

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE
CELLULAIRES**

PAR

MICHEL FAUSTHER, B. Sc. (Biologie Médicale)

**FORMATION DES CORPS DE MALLORY DANS LES
HÉPATOCYTES DE SOURIS INTOXiquÉES À LA
GRISÉOFULVINE : PHOSPHORYLATION DE K8/18 ET
EXPRESSION DE HSP70**

JANVIER 2004

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, à travers ce court message, toutes les personnes qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mon projet de maîtrise.

Une pensée spéciale à Monique Cadrin, ma directrice de thèse et mes collègues de laboratoire : Louis, Caroline, Kathleen, Martin et les autres...

Je ne terminerai pas sans mentionner le support moral et spirituel que m'ont apporté ma famille à Libreville, Gabon et mes proches ici, à Trois-Rivières, Canada

RÉSUMÉ

Le cytosquelette des cellules de la majorité des organismes supérieurs est constitué de trois grandes familles de filaments : les microfilaments d'actine (MFs), les microtubules (MTs) et les filaments intermédiaires (FIs)[1]. Les deux premières classes de filaments sont assez bien caractérisées : les MFs et les MTs participent à des processus cellulaires essentiels comme la mitose ou la motilité et assurent un rôle structural au sein de la cellule (organisation du cytoplasme). Les FIs ont des fonctions moins bien connues. Le nom des FIs leur vient du fait qu'ils ont un diamètre intermédiaire (10 nm) entre les MFs (7 nm) et les MTs (24 nm). On retrouve les FIs dans la plupart des cellules où ils forment un réseau complexe s'étendant de la périphérie nucléaire à la membrane plasmique[2]. Les FIs se distinguent de leurs homologues du cytosquelette à plusieurs niveaux (physiques, biochimiques, énergétiques). Par exemple, les FIs sont constitués de chaînes α -hélicoïdales dont l'assemblage ne nécessite pas de dépense énergétique alors que les MFs et les MTs sont formés de protomères globulaires polymérisés au moyen d'ATP ou de GTP. Par contre au niveau fonctionnel, la disposition des FIs suggère qu'ils jouent un rôle structural dans la cellule. Dans les cellules épithéliales des tissus kératinisés, une fonction établie des protéines de FIs est de soutenir mécaniquement la membrane plasmique au niveau des points d'attache (desmosomes et hémidesmosomes) avec les cellules voisines et la matrice extracellulaire[3-5]. Outre le soutien mécanique au niveau de la membrane plasmique, une fonction potentielle des FIs serait la protection en situation de stress de type physico-chimique. En effet, la réorganisation des FIs peut être observée *in vitro* dans les cellules exposées à la chaleur ou à une infection virale, et *in vivo* dans les hépatocytes de souris mises en présence de substances toxiques comme l'acétaminophène (ACT), la griséofulvine (GF) ou la 3,5-diéthoxycarboxy-1,4-dihydrocollidine (DDC)[6, 7]. Dans plusieurs systèmes (foie, épiderme, cellules musculaires, système nerveux central), certaines maladies semblent être la conséquence directe de défauts dans l'organisation des FIs dans les cellules[8]. Une caractéristique commune à plusieurs de ces pathologies est la présence d'agrégats de FIs intracytoplasmiques [8].

Chez l'homme, l'intoxication chronique à l'éthanol peut provoquer le développement d'une hépatite accompagnée de la formation de structures contenant des protéines de FIs agrégées : les corps de Mallory (CMs)[9]. Chez la souris, le traitement avec des agents hépatotoxiques comme la GF ou le DDC induit le développement d'une hépatite et la formation d'agrégats contenant des FIs, qui sont morphologiquement et biochimiquement similaires à ceux observés chez l'humain [10, 11]. Au cours du développement de la maladie, on observe des mécanismes cellulaires comme la surexpression des FIs, la modification de leur phosphorylation et l'expression des protéines de stress HSP70. La phosphorylation des FIs jouerait un rôle dans la régulation de la structure, et possiblement de la fonction des FIs. L'induction de l'expression de HSP70 serait causée par la présence augmentée de protéines altérées[12, 13]. Néanmoins, l'importance de ces processus dans les mécanismes de protection des hépatocytes face au stress induit par la GF reste à déterminer.

Dans le présent travail, nous avons voulu étudier la potentielle relation entre l'expression de HSP70 et la phosphorylation de K8/K18, au niveau de sites spécifiques à savoir les sérines 73 et 436 sur K8 et la sérine 33 sur K18, dans des hépatocytes de souris intoxiqués à la griséofulvine. Nous avons essayé de savoir si ces événements induits par le traitement à la GF étaient reliés et participaient aux processus de formation des corps de Mallory. Nos expériences ont été réalisées sur deux lignées de souris: C3H et FVB/n afin de vérifier si la réponse hépatocellulaire est influencée par l'origine génétique, des études précédentes ayant montré la réponse cellulaire peut être différente selon le patrimoine génique[14].

Contribution des auteurs

Michel Fausther a réalisé la totalité des expériences exposées dans le présent travail de recherche. Michel Fausther a été supervisé au cours de son travail en laboratoire par la directrice de thèse Monique Cadrin pour diverses questions de réflexion et d'écriture. Monique Cadrin et Louis Villeneuve ont participé à la conception du projet d'étude. Michel Fausther et Monique Cadrin ont participé à la rédaction de l'article scientifique présenté dans la présente thèse.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	v
TABLES DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES.....	x
CHAPITRE I L'HÉPATITE.....	1
1.1 L'hépatite chez l'homme.....	1
Hépatite alcoolique humaine	
1.2 Modèles animaux de l'hépatite alcoolique.....	2
CHAPITRE II LE CYTOSQUELETTE ET LES FILAMENTS	
INTERMÉDIAIRES	5
2.1 Filaments intermédiaires.....	5
Structure des filaments intermédiaires et mécanisme	
d'assemblage.....	7
2.2 Fonctions connues des filaments intermédiaires.....	9
CHAPITRE III LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES DANS LES	
HÉPATOCYTES.....	11
3.1 Les kératines 8 et 18.....	11
3.2 Importance fonctionnelle de K8/18.....	14
CHAPITRE IV FILAMENTS INTERMÉDIAIRES ET CORPS DE	
MALLORY.....	16
4.1 Composition biochimique des corps de Mallory.....	16
4.2 Mécanismes de formation des CMs.....	18
CHAPITRE V LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES	
FILAMENTS INTERMÉDIAIRES EN SITUATION DE STRESS	20
5.1 Phosphorylation de K8/18	20
5.2 Autres modifications post-traductionnelles de K8/18.....	24

CHAPITRE VI	LES PROTÉINES DE STRESS.....	26
6.1	Fonction des protéines de stress.....	26
6.2	Protéines de stress et filaments intermédiaires.....	29
CHAPITRE VII	CORPS DU TRAVAIL.....	31
CHAPITRE VIII	CONCLUSION.....	60
BIBLIOGRAPHIE.....		70

LISTE DES TABLEAUX

- 1.1 Drogues utilisées pour l'induction des CMs chez la souris
- 2.1 La famille des protéines de filaments intermédiaires
- 2.2 Distribution des kératines dans les tissus
- 2.3 Maladies associées aux mutations des kératines
- 3.1 Distribution des kératines dans le foie
- 3.2 Modèles animaux
- 5.1 Modifications post-traductionnelles des kératines
- 6.1 Les familles de protéines de stress
- 8.1 Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunofluorescence et Western blot

LISTE DES FIGURES

- 1.1 Structure moléculaire de la griséofulvine
- 2.1 Structure commune des protéines de filaments intermédiaires
- 2.2 Modèle de polymérisation des filaments intermédiaires
- 5.1 Sites de phosphorylation connus sur les kératines 8 et 18
- 6.1 Mécanisme d'action de la chaperonne DnaK (E. Coli)

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

<i>ACT</i>	Acétaminophène
<i>ATP</i>	Adénosine triphosphate
<i>cdc2</i>	Cyclin dependent protein kinase 2
<i>CMs</i>	Corps de Mallory
<i>C3H</i>	Patrimoine génétique spécifique à une lignée de souris
<i>C57/Bl6</i>	Patrimoine génétique spécifique à une lignée de souris
<i>DDC</i>	3,5-diéthoxycarboxy-1,4-dihydrocollidine
<i>EBS</i>	Épidermolyse bulleuse simple
<i>EGF</i>	Epidermal growth factor
<i>FIs</i>	Filaments intermédiaires
<i>FVB/n</i>	Patrimoine génétique spécifique à une lignée de souris
<i>GF</i>	Griséofulvine
<i>GTP</i>	Guanosine triphosphate
<i>hK8</i>	Kératine 8 humaine
<i>HSC70</i>	Protéine de stress exprimée constitutivement, membre de la famille dont le P.M. est autour de 70 kDa
<i>HSP70i</i>	Protéine de stress représentant la forme induite de HSC70
<i>JNK</i>	c-jun N-terminal kinase
<i>kDa</i>	Kilo Dalton
<i>K8</i>	Kératine 8
<i>K8/18</i>	Paire formée par l'assemblage des kératines 8 et 18
<i>K8 Ser79</i>	Sérine en position 79 sur la kératine 8
<i>K8 Ser33→Cys</i>	Kératine 8 mutée avec la sérine en position 33 remplacée par une cystéine
<i>MAP kinase</i>	Mitogen activated protein kinase
<i>MFs</i>	Microfilaments
<i>Mm 120-1</i>	Molecular marker 120-1
<i>MPM-2</i>	Mitotic phosphoproteins marker 2
<i>MTs</i>	Microtubules

<i>nm</i>	Nanomètre
<i>p/p</i>	Poids pour poids
<i>pKi</i>	Point isoélectrique
<i>P K8 Ser79</i>	Sérine en position 79 sur la kératine 8 phosphorylée
<i>Ser</i>	Sérine
<i>SMI 31</i>	Sternberg Monoclonals Inc. 31 antibody
<i>Thr</i>	Thréonine
<i>Tyr</i>	Tyrosine

CHAPITRE I

L'HÉPATITE

1.1 L'HÉPATITE CHEZ L'HOMME

Le foie est une glande annexe à l'appareil digestif. Ses principales fonctions sont : la synthèse de nombreuses substances physiologiques comme les vitamines, les facteurs de coagulation, le stockage de sucres (glycogène) et d'acides gras (triglycérides), la transformation de molécules chimiques et toxiques comme les médicaments.

Une des affections communes du foie est l'hépatite. L'hépatite est une inflammation aiguë du foie qui peut avoir plusieurs origines. L'étiologie de la pathologie peut être : 1) une infection virale (virus A, B, C, D et E, virus d'Epstein Barr) ou bactérienne (tuberculose, leptospirose), 2) un médicament (antibiotique comme les tétracyclines, le paracétamol, l'aspirine) ou une substance toxique comme l'éthanol (hépatite de type alcoolique).

Le diagnostic de la maladie est parfois difficile parce que les signes sont inconstants et d'intensité variable. De plus, certaines hépatites présentent peu ou pas de symptômes (hépatite de type A). Les symptômes communs aux différents types d'hépatite sont : l'ictère, le foie de volume augmenté (hépatomégalie) sensible au toucher, les selles claires, les urines foncées. Le diagnostic de l'hépatite est généralement confirmé au moyen d'examens biochimiques tels que la mesure du taux de bilirubine conjuguée, de phosphatases alcalines, de transaminases. L'hépatite est dite aiguë lorsqu'elle évolue depuis plus de trois mois et chronique depuis plus de 6 mois. L'hépatite chronique peut représenter un danger à long terme si elle n'est pas soignée. En effet, elle peut entraîner l'apparition d'une insuffisance hépatique et d'une hypertension portale qui sont les manifestations concrètes d'une cirrhose hépatique. La

cirrhose hépatique est généralement précédée d'une stéatohépatite (foie gras), mais elle peut survenir de manière fulgurante ou se développer à partir d'une hépatite modérée.

Au cours du développement de la cirrhose, il y a régénération pathologique des cellules du foie accompagnée de la production anarchique de tissu fibreux de type collagène. Cela entraîne la destruction parfois massive des cellules hépatiques et la formation de nodules de régénération qui sont des îlots de cellules viables séparées par du tissu cicatriciel. Le bouleversement de l'architecture hépatique et la mauvaise vascularisation de ces nodules causent des lésions irréversibles et une altération progressive des fonctions propres au foie.

Hépatite alcoolique humaine

En particulier, l'intoxication chronique à l'éthanol peut provoquer le développement d'une stéatohépatite caractérisée par la formation d'agrégats de protéines de FIs : les CMs. Les CMs peuvent également être observés dans d'autres pathologies conduisant au développement d'une hépatite chronique comme la cirrhose de l'enfance indienne, la maladie de Wilson, les hépatocarcinomes, l'intoxication avec des drogues comme l'amiodarone, le maléate de perhexiline[12, 14, 15].

1.2 MODÈLES ANIMAUX DE L'HÉPATITE ALCOOLIQUE HUMAINE

Il existe différents modèles animaux pour étudier les mécanismes cellulaires associés au développement de l'hépatite alcoolique et à la formation des CMs [12](tableau 1). Dans ces modèles animaux, l'exposition de souris à un stress de type toxique comme la griséofulvine, le DDC ou la colchicine induit le développement d'une hépatite accompagnée de la formation de CMs à long terme. Les agrégats de protéines de FIs formés sont biochimiquement et morphologiquement semblables à ceux qu'on observe au niveau de l'hépatite alcoolique chez l'humain[10, 15]. Il est également possible de provoquer le développement de la maladie et l'induction de la formation des CMs en exposant les souris à des combinaisons de stress toxiques ou à un stress toxique

suivi d'un stress physique[12, 16]. Ces modèles constituent donc des outils importants pour l'étude *in vivo* des CMs.

TABLEAU 1.1
Drogues expérimentales utilisées pour l'induction des CMs chez la souris¹

Droque expérimentale	Durée d'exposition
Griséofulvine	Mois
Griséofulvine avec maléate de perhexiline	Semaines
3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine	Mois
Colchicine	Mois
Dieldrine	Années

¹Tiré de: Jensen K. and Gluud C., "The Mallory Body : Morphological, Clinical and Experimental Studies (Part 1 of a Literature Survey)" *Hepatology* 20(5) :1061-77 1994

Le modèle animal utilisé dans notre projet de recherche est celui des souris intoxiquées à la griséofulvine (GF) (figure 1).

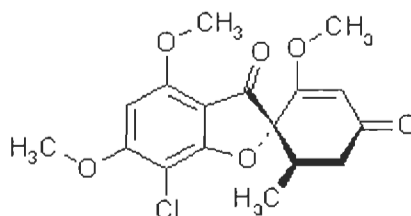


FIGURE 1.1 : Structure moléculaire de la griséofulvine.

Tiré de : <http://arachosia.univ-lille2.fr/labos/parasito/Internat/medicam/>. Site Internet Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Université de Lille (France) 2003

La griséofulvine est une mycotoxine isolée de *Penicillium Griseofulvum*, possédant une action inhibitrice sur le fuseau mitotique (effet anti-microtubules)[17-19]. Chez l'homme, elle est utilisée comme antibiotique fongistatique dans les traitements contre les dermatophytes tels que *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Tricophyton*[18]. Administrée à forte dose (2,5% p/p) chez la souris, cette drogue entraîne le développement d'une hépatite caractérisée par des dommages cellulaires comme la nécrose, l'inflammation, l'accumulation hépatique de porphyrines et la formation de CMs au bout de quatre à cinq mois environ[10]. L'avantage d'un tel modèle est donc de

reproduire le développement chez la souris d'une hépatite similaire à celle observée lors de l'hépatite alcoolique humaine et de permettre l'étude des modifications cellulaires au niveau des hépatocytes sur une longue période de temps. Cependant, le métabolisme hépatique de la griséofulvine n'est pas encore bien connu.

CHAPITRE II

LE CYTOSQUELETTE : LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

Nous venons de présenter notre modèle animal d'induction des CMs : les souris intoxiquées à la griséofulvine. Nous allons maintenant présenter la composante majeure des CMs : les filaments intermédiaires.

2.1 FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

La superfamille des FIs est composée de cinq groupes de protéines classifiés selon l'homologie de séquence[20, 21]. Les protéines de FIs des types I à IV (incluant le type VI récemment reclassé) sont retrouvées dans le cytoplasme alors que celles du type V sont présentes dans le noyau (tableau 1).

TABLEAU 2.1
La famille des protéines de filaments intermédiaires¹

Localisation	Type	Protéines	Distribution
Cytoplasmique	I	Kératines (K9-K20)	Épithélium
	II	Kératines (K1-K8)	Épithélium
	III	Vimentine	Mésenchyme
		GFAP	Cellules gliales/astrocytes
		Desmine	Cellules myogéniques
		Périphérine	Neurones périphériques
	IV	Neurofilaments (H, M, L)	Neurones
		α -internexine	Neurones du SNC
	VI	Nestine	Cellules souches neuro-épithéliales
	Nucléaire	V	Lamines

¹Tiré de: Ku, N.O., Liao, J., Chou, C.-F., and Omary, M.B., "Implications of intermediate filament protein phosphorylation" Cancer Metastasis Rev 15 :429-44 1996

Les kératines constituent les protéines de FIs de types I et II. Elles sont exprimées dans les cellules des tissus épithéliaux glandulaires ou sécrétoires (tableau 2), l'épithélium stratifié de la peau et l'épithélium corné des poils et des ongles[21, 22]. Les kératines de type I sont acides ($pK_i = 4-6$) et comprennent onze protéines épithéliales (K9-K20) et quatre protéines de l'épithélium corné (Ha1-Ha4). Les kératines de type II sont basiques ($pK_i = 6-8$) et incluent huit protéines épithéliales (K1-K8) et quatre protéines de l'épithélium corné (Hb1-Hb4). Toutes les cellules épithéliales expriment au moins une kératine de type I et une kératine de type II qui s'associent dans un ratio 1/1, de façon non-covalente, pour former le réseau de FIs[21, 23].

TABLEAU 2.2
Distribution des kératines dans les tissus¹

A	Kératines	
	Type I (acide)	Kératines 9-20 (K9-K20)
	Type II (relativement basique)	Kératines 1-8 (K1-K8)
B	Distribution dans les tissus	
	Épithélium simple	K8, K18, K19, K20
	Kératinocytes/couche basale	K5, K14
	Kératinocytes/couche suprabasale	K1, K10
	Épithélium de l'œsophage	K4, K13
	Épithélium de la cornée	K3, K12
	Épithélium cicatriciel	K6, K16, K17

¹Tiré de: Omary. M.B., Ku, N.O., Liao, J., and Price, D. (1998) "Keratins modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro" Subcell. Biochem. 31: 105-40

Le patron d'expression de ces combinaisons est fonction du tissu et du stade de différenciation cellulaire[22]. Les kératinocytes de l'épithélium stratifié de la peau produisent spécifiquement la paire K5/K14 au niveau de la couche basale et la paire K1/K10 au niveau de la couche suprabasale qui est constituée de cellules plus matures en termes de différenciation, alors que la paire K8/18 (avec des niveaux variables de K7, K19 et K20) est produite par la plupart des épithéliums glandulaires simples que l'on retrouve dans le pancréas, l'œsophage ou le foie[21, 22, 24]. La vimentine dans les cellules mésenchymateuses, la GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) dans les astrocytes et les cellules gliales, la desmine dans les cellules musculaires ainsi que la périphérine dans les neurones du système nerveux périphérique représentent les protéines de FIs de

type III. Les protéines de FIs de type IV incluent les trois sous-unités protéiques des neurofilaments (NF-L, NF-M et NF-H) et l' α -internexine. Les lamines nucléaires (A et B) constituent le type V et sont ubiquitaires à toutes les cellules[21]. Enfin, la nestine, anciennement membre de type IV, compose les FIs de type VI retrouvés dans les cellules souches neuro-épithéliales[25].

Structure des FIs et mécanisme d'assemblage

Les différentes protéines de FIs possèdent une structure commune qui consiste en une portion centrale en hélice α (d'environ 310 à 350 acides aminés) flanquée d'une tête amino-terminale et d'une queue carboxy-terminale non-hélicoïdales[24, 26, 27]. Les portions amino- et carboxy-terminales sont hétérogènes et de taille variable [20, 28] (figure 1). Le domaine central est divisé en sous-domaines α -hélicoïdaux (ex : 1A ou 1B) séparés par des séquences non hélicoïdales (ex : L1 ou L12)[29].

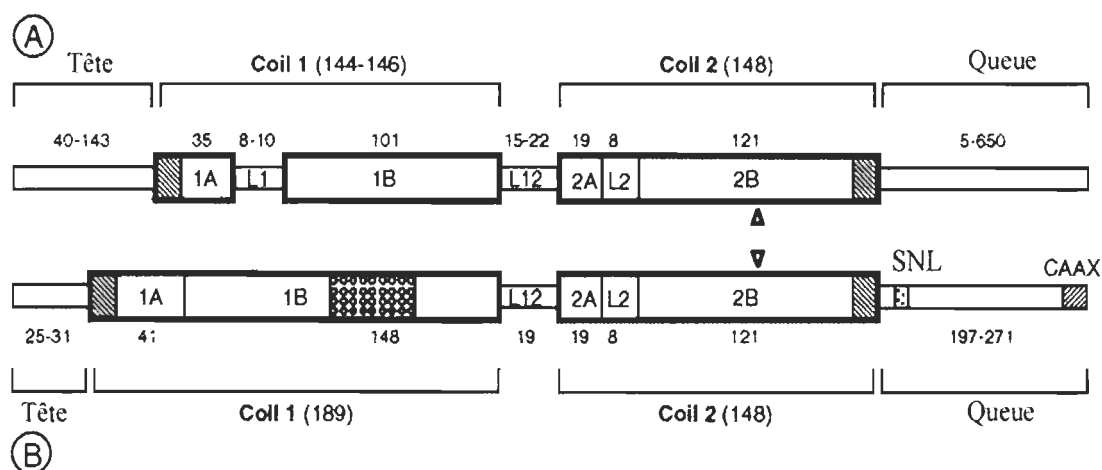


FIGURE 2.1 : Représentation schématique de la structure commune des IFs cytoplasmiques (A) et nucléaires (B). SNL : signal de localisation nucléaire et CAAX, séquences propres aux IFs nucléaires.

Tiré de : Herrmann, H., and Aepli, U. (1998) "Structure, Assembly, and Dynamics of Intermediate Filaments" Subcell. Biochem. 31: 319-62

Le mécanisme de polymérisation des FIs est encore mal connu. Les modèles actuels de polymérisation des FIs sont basés sur l'interaction des portions centrales α -hélicoïdales des FIs[30]. Un dimère est formé par l'assemblage « en spirale » de deux

protomères α -hélicoïdaux de FIs. Deux dimères s'associent, de façon antiparallèle, pour former un tétramère stable. Les tétramères s'associent alors bout à bout puis latéralement avec un léger décalage pour former des FIs stables et matures [24, 27](figure 2). L'unité de base (dimère) des FIs est soit homopolymérique (desmine, vimentine), soit hétéropolymérique (assemblage d'une kératine de type I et d'une kératine de type II)[21, 24].

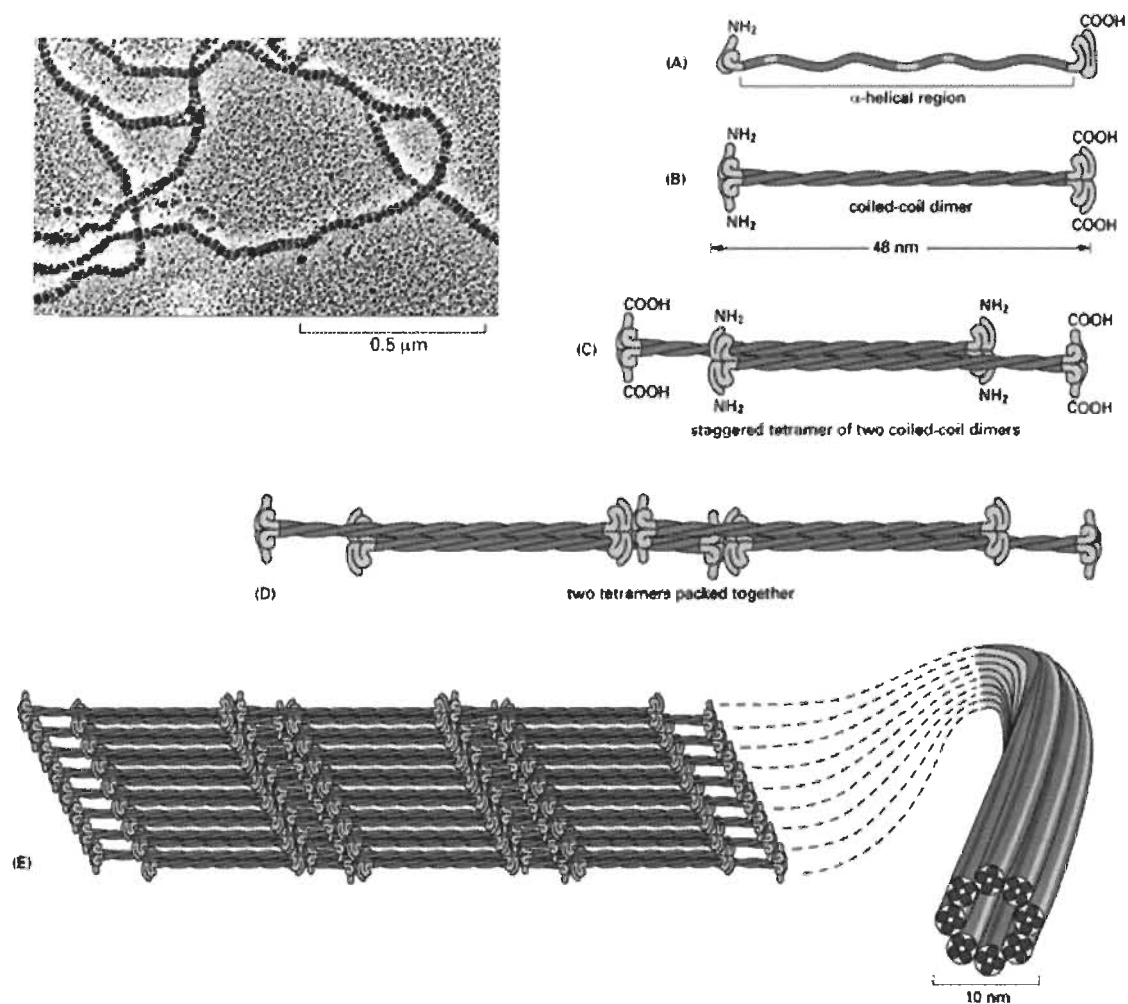


FIGURE 2.2 : Modèle actuel de polymérisation des FIs.

Tiré de :Alberts, B. et al (2002) "Molecular Biology of the cell", 4e éd., Garland Science, N.Y., U.S.A., pp924

Au sein des portions α -hélicoïdales (ex :1A, voir figure 1), on peut noter la présence de séquences répétées de résidus hydrophobes: les premier et quatrième acides

aminés de chaque série de 7 résidus sont apolaires, créant ainsi un environnement hydrophobe propice à l'assemblage des chaînes protéiques des FIs[21, 24]. L'existence de séquences très conservées localisées au niveau des bouts de la portion centrale α -hélicoïdale semble être importante dans l'assemblage des FIs[31, 32]. En effet, des mutations au niveau de ces régions perturbent l'organisation et l'assemblage normal des FIs. Les portions non α -hélicoïdales (tête et queue) semblent également impliquées dans l'assemblage des FIs. Par exemple, les queues des neurofilaments NF-H et NF-M déployées à l'extérieur du corps des filaments permettent leur association avec les autres neurofilaments et les microtubules au niveau de l'axoplasme[21, 33]. La polymérisation de la vimentine peut aussi être bloquée lorsqu'on introduit une mutation au niveau d'une séquence-cible de la tête, spécifique aux FIs de type III [21].

En plus de leur implication dans la polymérisation des FIs, la tête et la queue participent vraisemblablement à la régulation de la fonction des FIs. En effet, la tête et la queue des FIs sont des régions sujettes à des modifications post-traductionnelles dynamiques telles que la phosphorylation, la glycosylation, la transglutamination, l'acétylation. Ces dernières peuvent moduler la structure des FIs, influencer leur organisation ainsi que leur interaction avec d'autres constituants cellulaires et donc jouent probablement un rôle important dans la régulation de la fonction des FIs[23, 25, 34, 35].

2.2 FONCTIONS CONNUES DES FIs

Au niveau fonctionnel, aucune expérience *in vitro* n'a été en mesure de clairement définir un rôle pour les FIs[23]. Des études *in vivo* menées sur des souris transgéniques ont montré que l'expression d'un mutant de la kératine 14 qui perturbe la polymérisation des FIs, entraînait le développement d'une pathologie dont le phénotype ressemblait à l'épidermolyse bulleuse simple (EBS) chez l'homme[36]. L'épidermolyse bulleuse simple est caractérisée par la formation de cloches douloureuses au niveau de la muqueuse superficielle de la peau et par un décollement de l'épiderme dû à la

fragilisation des tissus. L'identification subséquente de mutations sur K14 chez des patients atteints d'épidermolyse bulleuse simple a permis d'établir un lien entre des pathologies humaines et des altérations des protéines de FIs dans les cellules[23, 37-41]. Par la suite, de nombreuses mutations sur les kératines, associées à des maladies de la peau chez l'homme, ont été répertoriées (tableau 3). Les résultats accumulés ont permis de démontrer que les protéines de FIs étaient impliquées de façon importante dans les processus de maintien de l'intégrité cellulaire, particulièrement lors de stress mécanique au niveau de l'épiderme [42].

TABLEAU 2.3
Maladies associées à des mutations de gènes de kératines¹

Gène de kératine	Maladie	Distribution
K5, K14	Épidermolyse bulleuse simple	Épiderme (couche basale)
K1, K10	Hyperkératose épidermolytique	Épiderme (couche suprabasale profonde)
K2e	Ichtyose bulleuse de Siemens	Épiderme (couche suprabasale superficielle)
K9	Kératoderme palmo-plantaire, variante épidermolytique	Épiderme de la paume/ plante du pied uniquement (couches suprabasales)
K16, K1	Kératoderme palmo-plantaire, variante non-épidermolytique	Épiderme de la paume/ plante du pied uniquement (couches suprabasales)
K6a, K16, K17	Pachyonychia congénitale	Ongles et autres épithelia stratifiés
K17	Stéatocystome multiplex	Peau
K4, K13	Nævus spongieux oral	Muqueuse buccale
K3, K12	Dystrophie cornéenne de Meesman	Cornée
K18	Prédisposition à développer des maladies chroniques du foie	Épithélium simple

¹Tiré de: McGowan, K., and Coulombe, P.A. (1998) "The wound repair-associated keratins 6,16, and 17: insights into role of intermediate filaments in specifying keratinocyte cytoarchitecture" Subcell. Biochem. 31: 173-204

CHAPITRE III

LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES DANS LES HÉPATOCYTES

Notre projet de recherche se concentrant essentiellement sur les mécanismes de défense cellulaires impliquant les FIs au cours du développement de l'hépatite alcoolique, nous allons présenter et décrire les filaments intermédiaires dans le foie au niveau structural et fonctionnel dans l'état actuel des connaissances.

3.1 LES KÉRATINES 8 ET 18

Les kératines 8 et 18 semblent se distinguer à plusieurs niveaux des autres kératines de type I et II. Ce sont les premières kératines à apparaître lors de l'embryogenèse chez les mammifères[43]. De plus, elles se révèlent être un marqueur cellulaire intéressant dans les carcinomes car elles continuent à être exprimées au cours du développement de la tumeur, contrairement aux autres types de kératines. Dans les cellules épithéliales de type glandulaire simple (tractus gastro-intestinal, œsophage, pancréas), K8 et K18 forment le réseau de FIs avec de faibles proportions de K7, K19 et K20[6, 7, 35]. Dans les hépatocytes adultes et les cellules acineuses pancréatiques, le réseau de FIs est constitué uniquement de K8 et de K18 (tableau 4). On peut donc penser que la paire K8/18 est implicitement responsable de la stabilité (résistance mécanique) des hépatocytes[6, 7].

Dans le but de mieux comprendre le rôle des kératines dans les hépatocytes, des lignées de souris transgéniques déficientes en kératine ou exprimant une kératine mutée ont été générées (tableau 5). L'importance fonctionnelle des kératines 8 et 18 a été clairement démontrée en utilisant des souris dont l'expression de l'une des kératines 8 ou 18 a été bloquée. Par exemple, le phénotype des souris déficientes en K8 (lignée C57/Bl6) est caractérisé par une hémorragie hépatique massive et une mortalité importante, illustrant bien la nécessité de la présence de la kératine 8 au niveau des

hépatocytes[44]. Cependant, suite au croisement de souris viables de lignée C57/Bl6 avec celles de lignée FVB/n, le phénotype est modifié[45]. On note un taux de mortalité

TABLEAU 3.1
Distribution des kératines dans les cellules hépatiques¹

Type de cellule	Protéine de filaments intermédiaires
Hépatocyte (adulte)	K8/18
Hépatoblaste (stade embryonnaire)	K8/18/19
Cellule souche (ovale)	K7/8/18/19
Cholangiocyte	K7/8/18/19
Cellule de Kupffer	vimentine
Cellule radiée	GFAP, vimentine, desmine, nestine
Cellule endothéliale/« liver specific natural killer »	vimentine

¹Tiré de: Omary, M.B., Ku, N.O., and Toivola, D.M. (2002) “*Keratins: guardians of the liver*” Hepatology 35(2): 251-7

TABLEAU 3.2
Lignées de souris transgéniques pour les kératines K8/18¹

Gène	Phénotype associé
Knock-out	
déficientes en K8 (lignée C57/Bl6)	Mortalité durant l'embryogenèse, hémorragie massive du foie
déficientes en K8 (lignée FVB/n)	Hyperplasie colorectale, colite, susceptibilité aux lésions hépatiques
déficientes en K18	Corps de Mallory dans les hépatocytes
Surexpression	
K8 type sauvage	Normal ou maladie du pancréas exocrine
K18 type sauvage	Normal
K18 Arg89→Cys	Hépatite chronique, fragilité cellulaire, susceptibilité aux lésions hépatiques
hK18 Ser52→Ala ²	Susceptibilité aux lésions hépatiques en situation de stress
K18 Ser33→Ala	Réorganisation des filaments intermédiaires dans le foie et le pancréas

¹Tiré de: Ku, N.O., Zhou, X., Toivola, D.M., and Omary, M.B. (1999) “*The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease*” Am. J. Physiol. 277(6 Pt1): G1108-37

²hK18, K18 humaine.

d'environ 50%. Par contre, on observe la stérilité chez les femelles et une susceptibilité des individus au stress de type mécanique[45, 46].

Les résultats de ces expériences indiquent que le patrimoine génétique joue un rôle important lorsqu'on évoque la fonction des kératines[45]. De façon générale, ces observations montrent que l'absence d'un réseau viable de FIs peut affecter l'intégrité de l'hépatocyte et par conséquent, l'homéostasie hépatique. Il semble aussi que l'importance fonctionnelle des FIs dans les hépatocytes soit différente dépendamment du type de kératine considéré (I ou II). En effet, l'absence de K8 ou K18 n'affecte pas les hépatocytes de la même façon, comme on peut le constater lorsqu'on compare le développement embryonnaire des souris FVB/n déficientes en K18 par rapport aux souris déficientes en K8. Dans le cas des souris FVB/n déficientes en K18, les individus sont normaux en termes de viabilité et fertilité et développent une hépatite, par contre, beaucoup moins grave comparativement aux souris FVB/n K8 -/-[47]. Ces données semblent indiquer que K8 soit plus importante que son homologue K18 et constitue un élément important pour les hépatocytes au cours de l'embryogenèse. Les disparités phénotypiques observées entre les souris K8 -/- et K18 -/-, de même origine génétique FVB/n, indiquent que les kératines 8 et 18 jouent des rôles différents mais essentiels au sein des hépatocytes[7].

Il est éventuellement nécessaire de différencier les fonctions accomplies par la protéine seule (K8 ou K18) et son rôle au sein du filament intermédiaire lorsqu'elle est associée à la kératine partenaire. K8 et K18 ont probablement des fonctions communes. Par exemple lorsqu'on expose au TNF (*tumor necrosis factor*) les lignées de souris FVB/n déficientes en kératines 8 ou 18 préalablement traitées à la concanavaline A (drogue hépatotoxique), elles présentent une plus grande susceptibilité d'induction de l'apoptose comparativement aux souris de type sauvage[48]. Ces résultats suggèrent que les kératines 8 et 18 jouent un rôle important dans les mécanismes anti-apoptotiques au niveau du foie [43]. K8 et K18 semblent également jouer un rôle essentiel dans la protection en situation de stress toxique. Un bon exemple est l'étude de la lignée de souris exprimant la kératine 18 mutée au niveau de l'arginine 89 (remplacée par une cystéine) [49]; l'arginine 89 est un motif conservé des kératines et fréquemment muté chez les personnes souffrant d'EBS. Les résultats obtenus montrent que les souris

exprimant K18 Arg89→Cys sont plus sensibles que les souris surexprimant K18 de type sauvage aux lésions induites par des drogues hépatotoxiques comme la GF ou l'ACT[50]. L'expression *in vitro* de la kératine 18 mutante Arg89→Cys dans les cellules entraîne des perturbations au niveau de l'assemblage normal des FIs et de leur réorganisation en situation de stress[49]. Ces résultats indiquent que la présence d'une kératine mutée peut perturber la polymérisation normale des FIs et avoir des conséquences néfastes sur l'organisation des FIs et la réponse des cellules au stress[50, 51]. Parallèlement, des mutations de K8 et K18 ont été identifiées chez des patients atteints de cirrhose cryptogénétique c'est-à-dire dont l'étiologie est inconnue[52, 53]. L'expression de kératines portant ces mutations, dans des cellules en culture, perturbe l'assemblage normal des FIs, altère les caractéristiques physiques des kératines comme leur flexibilité, leur stabilité et affecte un processus cellulaire important comme la réorganisation des kératines en situation de stress[52]. Ces observations, sans toutefois attribuer une fonction précise aux kératines 8 et 18, montrent que leur présence est indispensable à la protection des hépatocytes, particulièrement en situation de stress de type non-mécanique comme l'exposition aux drogues[7, 54].

3.2 IMPORTANCE FONCTIONNELLE DES KÉRATINES 8 ET 18

L'ensemble des expériences réalisées sur les lignées de souris transgéniques et en culture cellulaire ont permis d'établir l'importance fonctionnelle des kératines 8 et 18 au niveau des hépatocytes. Les observations suggèrent que l'absence d'une kératine native ou la présence d'une kératine altérée (protéine mutée) fragilise les hépatocytes et peut prédisposer le sujet (homme ou souris) à développer une hépatite[7, 52-54]. Il en résulte que les kératines 8 et 18, en plus de leur rôle de support mécanique, possèderaient une fonction générale de protection des hépatocytes en situation de stress non-mécanique (drogues hépatotoxiques, stress oxydatif, chaleur) [6, 7, 35]. Elles seraient également impliquées dans les mécanismes anti-apoptotiques au niveau du foie[43]. Les

mécanismes moléculaires par lesquels les kératines assurent ces différentes fonctions protectrices restent encore à déterminer.

CHAPITRE IV

FILAMENTS INTERMÉDIAIRES ET CORPS DE MALLORY

L'hépatite alcoolique représente le cadre du projet de recherche et son développement a été reproduit dans notre modèle animal par intoxication à la griséofulvine de lignées de souris FVB/n et C3H. Nous allons maintenant discuter des agrégats de FIs (les CMs) dont la présence est reliée au développement de la maladie.

4.1 COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES CMs

Les CMs ont été décrits pour la première fois par F.B. Mallory[9]. Ce sont des inclusions hyalines intracytoplasmiques observées au cours de pathologies humaines qui peuvent conduire au développement d'une cirrhose hépatique comme l'hépatite alcoolique ou des désordres métaboliques comme la maladie de Wilson. La présence des CMs est reliée à des altérations du réseau de FIs dans les hépatocytes[15, 55]. Les CMs sont des structures très insolubles, résistantes aux protéases, de taille et de position variables dans la cellule.

Leur composition est assez complexe[12, 15]. On retrouve majoritairement des protéines de FIs, les kératines 8 et 18 ainsi que des fragments protéolytiques de K8 et K18. On note aussi la présence de ponts transglutaminiques, d'épitopes phosphorylés, d'ubiquitine et de protéines de stress.

La signification biologique de la présence des corps de Mallory dans les hépatocytes n'est pas connue. De nombreuses études ont porté sur l'analyse des différentes composantes des CMs afin d'en déterminer l'origine et d'identifier les mécanismes cellulaires menant à leur formation. Les études ont porté d'une part sur les composantes kératines des CMs et d'autre part sur les composantes autres que les kératines. L'implication des kératines dans les processus de formation des CMs a été étudiée sous divers aspects : la présence ou l'absence de kératines (K8 ou K18), les changements

dans leur structure des protéines, leur organisation et leurs modifications post-traductionnelles. Les premières expériences suggéraient que les CMs correspondaient à une forme d'expression pathologique des FIs dans les hépatocytes, puisque certains anticorps spécifiques pour les kératines 8 et 18, ne reconnaissaient pas les CMs[56]. D'autres travaux ont montré que la structure et l'organisation des kératines étaient modifiées à l'intérieur des CMs[57]. Ces changements conformationnels pourraient être la conséquence de la présence de ponts transglutaminiques et d'ubiquitine au sein des CMs et expliquer l'enchevêtrement des kératines dans ces structures[58]. Ces différentes modifications des kératines pourraient être à l'origine de l'absence de marquage pour K8/K18 au niveau des CMs et du phénomène d'agrégation[56, 58].

Parmi les composantes des CMs autres que les kératines 8 et 18, on retrouve de l'ubiquitine et des protéines de stress, deux classes de protéines impliquées dans la protéolyse cellulaire[15]. L'ubiquitine est une protéine qui se lie, sous forme multimérique et de façon covalente, aux protéines à diriger vers des compartiments cellulaires spécifiques ou destinées à la dégradation par les protéasomes[59, 60]. Dans le cas des kératines, une étude *in vitro* a montré que l'ubiquitine s'associe avec K8 et K18 et régule leurs mécanismes de dégradation[61]. Les protéines de stress comme HSP70 ont pour rôle d'assurer le repliement adéquat des protéines nouvellement synthétisées ou dénaturées[62, 63]. Cependant lorsque les molécules sont altérées de manière irréversible, HSP70 a pour rôle de les diriger vers les systèmes de dégradation cellulaire comme les protéasomes[62]. Dans les cellules normales, l'ubiquitine et les protéines de stress sont exprimées de manière constitutive et assurent, en collaboration avec les protéasomes, l'essentiel de la dégradation des protéines anormales. En situation de stress, l'expression de l'ubiquitine et des protéines de stress est augmentée pour faire face à la présence augmentée de protéines dénaturées.

Les molécules phosphorylées Mm 120-1, SMI 31 et MPM-2 sont aussi présentes dans les CMs[15]. L'antigène Mm 120-1 est une protéine non caractérisée qui est exclusive aux CMs *in vivo* et dont l'expression peut être induite dans des cellules en culture soumises à différents types de stress (choc thermique, arséniate de sodium)[15]. SMI 31 est un épitope phosphorylé retrouvé au niveau des neurofilaments et de la protéine tau dans les amas neurofibrillaires de la maladie d'Alzheimer. Dans les CMs, il

est présent sur la protéine p62 (65 kDa) qui est connue pour interagir avec l'ubiquitine[15, 64]. La présence de SMI 31 dans les CMs est une caractéristique intéressante parce qu'elle démontre l'action de proline-kinases dans la formation des agrégats de FIs, SMI 31 étant un substrat connu de ce type d'enzymes[65]. p62 possède également l'épitope MPM-2 qui est phosphorylé par certaines kinases mitotiques actives lors de la phase M du cycle cellulaire comme p34 cdc2- et la MAP kinase [15].

4.2 MÉCANISMES DE FORMATION DES CMs

De nouvelles données sur la dynamique des FIs et sur les mécanismes de formation des CMs ont été obtenues suite à l'utilisation de modèles animaux tels que des lignées de souris déficientes en kératines ou intoxiquées avec des drogues comme la GF ou le DDC. Dans la lignée FVB/n, les souris déficientes en K18 (K18^{-/-}) développent spontanément avec l'âge, des agrégats de protéines de FIs contenant seulement K8[47]. Les souris FVB/n pour la déficience en K8 homozygotes (K8^{-/-}) et hétérozygotes (K8^{+/-}) pour leur part développent une hépatite sans formation de CMs et ceci même après intoxication au DDC[66]. Ces résultats démontrent que les CMs semblent être une conséquence plutôt qu'une cause de la maladie. De plus, il ressort que le ratio de K8 par rapport à K18 serait important pour initier la formation des agrégats de protéines de FIs. À partir de l'observation des phénotypes des lignées FVB/n, on peut déduire que ce n'est pas uniquement la présence mais aussi l'excès relatif de K8 par rapport à sa partenaire K18 qui détermine si les CMs vont être formés[15, 47, 66]. À l'inverse, l'excès relatif de K18 par rapport à K8 peut aussi provoquer la formation de CMs. Récemment, Nakamichi et collaborateurs ont montré *in vitro* que la surexpression de K18 dans des cellules intoxiquées à la GF induit la formation d'agrégats protéiques semblables aux CMs[67]. Cette expérience est intéressante dans le sens où elle appuie l'hypothèse selon laquelle un débalancement important entre les niveaux d'expression de K8 et de K18 constituerait un facteur favorisant l'agrégation et la formation des CMs. De plus, elle permet aussi de remettre en question le rôle présumé essentiel de K8 dans les processus

de formation de CMs. Il semble que, sous certaines conditions, le niveau de K18 soit également un paramètre déterminant pour l'induction des CMs. Cependant, ces données n'expliquent pas le phénotype inattendu des souris FVB/n déficientes en K8 homozygotes (K8 -/-). Les mécanismes précis de formation des CMs restent donc à élucider.

De plus, la présence augmentée de molécules comme l'ubiquitine et les protéines de stress dans les CMs constitue un indicateur potentiel de cytotoxicité et du dysfonctionnement des systèmes de dégradation cellulaire comme les protéasomes. Plusieurs faits essentiels viennent appuyer l'idée d'un problème de fonctionnement des protéasomes. Dans les hépatocytes, les différentes drogues utilisées pour les modèles animaux d'induction des CMs (GF, DDC, éthanol) génèrent un stress oxydatif [15] qui peut bloquer l'activité des protéasomes[68]. Dans les CMs de certains patients atteints d'hépatite, on peut observer la présence d'un mutant de l'ubiquitine appelée UBB(+1) qui semble altérer les capacités protéolytiques des protéasomes et favoriser l'agrégation des polypeptides destinés à la dégradation[69, 70]. Ces résultats semblent soutenir l'hypothèse suivante sur l'origine du phénomène d'agrégation : des conditions causant l'inactivation de la voie du système ubiquitine-protéasome entraînent le blocage de la protéolyse cellulaire et par conséquent, l'accumulation de protéines ubiquitinées et de protéines de stress. Les amas de protéines ubiquitinées et de protéines de stress tendent à former des agrégats protéiques à long terme. La présence des différents épitopes phosphorylés tels que Mm120-1, SMI 31 et MPM-2 est également importante pour la compréhension du processus d'agrégation, parce qu'elle implique l'action des kinases et, par conséquent, de phosphatases (spécifiques à ces sites) qui pourraient jouer un rôle régulateur dans la formation des CMs. Les kératines 8 et 18 sont aussi sujettes à la phosphorylation au sein des CMs (ce sujet sera traité ultérieurement).

CHAPITRE V

LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES EN SITUATION DE STRESS

Nous venons d'exposer en détail les CMs à partir de données scientifiques actuelles. Nous avons discuté de leur composition biochimique et de leur origine potentielle. Nous avons aussi évoqué la possibilité que des modifications post-traductionnelles des protéines qui les composent telles que la phosphorylation puissent être impliquées dans les mécanismes de régulation cellulaires au cours de l'évolution de l'hépatite. Nous allons maintenant décrire les modifications post-traductionnelles des FIs dans les hépatocytes, principalement la phosphorylation de K8/18.

5.1 PHOSPHORYLATION DE K8/18

Dans plusieurs systèmes biologiques, la phosphorylation joue un rôle régulateur important au niveau de diverses protéines impliquées dans des mécanismes cellulaires essentiels. Par exemple, les réactions de phosphorylation/déphosphorylation activent ou inactivent des enzymes mitotiques jouant un rôle essentiel au cours du cycle cellulaire[71]. Ces observations illustrent bien l'importance biologique et physiologique d'un tel processus au niveau de la cellule. Les protéines de FIs sont également affectées par cette modification post-traductionnelle[25, 35, 72].

Les kératines sont des protéines très dynamiques et se retrouvent réorganisées en réponse à différents stimuli[6, 24]. Des modifications post-traductionnelles dynamiques telles que la phosphorylation, la glycosylation, la transglutamination ou l'acétylation peuvent affecter les kératines au niveau de leur expression, localisation, organisation dans une situation physiologique ou en conditions de stress [35](tableau 6). Parmi tous ces processus, la phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus étudiée[25]. La phosphorylation est observée de façon constitutive (ex : mitose) et peut

être modifiée dans des conditions de stress (ex : choc thermique, toxicité induite par des drogues)[6, 35]. On note que la sérine (Ser) est le résidu majoritairement phosphorylé au niveau des kératines. On peut retrouver cependant de la phosphorylation au niveau d'autres résidus comme la thréonine (Thr) et la tyrosine (Tyr)[6, 35, 73]. Il existe un nombre important de sérines potentiellement phosphorylables au sein de la paire K8/18 : 61 sur K8 et 37 sur K18[35]. La présence d'autant de sites potentiels de phosphorylation rend complexe la compréhension de la phosphorylation des FIs (en termes fonctionnels) mais contribue aussi à montrer l'importance qu'une telle modification peut avoir sur le fonctionnement de ces protéines.

TABLEAU 5.1
Modifications post-traductionnelles des kératines¹

Modification	Kératine	Nature ou site de la modification
Phosphorylation	K1, K6, K8, K18	Sérine/thréonine
Glycosylation	K8, K13, K18, K19	O-GlcNAc-sérine
Acétylation	Kératines de l'épiderme	N-terminal-sérine
Lipides	K8, K14, K18, K19	Ajout de résidus palmitate ou rétinoylation
Protéolyse	K18, K19	Catalyse <i>via</i> caspase
Transglutamination	K8/18, K1/10	Cross-linking

¹Tiré de : Omary. M.B., Ku, N.O., Liao, J., and Price, D. (1998) "*Keratins modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro*" Subcell. Biochem. 31: 105-4

Au niveau des hépatocytes chez l'humain, cinq sites de phosphorylation (Ser) ont été caractérisés: trois sur K8 (Ser73 ou Ser79 chez la souris, Ser431 ou Ser436 chez la souris et Ser23) et deux sur K18 (Ser33 et Ser52) (figure 3). Un fait intéressant est que la tête et la queue des protéines de FIs renferment souvent la majorité sinon la totalité des sites de phosphorylation observés *in vivo* et *in vitro*. Les régions de la tête et de la queue sont les portions des protéines de FIs qui sont les plus variables et responsables de l'hétérogénéité structurale des FIs. Au niveau de la protéine K18, Ser33 et Ser52 sont localisés dans le domaine de la tête. Dans le cas de la protéine K8, Ser79 et Ser23 se retrouvent dans le domaine de la tête et Ser436 dans celui de la queue. Certains sites de phosphorylation sont communs aux kératines de types I et/ou II. Par exemple, Ser23 dont l'équivalent est Ser59 sur K6e au niveau de la peau est un site de phosphorylation

localisé dans une région conservée à travers les kératines de type II[35]. Dans le cas de Ser23, s'il existe une fonction associée à la phosphorylation au niveau du site, celle-ci devrait être partagée par toutes les kératines de type II. La Ser436 est apparemment un site de phosphorylation spécifique à K8 parce qu'il est situé dans une région dont la séquence est propre à K8. Il est donc probable que l'ajout de phosphates sur des sites Ser436 confère des propriétés particulières à K8.

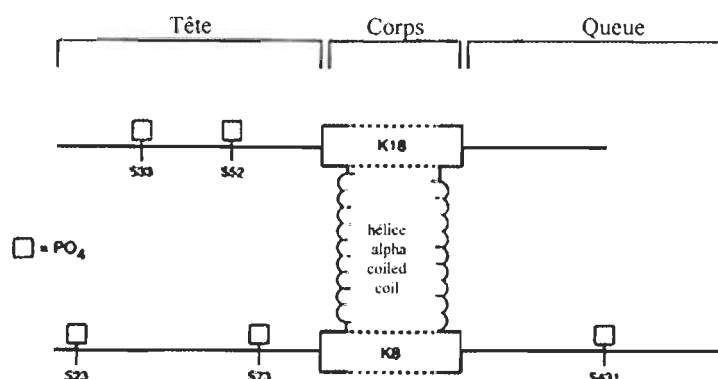


FIGURE 5.1 : Sites de phosphorylation connus de K8/18 ; S79 : sérine en position 79 phosphorylée.

Tiré de : Omary, M.B., Ku, N.O., Liao, J., and Price, D. (1998) "*Keratins modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro*" Subcell. Biochem. 31: 105-4

Au niveau fonctionnel, les premières évidences sur l'importance de la phosphorylation de K8/18 sont venues d'expériences réalisées sur des cellules en culture exprimant la kératine 18 humaine. K18 Ser52 (présent uniquement chez l'humain) est un site phosphorylé de façon constitutive mais dont le niveau de phosphorylation est fortement augmenté au cours de la mitose, provoquant la réorganisation des FIs à l'intérieur de la cellule[74]. Cependant lorsque la kératine 18 humaine portant la mutation Ser52→Ala (hK18 Ser52→Ala) est transfectée dans des cellules en culture, la capacité de ces dernières à déclencher la réorganisation des kératines est diminuée en situation de stress uniquement. *In vivo*, les hépatocytes des souris transgéniques exprimant hK18 Ser52→Ala sont plus sensibles au stress cellulaire induit par les drogues hépatotoxiques comme la GF ou la microcystine LR, comparativement aux souris exprimant la protéine de type sauvage[75]. Ces résultats impliquent que, d'une part, la phosphorylation de K18 sur Ser52 joue un rôle dans l'organisation des kératines

au cours de la mitose et d'autre part, qu'elle participe à la protection des cellules en situation de stress toxique induit par des drogues.

Une autre fonction de la phosphorylation des kératines a été mise en évidence avec l'étude de la phosphorylation de K18 Ser33 (présent chez l'humain et la souris). La phosphorylation de Ser33 sur K18 semble essentielle pour réguler l'association de K8/18 avec la famille de protéines 14-3-3 [76, 77]. En effet, la transfection de K18 Ser33→Ala/Asp dans des cellules en culture inhibe le rattachement de K8/18 avec les protéines 14-3-3. Les protéines 14-3-3 ($\alpha, \beta, \zeta, \tau, \epsilon, \delta, \sigma, \eta$) sont très conservées à travers les plantes et les mammifères et sont impliquées dans la régulation de plusieurs mécanismes de signalisation cellulaire impliquant des hydroxylases et la protéine kinase C [6, 78, 79]. Les protéines 14-3-3 sont caractérisées par le fait qu'elles ne se lient qu'à des protéines préalablement phosphorylées, ici K18 [79]. Les protéines 14-3-3 semblent agir comme facteur de solubilité de K8/18, déplaçant le « pool » de kératines de la fraction cytosquelettique vers la fraction cytoplasmique soluble. De ce fait, ces molécules s'associant à la K18 phosphorylée sur Ser33 jouerait, de façon directe, un rôle dans la distribution de K8/18 au niveau des différents compartiments cellulaires.

Au niveau de K8, la phosphorylation sur les sites Ser79 (présent chez la souris /Ser 73 chez l'humain) et Ser436 (présent chez la souris /Ser 431 chez l'humain) a été associée à divers processus tels que la mitose, l'apoptose, la réorganisation des FIs et la protection de la cellule en situation de stress *in vivo* et *in vitro* [35]. Le niveau de phosphorylation de K8 Ser79 est augmenté lorsque les hépatocytes de souris sont exposés à des drogues hépatotoxiques comme la GF ou induisant l'apoptose comme l'anisomycine [80, 81]. Récemment, K8 Ser79 a été montré comme étant un substrat physiologique des « MAP » kinases p38 et JNK, des enzymes activés en situation de stress cellulaire et impliqués dans les mécanismes d'apoptose [82, 83]. Ces résultats indiquent que la phosphorylation de K8 Ser79 constitue un marqueur de stress cellulaire et suggèrent une implication de la phosphorylation de K8 Ser79 dans la protection cellulaire contre le stress [84]. La phosphorylation de K8 Ser79 semble aussi être essentielle à l'organisation des kératines cellulaires. On observe que la phosphorylation de K8 Ser79 est accompagnée de la réorganisation des kératines cellulaires dans de nombreux événements cellulaires comme la mitose, l'apoptose et le stress induit. De

plus, il a été montré que la transfection d'une espèce mutante de K8 Ser79→Ala dans des cellules en culture entraîne l'inhibition de la phosphorylation au niveau de ce résidu et maintient la stabilité des filaments de kératines qui normalement s'agrègent en présence d'acide okadaïque[82]. Cette expérience relie, de façon directe, la phosphorylation d'un site spécifique K8 Ser79 à une fonction particulière : l'organisation des kératines dans la cellule.

La K8 Ser436 est, comme K8 Ser79, un site de phosphorylation situé sur K8 et qui se retrouve activé lors de la mitose (phase G2/M) après stimulation à l'EGF. De plus, K8 Ser436 peut être phosphorylé *in vitro* par la MAP kinase-prototype et la cdc2 kinase (enzymes activés par l'EGF) indiquant un rôle potentiel de cette modification dans les cascades d'activation mitotique[80].

5.2 AUTRES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE K8/18

En plus de la phosphorylation, les kératines sont sujettes à diverses modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, l'acétylation, la protéolyse. Ces modifications n'ont été que très peu étudiées. Par exemple, la glycosylation est associée à un grand nombre de protéines incluant des kinases, des phosphatases, des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette[85]. Comme la phosphorylation, la glycosylation est une modification post-traductionnelle dynamique et apparaît au niveau de régions riches en résidus Thréonine/Sérine. Il est possible que la glycosylation joue un rôle de modulation de la phosphorylation étant donné la proximité des Ser phosphorylables et Thr glycosylables mais cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée[51].

Parmi les autres modifications post-traductionnelles des kératines, la protéolyse est d'un intérêt particulier, puisque les kératines peuvent être des substrats des caspases durant l'apoptose[35]. La sensibilité des kératines à la digestion par les caspases semble être fonction du type de kératine. À la différence de K18 et K19 (type I), K8 (type II) ne semble pas posséder le site de clivage correspondant à la caspase 3, acteur essentiel du

processus d'apoptose[86]. Un fait intéressant est que le site de clivage de K18 et K19 (²³⁴VEVD) se retrouve au sein d'un motif similaire au niveau des autres kératines de type I comme, par exemple, la séquence ²⁷⁰VEMD sur K14. Des mutations dans cette région qui correspond à la portion non-hélicoïdale L12 de K14, sont à l'origine de formes rares d'épidermolyse bulleuse simple (EBS) chez l'humain. Ces observations impliquent la possibilité que des perturbations de la protéolyse des kératines soient à l'origine de maladies humaines de la peau[86, 87]. Cette hypothèse demeure à vérifier et la signification de la dégradation des kératines doit encore être déterminée. Il est donc nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les modifications post-traductionnelles qui affectent les kératines afin de comprendre l'importance fonctionnelle des kératines dans la cellule.

CHAPITRE VI

LES PROTÉINES DE STRESS

Dans notre projet de recherche, nous avons tenté d'évaluer l'importance biologique des filaments intermédiaires dans le processus des mécanismes de défense que possèdent les hépatocytes pour faire face au stress, ici, représenté par la présence de griséofulvine. Nous avons également essayé de voir s'il existait une relation au cours de l'hépatite entre les filaments intermédiaires de type kératine et une autre grande classe de protéines impliquées dans la protection cellulaire : les protéines de stress (HSPs). Avant d'exposer nos résultats, nous allons présenter cette classe de protéines appelées HSPs.

6.1 FONCTION DES PROTÉINES DE STRESS

Une condition essentielle à la survie de la cellule est la présence de protéines stables, capables d'accomplir les fonctions importantes qui leur sont attribuées. De brusques changements environnementaux tels que l'exposition aux drogues, la chaleur, les métaux ou simplement l'encombrement moléculaire dans le cytoplasme peuvent entraîner la dénaturation des protéines et nuire au bon fonctionnement de la cellule. Pour faire face à ces diverses situations, la cellule induit l'expression génique et la biosynthèse d'une large classe de protéines appelées les protéines du choc thermique (HSPs)[62, 63].

Les HSPs sont des familles de protéines ubiquitaires, conservées à travers les procaryotes et les eucaryotes. Ces familles sont définies selon le poids moléculaire, le compartiment où on les retrouve et leur fonction [62, 88, 89](tableau7). Les familles de HSPs sont constituées de membres appelés « chaperonnes moléculaires » qui peuvent être exprimés de façon constitutive ou encore induits par le stress. Par exemple chez les eucaryotes, la famille HSP70 inclut la protéine synthétisée constitutivement HSC70 ou HSC73 (P.M. 73 kDa), sa forme induite HSP70 ou HSP72 (P.M. 72 kDa), toutes deux

exprimées dans le cytosol, ainsi que les protéines HSP75 et grp78 localisées au niveau de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique respectivement[88]. La chaperonne moléculaire est une protéine capable de reconnaître sélectivement des régions hydrophobes exposées d'une protéine naissante, dénaturée ou instable et de s'y lier de façon non-covalente. La formation du complexe HSP-protéine permet de stabiliser le polypeptide et d'éviter les interactions non-désirées en son sein et aussi avec les molécules environnantes pour lui permettre de reprendre une conformation viable et surtout fonctionnelle[89, 90]. L'intervention des chaperonnes moléculaires peut se faire à plusieurs niveaux comme, par exemple, lors de l'élongation protéique le long des

TABLEAU 6.1
Les différentes familles de protéines de stress^{1,2}

Famille	Eucaryotes	Procaryotes	Chaperon. associées ^a	Compart. cellulaire ^b	Structure
Chaperonnes					
HSP90 (90 kDa)	HSP90 α/β , HSP82	HtpG	HSP20, HSP40	C, RE C, M, RE	Dimère, hélices α , feuillets β
HSP70 (70 kDa)	HSP72, HSC73, Ssa1-4, Ssb1-2	DnaK	Hip, Hop, GrpE		Domaines N- et C- terminaux
HSP40 (40 kDa)	HSP40, Ydj1	DnaJ	HSP72, HSC73	C, M, RE	Double hélice
Small HSPs (12-43 kDa)	HSP12-43, α B-crystalline		HSP72	C	Oligomères, domaine α -crystalline
Chaperonines					
HSP60 groupe I (57 kDa)	TriC, Cpn10, HSP10	GroEL, GroES	GimC	M	Deux heptamères (homo-oligomère)
groupe II (55 kDa)	TCP-1 ou CCT	Thermosome, TF55, TF56		C, N	Anneaux octamériques ou nanomériques (hétéromère)

¹Tiré de: Agashe, V.R., and Hartl, F.U. (2000) "Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding" Cell & Developmental Biology 11: 15-25

²Tiré de: Slavotinek, A.M., and Biesecker, L.G. (2001) "Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease" Trends in Genetics 17(9): 528-35

^asont énumérées uniquement les chaperonnes des systèmes eucaryotes

^bC, Cytosol; M, Mitochondrie; RE, Réticulum Endoplasmique; N, Noyau

ribosomes, la translocation membranaire et l'importation de protéines synthétisées *de novo* dans les différents compartiments cellulaires. Les chaperonnes peuvent aussi participer à la protéolyse cellulaire en collaboration avec le système ubiquitine-protéasome lorsque la dénaturation de la protéine est irréversible[88, 91].

La chaperonne HSP70 chez les eucaryotes ou DnaK chez *E.Coli* est l'une des chaperonnes les plus étudiées. Le modèle d'interaction entre la chaperonne moléculaire et les protéines a été plus amplement étudié avec DnaK, chez les procaryotes. Fondamentalement, le rôle biologique de DnaK est relié à sa capacité à interagir avec ses substrats : les protéines. La structure de DnaK comprend deux domaines essentiels à sa fonction : une portion N-terminale (40 kDa) possédant une activité d'ATPase et une portion C-terminale (25 kDa) pouvant lier les régions hydrophobes du polypeptide [90]. Le passage entre la forme DnaK libre et sa forme complexée (liée à la protéine) nécessite l'hydrolyse de l'ATP par la portion N-terminale et implique obligatoirement que le processus de « renaturation » soit séquentiel. La liaison de l'ATP avec DnaK entraîne des changements conformationnels dans la région C-terminale de la protéine de stress lui permettant soit de lier, soit de libérer rapidement les polypeptides. L'hydrolyse subséquente de l'ATP en ADP entraîne une modification structurale qui fait passer DnaK à une configuration plus « fermée » ayant une affinité supérieure pour le substrat. Cette réaction d'hydrolyse est, en fait, stimulée par un co-facteur ou co-chaperonne appelé DnaJ (HSP40 chez les eucaryotes) qui agit en tant qu'activateur de l'ATPase de DnaK. L'association DnaK-peptide-DnaJ en présence d'ADP favorise alors la stabilisation par la chaperonne du polypeptide. Un second co-facteur appelé GrpE entre ensuite en action et provoque la libération de l'ADP en l'échangeant pour de l'ATP. Cette réaction fait passer DnaK de nouveau à la configuration « ouverte » de départ (de faible affinité pour le substrat) permettant le relargage du polypeptide stable dans le milieu cellulaire et le renouvellement du cycle. Ce mécanisme est similaire chez les eucaryotes à la différence que d'autres co-facteurs comme Bag-1 et Hip (p48) participent avec HSP70 à la renaturation des protéines natives ou altérées[89, 90].

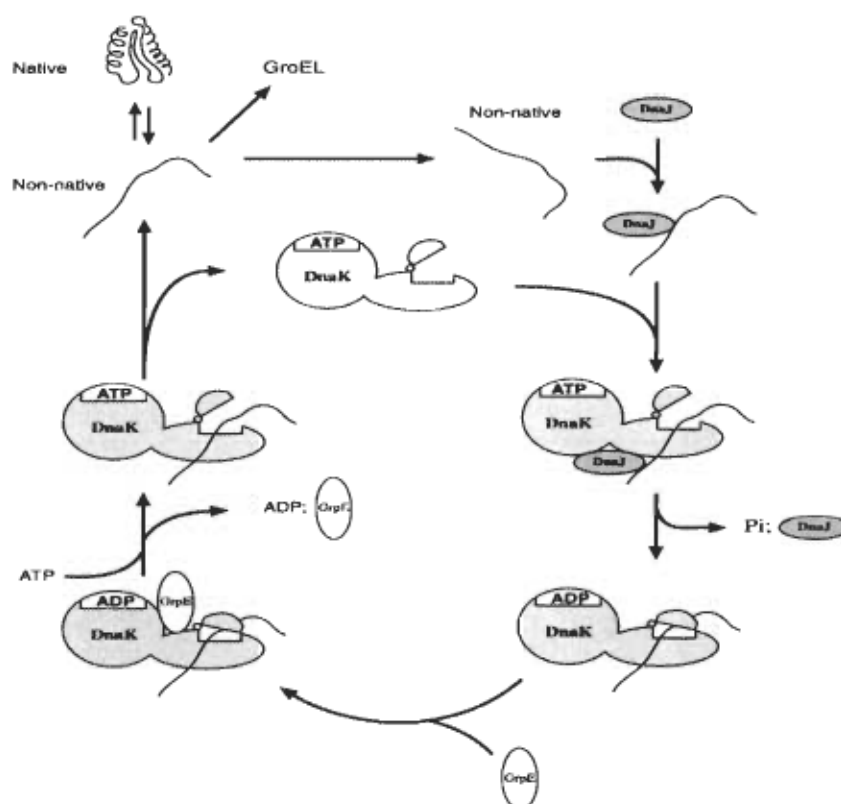


FIGURE 6.1 : Mécanisme d'action de la chaperonne DnaK (*E. Coli*).

Tiré de: Agashe, V.R., and Hartl, F.U. (2000) "Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding" *Cell & Developmental Biology* 11: 15-25

6.2 PROTÉINES DE STRESS ET FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

Les chaperonnes moléculaires peuvent être sollicités durant une situation de stress comme le choc thermique, les conditions environnementales favorisant la dénaturation des protéines et leur potentielle agrégation[62, 63]. Ils jouent un rôle important de protection en modulant les cascades enzymatiques menant à l'activation des caspases 3 et 9 pro-apoptotiques[88, 92].

Des études *in vitro* menées sur des colonocytes humains ont montré que HSC/P 70 interagit avec la paire K8/18 en présence d'ATP, avec une stœchiométrie inférieure à 1:1. HSC/P70 semble se lier avec plus d'affinité à K8 par rapport à K18 et K19[93]. De plus, l'association HSC/P70-K8/18 est plus présente au niveau de la fraction soluble

(cytosol) que de la fraction insoluble (cytosquelette) des kératines, avant et après induction d'un choc thermique. Cependant, l'interaction avec HSC/P70 ne semble pas modifier la solubilité de K8/18[93]. Ce résultat va à l'encontre d'études précédentes qui ont montré l'existence d'une interaction entre HSP27 et la vimentine ou l' α B-crystalline et la GFAP dans les cellules d'astrocytomes[94]. D'autres membres de la famille des protéines de stress, grp78 et MrJ (famille de DnaJ/HSP40) ont été aussi identifiés comme protéines associées à K8/18[95, 96]. Toutefois comme dans le cas de HSC/P70, le rôle de ces interactions n'est pas encore élucidé. Il est probable que les présumées fonctions seront reliées à des processus impliquant le réticulum endoplasmique comme, par exemple, l'importation de nouvelles protéines dans le cas de grp78 ou la prise en charge des protéines dénaturées en collaboration avec HSC/P70 dans le cas de HSP40.

Dans le contexte de l'hépatite alcoolique aboutissant à la formation de CMs, le rôle de HSP70 n'a pas encore été déterminé véritablement[97]. La présence de HSP70 au sein des CMs a été mise en évidence. Les données accumulées justifient la présence de HSP70 par sa fonction d'aide au bon repliement des protéines dénaturées dont la quantité, dans ces conditions toxiques défavorables, est importante au niveau des CMs[64]. Cependant, il ne faut pas restreindre l'action de HSP70 au niveau de K8/18 dans les hépatocytes à la renaturation des protéines altérées et à la prévention de l'agrégation. Il est possible d'envisager d'autres fonctions comme la régulation de l'association de K8/18 avec d'autres protéines ou encore la modulation des modifications post-traductionnelles des kératines comme la phosphorylation qui sont associées au stress.

CHAPITRE VII

CORPS DU TRAVAIL

RÉSUMÉ : Les filaments intermédiaires constituent, avec les microfilaments d'actine et les microtubules, les trois grandes familles de protéines qui composent le cytosquelette. Les kératines représentent les protéines de filaments intermédiaires les plus répandues et également celles exprimées dans les épithéliums glandulaires de type simple. Au niveau fonctionnel, l'importance des kératines a été établie par plusieurs études réalisées *in vitro* et *in vivo* montrant que l'absence de protéines natives ou la présence de protéines mutées, dans les cellules, peut entraîner leur fragilisation et réduire leur capacité à résister à diverses situations de stress. Les kératines sont sujettes à plusieurs modifications post-traductionnelles, la plus étudiée étant la phosphorylation. La phosphorylation semble jouer un rôle dans la modulation de la structure et la conformation des kératines, et par conséquent des fonctions associées aux kératines comme le support mécanique ou la protection en situation de stress. Dans notre étude, nous avons suivi l'expression et la localisation des kératines phosphorylées à divers sites spécifiques dans des hépatocytes de souris soumises à un stress chimique : l'intoxication à la griséofulvine. Nous avons également étudié la relation potentielle entre la phosphorylation des kératines 8 et 18 au niveau de sites spécifiques et l'expression dans les hépatocytes de HSP70, qui protège les cellules contre divers types de stress. Nos résultats ont montré que l'expression de HSP70 et des kératines phosphorylées à différents sites font partie de la réponse immédiate des hépatocytes à l'intoxication à la griséofulvine. Nous n'avons pas trouvé de relation claire entre l'expression dans les hépatocytes des différentes espèces de kératines phosphorylées et celle de HSP70. À long terme, lors de l'apparition des CMs, nous avons remarqué que HSP70 et les kératines phosphorylées à certains sites, mais pas toutes, sont présentes dans les agrégats de protéines de FIs.

HSP70 expression, Keratin Phosphorylation and Mallory Body Formation in Hepatocytes from Griseofulvin-Intoxicated Mice

MICHEL FAUSTHER¹, LOUIS VILLENEUVE¹ AND MONIQUE CADRIN¹

¹Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Québec, CANADA.

Address requests to: MONIQUE CADRIN, Ph D.

Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 boulevard des Forges, C.P. 500, Québec, Trois-Rivières, Canada G9A 5H7

Tel: (819) 376-5053

Fax: (819) 376-5084

Key words: intermediate filaments, keratin, phosphorylation, heat shock proteins, Mallory body formation, griseofulvin, hepatitis, C3H mouse strain, FVB/n mouse strain.

Abstract

Background

Keratins are members of the intermediate filaments (IFs) proteins, which constitute one of the three major cytoskeletal protein families. Studies on transgenic mice have shown that the absence, or expression of mutated keratins renders different epithelial tissues more susceptible to mechanical stress and drug-induced damages. Keratins are subject to posttranslational modifications such as phosphorylation and glycolysation that are thought to modulate their functions. Treatment of mouse with a diet containing griseofulvin (GF) induces, in hepatocytes, modifications in organization, expression and phosphorylation of keratins 8/18 (K8/18) IFs and leads, on the long term, to the formation of Mallory bodies (MBs), K8/18 containing aggregates, identical to human MBs found in numerous human liver diseases. The aim of the

present study was to determine whether a relationship exist between the stress induced by a toxic agent such as griseofulvin, as measured by analyzing the level of the stress inducible form of HSP70 (HSP70i) and K8/18 phosphorylation at specific sites.

Results

By Western blotting, we show that GF-treatment induces an increase in the expression of HSP70i and in the phosphorylation of K8 S79, K8 S436, and K18 S33. These events occur rapidly (within 2 weeks) after the beginning of the treatment. By immunofluorescence staining, we show that after the treatment HSP70i is present in all hepatocytes. However, K8 pS79 and K8 pS436 are observed only in groups of hepatocytes or in isolated hepatocytes. K18 pS33 is present in all hepatocytes. Interestingly, HSP 70i colocalizes with phosphorylated K8/18 in MBs.

Conclusion

Our results show that GF intoxication represents a stress condition that affects all hepatocytes in the liver. Since the phosphorylation of K8/18 on the studied sites is not occurring in every hepatocyte, we conclude that *in vivo* there is not a direct relationship between the stress induced by the treatment and the studied keratin phosphorylation sites. However, the presence of K8 pS79, K8 pS436 and K18 pS33 suggests that subpopulations of hepatocytes are responding differently to the stress than others. The significance of these findings will be discussed.

Background

Intermediate filaments (IFs) are with microtubules and actin microfilaments the major cytoskeletal components of most vertebrate cells [1-4]. IF proteins constitute a large family of proteins that is divided into five types [1, 2]. The expression of the different IF proteins is differentiation and tissue specific [1, 5]. Keratins expressed in epithelial cells, represent the largest and most complex subtype of IF proteins (more than 20 proteins)[2]. They are classified into two groups, the type I (acidic K9 to K20) and the type II (neutral basic, K1 to K8) which form obligate heteropolymers composed of equimolar amounts of type I and type II keratins [2, 6].

It is now generally accepted that, in multilayered epithelia, one of the function for keratin IFs is to protect the tissue from mechanical stress [7-9]. The first evidences for this function came from studies on epidermis which showed that transgenic mice

lacking or expressing mutated keratins displayed blistering skin disease phenotypes, similar to human skin diseases such as epidermolysis bullosa simplex (EBS) or epidermolysis hyperkeratosis (EH) [7, 10, 11].

As for epidermal keratins, the production of transgenic mice targeting K8 or K18 has been necessary to unravel the role of IFs in single layered epithelium such as in the liver. In hepatocytes, K8/18 is the only keratin pair and thus both keratins are necessary to form an IF network. Transgenic mice expressing K8 or K18 carrying mutations that affect filament formation, develop mild hepatitis and display greater liver sensitivity to mechanical and toxic stress than wild type animals [12, 13].

In humans, many liver diseases such as alcoholic hepatitis, Wilson's disease, Indian childhood cirrhosis and liver steatosis in obesity are associated with modifications in IF organization and formation of keratin containing aggregates called Mallory bodies (MBs) [14-18]. Moreover, recent studies from Ku et al have shown that mutations on K8/18 predispose to the development of liver disease such as cirrhosis in humans and confirmed that intact keratins are needed to preserve the cellular integrity of hepatocytes upon stressful conditions [19-21]. It is still unclear how keratins accomplish these protective roles. Previous studies have shown that modifications in keratin phosphorylation are associated with various conditions such as mitosis, apoptosis and stress, suggesting that it plays a role in the modulation of keratin-related functions [22-24].

Long-term treatment of mice with a diet containing GF induces the development of hepatitis and the formation of MBs, which are biochemically and morphologically similar to those found in humans [25]. This animal model constitutes a useful tool to investigate the behavior of keratins in the response of hepatocytes to the presence of a hepatotoxic agent.

In the present report, in order to determine if GF-treatment constitutes a stress condition for hepatocytes, we monitored the expression of the inducible form of HSP70. Our results showed that GF-treatment induced a rapid increase in HSP70i expression. Since K8/18 are phosphorylated at specific sites such as K8 S79, K8 S436, K18 S52 and K18 S33 in stress situations (reviewed in [23, 26]), we assessed the contribution of K8/18 phosphorylation at specific sites in the response of hepatocytes to the presence of GF. We also examined the possible relationship between HSP70i expression and K8/18 phosphorylation, during the development of

the hepatitis that leads to MBs formation. The effect of GF-treatment was monitored on two mouse strains, C3H and FVB/n and the results compared.

Results

Induction of HSP70i and K8/18 phosphorylation upon GF-treatment in C3H and FVB/n mice livers

The modifications in the amount of HSP70i, K8/18, and phosphorylated keratins (K8 pS79, K8 pS436 and K18 pS33) were analyzed by Western Blotting of total proteins from control and GF-treated C3H and FVB/n mice livers (2 weeks to 5 months). As described in previous studies, GF intoxication induces an increase in the level of keratins in the liver of both mouse strains (Fig. 1A, 1B) [27]. As shown in Fig. 1A, this modification in keratin level parallels an augmentation in HSP70i. In both mouse strains, HSP70i is present in control liver [28] and an elevation is noted at all time points (Fig 1A).

Since K8/18 phosphorylation has been shown to be associated with stress, Western blotting of total protein from C3H and FVB/n liver were probed with antibodies against K8 pS79, K8 pS436 and K18 pS33 (Fig. 1C-1G). Significant changes in K8 and K18 phosphorylation occur after a short period of GF-treatment in both mouse strains (Fig. 1C-1G). Small amounts of K8 pS79 and K18 pS33 are noticed in control livers (Fig. 1C,D and 1E,F). K8 pS436 is not detected in control livers (Fig. 1G). At 2 weeks of treatment, an increase in the amount of all phospho-keratin species analyzed is observed. In the case of K8 pS436 and K18 pS33, a decrease in phosphorylation is noted after 5 months of treatment, in comparison with 2 weeks treatment. However, the level of phosphorylation for K8 pS436 and K18 pS33 remains higher than control value in both mouse strains for the whole treatment (Fig 1 E-G). A decrease in K8 S79 phosphorylation is observed after 5 months of treatment, in C3H mice (Fig 1C). In FVB/n mice, K8 pS79 is not detected after the same period of treatment (Fig 1D).

Localization of HSP70i and K8/18 during GF intoxication

In order to determine if there is a relationship between the stress condition affecting the liver and the modifications in IF organization described in previous studies [27],

we analyzed at the cellular level, by performing double immunofluorescence staining, the distribution of HSP70i and IFs on liver sections of control and GF-treated C3H and FVB/n mice livers.

In control hepatocytes, IFs formed a complex cytoplasmic network that was denser at the cell membrane and particularly around the bile canaliculi [27](Fig. 2A). Our biochemical analysis showed that HSP70i is present in control hepatocytes. However, by immunofluorescence we did not detect the presence of HSP70i in the cells (Fig.2B). After 2 weeks of treatment, most of the hepatocytes were enlarged and the bile canaliculi were dilated. IF network was denser around dilated bile canaliculi (Fig. 2C). These modifications were accompanied by an increase in the amount of HSP70i in the majority of hepatocytes. In most hepatocytes, a granular staining was detectable at the membrane level and in the nuclei (Fig 2D). A few cells showed a high level of HSP70i. All these cells contained a very dense cytoplasmic IFs network, suggesting that HSP70i is required in cells where an important IF network reorganization is occurring. After 5 months of treatment, there was a mosaic pattern of cells with and without IF staining (Fig 2E). HSP70i showed a granular staining pattern in many hepatocytes and was also present in MBs (Fig 2F). The presence of HSP70i in MBs suggests that it is involved in the process of MB formation.

Phosphorylation of K8 S79, K8 S436 and K18 S33 during GF intoxication

Since it has been shown that K8/18 phosphorylation is modified in the response of cells to various types of stress [29], we studied the effect of GF on K8/18 phosphorylation at specific sites: K8 S79, K8 S436 and K18 S33. Cryosections of control and GF-treated C3H and FVB/n mice livers were fixed with 4% paraformaldehyde and processed for double immunofluorescence staining. Control mice showed hepatocytes with a cytoplasmic IF network, which was denser at the cell periphery (Fig.3-5 A). K8 pS79 and K8 pS436 were not generally detected in the IF network of control hepatocytes, although, occasionally some cells, most likely in mitosis, were stained (Fig 3B). A basal level of phosphorylation for K18 S33 was detected at periphery of all hepatocytes (Fig 5B).

After two weeks of GF-treatment, as mentioned above, there were morphological changes in hepatocytes, which were associated with modifications in the IF network organization (Fig 3-5C). This treatment induced the phosphorylation of K8 on S79 and S436 in some hepatocytes. K8 pS79 and K8 pS436 were present in clusters of

cells scattered over the whole liver (Fig 3,4,7 D). The groups of cells stained with the anti-K8 pS79 or the anti-K8 pS436 were usually surrounding porphyrin deposits or damaged cells (Fig 3,7 D). In the case of K8 pS79, IFs located in the cytoplasm and at periphery of the cells were highly stained (Fig 3D, E). For K8 pS436, the staining was stronger at the cell periphery and around the dilated bile canaliculi (Fig 4D). In addition to their presence in clusters of cells, K8 pS79 and K8 pS436 displayed an intense cytoplasmic staining in some isolated cells or cell doublets (Fig 3E). Since both epitopes showed similarities in their patterns of distribution, we asked whether they were present in the same hepatocytes. Immunostaining for the detection of K8 pS79 and K8 pS436 were performed on serial liver sections of GF-treated mice liver. Our results showed that the groups of hepatocytes positives for K8 pS79 were also positives for K8 pS436 (Fig 6).

In the case of K18 S33, its phosphorylation was increased in most if not all hepatocytes. Most of the staining was observed at the periphery of the cells, delimitating clearly the bile canaliculi. A few hepatocytes showed high levels of cytoplasmic K18 pS33 (Fig 5D).

After six weeks of GF-treatment, the distribution of hepatocytes containing K8 pS79 and K8 pS436 was different than what was observed after two weeks of treatment. Clusters of labeled cells were smaller whereas labeled isolated cells became more prominent (Fig 3G, 4F). Single and doublet cell(s) highly labeled with K8 pS79 and K8 pS436 were also present (Fig 3H). K18 pS33 was present in most hepatocytes and showed a similar pattern as the one observed after staining with Troma1 (Fig 5F).

After four or five months of GF-treatment in both mouse strains, MBs were present in some hepatocytes (Fig 3I, 4G, 5G). MBs had variable size and different positions depending on the cell and were observed in cells with, or without, a visible intracytoplasmic IF network, as detected with Troma 1. In both mouse strains, K8 pS436 and K18 pS33 were present in MBs (Fig 3,4G), whereas K8 pS79 seemed to be absent (Fig 3J). This last result was surprising since Stumptner et al had shown that K8 pS79 was present in MBs [30]. It is well known that fixation procedures can affect the recognition of an antigen by an antibody [31, 32]. In order to determine if the type of fixative accounted for the discrepancy between our results and the results of Stumptner et al, we performed the same series of experiments using cold acetone instead of 4% paraformaldehyde. After acetone fixation, no difference in the staining pattern was observed for GF-treatment of 2 to 6 weeks in both mouse strains (Fig 7).

However, differences were observed for MB staining in the 5 months treated mice liver. In C3H mouse strain livers, K8 pS79 was present in many MBs although some MBs showed no staining (Fig 7J). In FVB/n mouse strain livers, K8 pS79 was not present in most MBs (Fig 8). No difference in staining of MBs was observed for K8 pS436 and K18 pS33.

Localization of phosphorylated K8 species and HSP 70i during GF intoxication

Double immunostaining with anti-HSP70i and anti-phosphorylated keratins (K8 pS79 or K8 pS436) was performed to study the localization of HSP70i in relation with keratin phosphorylation. The results showed that HSP 70i and phosphorylated K8 species colocalized in some cells (Fig 9). However, in most of the cells, this co localization was not observed.

Discussion

The functional significance of K8/18 in single layered epithelium has been the subject of numerous studies over the last decade [26, 27, 33-37]. Although most of these studies lead towards roles for K8/18 in the resistance of cells to mechanical and toxic stress, the molecular mechanisms underlying these phenomena remain to be elucidated. To date, most of our understanding of the pathways involving keratins in the response of hepatocytes to toxic stress comes from analyses of various cell lines [29, 38, 39]. K8/18 phosphorylation at specific sites has been proposed to be a key factor in the regulation of these keratin functions. In this regard, K8 pS79, K8 pS436, K18 pS52 and K18 pS33 correspond to the most studied phosphorylation sites [40].

In vivo, K8/18 are also subjected to phosphorylation and, as suggested by *in vitro* studies, it is proposed to help hepatocytes to cope with toxic stress [23, 26, 37]. For instance, transgenic mice expressing human K18 S52→A mutant are more susceptible to drug-induced liver injury than transgenic mice over expressing wild type human K18 [41].

In the present study, we show that chronic intoxication of mice with GF, which is known to induce modifications in keratin organization and formation of MBs [27], is associated with increased expression of the stress protein HSP70i. GF-treatment resulted in a rapid increase in the expression of HSP70i. This modification is already perceptible after 2 weeks of treatment and is maintained for the whole period of

treatment. This result provides direct evidence that GF-treatment, which has been proposed to constitute an oxidative stress for hepatocytes [42], triggers signaling pathways involved in cellular protection [27]. This interpretation of our biochemical data is in agreement with our immunofluorescence study showing that HSP70i partly relocalizes to the nucleus during the treatment. This distribution pattern is typical of the distribution of HSP70i in stressed cells [43, 44].

We have previously shown that GF intoxication induced an overall increase in K8/18 phosphorylation [45, 46]. Here, we show that GF-treatment is associated with modifications in K8/K18 phosphorylation at specific sites such as: K8 S79, K8 S436 and K18 S33. Among the studied phosphorylation sites, K18 pS33 is the keratin phosphoepitope whose tissue distribution resembles that of HSP70i, since it is present and is increased in all treated hepatocytes. The phosphorylation of K18 S33 has been shown to play a role in keratin reorganization during mitosis and by linking 14-3-3 proteins, to modulate their function [47, 48]. Hence, we propose that K18 S33 phosphorylation could be linked to IFs reorganization during GF intoxication. Moreover, since K18 pS33 is increased in all hepatocytes, it could be implicated in the stress response by participating in the relocalization and/or the recruitment of molecules or factors implicated in stress-induced cell signaling.

In contrast to K18 pS33, phosphorylated K8 species, K8 pS79 and K8 pS436 are not present control mice hepatocytes. After 2 to 6 weeks of treatment, we observe an increase in the level of phosphorylation on these sites. However, contrary to HSP70i and K18 pS33, these phosphorylation sites are only present in isolated cells (single or doublets) or clusters of cells. Labeled single or doublets cells are more numerous after staining with the anti-K8 pS79 than after staining with the anti-K8 pS436. These cells could correspond to cells that are undergoing mitosis. This is supported by previous studies which showed that phosphorylation of K8 on S79 and S436 occurs during mitosis [22, 49]. This interpretation is also in agreement with the work of Stumptner et al which showed the presence of cell doublets reactive with the anti-K8 pS79 after a short treatment with DDC, a treatment that induces on the long term the MBs formation [30]. The discrepancy in the number of cells stained for K8 pS79 and K8 pS436 in the single and doublet cells stained cells suggests that different kinases are involved in the phosphorylation of these sites.

The presence of K8 pS79 and K8 pS436 is also detected in islets of cells. Interestingly, both antigens are present in the same clusters of cells surrounding

unstained cells that are most likely undergoing apoptosis. These unstained cells are evocative of detached cells during anoikis, an apoptotic process that can be induced by loss of cell-cell anchorage. Stress and apoptosis has been shown to modulate K8 S79 and K8 S436 phosphorylation [22, 49]. The observed phosphorylation could indicate that these hepatocytes are stressed hepatocytes intended to apoptosis. However, analysis of the livers for the presence of apoptosis shows that only a few hepatocytes are going through programmed cell death and groups of cells in apoptosis were never observed (data not shown). We propose that the apoptotic cell could represent the starting point of a signal transduction pathway to neighboring cells. The activation of specific kinases that would phosphorylate keratins, could provide these cells resistance to apoptosis. This latter interpretation is in agreement with the notion that K8/18 intermediate filaments play a key role in the protection of cells against apoptosis [23, 37].

Liao et al. have shown that HSP70 associates with K8/18 *via* K8 [50]. Our study show that colocalization of HSP70i and IFs occurs only in a few hepatocytes. Since the hepatocytes in which colocalization was observed contained K8 pS79 or K8 pS436, HSP70i binding to IFs in these cells may be related to the presence of keratin phosphorylation and participates to cellular pathways involving phosphorylated K8/18 on specific sites. Ku et al have shown that phosphorylation could modulate K8/18 ubiquitination and ensuing turnover [51]. Knowing that binding of HSP70 to a protein can affect its targeting by kinases or phosphatases [52], HSP70i could bind to phosphorylated K8 species, prevent dephosphorylation by specific phosphatases, and thereby enhance phosphorylation-mediated K8/18 protection from degradation by the ubiquitin pathway [51]. However, since HSP70i and phosphorylated K8 species colocalized only in few cells over the whole tissue, the relevance of this phenomenon in the response to the presence of the hepatotoxin needs to be addressed. Further investigations will be necessary to confirm this hypothesis.

Chronic intoxication of mice with GF induces the formation of MBs. Numerous studies have demonstrated the presence of different phosphorylated K8/18 species within MBs, suggesting that K8/18 phosphorylation could participate in the MBs formation processes [30, 53]. In our experiments, we show that K8 pS436 and K18 pS33 are present in all observed MBs whereas K8 pS79 is present in MBs in C3H mice hepatocytes but not in FVB/n mice. The difference in the presence of K8 pS79 phosphopeptide within MBs suggests that phosphorylation at that specific sites is not

essential for MB formation. However, as suggested by Stumptner et al.[30], since K8 pS436 and K18 pS33 are always detected in MBs, phosphorylation on these sites could be implicated in the processes of MB formation. Taken together, these results indicate that in the context of MB formation, K8/18 phosphorylation should not be considered as a general phenomenon but as specific events that affect precise sites on K8 or K18. The difference observed between keratin phosphorylation in C3H and FVB/n mice indicates that the genetic background influences the response of hepatocytes to toxic stress. This interpretation is in agreement with the results obtained with K8-null mice which displayed variable phenotypes depending on the genetic background [33, 34].

The treatment with GF that represents a toxic stress, most likely, involves the activation of stress activated protein kinases (SAPKs) in some hepatocytes. SAPKs p38 and JNK are physiologic kinases for K8 S79 and K8 S436[39, 54]. We postulate that p38 kinase and/or JNK are activated by GF-treatment in some hepatocytes and are responsible for the modifications in K8 phosphorylation that we observed. K8 and K18 give different patterns of phosphorylated cells indicating that under the same conditions, K8 and K18 phosphorylation is regulated differently.

Conclusions

Our results show that increases in HSP70i, K8/18 expression and K8/18 phosphorylation constitute early events in the response of hepatocytes to the presence of GF. These observations support a role for keratins in preserving cellular integrity during stress conditions induced by the presence of a chemical agent [27, 37]. HSP70i expression in hepatocytes after GF-treatment is not directly related to K8/18 phosphorylation at the studied sites: K8 S79, K8 S436 and K18 S33. With regard to MB formation, it appears that both HSP70i and K8/18 phosphorylation might contribute to the IF aggregation processes. The involvement of K8/18 phosphorylation in MB formation seems to be related only to specific sites.

Methods

Reagents

The antibodies (Ab) used were as following: Troma 1 a rat monoclonal antibody (rAb) that recognize K8 [55]; LJ4 a mouse monoclonal antibody (mAb) that recognize human K8 pS73 equivalent to mouse K8 pS79 [22]; mAb 5B3 that recognize K8 pS431 equivalent to mouse K8 pS436 [49]; 8250 a rabbit polyclonal antibody (pAb) that recognize K18 pS33 ([47] and pAb that recognize the stress inducible form of HSP 70, HSP 70i (Stressgen, Victoria, BC). The secondary antibodies for fluorescence microscopy were as follows: tetramethylisothiocyanate (TRITC) or fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated goat anti-rat antibodies, FITC-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON). The M.O.M. kit and Avidin/Biotin blocking kit (Vector® Laboratories Canada, Burlington, ON) were used to perform immunolabelling with mAbs LJ4 and 5B3. The secondary antibodies used for Western blotting were as follows: biotinylated goat anti-rat IgG, biotinylated donkey anti-mouse IgG and peroxidase donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON). The other reagents used were: Horseradish Streptavidin Peroxidase- conjugated (SPC) (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON), Bovine Serum Albumin (BSA) (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON), Leupeptin (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON), Pepstatin (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON), Aprotinin (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON), Normal Horse Serum (NHS) (Vector® Laboratories Canada, Burlington, ON), Luminol (Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON).

Animals

Adult C3H mice (Charles River Canada, St-Constant, QC) and FVB/n mice line (Baribault et al 1994) were fed a semi-synthetic diet (Texlad Test Diet, Madison, WI) containing 2.5% (w/w) GF (Schering Corp., Kenilworth, NJ) for periods ranging from 1 week to 5 months according to the method of Denk et al [25]. Control mice were fed the same diet without GF. Mice were sacrificed by cervical dislocation and livers were snap frozen in methylbutane precooled with liquid nitrogen and stored at -70°C before use.

Gel electrophoresis and immunoblotting

Livers were homogenized in Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8 containing 2.3 % SDS, 50mM sodium fluoride, 10mM EDTA, 1mM sodium pyrophosphate, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1 μ M leupeptin (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON), 1 μ M pepstatin (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON), 2.5 μ g/ml aprotinin (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON). Proteins were separated by electrophoresis on 10% SDS-polyacrylamide gels [56]. Protein concentration was determined by the Lowry method modified for the presence of SDS [57] and equal amounts of proteins (5 to 12.5 μ g) were loaded on each well. Gels were stained with 0.1% Coomassie Blue or transferred onto nitrocellulose membranes (Biorad laboratories Canada, Mississauga, ON) and processed for immunodetection. Membranes were blocked overnight with 5% nonfat dry milk (Carnation, Nestlé®) in PBS (Phosphate Buffer Saline, 0.137M NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 14.7mM KH₂PO₄, pH 7.2), incubated with the primary antibodies for 45 min. at room temperature, washed in PBS containing 0.2% Tween 20 and incubated for 45 min with the appropriate secondary antibody: biotinylated goat anti-rat (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON), biotinylated donkey anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON) and horseradish peroxidase donkey anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON). When biotinylated secondary antibodies were used, membranes were washed with PBS-Tween 20 and incubated with streptavidin conjugated with horseradish peroxidase (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON) for 30 min and washed with PBS-Tween 20. The chemiluminescent horseradish peroxidase substrate Luminol (Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON) was added to the membranes according to recommendations of the company, and membranes were exposed to Blue X-Omat X-ray film sheets (Mandel Scientific Company, Guelph, ON) to localize antibodies binding.

Fluorescence microscopy

Cryosections (5 μ m) of fresh liver were fixed with cold acetone (-20°C) for 10 min or 4% paraformaldehyde in PBS pH 7.2 for 20 min at room temperature and rinsed in PBS or TBS (Tris Buffer Saline, 10mM Tris-HCl, 0.138M NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.4) upon staining protocols. For the detection of K8, sections were incubated with

rAb Troma 1 at room temperature, washed in PBS and incubated with a FITC (or TRITC) conjugated goat anti-rat (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON) for 45 min at room temperature. For immunostaining of K18 (P)-ser-33, sections were incubated 1 hour at room temperature with anti-K18 pS33 (8250) diluted in PBS containing 10% BSA, washed in PBS and incubated for 45 min with a FITC conjugated donkey anti-rabbit antibody in PBS containing 10% BSA (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON). Immunostaining of phosphorylated keratin 8 was done with anti-K8 pS79 (LJ4) and anti-K8 pS436 (5B3) mAbs, using the M.O.M. (mouse on mouse) detection kit (Vector® Laboratories Canada, Burlington, ON) and an Avidin/Biotin blocking kit (Vector® Laboratories Canada, Burlington, ON) according to recommendations of the company. Normal horse serum (Vector® Laboratories Canada, Burlington, ON) was added to solution during incubation step with secondary antibody. For heat shock proteins staining, liver sections were incubated with anti-HSP 70i diluted in TBS containing 10% BSA for 45 min at 37°C, washed in TBS and incubated for 45 min at 37°C with a FITC conjugated donkey anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON) diluted in TBS containing 10% BSA. For detection of HSP 70i and K8 pS79 (or K8 pS436), the sections were treated with Nonidet P-40 1% (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON) following fixing step with 4% paraformaldehyde. The tissues were mounted in P-phenylene diamine diluted in glycerol 50% (V/V). The slides were kept at -20°C and photomicrographs were collected using an Olympus® BX60 photomicroscope.

Authors' contributions

MF carried out all western blotting analyses, performed the immunofluorescence studies and participated in drafting the manuscript. LV participated in the design of the study. MC participated in the design of study, its coordination and drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr B. Omary from the Department of Medicine, Palo Alto VA Medical Center and Stanford University, Palo Alto, California, for providing antibodies directed against phosphorylated keratins. We also thank Dr N. Marceau from the

Centre de recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Québec, for providing Troma 1 and FVB/n mice.

This work was supported by a grant from NSERC.

References

1. Lazarides E: **Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space.** *Nature* 1980, **283**(5744):249-256.
2. Fuchs E, Weber K: **Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease.** In: *Annu Rev Biochem.* vol. 63; 1994: 345-382.
3. Schliwa M: **"The Cytoskeleton. Cell Biology Monographs,"**. In. Edited by Springer-Verlag, vol. 13. New York: Wien; 1986.
4. Herrmann H, Hesse M, Reichenzeller M, Aepli U, Magin TM: **Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation.** *Int Rev Cytol* 2003, **223**:83-175.
5. Steinert PM, Roop DR: **Molecular and cellular biology of intermediate filaments.** *Annu Rev Biochem* 1988, **57**:593-625.
6. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R: **The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.** *Cell* 1982, **31**(1):11-24.
7. Vassar R, Coulombe PA, Degenstein L, Albers K, Fuchs E: **Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease.** *Cell* 1991, **64**(2):365-380.
8. Fuchs E, Cleveland DW: **A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease.** *Science* 1998, **279**(5350):514-519.
9. Coulombe PA, Omary MB: **'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**(1):110-122.
10. Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, Hebert A, Paller AS, Fuchs E: **Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses.** *Cell* 1991, **66**(6):1301-1311.
11. Porter RM, Lane EB: **Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function.** *Trends Genet* 2003, **19**(5):278-285.
12. Loranger A, Duclos S, Grenier A, Price J, Wilson-Heiner M, Baribault H, Marceau N: **Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity.** *Am J Pathol* 1997, **151**(6):1673-1683.
13. Ku NO, Michie S, Oshima RG, Omary MB: **Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant.** *J Cell Biol* 1995, **131**(5):1303-1314.
14. Denk H, Krepler R, Lackinger E, Artlieb U, Franke WW: **Immunological and biochemical characterization of the keratin-related component of Mallory bodies: a pathological pattern of hepatocytic cytokeratins.** *Liver* 1982, **2**(3):165-175.

15. Hazan R, Denk H, Franke WW, Lackinger E, Schiller DL: **Change of cytokeratin organization during development of Mallory bodies as revealed by a monoclonal antibody.** *Lab Invest* 1986, **54**(5):543-553.
16. Jensen K, Gluud C: **The Mallory body: theories on development and pathological significance (Part 2 of a literature survey).** *Hepatology* 1994, **20**(5):1330-1342.
17. Jensen K, Gluud C: **The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies (Part 1 of a literature survey).** *Hepatology* 1994, **20**(4 Pt 1):1061-1077.
18. Denk H, Stumptner C, Zatloukal K: **Mallory bodies revisited.** *J Hepatol* 2000, **32**(4):689-702.
19. Ku NO, Darling JM, Krams SM, Esquivel CO, Keeffe EB, Sibley RK, Lee YM, Wright TL, Omary MB: **Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(10):6063-6068.
20. Ku NO, Gish R, Wright TL, Omary MB: **Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease.** *N Engl J Med* 2001, **344**(21):1580-1587.
21. Ku NO, Wright TL, Terrault NA, Gish R, Omary MB: **Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis.** *J Clin Invest* 1997, **99**(1):19-23.
22. Liao J, Ku NO, Omary MB: **Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells.** *J Biol Chem* 1997, **272**(28):17565-17573.
23. Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D: **Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro.** In: *Subcell Biochem.* vol. 31; 1998: 105-140.
24. Toivola DM, Zhou Q, English LS, Omary MB: **Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**(6):1857-1870.
25. Denk H, Gschnait F, Wolff K: **Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation.** *Lab Invest* 1975, **32**(6):773-776.
26. Ku NO, Zhou X, Toivola DM, Omary MB: **The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease.** *Am J Physiol* 1999, **277**(6 Pt 1):G1108-1137.
27. Cadrin M, Hovington H, Marceau N, McFarlane-Anderson N: **Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver.** *J Hepatol* 2000, **33**(2):199-207.
28. Salminen WJ, Voellmy R, Roberts S: **Induction of hsp 70 in HepG2 cells in response to hepatotoxicants.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1996, **141**(1):117-123.
29. Liao J, Lowthert LA, Omary MB: **Heat stress or rotavirus infection of human epithelial cells generates a distinct hyperphosphorylated form of keratin 8.** *Exp Cell Res* 1995, **219**(2):348-357.
30. Stumptner C, Omary MB, Fickert P, Denk H, Zatloukal K: **Hepatocyte cytokeratins are hyperphosphorylated at multiple sites in human alcoholic hepatitis and in a mallory body mouse model.** *Am J Pathol* 2000, **156**(1):77-90.
31. Urban K, Hewicker-Trautwein M: **Fixation-dependent vimentin immunoreactivity of mono- and polyclonal antibodies in brain tissue of cattle, rabbits, rats and mice.** *Acta Histochem* 1994, **96**(4):365-377.

32. Scott CA, Ibba M, Mura A, Rubino S, Saba F, Massarelli G: **Vimentin-typing in diagnostic surgical pathology: a comparative study using four antibodies after different fixations.** *Basic Appl Histochem* 1987, **31**(1):91-102.
33. Baribault H, Penner J, Iozzo RV, Wilson-Heiner M: **Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice.** *Genes Dev* 1994, **8**(24):2964-2973.
34. Baribault H, Price J, Miyai K, Oshima RG: **Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8.** *Genes Dev* 1993, **7**(7A):1191-1202.
35. Gilbert S, Loranger A, Daigle N, Marceau N: **Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation.** *J Cell Biol* 2001, **154**(4):763-773.
36. Marceau N, Loranger A, Gilbert S, Daigle N, Champetier S: **Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease.** In: *Biochem Cell Biol.* vol. 79; 2001: 543-555.
37. Omary MB, Ku NO, Toivola DM: **Keratins: guardians of the liver.** *Hepatology* 2002, **35**(2):251-257.
38. Ku NO, Omary MB: **Expression, glycosylation, and phosphorylation of human keratins 8 and 18 in insect cells.** *Exp Cell Res* 1994, **211**(1):24-35.
39. Ku NO, Azhar S, Omary MB: **Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation.** *J Biol Chem* 2002, **277**(13):10775-10782.
40. Ku NO, Liao J, Chou CF, Omary MB: **Implications of intermediate filament protein phosphorylation.** *Cancer Metastasis Rev* 1996, **15**(4):429-444.
41. Ku NO, Michie SA, Soetikno RM, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB: **Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice.** *J Cell Biol* 1998, **143**(7):2023-2032.
42. Knasmuller S, Parzefall W, Helma C, Kassie F, Ecker S, Schulte-Hermann R: **Toxic effects of griseofulvin: disease models, mechanisms, and risk assessment.** *Crit Rev Toxicol* 1997, **27**(5):495-537.
43. Stege GJ, Li L, Kampinga HH, Konings AW, Li GC: **Importance of the ATP-binding domain and nucleolar localization domain of HSP72 in the protection of nuclear proteins against heat-induced aggregation.** *Exp Cell Res* 1994, **214**(1):279-284.
44. Welch WJ, Feramisco JR: **Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells.** *J Biol Chem* 1984, **259**(7):4501-4513.
45. Kawahara H, Cadrin M, French SW: **Ethanol-induced phosphorylation of cytokeratin in cultured hepatocytes.** *Life Sci* 1990, **47**(10):859-863.
46. Cadrin M, Anderson NM, Aasheim LH, Kawahara H, Franks DJ, French SW: **Modifications in cytokeratin and actin in cultured liver cells derived from griseofulvin-fed mice.** *Lab Invest* 1995, **72**(4):453-460.
47. Ku NO, Liao J, Omary MB: **Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins.** *Embo J* 1998, **17**(7):1892-1906.
48. Ku NO, Michie S, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB: **Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(7):4373-4378.

49. Ku NO, Omary MB: **Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431.** *J Biol Chem* 1997, **272**(11):7556-7564.
50. Liao J, Lowthert LA, Ghorri N, Omary MB: **The 70-kDa heat shock proteins associate with glandular intermediate filaments in an ATP-dependent manner.** *J Biol Chem* 1995, **270**(2):915-922.
51. Ku NO, Omary MB: **Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion.** *J Cell Biol* 2000, **149**(3):547-552.
52. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY: **Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance.** *J Biol Chem* 1997, **272**(29):18033-18037.
53. Stumptner C, Fuchsbichler A, Lehner M, Zatloukal K, Denk H: **Sequence of events in the assembly of Mallory body components in mouse liver: clues to the pathogenesis and significance of Mallory body formation.** *J Hepatol* 2001, **34**(5):665-675.
54. He T, Stepulak A, Holmstrom TH, Omary MB, Eriksson JE: **The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase.** *J Biol Chem* 2002, **277**(13):10767-10774.
55. Boller K, Kemler R, Baribault H, Doetschman T: **Differential distribution of cytokeratins after microinjection of anti-cytokeratin monoclonal antibodies.** *Eur J Cell Biol* 1987, **43**(3):459-468.
56. Laemmli U: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**(259):680-685.
57. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R: **Protein measurement with the Phenol folin reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**:265-275.

Figure 1 - Biochemical analysis of livers from C3H and FVB/n mice.

Western blots from C3H mice livers; A, K8 and HSP70; C, K8 pS79; E, K18 pS33; G, K8 pS436. Western blots from FVB/n mice livers; B, K8; D, K8 pS79; F, K18 pS33.

Figure 2 - Distribution of keratin IFs and HSP70i in hepatocytes from control and GF-fed C3H mice.

A, C, E keratin IFs; B, D, F HSP70i; A, B) control; C, D) 2 weeks treatment; E, F) 5 months treatment. **Arrows** in G and H indicate reactive MBs with Troma 1 (anti-K8) and anti-HSP70i, respectively.

Figure 3 - Distribution of keratin IFs and K8 pS79 in hepatocytes from control and GF-fed C3H mice.

A, C, F, I keratin IFs; B, D, E, G, H, J P K8 ser73; A, B) control; C, D, E) 2 weeks treatment; F, G, H 6 weeks treatment; I, J 5 months treatment. **Arrow** in D indicates clusters of cells containing K8 pS79. **Empty arrowheads** in I and J indicate MBs reactive with Troma 1 but not with LJ4 (anti-K8 pS79), respectively.

Figure 4 - Distribution of keratin IFs and K8 pS436 in hepatocytes from control and GF-fed C3H mice.

A, C, E, G keratin IFs; B, D, F, H K8 pS436; A, B) control; C, D) 2 weeks treatment; E, F) 6 weeks treatment; G, H); 5 months treatment. **Arrows** in D indicate clusters of cells containing K8 pS436. **Filled arrowheads** indicate reactive MBs with Troma 1 and 5B3 (anti-K8 pS436), respectively.

Figure 5 - Distribution of keratin IFs and K18 pS33 in hepatocytes from control and GF-fed C3H mice.

A, C, E, G keratin IFs; B, D, F, H K18 pS33; A, B) control; C, D) 2 weeks treatment; E, F) 6 weeks treatment; G, H) 5 months treatment. **Asterisk** shows a hepatocyte containing a high level of K18 pS33; **arrow** indicates a dilated bile canaliculi. **Filled arrowheads** in G and H indicate reactive MBs with Troma 1 and Ab8250 (anti-K18 pS33), respectively.

Figure 6 - Distribution of phosphorylated keratin IFs in hepatocytes from GF-fed C3H mice.

A, C K8 pS79; B, D K8 pS436; A, B, C, D 2 weeks treatment. **Arrows** in A and B indicate clusters of hepatocytes containing both K8 pS79 and K8 pS436. Note: reactivity in nuclei observed in A, B, C and D represents non-specific staining due to the secondary antibody.

Figure 7 - Distribution of keratin IFs and K8 pS79 in hepatocytes from control and GF-fed C3H mice.

A, C, F, I keratin IFs; B, D, E, G, H, J, K P K8 ser73; A, B) control; C, D, E) 2 weeks treatment; F, G, H 6 weeks treatment; I, J, K 5 months treatment. **Arrow** in D indicates clusters of cells containing K8 pS79; **asterisk** shows a damaged hepatocyte. **Filled arrowheads** in I and J indicate MBs reactive with Troma 1 and LJ4 (anti-K8 pS79), respectively; **empty arrowheads** in I and J indicate MBs reactive with Troma 1 but not with LJ4 (anti-K8 pS79), respectively.

Figure 8 - Distribution of keratin IFs and K8 pS79 in hepatocytes from GF-fed FVB/n mice.

A, C keratin IFs; B, D K8 pS79; A, B, C, D 4 months treatment. **Asterisks** in A and B indicate MBs reactive with Troma 1 but not with LJ4; **arrows** in C and D indicate MBs reactive with Troma 1 and LJ4, respectively.

Figure 9 - Distribution of phosphorylated keratin IFs and HSP70i in hepatocytes from GF-fed C3H mice.

A K8 pS79; B, D HSP70i; C K8 pS436; A, B, C, D 2 weeks treatment. **Arrows** in A and B indicate cells in which HSP70i and K8 pS79 colocalized. **Arrows** in C and D indicate cells in which HSP70i and K8 pS436 colocalized.

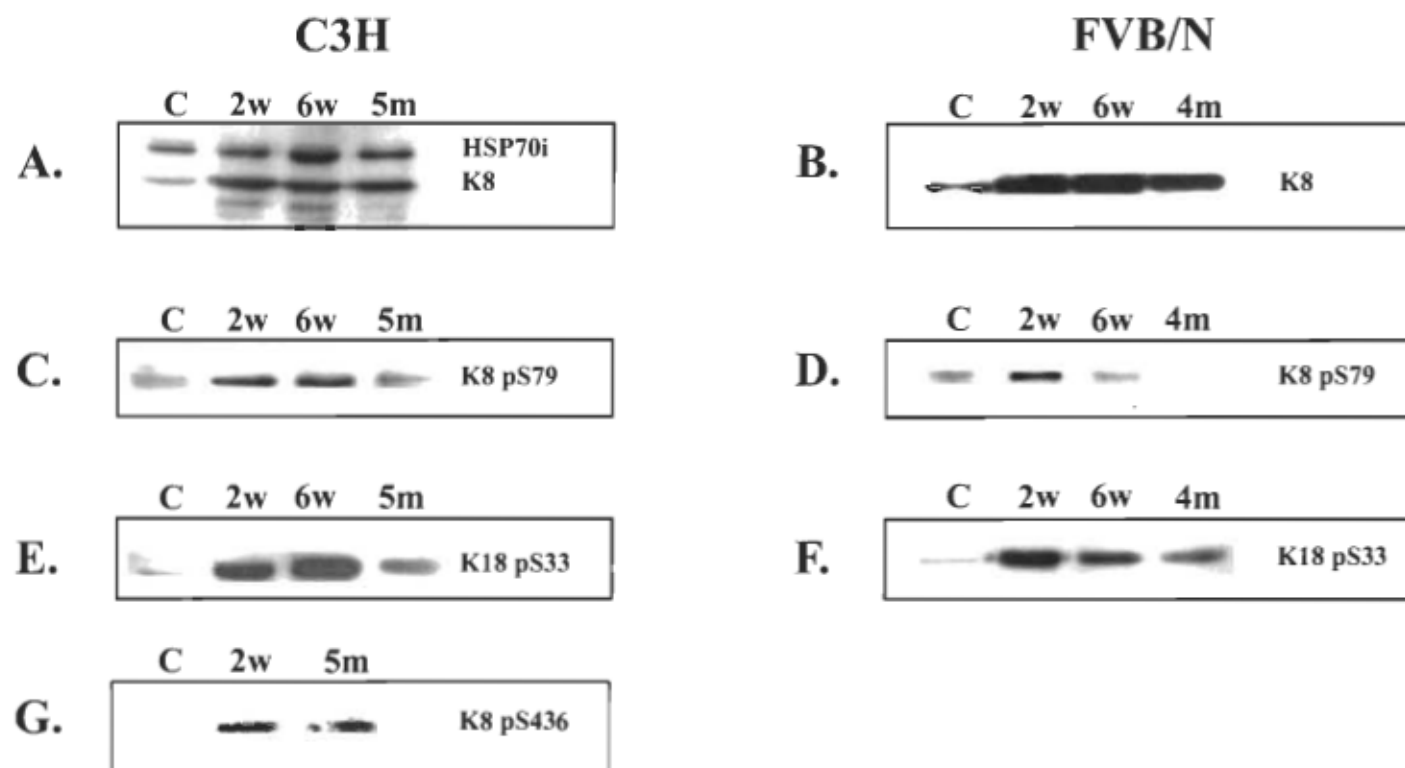


Figure 1

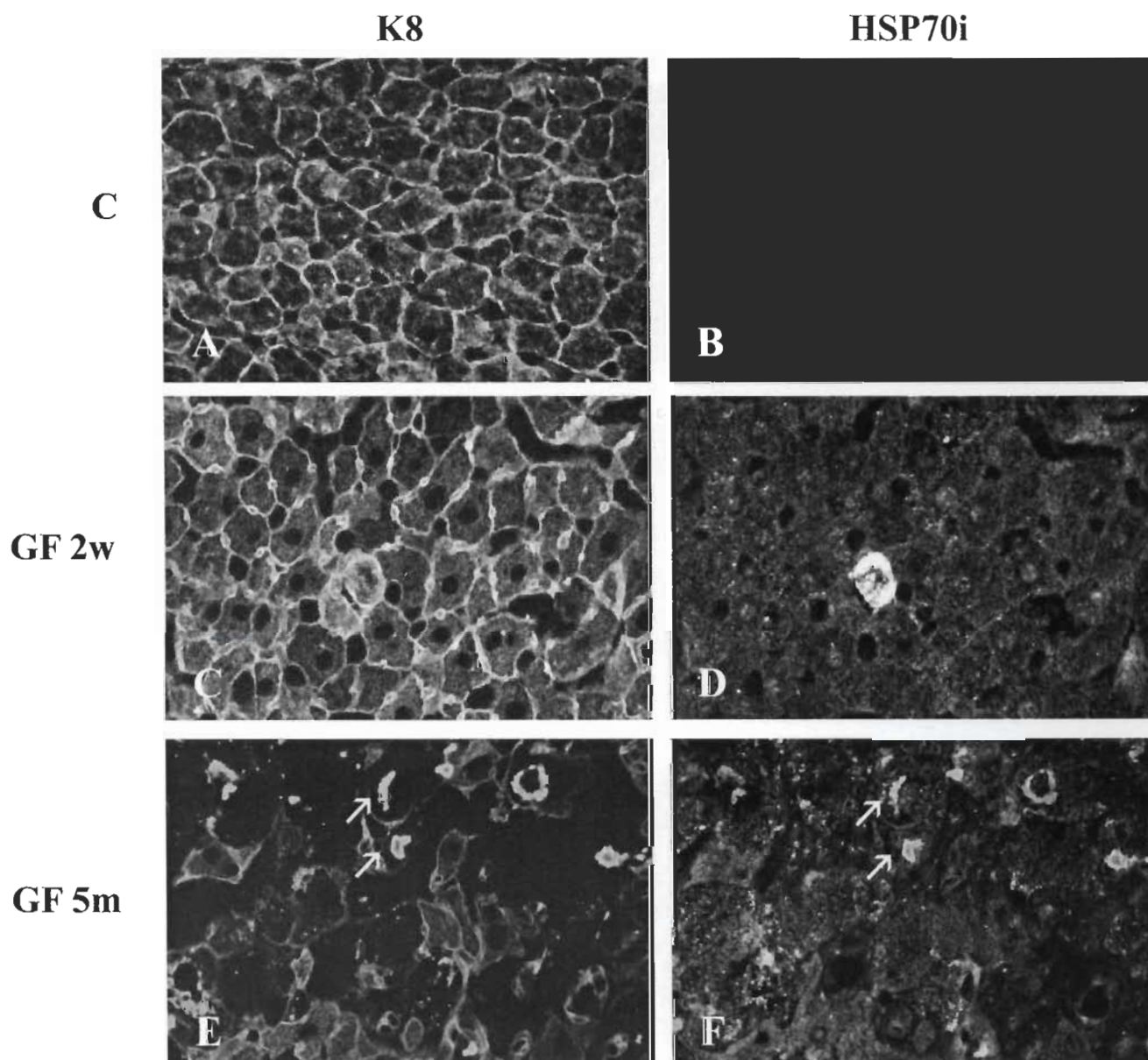


Figure 2

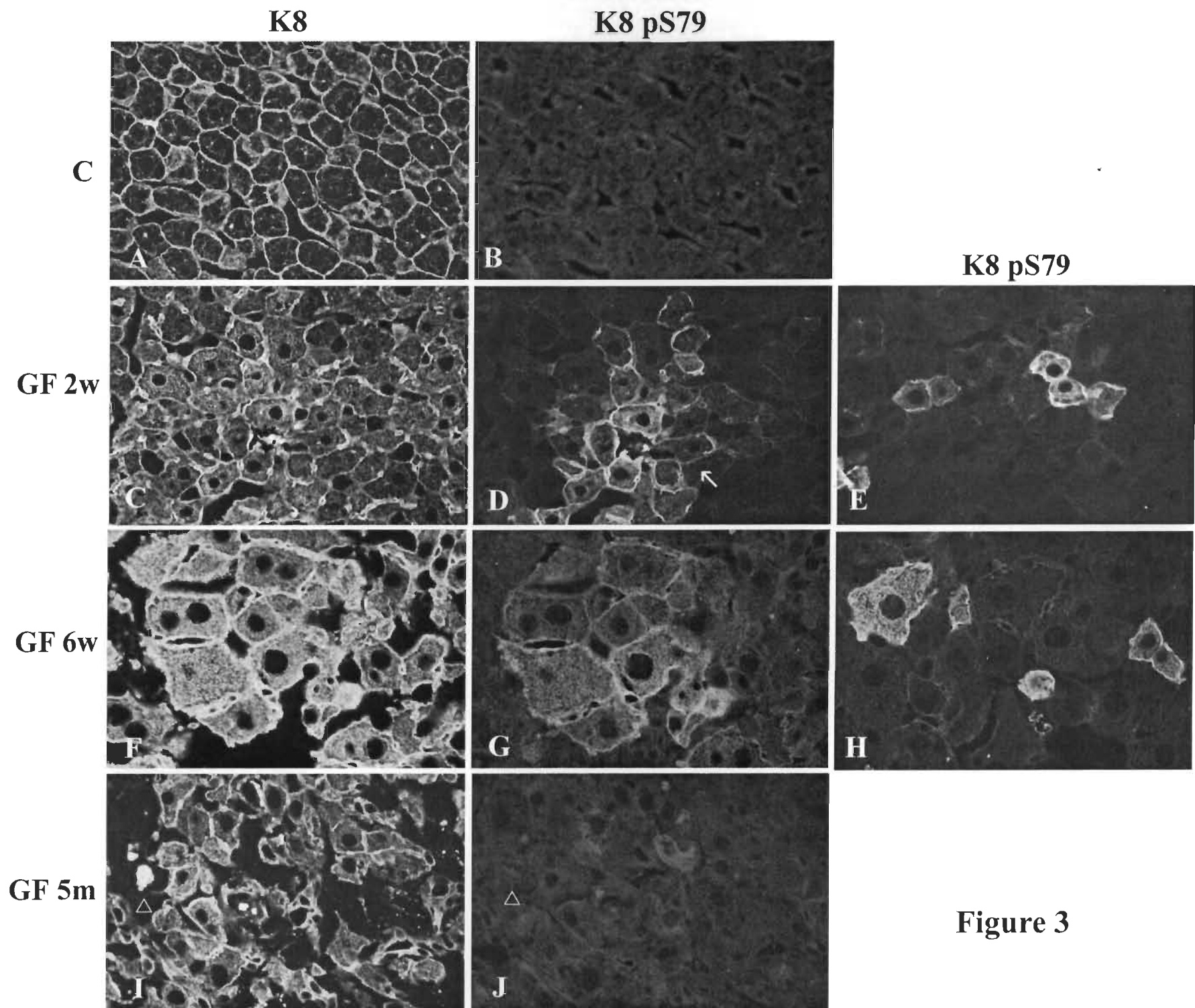
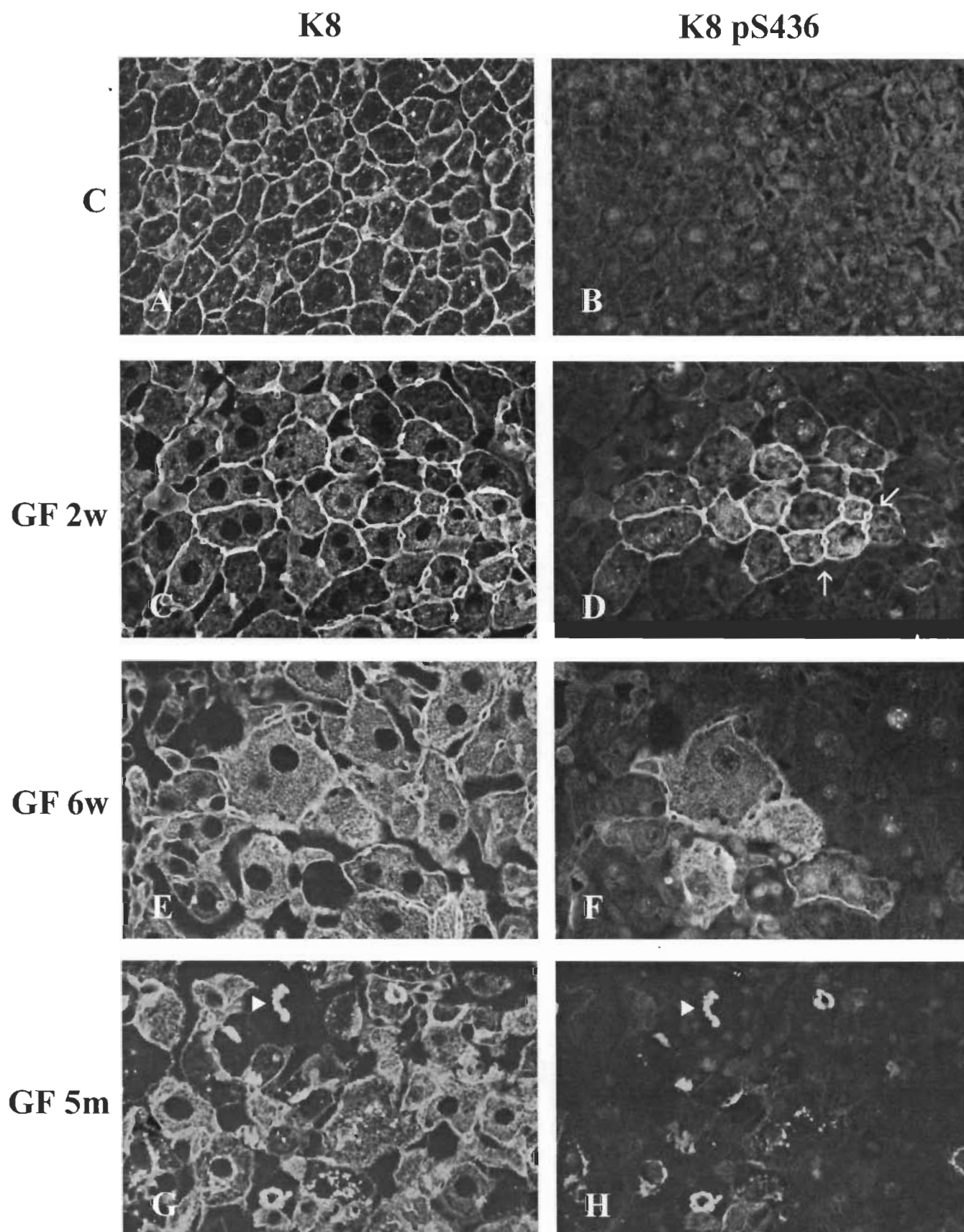
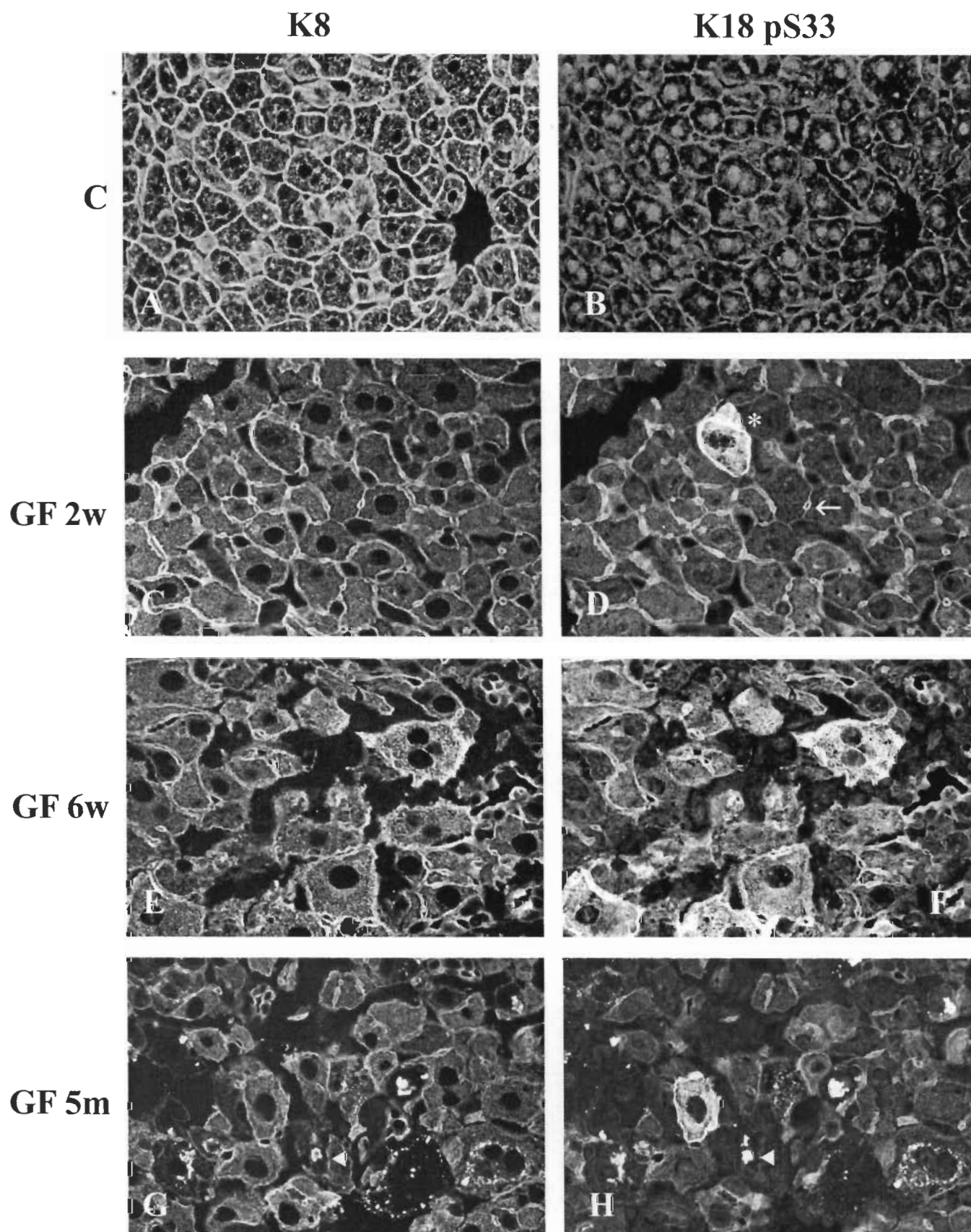


Figure 3

**Figure 4**

**Figure 5**

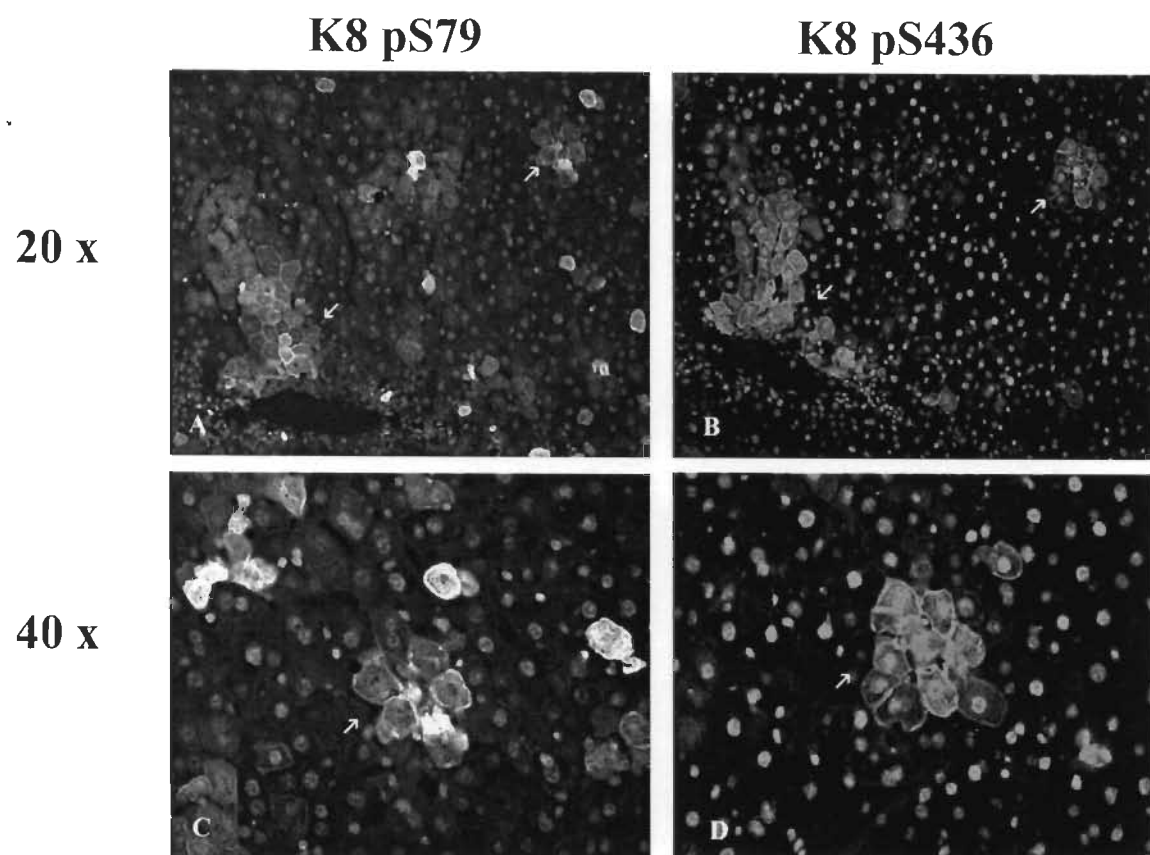
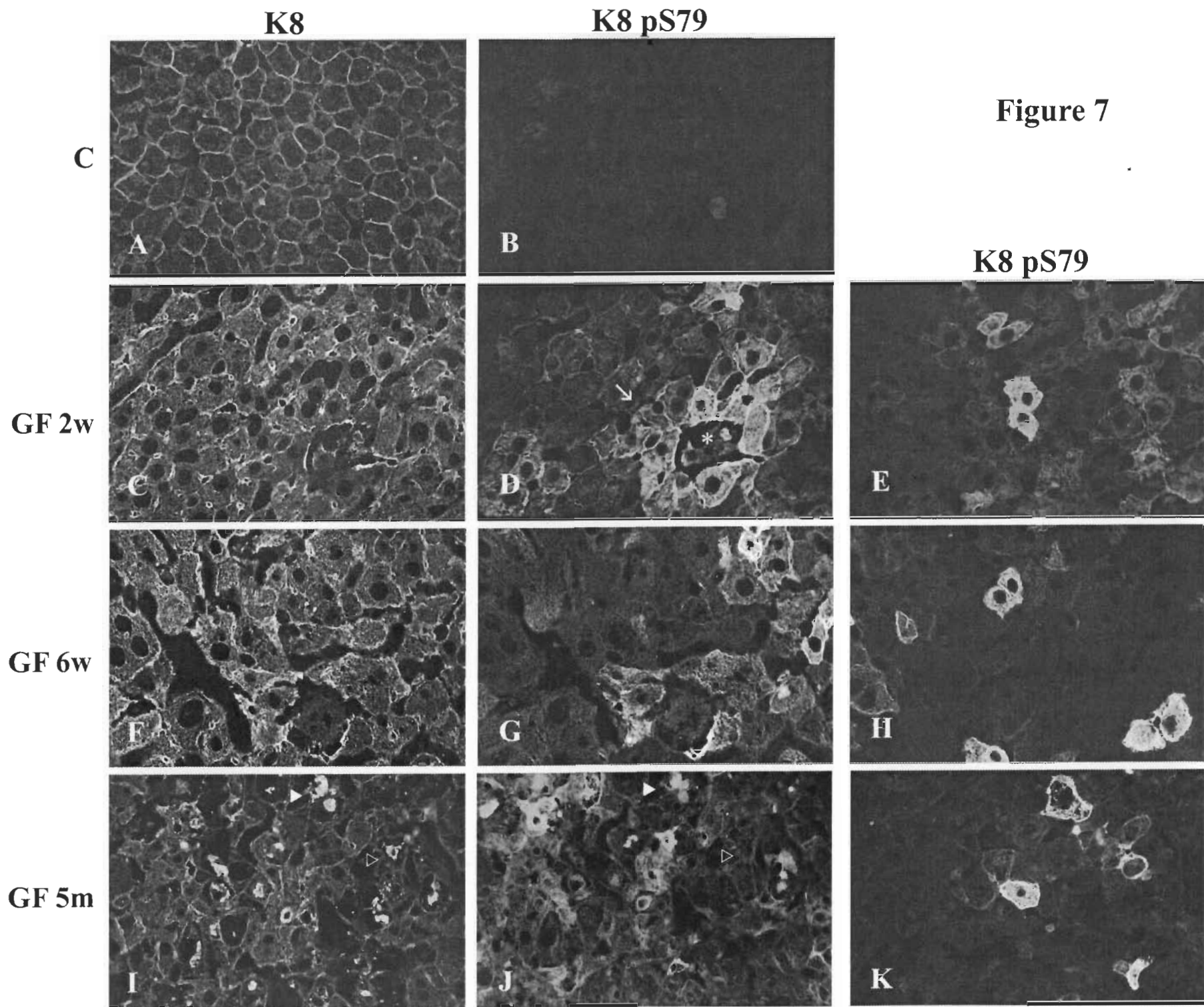


Figure 6



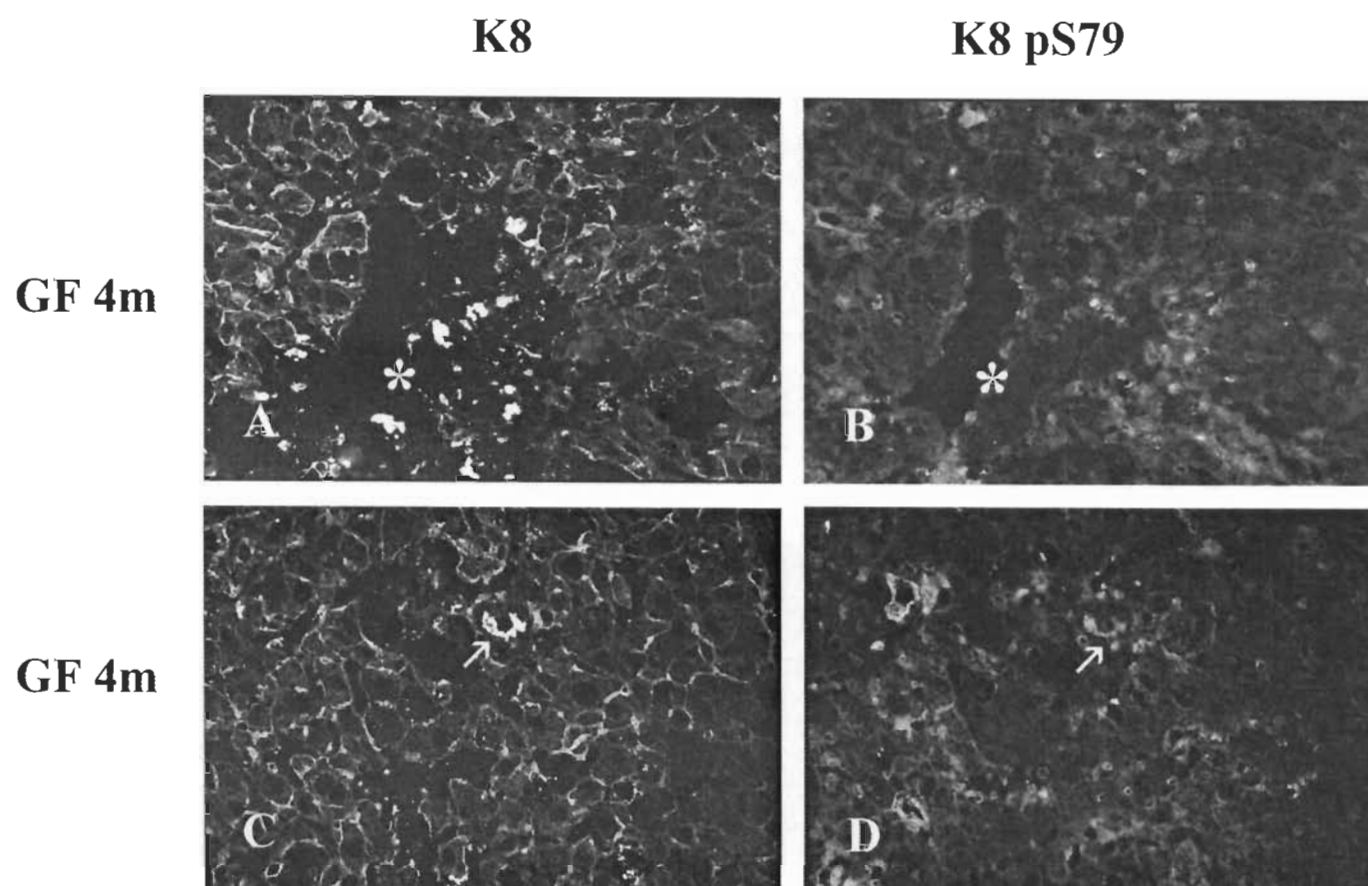


Figure 8

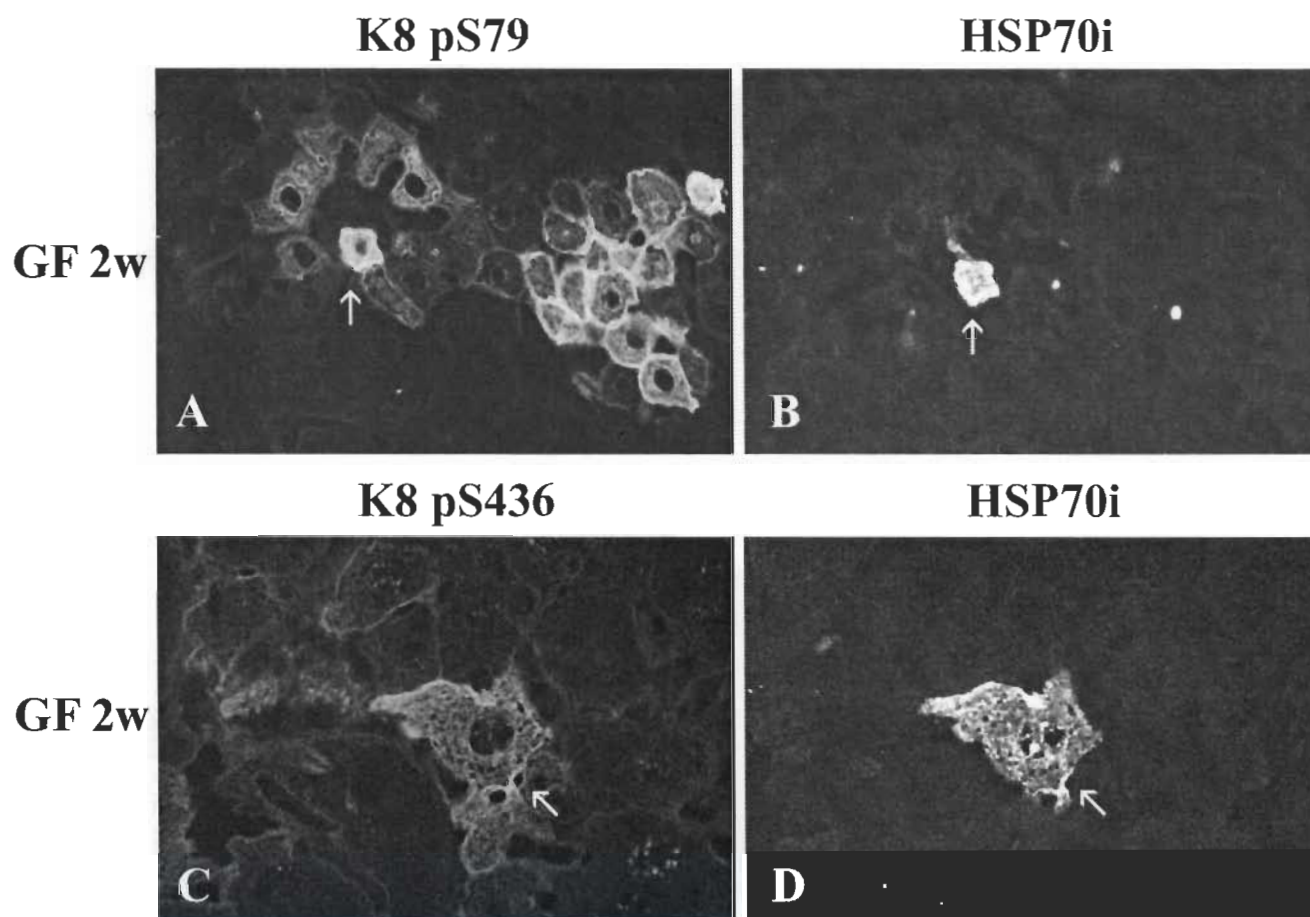


Figure 9

CONCLUSION

Nos résultats montrent que l'intoxication chronique, à la GF, de souris de lignée C3H entraîne la formation dans les hépatocytes d'agrégats, les CMs, qui contiennent des protéines de FIs les K8/18[8, 10, 15]. La formation de CMs est aussi observée dans les hépatocytes de la lignée de souris FVB/n (tableau 8).

TABLEAU 8.1
Tableau récapitulatif des résultats obtenus par immunofluorescence
et Western blot

	lignée C3H				lignée FVB/n			
	traitement à la griséofulvine							
espèce protéique étudiée	contrôle	2 sem ¹	6 sem	5 m ²	contrôle	2 sem	6 sem	4 m
K8/18 totales	++	++++	+++	+++	++	++++	+++	+++
HSP70	+	++	+++	++	+	++	+++	++
P K8 Ser79	+	+++	+++	+	+	+++	+	-
P K8 Ser436	-	+++	++	++	-	+++	++	++
P K18 Ser33	+	+++	++++	++	+	+++	++	++
Formation des CMs	oui				oui			

¹ sem : semaine

² m : mois

Dans les deux types de souris, des modifications morphologiques soit l'augmentation du volume des hépatocytes et la dilatation des canalicules biliaires précèdent la formation des CMs. Nos résultats montrent aussi que ces changements sont associés à une augmentation de l'expression et du niveau de phosphorylation des K8/18, au cours de la période qui précède la formation des CMs (tableau 8). Le traitement à la GF entraîne aussi une hausse de l'expression de HSP70i dans tous les hépatocytes. HSP70 est une chaperonne moléculaire dont l'expression peut être induite lorsque les

cellules sont placées en situation non-physiologique c'est-à-dire exposée à des agents toxiques de nature chimique ou physique [59, 60]. Au niveau biochimique, l'augmentation de l'expression de HSP70i est déjà perceptible après deux semaines de traitement avec la GF et cette modification est maintenue pendant toute la durée du traitement. Par immunofluorescence, on observe que HSP70i est localisée au niveau de la membrane plasmique et dans le noyau. La distribution particulière de HSP70i dans les hépatocytes traités à la GF est caractéristique des cellules stressées [94]. La présence de HSP70i démontre que la GF qui induit un stress oxydatif [95], déclenche des voies de signalisation cellulaire impliquées dans la protection des hépatocytes face à la présence de la drogue [96].

Des études menées précédemment dans notre laboratoire ont montré que l'intoxication de souris avec la GF est associée à une augmentation générale de la phosphorylation de K8/18 [97, 98]. Dans la présente étude, nous montrons que le traitement avec la GF est associé à une augmentation de la phosphorylation de K8/18 sur des sites spécifiques: K8 Ser79, K8 ser436 et K18 ser33. La distribution tissulaire des kératines phosphorylées est différente selon le site de phosphorylation considéré. Parmi les différents sites de phosphorylation étudiés, P K18 ser33 est l'épitope phosphorylé dont le patron de distribution ressemble le plus à celui de HSP70i. Comme c'est le cas pour HSP70i, la P K18 ser33 est présente et augmentée dans tous les hépatocytes de souris traitées à la GF. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que la phosphorylation de K18 ser33 joue un rôle dans la réorganisation des kératines durant la mitose et module l'association de K8/18 aux protéines 14-3-3 [72, 73]. Nous proposons, dans notre modèle d'intoxication à la GF, que la phosphorylation de K18 ser33 jouerait un rôle dans la réorganisation des FIs qui est observée au cours du traitement. De plus, la phosphorylation de K18 ser33 étant augmentée dans tous les hépatocytes, ce mécanisme pourrait être impliqué activement dans la réponse des hépatocytes face au stress en participant à la relocalisation ou au recrutement de molécules impliquées dans les voies de signalisation cellulaire induites par la présence de la GF.

À la différence de K18 ser33, les épitopes phosphorylées K8 Ser79 et K8 ser436 ne sont pas observés dans les hépatocytes de souris contrôles. Après 2 à 6 semaines de traitement, une augmentation de la phosphorylation au niveau de ces sites est observée.

Contrairement à K18 ser33 et HSP70i, la phosphorylation de K8 Ser79 et K8 ser436 est présente au niveau de cellules isolées (simplets ou doublets) ou de groupes de cellules. P K8 Ser79 est présent dans un plus grand nombre de cellules, comparativement à P K8 ser436. La présence de doublets suggère que ces cellules marquées soient en cours de mitose. Cette observation est en accord avec des études *in vivo* réalisées par Stumptner et collaborateurs, montrant la présence de doublets de cellules marquées pour P K8 Ser79 suite à l'intoxication au DDC, un traitement qui induit la formation de CMs à long terme [99]. La disparité entre le marquage pour P K8 Ser79 et P K8 ser436 suggère que différentes kinases sont impliquées dans l'ajout de phosphate au niveau de ces sites.

Nous avons noté que P K8 Ser79 et P K8 ser436 se retrouvent aussi au niveau d'amas cellulaires, localisés souvent près des vaisseaux hépatiques ou des canaux biliaires. Au centre des amas cellulaires marqués pour P K8 Ser79 et P K8 ser436, on observe souvent la présence de cellules non-marquées à l'aspect endommagé, qui ont des caractéristiques de cellules en cours d'apoptose. Nous proposons que ces cellules endommagées transmettent un signal aux cellules avoisinantes, signal qui entraînerait l'activation de kinases impliquées dans la phosphorylation de K8. K8 Ser79 et K8 ser436 sont des sites dont la phosphorylation est associée aux situations de stress et à l'apoptose [76, 77]. La phosphorylation de K8 Ser79 ou K8 ser436 dans ces hépatocytes pourrait suggérer qu'ils sont destinés à entrer en apoptose. Cependant, l'analyse pour détecter les cellules en apoptose dans les foies de souris intoxiquées à la GF, n'a montré que peu d'hépatocytes en apoptose. De plus, des groupes de cellules, tel que détecté avec le marquage pour P K8 Ser79 ou P K8 ser436, n'ont pas été observés dans le tissu (non présenté). Nous postulons donc qu'un signal, en provenance des cellules endommagées, activerait dans les hépatocytes environnants des kinases spécifiques qui phosphoryleraient les kératines et protégeraient ces cellules contre l'apoptose induite par la présence de GF. Cette hypothèse est en accord avec le concept selon lequel K8/18 joue un rôle essentiel dans la protection des cellules contre l'apoptose [7, 32].

Nous avons donc étudié la possibilité d'une relation entre la phosphorylation de K8/18 et la présence de HSP70i dans les hépatocytes. Des études *in vitro* réalisées par Quinlan et collaborateurs ont montré que HSP 27 peut modifier la solubilité de la vimentine, suggérant la possibilité d'une association physique entre les protéines de

stress et les protéines de FIs dans les cellules[90, 100]. Nos résultats obtenus, par analyse biochimique, montrent une augmentation simultanée de la phosphorylation de K8/18 et de l'expression de HSP70i dans les hépatocytes. Nous avons donc envisagé l'hypothèse suivante : si la phosphorylation de K8/18 et l'expression de HSP70i sont tous deux indicateurs de la réponse à un stress cellulaire, des hépatocytes contenant une quantité importante de HSP70i pourraient aussi contenir des kératines 8 et 18 phosphorylées. La phosphorylation de K8 (sérines 73 et 436) a été particulièrement étudiée, Liao et collaborateurs ayant montré que l'association de HSP70 avec les filaments formés de K8/18 se fait préférentiellement avec K8[89]. Nos résultats obtenus par immunofluorescence, indiquent qu'il n'y a pas de relation directe entre l'augmentation de l'expression de HSP70 et la phosphorylation de K8 au niveau de ser73 et ser436. Comme mentionné précédemment, la phosphorylation de K8/18 se retrouve dans des groupes de cellules et HSP70i est augmentée dans toutes les cellules. Cependant, un certain nombre d'hépatocytes contenant à la fois des hauts niveaux de HSP70i et de K8 phosphorylée ont été observées. L'observation de ces hépatocytes montre que HSP70i et K8 phosphorylée sur la sérine 73 ou 436 colocalisent au niveau du cytoplasme et de la membrane cellulaire. Cela indique que, contrairement aux expériences antérieures réalisées *in vitro* [89], HSP70 peut s'associer avec les filaments formés par K8/18 au niveau de la fraction insoluble des FIs dans les hépatocytes.

L'analyse de nos résultats amène à conclure que l'activation des kinases impliquées dans la phosphorylation de K8/18 et l'activation de l'expression de HSP70 dans les hépatocytes sont des mécanismes cellulaires dont les facteurs déclencheurs sont différents. Il est clair que la présence de la drogue constitue le stimulus de départ pour une réponse cellulaire qui entraîne la phosphorylation de K8/18 de même que l'expression de HSP70i. La mise en branle de ces mécanismes ne semble cependant pas avoir lieu dans toutes les cellules de la même façon. L'augmentation de l'expression de HSP70i dans les hépatocytes peut être la conséquence de son activité de chaperonne mais aussi de ses propriétés anti-apoptotiques[88, 101]. Il a déjà été montré que HSP70i inhibe l'activation d'enzymes comme les kinases JNK et p38, impliqués dans les processus de signalisation cellulaire initiant l'apoptose[101-103]. Récemment, des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que K8 est un substrat des kinases activées par le

stress p38 et JNK, respectivement[78, 79]. JNK et p38 font partie de la famille des « *mitogen-activated protein* » kinases (MAPK) et leur activité peut être stimulée dans diverses situations de stress comme l'inflammation, les stress de nature physique et chimique ou l'apoptose [104]. HSP70i peut donc être induite dans les hépatocytes pour moduler les mécanismes cellulaires impliquant les kinases pro-apoptotiques telles que JNK ou p38, comme, par exemple, la phosphorylation de K8/18 au niveau de sites spécifiques. De plus dans notre laboratoire, une étude *in vivo*, réalisée sur des lignées de souris FVB/n, a montré la présence de HSP70i en grande quantité dans les hépatocytes en apoptose comparativement aux hépatocytes normaux en utilisant la méthode TUNEL (données non publiées). Dans ce contexte, il est fort possible que l'induction de HSP70 et la phosphorylation de K8/18 soient des mécanismes qui participent à la modulation de l'apoptose dans les hépatocytes de souris intoxiquées à la GF. L'association de HSP70i aux FIs dans certaines cellules est peut-être la conséquence de la présence de phosphorylation au niveau de sites connus (ser73 ou ser436) ou inconnus et pourrait participer à la régulation d'autres mécanismes cellulaires comme la dégradation de K8/18 par les protéasomes. Ku et collaborateurs ont montré que la phosphorylation de K8/18 module leur ubiquitination et, par conséquent, leur recyclage cellulaire par les protéasomes [58]. Il est donc possible que HSP70i s'attache aux épitopes phosphorylés de K8 dans le but d'empêcher leur potentielle déphosphorylation par des phosphatases spécifiques. Un tel processus pourrait protéger K8/18 contre les mécanismes de dégradation cellulaire comme la voie des protéasomes. Cependant, cette hypothèse soulève plusieurs interrogations comme, par exemple, l'importance biologique d'un tel mécanisme (peu d'hépatocytes contiennent à la fois HSP70i et K8 Ser79 ou K8 ser436) ? Est-il possible que ce soit un processus séquentiel ? Est-ce que ce mécanisme est relié à une voie de signalisation cellulaire spécifique ou tout simplement à l'activité de chaperonne de HSP70i ?

Nos résultats montrent également que les souris C3H et FVB/n réagissent sensiblement de la même manière au stress induit par la GF c'est-à-dire que l'on observe dans les hépatocytes des deux types de souris, une augmentation de l'expression de HSP70, de K8/18 et de leur phosphorylation au niveau des sérines 73 et 436 sur K8 et 33 sur K18. À long terme, lorsqu'on note l'apparition des CMs, on voit que l'on retrouve

ces différentes espèces protéiques dans les cellules et également au niveau des agrégats de FIs. Ces observations suggèrent que ces mécanismes cellulaires spécifiques constituent des moyens de défense répandus à travers plusieurs lignées de souris dont le patrimoine génétique est différent. Cependant, on peut noter une différence de réaction des souris C3H et FVB/n en ce qui concerne la présence de l'épitope P K8 Ser79 au sein des CMs. Par immunofluorescence, on remarque que chez les souris C3H, l'épitope P K8 Ser79 est présent dans la plupart des CMs observés alors que dans le cas des souris FVB/n, la plupart des CMs ne contiennent pas l'épitope P K8 Ser79. Au niveau biochimique, on note une baisse importante de la phosphorylation de K8 sur la sérine 73 dans les hépatocytes de souris FVB/n intoxiquées à la GF alors qu'au niveau des souris C3H, cet épitope est encore présent dans les cellules. Ces observations sont intéressantes dans la mesure où elles nous amènent à évaluer la contribution de la phosphorylation des kératines dans les mécanismes de formation des CMs. La phosphorylation est une modification post-transcriptionnelle dynamique qui a été proposée comme jouant un rôle dans la modulation de la structure et la fonction des kératines[22, 32]. De plus, les modifications de la structure et de l'organisation des kératines ainsi que leur association avec d'autres protéines comme l'ubiquitine et les protéines de stress semblent constituer des facteurs favorisant l'agrégation au sein des CMs[15, 55]. L'ensemble des expériences déjà réalisées *in vivo* et *in vitro* indique que les CMs constituent des structures dynamiques en raison de la démonstration de la présence dans les CMs de plusieurs protéines (K8, K18, ubiquitine) et mécanismes cellulaires (phosphorylation, transglutamination) qui sont, biochimiquement parlant, très actifs[15, 105]. À cet égard, il a été proposé que les modifications post-traductionnelles des kératines comme, par exemple, la phosphorylation jouent un rôle dans les mécanismes de formation des CMs. Au sein des agrégats, la présence de plusieurs épitopes phosphorylés, localisés au niveau des kératines appuie cette hypothèse[15, 105]. Nos résultats ne remettent pas en cause l'importance de la phosphorylation dans les processus de formation des CMs de façon globale mais plutôt de façon spécifique. Le site P K8 Ser79 semble être présent dans les CMs d'hépatocytes de souris C3H alors qu'il ne l'est pas dans ceux des souris FVB/n. Cette observation implique, d'une part, que le patrimoine génétique du sujet ou de l'animal se révèle déterminant pour la réponse des hépatocytes face au stress. Ce résultat

est supporté par les études faites précédemment sur les souris transgéniques et chez l'humain qui ont montré que l'absence (ex: souris FVB/n K8 -/-) ou la mutation de K8 ou K18 (ex: cirrhose cryptogénétique humaine) peut modifier la réponse cellulaire face au stress et entraîner la fragilisation des hépatocytes, prédisposant le sujet à développer des maladies du foie[43, 45, 49-51]. D'autre part, elle suggère également que la phosphorylation de K8 sur la sérine 73 ne soit pas un mécanisme impliqué dans la formation et le maintien des CMs. L'absence de phosphorylation au niveau de K8 Ser79 dans certains CMs observés dans les hépatocytes de souris C3H traitées à la GF peut être également expliquée par l'inactivation de la ou des kinase(s) relative(s) à ce site. Les autres sites de phosphorylation étudiés (K8 ser436 et K18 ser33) sont retrouvés dans les CMs, quelle que soit la lignée considérée, ce qui implique que l'ajout de phosphate sur ces sérines pourrait probablement jouer un rôle dans les mécanismes de formation des agrégats de FIs.

Dans notre modèle expérimental, la diversité dans la phosphorylation des sérines sur K8/18, au niveau des CMs, pourrait être justifiée par des différences entre les hépatocytes dans le recyclage ou « *turnover* » des phosphates sur les kératines. Cela nous amène donc à considérer le rôle des kinases et des phosphatases potentiellement impliquées dans la phosphorylation de K8/18. Outre JNK et p38 déjà mentionnées, il existe un nombre important d'enzymes pouvant phosphoryler K8/18 comme la PKCε kinase, la CaM kinase, la S6 kinase, la MAP kinase et la cdc2 kinase[32, 106]. Dans le cas des phosphatases, quelques enzymes comme les phosphatases de type 1 et 2A ont été identifiées[107, 108]. Le grand nombre de molécules déjà connues contribue à montrer l'importance de la phosphorylation en tant que mécanisme de régulation dynamique des kératines. Il est clair que les conditions d'activation ou d'inactivation de ces enzymes vont directement moduler tous les processus ou fonctions qui sont associé(e)s à la phosphorylation de sérines spécifiques sur K8 ou K18, au cours du développement de l'hépatite et lors de la formation des CMs. Une étude réalisée *in vitro* a montré que l'exposition chronique de cultures primaires d'hépatocytes de rats à l'éthanol peut entraîner l'inactivation, à long terme, de JNK qui est une kinase activée par le stress [109] et dont K8 est un substrat[79]. Ainsi dans des conditions physiologiques ou de stress, il serait possible que les kinases associées à K8/18 soient inhibées et ne puissent

plus phosphoryler les sérines sur les protéines de FIs, expliquant du fait même les différences observées au niveau des sites étudiés (K8 Ser79 comparativement à K8 ser436 et K18 ser33). Dans les hépatocytes de souris C3H, on n'observerait pas P K8 Ser79 dans tous les CMs parce que les hépatocytes ne sont pas tous affectés uniformément par la GF, de la même manière que les CMs ne se forment pas en même temps dans la totalité des hépatocytes. De plus, comme l'ont suggéré des études précédentes, on peut penser que la phosphorylation des sérines sur K8/18 serait un processus séquentiel[105]; ce qui expliquerait que, selon de la lignée de souris concernée, on observe la présence de kératines phosphorylées ou non dans les CMs de souris traitées à la GF pendant la même période de temps. Cela se traduirait, au niveau cellulaire, par l'inactivation ou l'activation plus ou moins rapide de kinases associées à des sérines spécifiques dans un « background » génétique donné comparativement à un autre. Un tel processus d'inhibition des kinases associées à K8/18 aurait des conséquences importantes sur l'homéostasie cellulaire étant donné que la phosphorylation participe à la régulation des kératines à plusieurs niveaux comme leur structure, leur localisation intracellulaire ou leur organisation en situation de stress[6, 7, 32, 80]. Concernant les phosphatases, plusieurs études ont montré que l'usage d'inhibiteurs spécifiques de ces enzymes comme l'acide okadaïque ou la microcystine LR entraîne des perturbations de l'organisation des kératines dans les cellules[108, 110, 111]. En somme, les kinases et les phosphatases constituent vraisemblablement un niveau de régulation à part entière des fonctions potentielles reliées à la phosphorylation des kératines. Le contexte exact dans lequel s'inscrivent ces mécanismes reste à déterminer.

Malgré les nombreuses études menées, il semble que les fonctions associées aux kératines ne sont pas encore établies[21]. Dans les différents systèmes étudiés (épithélium stratifié de la peau, épithélium glandulaire simple), les données accumulées montrent que les altérations des kératines peuvent entraîner la fragilisation de la charpente cellulaire et modifier la réponse cellulaire dans diverses situations physiologiques ou non[20, 112]. Au niveau de l'épiderme, la preuve a été faite avec l'étude phénotypique de lignées de souris transgéniques exprimant des kératines modifiées que des mutations des protéines de FIs peuvent être la cause de maladies chez

l'humain[28, 34]. Ces expériences ont mis en évidence l'importance fonctionnelle des kératines au niveau du maintien de l'intégrité mécanique des cellules[20, 30, 38, 113]. Au niveau du foie, ces bouleversements de la réponse cellulaire constituent apparemment des facteurs de risque dans les maladies hépatiques[51]. De récentes études randomisées ont montré la présence de plusieurs mutations des kératines dans les hépatocytes chez des patients atteints de diverses pathologies hépatiques[49-51]. De plus, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* sur la réponse du foie en situation de stress toxique ont confirmé que la présence de kératines modifiées peut affecter la réponse des hépatocytes et favoriser le développement d'un état pathologique[6, 7, 35, 47, 71].

De nombreux travaux, dont les nôtres, ont porté sur les modifications post traductionnelles des kératines[22, 32]. En effet, des changements dans la phosphorylation, dans la glycosylation, dans la protéolyse au niveau des kératines sont observés au cours du développement de maladies ou lorsque les cellules sont soumises à divers types de stress[31, 81, 97-99, 111, 114]. Ces observations suggèrent donc d'autres niveaux de régulation concernant les fonctions potentielles associées aux kératines[32]. De toutes les modifications post-traductionnelles des kératines, la phosphorylation est la plus étudiée. L'importance de la phosphorylation en tant que mécanisme cellulaire de régulation est clairement illustrée par les processus d'activation ou d'inhibition des enzymes effecteurs au cours de la mitose ou de l'apoptose[67, 104]. Les études subséquentes de la phosphorylation ont montré que ce phénomène peut avoir lieu dans divers contextes cellulaires: de façon constitutive (mitose) ou induite (apoptose ou stress)[72, 76, 77]. Elles ont montré également que l'ajout de phosphate à des sites spécifiques sur les kératines peut être associée à l'organisation ou la localisation des FIs dans la cellule[70, 72, 78]. Cependant, peu de sites de phosphorylation ont été caractérisés comparativement au nombre de résidus potentiellement phosphorylables sur les kératines[32]. Les kinases et les phosphatases associées à la phosphorylation de kératines sont aussi peu connues[22]. De nombreuses recherches portent actuellement sur l'identification de nouveaux sites de phosphorylation et des enzymes (protéines kinases) qui y sont associés. Ainsi par mutagenèse dirigée, la caractérisation d'un site de phosphorylation spécifique à une kératine ou commun à un type de kératines permettra d'évaluer son importance fonctionnelle. Un certain nombre de mutations associées aux

maladies humaines étant déjà répertoriées, il serait possible de cibler la modification d'un résidu de kératine en particulier, par exemple : un acide aminé qui se retrouve au sein du motif reconnu par une kinase donnée. Il faudra, par la suite, procéder *in vitro* à l'étude de l'effet de la modification, au niveau cellulaire, de façon constitutive ou en réponse à un stress quelconque. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la phosphorylation des kératines peut constituer une autre approche au problème.

En conclusion, la hausse de l'expression des kératines, de leur phosphorylation et l'augmentation de HSP70i dans les hépatocytes de souris C3H et FVB/n traitées à la GF font partie des mécanismes de défense cellulaire utilisés par les hépatocytes pour faire face à la présence de la drogue. Ces observations supportent un rôle pour les kératines dans les processus de maintien de l'intégrité cellulaire au cours d'un stress induit par un agent hépatotoxique[6, 7, 20, 21]. L'expression de HSP70i et la phosphorylation de K8/18 participent aux mécanismes de formation de CMs. Cependant, la contribution de la phosphorylation de K8/18 apparaît spécifique au site de phosphorylation considéré. En raison du nombre important de sérines potentiellement phosphorylables sur K8 et K18 ainsi que la liste grandissante de kinases et phosphatases associées à celles-ci, il est important de mieux caractériser les mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation des kératines pour évaluer leur contribution dans le maintien de l'intégrité des hépatocytes au cours des situations de stress de nature toxique.

Déterminer les changements moléculaires précis qui affectent les kératines, comme par exemple la phosphorylation, constitue une étape importante dans la compréhension du fonctionnement des kératines et, à plus grande échelle, des protéines de FIs dans la cellule.

BIBLIOGRAPHIE

1. Schliwa M: **"The Cytoskeleton. Cell Biology Monographs,"**. In. Edited by Springer-Verlag, vol. 13. New York: Wien; 1986.
2. Goldman RD, Goldman AE, Green KJ, Jones JC, Jones SM, Yang HY: **Intermediate filament networks: organization and possible functions of a diverse group of cytoskeletal elements.** *J Cell Sci Suppl* 1986, **5**:69-97.
3. Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Norvell SM, Palka HL, Green KJ: **Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments.** *Int Rev Cytol* 1999, **185**:237-302.
4. Green KJ, Gaudry CA: **Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments?** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000, **1**(3):208-216.
5. Coulombe PA: **A new fold on an old story: attachment of intermediate filaments to desmosomes.** *Nat Struct Biol* 2002, **9**(8):560-562.
6. Ku NO, Zhou X, Toivola DM, Omary MB: **The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease.** *Am J Physiol* 1999, **277**(6 Pt 1):G1108-1137.
7. Omary MB, Ku NO, Toivola DM: **Keratins: guardians of the liver.** *Hepatology* 2002, **35**(2):251-257.
8. Cadrin M, Martinoli MG: **Alterations of intermediate filaments in various histopathological conditions.** *Biochem Cell Biol* 1995, **73**(9-10):627-634.
9. Mallory FB: **Cirrhosis of the liver: five different lesions which it may arise.** *Bull Johns Hopkins Hospital* 1911(22):69-75.
10. Denk H, Gschnait F, Wolff K: **Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation.** *Lab Invest* 1975, **32**(6):773-776.
11. Tsunoo C, Harwood TR, Arak S, Yokoo H: **Cytoskeletal alterations leading to Mallory body formation in livers of mice fed 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine.** *J Hepatol* 1987, **5**(1):85-97.
12. Jensen K, Gluud C: **The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies (Part 1 of a literature survey).** *Hepatology* 1994, **20**(4 Pt 1):1061-1077.
13. Quinlan R, Van Den Ijssel P: **Fatal attraction: when chaperone turns harlot.** *Nat Med* 1999, **5**(1):25-26.
14. Baribault H, Penner J, Iozzo RV, Wilson-Heiner M: **Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice.** *Genes Dev* 1994, **8**(24):2964-2973.
15. French SW: **Present Understanding of the Development of Mallory's Body.** *Arch Pathol Lab Med* 1983, **107**:445-450.
16. Denk H, Stumptner C, Zatloukal K: **Mallory bodies revisited.** *J Hepatol* 2000, **32**(4):689-702.

17. Yuan QX, Marceau N, French BA, Fu P, French SW: **Heat shock in vivo induces Mallory body formation in drug primed mouse liver.** *Exp Mol Pathol* 1995, **63**(1):63-76.
18. Knasmüller S, Parzefall W, Helma C, Kassie F, Ecker S, Schulte-Hermann R: **Toxic effects of griseofulvin: disease models, mechanisms, and risk assessment.** *Crit Rev Toxicol* 1997, **27**(5):495-537.
19. De Carli L, Larizza L: **Griseofulvin.** *Mutat Res* 1988, **195**(2):91-126.
20. Duriez T., Dujardin L, Afchain D: **Médicaments antiparasitaires** Uniform resource Locator [http://arachosia.univ-lille2.fr/labos/parasito/Internat/medicam/aut_fon2.html#3] 2003
21. Steinert PM, Roop DR: **Molecular and cellular biology of intermediate filaments.** *Annu Rev Biochem* 1988, **57**:593-625.
22. Fuchs E, Weber K: **Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease.** In: *Annu Rev Biochem.* vol. 63; 1994: 345-382.
23. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R: **The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.** *Cell* 1982, **31**(1):11-24.
24. Coulombe PA, Omary MB: **'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments.** *Curr Opin Cell Biol* 2002, **14**(1):110-122.
25. Herrmann H, Hesse M, Reichenzeller M, Aebi U, Magin TM: **Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation.** *Int Rev Cytol* 2003, **223**:83-175.
26. Ku NO, Liao J, Chou CF, Omary MB: **Implications of intermediate filament protein phosphorylation.** *Cancer Metastasis Rev* 1996, **15**(4):429-444.
27. Herrmann H, Aebi U: **Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments.** In: *Subcell Biochem.* vol. 31; 1998: 319-362.
28. Herrmann H, Aebi U: **Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions.** *Curr Opin Struct Biol* 1998, **8**(2):177-185.
29. Lazarides E: **Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space.** *Nature* 1980, **283**(5744):249-256.
30. Geisler N, Weber K: **The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins.** *Embo J* 1982, **1**(12):1649-1656.
31. Alberts Bea: **Molecular Biology of the cell.** In. , vol. 4e ed, Garland Science, N.Y., U.S.A.; 2002: pp924.
32. Coulombe PA, Chan YM, Albers K, Fuchs E: **Deletions in epidermal keratins leading to alterations in filament organization in vivo and in intermediate filament assembly in vitro.** *J Cell Biol* 1990, **111**(6 Pt 2):3049-3064.
33. Hatzfeld M, Weber K: **Modulation of keratin intermediate filament assembly by single amino acid exchanges in the consensus sequence at the C-terminal end of the rod domain.** *J Cell Sci* 1991, **99** (Pt 2):351-362.
34. Fuchs E, Cleveland DW: **A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease.** *Science* 1998, **279**(5350):514-519.

35. Chou CF, Smith AJ, Omary MB: **Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18.** *J Biol Chem* 1992, **267**(6):3901-3906.
36. Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D: **Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro.** In: *Subcell Biochem.* vol. 31; 1998: 105-140.
37. Vassar R, Coulombe PA, Degenstein L, Albers K, Fuchs E: **Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease.** *Cell* 1991, **64**(2):365-380.
38. Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, Hebert A, Paller AS, Fuchs E: **Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses.** *Cell* 1991, **66**(6):1301-1311.
39. Magin TM: **Lessons from keratin transgenic and knockout mice.** In: *Subcell Biochem.* vol. 31; 1998: 141-172.
40. Arin MJ, Roop DR: **Disease model: heritable skin blistering.** *Trends Mol Med* 2001, **7**(9):422-424.
41. Porter RM, Lane EB: **Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function.** *Trends Genet* 2003, **19**(5):278-285.
42. McLean WH: **Genetic disorders of palm skin and nail.** *J Anat* 2003, **202**(1):133-141.
43. McGowan K, Coulombe PA: **The wound repair-associated keratins 6, 16, and 17. Insights into the role of intermediate filaments in specifying keratinocyte cytoarchitecture.** In: *Subcell Biochem.* vol. 31; 1998: 173-204.
44. Oshima RG: **Apoptosis and keratin intermediate filaments.** *Cell Death Differ* 2002, **9**(5):486-492.
45. Baribault H, Price J, Miyai K, Oshima RG: **Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8.** *Genes Dev* 1993, **7**(7A):1191-1202.
46. Loranger A, Duclos S, Grenier A, Price J, Wilson-Heiner M, Baribault H, Marceau N: **Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity.** *Am J Pathol* 1997, **151**(6):1673-1683.
47. Magin TM, Schroder R, Leitgeb S, Wanninger F, Zatloukal K, Grund C, Melton DW: **Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates.** *J Cell Biol* 1998, **140**(6):1441-1451.
48. Caulin C, Ware CF, Magin TM, Oshima RG: **Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis.** *J Cell Biol* 2000, **149**(1):17-22.
49. Ku NO, Michie S, Oshima RG, Omary MB: **Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant.** *J Cell Biol* 1995, **131**(5):1303-1314.
50. Ku NO, Michie SA, Soetikno RM, Resurreccion EZ, Broome RL, Oshima RG, Omary MB: **Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice that express a dominant-negative human keratin 18 mutant.** *J Clin Invest* 1996, **98**(4):1034-1046.

51. Ku NO, Omary MB: **Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18.** *J Biol Chem* 1995, **270**(20):11820-11827.
52. Ku NO, Wright TL, Terrault NA, Gish R, Omary MB: **Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis.** *J Clin Invest* 1997, **99**(1):19-23.
53. Ku NO, Gish R, Wright TL, Omary MB: **Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease.** *N Engl J Med* 2001, **344**(21):1580-1587.
54. Ku NO, Darling JM, Krams SM, Esquivel CO, Keeffe EB, Sibley RK, Lee YM, Wright TL, Omary MB: **Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(10):6063-6068.
55. Hazan R, Denk H, Franke WW, Lackinger E, Schiller DL: **Change of cytokeratin organization during development of Mallory bodies as revealed by a monoclonal antibody.** *Lab Invest* 1986, **54**(5):543-553.
56. Cadrin M, Kawahara H, Ohta M, Katsuma Y, Marceau N, French SW: **Mallory bodies in hepatomas and hyperplastic nodules: in vitro and in vivo studies.** *Prog Clin Biol Res* 1990, **331**:231-248.
57. Cadrin M, French SW, Wong PT: **Alteration in molecular structure of cytoskeleton proteins in griseofulvin-treated mouse liver: a pressure tuning infrared spectroscopy study.** *Exp Mol Pathol* 1991, **55**(2):170-179.
58. Cadrin M, Marceau N, French SW: **Cytokeratin of apparent high molecular weight in livers from griseofulvin-fed mice.** *J Hepatol* 1992, **14**(2-3):226-231.
59. Aguilar RC, Wendland B: **Ubiquitin: not just for proteasomes anymore.** *Curr Opin Cell Biol* 2003, **15**(2):184-190.
60. Wojcik C: **Ubiquitin--more than just a signal for protein degradation.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**(10):397-399.
61. Ku NO, Omary MB: **Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion.** *J Cell Biol* 2000, **149**(3):547-552.
62. Parsell DA, Lindquist S: **The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins.** *Annu Rev Genet* 1993, **27**:437-496.
63. Nollen EA, Morimoto RI: **Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins.** *J Cell Sci* 2002, **115**(Pt 14):2809-2816.
64. Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, Kleinert R, Prinz M, Aguzzi A, Denk H: **p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases.** *Am J Pathol* 2002, **160**(1):255-263.
65. Ledesma MD, Avila J, Correas I: **Isolation of a phosphorylated soluble tau fraction from Alzheimer's disease brain.** *Neurobiol Aging* 1995, **16**(4):515-522.
66. Zatloukal K, Stumptner C, Lehner M, Denk H, Baribault H, Eshkind LG, Franke WW: **Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies.** *Am J Pathol* 2000, **156**(4):1263-1274.

67. Nakamichi I, Hatakeyama S, Nakayama KI: **Formation of Mallory body-like inclusions and cell death induced by deregulated expression of keratin 18.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**(10):3441-3451.
68. Fataccioli V, Andraud E, Gentil M, French SW, Rouach H: **Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities: relationship with oxidative stress.** *Hepatology* 1999, **29**(1):14-20.
69. Bardag-Gorce F, van Leeuwen FW, Nguyen V, French BA, Li J, Riley N, McPhaul LW, Lue YH, French SW: **The role of the ubiquitin-proteasome pathway in the formation of mallory bodies.** *Exp Mol Pathol* 2002, **73**(2):75-83.
70. McPhaul LW, Wang J, Hol EM, Sonnemans MA, Riley N, Nguyen V, Yuan QX, Lue YH, Van Leeuwen FW, French SW: **Molecular misreading of the ubiquitin B gene and hepatic mallory body formation.** *Gastroenterology* 2002, **122**(7):1878-1885.
71. Parker LL, Walter SA, Young PG, Piwnica-Worms H: **Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase.** *Nature* 1993, **363**(6431):736-738.
72. Ku NO, Omary MB: **Expression, glycosylation, and phosphorylation of human keratins 8 and 18 in insect cells.** *Exp Cell Res* 1994, **211**(1):24-35.
73. Feng L, Zhou X, Liao J, Omary MB: **Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway.** *J Cell Sci* 1999, **112** (Pt 13):2081-2090.
74. Liao J, Lowthert LA, Ku NO, Fernandez R, Omary MB: **Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues.** *J Cell Biol* 1995, **131**(5):1291-1301.
75. Ku NO, Michie SA, Soetikno RM, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB: **Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice.** *J Cell Biol* 1998, **143**(7):2023-2032.
76. Ku NO, Michie S, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB: **Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(7):4373-4378.
77. Ku NO, Liao J, Omary MB: **Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins.** *Embo J* 1998, **17**(7):1892-1906.
78. Aitken A: **14-3-3 proteins on the MAP.** *Trends Biochem Sci* 1995, **20**(3):95-97.
79. Aitken A, Baxter H, Dubois T, Clokie S, Mackie S, Mitchell K, Peden A, Zemlickova E: **Specificity of 14-3-3 isoform dimer interactions and phosphorylation.** *Biochem Soc Trans* 2002, **30**(4):351-360.
80. Ku NO, Omary MB: **Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431.** *J Biol Chem* 1997, **272**(11):7556-7564.
81. Liao J, Ku NO, Omary MB: **Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells.** *J Biol Chem* 1997, **272**(28):17565-17573.
82. Ku NO, Azhar S, Omary MB: **Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation.** *J Biol Chem* 2002, **277**(13):10775-10782.

83. He T, Stepulak A, Holmstrom TH, Omary MB, Eriksson JE: **The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase.** *J Biol Chem* 2002, **277**(13):10767-10774.
84. Toivola DM, Zhou Q, English LS, Omary MB: **Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells.** *Mol Biol Cell* 2002, **13**(6):1857-1870.
85. Hart GW, Kreppel LK, Comer FI, Arnold CS, Snow DM, Ye Z, Cheng X, DellaManna D, Caine DS, Earles BJ *et al*: **O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization.** *Glycobiology* 1996, **6**(7):711-716.
86. Ku NO, Liao J, Omary MB: **Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins.** *J Biol Chem* 1997, **272**(52):33197-33203.
87. Ku NO, Omary MB: **Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation.** *J Biol Chem* 2001, **276**(29):26792-26798.
88. Beere HM, Green DR: **Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**(1):6-10.
89. Slavotinek AM, Biesecker LG: **Unfolding the role of chaperones and chaperonins in human disease.** *Trends Genet* 2001, **17**(9):528-535.
90. Agashe VR, Hartl FU: **Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding.** *Semin Cell Dev Biol* 2000, **11**(1):15-25.
91. Walter S, Buchner J: **Molecular chaperones--cellular machines for protein folding.** *Angew Chem Int Ed Engl* 2002, **41**(7):1098-1113.
92. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR: **Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**(8):469-475.
93. Liao J, Lowthert LA, Ghorri N, Omary MB: **The 70-kDa heat shock proteins associate with glandular intermediate filaments in an ATP-dependent manner.** *J Biol Chem* 1995, **270**(2):915-922.
94. Perng MD, Cairns L, van den IP, Prescott A, Hutcheson AM, Quinlan RA: **Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and alphaB-crystallin.** *J Cell Sci* 1999, **112** (Pt 13):2099-2112.
95. Izawa I, Nishizawa M, Ohtakara K, Ohtsuka K, Inada H, Inagaki M: **Identification of Mrj, a DnaJ/Hsp40 family protein, as a keratin 8/18 filament regulatory protein.** *J Biol Chem* 2000, **275**(44):34521-34527.
96. Liao J, Price D, Omary MB: **Association of glucose-regulated protein (grp78) with human keratin 8.** *FEBS Lett* 1997, **417**(3):316-320.
97. Riley NE, Li J, McPhaul LW, Bardag-Gorce F, Lue YH, French SW: **Heat shock proteins are present in mallory bodies (cytokeratin aggresomes) in human liver biopsy specimens.** *Exp Mol Pathol* 2003, **74**(2):168-172.
98. Welch WJ, Feramisco JR: **Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells.** *J Biol Chem* 1984, **259**(7):4501-4513.
99. Cadrin M, Hovington H, Marceau N, McFarlane-Anderson N: **Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver.** *J Hepatol* 2000, **33**(2):199-207.

100. Kawahara H, Cadrin M, French SW: **Ethanol-induced phosphorylation of cytokeratin in cultured hepatocytes.** *Life Sci* 1990, **47**(10):859-863.
101. Cadrin M, Anderson NM, Aasheim LH, Kawahara H, Franks DJ, French SW: **Modifications in cytokeratin and actin in cultured liver cells derived from griseofulvin-fed mice.** *Lab Invest* 1995, **72**(4):453-460.
102. Stumptner C, Omary MB, Fickert P, Denk H, Zatloukal K: **Hepatocyte cytokeratins are hyperphosphorylated at multiple sites in human alcoholic hepatitis and in a mallory body mouse model.** *Am J Pathol* 2000, **156**(1):77-90.
103. Nicholl ID, Quinlan RA: **Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly.** *Embo J* 1994, **13**(4):945-953.
104. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B: **The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(19):7146-7159.
105. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY: **Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance.** *J Biol Chem* 1997, **272**(29):18033-18037.
106. Yaglom JA, Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Sherman MY: **The function of HSP72 in suppression of c-Jun N-terminal kinase activation can be dissociated from its role in prevention of protein damage.** *J Biol Chem* 1999, **274**(29):20223-20228.
107. Harper SJ, LoGrasso P: **Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38.** *Cell Signal* 2001, **13**(5):299-310.
108. Stumptner C, Fuchsbichler A, Lehner M, Zatloukal K, Denk H: **Sequence of events in the assembly of Mallory body components in mouse liver: clues to the pathogenesis and significance of Mallory body formation.** *J Hepatol* 2001, **34**(5):665-675.
109. Ku NO, Omary MB: **Identification of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 18: potential kinases and a role in filament reorganization.** *J Cell Biol* 1994, **127**(1):161-171.
110. Toivola DM, Omary MB, Ku NO, Peltola O, Baribault H, Eriksson JE: **Protein phosphatase inhibition in normal and keratin 8/18 assembly-incompetent mouse strains supports a functional role of keratin intermediate filaments in preserving hepatocyte integrity.** *Hepatology* 1998, **28**(1):116-128.
111. Toivola DM, Goldman RD, Garrod DR, Eriksson JE: **Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments.** *J Cell Sci* 1997, **110** (Pt 1):23-33.
112. Lee YJ, Aroor AR, Shukla SD: **Temporal activation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase by acetaldehyde in rat hepatocytes and its loss after chronic ethanol exposure.** *J Pharmacol Exp Ther* 2002, **301**(3):908-914.
113. Strnad P, Windoffer R, Leube RE: **In vivo detection of cytokeratin filament network breakdown in cells treated with the phosphatase inhibitor okadaic acid.** *Cell Tissue Res* 2001, **306**(2):277-293.

114. Kasahara K, Kartasova T, Ren XQ, Ikuta T, Chida K, Kuroki T: **Hyperphosphorylation of keratins by treatment with okadaic acid of BALB/MK-2 mouse keratinocytes.** *J Biol Chem* 1993, **268**(31):23531-23537.
115. Marceau N, Loranger A, Gilbert S, Daigle N, Champetier S: **Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease.** In: *Biochem Cell Biol.* vol. 79; 2001: 543-555.
116. Fuchs E, Coulombe PA: **Of mice and men: genetic skin diseases of keratin.** *Cell* 1992, **69**(6):899-902.
117. Liao J, Lowthert LA, Omary MB: **Heat stress or rotavirus infection of human epithelial cells generates a distinct hyperphosphorylated form of keratin 8.** *Exp Cell Res* 1995, **219**(2):348-357.