique, au sommet de la couche granuleuse, et libérer leur contenu dans l'espace intercellulaire. Ce contenu, formé de phospholipides et de mucopolysaccharides, va jouer le rôle de substance cimentante

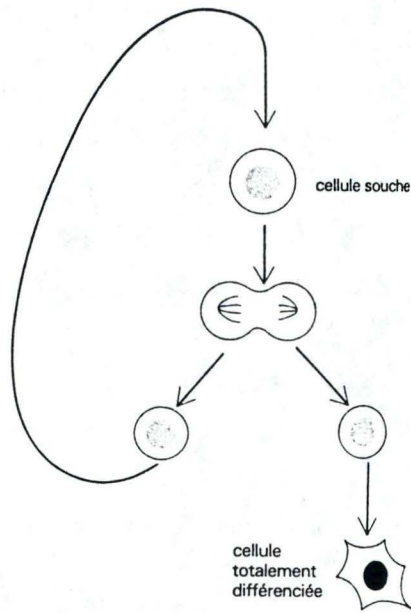


Fig. 6. Chaque cellule-fille issue de la division d'une cellule souche peut, soit rester une cellule souche, soit se différencier totalement (Alberts et al., 1983).

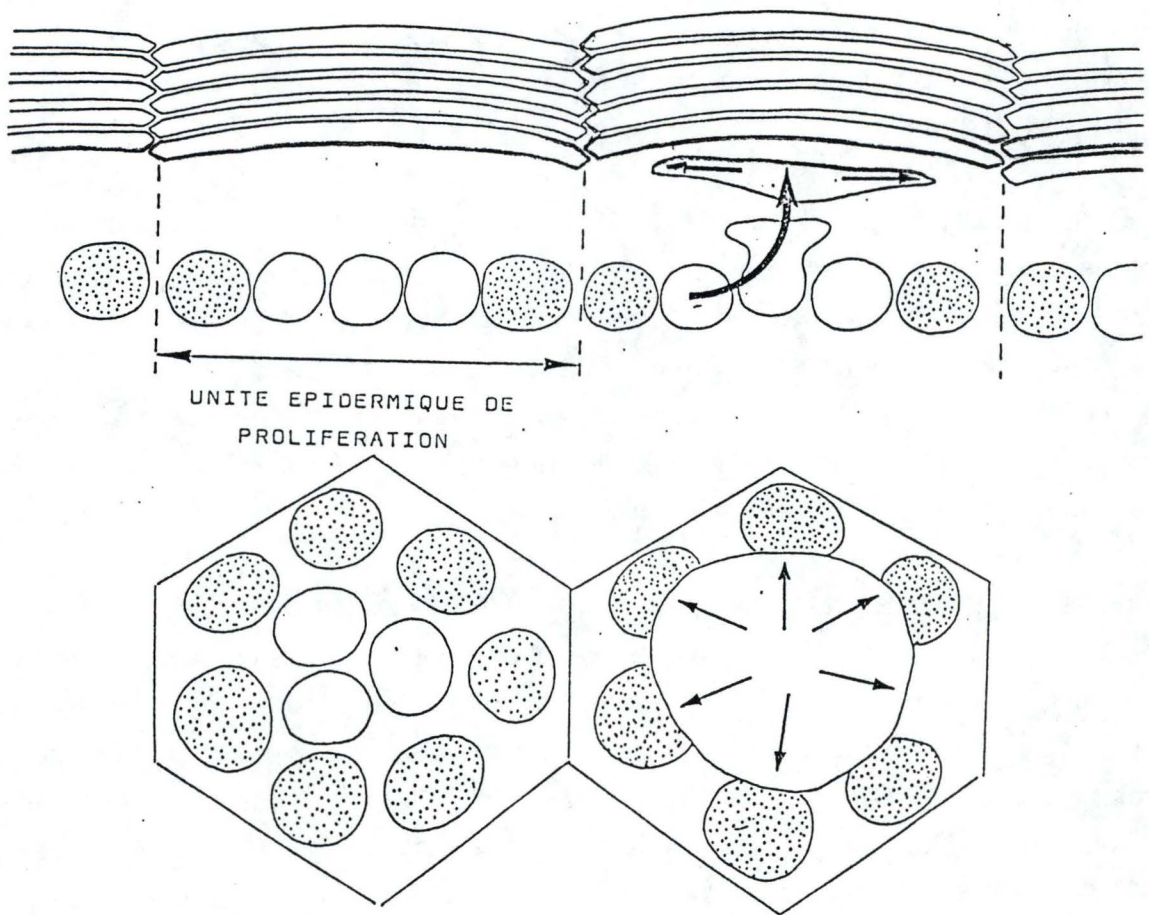


Fig. 7. Groupe de cellules basales situées sous la colonne de squames. Les cellules présentant une activité mitotique sont situées à la périphérie et représentées en pointillé.

intercellulaire. A ce niveau, les desmosomes sont encore visibles et dans le cytoplasme, suite à une activité enzymatique importante, on observe la destruction progressive des organites. Au fur et à mesure que la kératohyaline s'accumule, le noyau se pycnose puis disparaît. A la jonction entre les couches granuleuse et cornée, la membrane cellulaire de la cellule épidermique s'épaissit sur sa face interne pour mesurer environ 15 nm. Cette enveloppe cornée se maintient dans la couche cornée (Wheater et al., 1979; Junqueira et Carneiro, 1983; Eckert, 1989).

La couche cornée (Wheater et al., 1979; Green, 1992) correspond à des strates de cellules ayant terminé leur maturation kératosique, c'est-à-dire des cellules pavimenteuses, à membrane plasmique épaissie, dépourvues d'organites et remplies de kératine. Dans les zones les plus profondes de cette couche, les cellules gardent leurs jonctions desmosomales et leur kératine intracellulaire reste ordonnée sous forme de filaments. Vers la surface, les desmosomes et la structure interne des cellules sont désorganisés. Ce processus précède celui de la desquamation.

1.1.2.2. Organisation fonctionnelle des kératinocytes dans l'épiderme

1.1.2.2.1. Compartiment de prolifération (Alberts et al., 1989)

Le compartiment de prolifération est constitué principalement des cellules basales situées sur la JED séparant l'épiderme du derme sous-jacent. C'est au niveau de ces cellules et de quelques cellules de la première couche suprabasale que se déroule la mitose. C'est donc dans ce compartiment que se situent les cellules souches qui ont la capacité de se diviser indéfiniment tout au long de la vie d'un individu et d'engendrer une descendance différenciée. Quand elles se divisent, les cellules filles restent "cellule souche" comme la cellule parentale ou entrent irréversiblement dans une succession d'étapes qui mènent à la différenciation terminale (Fig. 6) (Alberts et al., 1989). On parle généralement d'unité épidermique de prolifération formée d'un groupe de cellules basales situées sous une colonne de cellules cornées qu'elles produisent (Potten, 1981). D'après son diamètre, on peut estimer qu'une colonne repose sur environ 10 cellules basales. On peut dès lors classer les cellules basales selon leur position par rapport à l'axe de la colonne en cellules centrales et en cellules périphériques, ces dernières possédant l'activité mitotique (Fig. 7). Nous reparlerons des cellules basales et de leurs molécules d'adhésion lorsque nous présenterons la jonction épidermo-dermique.

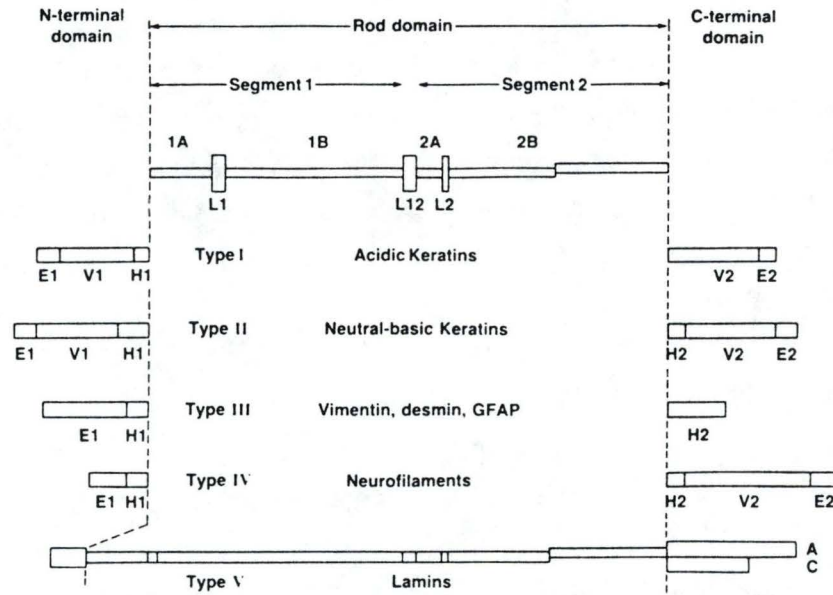


Fig. 8. Structure secondaire des polypeptides de kératine.

1A, 1B, 2A, 2B : séquences du domaine central en hélice α capables de former une double hélice avec des séquences homologues d'une autre sous-unité; H1, H2 : séquences conservées des domaines terminaux; V1, V2 : domaines variables des domaines terminaux; E1 : extrémité N-terminale de la sous-unité; EC : extrémité C-terminale de la sous-unité (Steinert & Freedberg, 1991).

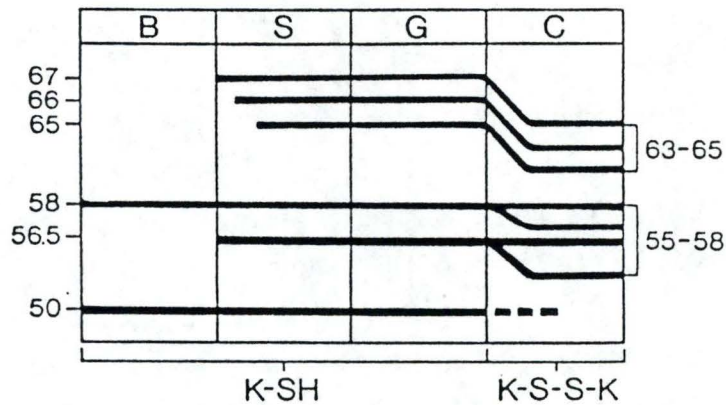


Fig.9. Séquence d'expression des kératines dans l'épiderme.

B : couche basale; S : couche épineuse; G : couche granuleuse; C : couche cornée (Mell et al., 1982).

1.1.2.2.2. Compartiment de différenciation.

Ce compartiment est constitué des couches des kératinocytes suprabasaux. A ce niveau, les marqueurs de la différenciation terminale des kératinocytes les plus importants sont : les kératines suprabasales, les précurseurs de l'enveloppe cornée, la filaggrine et les corps d'Odland.

Les kératines : les kératines sont des scléroprotéines formant des filaments intermédiaires d'un diamètre de 10 nm présents dans beaucoup d'épithéliums de morphologie et d'origine embryologique différentes (Green, 1980). Elles sont cependant absentes au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Bien que les kératines, d'un poids moléculaire allant de 40 à 60 kd, soient synthétisées dans beaucoup de types de cellules épithéliales, c'est dans l'épiderme, où elles jouent un rôle structural important, qu'elles sont les plus abondantes. Malgré leur composition en acides aminés très similaire et leur façon plus ou moins identique de réagir au niveau immunologique, on peut séparer les quelques 25 kératines humaines détectées à l'heure actuelle en deux grandes sous-familles : les sous-unités acides ($PI < 5,5$) et les sous-unités neutres basiques ($PI > 6$). Pour qu'un filament intermédiaire se forme, il faut des membres de chaque sous-famille (Eichner et al., 1984). Les différentes sous-unités sont des polypeptides possédant tous un domaine central contenant 312 à 314 acides aminés fort semblables d'une classe de filaments à l'autre. Ce centre commun est constitué de 4 régions en hélice α séparées par 3 régions non en hélice α et c'est aux endroits en hélice α que pourront se faire les appariements entre homologues pour former une double hélice. Les parties C- et N- terminales possèdent des régions constantes (H) spécifiques des kératines basiques et des régions variables (V et E) qui produisent les différents poids moléculaires des différentes kératines (Fig. 8).

Les kératines des différentes étapes de la différenciation de l'épiderme

Beaucoup de kératines ont un partenaire préféré avec lequel on les retrouve associées en leurs différentes localisations (Watt, 1989). Au niveau de la couche basale se trouve le couple des kératines K5 et K14 correspondant respectivement aux kératines de poids moléculaires égaux à 58 kd et 54 kd selon l'échelle de Moll (Moll et al., 1982). Ces kératines caractéristiques d'un épithélium pavimenteux stratifié vont persister jusqu'à la couche cornée. Ensuite, dans les couches suprabasales apparaissent les kératines K1 et K10 qui sont des kératines de 67 et 56,5 kd respectivement. Dans le stratum corneum, les kératines existantes ne sont plus le résultat de nouvelles synthèses mais la conséquence de dégradations partielles des kératines préexistantes. Ce qui donne lieu, en se basant sur le poids moléculaire, à 2 types de sous-unités : de poids moléculaires entre 55 et 58 kd et de poids moléculaires entre 65 et 58 kd (Fig.9) (Sun et al., 1985).

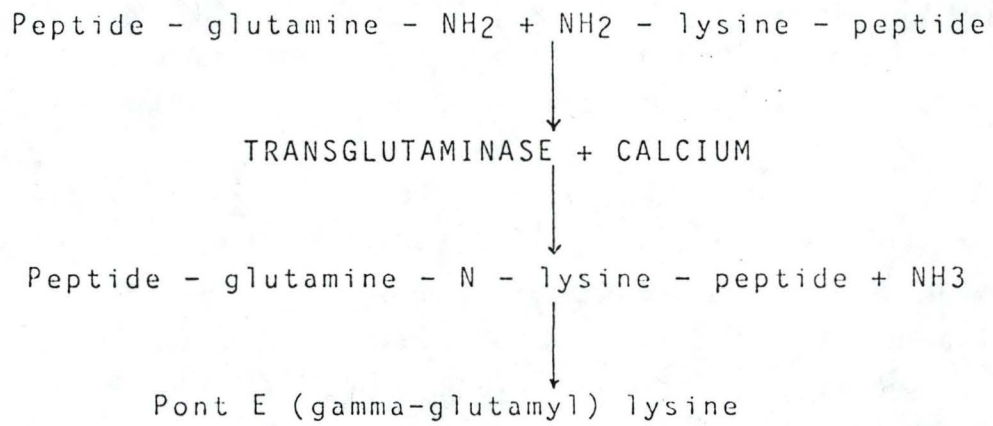


Fig. 10. Action de la transglutaminase dans l'incorporation de l'involucrine au niveau de la membrane plasmique (De Dobbeleer, 1988).

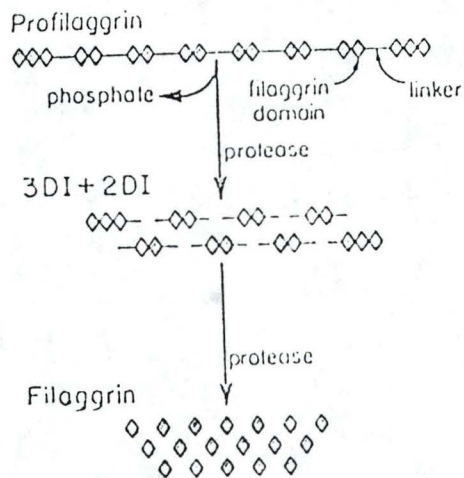


Fig. 11. Formation des sous-unités protéiques de la fillagrine (Dale et al., 1983).

L'enveloppe cornée et ses précurseurs (Rheinwal et Green, 1975; Green, 1979; Green et al., 1979; Watt et Green, 1981; Watt, 1989)

L'enveloppe cornée des kératinocytes épidermiques est une enveloppe uniforme d'environ 15 nm d'épaisseur située sous la surface cytoplasmique de la membrane plasmique. L'assemblage de l'enveloppe cornée est catalysé par la transglutaminase, une enzyme dont l'activité est contrôlée par la concentration en calcium libre environnant et qui permet la formation de ponts (glutamyl)-lysine entre des molécules telles que l'involucrine (Rice et Green, 1978), la loritrine (Mehrel et al., 1990) ou encore, plus récemment découverte, la scielline (Kvedar et al., 1992). Ce phénomène appelé "cross-linking" est en effet activé par des ionophores de calcium. Si la transglutaminase est présente dès les premières couches suprabasales, le début de la synthèse de l'enveloppe cornée ne se réalise que dans les assises supérieures de la couche granuleuse où une perméabilisation de la membrane et une entrée de Ca^{++} dans le cytoplasme se produisent (Green, 1980) (Fig. 10).

Filaggrine et kératohyaline (Resing et Dale, 1991)

Les granules de kératohyaline ne sont pas de véritables granules car ils ne possèdent pas de membrane et sont le plus souvent décrits comme des agrégats insolubles. Dans l'épiderme humain, la kératohyaline apparaît donc en microscopie électronique comme des globules denses, irréguliers ou de forme étoilée, composés de dépôts amorphes ou formés de fins granules déposés le long des faisceaux de filaments de kératine et à l'intersection de ceux-ci. La kératohyaline contient la profilaggrine, une protéine riche en histidine et très phosphorylée. La profilaggrine est un précurseur de haut poids moléculaire (300 kd) qui n'agrège pas les filaments de kératine et qui constitue en fait une répétition multiple de molécules de filaggrine (38 kd)(fig.11).

Double rôle de la filaggrine

1. La filaggrine sert de catalyseur pour l'association des tonofilaments. Elle interagit avec le groupement glycine des parties C-terminales des tonofilaments et favorise la formation des groupements disulfures. La filaggrine et des intermédiaires cationiques s'agrègent aux filaments de kératine forment des macrofibrilles dans lesquelles les filaments sont étroitement alignés les uns par rapport aux autres.

2. La filaggrine joue donc une fonction d'échaffaudage dans l'agrégation des filaments de kératine, dans la transition vers les cellules cornées, mais ce rôle n'est qu'un rôle temporaire. Dans la couche cornée, des enzymes vont venir attaquer le groupement arginine de la filaggrine, qui était important dans l'interaction kératine-filaggrine, et le transformer en citrulline. La filaggrine, avec la citrulline à la place de l'arginine, ne va plus interagir avec les filaments intermédiaires, ce qui va faciliter la décomposition protéolytique. La filaggrine est une source d'acides aminés libres au niveau de la couche cornée qui sont importants pour une hydratation normale de cette couche.

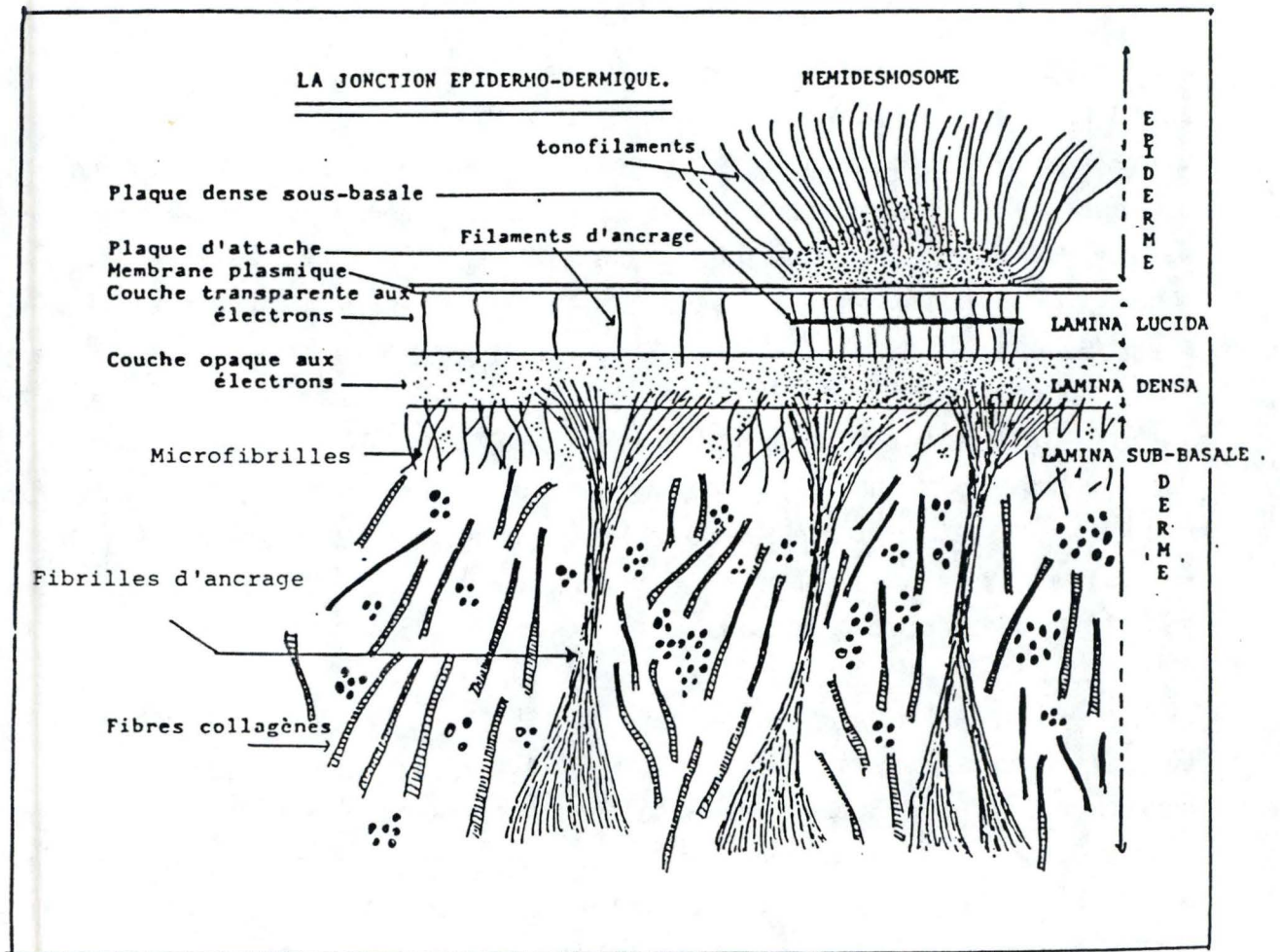


Fig. 12. Structure de la jonction épidermo-dermique (d'après R. Leloup).

Les corps d'Odland (Watt, 1989)

Les lipides intercellulaires contribuent de façon importante à la fonction de barrière de la couche cornée. Les lipides sont déposés par la sécrétion de structures appelées corps lamellaires ou corps d'Odland. Ces corps lamellaires sont synthétisés dans les cellules épineuses et se déplacent vers l'apex et la périphérie de celles-ci. Ensuite, ils fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent leur contenu dans les espaces intercellulaires pour les imperméabiliser.

1.1.3. Jonction épidermo-dermique (JED)

1.1.3.1. Morphologie et constituants biochimiques de la JED (Fig. 12)

A l'interface située entre les cellules épithéliales et le tissu conjonctif sous-jacent se trouve une structure spécialisée de la matrice extracellulaire: la membrane basale. Sous l'épiderme cette membrane basale contient des structures d'adhésion particulières : on l'appelle dès lors la jonction épidermo-dermique (JED) pour la différencier des autres membranes basales.

En ultrastructure, la JED se compose de la membrane plasmique des cellules basales de l'épiderme, de la lamina lucida, de la lamina densa et de la lamina sub-basale (Briggaman et al., 1991).

1.1.3.1.1. La membrane plasmique

La membrane plasmique de la face basale de la couche germinative de l'épithélium présente certains épaisissements périodiques denses aux électrons, appelés hémidesmosomes, caractéristiques du pôle basal de tout épithélium stratifié. Au niveau de chaque hémidesmosome on observe, côté cytoplasmique de la membrane plasmique, une plaque d'attache, zone dense aux électrons épaisse de 20 à 40 nm et des filaments intermédiaires de kératine qui s'y attachent (Briggaman et al., 1991). Les hémidesmosomes constituent des systèmes d'attache de l'épithélium sur le tissu conjonctif sous-jacent (Fig. 12). Nous reviendrons sur cette structure au paragraphe la concernant.

1.1.3.1.2. La lamina lucida

La lamina lucida constitue une région continue, transparente aux électrons, située entre la membrane plasmique et la lamina densa. Sa largeur semble varier quelque peu, spécialement dans les régions non hémidesmosomales. Entre les hémidesmosomes, elle a une épaisseur moyenne de 54 nm, alors qu'en dessous de ceux-ci elle ne dépasse pas 44 nm (Briggaman et al., 1991). Alors qu'en général la lamina lucida présente un aspect amorphe, elle contient sous les hémidesmosomes des filaments d'ancrage qui la traversent perpendiculairement depuis la membrane plasmique jusqu'à la lamina densa. De plus, il existe en dessous de chaque structure hémidesmosomale une plaque linéaire dense aux

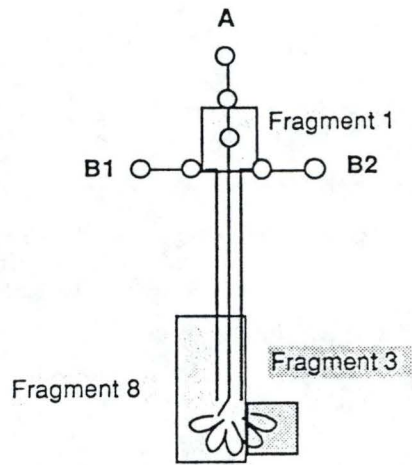


Fig. 13. Représentation schématique de la molécule de laminine et de ses différents sites d'interaction avec les cellules (Aumailley, 1991).

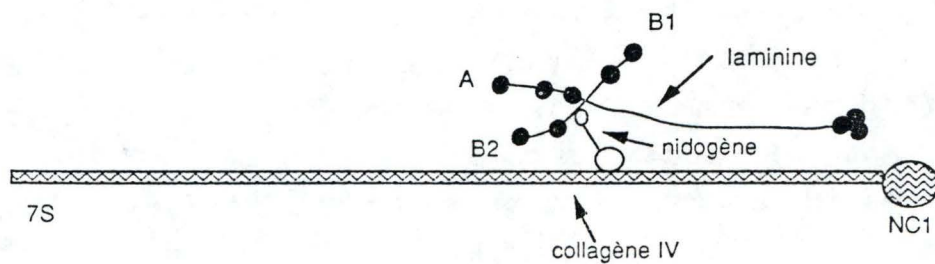


Fig. 14. Diagramme des interactions entre la laminine, le collagène IV et le nidogène (Aumailley, 1991).

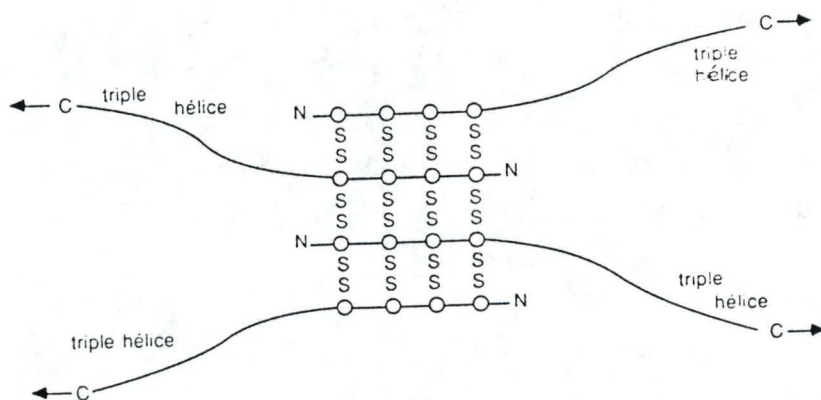


Fig. 15. Association de quatre molécules de collagène IV par leurs extrémités 7S, réalisant une structure en forme d'araignée : le "collagène 7S" (Borel et al., 1987).

électrons et parallèle à la membrane plasmique, appelée "plaque dense sous-basale". Ces observations supportent l'idée que l'hémidesmosome, la lamina lucida associée à une plaque dense sous-basale et les filaments d'ancrage forment une véritable unité structurale (Regauer et al., 1990; Briggaman et al., 1991). Certains constituants moléculaires de cette lamina lucida sont aujourd'hui identifiés : c'est le cas de la laminine, l'entactine/nidogène et de la fibronectine. La laminine, une glycoprotéine de 90 kd constituée de trois chaînes polypeptidiques liées par des ponts disulfures et arrangées en une structure cruciforme (Fig. 13), permet l'ancrage des cellules épithéliales au collagène des lames basales (Verrando, 1991). La laminine est un composant de la lamina lucida, mais peut être présente également au niveau de la lamina densa. L'entactine/nidogène ne constitue qu'une seule glycoprotéine de poids moléculaire de 150 kd formée d'une seule chaîne polypeptidique repliée pour former une structure en haltère. cette molécule forme des complexes stables avec la laminine. Elle s'associe généralement à celle-ci dans des proportions équimoléculaires. L'entactine/nidogène, ainsi que la laminine se lient en plus au collagène IV et probablement à d'autres molécules (Fig. 14)(Aumailley, 1991). La fibronectine, une glycoprotéine multifonctionnelle, largement distribuée dans les tissus en tant que composant de la matrice extracellulaire, est un dimère composé de deux chaînes polypeptidiques de 220 kd liées par des ponts disulfures. La fibronectine apparaît comme un constituant aux quantités variables de la JED (Briggaman et al., 1991).

1.1.3.1.3. La lamina densa

La lamina densa, probablement bordée de part et d'autre de protéoglycanes, est une couche continue, dense aux électrons, d'épaisseur plus ou moins uniforme (environ 70 nm), distribuée parallèlement à la membrane plasmique des kératinocytes basaux. La lamina densa est légèrement plus épaisse et plus dense dans les régions correspondant aux hémidesmosomes. Le composant majeur de la lamina densa est le collagène de type IV. C'est un hétérotrimère composé généralement de deux chaînes différentes de pro-collagène : deux chaînes $\alpha 1$ et une chaîne $\alpha 2$. Quatre molécules vont ensuite s'associer, en se liant par leur extrémité N -terminale (le domaine 7S) (Fig. 15 et 16), afin de réaliser une structure tridimensionnelle réticulée. Le collagène de type IV est incorporé dans le tissu avec peu ou pas de modifications post-traductionnelles pour réaliser un réseau à mailles lâches formé d'unités de pro-collagène, responsable de la non-striation de ce type de collagène (Briggaman et al., 1991). Les protéoglycanes, dont la chondroïtine-6-sulfate et l'héparan-sulfate, jouent dans la lamina densa un rôle important dans la cohésion de la membrane basale épidermique et dans la filtration des molécules chargées et des ions (Verrando, 1991).

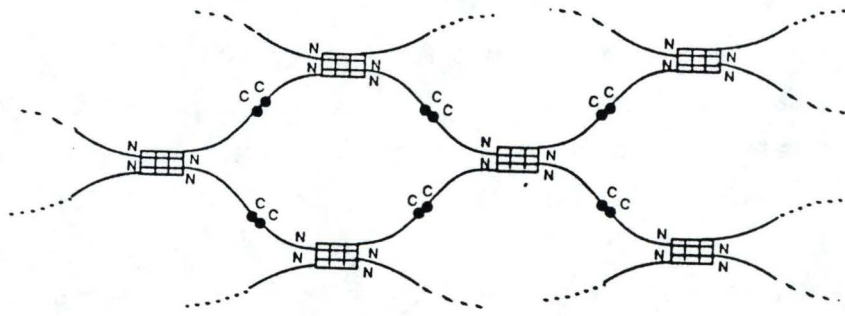


Fig. 16. Modèle du réseau de collagène IV : association extrémité à extrémité (Borel et al., 1987).

1.1.3.1.4. La lamina subbasale (couche fibroréticulaire)

On distingue généralement une région riche en éléments fibreux de différents types, directement en dessous de la lamina densa. Des fibrilles d'ancrage, des faisceaux de microfibrilles dermiques et des fibres de collagène de types III s'observent à ce niveau (Fig. 12).

Fibrilles d'ancrage

Les fibrilles d'ancrage réalisent de véritables faisceaux dont les extrémités s'évalent en éventail pour s'ancrer sur des plaques d'ancrage dans le derme et se rattacher à la lamina densa de l'autre côté (Regauer et al., 1990; Briggaman et al., 1991). Les fibrilles sont constituées de collagène de type VII, glycoprotéine d'un poids moléculaire de 510 kd. Ce collagène est formé de 3 chaînes polypeptidiques α identiques formant une triple hélice avec une extrémité C-terminale globuleuse et est organisé dans les tissus sous forme de dimères antiparallèles (Regauer et al., 1990; Kurpakus et al., 1991).

Faisceaux de microfibrilles

Ces faisceaux de microfibrilles, dont chaque microfibrille fait plus ou moins 8 à 11nm de diamètre, sont reliés directement, de façon perpendiculaire ou oblique, avec la lamina densa. Dans les portions plus profondes, un matériel dense aux électrons, amorphe et granulaire, probablement de l'élastine, est trouvé en association avec les microfibrilles. Ces faisceaux représentent une connection directe entre le tissu conjonctif profond et la lamina densa.

Fibres de collagène

Les fibres de collagène sont également présentes dans les papilles dermiques, sous la lamina densa. A ces différents endroits, les fibres de collagène sont orientées au hasard et habituellement présentes sous la forme de fibres isolées ou de faisceaux pauvrement constitués. Il s'agit de collagène de type I et III.

1.1.3.2. Fonctions de la "jonction épidermo-dermique"

La jonction épidermo-dermique joue un rôle de support et de soutien, assuré en grande partie, par le collagène de type IV, en association avec l'action mécanique du tissu conjonctif lâche dermique. Elle est impliquée également dans une fonction d'adhérence de l'épiderme au derme via différents de ses constituants, tels que la fibronectine ou la laminine, cette fonction étant renforcée par la structure papillaire du derme. La jonction épidermo-dermique constitue une barrière qui limite les mouvements cellulaires entre l'épithélium et le tissu conjonctif sous-jacent. Les lymphocytes et certaines fibres nerveuses pourraient cependant la traverser. Sa fonction de filtration est assurée par le tamis formé par la polymérisation des protéoglycanes. Elle constitue, de plus, un squelette dans la régénération

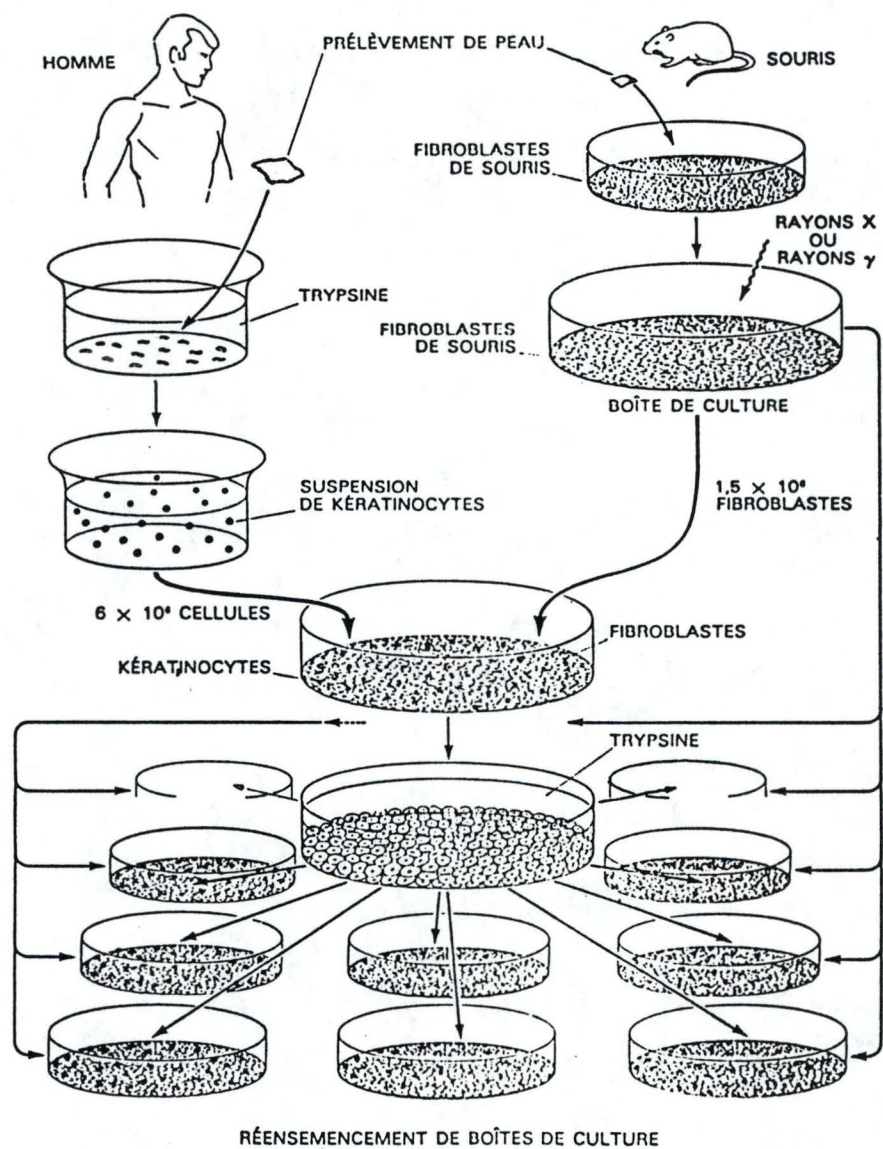


Fig. 17. Technique de la culture selon Green (Thivolet, 1986).

et la cicatrisation tissulaire où elle sert de guide à la migration des kératinocytes (Verrando, 1991).

1.2. Culture des kératinocytes épidermiques

1.2.1. Généralités

Plusieurs méthodes permettent de cultiver les kératinocytes in vitro ce qui autorise leur étude fondamentale ainsi que diverses applications cliniques. Les cultures de cellules dispersées sur un substrat, qui sont les techniques que nous avons utilisées dans ce travail, vont être décrites dans les prochains paragraphes. Depuis 1975, l'amélioration des techniques de culture a permis d'obtenir, sur des substrats variés, des cultures confluentes dans des délais assez courts. Ces cultures de kératinocytes peuvent se stratifier et subir la différenciation terminale pour former de véritables feuillets épidermiques, utilisables par exemple dans les greffes de peau (Thivolet, 1986).

Culture sur lit nourricier de fibroblastes type Rheinwald et Green (1975)

La méthode de Green (Green & Rheinwald, 1977; Green, 1992) utilise un lit nourricier, appelé en anglais "feeder layer", de fibroblastes de souris embryonnaires. Ces cellules, généralement des 3T3, sont traitées à la mitomycine C ou irradiées avant d'êtreensemencées de façon à empêcher la réplication de leur ADN sans toucher à leur métabolisme (Todaro & Green, 1963; Green, 1992). Le lit nourricier de 3T3 apporte aux kératinocytes de nombreux constituants indispensables à leur métabolisme tel que des facteurs de croissance. Il produit aussi des éléments de la JED et inhibe la prolifération des fibroblastes dermiques. La méthode de Green comprend 2 grandes étapes. La première est l'ensemencement des 3T3, alors que la deuxième est celui des kératinocytes sur ce lit nourricier. En culture primaire, ces kératinocytes proviennent d'une suspension cellulaire issue de la partie épidermique d'un prélèvement chirurgical de peau. Les cellules épidermiques s'intercalent entre les cellules 3T3, adhèrent et finalement s'étalent sur le fond de la boîte de culture (Green, 1980). Une fois attachées, ces cellules vont proliférer. En réalité, seulement 10% de la population des kératinocytes forment des colonies qui vont progressivement repousser les 3T3 à leur périphérie pour finalement confluer, éliminer les 3T3 et recouvrir la boîte de culture en 10 à 15 jours. Dès la formation des colonies, les kératinocytes se superposent (jusqu'à 6 à 8 couches) et la culture finale obtenue montre les caractéristiques d'un épiderme embryonnaire (Rheinwald & Green, 1975; Green, 1980; Thivolet, 1986). Par la suite, des sous-cultures ou cultures secondaires sont réalisées après trypsinisation de la culture primaire.

Par cette méthode, à partir de 2 cm² de peau, il est possible d'obtenir après quatre semaines 1 m² d'un "épiderme" de culture (Fig. 17)(Thivolet, 1986). Le bon rendement de cette

technique est obtenu grâce au lit nourricier utilisé pour ses capacités de synthèse, mais également grâce aux améliorations apportées par les auteurs dans la composition du milieu de culture. Mais le plus grand avantage de cette technique est celui de combiner à la fois une extension de la surface et une différenciation et de permettre ainsi des applications cliniques comme le traitement des grands brûlés ou d'ulcères cutanés. Ces cultures, comme d'autres méthodes, produisent une élimination des cellules de Merkel, des mélanocytes, mais surtout des cellules de Langerhans, dans les épidermes obtenus. La non-survie dans le milieu de culture de ces cellules originaires de la moëlle osseuse (Green, 1992) est intéressante lors des greffes, vu que ces cellules sont responsables du caractère antigénique de la peau.

Culture des kératinocytes épidermiques sans sérum et sans lit nourricier

Depuis une dizaine d'années, une nouvelle technique de culture des kératinocytes a été mise au point. Une culture sans sérum et sans lit nourricier est devenue possible par addition, dans un nouveau milieu nutritionnel (milieu MCDB 153) d'éléments à l'état de traces, dont un extrait de glande pituitaire bovine (Boyce & Ham, 1983). De plus, une concentration en Ca^{++} plus faible (0,1 mM) que la concentration généralement utilisée va permettre une prolifération optimale des kératinocytes. Des recherches ultérieures ont permis d'optimiser la croissance des kératinocytes, par enrichissement du milieu MCDB 153 avec des concentrations plus élevées d'un certain nombre d'acides aminés essentiels. On obtient de la sorte une monocouche proliférative possédant les caractéristiques des cellules épidermiques basales, mais sans différenciation (Pittelkow & Scott, 1986).

Pour induire éventuellement la différenciation après confluence des cellules, le milieu MCDB 153 est remplacé, par la suite, par le milieu DMEM ("Dulbecco Modified Eagle Medium"), auquel on ajoute 10% de sérum de veau foetal avec une concentration 1,8 mM de Ca^{++} . Ces différents facteurs induisent une stratification avec formation de desmosomes et la différenciation qui permet la formation de voiles cohérents de kératinocytes (Pittelkow & Scott, 1986).

Malgré sa dépendance moindre au sérum, son autonomie face au lit nourricier de 3T3 et l'inutilité de facteurs tels que la toxine cholérique qui à cause de sa liaison irréversible continuerait à augmenter l'AMPc dans la cellule, cette technique ne possède pas le grand avantage de la méthode de Green qui est d'associer prolifération et différenciation cellulaires.

1.2.2. Histologie et organisation de l'épiderme obtenu par culture sur 3T3

Chaque colonie formée de plusieurs couches cellulaires est polarisée comme l'épiderme normal : les cellules qui prolifèrent (les cellules basales) sont ancrées au fond de la boîte de culture, comme si elles se trouvaient sur la membrane basale de l'épiderme, et les cellules

en différenciation sont situées dans les couches suprabasales. Toutefois, alors que l'épiderme est alimenté *in vivo* par le pôle basal (via les vaisseaux sanguins du derme sous-jacent), les cultures cellulaires de ce type sont nourries par le pôle apical des cellules différenciées (Green, 1980; Green, 1992). En se rejoignant les colonies forment une couche épidermique uniquement formée de kératinocytes dont les cellules sont attachées entre elles par des desmosomes. Les hémidesmosomes, permettant l'adhésion au substrat, ne sont pas entièrement formés en culture (voir chapitre les concernant). L'épiderme reconstruit *in vitro* sera formé en moyenne de 2 à 8 couches cellulaires. La couche basale est constituée de cellules aplaties jointives avec un noyau central. A l'opposé, il faut se rappeler qu'*in vivo* les cellules basales ont une forme polygonale cylindrique (Rheinwald & Green, 1975; Green, 1980). Les cellules basales adhérant au substrat de culture représentent la population de kératinocytes en prolifération, à l'opposé d'*in vivo* où la synthèse d'ADN ne se limite pas uniquement à la couche basale, mais peut se produire également au niveau de la première couche suprabasale (Poumay et al., 1991; Poumay et al., 1993). Dans l'épithélium confluent, les divisions continuent à un taux beaucoup plus bas que dans les colonies en expansion. Ce taux inférieur correspond au taux de prolifération de l'épiderme *in vivo* (Green, 1980). Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, il n'y a aucune synthèse d'involucrine au niveau de la couche basale. L'épithélium cultivé n'est cependant qu'une reproduction imparfaite de l'épiderme. Il est stratifié et polarisé mais son organisation cellulaire est irrégulière. En outre, la différenciation est incomplète. L'épithélium contient peu de cellules cornées et presque pas de cellules granuleuses normalement situées à la frontière de la partie vivante et de la partie morte de l'épiderme. Par ailleurs, les cellules en culture ne synthétisent pas toutes les kératines normalement produites lors de la différenciation des couches supérieures de la partie vivante (Green, 1992). Les tailles moléculaires des kératines produites par les cellules en culture sont similaires mais pas identiques à celles produites par les cellules d'un épiderme intact. Ces différences, influencées par l'environnement local, ne sont cependant pas irréversibles (Green et al., 1979). Les cellules superficielles larges et aplaties sont les plus différenciées de la culture. Elles desquament comme *in vivo*, mais à l'opposé d'*in vivo*, ces cellules ne perdent ni leur noyau ni des organelles (Lewis et al., 1987). Il semble, de plus, que l'involucrine soit synthétisée très tôt en culture, dès les couches immédiatement suprabasales, alors qu'*in vivo* elle apparaît au niveau de la couche granuleuse.

1.2.3. Contrôles de la différenciation et de la stratification

Les cultures cellulaires ont permis de montrer que les phénomènes de prolifération et de différenciation sont dépendants de plusieurs facteurs externes ou internes. Par exemple, la concentration externe en calcium, liée au phénomène de perméabilisation membranaire, peut activer la transglutaminase (Green, 1980) mais également induire la stratification (Watt,

1984; Watt, 1989). De même, l'adhésion au substrat ainsi que la taille des cellules semblent contrôler la différenciation terminale (Watt, 1984; Watt, 1989; Poumay et al., 1991). La présence ou non de facteurs de croissance contrôle aussi ces mécanismes.

Le rôle de l'adhésion au substrat.

Des kératinocytes en suspension stoppent leur synthèse d'ADN et induisent leur différenciation terminale, comme le révèle la synthèse d'involucrine (Watt et al., 1988). La perte de contact avec d'autres kératinocytes et avec le substrat déclenche un changement dans la morphologie des cellules et mène à leur différenciation terminale (Watt et al., 1988). Les mesures de la prolifération et de la différenciation dans des cultures détachées par la dispase révèlent la disparition progressive des cellules en prolifération, suivie par une augmentation des cellules contenant de l'involucrine c'est-à-dire en différenciation. Ces résultats suggèrent que l'ancrage basal est responsable du maintien de la prolifération des cultures de kératinocytes (Watt et al., 1988; Watt, 1989; Poumay et al., 1991).

1.2.4. Utilisations des cultures de peau

Ainsi que nous l'avons dit précédemment, ces modèles de peaux reconstitués in vitro présentent un grand intérêt tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué (applications pharmaceutiques et médicales). En fonction du but recherché, les peaux cultivées en boîte doivent donc parfois pouvoir être détachées de leur substrat. Le détachement se réalise par action enzymatique de la dispase.

1.2.4.1. Détachement par la dispase

La dispase est une protéase neutre cristallisée à partir du filtra de culture de *Bacillus Polymixa* (Green et al., 1979; Owaribe et al., 1989; Stenn et al., 1989).

Cette protéase permet de séparer l'épiderme du derme, ou le voile épithélial de culture de son substrat, tout en préservant la viabilité des cellules épithéliales et les attaches intracellulaires (à l'opposé de la trypsine qui sépare individuellement les kératinocytes).

La dispase n'est pas une protéase à grand spectre d'action. Elle dégrade un peu de collagène I, mais surtout agit de façon sélective sur le collagène de type IV et la fibronectine sans toucher à la laminine, au collagène V, à l'albumine sérique, à la transférine ou aux fibrilles d'ancrage (collagène de type VII) (Stenn et al., 1989).

On produit aujourd'hui, en fonction de leur purification, deux grands types de dispase : la dispase I et la dispase II. On ne comprend pas encore très bien aujourd'hui pourquoi la dispase II, une protéase moins purifiée, agit de façon plus efficace que la dispase I. Les impuretés qu'elle contient doivent probablement jouer un rôle .

1.2.4.2. Conséquences du détachement

Des études de cultures détachées par la dispase et conservées sous forme de voiles flottants ont permis d'étudier les conséquences de ce détachement. Dès que le voile épidermique est détaché de son substrat, les bords de celui-ci s'enroulent. Le voile épidermique très élastique se rétracte fort rapidement devenant de la sorte plus épais. Le traitement par la dispase n'a aucun effet sur la viabilité des cellules épidermiques (Green et al., 1979). D'un point de vue morphologique, il faut remarquer un changement de forme des kératinocytes basaux qui passent d'une forme aplatie à une forme cuboïdale. Cette modification correspond à une réduction de 50 à 60 % de la surface du feuillet (Compton et al., 1989). En réponse à cette destruction du contact épithélial avec la matrice extracellulaire, la microscopie électronique nous apprend que de nombreux "blebs" se forment alors de manière réversible. Il semble aussi que les hémidesmosomes immatures disparaissent alors de la face basale des cellules détachées (Compton et al., 1989). Les mesures de la prolifération et de la différenciation terminale dans des cultures détachées puis stockées révèlent que le stockage de ces voiles aboutit progressivement et irréversiblement à une inhibition complète de l'activité prolifératrice des kératinocytes, suivie par une augmentation des cellules involucrines positives (Poumay et al., 1991; Boucher et al., 1991; Poumay et al., 1993). De plus, le stockage des cultures détachées par la dispase à 37°C cause une perte progressive de la polarité caractéristique des épithéliums stratifiés en culture. En effet, le détachement des cellules induit une réorganisation spatiale des populations cellulaires qui produit en 16 heures environ des groupes de cellules formés de kératinocytes indifférenciés entourés par des cellules en différenciation terminale. 24 heures après le détachement à 37°C, des cellules involucrine-positives apparaissent au centre de ces amas cellulaires (Poumay et al., 1993).

Le "colony forming efficiency", qui correspond à la capacité de la population des kératinocytes de réinitier la formation des colonies, diminue alors fortement. Alors qu'elle a une valeur d'environ 12% immédiatement après le détachement à la dispase, elle n'est plus que de 0,3% après 48 heures de stockage (Poumay et al., 1993). Stockant les cultures détachées à température ambiante, De Luca et al. (1989) n'observent pas de diminution du "colony forming efficiency" endéans les huit premières heures suivant le détachement. Le "colony forming efficiency" diminue toutefois par la suite dans leurs expériences, mais de façon non significative.

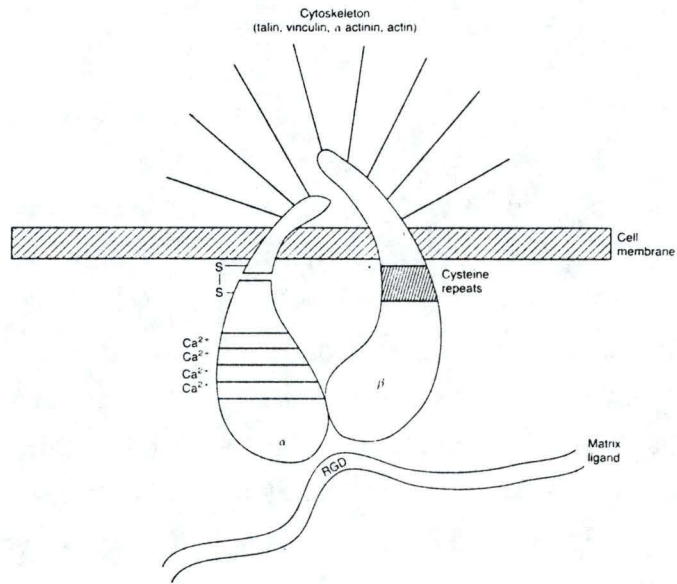


Fig. 18. Modèle structural des sous-unités d'intégrine (Dedhar, 1990).

1.3. Les intégrines

1.3.1. Introduction

Les interactions cellule-cellule et cellule-substrat sont possibles grâce à différentes familles de récepteurs appelés molécules d'adhésion. En plus de leur rôle dans l'adhésion à des ligands et des protéines matricielles extracellulaires spécifiques, ces récepteurs influencent des processus intracellulaires incluant la croissance cellulaire, la différenciation, la formation de jonctions et la polarité cellulaire. Il existe cinq grands types de familles de ces molécules (Albelda & Buck, 1990; Staquet, 1991): les intégrines, les immunoglobulines, les cadhérines, les Lec-CAMs et les homing récepteurs.

Les intégrines sont des molécules hétérodimériques qui fonctionnent à la fois comme molécules d'adhésion cellule-cellule ou comme molécule d'adhésion cellule-matrice extracellulaire. La superfamille des immunoglobulines est formée de récepteurs cellule-cellule uniquement. Les immunoglobulines ont des fonctions importantes au cours de l'embryogenèse, au cours des processus de guérison et dans la réponse inflammatoire. Les cadhérines sont des récepteurs cellule-cellule homophiles, Ca^{++} dépendant et régulés au cours du développement. La E-cadhérine, par exemple, joue un rôle essentiel dans l'épiderme, via des interactions avec différentes molécules d'adhésion, pour maintenir l'organisation suprabasale des kératinocytes (Wheelock & Jensen, 1992). Les Lec CAMs sont des molécules qui par leur domaine "lectine-like" permettant l'adhésion des globules blancs aux cellules endothéliales sont indispensables dans des phénomènes tels que la diapédèse. Les homing récepteurs sont essentiels dans le ciblage de lymphocytes vers un tissu spécialisé.

1.3.2. Structure biochimique des intégrines

Les intégrines forment une famille de glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques constituées d'une association non covalente d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Fig. 18). Ces deux sous-unités ont un grand domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique (excepté la sous-unité β_4 qui possède un domaine cytosplasmique d'environ 1000 acides aminés et qui de ce fait montre un poids moléculaire relativement plus grand que celui des autres sous-unités β) (Hynes, 1992). Les sous-unités α possèdent des sites de liaison pour des cations bivalents, de type Ca^{++} . Généralement, les sous-unités α sont clivées protéolytiquement en une chaîne lourde extracellulaire et une chaîne légère transmembranaire, ces deux chaînes étant reliées par un pont disulfure (Hynes, 1992; Albelda & Buck, 1990). Les sous-unités β contiennent quatre répétitions d'un motif riche en cystéines. La grande boucle du côté N-terminal du

Tableau I

Ligands des intégrines et sites de liaisons.

Integrin subunit composition	Ligands*	Binding sites on ligands*
$\alpha_1\beta_1$	COLL I, COLL IV, LM	
$\alpha_2\beta_1$	COLL I, COLL IV, LM	
$\alpha_3\beta_1$	COLL I, LM, FN	RGD on FN
$\alpha_4\beta_1$	FN, VCAM-1	CS-1 segment peptide EILDVPST on FN
$\alpha_4\beta_7$	Peyer's Patch Addressin	
$\alpha_5\beta_1$	FN	RGD
$\alpha_6\beta_1$	LM	
$\alpha_6\beta_4$	LM?	
$\alpha_v\beta_1$	FN, VN?	RGD
$\alpha_v\beta_n$	FN, COLL I	RGD
$\alpha_v\beta_3$	VN, FB, VWF, OP	RGD
$\alpha_{IIb}\beta_3$	FB, FN, VN, VWF	RGD and KQAGD on FB
$\alpha_x\beta_5(\beta_x)$	FN, VN	RGD
$\alpha^?\beta_6$		
$\alpha_i\beta_2$	ICAM-1, I.CAM-2	
$\alpha_m\beta_2$	C3bi, FB	RGD on C3bi
$\alpha_x\beta_2$		
α_{LRI}/β_{LRI}		

* Abbreviations: (COLL) Collagen; (FN) Fibronectin; (LM) Laminin; (VN) Vitronectin; (VCAM) Vascular cell adhesion molecule; (FB) Fibrinogen; (VWF) Von Willebrand Factor; (OP) Osteopontin; (I-CAM) Intercellular cell adhesion molecule; (LRI) Leukocyte Response Integrin; (RGD) Arginine-Glycine-Aspartic acid; (EILDVPST) Glutamic acid-Isoleucine-Leucine-Aspartic acid-Valine-Proline-Serine-Threonine; (KQAGD) Lysine-Glutamine-Alanine-Glycine-Aspartic acid.

domaine extracellulaire de la sous-unité β est stabilisée par un pont disulfure intra-chaîne (Albelda & Buck, 1990).

L'interaction des intégrines avec le cytosquelette et la matrice extracellulaire requiert certainement la présence des deux sous-unités, bien que la sous-unité β soit apparemment la plus impliquée. L'association des intégrines avec les filaments d'actine du cytosquelette se fait via une liaison indirecte, impliquant la taline, la vinculine, l' α -actinine et peut-être encore d'autres molécules associées au cytosquelette (Albelda & Buck, 1990).

La liaison des intégrines avec leurs ligands se produit dans une région du côté N-terminal de la sous-unité β , mais implique les deux sous-unités. Les intégrines reconnaissent des séquences d'acides aminés spécifiques de leurs ligands. La plus connue est la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) trouvée dans un grand nombre de protéines matricielles. Il faut remarquer cependant que toutes les intégrines ne se lient pas au ligand via les domaines contenant cette séquence RGD (Dedhar, 1990).

Les intégrines représentent donc des structures transmembranaires d'attache entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette. L'interaction avec un ligand extérieur modifierait aussi la structure du cytosquelette, via les intégrines, pour transmettre des signaux du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire (Quaranta & Jones, 1991; Schwartz, 1992).

1.3.3. Hétérogénéité des intégrines et spécificité du ligand

Les intégrines ont été divisées à l'origine en trois grandes sous-familles possédant chacune une sous-unité β commune capable de s'associer avec un groupe spécifique de sous-unités α . Plus récemment, on a montré que certaines sous-unités α pouvaient également se combiner avec plus d'une sous-unité β . Jusqu'à présent, on a découvert 12 sous-unités α et 9 sous-unités β . Toutes les associations ne sont pas possibles et on observe la formation de 18 hétérodimères différents (tableau 1), chacun de ceux-ci pouvant se lier à un ou plusieurs éléments de la matrice extracellulaire. Les ligands extracellulaires incluant des glycoprotéines matricielles (laminine, fibronectine, collagène, ...), des constituants du plasma (fibrinogène, vitronectine, facteur de VonWillebrand, ...) ou des molécules de surface cellulaire sont également très nombreux (Hynes, 1992).

1.3.3.1. Sous-famille β_1

Le plus grand nombre des intégrines possèdent la sous-unité β_1 . Ces intégrines sont connues sous le nom de VLA (Very Late Antigen) vu que, lorsque ces molécules s'expriment au niveau de lymphocytes, elles apparaissent tardivement, plusieurs jours après l'activation mitogénique (Hynes, 1987; Albelda & Buck, 1990). Ces molécules ne sont cependant pas limitées aux cellules lymphocytaires mais peuvent être exprimées dans la plupart des types

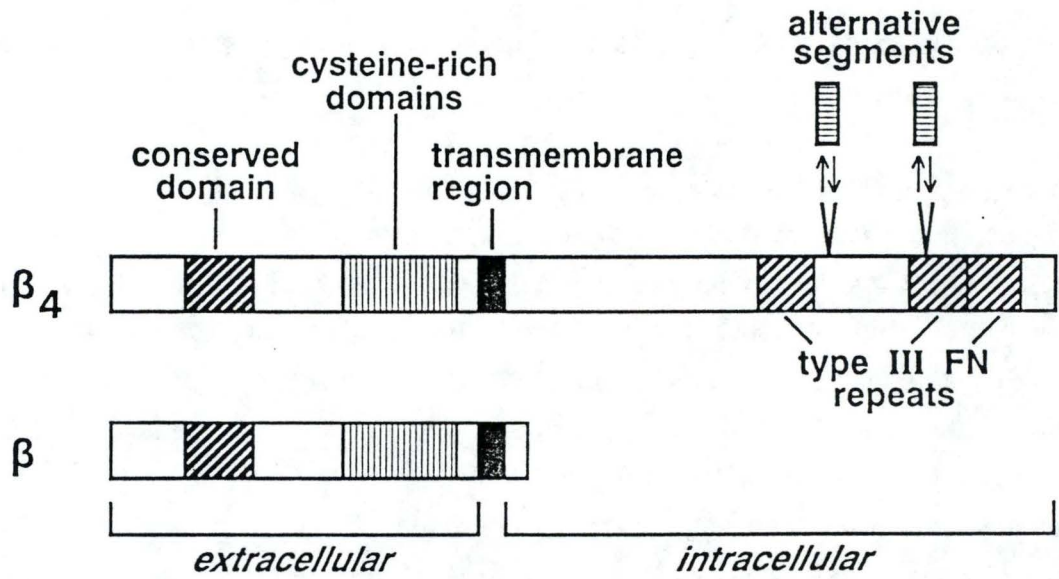


Fig. 19. Organisation de la structure primaire de la sous-unité d'intégrine β_4 en comparaison avec l'organisation typique des autres chaînes β d'intégrines (Quaranta et Jones, 1991).

cellulaires (à l'exception des globules rouges). On a découvert jusqu'à présent 7 récepteurs VLA différents, chacun avec des spécificités particulières pour un ou plusieurs ligands (ceux-ci pouvant varier d'un type cellulaire à l'autre) (Albelda & Buck, 1990). Les intégrines β_1 fonctionnent à la fois dans les adhésions cellule-cellule et cellule-substrat (collagène, fibronectine et laminine essentiellement).

1.3.3.2. Sous-famille β_2

La sous-famille β_2 des intégrines, connue également comme LEU-CAMs (Leu : leucocytes; CAM : molécule d'adhésion cellulaire) ou Ag CD18, est formée de trois récepteurs d'adhésion leucocytaires, LFA-1, MAC-1 et GP 150/95. Ces molécules, à l'opposé des VLA, sont limitées aux globules blancs (Albelda & Buck, 1990). Ces récepteurs sont nécessaires pour l'adhérence des lymphocytes, des neutrophiles et des monocytes circulants aux cellules endothéliales permettant ensuite la migration de ces cellules vers les sites inflammatoires et dans les tissus extravasculaires (Staquet, 1991).

1.3.3.3. Sous-famille β_3

Cette sous-famille, également appelée cytoadhésine, contient en plus des récepteurs à la vitronectine ($\alpha_v\beta_3$), la protéine de surface la plus importante des plaquettes : la glycoprotéine IIb/IIIa. Malgré que sa première fonction est d'être un récepteur pour la fibronectine, celle-ci peut se lier avec une plus faible affinité au facteur de Von Willebrand ou à la thrombospondine (Albelda & Buck, 1990).

Une autre sous-unité β est importante au niveau de l'épiderme.

La sous-unité β_4 sert d'alternative à la β_1 pour la sous-unité α_6 . Cette association se produit surtout sur les cellules de type épithélial. Par ses quatre domaines cystéiniques, typiques de ceux trouvés dans les séquences des sous-unités β , la sous-unité β_4 peut être considérée comme appartenant à ce groupe de sous-unités (Sonnenberg et al., 1990) malgré son grand domaine cytoplasmique de 1100 résidus (40 à 50 acides aminés chez les autres sous-unités β) qui possède trois régions de 120 résidus (Fig. 19) présentant une grande homologie avec la fibronectine. Une telle taille doit suggérer une complexité de fonction. Vu l'épaisseur estimée de la plaque hémidesmosomale (12-15 nm), le domaine cytoplasmique de la sous-unité β_4 pourrait facilement s'étendre en profondeur et, par relation avec les filaments intermédiaires, intervenir dans la transduction d'un signal (Quaranta & Jones, 1991).

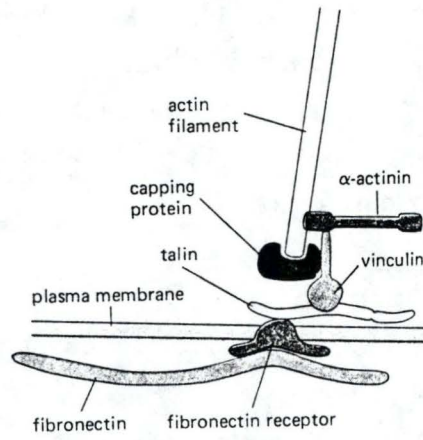


Fig. 20. Structure d'une adhésion focale (Alberts et al., 1989).

1.3.3.4. Intégrines et structures d'adhésion

En culture cellulaire, les deux grands types de structures d'adhésion des kératinocytes épidermiques au substrat sont les hémidesmosomes et les adhésions focales. Ces dernières correspondent aux endroits où la surface cellulaire est la plus proche du substrat (10 à 15 nm). Le cortex cellulaire au niveau du site de contact focal est attaché par des protéines de liaison transmembranaire à des composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine. Le domaine externe des intégrines à sous-unités β_1 sert de récepteur pour la fibronectine, alors que leur domaine cytoplasmique se lie aux microfilaments d'actine. Cette liaison est indirecte et se fait par l'intermédiaire d'au moins quatre protéines d'ancrage, comprenant la taline et la vinculine (Fig. 20)(Alberts et al., 1989). L' $\alpha_6\beta_4$ est l'intégrine trouvée en association avec les hémidesmosomes (Stanley et al., 1980; Stepp et al., 1990; Jones et al., 1991; Kurpakus, 1991). L' $\alpha_3\beta_1$ et l' $\alpha_2\beta_1$ sont les deux principales intégrines impliquées dans les adhésions focales correspondant aux endroits où la culture est la plus proche du substrat (Carter et al., 1990). L' $\alpha_6\beta_4$ se trouve à proximité des adhésions focales mais est clairement exclue de celles-ci (Marchisio et al., 1991).

Alors que $\alpha_6\beta_4$ est polarisée du côté de la membrane basale et est exprimée préférentiellement au niveau des structures hémidesmosomales, l' $\alpha_2\beta_1$ et l' $\alpha_3\beta_1$ ne se limitent pas aux adhésions focales mais sont exprimées sur toute la membrane plasmique des cellules basales (surface basale, apicale et latérales) (Klein et al., 1990; Kurpakus et al., 1991).

Alors que les ligands de l' $\alpha_2\beta_1$ (récepteur du collagène) et de l' $\alpha_3\beta_1$ (récepteur de la fibronectine, du collagène et de la laminine) (Le Varlet et al., 1991), celui ou ceux de l' $\alpha_6\beta_4$ sont encore hypothétiques. Le premier candidat serait la laminine (Quaranta & Jones, 1991) étant donné qu'il se colocalise généralement avec l' $\alpha_6\beta_4$. De plus, la sous-unité α_6 et une autre sous-unité β (β_1) forment également un récepteur pour la laminine.

L'adhésion et la migration des kératinocytes nouvellement repiqués sont activées d'abord par l' α_3 , alors que les contacts d'ancrage plus stables, impliquant l' $\alpha_6\beta_4$, se forment à plus longue échéance (Kurpakus et al., 1991). L' $\alpha_6\beta_4$ montre une localisation préférentielle dans les zones pauvres en fibres de stress d'actine. Les surfaces riches en actine et pauvres en $\alpha_6\beta_4$, avec une plus grande proximité avec le substrat, correspondent à l'association des intégrines $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_3\beta_1$ dans les adhésions focales (Carter et al., 1990; Marchisio et al., 1991).

1.3.3.5 Ligands hypothétiques de l' $\alpha_6\beta_4$

L' α_6 a une distribution plus large que la β_4 . Les cellules et les tissus positifs pour l' α_6 mais négatifs pour la β_4 peuvent exprimer l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ correspondant à un récepteur de la laminine. In vitro, beaucoup de lignées cellulaires possèdent à la fois les intégrines $\alpha_6\beta_1$ et

$\alpha_6\beta_4$, le taux de ces complexes variant d'une lignée cellulaire à l'autre (Sonnenberg et al., 1990).

L' α_6 se lie préférentiellement à la β_4 , même en présence de β_1 . Des immunoprécipitations avec des anticorps anti- α_6 ont montré, de fait, que la sous-unité α_6 se lie préférentiellement à la β_4 même en présence de la sous-unité β_1 (Sonnenberg et al., 1990). La question que l'on se pose encore actuellement est de savoir si l' $\alpha_6\beta_4$ est également un récepteur pour la laminine. Rien n'exclut qu'il n'y ait pas d'autres ligands possibles pour l' $\alpha_6\beta_4$. La coïncidence de l'expression et de la localisation de l' $\alpha_6\beta_4$ et de la laminine durant la formation du complexe d'adhésion, ainsi que la présence de certains épitopes de la laminine dans la lamina lucida, pousseraient à répondre positivement à la question (Kurpakus et al., 1991). De plus des anticorps monoclonaux spécifiques pour les sous-unités α et β bloquent l'adhésion à la laminine (Lee et al., 1992). Cependant, cette fonction de l' $\alpha_6\beta_4$ n'est pas largement acceptée. Certains auteurs pensent que le ligand pour l' $\alpha_6\beta_4$ peut être différent de celui de l' $\alpha_6\beta_1$ et soulignent que l' $\alpha_6\beta_4$ ne se lie pas sur des colonnes d'affinité portant de la laminine (De Luca et al., 1990). Une hypothèse proposée est que l'adhésion dépendante de l' α_6 , chez des cellules qui expriment l' $\alpha_6\beta_4$, serait peut-être activée par un faible niveau de l' $\alpha_6\beta_1$ et non pas par l' $\alpha_6\beta_4$ elle-même (Lee et al., 1992).

1.4. L'hémidesmosome

1.4.1. Constituants de l'hémidesmosome

Comme déjà vu précédemment, l'hémidesmosome est un élément important de l'ancrage de l'épiderme sur le derme.

Les composants propres aux hémidesmosomes identifiés jusqu'à présent sont les deux antigènes de la pemphigoïde bulleuse (APB) de 230 et 180 kd respectivement, l'HD1, l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ et la kalinine.

1.4.1.1. Les antigènes de la pemphigoïde bulleuse

La pemphigoïde bulleuse est une maladie auto-immune provoquant des boursoufflures au niveau de la peau. Celles-ci sont dues à la détérioration des interactions entre l'épithélium et le tissu conjonctif sous-jacent, résultant probablement de la perte de l'intégrité hémidesmosomale (Quaranta & Jones, 1991). Les APB de 230 kd, localisés essentiellement au niveau des plaques hémidesmosomales, sont des éléments cytosoliques permettant peut-être la fixation des filaments intermédiaires de kératine au niveau de la plaque cytoplasmique de l'hémidesmosome (Kurpakus et al., 1991). Les APB ne se limitent pas à l'épiderme, mais se situent dans tous les épithéliums stratifiés. Ceci suggère que les protéines de la pemphigoïde bulleuse (qui sont de deux types : HD2 de 230 kd localisée au

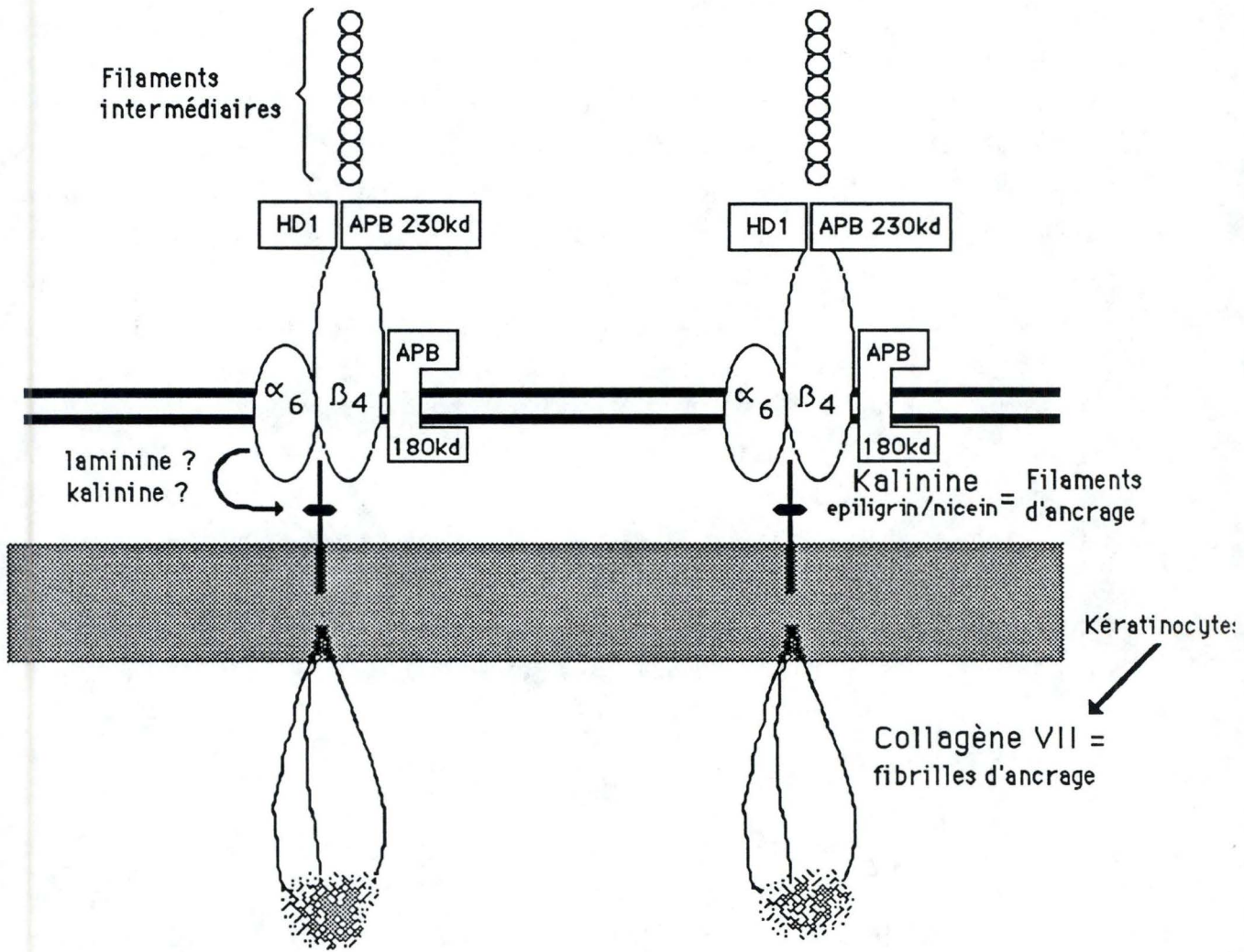


Fig. 21. Interactions possibles entre les différents constituants hémidesmosomaux.

niveau de la plaque cytoplasmique et HD4 de 180 kd localisée au niveau transmembranaire) (Fig. 21) (Hieda et al., 1992, Grinnell, 1992) sont synthétisées uniquement au niveau des cellules basales des épithéliums stratifiés et ne sont pas des marqueurs épithéliaux (Owaribe et al., 1990).

1.4.1.2. La HD1

Nouvellement a été découverte une protéine de 500 kd, appelée HD1. Celle-ci se trouve au niveau de la membrane basale des cellules basales, aux mêmes endroits que les APB et tout comme eux est exclue des adhésions focales et des sites d'adhésion cellule-cellule.

Au moins une portion de cette molécule HD1 est localisée dans la région la plus interne de la plaque hémidesmosomale où se font les liaisons avec les filaments intermédiaires (Fig. 21). Il est à remarquer également que l'HD1 est présent au niveau d'astrocytes du nerf optique et de cellules endothéliales qui ne possèdent pas l'hémidesmosome typique (Hieda et al., 1992).

1.4.1.3. Intégrine $\alpha_6\beta_4$

L'intégrine $\alpha_6\beta_4$ est jusqu'à présent la seule intégrine découverte comme partie intégrante de la structure hémidesmosomale (Stepp et al., 1990; Sonnenberg et al., 1991). Il est encore incertain que l' $\alpha_6\beta_4$ s'associe exclusivement aux hémidesmosomes ou qu'elle se trouve de façon générale dans le domaine basal de la membrane plasmique des cellules épithéliales (Quaranta & Jones, 1991). L'utilisation d'un antisérum polyclonal dirigé contre le complexe $\alpha_6\beta_4$ a pu montrer que l' $\alpha_6\beta_4$ était indispensable dans l'assemblage de l'hémidesmosome (Jones et al., 1991). Au niveau cytoplasmique, cette intégrine pourrait être en rapport avec les APB (Fig. 21) et être aussi impliquée, peut-être de façon secondaire, dans les interactions avec les filaments intermédiaires (Quaranta & Jones, 1991). En effet, la sous-unité β_4 , dotée d'une chaîne intracytoplasmique inhabituellement longue, doit certainement posséder des fonctions particulières. Notamment les relations de cette intégrine avec les filaments intermédiaires pourraient avoir une signification dans la transmission de signaux vers le noyau puisque ces filaments sont en relation avec ce dernier. La sous-unité β_4 doit donc être plus impliquée que la sous-unité α_6 dans les interactions intracytoplasmiques. Par contre, dans un modèle de cicatrisation, on a montré que la sous-unité α_6 joue un rôle plus probable que la sous-unité β_4 dans la régulation du lien extracellulaire de l'intégrine avec son ligand. Une perturbation du complexe $\alpha_6\beta_4$ avec un anticorps anti- α_6 semble produire plus d'effets délétères sur l'interaction cellule épithéliale/tissu conjonctif que les anticorps anti- β_4 (Kurpakus et al., 1991).

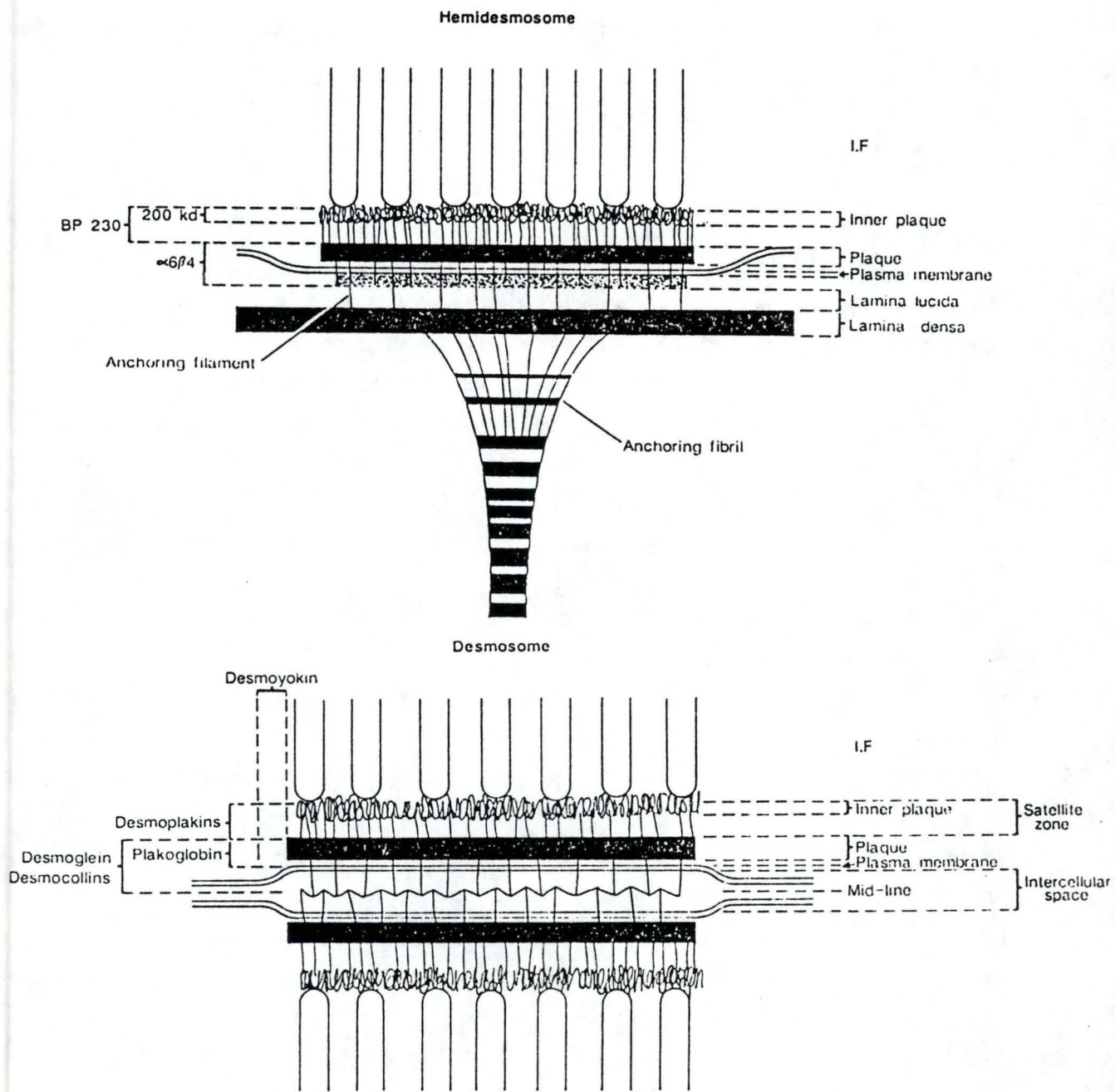


Fig. 22. Principales caractéristiques ultrastructurelles du desmosome et de l'hémidesmosome (Legan et al., 1992).

1.4.1.4. La kalinine

Comme nous l'avons vu, de fins filaments d'ancrage traversent la lamina lucida et relient l'hémidesmosome à la lamina densa. La lamina densa est fixée au stroma par un complexe de collagène de type VII, formant des fibrilles d'ancrage. Un contact direct entre le collagène VII et les structures propres à l'hémidesmosome semble peu probable. Dès lors, certaines protéines devraient pouvoir relier les fibrilles de collagène de type VII aux protéines de l'hémidesmosome. Rousselle et ses collaborateurs (1991) ont découvert ce qu'ils croient être un antigène impliqué intimement dans l'ancrage des kératinocytes à la membrane basale. La molécule la plus abondante obtenue par chromatographie d'immunoaffinité est formée de deux chaînes différentes: elle a été baptisée kalinine (Fig. 21). Un contact direct entre les fibrilles d'ancrage et l'hémidesmosome est improbable, d'autres protéines, telles que la kalinine seraient donc nécessaires pour relier le collagène de type VII à l' $\alpha_6\beta_4$ (Rousselle et al., 1991). L'immunolocalisation de la kalinine suggère fortement que cet antigène soit l'élément ultrastructural des filaments d'ancrage (Rousselle et al., 1991).

1.4.2. Comparaison de l'hémidesmosome et du desmosome : l'hémidesmosome n'est pas un demi-desmosome

Lorsqu'on analyse les hémidesmosomes, jonctions impliquées dans l'adhésion de l'épithélium à la membrane basale et les desmosomes, jonctions impliquées dans les adhésions intercellulaires, au niveau structural, on en déduit de nombreuses similitudes. Ils possèdent tous les deux une plaque dense cytoplasmique reliée aux filaments intermédiaires du cytosquelette de la cellule. La forte ressemblance entre les deux plaques suggère une relation entre les deux types de jonctions (Legan et al., 1992; Klätte et al., 1989). Une caractérisation récente des composants moléculaires montre cependant que la similarité est fortuite (Fig. 22).

1.4.2.1. $\alpha_6\beta_4$ et desmogléine-desmocolline

Les principales molécules d'adhésion des hémidesmosomes sont l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ et probablement l'APB de 180 kd. La sous-unité α_6 est une protéine transmembranaire avec un petit domaine cytoplasmique, alors que la sous-unité β_4 , unique et assez différente des autres chaînes β , possède un domaine cytoplasmique de 1100 acides aminés (Sonnenberg et al., 1990).

Les glycoprotéines adhésives du desmosome sont de deux types distincts mais apparentés : la desmogléine et les desmocollines. La desmogléine, plus courte de 50 acides aminés par rapport à la desmocolline, ne semble pas participer directement à des liens homophiles, vu

son incapacité à atteindre son partenaire à travers l'espace intercellulaire. Dès lors, on peut postuler l'existence de liens homophiles entre les desmocollines et un rôle accessoire des desmogléines (Klatte, 1989; Legan et al., 1992).

A cause de leur taille, la desmogléine et la β_4 peuvent s'étendre dans le cytoplasme au-delà des frontières internes des plaques, vers les filaments intermédiaires. Il semble que les domaines cytoplasmiques de la desmogléine et de la β_4 représentent des solutions parallèles pour les mêmes problèmes structuraux de la formation de la plaque et de l'association des filaments intermédiaires (Legan et al., 1992).

Remarque : un autre composant de la plaque desmosomale est la plakoglobine, associée à la desmogléine ou à la desmocolline 1 par une courte région commune de type cadhérine (Legan et al., 1992).

1.4.2.2. APB et desmoplakine

Les desmoplakines peuvent fournir un lien entre la plaque et les filaments intermédiaires, mais en ne se liant pas directement à ces derniers. Des répétitions de 38 acides aminés à l'extrémité C-terminale de la desmoplakine montrent une forte homologie avec des répétitions similaires dans la séquence d'un composant hémidesmosomal, l'antigène de 230 kd de la pemphigoïde bulleuse. De plus, l'APB de 230 kd occupe la position correspondante et joue probablement le même rôle de "linking" des filaments intermédiaires dans l'hémidesmosome que les desmoplakines dans les desmosomes (Klatte et al., 1989; Owaribe, 1990; Legan et al., 1992).

Legan et ses collaborateurs ont déduit de ces résultats que desmosomes et hémidesmosomes sont des structures analogues et non homologues. Chacune est spécialisée pour ses propres fonctions. Leurs ressemblances structurales sont fortuites, survenant probablement à travers une convergence d'évolution dictée par des exigences mécaniques pour fournir des liens d'adhésion avec le cytosquelette (Legan et al., 1992).

1.5. But du travail

Une culture confluente de kératinocytes, dans l'optique par exemple d'une utilisation thérapeutique de greffes cutanées, doit être séparée de son substrat. Or nous avons vu que le détachement perturbe la prolifération cellulaire et l'induction de la différenciation terminale des kératinocytes dans ces feuillets. Puisque simultanément, on observe une réorganisation spatiale des cellules, nous nous sommes demandés si la perte de la polarisation du tissu qui s'en suit peut être provoquée par la perte de polarisation des cellules basales elles-mêmes, particulièrement par une désorganisation des systèmes d'attache localisés à leur surface basale. Nous avons dès lors étudié les structures hémidesmosomales ainsi que l'expression et la localisation de leurs différents constituants alors que leur fonction d'adhésion est supprimée.

MATERIEL ET METHODES

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel de culture

2.1.1. Milieu de culture des cellules 3T3 (milieu 3T3)

Le milieu de culture des fibroblastes 3T3 de souris est constitué du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM)(Gibco) contenant 10% de FCS (Fetal Calf Serum), de la pénicilline (100 U/ml, Gibco) et de la streptomycine (100 µg/ml, Gibco).

2.1.2. Milieu de culture pour les kératinocytes humains (milieu CE)

Le milieu de base est formé pour trois quarts de son volume de DMEM et pour un quart du mélange nutritif F-12 de Ham (Gibco). Cette solution est additionnée de 10% de FCS et contient en plus 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 5 µg/ml d'insuline (Sigma), 0,4 µg/ml d'hydrocortisone (Calbiochem), 10^{-10} M de toxine cholérique (Sigma), 5 µg/ml de transferrine (Calbiochem), $2 \cdot 10^{-9}$ M de triiodothyronine (Sigma), de $1,8 \cdot 10^{-4}$ M d'adénine (Boehringer) et de 10 µg/ml d'Epidermal Growth Factor (EGF) (Gibco).

2.2. Méthode de culture

2.2.1. Culture des cellules 3T3

Les cellules 3T3 sontensemencées dans des boîtes de 75 cm², dans lesquelles ont été introduits 12 ml de milieu 3T3, à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules par boîte. Les cellules sont cultivées dans une étuve à 37°C, en présence de 5% de CO₂ et en atmosphère humide. Le milieu est changé tous les deux à trois jours.

Lorsque les cellules arrivent à confluence, quatre à cinq jours après l'ensemencement, elles sont détachées par la trypsine pour être ensuite réensemencées. Pratiquement, les cultures sont rincées deux fois par un tampon PBS de Dulbecco ne contenant pas de calcium. On ajoute ensuite 4 ml d'une solution de trypsine-EDTA (solution trypsine 0,1% (Boehringer) + EDTA 0,02% dans du PBS) qu'on laisse agir pendant 3 à 4 minutes, à température ambiante. Le détachement s'achève par un tapotement vigoureux de la boîte, puis 6 ml de milieu 3T3 sont ajoutés dans la boîte afin de neutraliser l'action de la trypsine. Les 10 ml de suspension, transférés dans un tube stérile à fond cône, sont ensuite centrifugés à 1000 RPM pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans du milieu de culture. Un comptage des cellules est effectué dans un hémocytomètre Thomas et un nombre adéquat de fibroblastes peuvent de la sorte être réensemencés.

La préparation des lits nourriciers s'effectue de la même façon, mais au préalable la division cellulaire des 3T3 est bloquée par deux heures d'incubation des cultures confluentes avec 25 µg/ml de mitomycine C (Kiowa) à 37°C après rinçage dans du PBS. Ces cellules sont par la suite réensemencées dans les boîtes de culture à raison de 40.000 cellules par cm².

2.2.2. Cultures des kératinocytes

2.2.2.1. Cultures primaires des kératinocytes

Dès réception de la biopsie de peau, celle-ci est lavée et placée dans une solution saline équilibrée de Hanks à laquelle on ajoute des antibiotiques. Des fragments de 2 cm² sont découpés et placés à 37°C dans la solution de Hanks à laquelle est ajouté 0,25% de trypsine. Après 1 heure, ces fragments sont placés dans du milieu CE dans lequel la séparation du derme et de l'épiderme est réalisée à l'aide de pinces. Les cellules épithéliales sont alors dissociées grâce à plusieurs passages répétés dans une pipette. La suspension ainsi obtenue est filtrée sur une gaze stérile. Le filtrat obtenu est centrifugé à 1000 RPM pendant 5 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire resuspendu dans du milieu CE. Un comptage cellulaire est ensuite réalisé dans un hémocytomètre Thomas afin d'ensemencer, sur lit nourricier de 3T3, 10⁷ cellules par boîte de 175 cm². Le milieu de culture est changé tous les deux à trois jours. A confluence, les cultures sont rincées 2 fois par le tampon PBS sans calcium et incubées pendant 30 minutes à 37°C avec 8 ml de la solution trypsine-EDTA. Dès que les kératinocytes sont détachés, l'action protéolytique de la trypsine est stoppée par l'ajout de 12 ml de milieu CE. Cette suspension est centrifugée à température ambiante à 1000 RPM pendant 5 minutes et le culot est resuspendu pour réaliser un comptage. Une seconde centrifugation permet alors de resuspendre les cellules à raison de 2.10⁶ cellules/ml dans un milieu prévu pour la congélation, composé de DMEM additionné d'antibiotiques (45%), de FCS (45%) et de diméthylsulfoxyde (DMSO, 10%)(Fluka). Un échantillonnage est réalisé dans des cryotubes (NUNC), chaque tube recevant 1 ml (2.10⁶ kératinocytes) de suspension. Ces tubes sont disposés dans une enceinte isolée que l'on place à -80°C afin d'obtenir une congélation lente et régulière des cellules. Le lendemain, les cryotubes sont stockés dans un container d'azote liquide (-185°C).

2.2.2.2. Cultures secondaires des kératinocytes

Les cryotubes sortant de l'azote liquide sont plongés dans un bain d'eau à 37°C. Après décongélation et lavage de l'ampoule à l'alcool, les tubes sont ouverts et la suspension est versée lentement dans 10 ml de milieu CE. Les 10 ml sont centrifugés et le culot resuspendu dans 2 ml de milieu CE. Les kératinocytes sont ensuite ensemencés sur lit nourricier de 3T3

à raison de 10^4 cellules/cm². Les milieux de culture sont renouvelés tous les 2 à 3 jours. La confluence cellulaire est atteinte endéans 10 à 12 jours.

2.3. Détachement par la dispase

2.3.1. Dispase seule

Afin de détacher le voile épidermique de son substrat, les cultures sont incubées dans une solution de dispase II (Boehringer) diluée à 0,25 % (poids/volume) dans du DMEM (Green, 1979) pendant 1 heure à 37°C. Soit l'incubation à 37°C se poursuit alors jusqu'à ce que la culture soit complètement détachée, soit l'incubation est prolongée à 4°C pendant 2 à 3 heures jusqu'à ce que la culture soit facilement détachable à l'aide de pinces. Le détachement est suivi d'un double rinçage dans du PBS. Les cultures détachées sont ensuite stockées dans le milieu de culture durant différents temps d'incubation (0h, 5 min, 15 min, 1h, 2h, 3h, 4h et 6h) à 37°C pour les cultures détachées à cette température et à 4°C pour les cultures détachées à 4°C.

2.3.2. Dispase et inhibiteurs du cytosquelette

Afin d'analyser au niveau microscopique l'effet du cytosquelette sur la rétraction cellulaire, des inhibiteurs de celui-ci sont ajoutés à 37°C à la dispase, au PBS de rinçage et au milieu de culture. Le nocodazole (Janssen), inhibiteur des microtubules, est utilisé à une concentration de 2 µg/ml alors que la cytochalasine D (Sigma), inhibiteur des microfilaments, est utilisée à une concentration de 10 µg/ml. Ces deux molécules sont dissoutes dans le DMSO. Pour les cultures contrôles, le DMSO seul est ajouté aux solutions d'incubation. Les durées d'incubation après détachement à la dispase sont de 0, 1 et 2h.

Pour les analyses macroscopiques de la rétraction du feuillet épidermique détaché de son substrat, les inhibiteurs du cytosquelette sont introduits après détachement à 4°C au niveau du milieu de culture de stockage et les feuillets détachés sont incubés 30 minutes à 4°C avec ces inhibiteurs. Une partie des puits sera alors placée à 37°C, alors qu'une autre partie sera conservée à 4°C toujours dans les mêmes milieux.

2.4. Analyse de la rétraction cellulaire

Pour les analyses macroscopiques, deux boîtes de 12 puits sont utilisées. Elles contiennent toutes les deux 3 exemplaires de cultures contrôles, de cultures incubées avec le nocodazole ou la cytochalasine D et des cultures incubées avec la cytochalasine D et le nocodazole. Une boîte est placée dans l'étuve à 37°C alors que l'autre est conservée à 4°C. Après 2 heures

d'incubation, la seconde boîte est aussi placée dans l'étuve à 37°C. Ces boîtes sont régulièrement photographiées tout au long de leur incubation. Les diamètres des voiles sont mesurés sur agrandissements photographiques et comparés au diamètre maximal, c'est-à-dire le diamètre des puits de culture.

2.5. Techniques histologiques

2.5.1. Fixation

2.5.1.1. Cryofixation pour la microscopie à immunofluorescence

Les voiles épidermiques sont brièvement rincés dans du PBS qui sera immédiatement éliminé par absorption sur papier Wattman, puis ils sont placés dans une petite nacelle en papier aluminium, d'environ 1 cm de diamètre, remplie de Tissue-Tek (OCT Compound) (Miles Laboratoires) qui est un milieu d'enrobage cryoprotecteur. La nacelle est placée le plus rapidement possible dans du méthanol préalablement refroidi par de la carboglace. Les sections des voiles de culture sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Microm HM500-OM), avec une épaisseur de coupe d'environ 5 µm. Elles sont recueillies par adhésion sur des lames porte-objets, séchées à l'air, puis stockées à -80°C jusqu'au moment de leur utilisation.

2.5.1.2. Fixation et postfixation pour la microscopie électronique à transmission

Après un bref rinçage dans le PBS, les voiles épidermiques sont fixés pendant 1 heure à 4°C dans une solution de glutaraldéhyde 2,5% (Fluka) diluée dans du cacodylate de sodium (Fluka) 0,1 M (pH 7,4) contenant du CaCl₂ 0,1 % (solution Caco). Cette première fixation est suivie d'un triple rinçage à 4°C dans la solution Caco (3 fois 5 minutes) et d'une postfixation à 4°C durant 1 heure dans du tétr oxyde d'osmium 1 % (OsO₄) (Jonhson Mattheys Chemicals Limited) dilué dans la solution Caco.

Afin de visualiser la surface basale des cellules basales et les invaginations pinocytotiques qui sont continues avec l'espace extracellulaire, nous avons utilisé le rouge de ruthénium (SIGMA) (Chien et al., 1981)

Le rouge de ruthénium est ajouté à 0,1% (poids/volume) au tétr oxyde d'osmium et joue de la sorte le rôle de marqueur extracellulaire de postfixation. Lors de l'utilisation du rouge de ruthénium, l'incubation des coupes ultrafines avec le citrate de plomb est supprimée.

2.5.2. Déshydratation

Après un triple rinçage dans la solution Caco (3 fois 10 minutes), les voiles épidermiques subissent une déshydratation dans des solutions d'éthanol de plus en plus concentrées à 4°C pour terminer dans de l'éthanol absolu à température ambiante.

2.5.3. Pré-infiltration

Si les feuillets sont séparés du substrat de culture, la pré-infiltration se réalise dans trois bains successifs de 10 minutes d'oxyde de propylène (Fluka) suivis de 90 minutes dans un mélange d'oxyde de propylène et d'Epon 812 (volume/volume).

Par contre, si la culture n'a pas été détachée par la dispase, le feuillet épidermique associé au support plastique est placé pendant une nuit dans un mélange d'alcool 100° et d'Epon 812 (volume/volume).

2.5.4. Infiltration

L'infiltration consiste en deux incubations d'une heure dans l'Epon sur rotor à 37°C. Pendant cette période, de petites assiettes souples sont remplies à mi-hauteur d'Epon et placées dans une étuve à 60°C.

2.5.5. Polymérisation

Les voiles épidermiques sont étalés sur les assiettes polymérisées et recouverts d'Epon. La polymérisation se fait pendant une nuit à 37°C, 24 h à 45°C et 72 h à 60°C. Des coupes semi-fines de 2 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées et colorées par le bleu de toluidine (Merck). Les coupes ultra-fines (40 nm d'épaisseur) réalisées par la suite sont recueillies sur des grilles de cuivre recouvertes de Formvar (Merck).

2.6. Colorations topographiques

2.6.1. Microscopie optique

Afin de se faire une idée de la topographie générale du tissu, une coloration hémalum-érythrosine est réalisée sur les coupes obtenues au cryostat (Hould, 1984).

Tableau II
Description des différents anticorps utilisés dans ce travail

Antigène	Anticorps	Espèce	Dilution	Référence
sous-unité α_2	anti CDW 49b	souris	1:20	
sous-unité α_5	anti CDW 49a	souris	1:25	
sous-unité α_6	GoH3	rat	1:100	Sonnenberg et al. (1986)
sous-unité β_1	DH12	souris	1:50	De Strooper et al. (1988)
sous-unité β_4	439-9B	rat	1:50	Kennel et al. (1989)
Involucrine		lapin (polyclonal)	1:250	Dover et Watt (1987)
APB		humain	1:1000	Owaribe (1990)
HD1	121	souris	1:50	Hieda (1992)

2.6.2. Microscopie électronique à transmission

Les coupes ultra-fines, après avoir été posées sur des grilles de cuivre, sont contrastées à l'acétate d'uranyl alcoolique et au citrate de plomb.

2.7. Colorations immunohisto et cytochimiques

2.7.1. En microscopie optique

2.7.1.1. Marquages immunofluorescents des intégrines et de l'involucrine

2.7.1.1.1. Méthode en général

Les antigènes qui nous intéressent sont reconnus par des anticorps dont les caractéristiques sont données au tableau II. Les anticorps anti α_6 , anti β_4 , anti β_1 , anti involucrine, anti APB et anti HD1 ont été donnés à Yves Poumay respectivement par Dr Sonnenberg (Amsterdam), Dr Kennel (Oak Ridge), Dr Cassiman (Leuven), Dr Watt (Londres) Dr Owaribe (Nagoya), Dr Pittelkow (Rochester) et Dr Owaribe.

Le complexe antigène-anticorps est révélé par un second anticorps conjugué soit à une molécule fluorescente, soit à de la biotine (Fig. 23). Ces anticorps secondaires utilisés sont de différents types : un anticorps polyclonal de mouton anti-immunoglobuline de souris ou un anticorps polyclonal de mouton anti-immunoglobuline de rat lié à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Amersham) et un anticorps polyclonal de mouton anti-immunoglobuline de souris conjugué à la biotine (Amersham). Cette dernière est ensuite révélée par de la streptavidine conjuguée à du Texas Red (Amersham).

2.7.1.1.2. Marquage proprement dit

Sortant du congélateur à -80° , les coupes sont réchauffées à température ambiante puis réhydratées quelques minutes dans du tampon phosphate particulier contenant du CaCl_2 (Gibco) à $9,10 \cdot 10^{-4}\text{M}$, du KCl (Merck) à $2,68 \cdot 10^{-4}\text{M}$, du KH_2PO_4 (Merck) à $1,43 \cdot 10^{-3}\text{M}$, du $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) à $4,92 \cdot 10^{-4}\text{M}$, du NaCl (Fluka) à $1,37 \cdot 10^{-1}\text{M}$ et du $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) à $8,15 \cdot 10^{-3}\text{M}$. Nous l'appellerons tampon $\text{PBA}_{(A)}$

Les coupes sont ensuite fixées pendant 30 minutes dans la formaldéhyde 4% puis lavées dans 3 bains successifs de glycine 0,1M (Merck). Les coupes sont ensuite rincées brièvement puis incubées pendant 2 fois 15 minutes dans du $\text{PBS}_{(A)}/\text{BSA}$ constitué d'une solution de $\text{PBS}_{(A)}$ à laquelle sont ajoutés de l'albumine de sérum bovin 0,1% (BSA) (fraction V) (Boehringer) pour bloquer les sites non-spécifiques, du Triton X-100 0,02% (Merck) 0,02% et du NaN_3 0,20 % (Merck).

Ensuite, 20 μl d'anticorps primaire dilué de façon appropriée (tableau II) dans du $\text{PBS}_{(A)}/\text{BSA}$ sont déposés sur chaque coupe, à l'exception des coupes "contrôle" où l'anticorps



Fig. 23 Complexe antigène-anticorps révélé par un second anticorps conjugué à une molécule fluorescente ou à de la biotine.

est remplacé par du PBS_(A)/BSA. Après incubation à température ambiante dans une chambre humide pendant 60 minutes, l'anticorps est drainé et les coupes sont rincées brièvement puis lavées pendant 3 fois 15 minutes dans le PBS_(A)/BSA. Les coupes sont alors incubées avec l'anticorps secondaire, également dilué dans le PBS_(A)/BSA, dans une chambre humide à température ambiante. Après 45 à 60 minutes, l'anticorps est drainé et les coupes sont rincées brièvement puis lavées dans trois bains successifs de 15 minutes dans le PBS_(A)/BSA. Les coupes sont montées dans une solution de glycérol 90% tamponnée par du Tris et contenant de la 1,4 diazobicyclo (2,2,2)octane (DABCO)(Sigma) pour contrecarrer l'affaiblissement de la fluorescence. Après avoir scellé les couvre-objets avec du vernis à ongles, les lames peuvent être stockées à - 20°C. Ces coupes, après quelques minutes de réchauffement, sont observables sur un microscope Zeiss (Photomicroscope) équipé d'un épicondenseur RS III pour l'épifluorescence associé à des filtres et des miroirs dichroïques spécifiques du Texas Red ou du FITC.

2.7.1.2. Marquage du cytosquelette avec ou sans inhibiteur dans un milieu avec ou sans Ca^{±±}

2.7.1.2.1. Etapes précédant le marquage

Pour cette expérience, la méthode de repiquage des kératinocytes et le milieu de culture sont différents de ceux utilisés jusqu'à présent. Nous avons utilisé des boîtes de culture multi 6. Dans le fond de chaque puits a été placée une lame couvre-objet stérile. Quatre puits ont reçu 400 000 3T3 et 100 000 kératinocytes avec 1,5 ml de milieu CE, 4 autres puits sont remplis de milieu de culture "kératinocyte-SFM" qui est constitué d'un milieu MCDB153 sans Ca⁺⁺ ni sérum et contenant de la gentamycine (50µg/ml), de l'EGF (5ng/ml) et de l'extrait de glande pituitaire bovine (50µg/ml). Ce milieu ne demande pas de couche nourricière (3T3) mais requiert une concentration plus élevée en kératinocytes (300 000 par puits) et permet une prolifération des kératinocytes tout en empêchant la formation de jonctions. Sans attendre la confluence, ces cellules sont traitées avec les inhibiteurs du cytosquelette. Dans chacun des 2 milieux, à 37°C pendant 1 heure, une culture sert de témoin, une culture est traitée par le nocodazole, une autre est traitée par la cytochalasine D et la dernière est traitée avec les deux inhibiteurs (Zamansky et al., 1991). Les concentrations utilisées de ces différents inhibiteurs sont identiques à celles décrites précédemment.

2.7.1.2.2. Marquage proprement dit

Les incubations dans le PBS_(A), le PBS_(A)/BSA, la formaldéhyde et la glycine sont identiques à celles décrites précédemment. Dans une chambre humide, les solutions d'anticorps (40 µl) sont placées sur un parafilm pour y retourner les lames couvre-objets. L'anticorps de la première incubation est un anticorps monoclonal de souris anti α-tubuline dilué 100 fois (Amersham) et l'anticorps de la seconde incubation est l'anticorps biotinylé dilué 100 fois

également. La troisième incubation met en présence les cellules et la phalloïdine conjuguée au bodipy (Molecular Probes, dilué 20 fois) et la streptavidine liée au Texas Red.

2.7.2. En microscopie électronique à transmission

2.7.2.1. Marquage à 4°C, de la sous-unité α_6 par Immunogold

Après avoir été détaché de son substrat à 4°C, le feuillet est incubé à cette température. Le détachement est suivi d'un bref passage dans du PBS_(A) et de trois bains successifs de 10 minutes dans du PBS_(A) contenant de la BSA 0,1%. Les feuillets épidermiques sont alors recouverts pendant 1 heure de 250 μ l de surnageant GoH₃ dialysé contre du PBS_(A) et dilué 10X dans du PBS_(A) + BSA 0,1%. Le puits contrôle sera recouvert uniquement de 250 μ l de PBS_(A) contenant la BSA 0,1%. Cette incubation est suivie de 3 lavages de 10 minutes dans le PBS_(A) contenant la BSA 0,1% puis les voiles épidermiques sont ensuite recouverts de 400 μ l d'une solution de GARa (anticorps de chèvre anti-rat) conjugué à de l'or colloïdal de 10 nm de diamètre (Amersham) dilué 20 fois dans du PBS_(A)/BSA. Après 3 nouveaux lavages successifs de 10 minutes dans la même solution, les feuillets contrôle et test 0h sont lavés dans la solution caco. Les autres feuillets sont placés pendant 5, 15 et 60 minutes dans du milieu CE chauffé préalablement à 37°C avant de suivre les mêmes étapes de fixation, de déshydratation, de préinfiltration, d'infiltration et de polymérisation, décrites plus haut pour la microscopie électronique.

Ce marquage en Immunogold est un marquage pré-embedding vu qu'il est réalisé avant les étapes de fixation et autres de la microscopie électronique. Si des inhibiteurs du cytosquelette sont utilisés au cours de cette expérience, ils sont ajoutés après le marquage, avant d'incuber les feuillets dans le milieu d'incubation à 37°C.

Afin d'analyser le processus d'internalisation et la localisation des billes d'or durant l'incubation des cultures à 37°C des régions cellulaires, prises au hasard sont photographiées au niveau de la couche basale à des grossissements uniformes (30.000 fois). Les micrographies correspondant aux différents temps sont ensuite mélangées et examinées par trois personnes différentes. Le nombre total de particules d'or par micrographie est déterminé et les particules sont classées en quatre localisations différentes: 1) au niveau de la membrane basale, 2) au niveau de vésicules situées au maximum à 1,5 μ m de la surface basale, 3) en profondeur et 4) au niveau des espaces intercellulaires. Les observations sont rassemblées et le nombre de particules d'or trouvé dans chaque catégorie est exprimé en pourcentage du nombre total de particules observées pour chaque temps d'incubation (0, 5, 15 et 60 min) à 37°C.

RESULTATS ET DISCUSSION

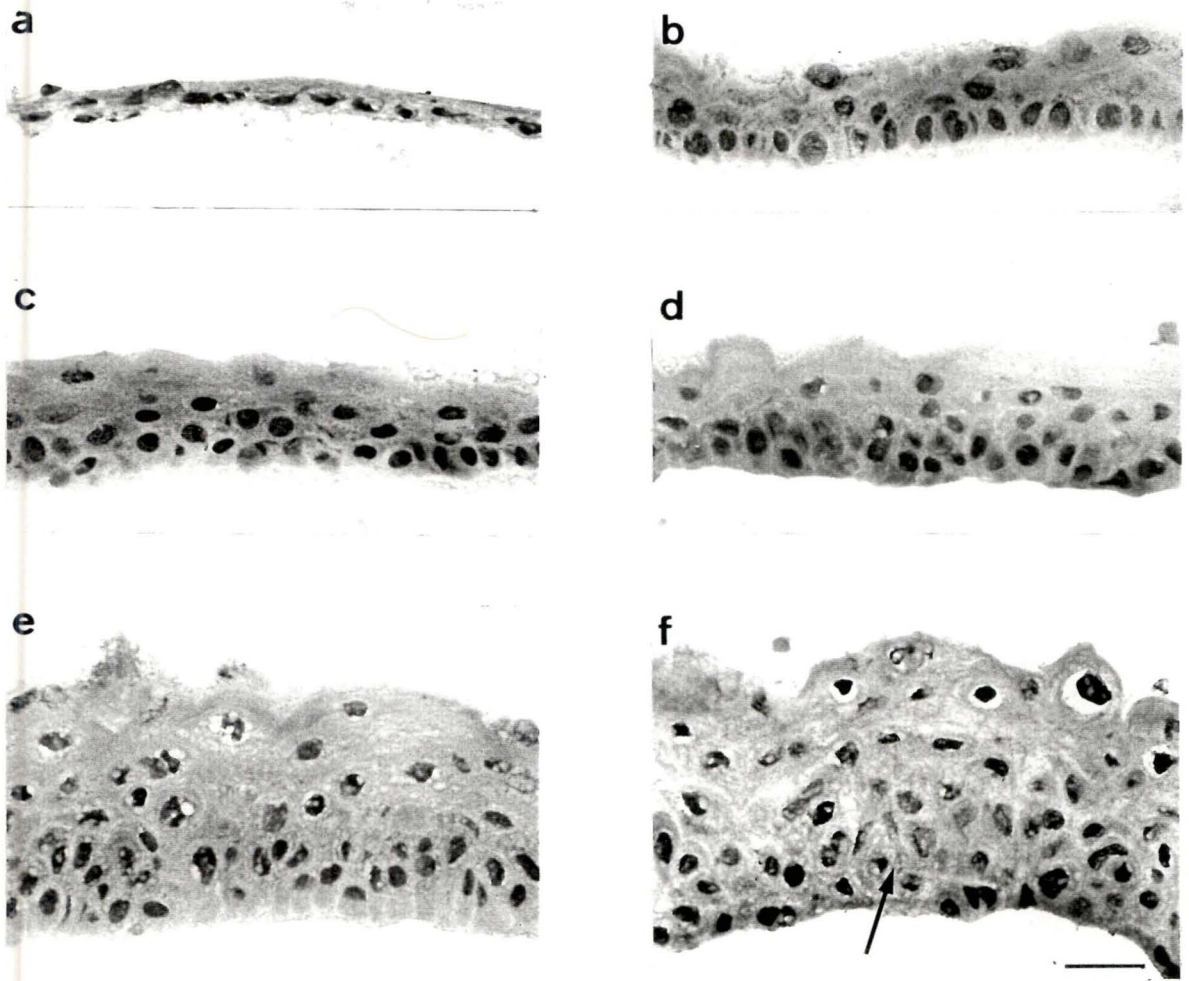


Fig. 24. Micrographies de coupes transversales, réalisées au cryostat et colorées à l'hémalum-érythrosine, de cultures de kératinocytes détachées de leur substrat par de la dispase à 4°C (a) ou à 37°C et stockées à cette dernière température pendant 0h (b), 1h (c), 2h (d), 4h (e) et 6h (f). L'épaississement du voile épidermique durant l'incubation à 37°C est expliqué par une rétraction et une réorganisation cellulaire. La flèche de la figure f indique le début de la formation d'une structure globuleuse.- Barre : 10 μ m.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats

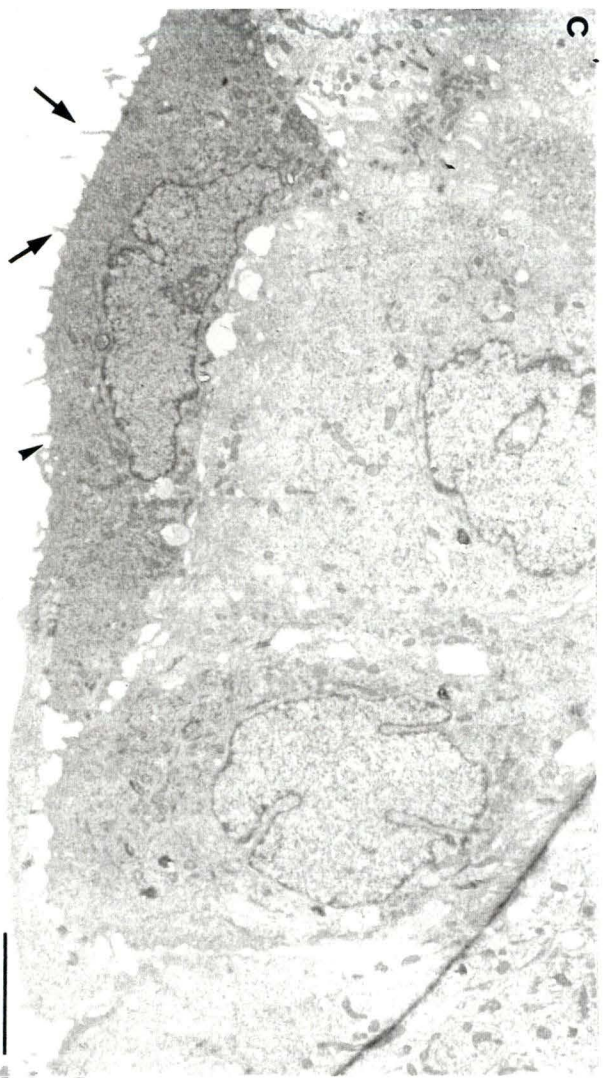
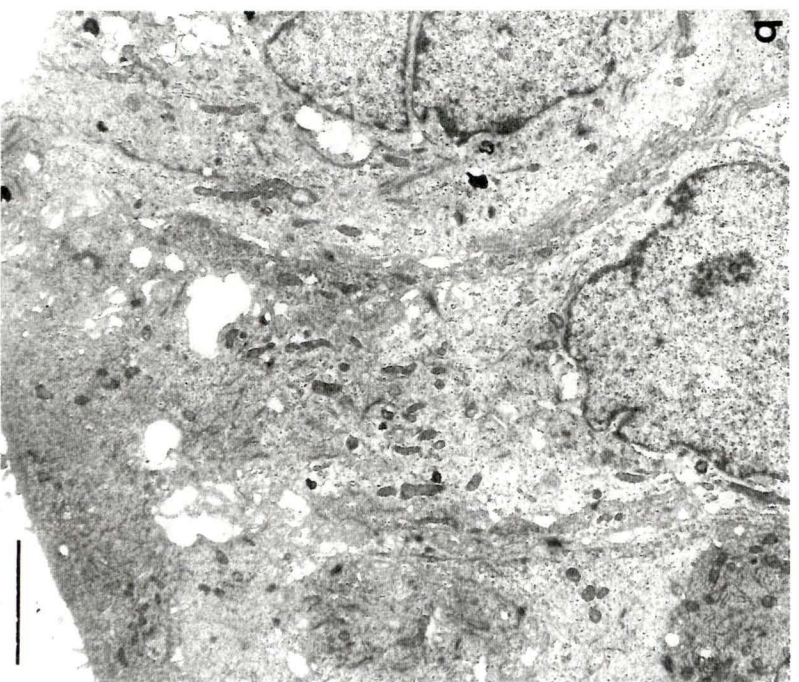
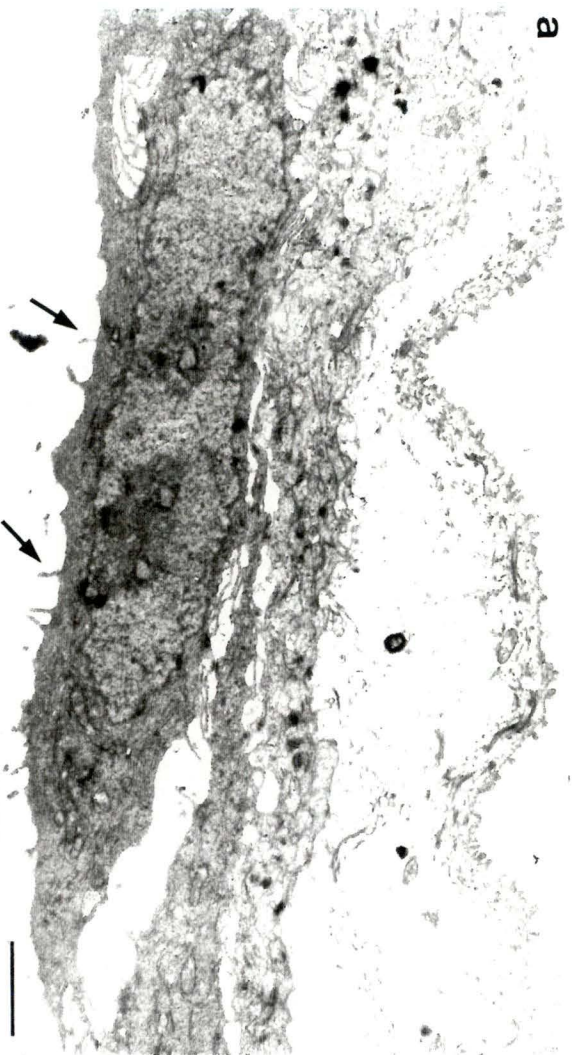
3.1.1. Détachement par la dispase des cultures de kératinocytes épidermiques humains

3.1.1.1. Observations en microscopie optique et électronique

Dès leur confluence, après 10 à 12 jours, les cultures cellulaires sont détachées par la dispase. Les voiles épidermiques ainsi détachés à 4°C et cryofixés (Fig. 24a) ne se modifient pas par rapport aux feuillets épidermiques avant leur détachement. A cette température, les feuillets de kératinocytes de deux à trois couches d'épaisseur ne subissent aucune rétraction. A l'opposé d'un épiderme intact *in vivo*, les cellules basales en culture sont de forme pavimenteuse (Rheinwald et Green, 1975; Green, 1980). Le noyau allongé (Fig. 25a) y occupe une place importante. De plus, les couches suprabasales sont constituées essentiellement de cellules épineuses, les couches granuleuses et cornées étant absentes (Green, 1980). Après un détachement à 37°C, quelques minutes suffisent (Fig. 24b) pour que les cellules basales prennent une forme nettement cuboïdale tout en maintenant un contact étroit avec les cellules voisines et suprabasales. A 37°C, le changement de forme des cellules basales est associé à une contraction rapide du diamètre des cultures (Compton et al., 1989). De plus, cinq minutes suffisent pour voir apparaître au niveau de la face basale des cellules basales, des boursoufflures cellulaires appelées "blebs". Après une à deux heures (Fig. 24c et 24d), les cellules basales de forme cuboïdale, avec un noyau central, sont surmontées de trois à cinq couches de cellules aplaties (Green et al., 1979; Banks-Schlegel et Green, 1981). Progressivement, après quatre à six heures (Fig. 24c-f et 25b-c), cet épaissement et ce changement morphologique vont être suivis d'une véritable réorganisation spatiale aboutissant à la formation de structures globuleuses. De fait, les cellules basales en s'allongeant verticalement vont progressivement quitter la couche basale et réaliser des interactions cellule-cellule complexes provoquant le passage de couches cellulaires superposées vers des amas cellulaires globuleux (Poumay et al., 1993). Après 6 heures, la microscopie électronique nous montre (Fig. 25c) que des cellules aplaties apparaissent sur la surface basale, en dessous des structures globuleuses, pour finalement les entourer. La microscopie électronique nous a permis également de visualiser dès la première heure de détachement une accumulation de microfilaments à la base des cellules basales (Fig. 25).

L'immunofluorescence nous a permis de visualiser également deux marqueurs de la différenciation terminale : l'involucrine et la kératine K10. A l'opposé de ce que l'on observe *in vivo*, l'involucrine est présente de façon continue dans les couches cellulaires suprabasales quel que soit le temps écoulé après détachement, alors que la kératine K10 ne

Fig. 25. Micrographies électroniques des cellules basales des voiles épidermiques immédiatement après le détachement par la dispase (a) ou après 1h (b) et 2h (c) d'incubation à 37°C. Les flèches montrent les blebs et la tête de flèche indique la réapparition en surface de cellules aplaties en dessous des structures globuleuses.
- Barres : 2 μm .



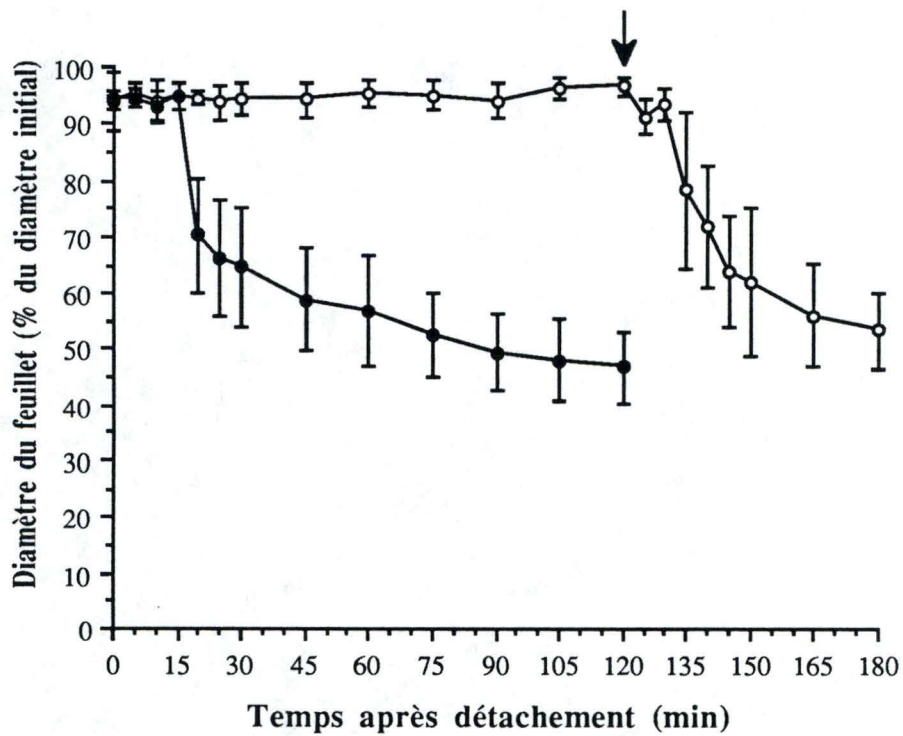


Fig. 26. Evolution du diamètre des voiles épidermiques détachés à 4°C et stockés pendant différents temps à 4°C (o) ou 37°C (•). La flèche indique le moment où la température d'incubation est élevée de 4°C à 37°C. Chaque point représente la moyenne \pm un écart-type du diamètre de 3 voiles épidermiques.

se visualise que dans quelques kératinocytes suprabasaux dispersés, mais de façon fort intense (non illustré).

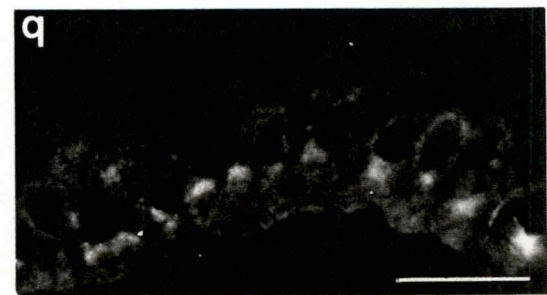
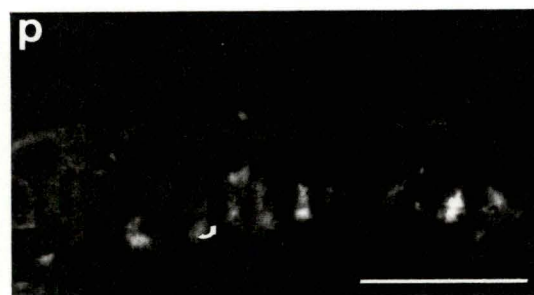
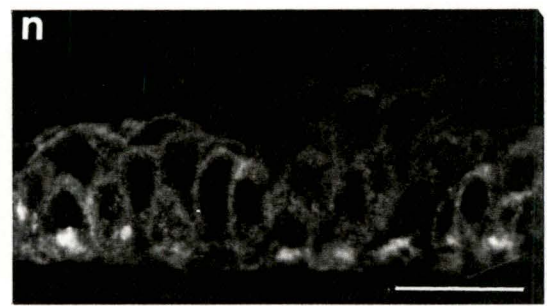
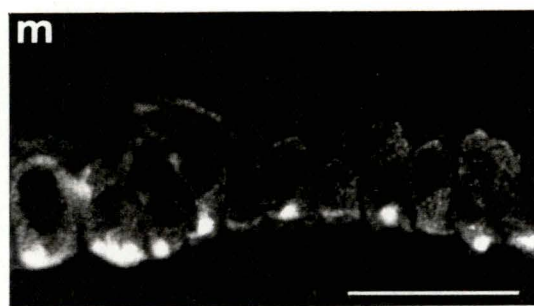
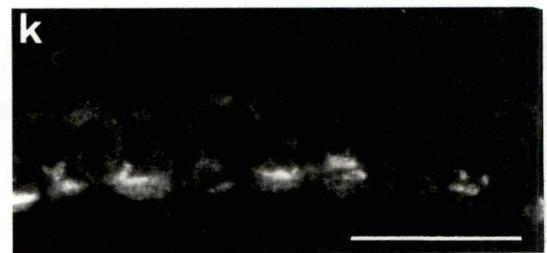
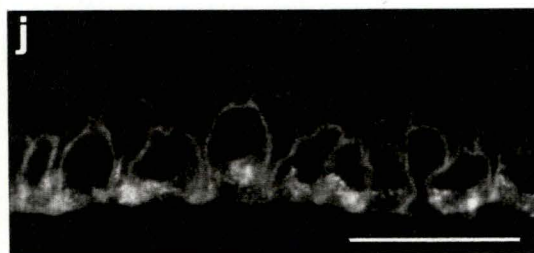
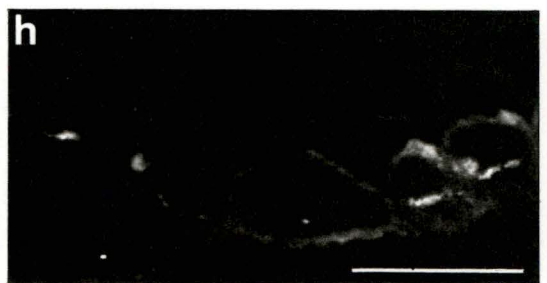
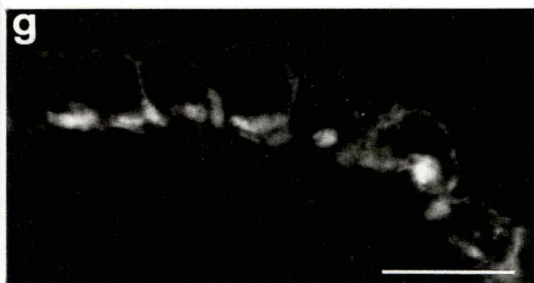
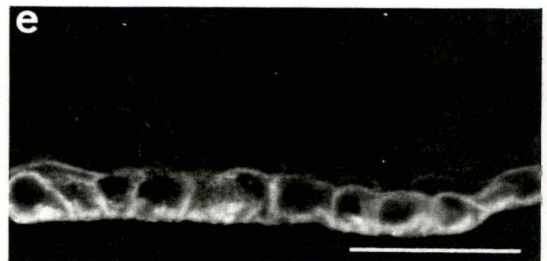
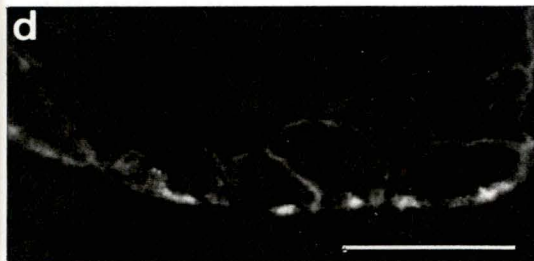
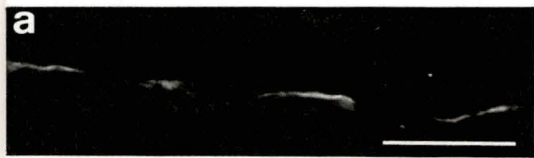
3.1.1.2. Influence de la température sur le diamètre du feuillet de culture détaché

Comme l'ont montré les expériences décrites précédemment, si le détachement du feuillet épidermique se réalise à 37°C, une contraction rapide et immédiate de celui-ci s'observe. Les mesures du diamètre maximal des voiles épidermiques durant leur stockage à 37°C indiquent que cette contraction initiale est suivie d'une contraction plus lente correspondant probablement à la réorganisation spatiale des kératinocytes. Par contre, si ce détachement est réalisé à 4°C, l'aspect pavimenteux des cellules et le diamètre du voile épidermique restent équivalents au diamètre initial tout au long de leur stockage à cette température. Le passage de 4 à 37°C après deux heures de stockage induit la contraction du feuillet de culture (Fig. 26).

3.1.1.3. Localisation des intégrines après détachement par la dispase.

Des marquages par immunofluorescence nous ont permis de localiser, avant et après le détachement par la dispase, les deux grands types d'intégrines associées aux cellules épidermiques : intégrines de la sous-famille des VLA et l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ polarisée au niveau de la face basale des kératinocytes basaux et associée aux structures de type hémidesmosomal (Fig. 27).

Lorsque les cultures sont fixées pendant cinq minutes à la paraformaldéhyde avant d'être détachées et cryofixées (Fig. 27a, b, c) ou si le détachement par la dispase se réalise à 4°C, on observe, grâce aux anticorps GoH3 et 439-9b, une polarisation des sous-unités de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ (Fig. 27a-b) sur la surface basale des cellules épidermiques. Par contre, le marquage avec l'anticorps DH12 confirme la présence préférentielle des intégrines de la sous-famille β_1 au niveau des sites de contact cellule-cellule dans les kératinocytes en culture. Le marquage par immunofluorescence des différentes intégrines dans des cultures détachées à 37°C et cryofixées après différents temps nous montre toujours la présence de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ tout autour des cellules basales, mais surtout nous permet de visualiser, dès les premières minutes après le détachement (Fig. 27d, e), la formation d'une tache intense de fluorescence qui progressivement, au cours des deux premières heures, s'éloigne de la membrane plasmique basale pour finalement se rapprocher du noyau (Fig. 27g, h, i, k). Ceci suggère un phénomène d'internalisation des domaines de cette membrane basale contenant l' $\alpha_6\beta_4$. Pendant ce même laps de temps, la sous-unité β_1 est toujours et uniquement localisée autour des cellules basales mais surtout concentrée sur les membranes apicales et latérales (Fig. 27f, i, l). Cette localisation est parfaitement confirmée par les anticorps anti sous-unité α_2 et α_5 (non illustrés). Quatre à six heures après le



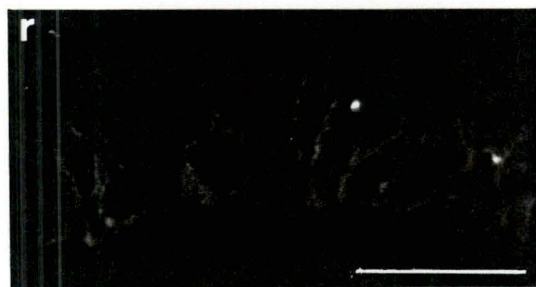
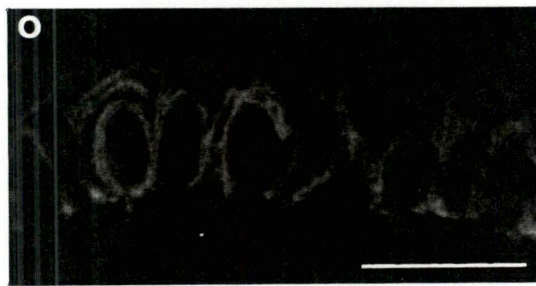
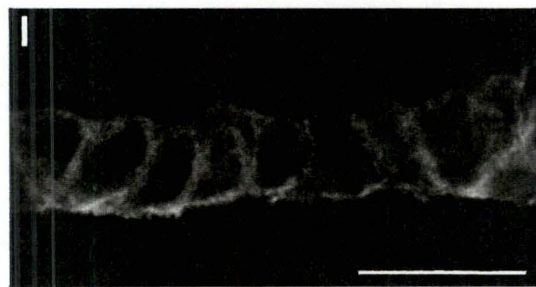
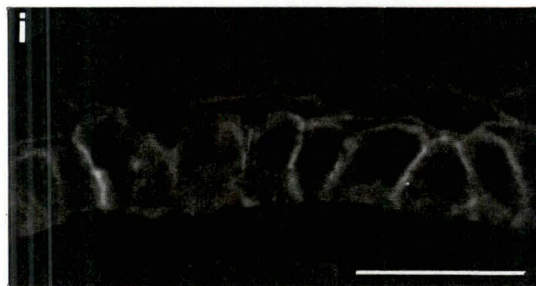


Fig. 27. Micrographies de coupes, réalisées au cryostat, de feuillets de culture de kératinocytes fixés avant (a, b, c) ou après (d-r) le détachement par la dispase et stockés à 37°C pendant 0h (d-f), 1h (g-i), 2h (j-l), 4h (m-o) et 6h (q-r). Les sous-unités d'intégrine α_6 (a, d, g, j, m, p), β_4 (b, e, h, k, n, q) et β_1 (c, f, i, l, o, r) sont marquées par immunofluorescence.

-Barres : 10 μ m.

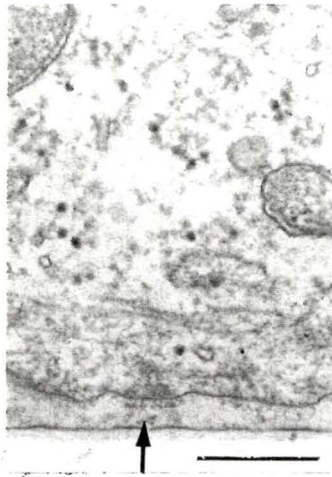


Fig. 28. Hémidesmosome immature à la base des cellules basales d'une culture non détachée de son substrat (flèche).- Barres : 0,2 μm .

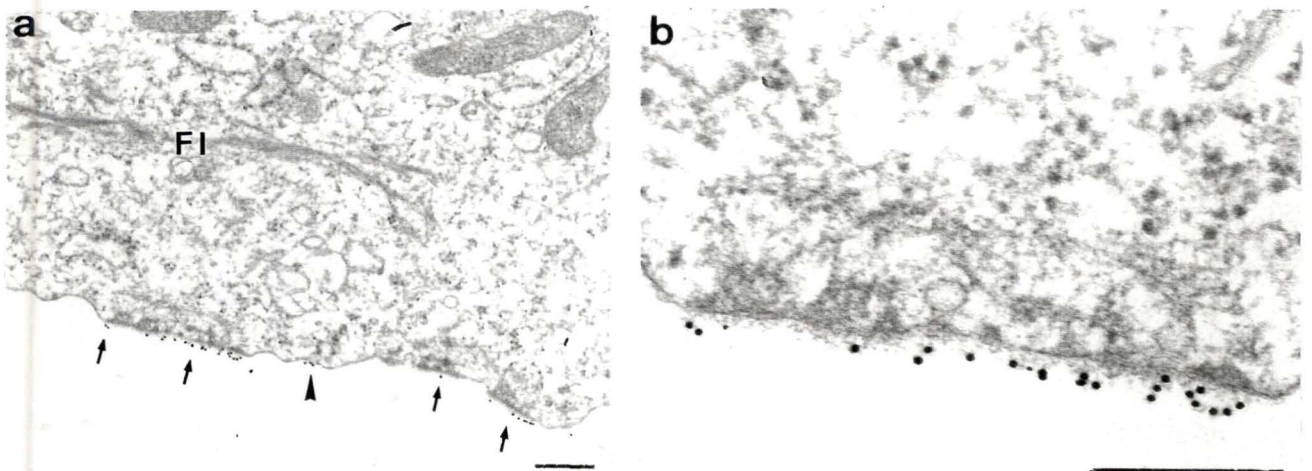


Fig. 29. Marquage par Immunogold de la sous-unité α_6 dans une culture de kératinocytes fixée immédiatement après détachement à 4°C. Les particules d'or sont localisées uniquement au niveau de la surface basale des cellules.

a. Micrographie électronique à petit grossissement de la surface basale. Certaines particules d'or sont regroupées et associées à des structures de type hémidesmosomal (flèches). D'autres particules, moins nombreuses ne sont pas associées à ces structures (tête de flèche).

b. Détail des hémidesmosomes immatures sur lesquels sont observées les particules d'or colloïdal.

Des filaments intermédiaires (FI) sont observés près de la membrane basale.

- Barres : 0,25 μm .

détachement, alors que l'organisation spatiale des cellules est perturbée, les taches de fluorescence associées aux sous-unités $\alpha_6\beta_4$, proches du noyau, vont voir progressivement leur taille diminuer. Tout le cytoplasme va alors se remplir de pointillés fluorescents (Fig. 27m, n, p, q). Ceci pourrait suggérer une redistribution complète de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$. Simultanément, les intégrines de la sous-famille β_1 restent en périphérie (Fig. 27o, r).

3.1.1.4. Internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ et de la structure de type hémidesmosomale à laquelle elle appartient.

3.1.1.4.1. L'hémidesmosome immature des kératinocytes en culture

Grâce à la microscopie électronique, lorsque nous n'avons pas détaché le feuillet épidermique du plastique de la boîte de culture, nous avons observé entre les membranes basales et le substrat des structures de type hémidesmosomal caractéristiques des kératinocytes en culture (Fig. 28). Vu l'absence de tissu conjonctif sous-jacent, ce système d'ancrage est constitué uniquement des plaques d'attache cytoplasmiques et parfois de plaques denses sub-basiliaires et des filaments d'ancrage, d'où son appellation d'hémidesmosome immature.

3.1.1.4.2. Internalisation et recyclage de la sous-unité α_6

Grâce au fait que, dans les cellules détachées à 4°C, l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ reste présente en surface de la membrane basale, la sous-unité α_6 peut être marquée extracellulairement par Immunogold, via l'anticorps GoH3 qui reconnaît un épitope extracellulaire de cette protéine (Sonnenberg et al., 1991). La spécificité du marquage de la sous-unité α_6 est supportée notamment par le fait que, malgré l'immersion totale du voile épidermique dans le milieu contenant l'anticorps, le marquage ne se réalise qu'au niveau des cellules basales. De plus, lorsque pour le témoin, l'anticorps GoH3 n'est pas présent, aucun marquage n'est observé au niveau des kératinocytes.

Si l'on fixe les cultures immédiatement après les avoir détachées et marquées par l'anticorps GoH₃ à 4°C (Fig. 29), les particules d'or colloïdal se retrouvent exclusivement sur la surface basale des cellules. Ces billes d'or sont soit dispersées, soit regroupées au niveau de domaines membranaires caractérisés par une structure dense cytoplasmique correspondant aux hémidesmosomes immatures. A ce moment, des filaments intermédiaires sont encore fréquemment observés à proximité de la face détachée des cellules.

Une incubation de 5 min à 37°C, avant que les voiles épidermiques marqués ne soient fixés, suffit pour que la plupart des hémidesmosomes immatures associés à des particules d'or colloïdal se retrouvent localisés dans des invaginations (Fig. 30). Ces hémidesmosomes internalisés sont localisés entre les filaments intermédiaires et une région pauvre en organites contenant des microfilaments.

Si on attend 15 min à 37°C avant de fixer les feuillets épidermiques marqués, les particules d'or se retrouvent plus en profondeur dans des vésicules de petite ou de grande taille,

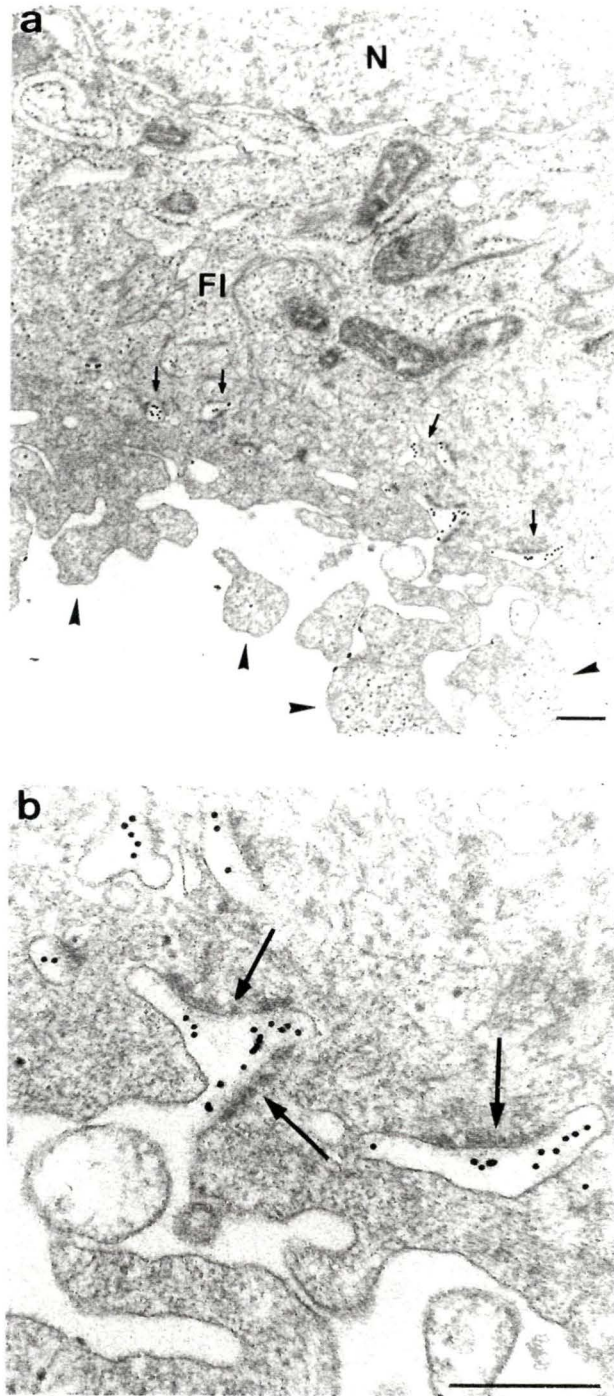


Fig. 30. Marquage par Immunogold de la sous-unité α_6 dans une culture de kératinocytes détachée à 4°C et incubée pendant 5 min à 37°C avant d'être fixée. Les micrographies à faible (a) et à fort (b) grossissement permettent de visualiser les domaines membranaires qui s'invaginent avec les structures hémidesmosomales marquées par l'or colloïdal (flèches). On observe des filaments intermédiaires (FI) et une région pauvre en organites où se trouvent des microfilaments (MF) à la base des cellules. Des blebs (têtes de flèches) apparaissent simultanément.
 - Barres : 0,25 μ m.

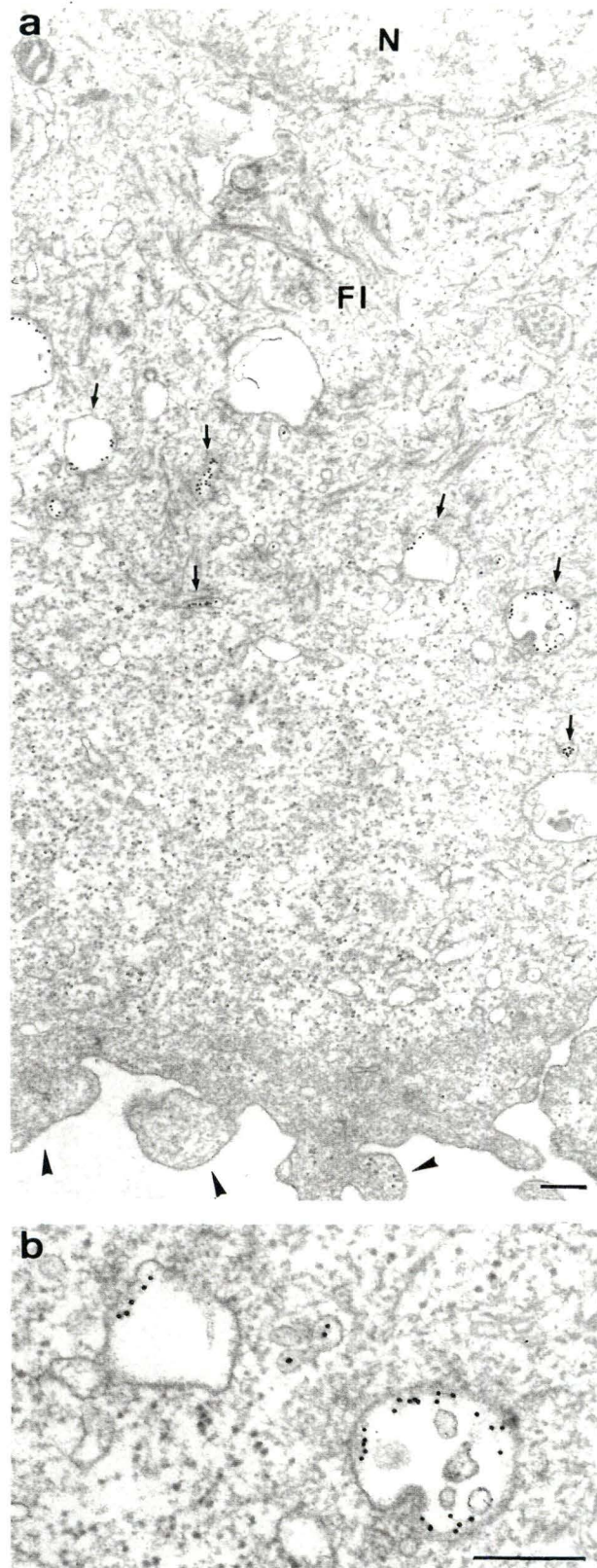


Fig. 31. Marquage par Immunogold de la sous-unité α_6 dans une culture de kératinocytes détachée à 4°C et incubée pendant 15 min à 37°C avant d'être fixée.

a. La micrographie à faible grossissement permet de visualiser les particules d'or disposées sous le noyau (N)(flèches). Les vésicules de grande ou de petite taille, dans lesquelles elles se trouvent, se localisent entre les filaments intermédiaires (FI) et la région pauvre en organites où se trouvent les microfilaments (MF). Des blebs sont observés à proximité (têtes de flèche).

b. Détail de vésicules contenant les particules d'or.- Barre : 0,25 μm .

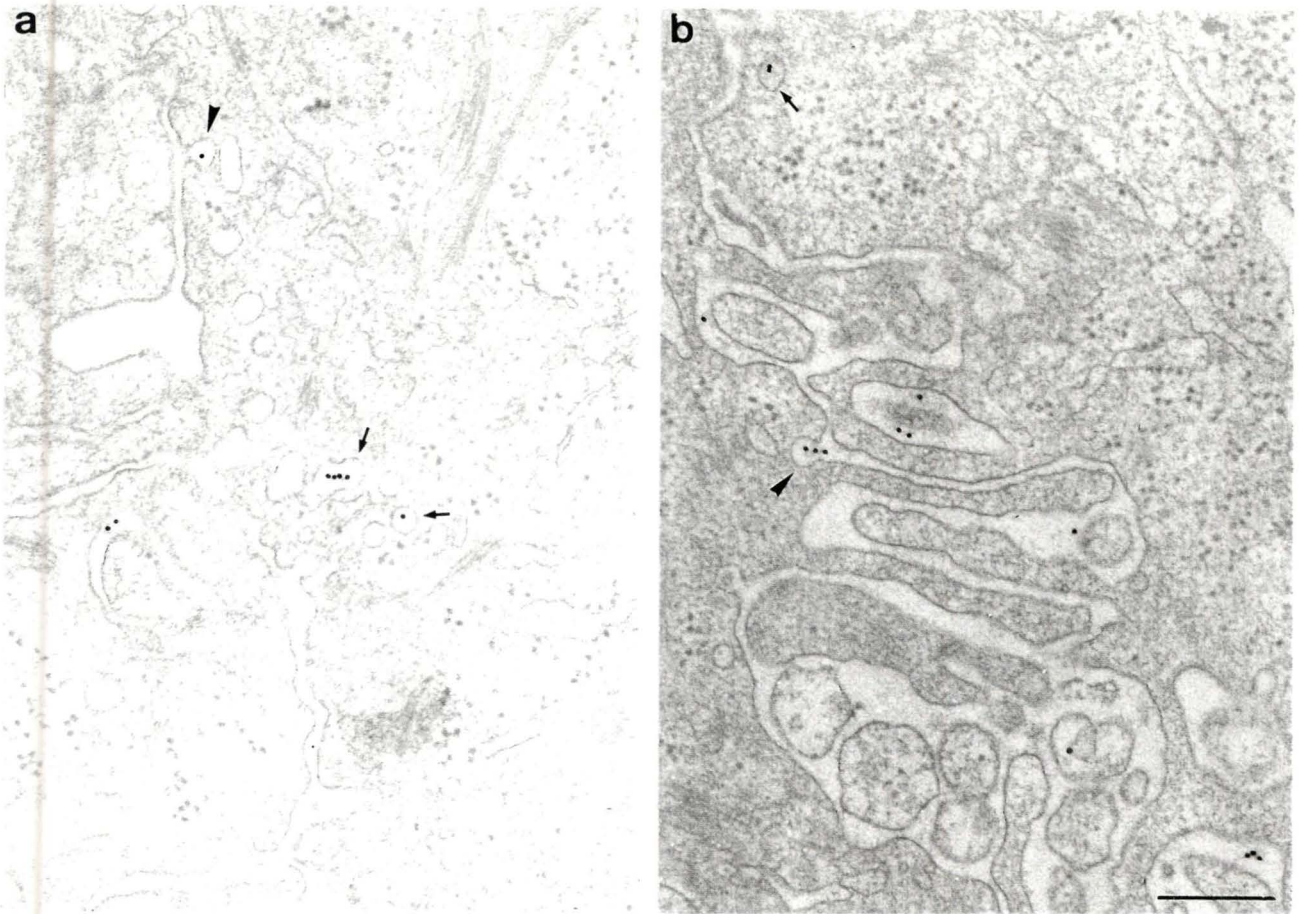


Fig. 32. Marquage par Immunogold de la sous-unité α_6 dans une culture de kératinocytes détachée à 4°C et incubée pendant 60 min à 37°C avant d'être fixée. Les particules d'or s'observent au niveau des espaces intercellulaires, dans des vésicules qui semblent fusionner avec les membranes latérales (têtes de flèche) ou dans des vésicules proches de ces membranes (flèches).- Barre : 0,25 μm .

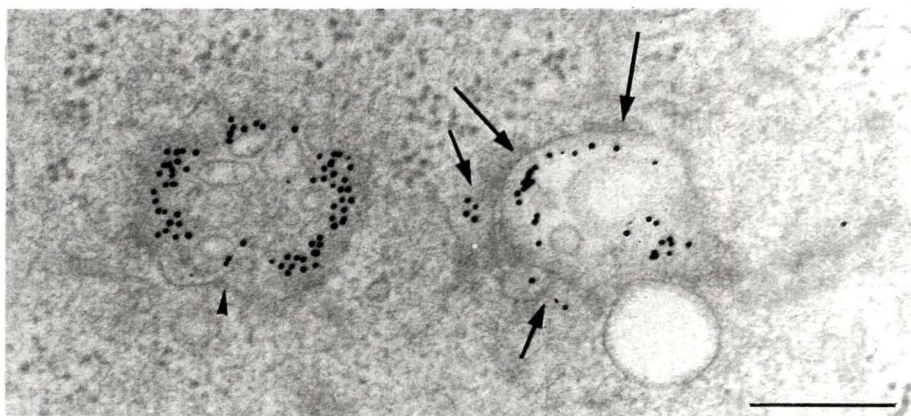


Fig. 33. Marquage par Immunogold de la sous-unité α_6 au niveau des cellules basales d'une culture de kératinocytes détachée à 4°C et incubée pendant 60 min à 37°C avant la fixation. Les grandes flèches sont orientées vers des structures de type hémidesmosomal. Les petites flèches sont centrées sur les petites vésicules semblant s'isoler de la grande vésicule. La tête de flèche montre un corps multivesiculaire.- Barre : 0,25 μm .

disposées de façon presque linéaire sous le noyau (Fig. 31). Cette localisation correspond à celle de la tache de fluorescence intense obtenue sur les coupes marquées pour l' $\alpha_6\beta_4$ en immunofluorescence. A ce stade de l'internalisation, les particules d'or colloïdal, malgré leur liaison aux membranes délimitant les vésicules, ne semblent plus être associées à des structures de type hémidesmosomal. Après 15 min d'incubation à 37°C, les filaments intermédiaires se localisent toujours au-dessus des zones occupées par les vésicules contenant les particules d'or, alors que les microfilaments se trouvent à proximité de la membrane basale et de ses nombreux blebs.

Après 60 min d'incubation à 37°C, alors que les différents éléments du cytosquelette localisés précédemment n'ont modifié en rien leur position, les particules d'or, par contre, ne vont plus uniquement se situer dans des vésicules proches du noyau comme après 15 min. Plusieurs sont observées dans de petites vésicules à proximité étroite des membranes plasmiques latérales et d'autres sont observées dans les espaces intercellulaires (Fig. 32). Cette relocalisation intercellulaire des particules d'or suggère qu'une partie de la sous-unité α_6 semble subir un processus de recyclage vers les membranes plasmiques latérales.

Le recyclage des sous-unités α_6 vers les espaces intercellulaires ne semble cependant pas être leur seul devenir (Fig. 33). De fait, après 1h d'incubation à 37°C, de petites vésicules contenant des particules d'or colloïdales semblent se former (flèches) pour peut-être se regrouper en des corps multivésiculaires (tête de flèche) ou migrer vers les membranes latérales.

Afin d'établir le parcours suivi par la sous-unité α_6 après le détachement du voile épidermique, nous avons mis au point une procédure de localisation et de comptage à l'aveugle des particules d'or sur des micrographies électroniques de faible grossissement, prises après les différents temps d'incubation à 37°C. Quatre localisations furent définies (la surface de la membrane plasmique basale, les vésicules situées dans le cytoplasme ventral à moins de 1,5 μm de cette membrane, les vésicules situées plus en profondeur dans le cytoplasme, les espaces intercellulaires) et le pourcentage de particules d'or trouvées dans chacune de celles-ci fut déterminé grâce à 80 surfaces photographiées. Ces comptages (tableau III)(fig.33) nous ont d'abord confirmé que l'incubation à 4°C inhibe toute internalisation de domaines contenant la sous-unité d'intégrine α_6 . Par contre, le passage à 37°C induit de façon immédiate la formation et la migration de vésicules contenant les particules d'or colloïdal. Après une heure à cette température, un tiers des particules d'or se trouve localisé entre les cellules, suggérant un processus de recyclage de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$. La présence de ces particules ne peut être le résultat d'une migration latérale des unités α_6 marquées à la base des cellules car, après 15 min, à peine 12 % des particules sont retrouvées en dehors du cytoplasme.

Tableau III

Pourcentage des particules d'or trouvées dans des régions particulières de la cellule après différents temps d'incubation à 37°C de cultures de kératinocytes préalablement détachées par de la dispase à 4°C et dont la sous-unité α_6 est marquée par Immunogold.

Localisation Cellulaire	Temps d'incubation (min)			
	0	5	15	60
Membrane basale	96.7 %	39.7 %	5.7 %	6.1 %
Intracellulaire (à moins de 1.5 μm de la membrane basale)	1.1%	58.7 %	27.8 %	3.6 %
Intracellulaire (autres)	0 %	1.4 %	60.2 %	57.2 %
Membranes latérales	2.1 %	0.2 %	6.4 %	33.1 %
<i>Comptage des particules</i>	<i>615</i>	<i>441</i>	<i>753</i>	<i>362</i>

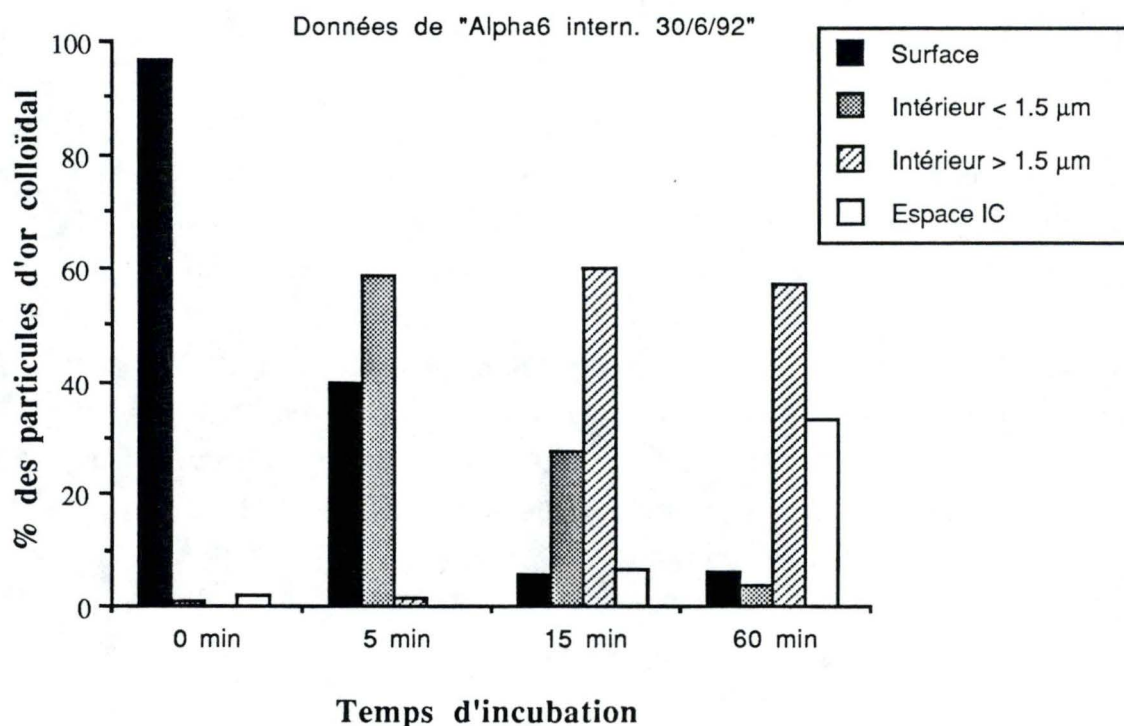


Fig. 34. Evolution de la répartition des particules d'or (associées aux sous-unités α_6) dans différentes régions de la cellule après différents temps d'incubation à 37°C.

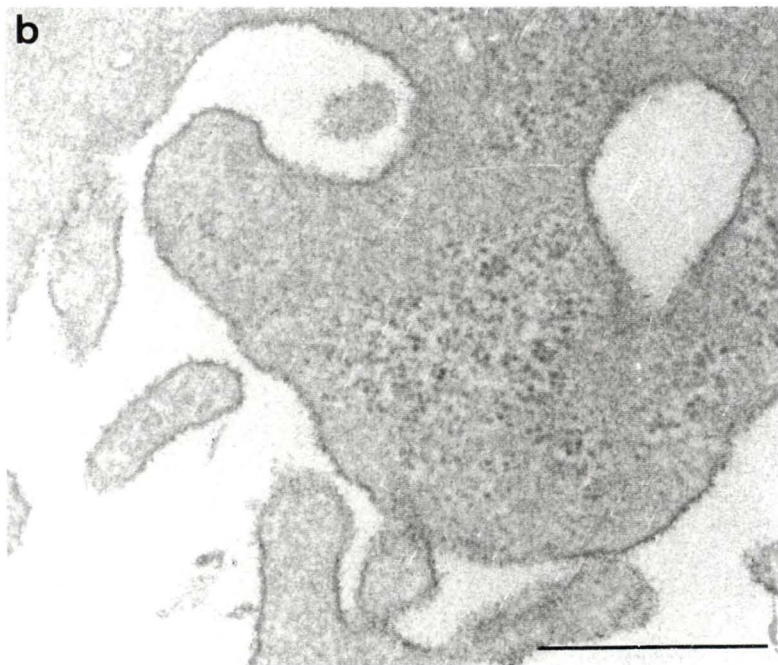
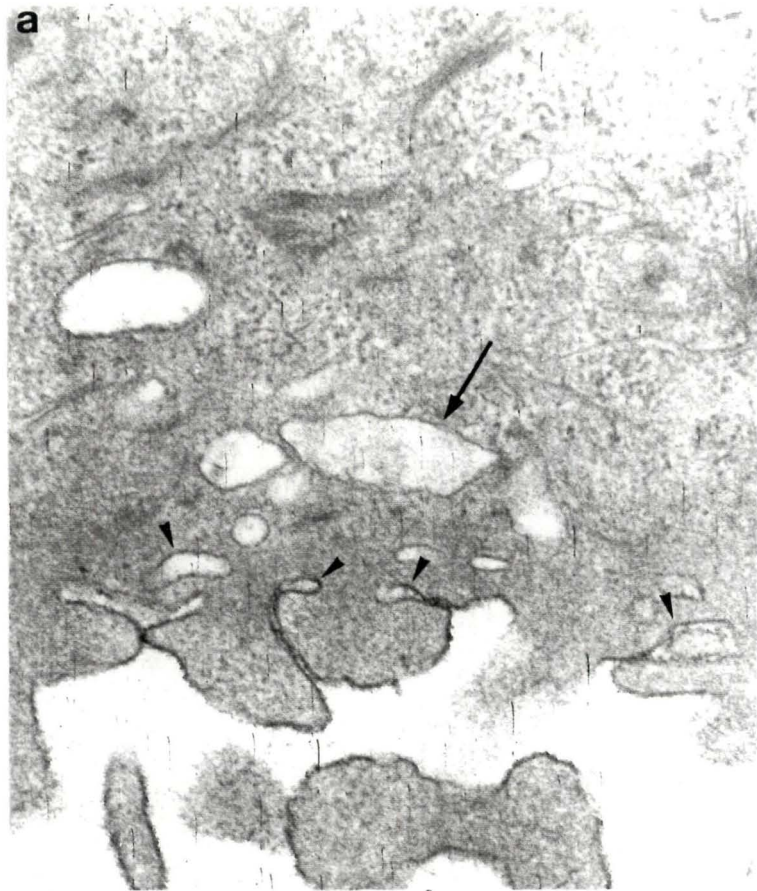


Fig. 35. Marquage des surfaces cellulaires au rouge de ruthénium.

a. Les vésicules éloignées de la surface basale, non marquées au rouge de ruthénium, n'ont plus aucun contact avec le milieu extérieur (flèches). Les invaginations en relation avec le milieu extracellulaire sont marquées (têtes de flèche).

b. Replis membranaires en contact avec le milieu extérieur et marqués par le rouge de ruthénium.- Barres : 0,5 μm .

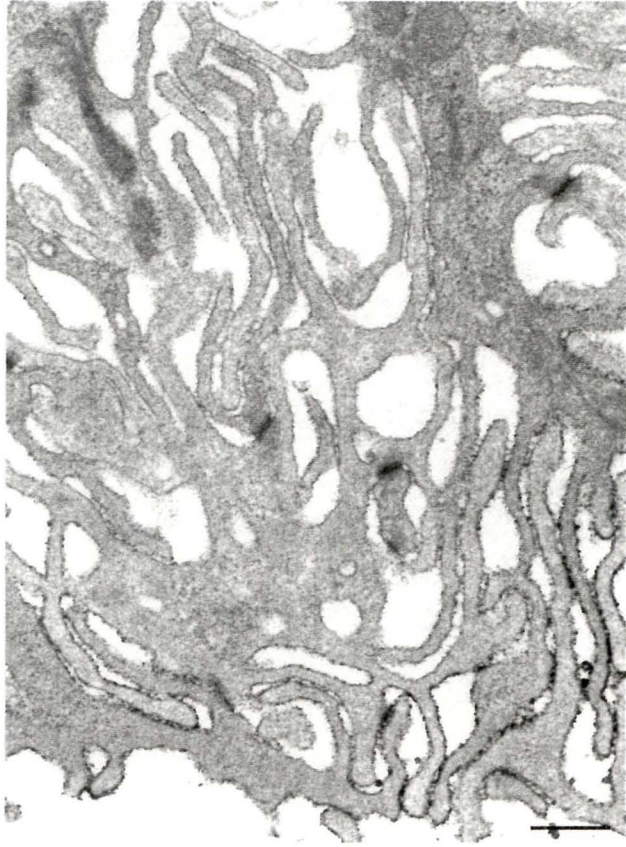


Fig. 36. Marquage des espaces intercellulaires au rouge de ruthénium - Barre : 0,3 μm

3.1.1.4.3. Marquage de l'espace extracellulaire par le rouge de ruthénium

Au vu des observations décrites ci-dessus, on peut se poser la question suivante : les vésicules associées aux particules d'or colloïdal, que nous voyons s'éloigner progressivement à 37°C de la membrane plasmique basale détachée, sont-elles de véritables vésicules d'internalisation ou correspondent-elles à des replis membranaires en contact avec le milieu extérieur ? Afin de répondre à cette question nous avons utilisé le rouge de ruthénium constitué de molécules cationiques pouvant se fixer sur les différents constituants anioniques du glycocalyx (Hayat, 1989). Le rouge de ruthénium, présent lors de la post-fixation, pénètre uniquement dans les invaginations qui sont encore en relation avec l'espace extracellulaire. Il permet de la sorte de distinguer les vésicules internalisées des vésicules qui nous paraissent libres mais qui sont encore attachées à la membrane plasmique (Fig. 35a, b). Au niveau des feuilletts épidermiques ayant subi différents temps d'incubation à 37°C, la coloration dense aux électrons se limite à la surface basale et aux vésicules ou replis proches de celle-ci. Nous pouvons déduire, pour les feuilletts épidermiques détachés incubés 15 à 60 min à 37°C, que les vésicules éloignées de la membrane basale ont perdu tout contact avec le milieu extérieur. Lors de notre marquage à l'or colloïdal, les vésicules observées à plus de 1,5 µm de la membrane basale après 15 à 60 min d'incubation à 37°C sont donc isolées de l'espace extracellulaire et ne peuvent dès lors correspondre à des replis de la membrane plasmique basale.

3.1.1.4.4. Marquage de la sous-unité α_6 dans les espaces intercellulaires

Lors des comptages (Tableau III), nous avons relevé 2,1% de particules d'or présentes entre les cellules alors qu'aucune incubation à 37°C n'avait eu lieu. Ces particules étaient alors localisées à proximité des faces basales détachées des kératinocytes. Le marquage par le rouge de ruthénium (Fig. 36) nous a appris que ces particules correspondent probablement au marquage de l' α_6 présente sur les faces latérales et qui est atteinte par les anticorps placés dans le milieu extracellulaire.

3.1.1.5. Localisation d'autres constituants des hémidesmosomes (HD1 et APB) dans les feuilletts épidermiques détachés par la dispase

Par le marquage Immunogold réalisé précédemment, nous avons pu vérifier la présence préférencielle de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ au niveau des hémidesmosomes. Pour étudier l'évolution de l'hémidesmosome lors de son internalisation, nous avons localisé par immunofluorescence d'autres constituants des hémidesmosomes : l'antigène de la pemphigoïde bulleuse (APB) et la molécule HD1 (Fig. 37). Immédiatement après le détachement par la dispase (Fig. 37a, b, c), l'APB (Fig. 37c) comme l'HD1 (Fig. 37b) se localisent de la même façon que l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ sur la face basale des cellules. Un spot de fluorescence commence à se former dans le bas du cytoplasme, suggérant une internalisation commune des différents constituants

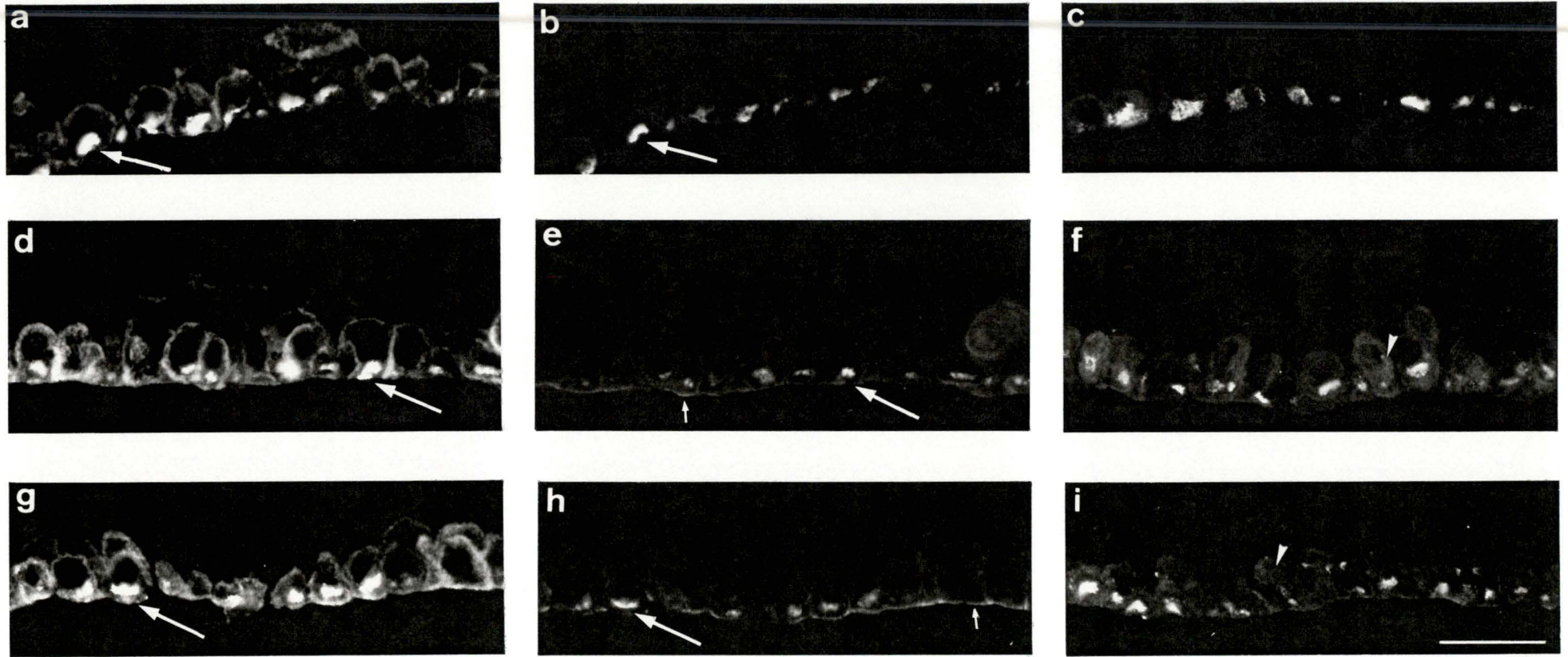


Fig. 37. Coupes, réalisées au cryostat, de feuillets épidermiques fixés soit directement après leur détachement par la dispase (a, b, c), soit après 1h (d, e, f) et 2h (g, h, i) d'incubation dans un milieu à 37°C. Un double marquage de la sous-unité d'intégrine α_6 (a, d, g) et de la molécule HD1 (b, e, h) a été effectué sur certaines coupes alors que le marquage de l'APB a été réalisé sur des coupes équivalentes (c, f, i). Les grandes flèches permettent de comparer les mêmes cellules lors du double marquage. Les petites flèches indiquent la fluorescence apparaissant au niveau basal des cellules lors du marquage de l'HD1. Les têtes de flèche sont orientées sur des cellules où une fluorescence homogène (APB) est particulièrement bien visualisée.- Barre : 10 μm .

hémidesmosomaux. Ceci suggère une conservation de l'intégrité de l'hémidesmosome immature, comme nous l'a d'ailleurs indiqué précédemment la microscopie électronique après les premiers temps d'incubation. A l'opposé de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, une protéine transmembranaire localisée sur tout le contour cellulaire des cellules basales mais concentrée dans les hémidesmosomes, les deux autres molécules (HD1 et APB) ne sont probablement exprimées qu'au niveau des structures hémidesmosomales et de ce fait sont concentrées exclusivement au niveau basal des cellules. Après 1h et 2h d'incubation à 37°C, APB et HD1 se différencient quelque peu de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$. HD1 suit l' $\alpha_6\beta_4$ mais se localise aussi sur la surface basale des cellules où, après 2h, on découvre une fine ligne de fluorescence (Fig. 37h). Pour l'APB, l'internalisation du spot de fluorescence suit l'internalisation de l' $\alpha_6\beta_4$ mais est accompagnée, dès la première heure d'incubation, d'une distribution homogène de fluorescence dans tout le cytoplasme des cellules basales.

3.1.2. Contraction, internalisation et cytosquelette

Nos observations précédentes nous ont permis d'associer au processus de détachement par la dispase à 37°C des phénomènes de contraction immédiate du feuillet épidermique et d'internalisation des constituants hémidesmosomaux tels que l'intégrine $\alpha_6\beta_4$. Nous avons voulu alors analyser les différentes implications que le cytosquelette peut avoir dans de tels processus. Dans ce but nous avons utilisé des inhibiteurs du cytosquelette et étudié les différents effets produits par ces inhibiteurs. Pour les microtubules, nous avons utilisé le nocodazole, une molécule se liant à la tubuline et affectant de la sorte la polymérisation des microtubules. Pour les microfilaments, nous avons utilisé la cytochalasine D, une molécule appartenant à une famille de métabolites excrétés par diverses espèces de moisissures. La cytochalasine D agit en se fixant spécifiquement à une extrémité des filaments d'actine, empêchant ainsi l'addition de nouvelles sous-unités à cette extrémité. A l'opposé du nocodazole, la cytochalasine D provoque une inactivation et non une décomposition des structures. Nous avons étudié également l'effet simultané de ces deux inhibiteurs.

3.1.2.1. Visualisation de l'efficacité des inhibiteurs du cytosquelette par immunofluorescence.

Un marquage par immunofluorescence a été réalisé afin d'observer les microfilaments et les microtubules dans des cultures de kératinocytes et vérifier l'efficacité des inhibiteurs. Cette expérience a été effectuée sur des kératinocytes repiqués soit dans un milieu de culture contrôle (Fig. 38), soit dans un milieu de culture sans sérum (Fig. 39). Ce milieu avec une faible concentration en Ca^{++} (0,1 mM) est intéressant car, en empêchant la formation des desmosomes et la stratification, il permet une meilleure observation du cytosquelette au niveau de cellules isolées et bien étalées. Avant d'analyser l'efficacité du nocodazole ou de la

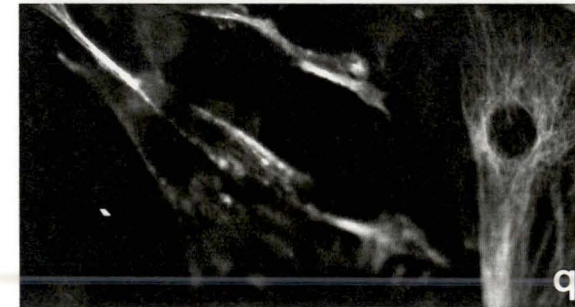
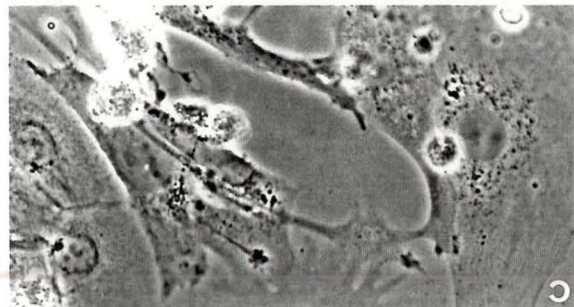
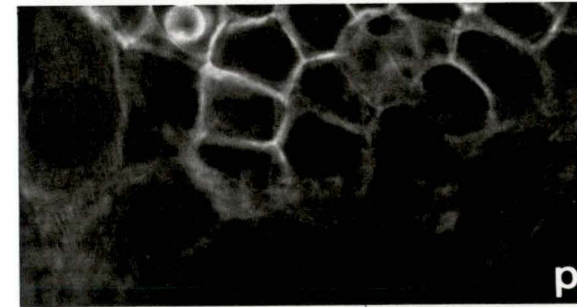
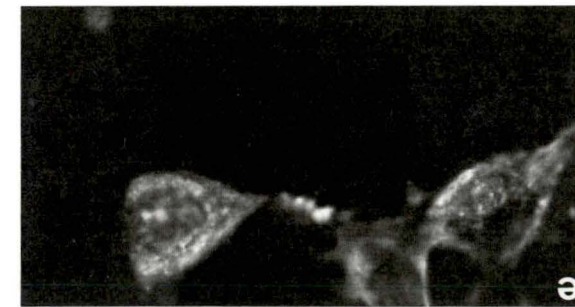
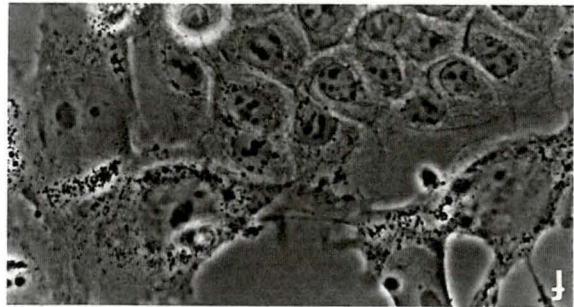
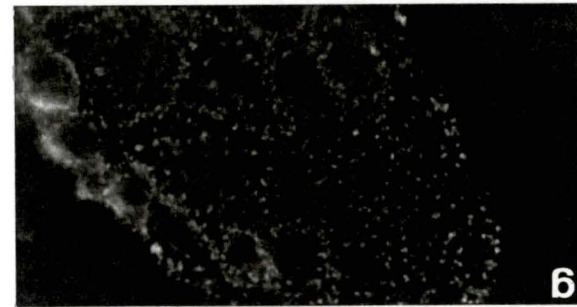
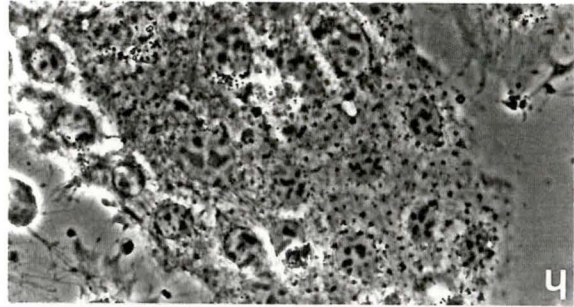
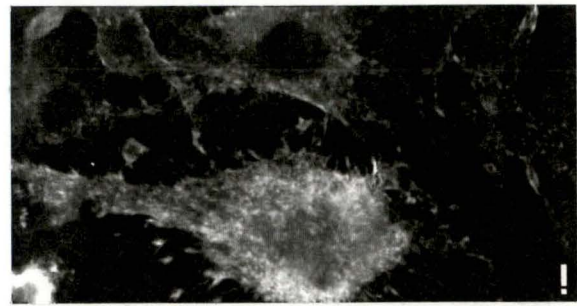
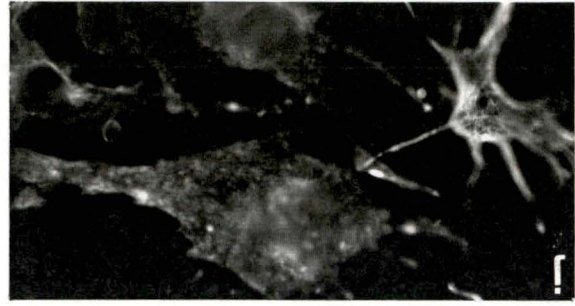
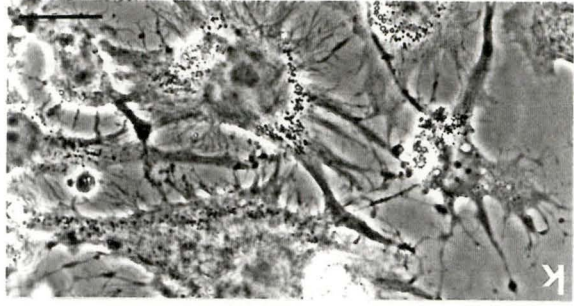


Fig. 38. Cultures de 5 jours de kératinocytes réalisées sur des lames couvre-objets avec un lit de 3T3. Un double marquage des microtubules (a, d, i) et des microfilaments (b, c, g, j) a été réalisé. Des contrastes de phase ont été réalisés (c, f, h, k). Une culture nous a servi de témoin (a, b, c), une autre a été traitée au nocodazole (d, e, f), la dernière a été traitée à la cytochalasine D (g, h, i, j, k). Les micrographies g et h correspondent à des kératinocytes, alors que les photographies i,j,k correspondent à des fibroblastes.- Barre : 15 μm .

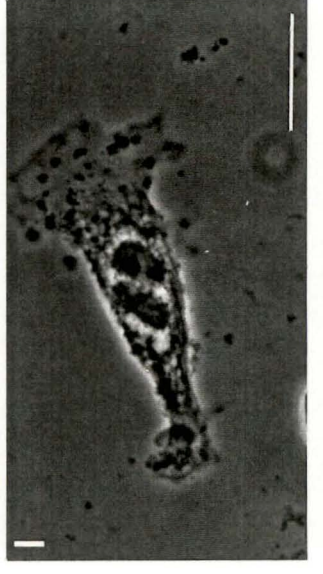
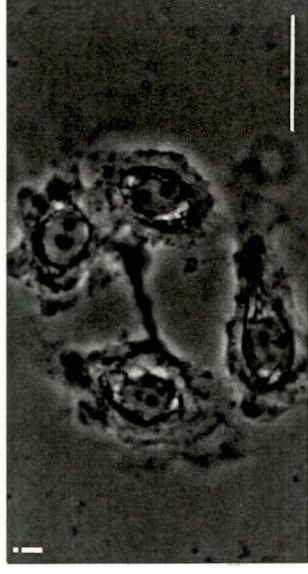
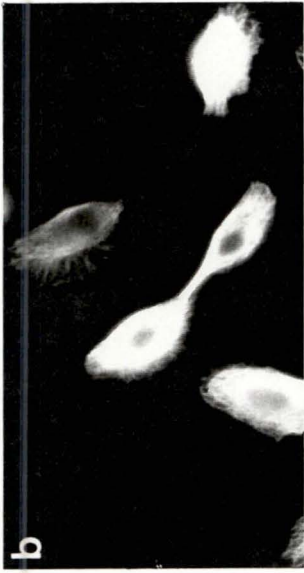
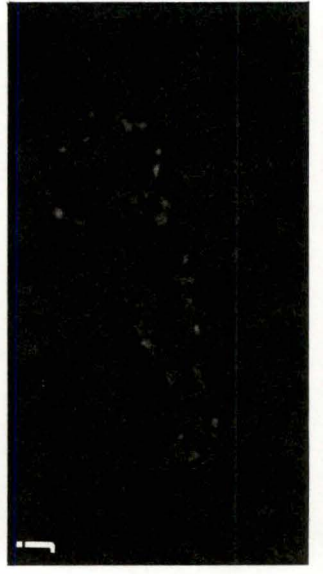
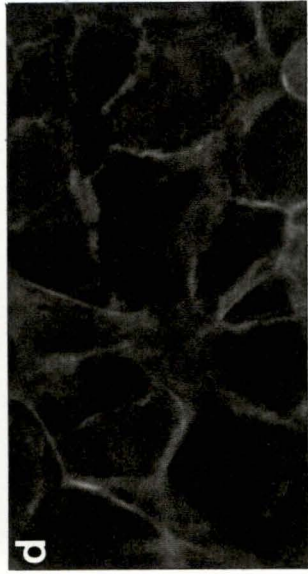
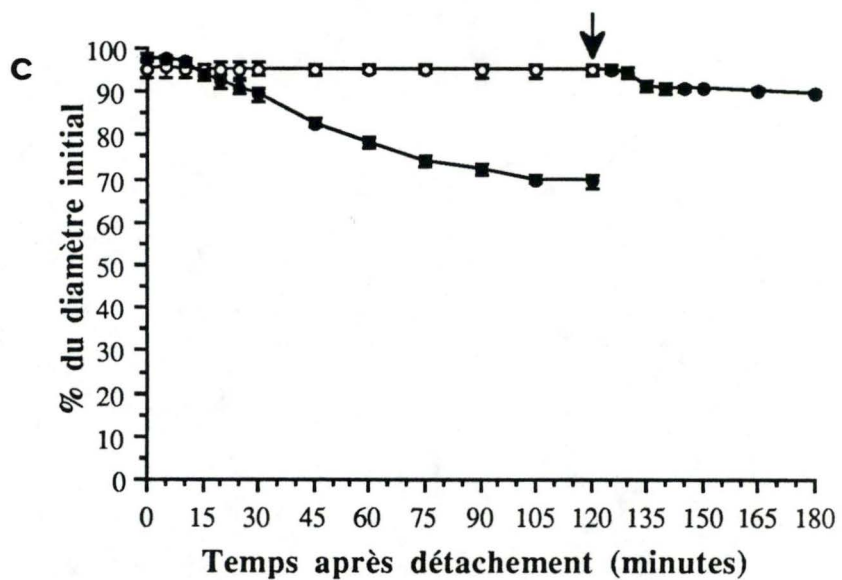
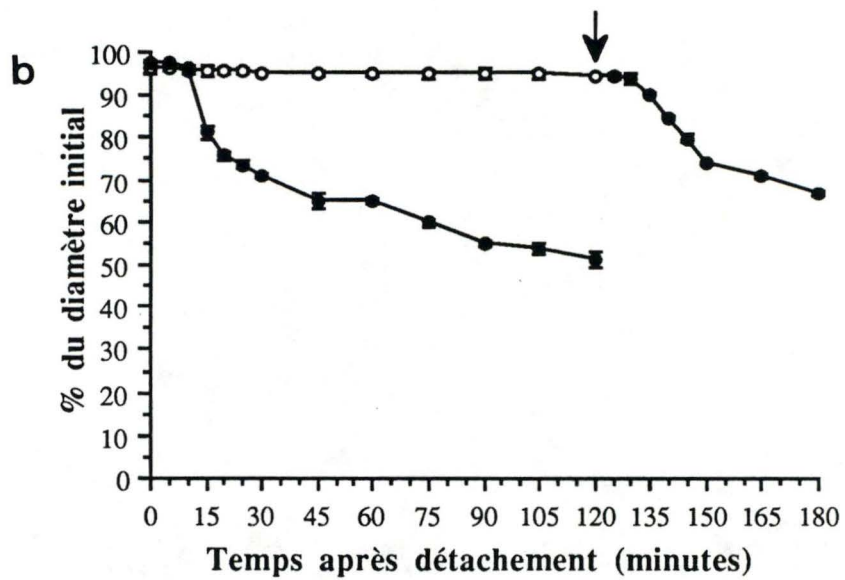
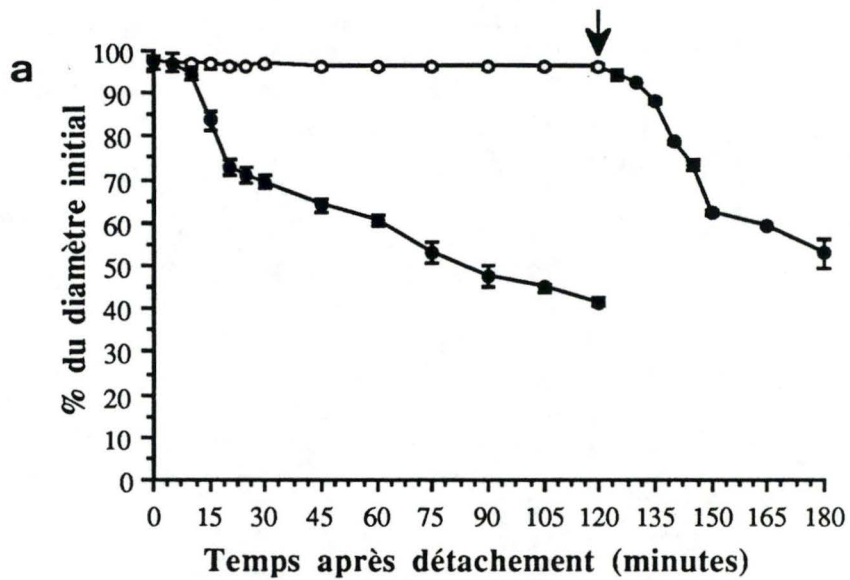


Fig. 39. Culture de kératinocytes de 5 jours effectuées sur lames couvre-objets dans un milieu MCDB 153. Un double marquage des microtubules (a, d, g,j) et des microfilaments (b, e, h, k) a été réalisé. Les micrographies c, f, i, l correspondent aux contrastes de phase. Alors qu'une culture nous sert de témoin (a, b, c) d'autres sont traitées soit au nocodazole (d, e, f), soit à la cytochalasine D (g, h, i), soit avec les deux inhibiteurs (j, k, l). -Barres : 15 μ m.



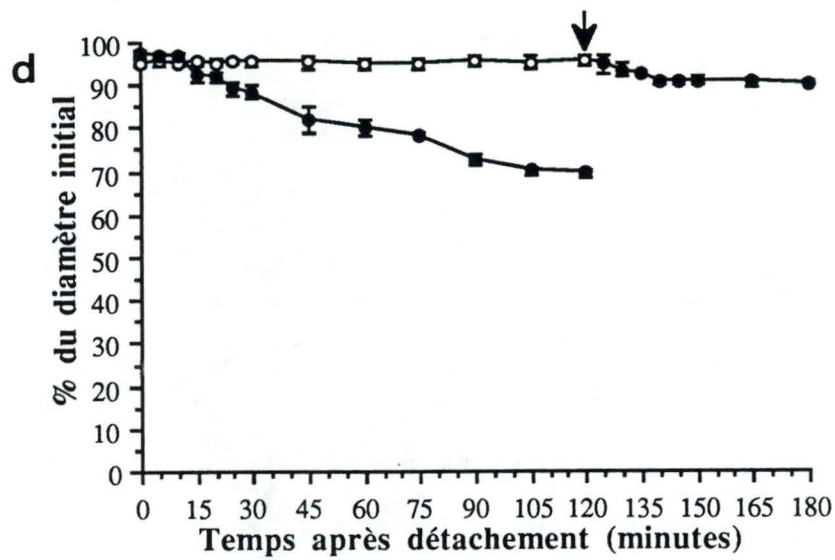
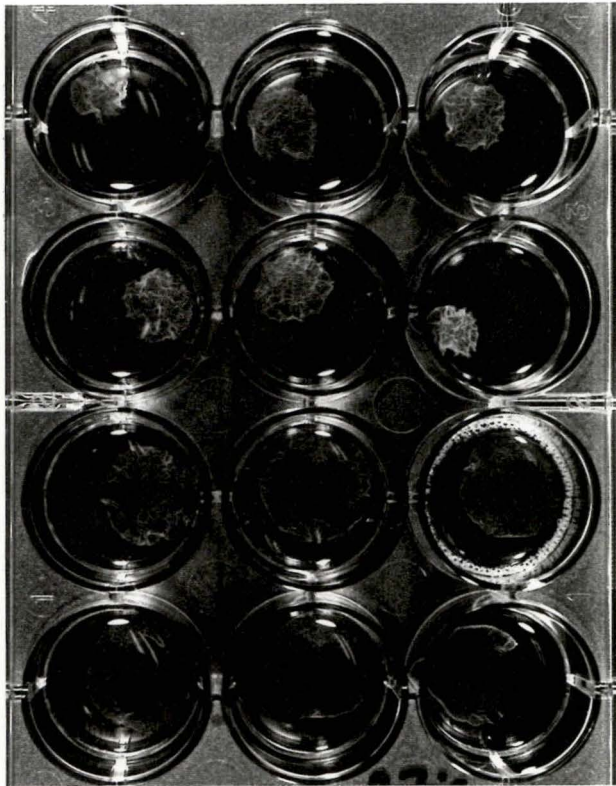


Fig. 40. Evolution du diamètre du voile épidermique après le détachement par la dispase et différents temps d'incubation à 4°C (o) ou à 37°C (●).

- Incubation dans un milieu normal.
- Incubation dans un milieu contenant du nocodazole, inhibiteur des microtubules.
- Incubation dans un milieu contenant de la cytochalasine D, inhibiteur des microfilaments
- Incubation dans un milieu contenant du nocodazole et de la cytochalasine D.

Les flèches indiquent le moment où la température d'incubation est passée de 4°C à 37°C. Chaque point représente la moyenne \pm un écart-type du diamètre de 3 voiles épidermiques.



contrôle

nocodazole

cytochalasine D

nocodazole + cytochalasine D

Fig. 41. Photographie d'une boîte de culture dont les 3 premiers puits contiennent un milieu de culture contrôle, les 3 suivants sont traités au nocodazole, les 3 autres à la cytochalasine D et les 3 derniers par une association des deux inhibiteurs du cytosquelette.

cytochalasine D, il faut remarquer que dans le milieu contrôle les microtubules sont visualisées uniquement au niveau des fibroblastes, les kératinocytes semblant peu ou ne pas en posséder. Par contre, dans le milieu sans Ca^{++} , les microtubules semblent plus abondants et sont normalement observables au niveau des kératinocytes. Nous n'avons pas d'explications à donner à cette observation.

Lorsque du nocodazole est ajouté dans le milieu de culture, une dégradation des microtubules est observée aussi bien dans le milieu contrôle que dans le milieu MCDB 153. La cytochalasine D, d'après Nagee et al. (1987) inhibe l'assemblage de l'actine sans affecter son désassemblage. Ce procédé doit aboutir probablement, à plus long terme, à une dégradation des microfilaments. Lors de notre expérience nous avons observé une réorganisation des microfilaments avec relocalisation sous forme condensée dans la région périnucléaire, dans le cytoplasme et sur la membrane cellulaire comme déjà décrit par d'autres (Gomez et al., 1992).

3.1.2.2. Actions des inhibiteurs du cytosquelette sur la contraction du feuillet épidermique

Nous avons d'abord analysé l'action des inhibiteurs du cytosquelette sur la contraction des voiles épidermiques après détachement par la dispase en ayant ajouté à leur milieu de culture du nocodazole, de la cytochalasine D ou l'association de ces deux inhibiteurs. Une partie des cultures sont gardées à 4°C alors que d'autres sont placées dans une étuve 37°C. Après différents laps de temps, nous avons photographié les voiles de culture et estimé la contraction épidermique. Les graphiques montrant les mesures des diamètres effectuées sur les feuillets épidermiques illustrent leur contraction (Fig. 40). A 4°C, comme l'avaient déjà indiqué les expériences précédentes (Fig. 24), aucune contraction n'est observée. Par contre, à 37°C, l'évolution est différente selon la présence et la nature de l'inhibiteur. Pour les feuillets témoins, une décroissance du diamètre de la culture cellulaire s'observe très rapidement après 10 à 15 min, le temps nécessaire au réchauffement du milieu. Cette étape de contraction rapide est suivie d'une contraction plus lente résultant peut-être de la réorganisation cellulaire. Lorsqu'après deux heures le passage à 37°C est réalisé pour la boîte de culture conservée jusque-là à 4°C, la contraction des feuillets épidermiques démarre de la même façon que pour les feuillets placés directement à 37°C (Fig. 40a). Le même style de courbe est obtenu lors de l'addition du nocodazole. Que ce soit avec ou sans nocodazole le diamètre final du feuillet épidermique ne représente plus que 45 à 50 % du diamètre initial. Nous pouvons déduire de ces observations, vu le faible effet du nocodazole, que les microtubules ne jouent pas un rôle essentiel dans le processus de contraction, qui suit le détachement par la dispase, de voiles épidermiques de culture (Fig. 40b). Par contre, en présence de cytochalasine D, une inhibition significative de la contraction est observée. Le feuillet épidermique après deux heures d'incubation à 37°C acquiert un diamètre correspondant environ 70 à 75 % du diamètre initial. Les microfilaments doivent donc jouer

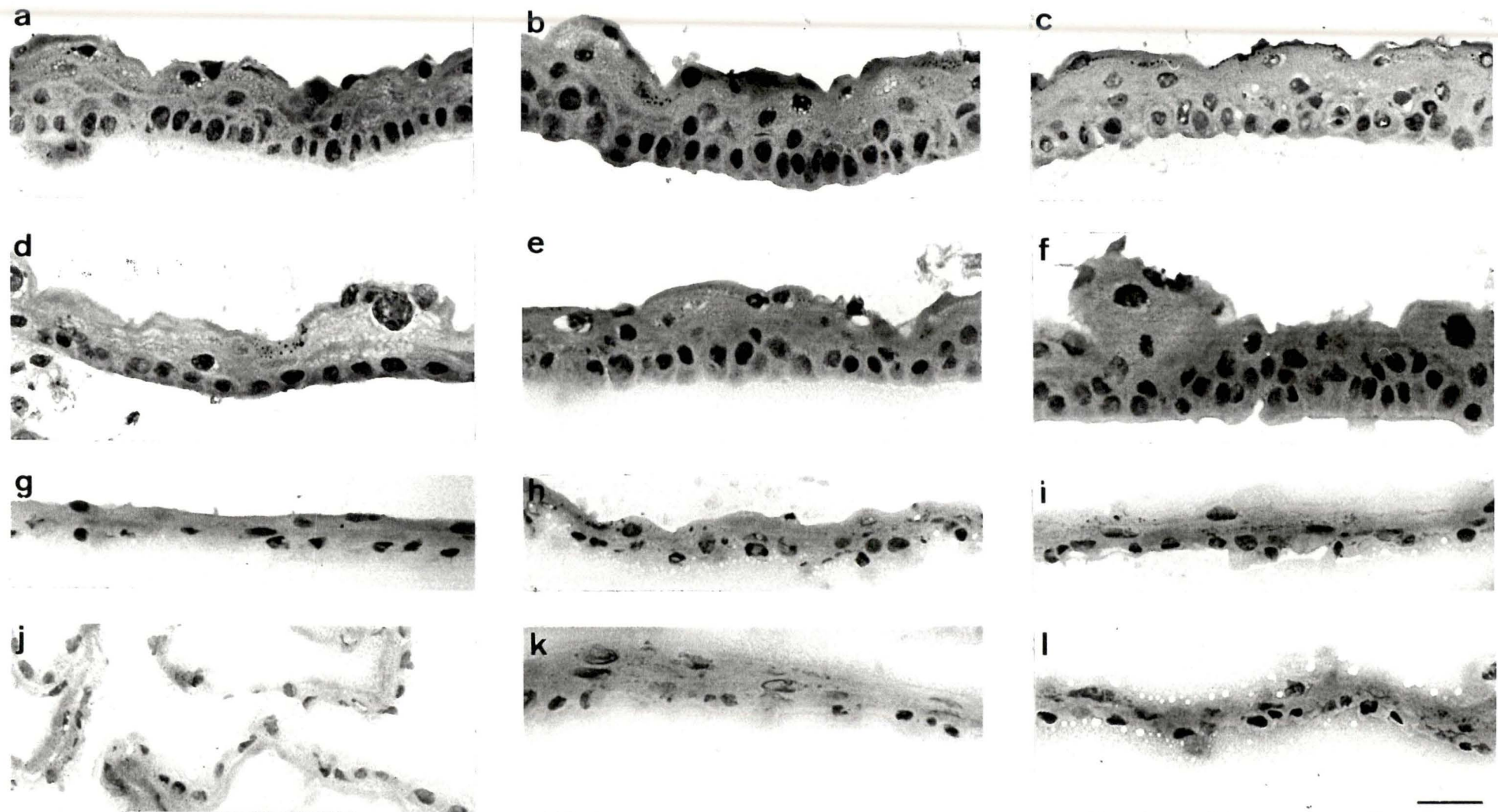


Fig. 42. Micrographies de coupes, réalisées au cryostat, de voiles épidermiques fixés directement après leur détachement par de la dispase (a, d ,g ,j) ou après 1h (b, e, h, k) et 2h (c, f, i, l) d'incubation à 37°C. Feuilles contrôles (a, b, c,) traités par le nocodazole (d, e, f), par la cytochalasine D (g, h, i) ou par les deux inhibiteurs (j, k, l).- Barre : 10 µm.

un rôle dans le phénomène de contraction. Vu la contraction d'environ 30 % se déroulant malgré la présence de l'inhibiteur, les microfilaments ne sont probablement pas les seuls facteurs impliqués dans un tel processus. Lors du passage de 4°C à 37°C, nous observons, à l'opposé des milieux témoins ou avec nocodazole, une contraction presque nulle (Fig. 40c). Comme le montre la Figure 40d, l'effet de la cytochalasine D seule est fort semblable à celui obtenu par l'association des deux inhibiteurs.

Comme nous le montre la Figure 41, une photographie d'une boîte de culture gardée pendant 2h à 37°C, nous pouvons associer d'une part les voiles épidermiques n'ayant pas été en contact avec la cytochalasine D (témoin et nocodazole) et d'autre part les voiles épidermiques ayant été en contact avec celle-ci (cytochalasine D seule ou associée au nocodazole). L'épaississement des feuillets épidermiques en contraction est observable sur cette photo. Elle paraît homogène sur toute la surface du feuillet épidermique.

3.1.2.3. Actions des inhibiteurs du cytosquelette sur la morphologie cellulaire après détachement par la dispase

Les feuillets de kératinocytes sont cryofixés directement après leur détachement (Fig. 42a, d, g, j), ou après 1h (Fig. 42b, e, h, k) ou 2h (Fig. 42c, f, i, l) d'incubation dans le milieu de culture à 37°C. Comme dans l'expérience précédente certaines cultures sont restées dans un milieu contrôle (Fig. 42a, b, c) alors que d'autres sont incubés dans un milieu contenant du nocodazole (Fig. 42d, e, f), de la cytochalasine D (Fig. 42g, h, i) ou une association des deux inhibiteurs (Fig. 42g, k, l).

L'évolution morphologique dans le milieu contrôle est identique à celle décrite au paragraphe 3.1.1.1. Comme nous l'avons déduit des analyses macroscopiques, lorsque le milieu de culture contient le nocodazole, la rétraction cellulaire se déroule de façon similaire à celle observée dans le milieu sans inhibiteur.

Par contre, en accord toujours avec les analyses macroscopiques, une grande différence s'observe au niveau des cultures traitées avec la cytochalasine D. La coloration à l'hémalum-érythrosine permet de visualiser l'aspect aplati des cellules et de leur noyau. La moins bonne qualité des cultures traitées par cet inhibiteur est expliquée par les difficultés que nous avons rencontrées pour les détacher de leur substrat. Alors que les cultures contrôles et les cultures traitées avec du nocodazole se détachent d'elles-mêmes, il a fallu utiliser des pinces pour détacher les feuillets épidermiques traités par la cytochalasine D. Nous avons ensuite localisé l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ par immunofluorescence et par Immunogold, en présence ou non d'inhibiteurs du cytosquelette, pour rechercher si son internalisation dépend de l'un ou l'autre élément du cytosquelette.

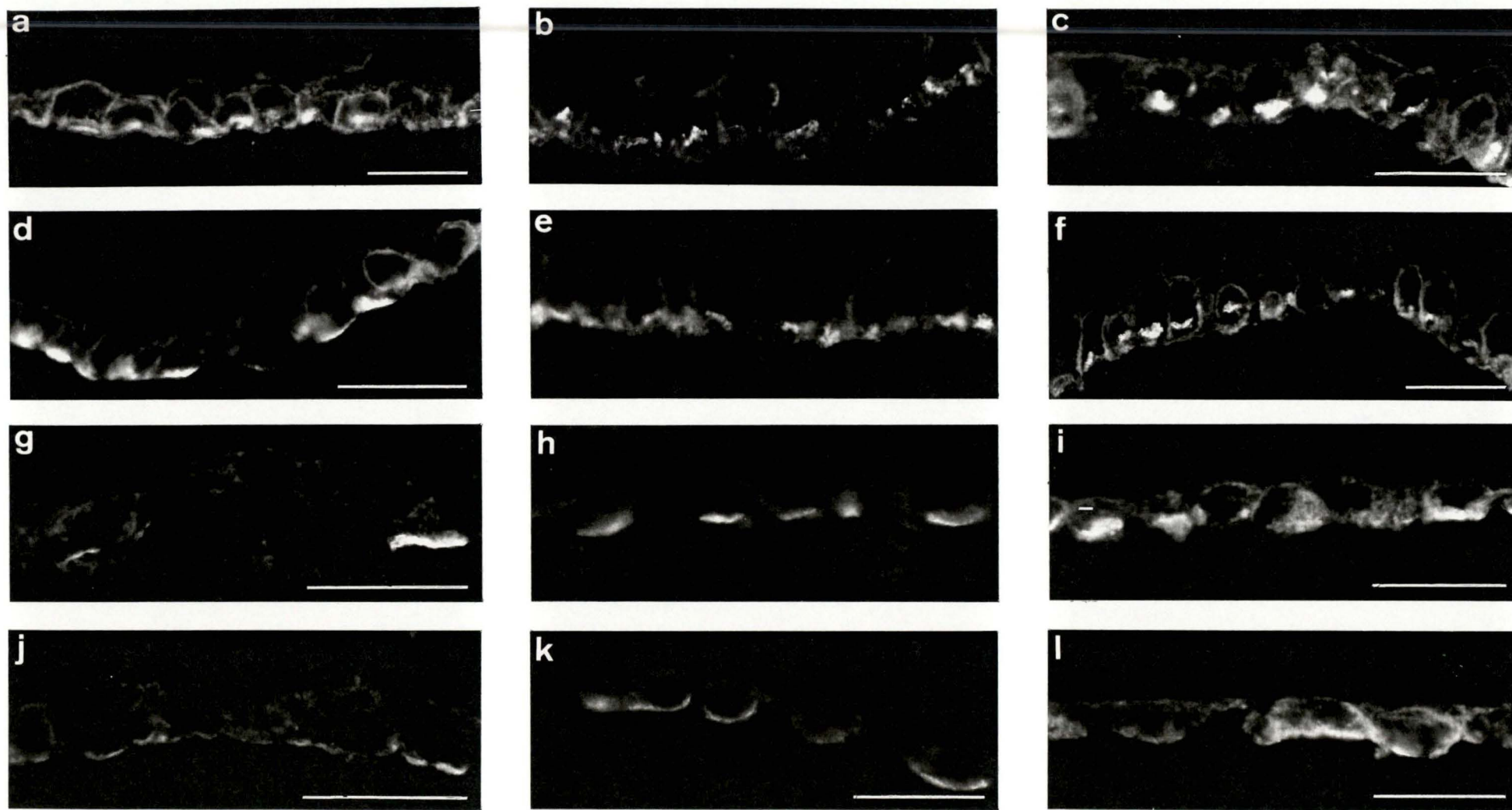


Fig. 43. Micrographies des marquages par immunofluorescence de la sous-unité α_6 sur des coupes au cryostat de feuillets de culture de kératinocytes fixés directement après détachement par la dispase (a, d, g, j) ou stockés préalablement pendant 1h (b, e, h, k) et 2h (c, f, i, l) à 37°C. Certains voiles sont incubés dans un milieu contrôle (a, b, c) alors que d'autres le sont dans un milieu avec nocodazole (d, e, f), avec cytochalasine D (g, h, i) ou avec les deux inhibiteurs (j, k, l).- Barres 10 μ m.

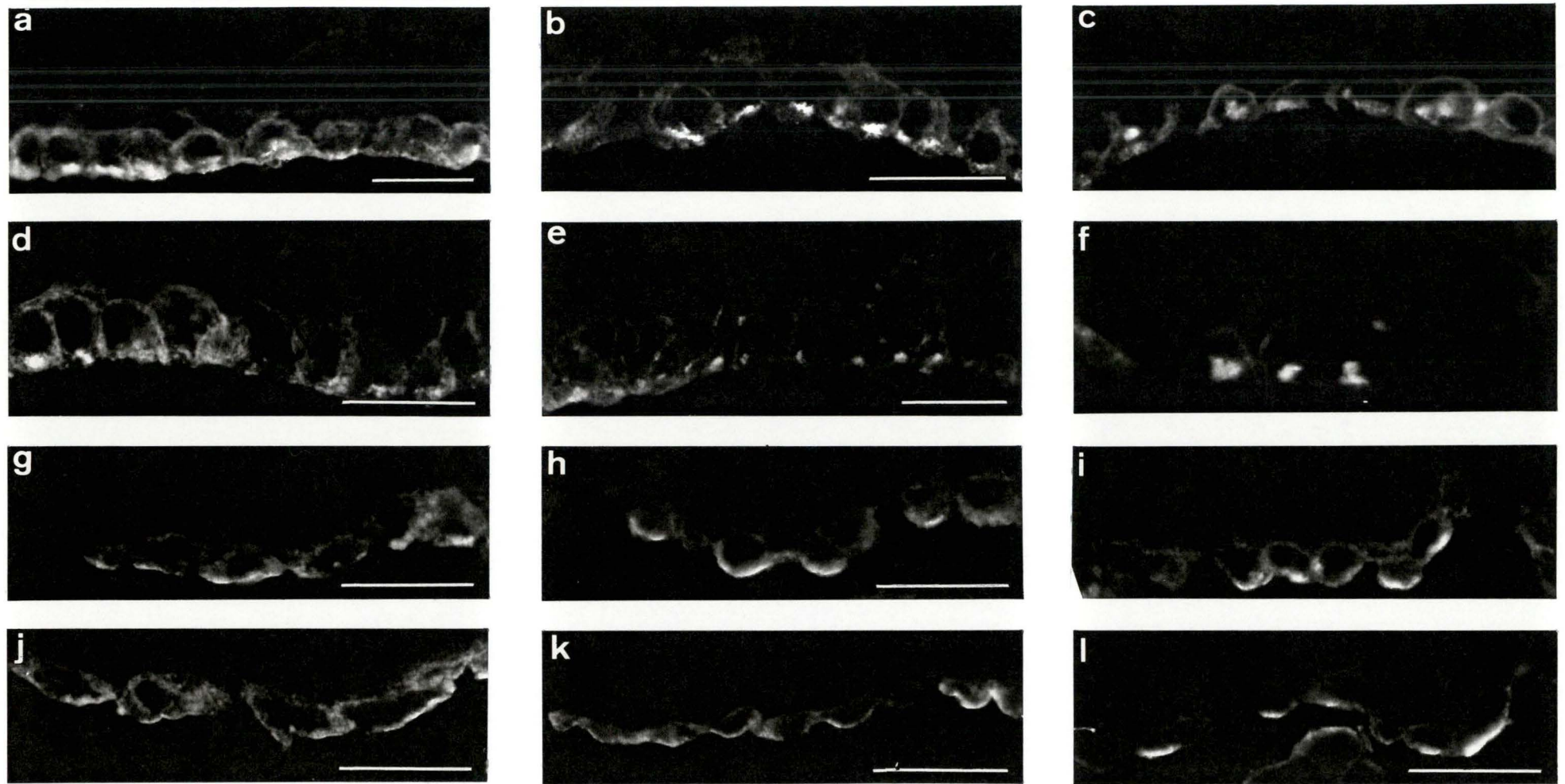


Fig. 44. Micrographies des marquages par immunofluorescence de la sous-unité β_4 sur des coupes au cryostat de feuillets de culture de kératinocytes fixés directement après détachement par la dispase (a, d, g, j) ou stockés préalablement pendant 1h (b, e, h, k) et 2h (c, f, i, l) à 37°C. Certains voiles sont incubés dans un milieu contrôle (a, b, c) alors que d'autres le sont dans un milieu avec nocodazole (d, e, f), avec cytochalasine D (g, h, i) ou avec les deux inhibiteurs (j, k, l).- Barres 10 μm .

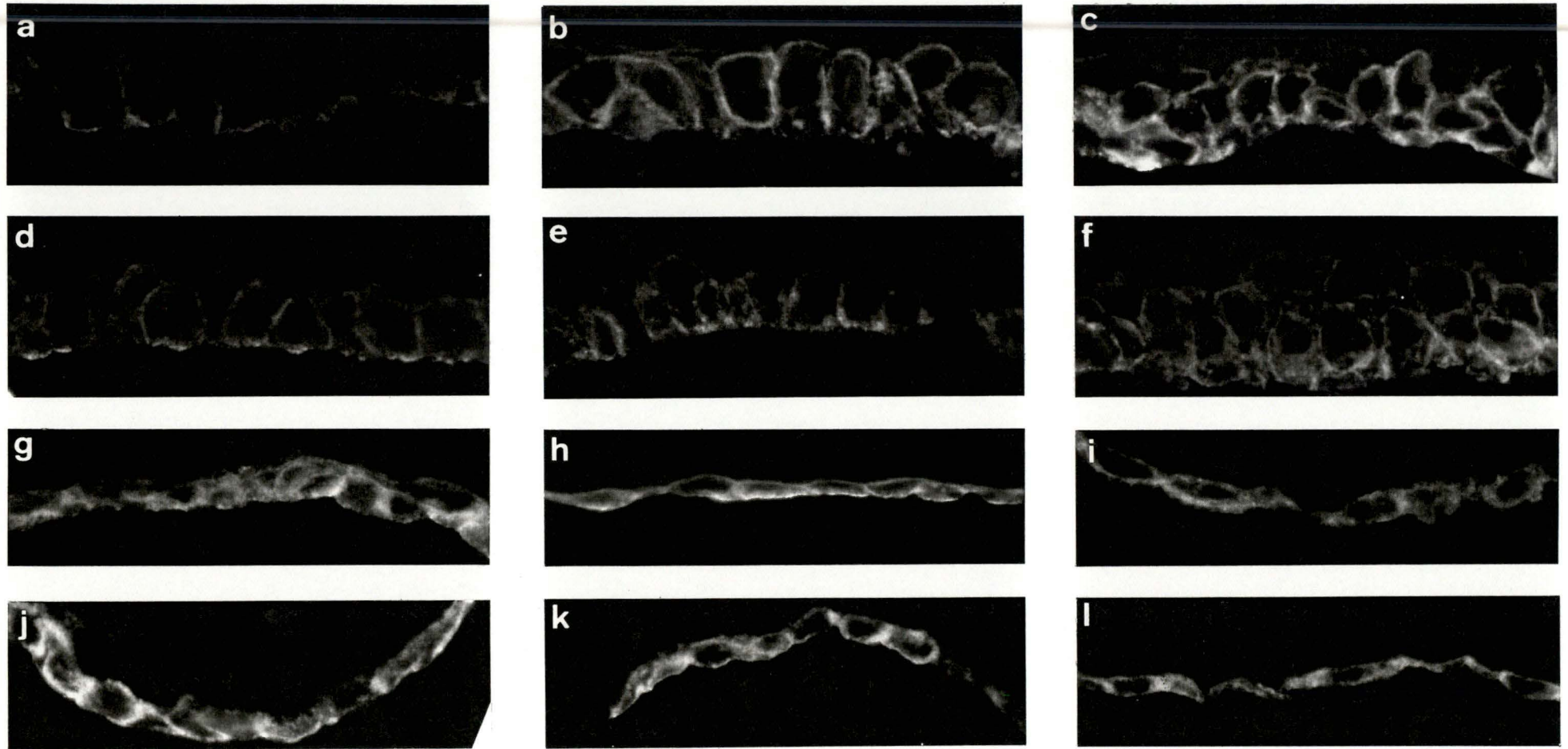


Fig. 45. Micrographies des marquages par immunofluorescence de la sous-unité β_1 sur des coupes au cryostat de feuillets de culture de kératinocytes fixés directement après détachement par la dispase (a, d, g, j) ou stockés préalablement pendant 1h (b, e, h, k) et 2h (c, f, i, l) à 37°C. Certains voiles sont incubés dans un milieu contrôlé (a, b, c) alors que d'autres le sont dans un milieu avec nocodazole (d, e, f), avec cytochalasine D (g, h, i) ou avec les deux inhibiteurs (j, k, l). - Barres 10 μm .

3.1.2.4. Cytosquelette, rétraction cellulaire et internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$

3.1.2.4.1. Visualisation par immunofluorescence.

Nous avons marqué par immunofluorescence les sous-unités d'intégrines α_6 (Fig. 43), β_4 (Fig. 44) et β_1 (Fig. 45) et nous avons analysé les conséquences que les inhibiteurs des microtubules et des microfilaments peuvent avoir sur leur localisation après détachement par la dispase à 37°C (0h, 1h et 2h). Comme déjà mentionné, la cytochalasine D influence la rétraction du feuillet épidermique, mais le nocodazole ne l'influence que très peu. Nous avons recherché s'il existait une corrélation entre le bon fonctionnement de certains constituants du cytosquelette, la rétraction cellulaire et l'internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ après détachement par la dispase à 37°C. Dans le milieu contrôle, le détachement à 37°C est suivi d'une rétraction cellulaire et d'une internalisation des sous-unités d'intégrines α_6 (Fig. 43a, b, c) et β_4 (Fig. 44a, b, c), la sous-unité β_1 (Fig. 45a, b, c) restant en surface des cellules basales. Les taches de fluorescence, après deux heures d'incubation, se sont rapprochées du noyau cellulaire. Lorsque du nocodazole est ajouté dans le milieu de culture, l'immunofluorescence confirme une intervention négligeable des microtubules dans ce processus d'internalisation. Le marquage de la sous-unité β_1 (Fig. 45d, e, f) nous permet de visualiser la conformation cylindrique des cellules et une certaine réorganisation après deux heures d'incubation. Les marquages des sous-unités α_6 (Fig. 43d, e, f) et β_4 (Fig. 44d, e, f) sont parfaitement comparables à ceux obtenus dans les voiles épidermiques incubés dans un milieu sans inhibiteur. L'internalisation de $\alpha_6\beta_4$ n'est donc probablement pas dépendante des microtubules de la cellule. Grâce à l'utilisation de la cytochalasine D, nous avons étudié l'influence des microfilaments aussi bien au niveau de la rétraction cellulaire que de l'internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$. Le marquage de la sous-unité β_1 (Fig. 45g, h, i, j, k, l) tout autour de la surface cellulaire des cellules basales nous indique une rétraction pratiquement nulle de ces dernières après une à deux heures d'incubation à 37°C. Les cellules basales gardent leur forme pavimenteuse qu'elles avaient lors de leur culture sur le plastique de la boîte de culture. Les marquages des sous-unités α_6 (Fig. 43g, h, i, j, k, l) et β_4 (Fig. 44g, h, i, j, k, l) nous montrent une surface basale plus fluorescente que le reste du contenu cellulaire. Après une à deux heures d'incubation à 37°C, la fluorescence qui s'accroît semble se retrouver du côté interne de la membrane plasmique basale sans toutefois s'internaliser en profondeur dans la cellule. Les mêmes résultats sont obtenus lors de l'incubation du voile épidermique dans un milieu contenant les deux inhibiteurs. Grâce aux résultats obtenus lors de l'addition de cytochalasine D dans le milieu de culture, nous pouvons déduire une implication des microfilaments dans le processus d'internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$. Une observation nous a cependant intrigués. En effet, après deux heures d'incubation à 37°C, les sous-unités α_6 et β_4 semblent commencer à pénétrer dans les cellules. Afin de savoir si la cytochalasine D ne fait que retarder ou si elle inhibe totalement le processus d'internalisation, nous avons réalisé un marquage par Immunogold des sous-

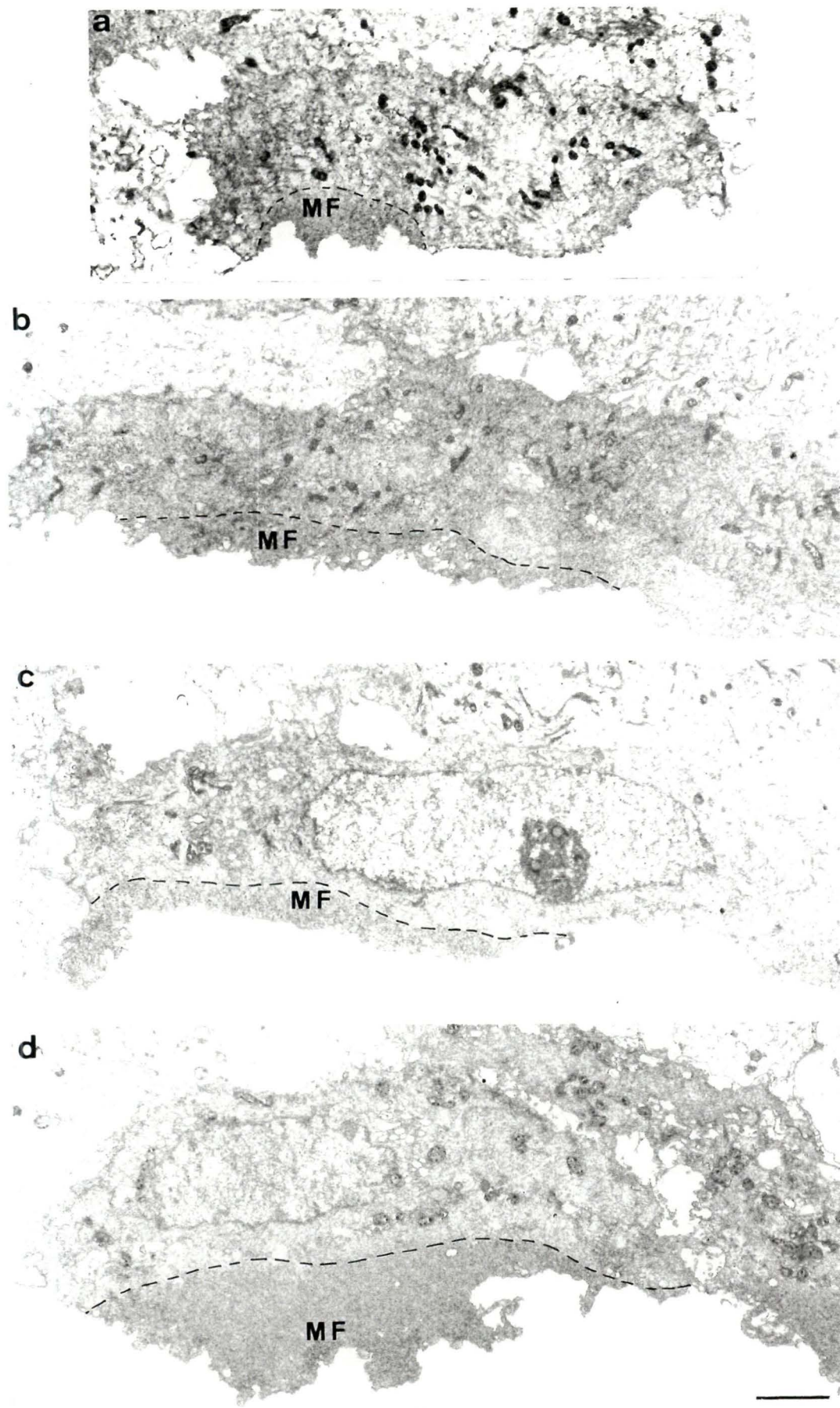


Fig. 46. Micrographies électroniques de kératinocytes basaux traités à la cytochalasine D et fixés soit directement après leur détachement par la dispase (a) soit après 5 min (b), 15 min (c) et 60 min (d) d'incubation à 37°C. Les pointillés permettent de visualiser l'accumulation progressive au cours du temps des microfilaments (MF) à la base des cellules.- Barre : 2 μ m.

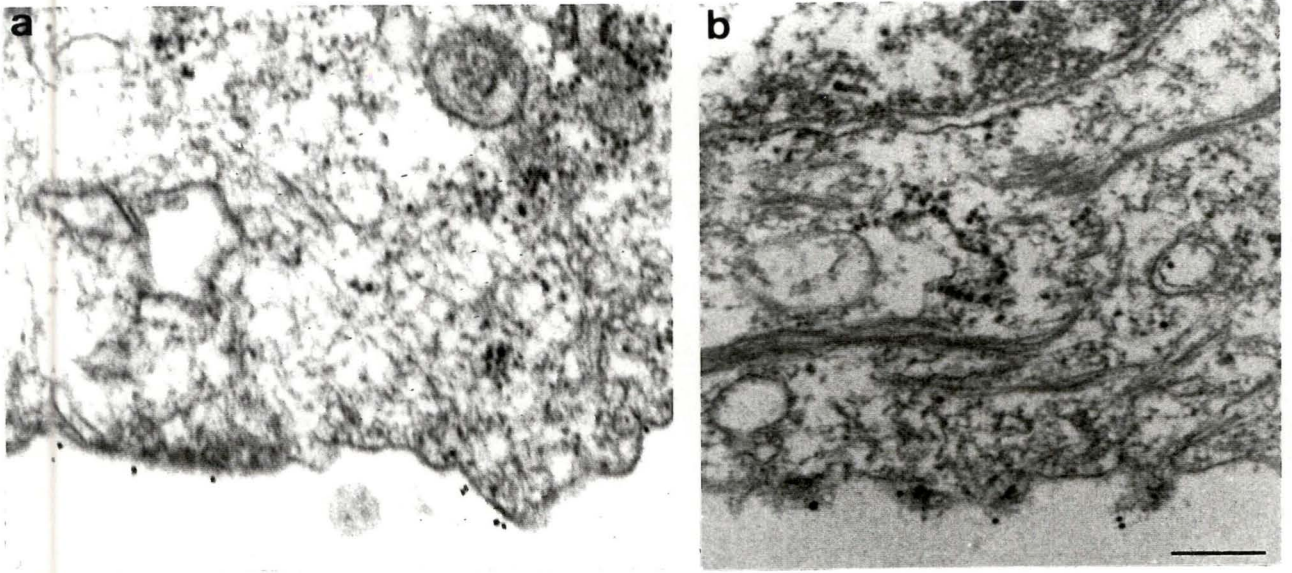


Fig. 47. Marquage Immunogold de la sous-unité α_6 au niveau des cellules basales d'une culture de kératinocytes traitée à la cytochalasine D et fixée directement après son détachement par la dispase à 4°C. Les particules d'or associées aux sous-unités α_6 sont toutes localisées au niveau de la face basale des cellules (a, b).
- Barre : 0,2 μm .

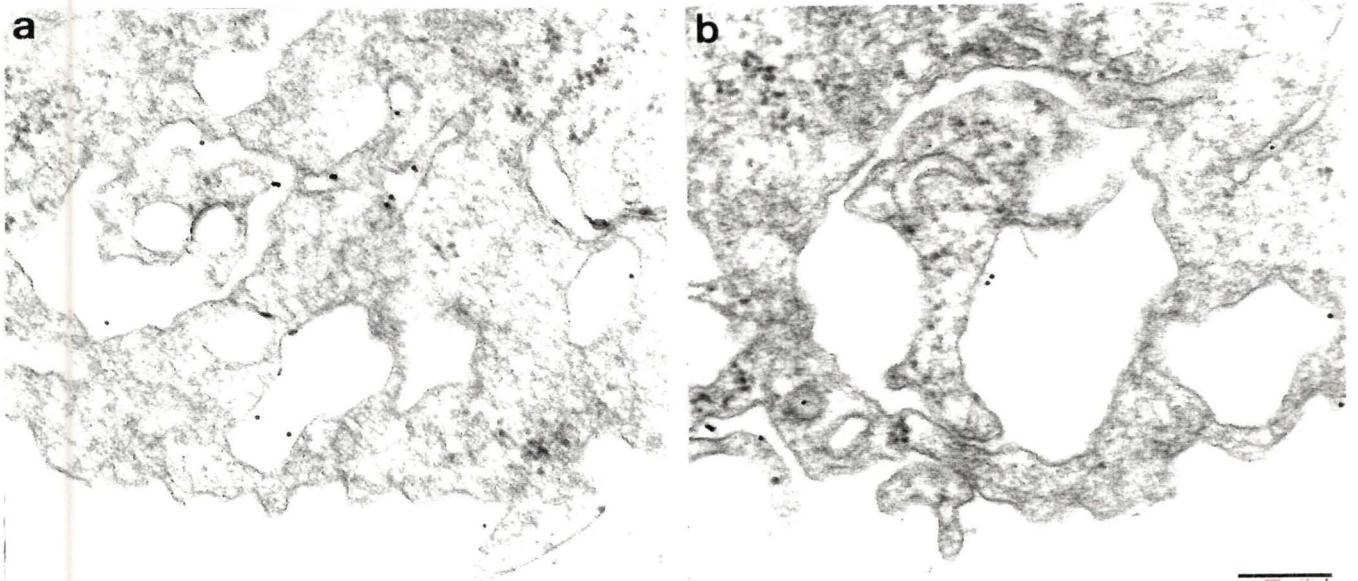


Fig. 48. Marquage Immunogold de la sous-unité α_6 au niveau des cellules basales d'une culture de kératinocytes traitée à la cytochalasine D, détachée par la dispase à 4°C et incubée pendant 5 min à 37°C avant d'être fixée. Les particules d'or se retrouvent dans des vésicules ou replis membranaires proches de la membrane basale.- Barre : 0,2 μm .

unités α_6 présentes sur la face basale après le détachement et avons analysé leur localisation après différents temps d'incubation en présence de la cytochalasine D.

3.1.2.4.2. Localisation en ultrastructure de la sous-unité α_6 dans des feuilletts épidermiques détachés et traités par la cytochalasine D

En présence de cytochalasine D, lorsqu'on étudie en microscopie électronique l'évolution morphologique des cellules basales des feuilletts épidermiques (Fig. 46), on observe une forme relativement pavimenteuse des kératinocytes et un noyau aplati. La microscopie électronique nous permet de visualiser les microfilaments après le traitement à la cytochalasine D. Nous observons une évolution marquante de leur localisation au cours du temps suivant le détachement (0, 5, 15 et 60 min) : les microfilaments rendus inactifs se concentrent à la base des cellules et leur accumulation devient fort importante après une heure d'incubation à 37°C (Fig. 46d). Cette concentration de microfilaments est observée également en absence d'inhibiteurs mais leur accumulation n'est jamais aussi importante (Fig. 25). Le traitement par la cytochalasine D et la non-rétraction qu'il provoque empêche toute formation de clusters à la base des cellules.

Par marquage Immunogold de la sous-unité α_6 , nous avons aussi analysé en ultrastructure l'internalisation de l' $\alpha_6\beta_4$ en présence de cytochalasine D. Directement après le détachement par la dispase, nous obtenons le même résultat que sans inhibiteur : les particules d'or sont toutes localisées à la surface des cellules basales (Fig. 47). Après 5 min d'incubation, l'internalisation commence. Les particules d'or colloïdal se retrouvent en effet dans des vésicules ou replis membranaires proches de la surface basale. Lorsqu'en immunofluorescence nous avons observé une fluorescence plus intense et semblant pénétrer dans la cellule, nous avons pensé à un retard dans l'internalisation des intégrines $\alpha_6\beta_4$ provoqué par la non-rétraction des cellules et non pas directement par inhibition des microfilaments. La microscopie électronique nous montre qu'après 5 min d'incubation à 37°C le marqueur se trouve dans ce qui semble être des replis de la membrane plasmique basale (Fig. 48). Le changement important s'observe après 15 min (Fig. 49) et 60 min (Fig. 50) d'incubation. Alors qu'en absence de l'inhibiteur, les sous-unités α_6 marquées par Immunogold étaient internalisées et en partie recyclées, en présence de l'inhibiteur des microfilaments, que ce soit après 15 ou 60 min, une proportion relativement importante des particules reste en surface ou se retrouve dans des vésicules fort proches de la membrane. Ces vésicules, s'éloignant au maximum d'environ 0,7 μm de la membrane basale, ne correspondent probablement qu'à des replis membranaires et non à la formation de véritables vésicules. L'internalisation complète de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ ne paraît donc pas se produire en présence de cytochalasine D. Les microfilaments semblent donc jouer un rôle dans la rétraction cellulaire et dans l'internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$. Comme nous le montre la Figure 49c, d après 15 min d'incubation, nous avons vu apparaître une internalisation des particules d'or colloïdal par des "coated pits". Ce type d'internalisation

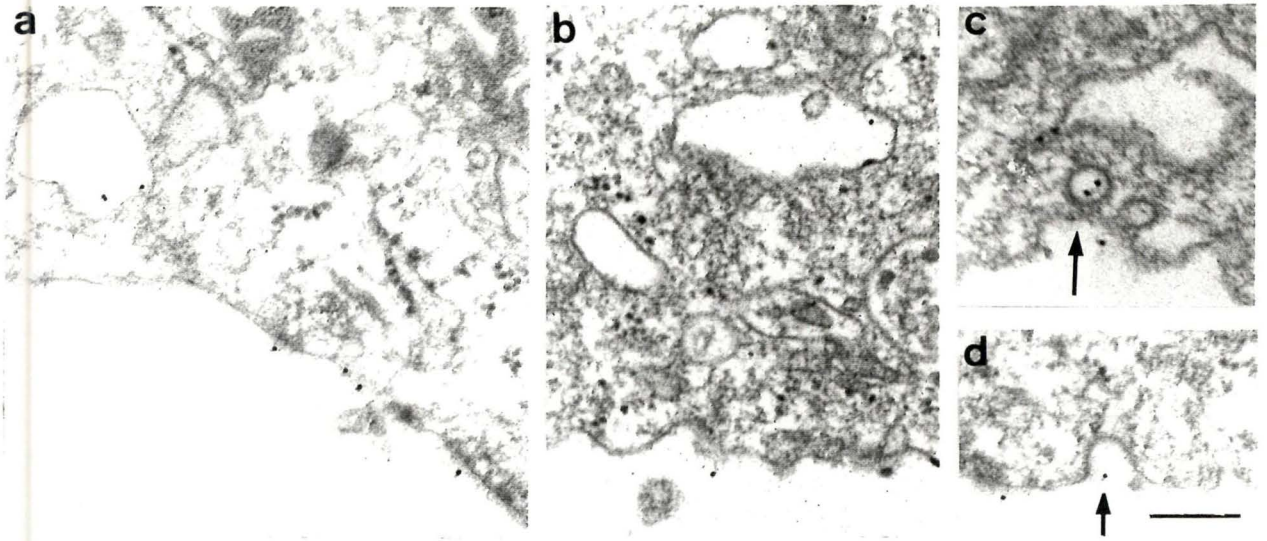


Fig. 49. Marquage Immunogold de la sous-unité α_6 au niveau des cellules basales d'une culture de kératinocytes traitée à la cytochalasine D, détachée par la dispase à 4°C et incubée pendant 15 min à 37°C avant d'être fixée. Les particules d'or se retrouvent, comme après 5 min, dans des vésicules ou replis membranaires proches de la membrane basale. Les particules d'or semblent de plus être internalisées dans des "coated pits" (flèches).- Barre : 0,2 μm .

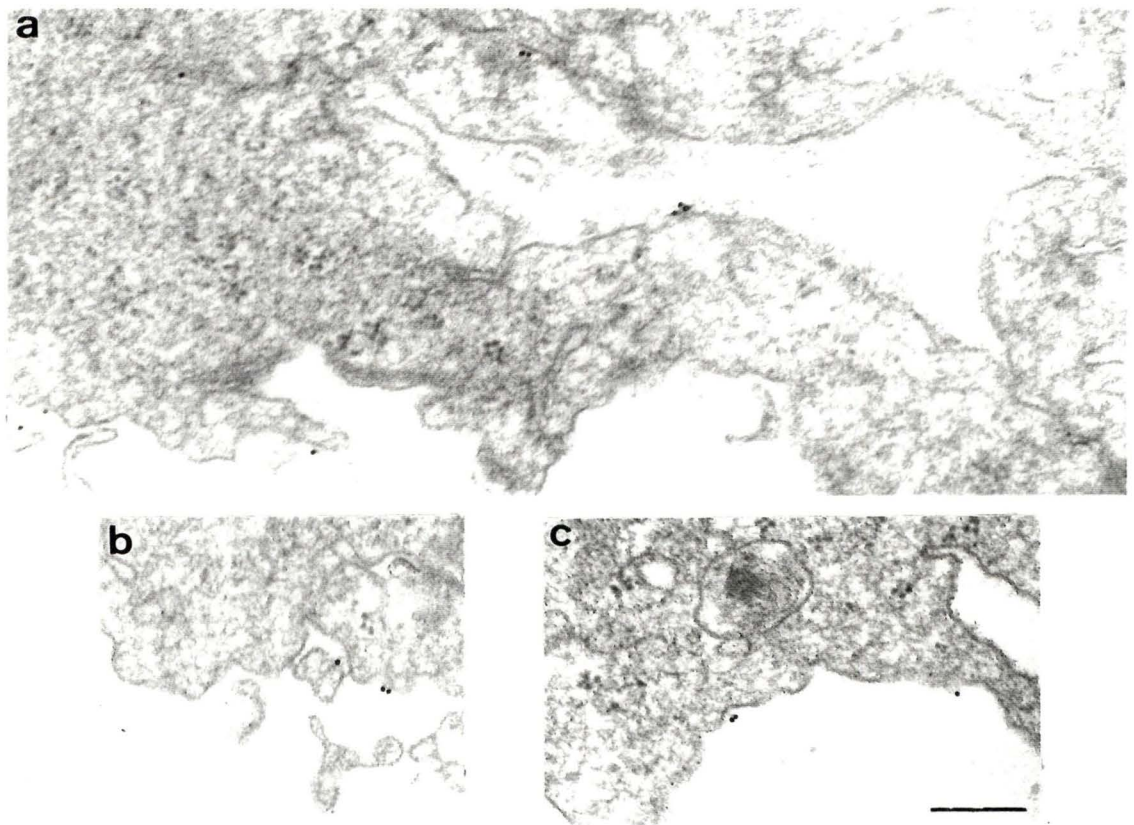


Fig. 50. Marquage Immunogold de la sous-unité α_6 au niveau des cellules basales d'une culture de kératinocytes traitée à la cytochalasine D, détachée par la dispase à 4°C et incubée pendant 60 min à 37°C avant d'être fixées. Les particules d'or se retrouvent dans des vésicules ou replis membranaires proches de la membrane (a) mais toujours, comme pour les autres temps, en surface cellulaire (b, c).
- Barre : 0,2 μm .

n'avait jamais été observé au préalable dans les expériences sans inhibiteur du cytosquelette. L'internalisation via des "coated pits" concerne l'endocytose par récepteurs. A l'opposé du type d'internalisation que nous avons observé jusqu'à présent pour l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, l'endocytose par "coated pits" n'est pas influencée par le système des microfilaments. L'observation de billes d'or dans des "coated pits" lorsque les cultures cellulaires sont traitées à la cytochalasine D s'expliquerait peut-être par une voie alternative que la cellule emploierait pour internaliser malgré tout l'intégrine $\alpha_6\beta_4$?

3.2. Discussion

Précédemment, des études réalisées au département d'Histologie ont porté sur les conséquences qu'un stockage prolongé de feuillets épidermiques détachés par la dispase pouvait avoir sur la prolifération des kératinocytes basaux (Poumay et al., 1991; Boucher et al. 1991; Poumay et al., 1993). Alors que le traitement par la dispase n'apporte en lui-même aucune détérioration aux cellules épidermiques (Green et al., 1979), un stockage prolongé à une température de 37°C provoque une diminution progressive de la capacité de synthèse de l'ADN (diminution du labelling index) au niveau des cellules basales détachées et une perte de la polarité caractéristique du tissu de culture. Simultanément, on observe des réorganisations cellulaires globuleuses des kératinocytes, une induction de leur différenciation terminale et une diminution de la colony forming efficiency (capacité des kératinocytes à reformer de nouvelles colonies)(Poumay et al., 1993). En conséquence, l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire est un élément-clé dans l'intégrité et l'organisation du tissu. Beaucoup de récepteurs transmembranaires pour les protéines de la matrice extracellulaire appartiennent à la famille des intégrines. Nous avons dès lors orienté notre travail vers l'étude du système d'ancrage de type hémidesmosomal et de ses constituants, principalement l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, après un détachement du feuillet épidermique de son substrat. Dans ce cadre, il est d'ores et déjà intéressant de noter que des travaux récents ont montré que les intégrines ne sont pas uniquement des récepteurs structurels qui connectent la matrice extracellulaire et le cytosquelette, mais sont aussi des récepteurs transmetteurs de signaux vers le cytoplasme et régulent le pH intracellulaire, le Ca^{++} libre dans la cellule, la phosphorylation de différentes protéines et le turn-over du phosphatidyl inositol (Schwartz, 1992).

3.2.1. Evolution de la structure hémidesmosomale et de ses différents constituants après détachement par la dispase et différents temps d'incubation

Dans nos expériences, par la dispase permet le détachement basal des kératinocytes en culture sans apparemment altérer leur intégrité morphologique. Ceci est en accord avec les observations d'autres chercheurs (Stenn et al., 1989; Owaribe et al., 1990). Le

détachement à la dispase est toutefois plus difficile si l'incubation est réalisée à 4°C, l'activité de l'enzyme étant bien sûr ralentie à cette température. Dans ces conditions, il faut aider le détachement des cellules en utilisant des pinces, ce qui peut parfois abîmer les cellules. Si on se rappelle que le détachement à 4°C empêche la rétraction cellulaire, on peut supposer que l'action mécanique normalement produite à 37°C par cette rétraction doit être remplacée par une légère traction des pinces afin d'obtenir ce détachement à 4°C.

Un stockage des cultures détachées pendant différents laps de temps à 37°C aboutit à des variations morphologiques des kératinocytes basaux et à une réorganisation cellulaire. L'observation des blebs, apparaissant alors en quelques minutes sur la surface basale des cellules détachées confirme les résultats déjà publiés (Gipson et al., 1983). De même, Compton et ses collaborateurs (1989), en analysant des cultures de kératinocytes après leur détachement, ont observé également la formation de nombreux blebs, de 150 à 400 nm de diamètre, sur la face basale de ces cultures et décrivent des défauts membranaires à ce niveau.

Par ailleurs, l'immunofluorescence permet d'observer au niveau des cellules basales l'internalisation progressive de plusieurs des constituants hémidesmosomaux ($\alpha_6\beta_4$, APB, HD1). En effet, immédiatement après le détachement, ces différentes molécules sont polarisées vers les surfaces basales des cellules, de façon similaire à leur localisation décrite au niveau de kératinocytes non-détachés (Owaribe et al., 1990; Ryyänen et al., 1991; Hieda et al., 1992). Il est intéressant de constater qu'à l'opposé de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, les molécules APB et HD1 se limitent aux taches de fluorescence et ne se trouvent pas au niveau des contours cellulaires. Cette observation s'explique par une localisation de ces molécules limitée aux structures hémidesmosomales. Par contre, au fur et à mesure du stockage à 37°C, des taches très lumineuses intracytoplasmiques se forment progressivement et se rapprochent du noyau. Il est intéressant de noter ici que Hertle et ses collaborateurs (1992) ont examiné *in vivo* l'expression de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ après la formation de bulles produites par aspiration de l'épiderme. Ce processus aboutit au détachement des cellules épidermiques qui se retrouvent alors séparées du derme sous-jacent. Dans ces cellules ayant perdu leur ancrage sur le tissu conjonctif, ces auteurs observent une localisation intracellulaire ponctuelle de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ rappelant les résultats obtenus lors de nos expériences.

L'APB internalisé est localisé dans les premiers temps avec l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, mais déjà après 1 ou 2h d'incubation à 37°C, la tache de fluorescence s'atténue et une redistribution de l'APB dans tout le cytoplasme est observée. Owaribe et al. (1990) ont étudié l'expression de l'APB dans des cellules épithéliales de glandes mammaires bovines et ces auteurs ont également observé la localisation intracytoplasmique de l'APB et son accumulation du côté basal du noyau après détachement par la dispase et la distribution de l'APB dans tout le cytoplasme après 1h d'incubation à 37°C des cultures détachées. L'apparition de l'antigène

dans tout le cytoplasme peut s'expliquer de deux façons : soit il s'agit d'une redistribution de l'APB préexistant dans toute la cellule, et donc une décomposition partielle de l'hémidesmosome, ou bien il s'agit d'une synthèse protéique nouvelle de l'APB. En ce qui concerne la molécule HD1, son internalisation est simultanée avec l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ et l'APB, mais dans ce cas une fluorescence non négligeable apparaît à la base des cellules, 2h après le détachement. Ceci suggère éventuellement un recyclage de l'HD1 avec retour vers la face basale.

Nous pouvons donc déduire de nos observations, qu'à l'opposé des intégrines VLA persistant à la surface des cellules, les différents constituants hémidesmosomaux, suite à un détachement du feuillet épidermique de son substrat, s'internalisent dans la cellule. Les expressions différentes observées pour les trois constituants hémidesmosomaux analysés suggèrent qu'au début de leur internalisation les structures hémidesmosomales restent intactes, mais qu'une décomposition partielle de l'hémidesmosome a lieu après un plus long temps d'incubation à 37°C et que ses différents constituants peuvent être recyclés.

Nos observations en microscopie électronique sont en parfait accord avec celles de Takahashi et al. (1985) ou d'Owaribe et al. (1990) qui observent comme nous, directement après le détachement des cellules épithéliales, une grande densité d'hémidesmosomes s'invaginant au niveau de la surface des cellules basales détachées. Lors du détachement par la dispase, le rôle de système d'ancrage stabilisateur de l'hémidesmosome (Carter et al., 1990) n'ayant plus aucune utilité, son internalisation pourrait donc s'expliquer. La microscopie électronique nous indique que, dès les 15 premières minutes d'incubation à 37°C, la plupart des hémidesmosomes immatures disparaissent progressivement des vésicules d'invagination. L'internalisation pourrait donc induire un démantèlement de la structure de type hémidesmosomal. Ce démantèlement ne semble cependant pas être complet car, après une heure d'incubation à 37°C, quelques structures hémidesmosomales, bien que peu nombreuses, persistent dans certaines vésicules. Cette observation est en accord avec l'évolution comparable de la taille et de la luminosité des taches observées lors des marquages par immunofluorescence des différents constituants hémidesmosomaux. En accord avec les observations de Stepp et al. (1991), Sonnenberg et al. (1991) et Jones et al. (1991), réalisées sur l'épiderme de biopsies, le marquage Immunogold de la sous-unité α_6 sur les kératinocytes en culture montre l'association de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ avec les structures de type hémidesmosomal.

Lorsque nous analysons les conséquences que peuvent apporter différents temps de stockage à 37°C des cultures détachées, le marquage Immunogold nous indique, en plus du processus d'internalisation, qu'un recyclage de la sous-unité α_6 semble exister, permettant probablement sa redistribution rapide sur la surface cellulaire. Il se pourrait que, lors de l'adhésion future à un nouveau substrat, ce soit autour de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, servant en sorte de centre organisateur, que se reforme toute la structure de type hémidesmosomal (Jones et al., 1991; Hertle et al., 1992). En d'autres termes, l'internalisation serait dès lors plutôt

bénéfique pour la réadhésion, par exemple de greffes de kératinocytes sur des surfaces blessées. Idéalement, il faudrait maintenant utiliser un anticorps qui reconnaisse la portion extracellulaire de la sous-unité β_4 pour savoir si celle-ci suit réellement le même trajet que la sous-unité α_6 . De même, un marquage Immunogold des molécules HD1 et APB pourrait nous permettre d'analyser au niveau ultrastructural leur localisation pendant ces phénomènes.

Pour l' $\alpha_6\beta_4$, nous observons en fluorescence après 4 à 6h d'incubation à 37°C, une diminution de la taille et de l'intensité du spot de fluorescence et une répartition de petits points de fluorescence dans tout le cytoplasme cellulaire. Vu que l' $\alpha_6\beta_4$ est une molécule transmembranaire, les points de fluorescence répandus dans tout le cytoplasme correspondent à des molécules présentes dans des vésicules. Au contraire, le marquage de l'APB montre après moins d'1h une distribution très homogène dans tout le cytoplasme, en vue d'une utilisation future peut-être de cette molécule.

Les mécanismes d'internalisation et de recyclage sont-ils des processus constitutifs de la cellule ou des conséquences spécifiques du détachement des cellules basales de leur substrat ? Il n'est pas exclu qu'une internalisation et un recyclage de différents constituants hémidesmosomaux se déroulent de façon constitutive, puisque Bretscher (1992) a récemment montré que l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ notamment fait partie des intégrines qui circulent entre la surface cellulaire et le cytoplasme.

3.2.2. Les vésicules associées aux particules d'or colloïdal sont-elles de véritables vésicules ou de simples replis membranaires ?

Le rouge de ruthénium, un marqueur extracellulaire de post-fixation, nous a permis de distinguer les vésicules internalisées des replis membranaires. Aucune structure, éloignée de plus de 0,3 à 0,4 μm de la surface cellulaire, n'est contrastée par le rouge de ruthénium. Il ne peut plus dès lors s'agir de replis de la membrane plasmique. Les sous-unités α_6 associées aux particules d'or, se retrouvant après 15 min d'incubation à 37°C dans des vésicules proches du noyau, semblent donc suivre un processus d'internalisation dans la cellule qui les isole totalement du milieu extracellulaire. Chien et al. (1982), travaillant sur des endothéliums d'artères carotides canines, ont pratiquement fait les mêmes observations : alors que dans la zone périphérique des cellules endothéliales 92 % des vésicules sont en continuité avec le milieu extérieur, à 0,4 μm du plasmalemme, elles ne semblent plus avoir aucun contact avec ce milieu extracellulaire.

3.2.3. Comparaison de l'internalisation de la sous-unité α_6 avec l'endocytose par récepteur

L'analyse par Immunogold de la sous-unité α_6 montre que le procédé d'internalisation ne semble pas toujours suivre un trajet similaire à celui de l'endocytose par récepteur. A

l'opposé de l'endocytose spécifique, le but de l'internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ n'est pas d'introduire dans la cellule un ligand particulier. De plus, les invaginations de la membrane plasmique basale auxquelles sont associées les particules d'or colloïdal ne sont pas des "coated pits" (puits recouverts de clathrine sur leur surface cytoplasmique). Par contre lorsque nous avons ajouté au milieu de la cytochalasine D, nous avons observé après 15 min d'incubation à 37°C l'internalisation de quelques rares particules d'or dans des "coated vesicles".

Dans un milieu contrôle sans inhibiteur, les particules d'or internalisées en profondeur dans la cellule peuvent peut-être suivre deux trajets différents. Comme le montre la figure 32, une partie des sous-unités α_6 associées à l'or colloïdal est recyclée vers la membrane plasmique bordant les espaces intercellulaires alors qu'une autre, comme le montre la figure 33, semble transiter par des corps multivésiculaires, probablement vers les lysosomes. Après 1h d'incubation à 37°C, certaines vésicules d'internalisation sont toujours associées à des hémidesmosomes immatures. La conservation occasionnelle de ces structures hémidesmosomales est en accord avec l'évolution similaire des taches lumineuses produites lors des marquages par immunofluorescence de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, de l'HD1 et de l'APB. De petites vésicules de forme arrondie semblent sortir de ces grandes vésicules localisées en profondeur dans la cellule. Comme des structures hémidesmosomales ne sont jamais observées au niveau des petites vésicules, on peut penser que les petites vésicules bourgeonnent à partir des invaginations de la membrane détachée. Après s'être isolées, les petites vésicules peuvent suivre deux trajets différents : certaines sont retrouvées à proximité des membranes cellulaires latérales pour peut-être déverser leur contenu au niveau des espaces intercellulaires, alors que d'autres semblent fusionner au niveau de grandes vésicules qui se transforment en corps multivésiculaires. Ces trajets sont hypothétiques et mériteraient une analyse plus détaillée pour être confirmés.

L'observation de l'internalisation sans "coated pits" de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ dans un milieu de culture contrôle n'est cependant pas valable pour toutes les intégrines. Raub et Kuentzel (1989) en travaillant sur le récepteur de la fibronectine (FnR), qui est l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, ont montré le rôle des "coated pits" dans le processus d'internalisation du FnR. Lors d'une inhibition de l'endocytose par "coated pits", alors que la plupart des FnR restent en surface, 10 % d'entre eux s'internalisent malgré tout dans la cellule de façon adsorptive. De plus, Raub et Kuentzel (1983), mais aussi Sczekan et Juliano (1990) en étudiant les FnR de fibroblastes CHO (Chinese hamster ovary), ont montré que l'endocytose de ± 30 % de ces FnR est un phénomène constitutif. D'après Bretscher (1992), ce phénomène constitutif aboutit à un processus de recyclage : que ce soit pour l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ ou pour le FnR, ces deux intégrines circulent dans les cellules et, après internalisation, suivent un processus de recyclage ou se dirigent vers le système endosomal.

3.2.4. Implications du cytosquelette dans la rétraction cellulaire et l'internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$

Grâce aux micrographies des cultures cellulaires détachées observées en microscopie électronique, nous avons observé, après différents temps d'incubation à 37°C, une évolution des constituants du cytosquelette. Immédiatement après le détachement à 4°C du feuillet épidermique, les filaments intermédiaires sont fréquemment observés près de la membrane cytoplasmique basale. Par la suite, lors des différents temps d'incubation à 37°C permettant l'internalisation des domaines membranaires contenant l'intégrine $\alpha_6\beta_4$, ces invaginations se localisent entre une région riche en filaments intermédiaires et une région pauvre en organites où des microfilaments s'accumulent progressivement. Takahashi et ses collaborateurs (1985), étudiant des cellules épidermiques de souris dissociées par la trypsine, ont observé également un mécanisme d'internalisation des hémidesmosomes et une évolution des différents constituants du cytosquelette dont particulièrement une rétraction des filaments intermédiaires. Ces auteurs ont également rapporté que les inhibiteurs des microfilaments et des microtubules empêchent ces phénomènes. Ce sont de telles observations qui nous ont conduit à étudier les implications possibles du cytosquelette dans les processus de rétraction cellulaire et l'internalisation des hémidesmosomes immatures lors du détachement par la dispase et après différents temps d'incubation à 37°C. Nous avons utilisé deux inhibiteurs du cytosquelette : le nocodazole qui est un inhibiteur des microtubules et la cytochalasine D qui est un inhibiteur des microfilaments (Magee et al., 1987; Zamansky et al., 1991; Gomez et al., 1992). Un inhibiteur des filaments intermédiaires serait naturellement très intéressant à utiliser vu l'implication probable de ces derniers, comme l'ont montré Takahashi et al. (1985), dans l'internalisation des hémidesmosomes. Aucun moyen inhibant les fonctions de ce constituant du cytosquelette n'a cependant encore été décrit. Toutefois ce domaine est en pleine évolution et, alors que jusqu'à présent on pensait le réseau de filaments intermédiaires d'une très grande stabilité, Skalli et al. (1992) ont synthétisé récemment les derniers résultats sur ce sujet, proposant une notion d'équilibre dynamique entre les sous-unités polymérisées et non polymérisées des filaments intermédiaires : un processus de phosphorylation-déphosphorylation contrôle probablement cet équilibre.

En analysant la rétraction des feuillets épidermiques en présence des inhibiteurs (nocodazole et cytochalasine D) lors des différents temps d'incubation à 37°C, une implication des microfilaments a pu être déduite. Par contre, les rares microtubules semblent avoir peu ou pas d'effet sur la rétraction de la culture des kératinocytes et sur sa réorganisation cellulaire. La figure 40, en nous montrant l'effet important que la cytochalasine D peut apporter à la contraction cellulaire, montre également qu'en présence de cet inhibiteur une certaine contraction du feuillet épidermique se produit malgré tout. Deux explications peuvent être proposées à cette observation : soit la cytochalasine D ne possède qu'une

Les résultats obtenus en présence de la cytochalasine D semblent fort comparables à ceux obtenus lors de l'incubation à 4°C. La morphologie des cellules et la persistance des particules d'or plus ou moins en surface de celles-ci à 4°C ou avec de la cytochalasine D présentent de nombreuses analogies. Cette température, bien qu'empêchant, à l'opposé de la cytochalasine D, la formation complète des replis membranaires, peut peut-être jouer un rôle similaire à un inhibiteur des microfilaments en ne permettant pas leur fonctionnement. Une dernière question importante reste à se poser : l'implication du cytosquelette dans la rétraction cellulaire et surtout dans l'internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ se limite-t-elle à une fonction mécanique des microfilaments ? Comme le proposent Zamansky et al. (1991), le rôle du cytosquelette, s'étendant du noyau à la membrane plasmique, ne se limite pas à des fonctions de croissance, de forme ou de mobilité des cellules, mais est un centre critique permettant d'envoyer de l'extérieur vers le noyau de la cellule de nombreux signaux informatifs. Cette qualité du cytosquelette a peut-être son importance dans le processus d'internalisation des hémidesmosomes après le détachement par la dispase.

PERSPECTIVES ET CONCLUSION

4. PERSPECTIVES ET CONCLUSION

L'intérêt des greffes cutanées réalisées à partir de cultures de kératinocytes et les différentes conséquences que le stockage prolongé des feuillets épidermiques peut apporter à son efficacité, nous ont conduits à étudier l'évolution des systèmes d'attache hémidesmosomaux contenant l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ au niveau des cellules basales de cultures de kératinocytes détachées de leur substrat. Les observations que nous avons faites sur l'internalisation des structures hémidesmosomales et sur le recyclage possible d'un constituant tel que l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ nous ont amenés à spéculer que ce processus d'internalisation rapide pouvait en définitive être tout-à-fait bénéfique à la réadhésion des greffes de kératinocytes. Toutefois, nous ignorons encore quels sont les processus qui contrôlent ces phénomènes.

Le feuillet épidermique détaché est donc partiellement modifié lors de son stockage : notamment, de nombreuses boursoufflures membranaires ou "blebs" se forment à la base des cellules. Or, selon plusieurs auteurs, l'augmentation du Ca^{++} cytosolique libre provoquerait leur apparition au niveau de différents types cellulaires. A l'avenir, il serait dès lors intéressant en culture cellulaire de rechercher, par les mesures du Ca^{++} intracellulaire lors du détachement cellulaire, si un tel processus est en relation avec l'internalisation des hémidesmosomes.

Par ailleurs, nos observations pourront probablement aussi permettre de mieux comprendre certaines conséquences du détachement épidermique dans des maladies cutanées, par exemple la pemphigoïde bulleuse, une pathologie autoimmune qui implique aussi un détachement basal des cellules épidermiques.

BIBLIOGRAPHIE

5. BIBLIOGRAPHIE

- Albelda, S.M. et Buck, C.A. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.*; 4: 2868-2880.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Watson J.D. (1989) *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc.; London: 1219 p.
- Aumailley, M. (1991) Biochimie des interactions cellules-matrices dans le revêtement cutané-muqueux. *Séminaires INSERM*; 214: 9-18.
- Banks-Schlegel, S. et Green, H. (1981) Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. *J. Cell Biol.*; 90: 732-737.
- Borel, J.P., Randoux, A., Maquart, F.X., Le Pench, C. et Valeyre, J. (1987) *Biochimie dynamique*. Maloine, Paris, 799 p.
- Boucher, F., Poumay, Y., Degen, A., Paye, M. et Leloup, R. (1991) Utilization of human cultured epidermal keratinocytes: irreversibility of the inhibition of proliferation induced in stored detached cultures. *Burns*; 17: 205-208.
- Boyce, S.T. et Ham, R.G. (1983) Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.*; 81: 33s-40s.
- Bretscher, M.S. (1992) Circulating integrins: alpha5beta1, alpha6beta4 and Mac-1, but not alpha3beta1, alpha4beta1 or LFA-1. *EMBO J.*; 11: 405-410.
- Briggaman, R.A., Yoshiike, T. et Crouce, D.J. (1991) The epidermal-dermal junction and genetic disorders of this area. in *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin* (Vol. II, Goldsmith, L.A., ed.) pp. 1243-1266, Oxford University Press, New York.
- Carter, W.G., Kaur, P., Gil, S.G., Gahr, P.J. et Wayner, E.A. (1990) Distinct functions for integrins alpha3beta1 in focal adhesions and alpha6beta4/bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes. *J. Cell Biol.*; 111: 3141-3154.

- Chien, S., Laufer, L. et Handley, D.A. (1982) Vesicle distribution in the arterial endothelium determined with ruthenium red as an extracellular marker. *J. Ultrastruct. Res.*; 79: 198-206.
- Compton, C.C., Gill, J.M., Bradford, D.A., Regauer, S., Gallico, G.G. et O'Connor, N.E. (1989) Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. *Lab. Invest.*; 60: 600-612.
- Dale, B.A., Haugen Scofield, J.A., Hennings, H., Stanley, J.R. et Yuspa, S.H. (1983) Identification of filaggrin in cultured mouse keratinocytes and its regulation by calcium. *J. Invest. Dermatol.*; 81: 90s-95s.
- De Dobbeleer. (1988) Ultrastructure du complexe tonofilaments-desmosome: contribution à l'étude de l'adhésion épidermique. Thèse d'agrégation de l'enseignement supérieur.
- De Luca, M., Albanese, E., Bondanza, S., Megna, M., Ugozzoli, L., Molina, F., Cancedda, R., Santi, P.L., Bormioli, M., Stella, M. et Magliacani, G. (1989) Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. *Burns*; 15: 303-309.
- Dedhar, S. (1990) Integrins and tumor invasion. *BioEssays*; 12: 583-590.
- Eckert, R.L. (1989) Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol. Rev.*; 69: 1316-1346.
- Edelson, R. et Fink, J. (1985) Le rôle immunitaire de la peau. *Pour la Science*: 59-67.
- Eichner, R., Bonitz, P. et Sun T-T. (1984) Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J. Cell Biol.*; 98: 1388-1396.
- Gipson, I.K., Grill, S.M., Spurr, S.J. et Brennan, S.J. (1983) Hemidesmosome formation in vitro. *J. Cell Biol.*; 97: 847-857.
- Gomez, M., Navarro, P., Quintanilla, M. et Cano, A. (1992) Expression of alpha6beta4 integrin increases during malignant conversion of mouse epidermal keratinocytes: association of beta4 subunit to the cyokeratin fraction. *Exp. Cell Res.*; 201: 250-261.

- Green, H. (1980) The keratinocyte as differentiated cell type. The Harvey lectures; 74: 101-131.
- Green, H. et Rheinwald, J.G. (1977) Process for serially culturing keratinocytes. United States Patent; (4,016,036).
- Green, H., Kehinde, O. et Thomas, J. (1979) Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 76: 5665-5668.
- Grinnell, F. (1992) Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. J. Cell Sci.; 101: 1-5.
- Hayat, M.A. (1989) Principles and techniques of electron microscopy. Macmillan Press Scientific & Medical, London, 463 p.
- Hertle, M.D., Kubler, M.-D., Leigh, I.M. et Watt, F.M. (1992) Aberrant integrin expression during epidermal wound healing and in psoriatic epidermis. J. Clin. Invest.; 89: 1892-1901.
- Hieda, Y., Nishizawa, Y., Uematsu, J. et Owaribe, K. (1992) Identification of a new hemidesmosomal protein, HD1: a major, high molecular mass component of isolated hemidesmosomes. J. Cell Biol.; 116: 1497-1506.
- Hould, R. (1984) Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Marlane éditeur, Paris, 399 p.
- Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell; 69: 11-25.
- Jones, J.C.R., Kurpakus, M.A., Cooper, H.M. et Quaranta, V. (1991) A function for the integrin alpha6beta4 in the hemidesmosome. Cell Reg.; 2: 427-438.
- Junqueira, L.C. et Carneiro, J. (1983) Basic histology. Lange Medical Publications, Los Altos, California, 510 p.
- Klatte, D.H., Kurpakus, M.A., Grelling, K.A. et Jones, J.C.R. (1989) Immunochemical characterization of three components of the hemidesmosome and their expression in cultured epithelial cells. J. Cell Biol.; 109: 3377-3390.

- Klein, C.E., Steinmayer, T., Mattes, J.M., Kaufmann, R. et Weber, L. (1990) Integrins of normal human epidermis: differential expression, synthesis and molecular structure. *Br. J. Dermatol.*; 123: 171-178.
- Kurpakus, M.A., Quaranta, V. et Jones, J.C.R. (1991) Surface relocation of alpha6beta4 integrins and assembly of hemidesmosomes in an in vitro model of wound healing. *J. Cell Biol.*; 115: 1737-1750.
- Le Varlet, B., Staquet, M.J., Dezutter-Dambuyant, C., Gaucherand, M. et Schmitt, D. (1991) Expression and endocytosis of integrin VLA receptors for collagen, fibronectin and laminin by normal human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*; 2: 287-299.
- Lee, E.C., Lotz, M.M., Steele, G.D.Jr. et Mercurio, A.M. (1992) The integrin alpha6beta4 is a laminin receptor. *J. Cell Biol.*; 117: 671-678.
- Legan, P.K., Collins, J.E. et Garrod, D.R. (1992) The molecular biology of desmosomes and hemidesmosomes: 'What's in a name?'. *BioEssays*; 14: 385-393.
- Lewis, L., Barrandon, Y., Gree, H., Albrechts-Bueshler, G. (1987) The reorganization of microtubules and microfilaments in differentiating keratinocytes. *Differentiation*; 36: 228-233.
- Magee, A.I., Lytton, N.A. et Watt, F.M. (1987) Calcium-induced changes in cytoskeleton and motility of cultured human keratinocytes. *Exp. Cell Res.*; 172: 43-53.
- Marchisio, P.C., Bondanza, S., Cremona, O., Cancedda, R. et DeLuca, M. (1991) Polarized expression of integrin receptors (alpha6beta4, alpha2beta1, alpha3beta1, and alpha5beta1) and their relationship with the cytoskeleton and basement membrane matrix in cultured human keratinocytes. *J. Cell Biol.*; 112: 761-773.
- Moll, R., Franke, W.W. et Schiller, D.L. (1982) The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*; 31: 11-24.
- Owaribe, K., Kartenbeck, J., Stumpp, S., Magin, T.M., Krieg, T., Diaz, L.A. et Franke, W.W. (1990) The hemidesmosomal plaque. I. Characterization of a major constituent protein as a differentiation marker for certain forms of epithelia. *Differentiation*; 45: 207-220.

- Pittelkow, M.R. et Scott, R.E. (1986) New techniques for the in vitro culture of human skin keratinocytes and perspectives on their use for grafting of patients with extensive burns. *Mayo Clin. Proc.*; 61: 771-777.
- Potten, C.S. (1981) Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Intern. Rev. Cytol.*; 69: 271-318.
- Poumay, Y., Boucher, F., Leclercq-Smekens, M., Degen, A. et Leloup, R. (1993) Basal cell adhesion to a culture substratum controls the polarized spatial organization of human epidermal keratinocytes into proliferating and terminally differentiating suprabasal populations. *Epith. Cell Biol.*; 2: sous presse.
- Poumay, Y., Boucher, F., Degen, A. et Leloup, R. (1991) Inhibition of basal cell proliferation during storage of detached cultured epidermal keratinocyte sheets. *Acta Derm. Venereol. (Stockh.)*; 71: 195-198.
- Quaranta, V. et Jones, J.C.R. (1991) The internal affairs of an integrin. *Trends Cell Biol.*; 1: 2-4.
- Raub, T.J. et Kuentzel, S.L. (1989) Kinetic and morphological evidence for endocytosis of mammalian cell integrin receptors by using an anti-fibronectin receptor β subunit monoclonal antibody. *Exp. Cell Res.*; 184: 407-426.
- Regauer, S., Seiler, G.R., Barrandon, Y., Easley, K.W. et Compton, C.C. (1990) Epithelial origin of cutaneous anchoring fibrils. *J. Cell Biol.*; 111: 2109-2115.
- Resing, K.A. et Dale, B. (1991) Proteins of keratohyaline. in *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin* (Vol. I, Goldsmith, L.A., ed.), pp. 148-167, Oxford University Press, New York.
- Rheinwald, J.G. et Green, H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*; 6: 331-344.
- Rousselle, P., Lunstrum, G.P., Keene, D.R. et Burgeson, R.E. (1991) Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell Biol.*; 114: 567-576.

- Ryynänen, J., Jaakkola, S., Engvall, E., Peltonen, J. et Uitto, J. (1991) Expression of $\beta 4$ integrins in human skin: comparison of epidermal distribution with $\beta 1$ -integrin epitopes, and modulation by calcium and vitamin D3 in cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*; 97: 562-567.
- Schmitt, D. (1985) Progrès en immunocytochimie ultrastructurale. Séminaire INSERM; 131: 143-148.
- Schwartz, M.A. (1992) Transmembrane signalling by integrins. *Trends Cell Biol.*; 2: 304-308.
- Sczekan, M. et Juliano, R. (1989) Internalization of the fibronectin receptor is a constitutive process. *J. Cell. Physiol.*; 142: 574-580.
- Skalli, O., Chou, Y.-H. et Goldman, R.D. (1992) Intermediate filaments: not so tough after all. *Trends Cell Biol.*; 2: 308-312.
- Sonnenberg, A., Calafat, J., Janssen, H., Daams, H., Van der Raaij-Helmer, L.M.H., Falcioni, R., Kennel, S.J., Aplin, J.D., Baker, J., Loizidou, M. et Garrod, D. (1991) Integrin $\alpha 6/\beta 4$ complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J. Cell Biol.*; 113: 907-917.
- Sonnenberg, A., Linders, C.J.T., Daams, J.H. et Kennel, S.J. (1990) The $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6) and $\alpha 6\beta 4$ protein complexes: tissue distribution and biochemical properties. *J. Cell Sci.*; 96: 207-217.
- Staquet, M.-J. (1991) Intégrines et épiderme. Séminaire INSERM; 214: 71-81.
- Steinert, P.M. et Freedberg, I.M. (1991) Molecular and cellular biology of keratins. in *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin* (Vol. I, Goldsmith, L.A., ed.) pp. 113-147, Oxford University Press, New York.
- Stenn, K.S., Link, R., Moellmann, G., Madri, J. et Kuklinska, M.S. (1989) Dispase, a neutral protease from bacillus *Polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J. Invest. Dermatol.*; 93: 287-290.
- Stepp, M.A., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A., Elwell, J. et Gipson, I.K. (1990) $\alpha 6\beta 4$ integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1990; 87: 8970-8974.

- Stingl, G. et Alberer, W. (1983) The Langerhans cell. in *Biochemistry and Physiology of the Skin* (Vol. II, Goldsmith, L.A., ed.) pp. 907-920, Oxford University Press, New York.
- Sun, T.-T., Tseng, S.C.G., Huang, A.J.-W., Cooper, D., Schermer, A., Lynch, M.H., Weiss, R. et Eichner, R. (1985) Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins: a review. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*; 455: 307-329.
- Takahashi, Y., Mutasim, D.F., Patel, H.P., Anhalt, G.J., Labib, R.S. et Diaz, L.A. (1985) The use of human pemphigoid autoantibodies to study the fate of epidermal basal cell hemidesmosomes after trypsin dissociation. *J. Invest. Dermatol.*; 85: 309-313.
- Thivolet, J. (1986) La peau de remplacement. *Pour la Science*: 16-22.
- Todaro, G.J. et Green, H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.*; 17: 299-313.
- Verrando, P. (1991) La jonction dermo-épidermique. *Séminaire INSERM*; 214: 83-100.
- Watt, F.M. (1984) Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis. *J. Cell Biol.*; 98: 16-21.
- Watt, F.M. (1989) Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr. Opin. Cell Biol.*; 1: 1107-1115.
- Watt, F.M. et Green, H. (1981) Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures. *J. Cell Biol.*; 90: 738-742.
- Watt, F.M., Jordan, P.W. et O'Neill, C.H. (1988) Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1988; 85: 5576-5580.
- Wheather, P.R., Burkitt, H.G. et Daniels, V.G. (1979) *Functional Histology*. Churchill Livingstone, London, 278 p.
- Wheelock, M.J. et Jensen, P.J. (1992) Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by E-cadherin. *J. Cell Biol.*; 117: 415-425.

Zamansky, G.B., Nguyen, U. et Chou, I.-N. (1991) An immunofluorescence study of the calcium-induced coordinated reorganization of microfilaments, keratin intermediate filaments, and microtubules in cultured human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*; 97: 985-994.