

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

KATHLEEN RIOPEL, B. Sc. (Biochimie)

**KÉRATINES 8 ET 18 : MODIFICATIONS DE LA
PHOSPHORYLATION ET DE LA SOLUBILITÉ CHEZ LES
SOURIS TRAITÉES À LA GRISÉOFULVINE**

AVRIL 2005

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 voudrais remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à mon projet de maîtrise. Particulièrement, ma directrice de recherche, Madame Monique Cadrin Ph.D., qui m'a accueillie dans son laboratoire, pour son soutien, son dévouement et sa confiance en mes capacités pour la recherche. Par la générosité et la passion qui l'habitent, elle a su me faire partager cette passion pour les sciences. Je voudrais la remercier particulièrement pour m'avoir fait profiter de son expérience de chercheure en tenant compte de mes opinions et mes idées.

Je tiens aussi à remercier mes parents et ma famille qui m'ont supportée et encouragée durant mes études. Ils m'ont appris à persévérer et m'ont aidée à avoir une meilleure confiance en mes capacités.

Je voudrais enfin remercier mes collègues de travail: Michel Fausther et Martin Désaulniers qui m'ont aussi encouragée et supportée et avec qui j'ai pu partager opinions et conseils ces dernières années au laboratoire.

RÉSUMÉ

Les filaments intermédiaires (FIs) forment avec les microtubules et les microfilaments le cytosquelette des cellules eucaryotes. Malgré le fait que les protéines de FIs représentent environ 5 % des protéines totales d'une cellule, leur fonction est encore mal connue. Les FIs forment un réseau complexe qui s'étend de la membrane plasmique à la périphérie nucléaire. À première vue, en raison de leur disposition dans la cellule, ils semblent jouer uniquement un rôle structural. Par contre, plusieurs maladies humaines comme l'épidermolyse bulleuse simple, la maladie de Wilson et l'hépatite alcoolique peuvent être associées à des altérations des protéines de FIs. Une fonction potentielle des FIs serait la protection des hépatocytes face à un stress. Cette hypothèse semble plausible si on considère que plusieurs types de stress engendrent la réorganisation du réseau de FIs des hépatocytes.

Un certain nombre de maladies du foie chez l'homme comme l'hépatite alcoolique entraînent la formation d'amas protéiques intracytoplasmiques contenant des protéines de FIs agrégées: les Corps de Mallory (CMs).

Nos présents travaux portent sur l'analyse des modifications des propriétés physico-chimiques des kératines au cours du développement d'une hépatite. Le traitement de souris avec une drogue, la griséofulvine, entraîne des modifications des protéines de FIs ainsi que la formation des CMs. Ces CMs sont morphologiquement et biochimiquement similaires à ceux observés chez l'humain dans le cas de l'hépatite alcoolique. L'existence de ce modèle animal nous permet donc d'étudier de façon systématique les différentes étapes qui mènent au développement de la maladie et à la formation des CMs.

Des études *in vitro* tendent à montrer que la modulation de la phosphorylation des FIs jouerait un rôle dans la régulation de la structure, de la solubilité, et possiblement de la fonction des FIs. Des modifications dans les propriétés physico-chimiques des kératines comme la **solubilité** et le **niveau de phosphorylation**

pourraient jouer des rôles importants dans les mécanismes de détoxification des hépatocytes en présence d'agents hépatotoxiques. En effet, il semble que les modifications des propriétés physicochimiques des kératines, comme leur état de phosphorylation ou la fraction cellulaire dans laquelle elles se retrouvent, pourraient moduler les interactions des kératines avec différentes protéines.

Nos études biochimiques par immunobuvardage de type Western en utilisant une batterie d'anticorps contre les kératines, montrent que le traitement à la griséofulvine entraîne une augmentation de l'expression des kératines et des modifications dans la phosphorylation à des sites spécifiques sur les kératines. L'étude des différentes fractions cellulaires a permis de montrer que la solubilité des kératines est aussi modifiée au cours du traitement. En plus, il a été déterminé que les kératines hyperphosphorylées se retrouvent dans les fractions cellulaires les plus insolubles. L'étude par microscopie à fluorescence a permis de montrer que les kératines phosphorylées à des sites particuliers se retrouvent aussi dans les fractions cellulaires les plus insolubles.

Les résultats de ces expériences nous ont permis de mieux comprendre les changements des propriétés physico-chimiques des kératines et leur fonction dans la réponse des hépatocytes face au stress induit par un agent toxique.

Mots-Clés: Filaments intermédiaires, kératine, phosphorylation, solubilité

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	i
RÉSUMÉ.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES.....	viii
CHAPITRE I	1
<i>HÉPATITES, CYTOSQUELETTE ET CORPS DE MALLORY.....</i>	<i>1</i>
1.1 FOIE	1
1.2 HÉPATITES	3
1.3 CYTOSQUELETTE.....	4
1.4 FILAMENTS INTERMÉDIAIRES	4
1.5 STRUCTURE DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES	6
1.6 POLYMÉRISATION DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES	7
1.7 RÔLE DES RÉGIONS TERMINALES LORS DE LA POLYMÉRISATION	9
1.8 KÉRATINES.....	9
1.9 FONCTIONS DES FIs DE KÉRATINES	11
1.10 RÔLE DES KÉRATINES DANS LES HÉPATOCYTES; MODÈLE ANIMAL	13
1.11 MUTATION SUR LA K8 OU K18 CHEZ L'HUMAIN	16
1.12 CORPS DE MALLORY (CMS).....	16
1.13 MÉCANISME DE FORMATION DES CMS	17
CHAPITRE II	19
<i>MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES KÉRATINES.....</i>	<i>19</i>
2.1 PHOSPHORYLATION DES PROTÉINES	19
2.2 PHOSPHORYLATION DES KÉRATINES.....	20
2.2.1 Phosphorylation de la sérine 52 sur la K18.....	22
2.2.2 Phosphorylation de la sérine 73 sur la K8.....	23

2.2.3 Phosphorylation de la sérine 33 sur la K18.....	24
2.2.4 Phosphorylation de la sérine 431 sur la K8.....	24
2.2.5 Rôle de la phosphorylation des kératines.....	25
2.3 SOLUBILITÉ DES KÉRATINES 8 ET 18.....	25
CHAPITRE III.....	27
3.1 MODÈLE ANIMAL ET HÉPATITE ALCOOLIQUE.....	27
3.2 LA GRISÉOFULVINE.....	27
3.3 GRISÉOFULVINE ET SOURIS C3H	28
CHAPITRE IV	30
<i>LA PROBLÉMATIQUE À LONG TERME.....</i>	<i>30</i>
4.1 MÉTHODOLOGIE.....	31
CHAPITRE V.....	32
<i>RÉSULTATS.....</i>	<i>32</i>
5.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE	32
5.2 ARTICLE SCIENTIFIQUE	34
CHAPITRE VI	65
<i>DISCUSSION.....</i>	<i>65</i>
6.1 KÉRATINES ET COMPARTIMENTATION	66
6.2 PHOSPHORYLATION DES KÉRATINES ET SOLUBILITÉ DES FIs	68
6.3 KÉRATINES ET LOCALISATION CELLULAIRE.....	70
6.4 CONCLUSION.....	72
CHAPITRE VII.....	74
<i>PERSPECTIVES DE RECHERCHES.....</i>	<i>74</i>
BIBLIOGRAPHIE.....	76

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	Fonction des différentes cellules du foie.....	3
TABLEAU 1.2	Famille de protéines des filaments intermédiaires.....	5
TABLEAU 1.3	Distribution des kératines dans les différents tissus.....	10
TABLEAU 1.4	Maladies dues à une mutation sur le gène des kératines.....	13
TABLEAU 1.5	Observations des souris « Knock-out ».....	14
TABLEAU 1.6	Souris et stress au niveau du foie.....	15
TABLEAU 2.1	Modifications post-traductionnelles des kératines.....	19
TABLEAU 2.2	Fonction et association de la phosphorylation à un événement cellulaire.....	22
TABLEAU 3.1	Drogues expérimentales utilisées pour l'induction des CMs chez la souris.....	27

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : Organisation d'un lobule hépatique.....	2
FIGURE 1.2 : Localisation des cellules hépatiques.....	2
FIGURE 1.3 : Schéma de la structure primaire d'un monomère de FIs.....	6
FIGURE 1.4 : Modèle de polymérisation des FIs.....	7
FIGURE 1.5 : FIs.	8
FIGURE 1.6 : Schéma de la distribution des FIs.	11
FIGURE 2.1 : Structure des résidus sérine, tyrosine et thréonine non-phosphorylés et phosphorylés.	20
FIGURE 2.2: Sites de phosphorylation identifiés	21
FIGURE 3.1: Structure chimique de la GF	27

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

<i>ACT</i>	Acétaminophène
<i>Ala</i>	Alanine
<i>ARN</i>	Acide ribonucléique
<i>Asp</i>	Acide aspartique
<i>ATP</i>	Adénosine triphosphate
<i>C-terminale</i>	Carboxy-terminale
<i>cdc2</i>	Cyclin dependent protein kinase 2
<i>CMs</i>	Corps de Mallory
<i>C3H</i>	Lignée de souris
<i>C57/Bl6</i>	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>	Lignée de souris
<i>GF</i>	Griséofulvine
<i>HE</i>	Hyperkératose épidermolytique
<i>JNK</i>	c-jun N-terminal kinase
<i>kDa</i>	Kilo Dalton
<i>K8</i>	Kératine 8
<i>K18</i>	Kératine 18
<i>K8 -/-</i>	Homozygote sans kératine 8
<i>K18 -/-</i>	Homozygote sans kératine 18
<i>K8/18</i>	Paire formée par l'assemblage des kératines 8 et 18
<i>K8 S79</i>	Sérine en position 79 sur la kératine 8
<i>K8 S73</i>	Sérine en position 73 sur la kératine 8
<i>K8 S431</i>	Sérine en position 431 sur la kératine 8
<i>K8 S436</i>	Sérine en position 436 sur la kératine 8
<i>K18 S33</i>	Sérine en position 33 sur la kératine 18
<i>K18 S52</i>	Sérine en position 52 sur la kératine 18

<i>K8 pS73</i>	Sérine en position 73 sur la kératine 8 phosphorylée
<i>K8 pS431</i>	Sérine en position 431 sur la kératine 8 phosphorylée
<i>K8 pS436</i>	Sérine en position 436 sur la kératine 8 phosphorylée
<i>K18 pS33</i>	Sérine en position 33 sur la kératine 18 phosphorylée
<i>K18 pS52</i>	Sérine en position 52 sur la kératine 18 phosphorylée
<i>K8 pS79</i>	Sérine en position 79 sur la kératine 18 phosphorylée
<i>K18 S33A/D</i>	Kératine 18 mutée où la sérine en position 22 est remplacée par une alanine ou un acide aspartique
<i>K18 S52A</i>	Kératine 18 mutée où la sérine en position 52 est remplacée par une alanine
<i>K18 R89C</i>	Kératine 8 mutée où l'arginine en position 89 est remplacée par une cystéine
<i>MAP kinase</i>	Mitogen activated protein kinase
<i>N-terminale</i>	Amino-terminale
<i>nm</i>	Nanomètre
<i>pI</i>	Point isoélectrique
<i>p/p</i>	Poids pour poids
<i>K8 pS79</i>	Sérine en position 79 sur la kératine 8 phosphorylée
<i>S</i>	Sérine

CHAPITRE I

HÉPATITES, CYTOSQUELETTE ET CORPS DE MALLORY

1.1 Foie

Le foie est une glande amphicrine annexe à l'intestin grêle et est un des organes les plus importants pour le bon fonctionnement de l'organisme. Il assure entre autre une fonction exocrine puisqu'il synthétise la bile qui est acheminée au duodénum par les canaux et la vésicule biliaire. Le foie assure aussi des fonctions endocrines puisqu'il synthétise plusieurs métabolites comme les facteurs de coagulation et le glucose qui sont acheminés dans la circulation sanguine. Le foie joue aussi un rôle dans la détoxification de l'organisme en filtrant le sang et en métabolisant et dégradant les substances toxiques par voies enzymatiques.

Le foie est constitué de lobules hépatiques qui sont eux-mêmes composés d'un regroupement d'hépatocytes centrés sur une veine centrolobulaire. Le lobule hépatique est entouré d'espaces portes où se regroupent les branches de l'artère hépatique, de la veine porte et des canaux biliaires. Le lobule hépatique est fait de travées, monocouches d'hépatocytes, qui sont délimitées par les capillaires sinusoides. Le sang est acheminé au foie par la veine porte et l'artère hépatique et circule dans les capillaires sinusoides des espaces portes vers la veine centrolobulaire (Figure 1.1).

Le foie est composé de plusieurs types de cellules (Figure 1.2) et chaque cellule assure des fonctions particulières (tableau 1.1). Les hépatocytes constituent environ 70 % des cellules du foie et sont les cellules responsables entre autre de la détoxification de l'organisme et de la synthèse et la sécrétion de plusieurs métabolites importants pour l'organisme (albumine, facteurs de coagulation, etc).

Schéma du lobule hépatique

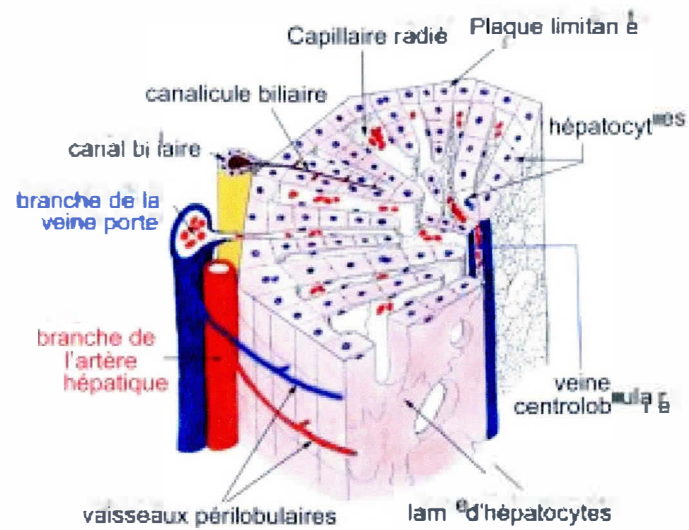


FIGURE 1.1 : Organisation d'un lobule hépatique. (Vacheret, 1999)

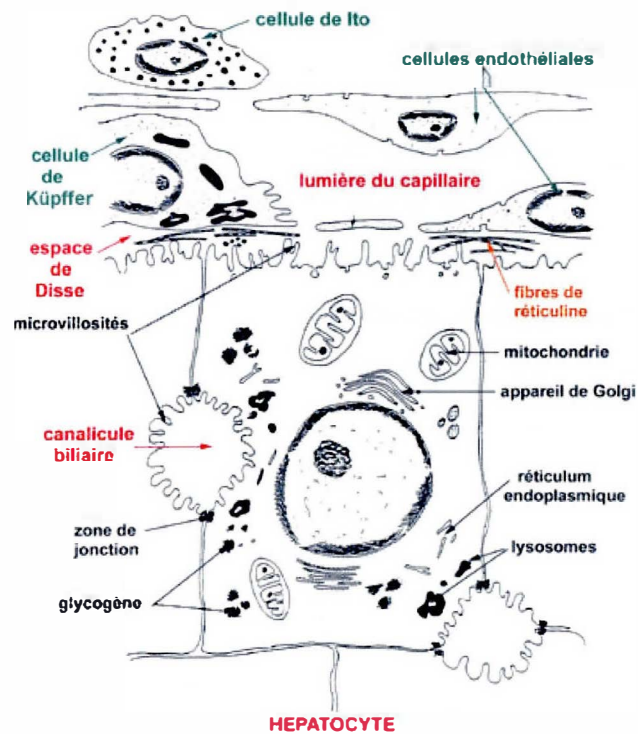


FIGURE 1.2 : Localisation des cellules hépatiques (Vacheret, 1999)

TABLEAU 1.1
Fonction des différentes cellules du foie

Cellules	Fonctions
Hépatocytes	Stockage du glucose et de lipides, Synthèse de l'urée, de lipoprotéines plasmatiques, de l'albumine, de facteurs de coagulation, de l'acide biliaire, Rôle dans la détoxification
Cellules endothéliales	Recouvrent les capillaires sinusoides
Cellules de Küpffer	Défense de l'organisme, Rôle phagocytaire
Cellules de Ito	Stockage des lipides et de la vitamine A
Cellules des canaux biliaires	Cellules épithéliales qui recouvrent les canaux biliaires
Cellules ovales	Rôle dans la régénération hépatique

1.2 Hépatites

L'hépatite ou l'inflammation du foie peut être d'origine multiple, mais en général, elle résulte d'une infection virale (virus A, B, C, D, E, F et G, virus d'Epstein Barr, etc.), d'une infection bactérienne (tuberculose, leptospirose, etc.), ou d'une exposition massive ou chronique à des substances toxiques comme l'alcool ou des médicaments (antibiotiques, acétaminophène etc.). Peu importe son origine, l'inflammation du foie a pour conséquence de réduire sa capacité à accomplir ses fonctions vitales.

Le développement de l'hépatite est caractérisé par de nombreux changements macroscopiques et microscopiques du foie. On observe une augmentation de la taille du foie qui peut atteindre trois fois son volume initial (Yokoo *et al.*, 1979). On remarque aussi une coloration plus foncée et la segmentation du foie (LaVia and Hill, 1975; Ruebner *et al.*, 1991). Du point de vue microscopique, on peut observer une hypertrophie des hépatocytes, une dilatation des canalicules biliaires et l'accumulation de porphyrines dans les hépatocytes (Yokoo *et al.*, 1979). On observe aussi une stéatose

hépatique, c'est-à-dire une accumulation importante de triglycérides sous forme de vacuoles intracytoplasmiques et une augmentation de la quantité de réticulum endoplasmique lisse dans les hépatocytes (Yokoo et al., 1979). Enfin, certaines hépatites peuvent être associées à une réorganisation importante du cytosquelette et plus particulièrement du réseau de filaments intermédiaires (FIs) et leur agrégation sous forme d'amas protéiques intracytoplasmiques dans les hépatocytes: les Corps de Mallory (CMs) (Mallory, 1911).

1.3 Cytosquelette

Le cytosquelette de la majorité des cellules de mammifères est composé de trois types de filaments : les microtubules formés de tubuline, les microfilaments d'actine et les filaments intermédiaires (FIs) formés de plusieurs types de protéines. Les fonctions généralement attribuées au cytosquelette d'une cellule sont le maintien de la structure de la cellule, l'organisation cytoplasmique des organites, l'organisation de la membrane plasmique, le mouvement des chromosomes lors de la mitose, les mouvements cellulaires et intracellulaires et les interactions entre les cellules (Cadrin et al., 1993; Wong and Coulombe, 2003).

1.4 Filaments Intermédiaires

Les FIs sont formés par une grande famille de protéines et se retrouvent dans les cellules des organismes supérieurs (Fuchs, 1994; Herrmann and Aebi, 1998a; Herrmann and Aebi, 1998b). Les protéines de FIs sont classées en cinq types selon l'homologie de leur séquence en acides aminés, leur point isoélectrique (Parker *et al.*) et leur masse moléculaire (tableau 1.2) (Fuchs and Weber, 1994; Steinert and Roop, 1988).

TABLEAU 1.2
Famille de protéines des filaments intermédiaires.

Nom		Classe	PM (10 ⁻³)	Occurrence typique chez les mammifères
<i>Protéine de FIs cytoplasmique</i>				
Cytokératine acide	CK 9-20	I	40-64	Épithélium
Cytokératine basique	CK 1-8	II	52-68	Épithélium
Vimentine ^a		III	55	Cellules mésenchymateuses
Desmine		III	53	Cellules musculaires
Glial filament protein (GFAP)		III	50-52	Cellules gliales, astrocytes
Périphérine		III	54	Cellules neuronales diverses
Nestine		[III/IV] ^b	240 ^c	Cellules souches neuroépithéliales, Cellules musculaires
α-internexine		IV	56 ^c	Neurones
Triplet protéine de neurofilaments				
NF-L		IV	68 ^c	Neurones
NF-M		IV	110 ^c	Neurones, copolymère avec NF-L
NF-H		IV	130 ^c	Neurones, copolymère avec NF-L
Phakinine		[I?] ^d	46	Crystallin, copolymère avec filensine
Filensine		[IV?] ^d	83 ^c	Crystallin, copolymère avec phakinine
Protéine de FIs nucléaire				
<i>Lamines</i>				Lamines nucléaires
Type A / C		V	62-72	La plupart mais pas toutes les cellules
Type B		V	65-68	Toutes les cellules

^a La vimentine est exprimée dans toutes les cellules en culture en raison de la présence d'un élément de réponse au sérum dans son promoteur

^b La nestine montre une homologie de séquence avec les protéines de type III et le type IV. Selon la structure du gène, il serait placé avec le type IV (Dahlstrand *et al.*, 1992).

^c Le poids moléculaire donné est déduit de la séquence en aa. Le poids moléculaire apparent sur un gel de polyacrylamide peut être considérablement plus élevé.

^d Phakinine montre une grande homologie de séquence avec la CK18 mais ne polymérise pas avec les cytokératines. La filensine montre une grande homologie de séquence avec NF-L (coil-1) et aussi bien qu'avec la nestine et la vimentine (coil-2). (Georgatos *et al.*, 1997).

Tiré de : (Herrmann and Aebi, 1998b)

Les quatre premiers types de protéines de FIs se retrouvent dans le cytoplasme des cellules (Fuchs and Weber, 1994) que le type V, composé des lamines (A, B, C), est

retrouvé exclusivement dans le noyau (Fuchs and Weber, 1994; Ku et al., 1996a). L'expression des protéines de FIs est spécifique au type de cellule et au stade de différenciation (Fuchs and Weber, 1994; Herrmann and Aebi, 1998a; Herrmann and Aebi, 1998b; Ku et al., 1996a). Cette expression spécifique suggère que chaque type de FIs joue un rôle particulier dans les cellules.

1.5 Structure des filaments intermédiaires

Les protéines de FIs ont une structure commune, c'est-à-dire un motif central en hélice α flanqué de deux domaines globulaires N- et C-terminaux qui forment respectivement la tête et la queue de la molécule (figure 1.3) (Geisler and Weber, 1982; Lazarides, 1980; Steinert and Roop, 1988). Le domaine central en hélice α est conservé parmi tous les monomères de FIs et est composé de 4 hélices α (1A, 1B, 2A, 2B) séparées par trois régions intercalaires (L1, L1-2, L2) dont la longueur varie entre 8 et 22 acides aminés (Geisler and Weber, 1982). La partie centrale en hélice α est composée de 310 acides aminés pour les protéines de types I - IV avec une longueur de 46 nm. Les protéines de type V possèdent un domaine central de 356 acides aminés ce qui leur confère une longueur de 53 nm (Fuchs and Weber, 1994; Parry and Steinert, 1999).

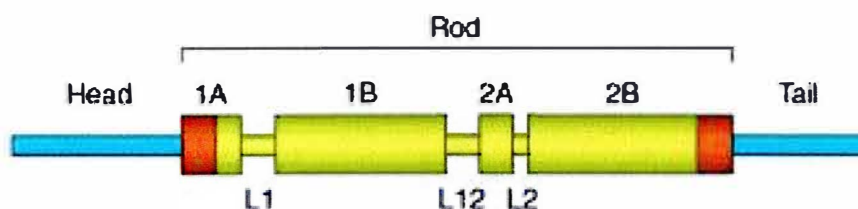


FIGURE 1.3 : Schéma de la structure primaire d'un monomère de FIs.

Tiré de : (Coulombe and Omary, 2002)

La région centrale en hélice α des protéines de FIs est en général composée d'acides aminés hydrophobes (apolaires) à la position 1 et 4 de tous les 7 résidus. Cette répétition assure un environnement propice à la formation de la structure en superhélice entre deux monomères de FIs (Fuchs and Weber, 1994; Herrmann et al., 2003; Parry and Steinert, 1999). Une distribution périodique d'acides aminés acides et basiques à tous les 9.5 acides aminés au niveau de la partie centrale en hélice α , favorise la stabilisation interne de l'hélice α et les interactions interchaînes (Conway and Parry, 1990; Fuchs and Weber, 1994; Kirfel et al., 2003; Parry and Steinert, 1999).

Contrairement à la partie centrale hautement conservée des protéines de FIs, les domaines globulaires N- et C- terminaux (tête et queue) diffèrent grandement en taille et en séquence, d'une protéine de FIs à l'autre (Heins and Aebi, 1994). Cette variabilité apporte la nature hétérogène des protéines de FIs.

1.6 Polymérisation des filaments intermédiaires

Le mécanisme de polymérisation des FIs n'a pas encore été totalement élucidé. Le dernier modèle proposé par Strelkov et ses collaborateurs (Strelkov *et al.*, 2003) propose que l'assemblage s'effectue par l'association en superhélice de deux protéines de FIs au niveau de la partie centrale en hélice α pour former le dimère parallèle (figure 1.4).

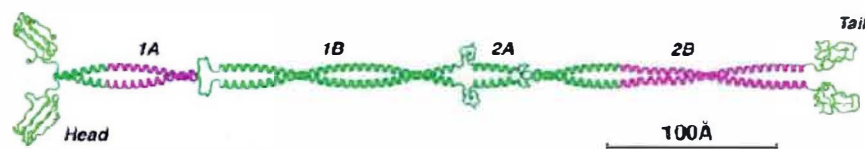


FIGURE 1.4 : Modèle d'assemblage des dimères de FIs.

Tiré de : (Strelkov et al., 2003)

Ensuite, selon 4 modes d'association, deux dimères s'uniraient pour former un tétramère (figure 1.5). (Geisler et al., 1992; Herrmann and Aebi, 1998b; Parry and Steinert, 1999; Steinert et al., 1993). Il pourrait se produire une association antiparallèle latérale non décalée (mode A_{12}) (Parry and Steinert, 1999), une association antiparallèle latérale décalée où les segments 1B se positionnent côte à côte (mode A_{11}) (Strelkov et al., 2003), association antiparallèle latérale décalée où les segments 2B vont s'aligner (mode A_{22}) (Strelkov et al., 2003). Finalement, le dernier mode d'association des dimères se produirait de manière longitudinale par le chevauchement des domaines globulaires N- et C-terminaux (mode A_{CN}) (Heins *et al.*, 1993).

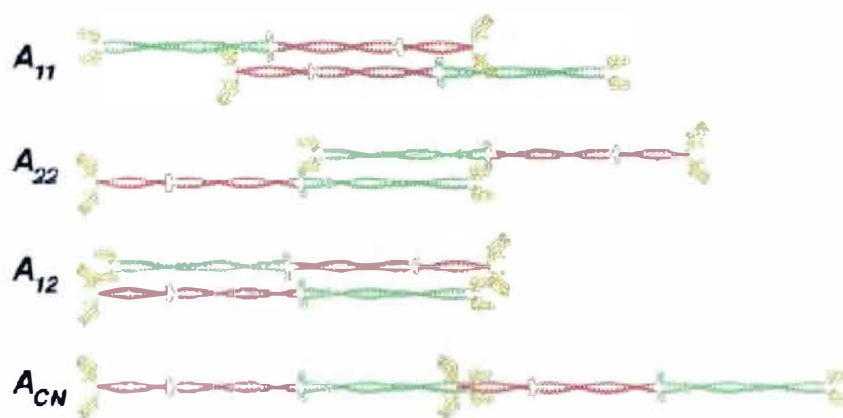


FIGURE 1.5 : Modèle d'association des tétramères de FIs.

Tiré de : (Strelkov et al., 2003)

Les tétramères ainsi formés vont s'accoler bout à bout pour former les protofilaments (2 nm). À leur tour, les protofilaments vont s'associer deux à deux pour former les protofibrilles (4 nm). Finalement, quatre de ces protofibrilles vont s'accoler pour former le filament intermédiaire stable de 10 nm. Ce modèle de polymérisation indique que les FIs sont contrairement aux microtubules et aux microfilaments d'actine, des structures cellulaires symétriques et dépourvues de polarité (Fuchs and Weber, 1994; Herrmann and Aebi, 1998a; Herrmann and Aebi, 1998b).

La formation des filaments intermédiaires repose principalement sur la structure intrinsèque des protéines, c'est-à-dire leur séquence en acides aminés ainsi que leur structure secondaire et tertiaire communes (Fuchs and Weber, 1994). En effet, la polymérisation, *in vitro*, se produit sans la consommation d'énergie (ATP) ou la participation de protéines associées (Herrmann *et al.*, 1996). Par contre, les protéines associées au kératines ainsi que les modifications post-traductionnelles pourrait moduler l'organisation des FIs *in vivo* (Helfand *et al.*, 2002; Inada *et al.*, 1999; Sahlgren *et al.*, 2003).

1.7 Rôle des régions terminales lors de la polymérisation

La région N-terminale des protéines de FIs semble médier l'association bout à bout et latérale des monomères de FIs (Parry *et al.*, 2002). La portion N-terminale (tête) peut jouer un rôle particulier dans la polymérisation des FIs. Par exemple, soustraire la tête de la K5 interrompt la polymérisation de K5 avec K14. Par contre, enlever la région N-terminale de la K14 ne semble pas affecter sa polymérisation avec la K5 native (Coulombe *et al.*, 1990). La partie C-terminale semble quant à elle ne pas intervenir dans les processus d'assemblage des FIs (Bader *et al.*, 1991; Hatzfeld and Weber, 1991; Herrmann *et al.*, 1996).

1.8 Kératines

Les kératines composent les types I et II des protéines de FIs intermédiaires et se retrouvent dans toutes les cellules épithéliales de recouvrement et glandulaires. Le -type I est composé des kératines acides 9 à 20 ayant un pI variant de 4 à 6 et le type II est composé des kératines neutres à basiques 1 à 8 ayant un pI variant de 6 à 8 (Fuchs and Weber, 1994; Omary *et al.*, 1998). Les kératines sont des hétéropolymères obligatoires

et sont exprimées de façon spécifique selon le type d'épithélium (tableau 1.3)(Cadrin *et al.*, 2000). Par exemple, les hépatocytes expriment deux kératines, les K8 et K18 tandis que les cellules épithéliales du petit intestin expriment quatre kératines, les K8, K18, K19 et K20 (Ku *et al.*, 1999).

TABLEAU 1.3
Distribution des kératines dans les différents tissus

Tissus	Kératines
Distribution dans l'épithélium digestif	
Hépatocytes	K8 / 18
Canaux biliaires	K8 / 19 + (K7 / 18) *
Conduit du pancréas	K8 / 19 + (K7 / 18) *
Acinus du pancréas	K8 / 18 + K19 **
Petit intestin	K8 / 20 + K19 + K18
Colon	K8 / 18 + K19 + K20
Œsophage	K4 / 13 + (K6) *
Estomac	K8 / 18 + K19 + K20 + (K7) *
Vésicule biliaire	K8 / 18 + (K7 / 19) *
Distribution dans les autres épithélium	
Kératinocyte basal	K5 / 14
Kératinocyte subbasal	K1 / 10
Kératinocyte hyperproliférant	K6 / 16 / 17
Épithélium de la cornée	K3 / 12

* peu de kératines dans le tissu,

** K19 est localisé seulement dans la partie apicale des cellules de l'acini (Toivola *et al.*, résultats non-publiés)

Tiré de : (Ku *et al.*, 1999)

L'expression de protéines de FIs est aussi modulée par le niveau de différenciation des cellules. Par exemple, au niveau de l'épithélium stratifié de la peau les K5/K14 se retrouvent dans les kératinocytes basaux alors que la paire K1/K10 se retrouve dans les kératinocytes des couches suprabasales où les cellules sont matures et différenciées (Moll *et al.*, 1982). Un autre exemple est la K19 qui est exprimée dans les cellules basales du système gastrointestinal tandis que la K20 est exprimée dans les cellules différenciées de la région suprabasale de ce système (Moll, 1998).

Dans les hépatocytes, les kératines K8 et K18 forment un réseau cytoplasmique qui s'étend de la membrane plasmique jusqu'au noyau (figure 1.6).

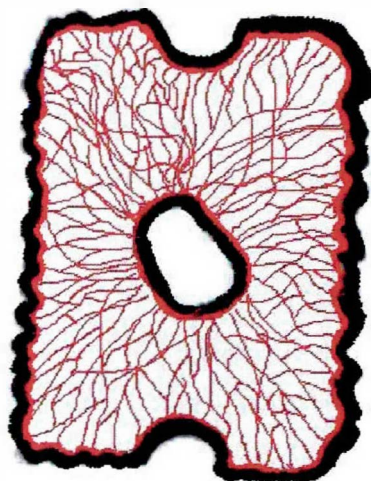


FIGURE 1.6 : Schéma de la distribution des FIs.

1.9 Fonctions des FIs de kératines

À leur découverte au début des années 1960, les scientifiques croyaient que les FIs étaient des artéfacts. Contrairement à ce qui a été suggéré à la découverte de ce type de filament soit que les FIs constituent la structure la plus stable de la cellule des mammifères, les FIs joueraient beaucoup plus qu'un rôle structural au niveau de la cellule (Fuchs and Cleveland, 1998; Yamada et al., 2003). En effet, à cette époque l'observation que les FIs étaient associés à la membrane plasmique au niveau des jonctions cellulaires de type desmosome et hémidesmosome, a amené à proposer que le rôle des FIs était uniquement un rôle de soutien élastique de la membrane plasmique et de l'architecture générale de la cellule. Des études ultérieures ont montré que le réseau

de FIs est très dynamique et possède une grande capacité de remodelage (Cadrin et al., 2000; Fausther *et al.*, 2004; He *et al.*, 2002).

Des fonctions reliées aux FIs ont été mises en évidence par l'étude de souris transgéniques. Des souris transgéniques portant une mutation sur la K14 (kératine de la peau) présentent des kératinocytes avec un réseau de FIs désorganisé. L'épiderme de ces souris démontre une très grande fragilité au stress mécanique. Ce phénotype ressemble au phénotype observé dans le cas de certaines maladies humaines comme l'Épidermolyse bulleuse simple (Krebs) (Vassar *et al.*, 1991). L'étude du génotype de patients atteints de EBS a permis de montrer la présence d'une mutation sur la K14 identique à celle induite chez les souris transgéniques (Fuchs and Weber, 1994). Des études subséquentes ont permis de montrer que les patients souffrant de EBS pouvaient avoir aussi des mutations sur la K5 (kératine complémentaire à la kératine 14) (Fuchs, 1994).

Plusieurs autres maladies de la peau ont aussi été associées à des mutations sur les kératines (tableau 1.4) (McGowan and Coulombe, 1998). Par exemple, l'hyperkératose épidermolytique (HE), une maladie autosomique dominante de la peau est une conséquence de l'altération du réseau de FIs, suite à la présence d'une mutation sur la K10. Cette maladie amène un amincissement des couches cornées et glandulaires de la peau. Dans les cellules, la mutation entraîne l'agrégation des protéines de FIs. Comme ce fut le cas pour EBS, HE a été identifiée comme maladie reliée à un problème au niveau des kératines suite à des études réalisées sur des souris transgéniques portant une mutation sur la K10 et à l'analyse des gènes de patients dont le phénotype suggérait une maladie similaire (Anton-Lamprecht, 1983).

Les résultats de ces études ont donc permis de démontrer qu'au niveau de l'épiderme, les protéines de FIs jouent un rôle de protection des tissus contre les stress mécaniques. Puisque les kératines sont impliquées dans les jonctions cellulaires de types desmosomes et hémidesmosomes, la présence de kératines mutées à ce niveau pourrait être impliqué dans la sensibilité accrue des cellules aux stress mécaniques.

TABLEAU 1.4
Maladies associées à une mutation sur le gène des kératines

Gène de kératine	Maladie	Distribution
K5, K14	Épidermolyse bulleuse simple	Épiderme (couche basale)
K1, K10	Hyperkératose épidermolytique	Épiderme (couche suprabasale profonde)
K2e	Ichyose bulleuse de Siemens	Épiderme (couche suprabasale superficielle)
K9	Kératoderme palmoplantaire, variante non-épidermolytique	Épiderme de la paume / plante du pied uniquement (couches suprabasales)
K16, K1	Kératoderme palmoplantaire, variante non-épidermolytique	Épiderme de la paume / plante du pied uniquement (couches suprabasales)
K6e, K16, K17	Pachyonychia congénitale	Ongles et autres épithélia stratifiées
K17	Stéatose multiplex	Peau
K4, K13	Naevus spongieux oral	Muqueuse buccale
K3, K12	Dystrophie cornéenne de Meesman	Cornée
K18	Prédisposition à développer des maladies chroniques du foie	Épithélium simple
Tiré de : (McGowan and Coulombe, 1998)		

1.10 Rôle des kératines dans les hépatocytes; modèle animal

Les hépatocytes contiennent un réseau cytoplasmique de FIs composé de K8 et K18 qui s'étend de la membrane plasmique jusqu'au noyau comme illustré à la figure 1.6.

Comme ce fut le cas pour les études sur le rôle des kératines au niveau de l'épithélium de la peau, l'utilisation de souris transgéniques contenant des K8 et K18 mutées, surexprimées ou des kératines ectopiques a été nécessaire pour mettre en évidence les rôles de ces kératines dans le foie.

Puisque les K8 et K18 sont les seules kératines exprimées dans les hépatocytes et que les K8 et K18 sont des hétéropolymères obligatoires, le dérèglement de l'une ou l'autre de ces kératines affecte le réseau de FIs dans les hépatocytes. Des souris transgéniques déficientes en K8 et en K18 ont été produites et les hépatocytes ne contiennent pas de réseau de FIs (tableau 1.5).

TABLEAU 1.5
Observations sur des souris « Knock-out »

Souris	Kératine	Phénotype de la souris
«Knock-out »	K8 (souris C57/B16)	Mortalité durant l'embryogenèse, hémorragie massive du foie
	K8 (souris FVB/N)	Hyperplasie collatérale, colite, susceptibilité aux lésions hépatiques
	K18	Corps de Mallory dans les hépatocytes

Tiré de : (Ku et al., 1999)

Les souris déficientes en K8 montrent un taux de mortalité intra-utérine important selon leur prédisposition génétique. Par exemple, les souris de la lignée C57/B16 déficientes en K8 ont un taux de mortalité embryonnaire de 95 % et la mort est caractérisée par une hémorragie hépatique massive (Baribault *et al.*, 1993). Par contre, chez les souris FVB/N K8 $-/-$ croisées avec les souris C57/B16 K8 $-/-$, la mortalité embryonnaire est de 50 % (Baribault *et al.*, 1994). Les souris qui survivent développent une hépatite vers l'âge de 6 mois (Oshima, 2002).

Les souris FVB/N déficientes en K18 sont toutes viables et développent une hépatite modérée (Magin, 1998; Magin *et al.*, 1998). La présence d'agrégats de K8 a été observée chez les spécimens âgés (Magin, 1998; Magin et al., 1998; Oshima, 2002). Ces observations au niveau du foie suggèrent que la K8 est essentielle au bon fonctionnement des hépatocytes (Baribault et al., 1994).

Des expériences effectuées sur les souris déficientes en K8 ou K18 et sur des souris portant des mutations sur la K8 ou la K18 suggèrent que le réseau de FIs de kératines joue un rôle dans la protection des hépatocytes contre les stress mécaniques ou toxiques (tableau 1.6).

TABLEAU 1.6
Souris et stress au niveau du foie

Type de stress	Lignée de souris	Conséquences ^a
<i>Mécanique</i>		
Perfusion du foie	K18 R89C ^b	↑ fragilité
Perfusion du foie	K8 -/- ^c	↑ fragilité
<i>Non-mécanique</i>		
GF ^d / ACT ^e	K18 R89C	↑ létalité
Hépectomie pariétale	K8 -/-	↑ létalité
Anesthésie pentobarbitale	K8 -/-	↑ nécrose / hémorragie
Microcystine-LR	K18 R89C, K8 -/-	↑ nécrose / hémorragie
DDC ^f	K8 -/-	↑ létalité
Concanavaline A	K8 -/-, K18 -/-	↑ létalité
Anticorps FAS	K8 -/-	↑ létalité
Anticorps FAS	K18 R89C	↑ létalité
Diète lithogénique	K8 -/-, K18 -/-	↑ nécrose

^a Toutes les données ont été basées par une comparaison avec des souris contrôles. ^b Les souris K18 R89C surexpriment un mutant de la K18 humaine (Arg89/Cys) qui résulte en un collapsus des kératines hépatiques en grain cytoplasmiques. ^c -/- indique des souris déficientes homozygotes. ^d GF : griséofulvine. ^e ACT : acétaminophène. ^f DDC : 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine.

Tiré de : (Omary *et al.*, 2002)

L'épidermolyse bulleuse simple se caractérise entre autre par une mutation sur la K18 (K18 R89C). Les hépatocytes des souris ayant cette mutation ou une déficience en K8 (K8-/-) sont plus fragiles à un stress mécanique comme la perfusion du foie (Ku *et al.*, 1995; Loranger *et al.*, 1997). Lors de stress non-mécaniques (GF, DDC, etc.), les hépatocytes de ces souris (K18 R89C, K8 -/-) montrent un développement rapide de hépatite et on observe une mortalité et une nécrose accrue des hépatocytes (Ku *et al.*, 1996b; Toivola *et al.*, 1998). La transfection de cellule avec la K18 R89C montre que cette mutation ponctuelle entraîne des perturbations au niveau de l'assemblage et de

l'organisation des FIs (Ku et al., 1995). Ces résultats indiquent que l'augmentation de la susceptibilité des hépatocytes à la présence d'agents toxiques peut-être liée à une polymérisation anormale des FIs.

En résumé, les résultats obtenus dans ces différentes études montrent que le réseau de FIs est nécessaire pour le maintien de l'homéostasie des hépatocytes. Les FIs jouent également un rôle important dans la protection des hépatocytes contre les stress mécaniques et toxiques. La mutation de l'une ou l'autre des kératines peut affecter le réseau de FIs. Enfin, le retrait de K8 ou de K18 affecte le phénotype des souris mais de façon différente selon le patrimoine génétique de la souris.

1.11 Mutation sur la K8 ou K18 chez l'humain

Différentes mutations ont été identifiées chez les patients atteints de cirrhoses cryptogénétiques, c'est-à-dire une cirrhose de cause inconnue (Ku *et al.*, 2001). Les kératines portant les mutations observées chez ces patients ont été transfectées dans des cellules en culture. En situation de stress, ces kératines montrent des anomalies tant au niveau de la flexibilité, de la stabilité, que de l'assemblage et l'organisation des FIs (Ku *et al.*, 1997). De plus, des études récentes ont montré que des mutations sur les K8 et K18 prédisposent les humains au développement d'hépatites. Ces résultats supportent l'hypothèse que chez l'humain comme chez la souris, les FIs de kératines jouent un rôle dans la protection des hépatocytes contre différents stress.

1.12 Corps de Mallory (CMs)

Les Corps de Mallory (CMs) ont été décrits pour la première fois par Frank Mallory en 1911 (Mallory, 1911). Les CMs sont observés dans les hépatocytes de

patients souffrant de certaines maladies du foie comme l'hépatite alcoolique, la cirrhose infantile indienne, la maladie de Wilson et l'obésité (Denk et al., 2000; French, 1983; Jensen and Gluud, 1994a). Les CMs sont de taille et de localisation variables dans les hépatocytes. Ils forment des amas très insolubles qui sont résistants aux protéases (Denk et al., 2000). Différentes études biochimiques et immunohistochimiques ont montré que les CMs ont pour composantes principales les protéines de FIs K8 et K18. Ils contiennent aussi du glycogène, des phospholipides, des protéines basiques non conjuguées, de la transglutaminase, de l'ubiquitine, des protéines de stress et de l'ARN (Denk et al., 2000; Jensen and Gluud, 1994a).

1.13 Mécanisme de formation des CMs

Aucune étude jusqu'à présent n'a permis de démontrer précisément si ces agrégats protéiques sont nocifs ou protecteurs pour la cellule qui les contient. Le développement des CMs est toujours lié à une hépatite mais le contraire n'est pas toujours vrai (Jensen and Gluud, 1994a). Ainsi, il a été proposé que la formation des CMs est la conséquence et non la cause du développement de la maladie et la présence des CMs ne serait pas responsable de la réorganisation du réseau de FIs.

De nombreuses études ont été menées pour déterminer le mécanisme de formation des CMs dans les hépatocytes au cours du développement d'une hépatite. Les résultats de ces études suggèrent que la formation des CMs est la conséquence d'une augmentation de synthèse des kératines (K8 et K18) (Cadrin et al., 1995; Cadrin and Martinoli, 1995; Hutter et al., 1993). La saturation du mécanisme ubiquitine-protéasome responsable de la dégradation des protéines altérées pourrait aussi être responsable de l'accumulation de protéines sous forme d'agrégats dans la cellule. En effet, un inhibiteur du mécanisme ubiquitine-protéasome, le PS431, entraîne la formation des CMs dans les hépatocytes en culture (Bardag-Gorce *et al.*, 2004; French *et al.*, 2001). Les résultats de ces expériences combinés à la présence d'ubiquitine dans les CMs, suggèrent qu'une

inhibition de la protéolyse des kératines par le système de protéasomes entraînerait la formation des CMs *in vivo*.

Un autre facteur qui pourrait être responsable du développement des CMs est le ratio K8 / K18. L'étude des hépatocytes de souris K8 -/- montre qu'il n'y a pas formation de CMs même après un traitement avec une drogue hépatotoxique comme le DDC. Par contre, les souris K18 -/- produisent spontanément, avec l'âge, des agrégats de kératines (Magin, 1998; Magin et al., 1998; Zatloukal *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que la présence et surtout l'excès de K8, sont nécessaires pour produire des CMs. Par contre, d'autres études montrent que la surexpression de l'une ou l'autre des kératines par exemple la K18 dans les hépatocytes traités à la GF favorise le développement des CMs (Nakamichi *et al.*, 2002). Le déséquilibre entre le niveau des deux kératines dans les cellules hépatiques pourrait donc être un autre facteur favorisant le développement des CMs.

La modification de la phosphorylation des kératines pourrait aussi être un facteur favorisant la formation des CMs. En effet, l'inhibition des phosphatases par la tautomycine chez les souris, induit la formation des CMs qui contiennent des kératines phosphorylées (French et al., 2001).

Les différents résultats obtenus indiquent que la formation des CMs est un mécanisme très complexe et encore assez mal compris. Les CMs sont souvent observés dans des situations où l'homéostasie de la cellule est perturbée. Leur présence pourrait être la conséquence d'une réaction organisée des hépatocytes face au stress.

CHAPITRE II

MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES KÉRATINES

Plusieurs modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, l'acétylation, la protéolyse, la transglutamination et la phosphorylation peuvent se produire sur une protéine. Ces modifications jouent des rôles importants dans la régulation de plusieurs mécanismes cellulaires. Les kératines peuvent aussi subir plusieurs modifications post-traductionnelles (tableau 2.1) et ces modifications jouent probablement un rôle dans la régulation de leur fonction.

TABLEAU 2.1

Modifications post-traductionnelles des kératines

Modification	Kératines	Nature ou site de la modification
Phosphorylation	K1, K6, K8, K18	Sérine / thréonine
Glycosylation	K8, K18, K13, K19	O-GlcNAC-sérine
Acétylation	Kératines de l'épiderme	N-terminal-sérine
Lipides	K8, K14, K18, K19	Palmitate, rétinoylation
Protéolyse	K8, K19	Catalyse par les caspases
Transglutamination	K8 / 18, K1 / 10	« Cross-linking »

Tiré de : (Omary et al., 1998)

2.1 Phosphorylation des protéines

La phosphorylation est une modification de la chaîne latérale d'un acide aminé par addition enzymatique d'un groupement phosphate (figure 2.1) qui peut affecter l'activité ou la stabilité de la protéine, notamment en induisant des changements au niveau de la conformation de la chaîne protéique et de sa charge nette. Les sites de phosphorylation des protéines des eucaryotes sont les acides hydroxyaminés suivants :

la sérine (S), la thréonine, et la tyrosine (Feng *et al.*, 1999; Lodish *et al.*, 2000; Omary *et al.*, 1998).

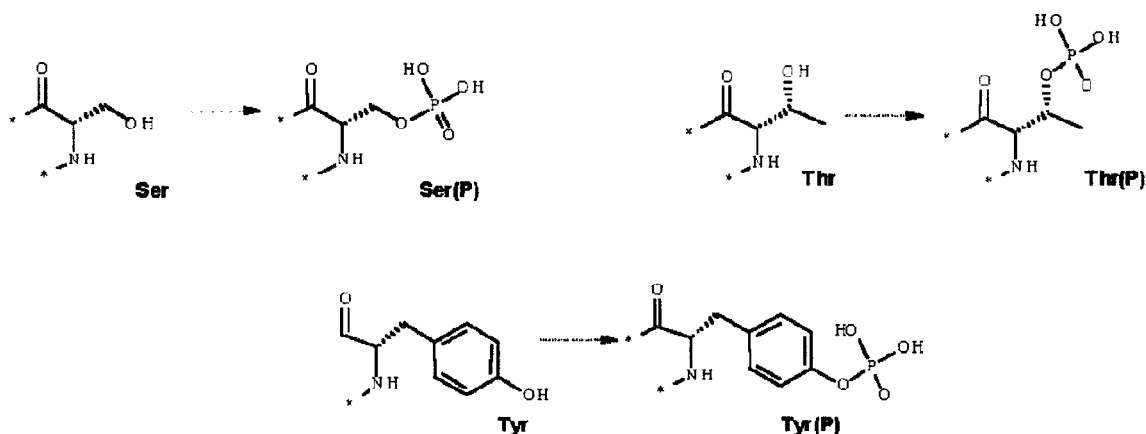


FIGURE 2.1 : Structure des résidus sérine, tyrosine et thréonine non-phosphorylés et phosphorylés.

Plusieurs mécanismes essentiels de la cellule comme la mitose, la différenciation, la réponse à des facteurs de croissance, la réponse au stress et l'apoptose sont régulés par des cascades de signalisation cellulaire impliquant la phosphorylation et la déphosphorylation de protéines spécifiques

2.2 Phosphorylation des kératines

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle des kératines qui a été la plus étudiée. Différentes études, *in vivo* ou *in vitro*, ont montré que la phosphorylation se produit uniquement au niveau de la tête et la queue des kératines (Chou *et al.*, 1996; Geisler and Weber, 1988). Comme ces domaines sont directement responsables de l'hétérogénéité des kératines et se projettent à l'extérieur du filament, la modulation de la phosphorylation des kératines pourrait jouer vraisemblablement un rôle dans la régulation de la fonction des kératines (Coulombe, 2002; He *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 1997). À partir de l'étude de la séquence en acides aminés des kératines humaines, il

a été établi que, sur les régions N- et C-terminales, la K8 possède 61 sites de phosphorylation potentielle alors que la K18 en possède 37 (Omary et al., 1998). Le nombre important de ces sites rend l'étude de la phosphorylation des kératines très complexe. Au niveau de la K8 et de la K18, certains sites spécifiques sont phosphorylés de façon constitutive. Cette phosphorylation basale est modifiée par différentes conditions comme la mitose, l'apoptose ou encore l'induction d'un stress (Ku et al., 1999; Omary et al., 1998). Au niveau des kératines 8 et 18, le résidu le plus fortement affecté par la phosphorylation est la sérine. Dans les hépatocytes humains, 3 sites de phosphorylation ont été caractérisés sur la K8 soit les sérines 73, 431 et 23 et 2 sur la K18 soit les sérines 33 et 52 (figure 2.2) (Omary et al., 1998). Les sérines 23, 33, 52 et 73 se retrouvent respectivement sur la tête des kératines 18 et 8 tandis que la sérine 431 se retrouve sur la queue de la kératine 8. La phosphorylation de la sérine 23 qui se retrouve sur une région conservée des kératines de type II aurait une fonction plus générale (site équivalent K6e S59 de la peau) (Omary et al., 1998) alors que les sérines 73 et 431 se retrouvent uniquement sur la kératine 8 et accompliraient certaines fonctions spécifiques reliées à celles-ci.

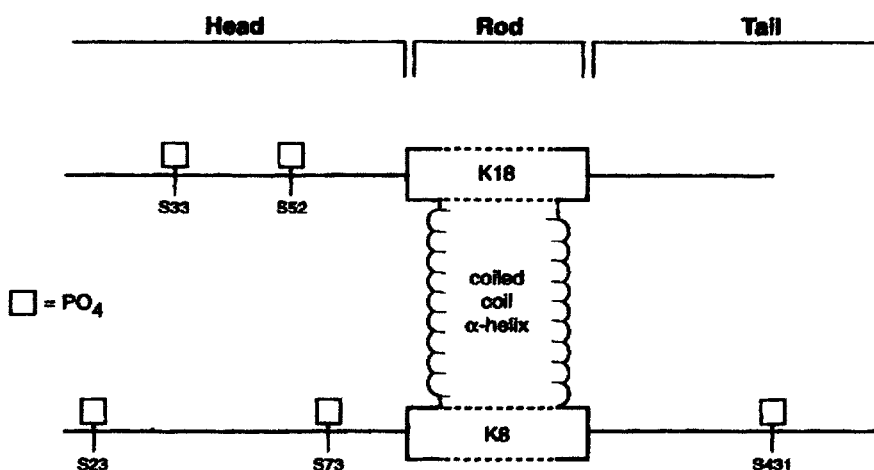


FIGURE 2.2: Sites de phosphorylation identifiés (Omary et al., 1998)

Le niveau de phosphorylation sur chacun des sites mentionnés précédemment a été étudié dans différentes conditions physiologiques (tableau 2.2). Ces études semblent

confirmer que la phosphorylation d'une sérine particulière est reliée à un rôle ou une fonction spécifique dans la cellule.

TABLEAU 2.2
Fonctions et association de la phosphorylation à un événement cellulaire

Fonction ou événement cellulaire	Kératine et sites	Évidences
Fonction conservée des kératines de type II	K18 S33 K6e S59	-Séquence conservée -Phosphorylation identifiée sur plusieurs kératines
Réorganisation des filaments et solubilité	K18 S52	-Analyse des mutations en culture cellulaire -Cellules en culture marquées avec un anticorps contre les phosphoépitopes
Stimulation aux facteurs de croissance / mitose	K8 S431, 73 K18 S52, 33	-Analyse en culture cellulaire -Hépectomie partielle chez la souris
Interaction avec la famille de protéine 14-3-3	K18 S33	-Analyse des mutations en culture cellulaire
Compartiment cellulaire spécifique	K18 S33, 52	-Tissus marqués avec un anticorps contre les phosphoépitopes
Protection contre un stress cellulaire	K8 S73	-Association de l'hyperphosphorylation des K8/18 avec une variété de stress chez des cultures cellulaires et des souris
Apoptose	K8 S73, 431 K18 S52	-Induction de l'apoptose en cultures cellulaires

Tiré de : (Omary et al., 1998)

2.2.1 Phosphorylation de la sérine 52 sur la K18

La phosphorylation de la sérine 52 sur la K18 a été mise en évidence par l'étude des cellules HT-29 (adénocarcinome colorectal). Ce site possède un niveau de phosphorylation basal qui est augmenté lors de la mitose ou d'un stress. Cette augmentation de la phosphorylation est associée à une réorganisation du réseau de FIs (Liao *et al.*, 1995). Lorsque ce site est muté et que la sérine 52 est remplacée par une alanine (K18 S52A), il y a une réorganisation moins importante du réseau de FIs en

réponse au stress (Ku *et al.*, 1998b). Ces résultats suggèrent que la modification de la phosphorylation sur ce site joue un rôle dans l'organisation du réseau de FIs. Lorsque cette mutation (K18 S52A) est présente *in vivo* chez des souris transgéniques, les hépatocytes de ces dernières sont beaucoup plus sensibles au stress induit par les drogues hépatotoxiques (GF, microcystine LR) que leurs semblables de type sauvage (Ku *et al.*, 1998b). Ces différents résultats suggèrent donc que la phosphorylation de ce site joue un rôle important dans la formation d'un réseau de kératines qui procure à la cellule une protection contre un stress induit par des agents toxiques.

2.2.2 Phosphorylation de la sérine 73 sur la K8

La phosphorylation sur la K8 S73 (K8 S79 équivalent chez la souris) n'est pas observée de façon constitutive dans la cellule. La phosphorylation de cette sérine a été décrite comme étant induite dans les cellules en processus de mitose, d'apoptose ou placées en situation de stress (Omary *et al.*, 1998). Dans ces différentes conditions, la phosphorylation de la S73 sur la K8 est accompagnée d'une réorganisation du réseau de FIs (Ku and Omary, 2000; Liao *et al.*, 1997). Le traitement de cellules avec un inhibiteur de phosphatases, l'acide okadaïque entraîne une hyperphosphorylation généralisée des kératines et une déstabilisation du réseau de FIs. La transfection de cellules avec une K8 où la S73 est remplacée par une alanine (K8 S73A) et entraîne une stabilisation du réseau de FIs en présence d'acide okadaïque (Ku *et al.*, 2002a). Ce résultat suggère que la phosphorylation de ce site particulier participe à la déstabilisation du réseau de FIs.

Le traitement de souris avec l'anisomycine (inducteur de l'apoptose) ou la GF entraîne aussi une augmentation de phosphorylation de la K8 S73 dans les hépatocytes. Ces résultats suggèrent que, *in vivo*, ce site de phosphorylation joue un rôle dans la réponse des hépatocytes au stress. La phosphorylation de ce site pourrait être considérée comme un marqueur de stress cellulaire (Marceau *et al.*, 2001).

En raison de l'importance que semble jouer la K8 pS73 dans les différentes réponses cellulaires, différentes études ont tenté de mettre en évidence la ou les kinases impliquées dans la phosphorylation de la K8 S73. Des études *in vitro* ont montré que deux kinases, P38 et JNK, qui sont activées dans les situations de stress et d'apoptose ont la capacité de phosphoryler la K8 S73 (He et al., 2002; Ku et al., 2002a). L'implication de ces kinases *in vitro* appuie l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation de cette sérine est une conséquence du stress cellulaire et suggère que les kératines pourraient protéger en situation de stress par leurs modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (Toivola *et al.*, 2002).

2.2.3 Phosphorylation de la sérine 33 sur la K18

La phosphorylation de la K18 S33 (équivalent chez l'humain et la souris) est présente à un faible niveau de façon constitutive dans la cellule. Lors de la mitose ou en présence de l'EGF, la phosphorylation de ce site est augmentée. En plus, la phosphorylation de ce site est essentiel à la liaison de la K18 aux protéines de la famille 14-3-3 (Coulombe and Omary, 2002; Ku et al., 2002a; Ku et al., 1998a). La microcystine LR est un agent qui inhibe les phosphatases. La transfection de cellules avec la K18 mutée ou la S33 est remplacée par une alanine ou un acide aspartique (S33A/D) entraîne une résistance à la microcystine LR. Ces résultats laissent sous-entendre une perturbation de l'organisation des FIs de K8 et K18 (Coulombe and Omary, 2002) et une inhibition de l'association de la famille de protéines 14-3-3 dans les cellules.

2.2.4 Phosphorylation de la sérine 431 sur la K8

La phosphorylation de la K8 S431 (équivalent à la S436 chez la souris) est un autre site qui devient phosphorylé lors du processus de la mitose (phase G2/M) (Omary et al., 1998). De plus, la K8 S431 devient phosphorylée lors de l'apoptose et entraîne une réorganisation du réseau de FIs (Omary et al., 1998). Dans les cellules HT-29, ce site est phosphorylé par les MAP kinases et la cdc2 kinase qui sont activées en présence de l'EGF dans le milieu cellulaire.

2.2.5 Rôle de la phosphorylation des kératines

La phosphorylation des différentes sérines pourrait médier des étapes distinctes et complémentaires de la fonction des K8 et K18 (Marceau et al., 2001). La phosphorylation de sites particuliers semble agir à différents niveaux sur la dynamique des FIs en affectant l'organisation, la distribution des FIs, la dégradation et l'interaction avec les protéines pouvant être associées aux kératines. Certains auteurs ont aussi émis l'hypothèse que la phosphorylation pourrait être impliquée dans les mécanismes de défenses cellulaires entre autre lors de stress toxique induit par des drogues hépatotoxiques.

Il est donc nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les modifications post-traductionnelles et tout particulièrement sur la phosphorylation qui affecte les kératines pour mieux comprendre l'importance de ce mécanisme dans la réponse cellulaire à différents stimuli.

2.3 Solubilité des kératines 8 et 18

Les kératines ont longtemps été considérées comme des protéines essentiellement insolubles. En effet, il a été difficile de mettre en évidence l'existence

des kératines solubles puisque cette fraction cellulaire représente moins de 1 % des kératines totales (Soellner *et al.*, 1985). Des études récentes ont permis de montrer que des variations dans les proportions de kératines solubles versus insolubles se produisent au cours de différents événements cellulaires. Une étude des cellules HT-29 en phase G0/G1 du cycle cellulaire montre que la fraction soluble dans une solution de PBS des K8/18 représente 5% des kératines totales alors qu'au cours de la mitose cette fraction est beaucoup plus importante (Chou *et al.*, 1993; Omary *et al.*, 1998).

La fraction cellulaire soluble des kératines peut aussi être redistribuée lors de l'apoptose ou encore lorsque les cellules sont placées en présence d'un inhibiteur de phosphatases. Les kératines deviennent alors hyperphosphorylées et une augmentation de la fraction soluble des kératines est observée (Omary *et al.*, 1998).

La fraction cellulaire soluble contient des kératines en cours de synthèse ou nouvellement synthétisées puisque le « turnover » des kératines est relativement lent (minutes) (Chou *et al.*, 1992; Denk *et al.*, 1987). La fraction soluble contient aussi des kératines ayant subies des modifications post-traductionnelles qui ont entraînées leur désassemblage du filament (Bachant and Klymkowsky, 1996; Liao *et al.*, 1995).

Omary et ses collaborateurs suggèrent que la solubilité des kératines est différente pour chaque système et comme mentionné plus haut, varie au cours du cycle cellulaire (Omary *et al.*, 1998). Il est donc important de vérifier la distribution des kératines dans les différentes fractions cellulaires lors du développement de l'hépatite afin de comprendre l'importance de cette modification post-traductionnelle dans la réponse des cellules au stress.

CHAPITRE III

3.1 Modèle animal et hépatite alcoolique

Le développement de l'hépatite alcoolique est associée à des modifications dans l'organisation des FIs et à leur agrégation sous forme de CMs. Différents modèles animaux (rat, souris, cochon d'Inde....) ont été développés pour étudier l'hépatite et la formation de CMs (tableau 3.1) (Jensen and Gluud, 1994a).

TABLEAU 3.1

Drogues expérimentales utilisées pour l'induction des CMs chez la souris.

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

Tiré de : (Jensen and Gluud, 1994a)

3.2 La Griséofulvine

Une des drogues les plus utilisées pour étudier le développement des hépatites et la formation des CMs est la griséofulvine (GF) (figure 3.1).

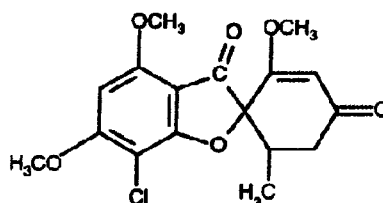


FIGURE 3.1: Structure chimique de la GF

Tiré de : (Develoux, 2001)

La griséofulvine est un produit du métabolisme de *Penicillium* d'où elle a été isolée pour la première fois en 1939 (Oxford *et al.*, 1939). Cet antifongique fut dans un premier temps utilisé en agriculture, et en 1958 utilisé contre une infection induite de *Microsporus canis* chez le porc. Après cette date, il fut rapidement utilisé chez l'humain pour le traitement des dermatophytoses causées par une infection avec les champignons *Microsporum*, *Epidermophyton* ou *Tricophyton* (De Carli and Larizza, 1988; Develoux, 2001).

3.3 Griséofulvine et souris C3H

Le traitement chronique de souris avec la GF entraîne une série de modifications qui mènent à la formation des CMs dans les hépatocytes. Les premières modifications microscopiques, qui font suite à l'intoxication à la GF, sont observées après une semaine de traitement. On observe alors une augmentation du volume des hépatocytes, une accumulation de porphyrine dans les cellules et une dilatation des canalicules biliaires. Ces modifications sont associées à une augmentation de la densité du réseau de FIs (phase I) (Cadrin *et al.*, 2000; Denk *et al.*, 1975; Gschnait *et al.*, 1975; Yokoo *et al.*, 1979). Cette première phase est suivie par une récupération partielle des hépatocytes après trois mois de traitement. Au cours de cette période d'adaptation, les hépatocytes et les canalicules biliaires redeviennent de taille assez semblable à ce qui est observé dans les foies contrôles. Le réseau de FIs semble aussi retourner à son état initial, la densité des FIs apparaît similaire à celle observée chez les souris contrôles (phase II) (Cadrin *et al.*, 2000). Après 4 mois de traitement, certains hépatocytes sont de forme polygonale, possèdent un réseau de FIs et ressemblent aux hépatocytes contrôles. D'autres hépatocytes de formes variables semblent être dépourvus d'un réseau de FIs mais contiennent des agrégats de protéines de FIs: les CMs (phase III) (Cadrin *et al.*, 2000). Ces agrégats protéiques dans les hépatocytes sont similaires du point de vue

microscopique et biochimique aux CMs observés dans le cas d'hépatite alcoolique chez l'humain (Jensen and Gluud, 1994a; Jensen and Gluud, 1994b). Ce modèle animal représente donc le système idéal pour étudier les modifications des FIs au cours du développement de l'hépatite et de la formation des CMs

CHAPITRE IV

LA PROBLÉMATIQUE À LONG TERME

Plusieurs études ont déjà démontré que la phosphorylation est un événement normal et physiologiquement important à l'intérieur des cellules. La phosphorylation est reconnue pour son rôle de régulateur d'un grand nombre de processus cellulaires. Les fonctions des kératines semblent aussi être régulées par un système de phosphorylation / déphosphorylation. Ainsi, l'objectif à long terme de notre étude consiste à élucider la fonction de chacun des sites de phosphorylation des kératines et de comprendre dans quels mécanismes cellulaires ils sont impliqués. Un patron de phosphorylation pourrait être alors proposé pour chacune des situations auxquelles la cellule fait face comme la mitose, l'apoptose et le stress cellulaire. Ainsi, la phosphorylation ou la déphosphorylation de certains sites pourrait avoir un effet sur la capacité des hépatocytes à répondre au stress et sur la réorganisation des FIs au cours de développement de l'hépatite et sur la formation des CMs.

Les différents niveaux de solubilité des kératines qui semblent être médiés par la phosphorylation des kératines à des sites spécifiques pourraient aussi représenter un facteur important dans la régulation du rôle de ces protéines dans la cellule.

L'étude de la phosphorylation et de la solubilité des kératines nous semble donc importante pour comprendre les mécanismes par lesquelles les kératines pourraient protéger les hépatocytes contre les stress toxiques. D'autres études sont présentement en cours dans notre laboratoire pour déterminer les effecteurs (enzymes, kinases, phosphatases et protéines associées) qui pourraient être impliqués dans ces mécanismes cellulaires.

4.1 Méthodologie

Des souris C3H ont été traitées pour différentes périodes de temps (2 semaines à 5 mois) avec une diète contenant de la GF 2.5% p/p. Nous avons étudié par immunobuvardage de type Western différentes fractions cellulaires pour déterminer la solubilité des kératines à différentes périodes au cours du traitement à la GF (solubles, moyennement solubles, peu solubles, très insolubles). Nous avons aussi étudié la répartition de chacune des kératines phosphorylées sur différents sites (K8 pS79, K8 pS431, K18 pS33) dans chacune des fractions cellulaires (solubles, moyennement solubles, peu solubles, insolubles). Finalement, nous avons tenté de déterminer la localisation dans les hépatocytes des différentes fractions des kératines et des kératines phosphorylées à différentes périodes de traitement.

CHAPITRE V

RÉSULTATS

5.1 Résumé de l'article

Plusieurs maladies du foie, comme l'hépatite alcoolique, sont associées à l'organisation du réseau de filaments intermédiaires et à la formation d'agrégats de protéines contenant les kératines 8 et 18, nommés les Corps de Mallory (CMs). L'accumulation d'évidences laisse croire que les kératines 8 et 18 jouent un rôle essentiel dans la protection des hépatocytes contre des stress toxiques ou mécaniques. Déterminer les modifications précises qui affectent les kératines durant le développement des CMs constitue un cheminement important dans la compréhension des mécanismes moléculaires utilisés par les kératines pour accomplir leurs fonctions. Les CMs sont formés dans le foie des souris traitées à la griséofulvine (GF). Ces souris constituent un modèle animal de choix pour investiguer la contribution des kératines dans le maintien de l'intégrité cellulaire durant une intoxication chronique. Les études précédentes ont montré que, durant l'intoxication à la GF, la formation des CMs est précédée par des modifications de l'expression des kératines 8 et 18 (K8/K18), du contenu protéique et de la phosphorylation des kératines. Comme des études ont montré l'existence de liens entre la phosphorylation, la solubilité et la fonction des kératines, nous avons analysé la phosphorylation des kératines à différentes périodes de l'intoxication à la GF, et ce dans les fractions de (K8/K18) solubles et insolubles. Les protéines ont été analysées par des immunobuvardages de type Western en utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre les phospho-kératines (K8 pS79, K8 pS431 et K18 pS33). En plus, nous avons analysé par immunofluorescence la distribution tissulaire de ces phospho-kératines présentes dans les hépatocytes après le traitement à la GF. Nos résultats montrent que durant l'intoxication à la GF, il y a une augmentation de la quantité de kératines insolubles, les phospho-kératines sont prédominantes dans les fractions insolubles, les phospho-kératines sont présentes dans la membrane et le cytosquelette après l'extraction des protéines. Ces résultats supportent l'hypothèse que

les propriétés physico-chimiques comme la phosphorylation et la solubilité des kératines jouent un rôle important dans la protection des hépatocytes contre un stress toxique.

Contribution des auteurs

Kathleen Riopel a réalisé presque en totalité les expériences présentées dans ce travail de recherche. Martin Désaulniers a apporté une assistance technique au niveau de la préparation des cryocoupes de foies. Monique Cadrin a élaboré le projet de maîtrise et supervisé le travail en laboratoire de Kathleen Riopel. Kathleen Riopel et Monique Cadrin ont participé à la rédaction de l'article scientifique présenté dans le présent mémoire.

5.2 Article Scientifique

Keratin 8 and 18: Phosphorylation and Solubility in Griseofulvin intoxicated Mice Liver

KATHLEEN RIOPEL¹, MARTIN DÉSAULNIERS¹ AND MONIQUE CADRIN¹

¹ Département 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

Article soumis à:
Journal of Cell Science

**Keratin 8 and 18: Phosphorylation and Solubility in Griseofulvin
intoxicated Mice Liver**

KATHLEEN RIOPEL¹, MARTIN DÉSAULNIERS¹ AND MONIQUE CADRIN¹

¹ Département 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

Article soumis à:
Journal of Cell Science

Abstract

The cytoskeletal K8/K18 (IFs) are believed to play an essential role in the protection of hepatocytes against mechanical and toxic injuries. This assertion is mainly based on hepatocytes fragility that is observed in transgenic mice deficient in K8 or K18 or carrying mutations on K8 or K18. The molecular mechanism by which keratins would accomplish this function has not been elucidated yet. Liver diseases such as alcoholic hepatitis are associated with modifications, in hepatocytes, of IFs organisation and the formation of keratins 8/18 (K8/K18) containing aggregates named Mallory bodies (MBs). MBs can be induced to form in mice hepatocytes following a treatment with a diet containing griseofulvin. This provides a reliable animal model for assessing the mechanism by which keratin could be involved in the response of hepatocytes to chemical injury. We analyzed a relationship between keratin phosphorylation and keratin solubility. Four cellular fractions were prepared according to protein solubility and the presence of K8/K18 and of K8 and K18 phosphorylation on specific sites was analyzed in the different fraction. The level and phosphorylation of K8/K18 was analyzed after different period of treatment. Our results show that during GF intoxication there are changes in keratins solubility and an increase in the amount of insoluble K8/K18 is observed. The phosphorylation on the different sites analyzed is more prominent in the most insoluble fraction in comparison with the soluble keratin fraction. We show that the more insoluble keratins are phosphorylated keratins at the studied specific sites.

Key words: intermediate filaments, keratin phosphorylation, keratin solubility, Mallory body formation, griseofulvin, hepatitis, C3H mouse strain.

List of abbreviations

IFs	intermediate filaments
K8	keratin 8
K8/K18	intermediate filaments composed of K8 and K18
K8 S79	serine 79 on keratin 8
K8 pS79	phosphorylated serine 79 on keratin 8
MBs	Mallory Bodies
GF	griseofulvin
NP40	Nonidet P-40 soluble fraction
EMP	Empigen BB soluble fraction
P-EMP	Post-empigen BB insoluble fraction

Authors' contributions

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

Introduction

The cytoskeleton of most mammalian cells is composed of three major filamentous structures: 1) tubulin microtubules, 2) actin microfilaments and 3) intermediate filaments (IFs) (Fuchs and Weber, 1994; Herrmann et al., 2003; Lazarides, 1980). The IFs are composed of a large family of proteins expressed in a tissue (Fuchs and Weber, 1994; Lazarides, 1980). Keratins represent the largest subfamily of IF proteins. They are divided into two groups, the acidic type I (K9-K20) and the neutral basic type II (K1-K8) which are expressed in equimolar amounts in most epithelial cells to form obligatory heteropolymers. For example, K18 type I and K8 type II constitute the major keratin pair present in simple epithelium such as hepatocytes (Fuchs and Weber, 1994).

Most of the studies realized *in vitro* on cultured cells have failed in unravelling a role for keratins in cells. Studies on whole animals have been necessary to reveal some keratin functions. For instance, studies on transgenic mice carrying mutations on epidermal keratins presented the first evidence for a role for keratins in protecting cells and tissue from mechanical stress. Later, human blistering skin diseases such as *epidermolysis bullosa simplex* were shown to be the consequence of mutation on keratins (Coulombe et al., 1991; McLean and Lane, 1995; Porter and Lane, 2003; Vassar et al., 1991).

The importance of keratin IFs in hepatocytes was first suggested by their affection in a number of human diseases such as alcoholic liver disease, Wilson liver disease and obesity (Omary et al., 2004). These diseases were known to be associated with changes in IF network organisation and in the formation in hepatocytes of K8 and K18 (K8/18) containing aggregates named Mallory bodies (MBs) (Denk et al., 1982; Denk et al., 2000; Hazan et al., 1986; Jensen and Glud, 1994a; Jensen and Glud, 1994b).

The use of animal model has allowed to clarify the importance of keratins in hepatocytes. Studies using transgenic mice carrying an ectopic human keratin (K14) gene (Albers et al., 1995), a mutated human K18 (Arg89→Cys) gene (Ku et al., 1995) or a K8-null mutation (Loranger et al., 1997) have demonstrated that an intact keratin IF network is necessary to maintain the integrity of hepatocytes against mechanical stress. Moreover, hepatocytes from mice carrying a human K18 with an Arg89→Cys (Liao et al., 1997) or a Ser52→Ala (Ku et al., 1998b) mutation, and from K8-null mice were shown to be more susceptible to various hepatotoxins. Taken together the results of these studies demonstrated that keratins play an active role in the protection of hepatocytes from mechanical and toxic stress.

The recent observation of the association of cryptogenic and non cryptogenic forms of human liver disease with mutations on keratin 8 and 18 is in agreement with results obtained on animal models (Ku et al., 2003a). Even though these reports lead to a role for keratin in maintaining tissue integrity upon exposure to mechanical and toxic stress, the molecular mechanisms underlying this phenomenon is not understood yet.

Keratins are subjected to several posttranslational modifications like glycosylation, acetylation and phosphorylation and posttranslational modifications are believed to regulate their functions (Krebs, 1994; Omary et al., 1998). Protein phosphorylation is highly dynamic and plays a major role in regulating cellular mechanisms such as membrane signalling, mitosis, stress response and apoptosis (Ku and Omary, 1997; Liao et al., 1997; Omary et al., 1998). Significant modifications in keratins phosphorylation occur during the process of mitosis, cell stress response and apoptosis. Thus, regulation of keratin phosphorylation is believed to play an active role in these cellular processes.

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 (Denk et al., 1975). This animal model constitutes a useful tool to investigate the keratin dynamic in hepatocytes response to hepatotoxic

agents. Different studies have shown that MBs are composed of K8/K18 modified K8/K18, cross-linked keratins, ubiquitinated keratins and non-keratin proteins such as glycoproteins (Luisada-Opper et al., 1977; Ohta et al., 1988).

The aim of the present study was to characterize the modifications in keratin dynamics during GF treatment in order to clarify the molecular mechanism by which they accomplish their protective role in response to the presence of toxic agents. We compared the level of keratin in different subcellular fractions in control and GF treated mice livers. Moreover, we analysed the level of K8 S79, K8 S431 and K18 S33 phosphorylation in the different subcellular fraction at different period of GF-treatment. Finally, we analysed the subcellular distribution of the insoluble and the most insoluble keratin fraction by immunofluorescence microscopy.

The results indicate that modifications in keratin phosphorylation represent an early event in the response of hepatocytes to GF intoxication. Moreover, the modifications in keratin solubility observed in the present study are most likely related to the phosphorylation of these proteins. These K8/K18 physico-chemical properties vary during the treatment. Our immunofluorescence analysis of the subcellular fractions suggests that keratin phosphorylation dictates keratin localisation to specific subcellular domains.

Material and Methods

Reagents

Nonidet P-40 and 2-methylbutane were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON). The protein-G-agarose beads and the disuccinimidyl suberate were purchased from Pierce (Rockford, IL). The protease inhibitor cocktail tablet was purchased from Roche diagnostics (Mississauga, ON). The Empigen BB was purchased from Calbiochem® (San Diego, California). The nonfat milk was purchased from Carnation Nestlé® (Wilkes-Barre, PA).

Antibodies

The following antibodies (Ab) were used: Troma 1, a rat monoclonal (m) antibody (mAb) that recognizes K8 (Boller et al., 1987); LJ4 a mouse monoclonal antibody (mAb) that recognizes mouse K8 pS79 and its human equivalent K8 pS73 (Liao et al., 1997); mAb 5B3 that recognizes mouse K8 pS436 and its human equivalent K8 pS431 (Ku and Omary, 1997) and 8250 a rabbit polyclonal antibody (pAb) that recognize K18 pS33 (Ku et al., 1998a). The secondary antibodies for fluorescence microscopy were as follows: tetramethylisothiocyanate (TRITC) or fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled goat anti-rat antibodies; FITC-conjugated donkey anti-rabbit antibody and TRITC or FITC labeled sheep anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON). The M.O.M. kit and Avidin/Biotin blocking kit (Vector® Laboratories Canada, Burlington, ON) were used for immunofluorescence labelling with mAbs LJ4 and 5B3. The secondary antibodies used for Western blotting were as follow: biotinylated goat anti-rat IgG, biotinylated donkey anti-mouse IgG and peroxylase labeled donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON). Horseradish Streptavidin Peroxylase-conjugated (SPC) (Jackson ImmunoResearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON) was used for the detection of the biotinylated Abs.

Animals and treatment

Adults C3H mice (Charles Rivers Canada, St-Constant, QC) weighing 22 to 24g were fed a semi-synthetic diet (Teklab Test Diet, Madison, WI) containing 2.5% GF (W/W) (a generous gift of Schering Corp., Kenilworth, NJ) for different periods ranging from 2 weeks to 5 months according to the methods of Denk *et al.* (Denk et al., 1975). Control mice were fed the same diet without GF. The mice were sacrificed by cervical dislocation and livers were removed, frozen quickly and kept at -80°C in 2-methylbutane (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON). All experiments were conducted according to the requirements of the Canadian Council Animal Care and of the “Université du Québec à Trois-Rivières” Animal Welfare Committee.

Protein preparation

The different subcellular fraction was prepared according to the schema shown in Fig 1. Liver (20mg), from control and treated mice were homogenized with a Potter-Elvehjem Tissue Grinder in 1 ml of ice-cold PBS (Phosphate Buffer Saline, 137mM NaCl, 2.68mM KCl, 4.29mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄, pH 7.2) containing 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM NaF, and a protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Mississauga, ON). Samples were centrifuged for 20 minutes at 16 000g. Supernatants were collected as the PBS fraction. The pellets were homogenized in 1 ml of ice-cold PBS containing 1% NP-40 (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON) and the protease inhibitor cocktail. After agitation for 1 hour at 4 °C, the samples were centrifuged for 20 minutes at 16 000 g and the supernatants were collected as the NP40 fraction. The pellets were homogenized in 1 ml of ice-cold PBS containing 1% of Empigen BB (EMP) (Calbiochem®, San Diego, California) and the protease inhibitor cocktail. After agitation for 1 hour at 4 °C, the samples were centrifuged for 20 minutes at 16 000 g and the supernatants collected as the EMP fraction. The pellets were dissolved in 9.5 M urea and referred as the post-EMP fraction (P-EMP).

Immunoprecipitation

The Abs Lj4 was covalently bound to protein-G-agarose beads with disuccinimidyl suberate (DSS) according to the protocol of Pierce (Rockford, IL). The cell fractions (PBS, NP40 and EMP), were subjected to immunoprecipitation overnight at 4 °C with the antibody-conjugated protein-G-agarose beads. The beads were washed with quenching buffer (25 mM tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.2) and centrifuged to eliminate all unbound proteins. The pellets were resuspended in 25 µl of Laemmli sample buffer without β-mercaptoethanol. After centrifugation the supernatants containing proteins were recovered for analysis.

SDS-PAGE and Western Blotting analysis

200 µl of each fraction were precipitated overnight in ethanol at -20 °C and solubilized in 25 µl of Laemmli sample buffer were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels (Laemmli, 1970). Gels were stained with 0.1% Coomassie Blue or

immunoblotted. For immunoblotting, gels were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad laboratories Canada, Mississauga, ON) and processed for immunodetection with the different anti-keratin antibodies. Briefly, the membranes were blocked overnight with PBS- 5% nonfat milk (Carnation, Nestlé®, Wilkes-Barre, PA) followed by washes with PBS-T (PBS, 0.2% Tween 20) for 30 minutes. The membranes were then probed with one of the different antibodies (mAb Troma I; mAb LJ4; mAb 5B3; mAb 8250) in PBS-5% nonfat milk for 1 hour at room temperature (RT). After washing with PBS-T, the membranes were incubated for 45 minutes with the appropriate secondary antibody. Followed by streptavidin-horseradish peroxidase (when a biotinylated secondary antibody was used) incubation for 30 minutes. The membranes were washed with PBS-T prior to the auditioning of the chemiluminescent horseradish peroxidase substrate, Luminol, according to the recommendations of the company (Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON). The membranes were finally exposed to Blue X-Omat X-ray film sheets (Mandel Scientific Company, Guelph, ON) to locate antibodies binding.

Immunofluorescence microscopy

Cryostat sections (4 µm) of fresh liver were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, for 10 minutes at RT, rinsed in PBS and processed for immunostaining. Other sections were processed for extraction prior fixation. Sections were treated with PBS, containing 1% NP-40 and protease inhibitor cocktail for 15 minutes, rinsed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde rinsed again in PBS and processed for immunostaining. Some sections were extracted with PBS containing 1% NP-40 and protease inhibitor cocktail for 15 minutes, rinsed with PBS, extracted with PBS containing 1% Empigen BB and protease inhibitor cocktail for 15 minutes, rinsed with PBS and then fixed with 4% paraformaldehyde, rinsed in PBS and processed for immunostaining.

For total IF immunostaining, sections were incubated for 45 minutes at RT with the rat mAb Troma 1, rinsed in PBS and incubated with the secondary antidody, goat anti-rat IgG conjugated to FITC or TRITC for 30 minutes, rinsed in PBS and mounted

with the anti fading agent 0.1% PPDA (P-phenylene diamine) diluted in 50% (V/V) glycerol/PBS. In double-immunostaining experiments for detection of total keratin and phosphorylated keratin 8, the sections were incubated for 1 hour at RT either mouse mAb LJ4 or mAb 5B3 diluted in PBS, using the M.O.M. (mouse on mouse) detection kit and an Avidin/Biotin blocking kit according to the recommendations of the company. The sections were incubated for 45 minutes at RT with the secondary antidody, sheep anti-mouse IgG conjugated to FITC or TRITC rinsed in PBS and then processed for total IF staining. For immunostaining of phosphorylated keratin 18, the sections were incubated for 1 hour at RT with the 8250 rabbit polyclonal antibody, rinsed in PBS and incubated for 45 minutes with the donkey FITC conjugate. The sections were then rinsed and labelled for K8 detection. The sections were mounted with the anti fading agent 0.1% PPDA and kept at -20°C. Photomicrographs images were collected using an Olympus® BX60 microscope coupled with a CoolSNAP-PROcf monochrome camera (Meyer instruments, Houston, TX).

Results

Keratin distribution in subcellular fractions In the first part of this study, we set out to characterize the distribution of proteins and especially keratins in different subcellular compartments. Proteins from control and GF-treated mice liver (2 weeks and 5 months) were prepared according to their solubility as describe in Material and Methods section and then separated by SDS-PAGE. Coomassie blue staining of the gels shows that most of the proteins are present in the PBS (soluble) and NP40 subcellular fractions (Fig.2). Some proteins are also found in the EMP and P-EMP subcellular fractions. The major proteins present in these fractions have a molecular weight of 55 and 49 kDa which correspond to the molecular weight of K8 and K18 respectively.

The different subcellular fractions were normalized to amount of liver samples as described in material and methods section. The band below 55 kDa is degradation product of K8 (Cadrin et al., 1991; Cadrin et al., 2000). By Western blotting we examined the pattern of keratins distribution in the different subcellular fractions from

control and GF-treated mice livers (2w, 5m) (Fig 3A, 3E). In control livers, small amounts of keratin are found in PBS and NP40. Most of the keratins are recovered in the EMP fraction. Some keratins are not solubilized by EMP and constitute the keratin P-EMP subcellular fraction. As described previously, there is an increase in the amount of keratin after GF treatment (Cadrin et al., 2000; Fausther et al., 2004).

There are important modifications in the pattern of keratin distribution in the different subcellular fractions (K8 densitometric analysis graphic). After 2 weeks of GF treatment there is an increase in the amount of keratins present in the PBS and the NP40 fractions in comparison with EMP fraction. There is also an increase in the level of keratins present in the P-EMP fraction.

As described previously, there is an increase in the amount of keratin after GF treatment (Cadrin et al., 2000; Fausther et al., 2004). After 5 months of GF treatment, a treatment that is known to induce MBs formation, keratins are mainly increased in PBS, NP40 and P-EMP fractions when compared with control. However, this increase in PBS and NP-40 fractions is less important than after 2 weeks treatment. The increase in the amount of keratins in the P-EMP fraction is more important than after 2 weeks treatment.

K8 phosphoepitopes distribution in subcellular fractions. The modification in keratin phosphorylation in the different subcellular fractions was analyzed by Western blotting using specific keratin phosphoepitopes antibodies. The pattern of K8/18 phosphorylation on different sites (K8 S79, K8 S436, K18 S33) was analyzed and summary of the data is presented in Table 1. The results show that the different K8/K18 phosphoepitopes associate with different subcellular fractions and that distribution varies during GF treatment. For instance, K8 pS79 is not detected in the subcellular fractions prepared from control livers. (Fig 3B, F). However, after 2 weeks of treatment, K8 pS79, is detected in EMP and P-EMP fraction (Fig 3B). After 5 months of treatment K8 pS79 is present only in the P-EMP fraction (Fig 3F). As for K8 p79, K8 pS436 is not observed in control livers (Fig 3C, G). After two weeks of treatment it is mainly present

in the EMP and P-EMP fractions (Fig 3C). The amount of K8 pS436 decreases after 5 months of treatment (Fig 3G). In the case of K18 S33, its phosphorylation is not detected in control livers (Fig 3D, H). After 2 weeks of treatment K18 pS33 is observed only in the P-EMP fraction (Fig 3D). The amount of K18 pS33 increases in the P-EMP fraction after 5 months of treatment (Fig 3H). This results were confirm by immunoprecipitation with the different antibodies and western blotting analysis (data not shown).

Immunostaining of Keratins IFs on extracted liver sections. To determine the relationship between keratin subcellular fractions, as analysed by Western blotting, and their localization in the hepatocytes, cryostat sections of fresh livers were extracted using the same extraction solutions as the one used for biochemical analysis and processed for immunofluorescence microscopy. We first examined the general distribution of keratins in unextracted and extracted liver sections (Fig. 4). In unextracted control livers, keratin IF network (TROMA 1 staining) is denser at cell periphery and around the bile canaliculi (Fig. 4A). After 2 weeks of GF-treatment, the IF network is denser in the cytoplasm and around the dilated bile canaliculi (Fig. 4D). After 5 months of GF-treatment there is a mosaic pattern of cells with and without IF staining. The presence of MBs is observed in some hepatocytes (Fig. 4G). NP40 extracted control liver sections are presented in (Fig. 4B, E, H). There is a general reduction in staining in all subcellular compartments and remaining filament corresponds to EMP + P-EMP subcellular fractions. After EMP extraction, the filament correspond to the P-EMP fraction. In control liver sections most keratin IF network is removed and only a faint staining remain at the periphery of hepatocytes (Fig. 4C). Two weeks GF treated liver sections extracted with EMP shows clusters of cells with an important IF network (Fig. 4F). EMP extracted 5 months GF treated liver sections shows a general decrease in IF staining and. MBs are still present after the EMP extraction (Fig. 4I).

K8 pS79 subcellular localization in extracted liver sections. In control livers K8 pS79 was not detected except a few hepatocytes in mitosis (Fig. 5A). After 2 weeks of

treatment there is an intense cytoplasmic and peripheral staining of K8 pS79 in clusters of hepatocytes as well as in some isolated cells (Fig. 5D). Some isolated cells have cytoplasmic network (Fig. 5G). There is a general reduction of K8 pS79 staining after NP40 extraction and remaining filament correspond to EMP + P-EMP subcellular fractions and no major changes in K8 pS79 immunofluorescence staining (Fig. 5B, E, H). After EMP extraction the filament correspond to the P-EMP fraction. K8 pS79 is not detected in P-EMP control liver section (Fig. 5C). Two weeks GF treated liver sections (Fig. 5F), the P-EMP fraction shows clusters of cell and isolated cells containing K8 pS79. EMP extracted 5 months GF treated liver sections shows some isolated cells in mitosis with peripheral staining (Fig. 5I).

K18 pS33 subcellular localization in extracted liver sections. In control liver (Fig. 6A), K18 pS33 was detected at the cell periphery of hepatocytes. After 2 weeks of GF-treatment, there is an increase of K18 pS33 at the cell periphery and the dilated bile canaliculi are highly stained (Fig. 6D) and some hepatocytes are highly stained. After 5 months of treatment, MBs are present in some hepatocytes (Fig. 6G). K18 pS33 phosphorylation is observed in MBs and in the cytoplasm of some hepatocytes. NP40 extractions correspond to filament of EMP + P-EMP subcellular fractions. The EMP + P-EMP extracted liver sections for each treatment time show K18 pS33 immunostaining at the cells periphery and in MBs at 5 months of treatment (Fig. 6B, E, H). After EMP extraction, the filament correspond to the P-EMP fraction. K18 pS33 is detected in small amount at the cell periphery in the P-EMP liver section (Fig. 6C). The P-EMP extracted 2 weeks liver sections (Fig. 6F) show small clusters of cells containing K8 pS33 staining. After 5 months of treatment, staining K8 pS33 is present in MBs (Fig. 6I).

K8 pS436 subcellular localization in extracted liver sections. In control liver, K8 pS436 is not detected (Fig. 7A, B, C). After 2 weeks of GF treatment clusters of cells show K8 pS436 in the cytoplasm and at the cell periphery (Fig. 7D). After 5 months of treatment, MBs present in some hepatocytes are positive for K8pS436 (Fig. 7G). K8 pS436 phosphorylation is also present in some isolated or cluster of hepatocytes (Fig. 7B, E, H). NP40 extractions correspond to filament of EMP + P-EMP subcellular

fractions. After NP40 extraction most of the staining is observed at the cell periphery (Fig. 7B, E, H). After EMP extraction the filament correspond to the P-EMP fraction. EMP extraction of two weeks GF treated liver sections shows cluster of cell or cell with K8 pS436 present only at the periphery of some hepatocytes (Fig. 7F). EMP extracted 5 months GF treated liver section shows stained MBs (Fig. 7I).

Discussion

In the present study we show that GF-intoxication induces profound modifications in keratins solubility pattern. These modifications are associated with important changes in K8/K18 phosphorylation status.

Solubility: In this experiment we show for the first time that in hepatocytes, keratins are present mainly in the EMP and P-EMP insoluble fractions in control and treated mice liver. This pattern of distribution is in agreement with the results of Chou *et al.* who showed similar pattern of keratin distribution in cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. In HT-29 cells in the G0/G1 stage of cell cycle ~ 5 % of total keratins are soluble in absence of detergent (cytosolic pool); ~ 10-15 % are soluble in the presence of non-ionic detergent such as NP40 (membrane fraction); and ~ 45 % of keratins are soluble in a zwitterionic detergent such as EMP (cytoskeletal fraction); ~ 40 % of the keratins are resistant to detergent and remain in the post-EMP fraction (remain cytoskeletal fraction) (Chou et al., 1993; Omary et al., 1998). These authors suggested that this pattern of distribution of keratin in different subcellular fractions may be particular to different cell systems and cellular status.

In our study, we compared the ratio of keratins contained in each subcellular fraction with the total amount of keratins in all four subcellular fraction in control or GF-treated mice livers.

In control livers, no significant changes were observed in each subcellular fraction. After 2 weeks of treatment we observed an increase from ~ 2 % to 20 % and an increase from ~ 2 % to 6 % after 5 months of intoxication in the PBS subcellular fraction. NP40 subcellular fraction shows an increase from ~ 4 % to 18 % after 2 weeks of treatment and an increase from ~ 4 % to 12 % after 5 months of GF intoxication. EMP fraction shows a decrease from ~ 75 % to 40 % after 2 weeks and 5 months of GF treatment. Finally, after 2 weeks of treatment no significant changes were observed in the P-EMP and an increase of K8 from ~ 19 % to 40 % was observed after 5 months of intoxication.

This pattern of distribution is in agreement with the observation of Chou *et al.* described previously (Chou *et al.*, 1993). Moreover, our results are also in agreement with those of Toivola *et al.* 2002, who showed in control cells that keratins are mainly present in the HSE extracts (EMP + P-EMP equivalent) and less in TX-100 extracts (PBS + NP40 equivalent) in cell cultures (Toivola *et al.*, 2002).

A few studies have suggested that different keratin subcellular fractions could play different roles in the regulation of keratins function (Ku *et al.*, 1996). For instance, soluble keratins have been shown to interact with 14-3-3 protein, a protein involved in cell cycle control and its interaction is modulated with the phases of cell cycle.

Phosphorylation: Phosphorylation is the most studied posttranslational modification that affects IF proteins. Modification in IF protein phosphorylation in disease states has been reported for example in neuronal cells, muscular cells, and glial cells. K8/18 present in hepatocytes are phosphorylated at specific sites and the modulation of these specific phosphorylation sites has been suggested to play a regulatory role in keratin functions. In the case of K8/18, a basal level of phosphorylation is observed in cells and modifications in K8/18 phosphorylation or hyperphosphorylation have been observed in the response of hepatocytes to various conditions such as GF or DDC treatment (Stumptner *et al.*, 2001). All these studies lead to the conclusion that K8/18 and the modulation of their phosphorylation play a role in

response of cells to stress. Although it is well accepted that imbalances in the regulation in phosphorylation is involved in hepatitis, the importance of phosphorylation in the development of the disease has not been clarified yet (Ku et al., 2003b; Toivola et al., 2004). In fact, several studies suggest a role for K8/18 in the resistance to toxic stress, but the mechanism of these functions is unknown (Marceau et al., 2001). Previous studies have shown an hyperphosphorylation and solubilization of keratin with okadaic acid (Kasahara et al., 1993; Paramio, 1999; Yatsunami et al., 1993).

In order to determine the relationship between phosphorylation, stress and subcellular distribution, we examine K8 pS79, K8 pS436 and K18 pS33 in different subcellular fractions and this specific sites is observed in the EMP and P-EMP subcellular fractions.

Our results of phosphorylation sites associated with different subcellular fraction were confirmed by immunofluorescence staining on extracted sections. We wanted to determine if the insoluble and phospho-keratins were associated with specific subcellular fraction. The results obtained with K8 pS79, K18 pS33 and K8 pS436 show that these phosphorylation sites is observed in insoluble EMP and P-EMP subcellular fraction.

In an earlier study, Omary *et al.* have shown that K8 pS73, K8 pS436 and K18 pS33 during G0/G1 stage of cell cycle is abundant in PBS and NP40 subcellular fraction, and less present in EMP fraction and abundant in P-EMP subcellular fractions in HT-29 cell (Omary et al., 1998). However, Toivola et al. 2002 have shown that K8 pS73 in HT-29 cell culture is present only in HSE extracts (EMP + P-EMP equivalent) (Toivola et al., 2002). Our observations are in agreement with the results of Toivola *et al.* showing an increase in K8 pS73 in HSE extracts in HT-29 cell treated with CL-A (phosphatases inhibitor) (Toivola et al., 2002). Taken together these results show that the different keratin subcellular fractions have different solubility. It has been proposed by Toivola *et al.* that phosphorylation of K8 pS73 interferes with keratin filament assembly and may alter keratin solubilization (Toivola et al., 2002).

Conclusion

Several studies have demonstrated the presence of phosphorylation in the liver of GF-treated mouse and cell culture such as HT-29 (Fausther et al., 2004; Omary et al., 1998). Previous results showed that the increase of the expression as well as modifications in phosphorylation of K8 and K18 are early events of the response of hepatocytes to GF-intoxication. The phosphorylation is a significant event in the regulation of several cellular functions. The modifications of solubility and phosphorylation represent an early event in the response of hepatocytes to stress induced by GF. Moreover, the phosphorylation seems directly affect keratin solubility.

In our study, we present evidence that phosphorylation is associated with specific subcellular fraction and affect keratins IFs integrity and solubility. The change in keratin level, phosphorylation and solubility in the different subcellular fractions observed in our study suggest that these physicochemical changes in keratins properties represent a key element in the contribution of the cytoskeleton to the stress response induced by the presence of GF.

The regulation of phosphorylation, which is different for K8 and K18, suggests that they play different functions in the cell. The importance of the modifications of solubility and phosphorylation might represent a significant phenomenon in the protective role associated to keratin in the response of hepatocytes to the stress induced by GF treatment. The phosphorylation and the solubility of keratin seem to be important in the integrity and the homeostasis of the cell.

In relation with other studies, the increase in the amount of soluble keratins seems to be important for the association of different protein to intermediate filament in soluble fraction. For example, K18 pS33 is associated to 14-3-3 proteins only in soluble fraction (Ku et al., 1998a). Ran, a GTPase of the Ras superfamily, is associated with K8/K18 IFs in the soluble NP40 subcellular fraction (Tao et al., 2005). AKT, a protein in the apoptosis pathway, is associated with K10 only in soluble fraction (Paramio et al., 2001; Santos et al., 2002).

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.

This work was supported by a grant from NSERC.

Figure Legends

Fig. 1. Subcellular fraction preparation as described in materials and methods.

Fig. 2. Subcellular fractions and protein distribution. Proteins were fractionated as described in materials and methods and then analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. Liver from (A) control and 2 weeks GF-treated mice and (B) control and 5 months treated liver.

Fig. 3. Subcellular fractions and keratin distribution. Proteins were fractionated as described in materials and methods then analyzed by SDS-PAGE and by immunoblotting using antibody specific to K8. Liver from (A) control and 2 weeks treated liver and (B) control and 5 months treated liver. Arrows: bile canaliculi, Arrowhead: cell with FIs network, asterix: cell without FIs network, † : MBs.

Fig. 4. K8 staining, subcellular localization and subcellular fraction. Cryostat sections were extracted and stained using antibody specific to K8 as described in material and methods. Liver from control (A, B, C), 2 weeks (D, E, F) and 5 months (G, H, I) treated liver. Non-extracted liver section (A, D, G), P-EMP + EMP extracted liver sections (B, E, H) and P-EMP (C, F, I) extracted liver sections.

Fig. 5. K8 pS79 staining, subcellular localization and subcellular fraction. Cryostat sections were extracted and stained using antibody specific to K8 pS79 as described in material and methods. Liver from control (A, B, C), 2 weeks (D, E, F) and 5 months (G, H, I) treated liver. Non-extracted liver section (A, D, G), P-EMP + EMP extracted liver sections (B, E, H) and P-EMP (C, F, I) extracted liver sections.

Fig. 6. K18 pS33 staining, subcellular localization and subcellular fraction. Cryostat sections were extracted and stained using antibody specific to K18 pS33 as described in material and methods. Liver from control (A, B, C), 2 weeks (D, E, F) and 5 months (G,

H, I) treated liver. Non-extracted liver section (A, D, G), P-EMP + EMP extracted liver sections (B, E, H) and P-EMP (C, F, I) extracted liver sections.

Fig. 7. K8 pS436 staining, subcellular localization and subcellular fraction. Cryostat sections were extracted and stained using antibody specific to K8 pS436 as described in material and methods. Liver from control (A, B, C), 2 weeks (D, E, F) and 5 months (G, H, I) treated liver. Non-extracted liver section (A, D, G), P-EMP + EMP extracted liver sections (B, E, H) and P-EMP (C, F, I) extracted liver sections.

Bibliography

Albers, K. M., Davis, F. E., Perrone, T. N., Lee, E. Y., Liu, Y. and Vore, M. (1995). Expression of an epidermal keratin protein in liver of transgenic mice causes structural and functional abnormalities. *J Cell Biol* **128**, 157-69.

Boller, K., Kemler, R., Baribault, H. and Doetschman, T. (1987). Differential distribution of cytokeratins after microinjection of anti-cytokeratin monoclonal antibodies. *Eur J Cell Biol* **43**, 459-68.

Cadrin, M., French, S. W. and Wong, P. T. (1991). Alteration in molecular structure of cytoskeleton proteins in griseofulvin-treated mouse liver: a pressure tuning infrared spectroscopy study. *Exp Mol Pathol* **55**, 170-9.

Cadrin, M., Hovington, H., Marceau, N. and McFarlane-Anderson, N. (2000). Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver. *J Hepatol* **33**, 199-207.

Chou, C. F., Riopel, C. L., Rott, L. S. and Omary, M. B. (1993). A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. Lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility. *J Cell Sci* **105** (Pt 2), 433-44.

Coulombe, P. A., Hutton, M. E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A. S. and Fuchs, E. (1991). Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* **66**, 1301-11.

Denk, H., Gschnait, F. and Wolff, K. (1975). Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation. *Lab Invest* **32**, 773-6.

Denk, H., Krepler, R., Lackinger, E., Artlieb, U. and Franke, W. W. (1982). Immunological and biochemical characterization of the keratin-related component of Mallory bodies: a pathological pattern of hepatocytic cytokeratins. *Liver* **2**, 165-75.

Denk, H., Stumptner, C. and Zatloukal, K. (2000). Mallory bodies revisited. *J Hepatol* **32**, 689-702.

Fausther, M., Villeneuve, L. and Cadrin, M. (2004). Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice. *Comp Hepatol* **3**, 5.

Fuchs, E. and Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* **63**, 345-82.

Hazan, R., Denk, H., Franke, W. W., Lackinger, E. and Schiller, D. L. (1986). Change of cytokeratin organization during development of Mallory bodies as revealed by a monoclonal antibody. *Lab Invest* **54**, 543-53.

Herrmann, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., Aebi, U. and Magin, T. M. (2003). Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol* **223**, 83-175.

Jensen, K. and Gluud, C. (1994a). The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies (Part 1 of a literature survey). *Hepatology* **20**, 1061-77.

Jensen, K. and Gluud, C. (1994b). The Mallory body: theories on development and pathological significance (Part 2 of a literature survey). *Hepatology* **20**, 1330-42.

Kasahara, K., Kartasova, T., Ren, X. Q., Ikuta, T., Chida, K. and Kuroki, T. (1993). Hyperphosphorylation of keratins by treatment with okadaic acid of BALB/MK-2 mouse keratinocytes. *J Biol Chem* **268**, 23531-7.

Krebs, E. G. (1994). The growth of research on protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* **19**, 439.

Ku, N. O., Darling, J. M., Krams, S. M., Esquivel, C. O., Keeffe, E. B., Sibley, R. K., Lee, Y. M., Wright, T. L. and Omary, M. B. (2003a). Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6063-8.

Ku, N. O., Liao, J., Chou, C. F. and Omary, M. B. (1996). Implications of intermediate filament protein phosphorylation. *Cancer Metastasis Rev* **15**, 429-44.

Ku, N. O., Liao, J. and Omary, M. B. (1998a). Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *Embo J* **17**, 1892-906.

Ku, N. O., Michie, S., Oshima, R. G. and Omary, M. B. (1995). Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. *J Cell Biol* **131**, 1303-14.

Ku, N. O., Michie, S. A., Soetikno, R. M., Resurreccion, E. Z., Broome, R. L. and Omary, M. B. (1998b). Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice. *J Cell Biol* **143**, 2023-32.

Ku, N. O. and Omary, M. B. (1997). 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* **272**, 7556-64.

Ku, N. O., Soetikno, R. M. and Omary, M. B. (2003b). Keratin mutation in transgenic mice predisposes to Fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology* **37**, 1006-14.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* **283**, 249-256.

Liao, J., Ku, N. O. and Omary, M. B. (1997). Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells. *J Biol Chem* **272**, 17565-73.

Loranger, A., Duclos, S., Grenier, A., Price, J., Wilson-Heiner, M., Baribault, H. and Marceau, N. (1997). Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity. *Am J Pathol* **151**, 1673-83.

Luisada-Opper, A. V., Kanagasundaram, N. and Leevy, C. M. (1977). Chemical nature of alcoholic hyalin. *Gastroenterology* **73**, 1374-6.

Marceau, N., Loranger, A., Gilbert, S., Daigle, N. and Champetier, S. (2001). Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease. In *Biochem Cell Biol*, vol. 79, pp. 543-55.

McLean, W. H. and Lane, E. B. (1995). Intermediate filaments in disease. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 118-25.

Ohta, M., Marceau, N., Perry, G., Manetto, V., Gambetti, P., Autilio-Gambetti, L., Metuzals, J., Kawahara, H., Cadrin, M. and French, S. W. (1988). Ubiquitin is present on the cytokeratin intermediate filaments and Mallory bodies of hepatocytes. *Lab Invest* **59**, 848-56.

Omary, M. B., Coulombe, P. A. and McLean, W. H. (2004). Intermediate filament proteins and their associated diseases. *N Engl J Med* **351**, 2087-100.

Omary, M. B., Ku, N. O., Liao, J. and Price, D. (1998). Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem* **31**, 105-40.

Paramio, J. M. (1999). A role for phosphorylation in the dynamics of keratin intermediate filaments. *Eur J Cell Biol* **78**, 33-43.

Paramio, J. M., Segrelles, C., Ruiz, S. and Jorcano, J. L. (2001). Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKC ζ mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* **21**, 7449-59.

Porter, R. M. and Lane, E. B. (2003). Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function. *Trends Genet* **19**, 278-85.

Santos, M., Paramio, J. M., Bravo, A., Ramirez, A. and Jorcano, J. L. (2002). The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J Biol Chem* **277**, 19122-30.

Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Lehner, M., Zatloukal, K. and Denk, H. (2001). 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* **34**, 665-75.

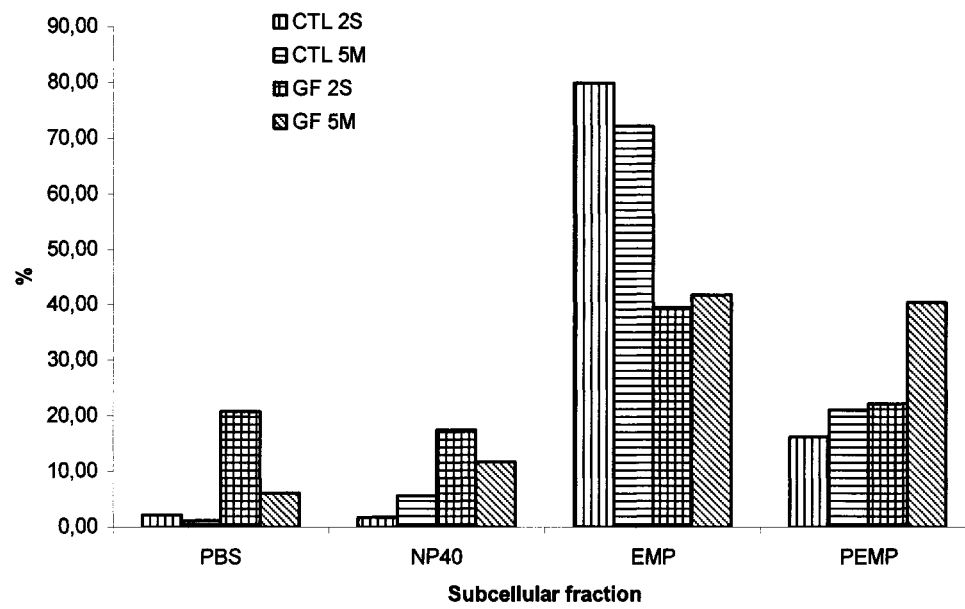
Tao, G. Z., Zhou, Q., Strnad, P., Salemi, M. R., Lee, Y. M. and Omary, M. B. (2005). Human Ran cysteine 112 oxidation by pervanadate regulates its binding to keratins. *J Biol Chem* **280**, 12162-7.

Toivola, D. M., Ku, N. O., Resurreccion, E. Z., Nelson, D. R., Wright, T. L. and Omary, M. B. (2004). Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology* **40**, 459-66.

Toivola, D. M., Zhou, Q., English, L. S. and Omary, M. B. (2002). Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells. *Mol Biol Cell* **13**, 1857-70.

Vassar, R., Coulombe, P. A., Degenstein, L., Albers, K. and Fuchs, E. (1991). Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* **64**, 365-80.

Yatsunami, J., Komori, A., Ohta, T., Suganuma, M., Yuspa, S. H. and Fujiki, H. (1993). Hyperphosphorylation of cytokeratins by okadaic acid class tumor promoters in primary human keratinocytes. *Cancer Res* **53**, 992-6.



K8 Densitometric analysis ; Riopel et al.

CELL EXTRACTS

Liver 20mg

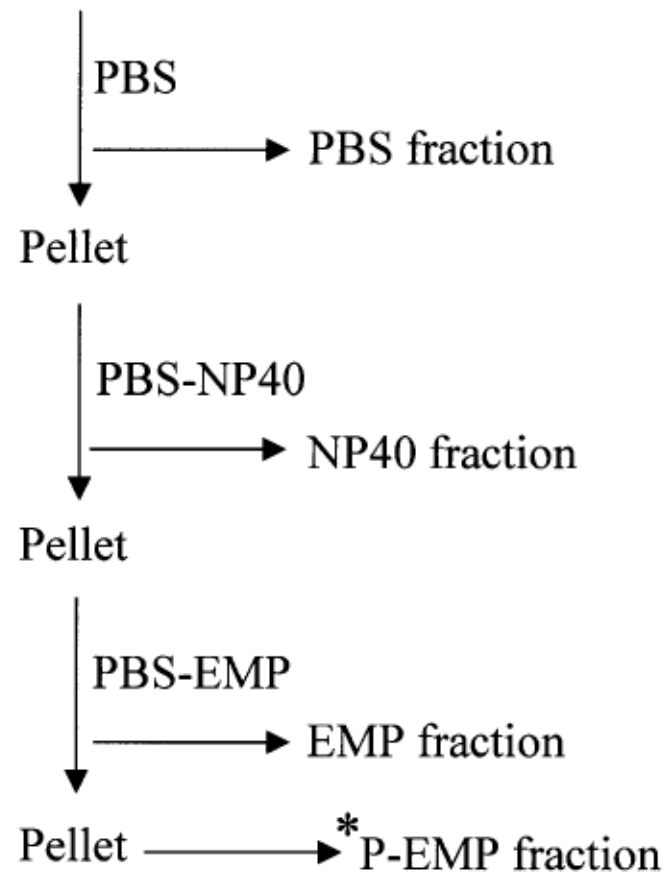


Figure 1; Riopel et al.

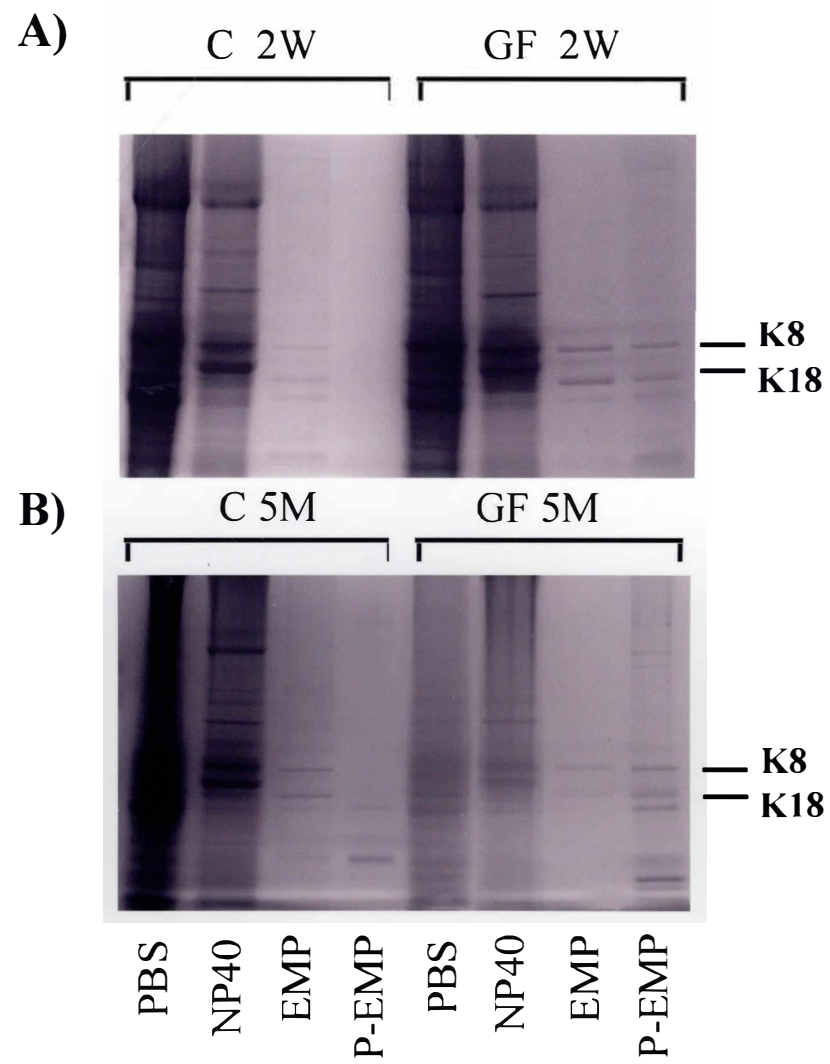


Figure 2; Riopel et al.

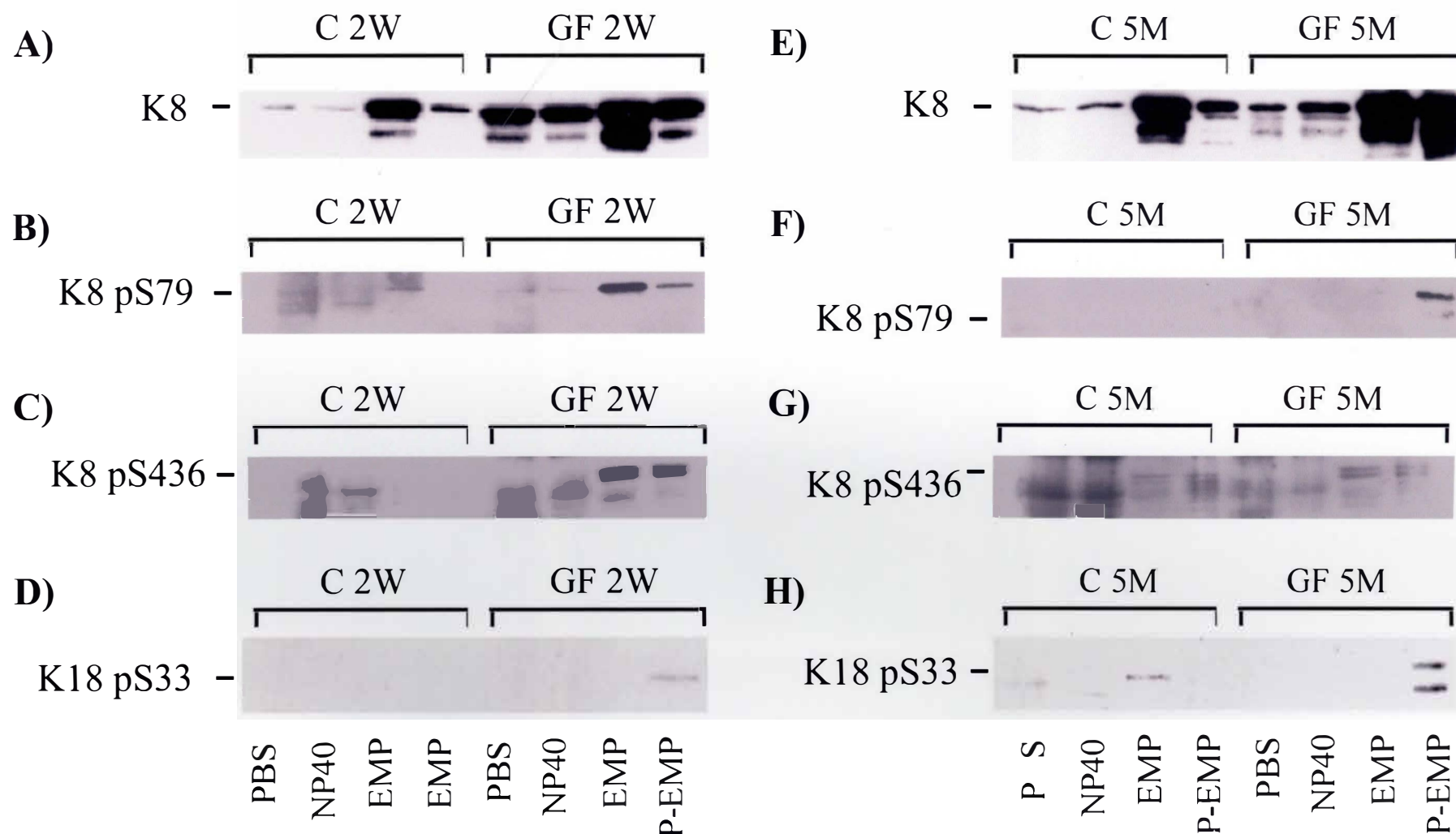


Figure 3; Riopel et al.

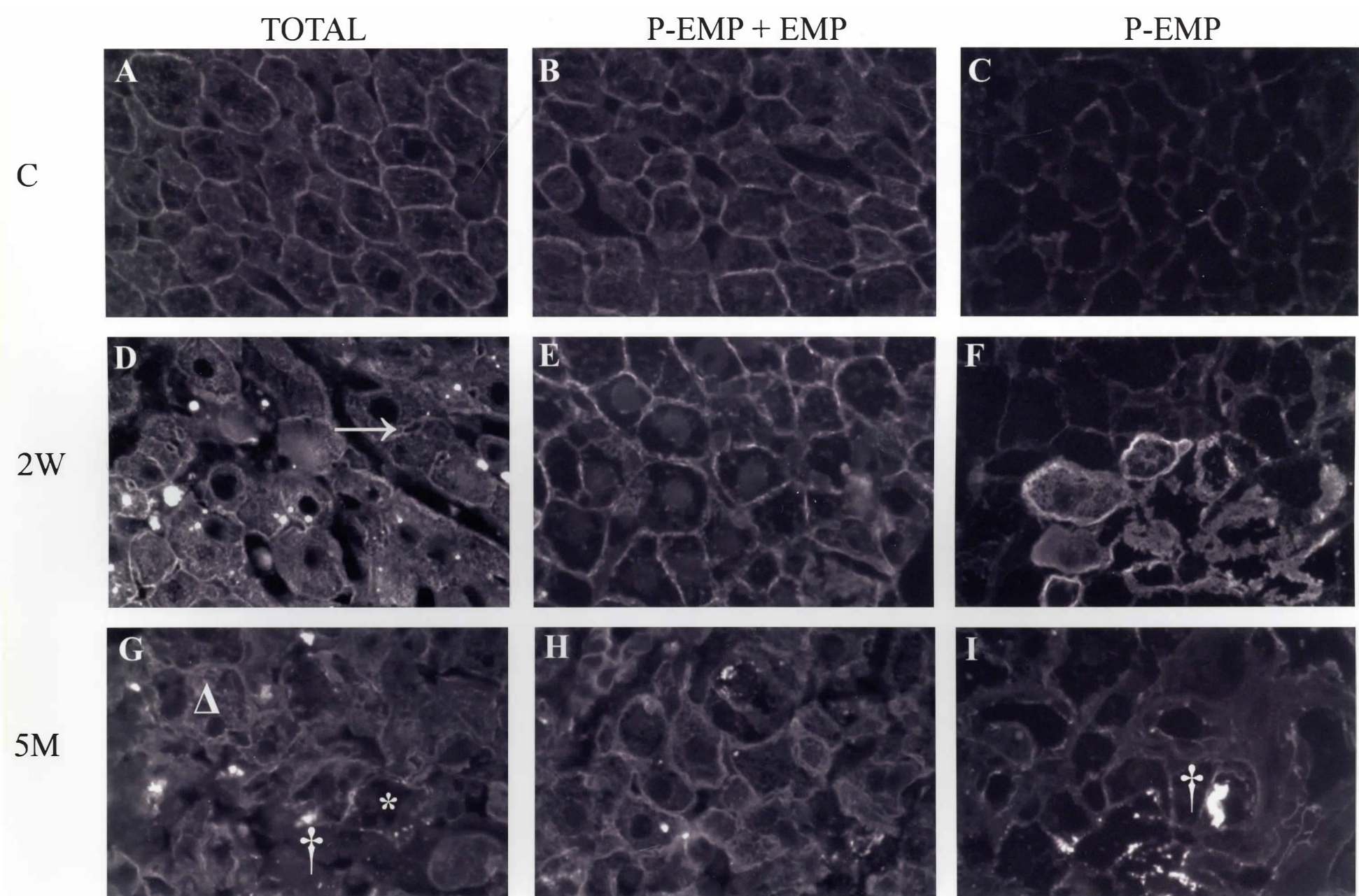


Figure 4; Riopel et al.

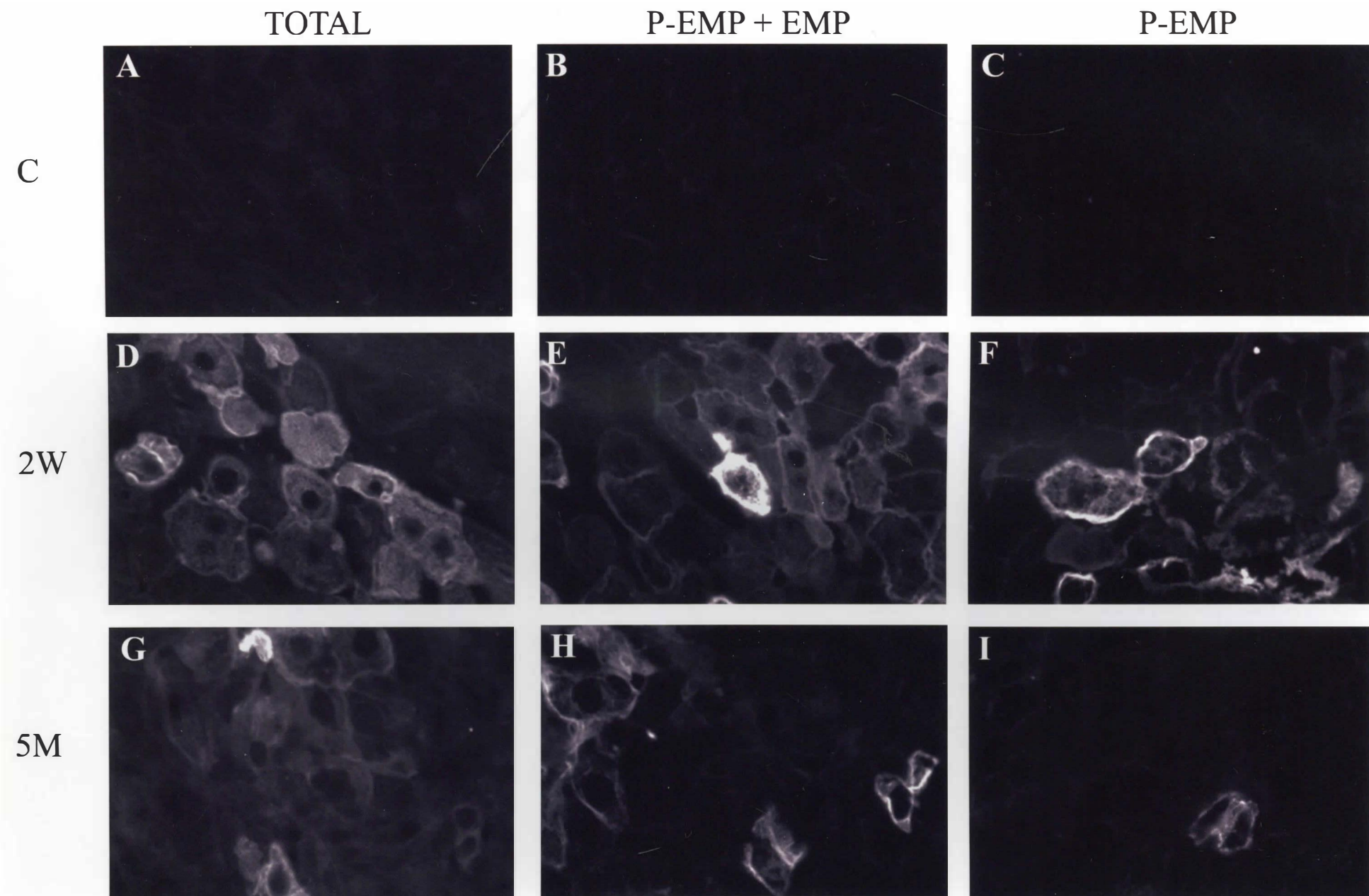


Figure 5; Riopel et al.

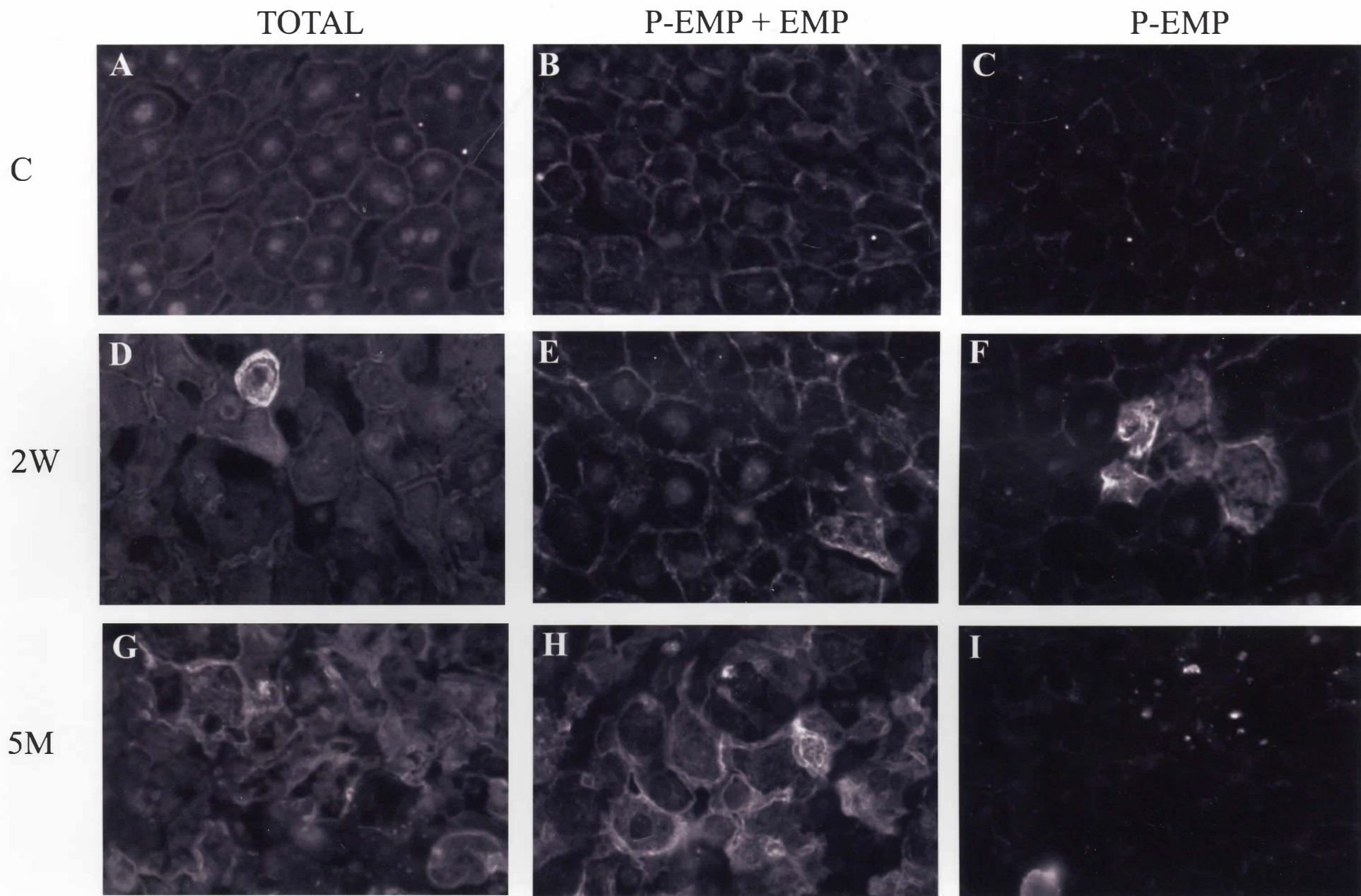


Figure 6; Riopel et al.

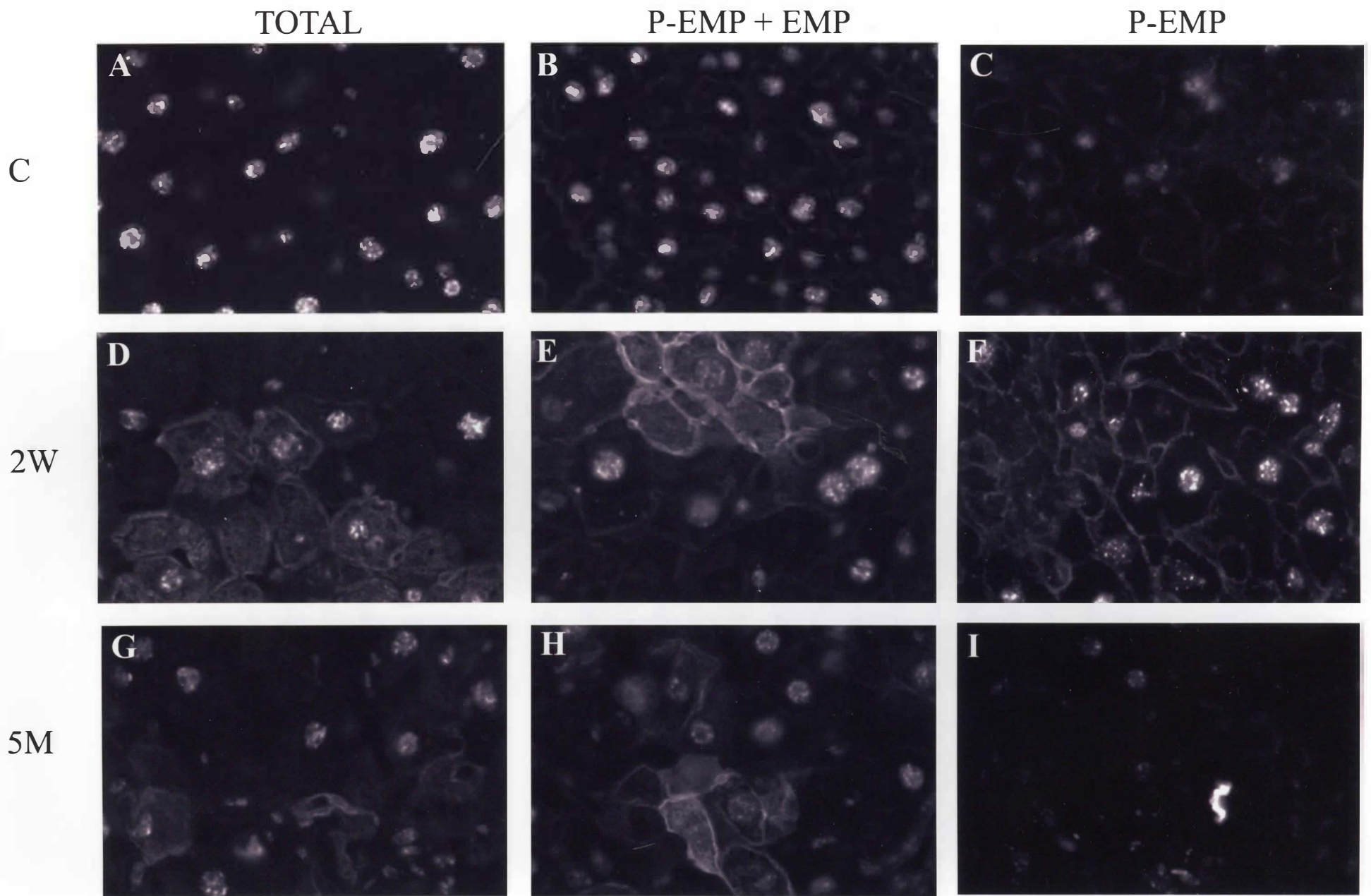


Figure 7; Riopel et al.

CHAPITRE VI

DISCUSSION

Les objectifs principaux de ce projet de maîtrise étaient de caractériser les phénomènes de phosphorylation des kératines en relation avec leurs changements de solubilité dans les hépatocytes de souris traitées avec un agent hépatotoxique. L'agent toxique utilisé, la GF reproduit la formation des agrégats protéiques, les CMs retrouvés chez l'humain dans le cas d'hépatites alcooliques. Ce travail de recherche a permis de montrer pour la première fois, l'importance de la phosphorylation et de la solubilité des kératines au cours des mécanismes de réponses des hépatocytes à une situation de stress toxique. Nos résultats montrent que l'intoxication chronique de souris à la GF entraîne la formation de CMs. En plus, au cours de la période précédant la formation des CMs de nombreux changements dans l'expression, la phosphorylation et la solubilité des kératines sont observés. Malgré le fait que notre étude soulève de nombreuses questions concernant la signification fonctionnelle des FIs ainsi que l'importance des modifications post-traductionnelles, elle supporte l'hypothèse voulant que les FIs de kératines jouent un rôle dans les hépatocytes soumis à une diète contenant un agent toxique, la GF. Différentes études ont montré que la phosphorylation des kératines sur des sites spécifiques pouvait être associée à plusieurs événements cellulaires dans la cellule.

L'importance fonctionnelle des K8 et K18 dans les épithéliums simples a fait l'objet de plusieurs études (Cadrin et al., 2000; Ku et al., 1999; Omary et al., 2002). Toutes ces études semblent montrer un rôle important des kératines dans la protection des hépatocytes soumis à un stress cellulaire toxique ou mécanique (Omary et al., 2002). Par contre, les mécanismes par lesquelles les kératines pourraient jouer ce rôle demeurent inconnus. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle dynamique des protéines qui se produit à des sites spécifiques selon les différentes situations physiologiques et pourrait être un des éléments responsables de cette fonction

de protection que joueraient les kératines contre le stress. Par exemple, la mutation K18 ou la sérine 33 est remplacée par une alanine (K18 S52A) *in vivo* chez des souris transgéniques, montre une augmentation de la sensibilité des hépatocytes au stress induit par les drogues hépatotoxiques (GF, microcystine LR) comparativement à leurs semblables de type sauvages (Ku et al., 1998a). Afin de mieux comprendre l'importance de la phosphorylation, plusieurs chercheurs ont caractérisé différents sites de phosphorylation. Ils ont tenté par des études *in vivo* et *in vitro* de déterminer leurs rôles. Les sites de phosphorylation visés par ces travaux sont la K8 pS73 (K8 pS79 chez la souris), la K8 pS431 (K8 pS436 chez la souris) et la K18 pS33 (Ku et al., 1996a; Ku et al., 1996b; Ku et al., 1999; Omary et al., 1998; Omary et al., 2002).

Les études précédentes de notre laboratoire, effectués *in vivo* chez les souris C3H montrent que l'intoxication à la GF est associée à une hyperphosphorylation généralisée des K8/K18 (Cadrin and Martinoli, 1995). Des études subséquentes ont montré une augmentation de la phosphorylation sur les sites spécifiques: la S79 et S436 de la K8 et la S33 de la K18 et une distribution tissulaire différente pour chacun d'entre eux (Fausther et al., 2004).

6.1 Kératines et compartimentation

Plusieurs études montrent que les protéines incluant les kératines sont présentes dans différents compartiments cellulaires que l'on peut isoler à partir de leur solubilité propre dans différents détergents (Chou et al., 1993; Liao *et al.*, 1996; Lowthert *et al.*, 1995).

Nos résultats montrent à l'aide des analyses biochimiques que dans les hépatocytes de souris contrôles *in vivo* une petite quantité de kératines se retrouve dans la fraction cellulaire soluble PBS et dans la fraction cellulaire NP40. La plus grande partie des kératines est retrouvée dans la fraction cellulaire EMP et P-EMP, soit la fraction des kératines du cytosquelette.

Chou et ses collaborateurs (Chou et al., 1993) ont étudié les kératines présentes dans différentes fractions cellulaires produites après la lyse des cellules. Ces fractions cellulaires représentent les kératines cytosoliques, membranaires, cytosquelettiques et une fraction de kératines insolubles. Cette étude montre chez les cellules en culture de type HT-29 au stade G0/G1 du cycle cellulaire, environ 5 % des kératines sont solubles dans le PBS et représentent la fraction cytosolique. Environ 10-15 % des kératines sont solubilisées en présence de détergent non-ionique comme le NP40 qui détruit les liens lipides-protéines et représentent la fraction cellulaire associée à la membrane. 45 % des kératines sont solubles dans un détergent zwitterionique comme l'EMP qui détruit en partie les liens protéines-protéines et représente une partie des kératines formant le cytosquelette. Finalement, environ 40 % des kératines sont résistantes à ces détergents et représentent une autre partie de la fraction du cytosquelette qui est insoluble. Par contre, il est important de noter que Chou et ses collaborateurs suggèrent que le patron de distribution des kératines dans chacune des fractions peut être différent d'un système cellulaire à l'autre. En plus, cette étude ne mentionne pas si un stress toxique ou mécanique peut entraîner une variation du patron de distribution des kératines dans les différentes fractions cellulaires (Chou et al., 1993).

Dans notre étude, nous avons calculé le pourcentage de kératines dans chacune des fractions par rapport au total des kératines des quatre fractions cellulaires des contrôles ou des traitées. Chez les souris contrôles, aucun changement significatif n'est observé dans chacune des fractions cellulaires. On observe une augmentation de ~ 2 % à 20 % des kératines de la fraction cellulaire PBS après 2 semaines d'intoxication. On remarque une augmentation de ~ 2 % à 6 % de la fraction cellulaire PBS après 5 mois de traitement à la GF. On observe dans la fraction cellulaire NP40, une augmentation de ~ 4 % à 18 % après 2 semaines d'intoxication et une augmentation de ~ 4 % à 12 % après 5 mois de traitement. La fraction cellulaire EMP montre une diminution de ~ 75 % à 40 % après 2 semaines et 5 mois de traitement à la GF. Finalement, après 2 semaines de traitement aucun changements significatif est observé tandis qu'une augmentation de ~ 19 % à 40 % après 5 mois d'intoxication.

Ce patron de distribution est en accord avec les observations de Chou et ses collaborateurs décrits précédemment (Chou et al., 1993). En plus nos résultats, sont en accord avec Toivola et ses collaborateurs qui montrent la présence majoritaire des kératines dans la fraction cellulaire HSE (équivalentes aux fractions EMP + P-EMP de nos résultats) et peu de kératines dans la fraction cellulaire TX-100 (équivalentes aux fractions PBS + NP40 de nos résultats) chez les cellules HT-29 contrôles (Toivola et al., 2002).

Des études ont suggéré qu'une différence dans la distribution des kératines dans chacune des fractions cellulaires pourrait jouer un rôle dans la régulation de la fonction des kératines (Ku et al., 1996a). Pour l'instant, il a été montré que la K18 se lie aux protéines de la famille 14-3-3 seulement quand la kératine est phosphorylée au niveau de la S33 et soluble et cette interaction est modulée au cours du cycle cellulaire.

6.2 Phosphorylation des kératines et solubilité des FIs

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus étudiée au niveau des protéines de FIs. Les modifications de la phosphorylation des FIs ont été rapportées dans plusieurs cellules, par exemple, les neurones, les muscles et les cellules gliales. K8/K18, les protéines de FIs dans les hépatocytes sont phosphorylées à des sites spécifiques et la modulation de la phosphorylation semble jouer un rôle important dans la fonction des kératines. Toutes ces études, mènent à la conclusion que les K8/K18 par une modulation de leur phosphorylation jouent un rôle important dans la réponse des hépatocytes au stress.

Il est aussi accepté que le débalancement dans la régulation de la phosphorylation et la solubilité des kératines impliqué dans les hépatites n'est pas bien connu et mérite d'être étudié (Ku et al., 2003; Toivola et al., 2004) (Marceau et al., 2001). Un niveau basal de phosphorylation de certains sites de K8/K18 est observé dans

les hépatocytes. Une phosphorylation et une hyperphosphorylation de K8/K18 a été observée suite à la réponse des hépatocytes au stress induit par la GF ou le DDC (Stumptner et al., 2001). En plus, les études de (Chou et al., 1993), (Omary et al., 1998), (Toivola et al., 2002) montrent qu'il y a une relation entre la phosphorylation et la solubilité des kératines. Des études précédentes ont aussi montré une solubilisation des kératines suite à l'hyperphosphorylation de celles-ci après un traitement aux inhibiteurs de phosphatases (OA) (Kasahara et al., 1993; Paramio, 1999; Yatsunami et al., 1993).

Pour déterminer la relation existante entre la phosphorylation et la solubilité des kératines suite au stress induit par la GF, nous avons examiné la K8 pS79, la K8 pS436 et la K18 pS33 dans la fraction cellulaire EMP et la fraction cellulaire P-EMP. Notre étude montre que le traitement entraîne l'augmentation de la quantité de kératines phosphorylées dans chacune des fractions cellulaires mais de façon plus importante dans les fractions cellulaires insolubles, EMP et P-EMP. Toivola et ses collaborateurs observent dans leur étude une hyperphosphorylation généralisée et une solubilisation des kératines lors du traitement des cellules HT-29 et KC où les sérine/thréonine phosphatases sont inhibées (Toivola et al., 2002).

De plus cette étude supportent l'hypothèse de Toivola et ses collaborateurs suggèrent que la phosphorylation de ce site interfère avec l'assemblage des kératines et pourrait jouer un rôle dans la solubilité des kératines (Toivola et al., 2002). Cette différence entre nos résultats *in vivo* et ceux obtenus par Toivola, Chou et leurs collaborateurs suggèrent que plusieurs autres facteurs pourraient influencer la solubilité des kératines comme la glycosylation, l'acéthylation et l'attachement à d'autres protéines (Chou et al., 1993; Ku et al., 1996a) (Toivola et al., 2002).

6.3 Kératines et localisation cellulaire

Les études résultats obtenus par biochimie ont été confirmés par immunofluorescence et montrent que la distribution tissulaire des kératines phosphorylées est différente pour chacun des sites étudiés.

Sur les cryocoupes n'ayant pas été traitées avec les différents détergents, la phosphorylation de la K8 pS79 et K8 pS436 est localisée au niveau d'hépatocytes à proximité des veines centrales. Les kératines phosphorylées K8 pS79 et K8 pS436 ne sont pas observées dans les cryocoupes d'hépatocytes de souris contrôles où les protéines n'ont pas été extraites. Après 2 semaines de traitement, on note une augmentation de la phosphorylation de ces sites, et ce particulièrement pour la K8 pS79. La phosphorylation de la K8 pS79 et K8 pS436 est observée au niveau de cellules isolées (simplets ou doublets) et au niveau d'amas cellulaire. Il est important de noter qu'au centre de ces groupes d'hépatocytes se retrouve un hépatocyte en apoptose (Désaulniers *et al.*, To be submitted). Fausther et ses collaborateurs ont aussi observé, *in vivo*, ces cellules isolées et phosphorylées en plus d'amas d'hépatocytes contenant les K8 pS79 et K8 pS436 phosphorylés (Fausther *et al.*, 2004). D'un autre côté, Stumptner et ses collaborateurs ont réalisé des études *in vivo* et ont observé la présence de doublets cellulaires phosphorylés sur la K8 pS79 après une intoxication de souris au DDC, un agent qui induit la formation des CMs (Stumptner *et al.*, 2001).

Mis ensemble ces résultats suggèrent que ces sites phosphorylés chez des cellules isolées montrent la présence d'hépatocytes en processus de mitose. Par contre, le marquage similaire de cellules isolées mais différentes suggère l'activation de différentes kinases lors du processus de mitose. L'ensemble de ces résultats suggèrent aussi par la présence d'amas cellulaires phosphorylés sur la K8 pS79 et K8 pS436, qu'il y a activation de kinases impliquées dans les processus anti-apoptotiques. Il a été proposé que l'hépatocyte en apoptose transmet un signal cellulaire qui entraînerait l'activation de kinases responsables de la phosphorylation des K8 pS79 et K8 pS436 en situation de stress cellulaire provoqué par l'agent hépatotoxique. L'activation de ces

kinases pourrait protéger les cellules contre l'apoptose (Fausther et al., 2004). Cette hypothèse est supportée par le fait que les K8/K18 jouent un rôle de protection dans les hépatocytes (Omary et al., 2002).

Les analyses en immunofluorescence de la K18 pS33 des cryocoupes n'ayant subi aucune extraction protéique montrent que ce site est phosphorylé à un niveau basal chez les souris contrôles. On remarque aussi après 2 semaines de traitement une augmentation de la phosphorylation de la K18 pS33 dans tous les hépatocytes. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que la phosphorylation de la K18 pS33 est responsable de la réorganisation du réseau de FIs de kératines lors de la mitose et qu'elle est responsable de l'association des K8/K18 aux protéines de la famille 14-3-3 (Ku *et al.*, 2002b). Fausther et ses collaborateurs proposent que la K18 pS33 est un site phosphorylé lors du processus de mitose en plus d'être phosphorylé lors des mécanismes de protection des hépatocytes contre un stress toxique (Fausther et al., 2004). Après 5 mois de traitement nos résultats en immunofluorescence montrent la présence des K8 pS79, K8 pS436 et K18 pS33 dans les CMs. On observe également des kératines phosphorylés membranaires et cytosquelettiques. Fausther et ses collaborateurs ont aussi montré que les sites de phosphorylation, K8 pS79, K8 pS436 et K18 pS33 sont présents dans les CMs (Fausther et al., 2004). Ku et ses collaborateurs ont montré que la phosphorylation de K8/K18 module leur ubiquitination et par conséquent leur recyclage par la voies des protéasomes (Ku and Omary, 2000).

Mis ensemble ces résultats appuient également l'hypothèse selon laquelle les modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation jouent un rôle important lors de la formation des CMs (French, 1983). La saturation du mécanisme ubiquitine-protéasome responsable de la dégradation des protéines altérées pourrait aussi être responsable de l'accumulation de protéines sous forme d'agrégats dans la cellule. La présence d'ubiquitine dans les CMs suggèrent qu'une inhibition de la protéolyse des kératines par le système de protéasomes entraînerait la formation des CMs *in vivo* (Bardag-Gorce et al., 2004; French et al., 2001).

Les études d'immunofluorescence avec le marquage de la K8 sur les cryocoupes de foies extraites avec le NP40 (il ne demeure sur la lame que les protéines des fractions cellulaires EMP et P-EMP), montrent que les protéines les plus solubles qui sont extraites sont des protéines cytoplasmiques chez les hépatocytes de souris contrôles et traitées de 2 semaines et 5 mois. Les protéines des fractions EMP et P-EMP qui subsistent sur la cryocoupe ne semblent pas être phosphorylées car les marquages de la K8 pS79, K8 pS436 et la K18 pS33 sont encore présents.

L'observation par immunofluorescence des cryocoupes de foies extraites avec le NP40 suivi de l'Empigène BB (il ne demeure sur la coupe que les protéines de la fraction cellulaire P-EMP) montrent chez les hépatocytes de souris contrôles que les kératines qui demeurent présentes sur les cryocoupes sont des protéines membranaires. Après 2 semaines et 5 mois de traitement, on remarque des K8 qui sont en fait les kératines phosphorylées sur les sites étudiés lors des observations des marquages de la K8 pS79, K8 pS436 et la K18 pS33. De plus, après 5 mois de traitement, on observe que les kératines les plus insolubles se retrouvent dans les CMs et qu'elles sont phosphorylées sur les sites étudiées. On observe aussi lors du marquage de la K8 pS79 que seulement les cellules en processus de mitose possèdent des kératines très insolubles de la fraction cellulaire P-EMP.

6.4 Conclusion

Les mécanismes de régulation de la phosphorylation qui sont différents pour K8 et K18, suggèrent que ces kératines jouent différents rôles dans la cellule. L'importance de la modification de la phosphorylation et la solubilité peuvent représenter des événements importants dans la protection des hépatocytes contre le stress induit par le traitement à la GF. Ces modifications semblent importantes pour le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie de la cellule.

En relation avec les autres études, l'augmentation des kératines solubles semblent importante pour la liaison de protéines accessoires dans plusieurs mécanismes cellulaires comme l'apoptose et la mitose. Par exemple, La K18 pS33 est associée à la famille de protéines 14-3-3 seulement dans la fraction cellulaire soluble (Ku et al., 1998a). Ran, une GTPase de la superfamille de Ras, est associé aux réseau de Fis seulement dans la fraction cellulaire soluble dans le NP40 (Tao et al., 2005). AKT, une protéine importance dans les mécanismes d'apoptose, se lie à la K10 seulement dans la fraction soluble (Paramio et al., 2001; Santos et al., 2002).

CHAPITRE VII

PERSPECTIVES DE RECHERCHES

À partir de l'étude de la séquence en acides aminés des kératines humaines, il a été établi que la K8 possède 61 sites de phosphorylation potentielles alors que la K18 en possède 37 (Omary et al., 1998). Le nombre important de ces sites rend l'étude de la phosphorylation des kératines très complexe. Il est donc important d'identifier de nouveaux sites de phosphorylation des K8 et K18 afin de mieux comprendre leur rôle et leur importance fonctionnelle respective dans les hépatocytes lors de la réponse au stress.

À ce jour 3 sérines ont déjà été identifiées et nos résultats impliquent une diversité plus importante de sites de phosphorylation soit des sérines, des thréonines et des tyrosines. Il faut donc identifier les autres sites de phosphorylation importants lors du processus de mitose, d'apoptose ou de stress afin de mieux comprendre l'importance fonctionnelle de la phosphorylation des kératines. Il faut aussi étudier l'implication de différentes kinases qui sont activées dans notre système de souris traitées à la GF *in vivo*. Récemment des études *in vitro* ont démontré l'implication des kinases p38 et JNK dans la phosphorylation de la K8 pS73 lors de stress cellulaire (He et al., 2002; Ku et al., 2002a). Par contre, des études de notre laboratoire chez les souris C3H indiquent que ces kinases ne sont pas responsables de la phosphorylation de ce site (K8 pS79) lors de stress toxique dans notre modèle animal (Désaulniers et al., To be submitted). Alors, il semble important de déterminer les voies de signalisation cellulaires impliquées dans la réponse des hépatocytes au stress par l'étude des kinases qui sont impliquées dans la phosphorylation des K8 et K18 (exemple : PKC, CaM kinase, s6 kinase, cdc2 kinase).

Désaulniers et ses collaborateurs soulèvent l'hypothèse selon laquelle les hépatocytes en processus d'apoptose enverraient un signal vers les cellules environnantes ce qui activerait des kinases spécifiques et la phosphorylation de sites particuliers des kératines (Désaulniers et al., To be submitted). Ce processus de

signalisation cellulaire pourrait protéger les cellules contre le stress cellulaire induit par la GF et ultimement affecter le déclenchement des mécanismes d'apoptose. Considérant ces résultats les kératines jouent un rôle crucial dans la protection des hépatocytes contre un stress toxique et l'apoptose (Omary et al., 2002). De ce fait, il semble important d'étudier les rôles potentiels des kératines lors du mécanisme d'apoptose et les liens possibles avec les protéines accessoires de ce mécanismes.

BIBLIOGRAPHIE

Anton-Lamprecht, I. (1983). Genetically induced abnormalities of epidermal differentiation and ultrastructure in ichthyoses and epidermolyses: pathogenesis, heterogeneity, fetal manifestation, and prenatal diagnosis. *J Invest Dermatol* **81**, 149s-56s.

Bachant, J. B. and Klymkowsky, M. W. (1996). A nontetrameric species is the major soluble form of keratin in *Xenopus* oocytes and rabbit reticulocyte lysates. *J Cell Biol* **132**, 153-65.

Bader, B. L., Magin, T. M., Freudenmann, M., Stumpp, S. and Franke, W. W. (1991). Intermediate filaments formed de novo from tail-less cytokeratins in the cytoplasm and in the nucleus. *J Cell Biol* **115**, 1293-307.

Bardag-Gorce, F., Vu, J., Nan, L., Riley, N., Li, J. and French, S. W. (2004). Proteasome inhibition induces cytokeratin accumulation in vivo. *Exp Mol Pathol* **76**, 83-9.

Baribault, H., Penner, J., Iozzo, R. V. and Wilson-Heiner, M. (1994). Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice. *Genes Dev* **8**, 2964-73.

Baribault, H., Price, J., Miyai, K. and Oshima, R. G. (1993). Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8. *Genes Dev* **7**, 1191-202.

Cadrin, M., Anderson, N. M., Aasheim, L. H., Kawahara, H., Franks, D. J. and French, S. W. (1995). Modifications in cytokeratin and actin in cultured liver cells derived from griseofulvin-fed mice. *Lab Invest* **72**, 453-60.

Cadrin, M., Brown, D. L. and Reulh, K. R. (1993). Effects of Environmental Toxicants on the Cytoskeleton. In *Handbook of Hazardous Materials*, (ed. A. Press), pp. 233-239.

Cadrin, M., Hovington, H., Marceau, N. and McFarlane-Anderson, N. (2000). Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver. *J Hepatol* **33**, 199-207.

Cadrin, M. and Martinoli, M. G. (1995). Alterations of intermediate filaments in various histopathological conditions. *Biochem Cell Biol* **73**, 627-34.

Chou, C. F., Riopel, C. L., Rott, L. S. and Omary, M. B. (1993). A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. Lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility. *J Cell Sci* **105** (Pt 2), 433-44.

Chou, C. F., Smith, A. J. and Omary, M. B. (1992). Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *J Biol Chem* **267**, 3901-6.

Chou, Y. H., Opal, P., Quinlan, R. A. and Goldman, R. D. (1996). The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells. *J Cell Sci* **109** (Pt 4), 817-26.

Conway, J. F. and Parry, D. A. (1990). Structural features in the heptad substructure and longer range repeats of two-stranded alpha-fibrous proteins. *Int J Biol Macromol* **12**, 328-34.

Coulombe, P. A. (2002). A new fold on an old story: attachment of intermediate filaments to desmosomes. *Nat Struct Biol* **9**, 560-2.

Coulombe, P. A., Chan, Y. M., Albers, K. and Fuchs, E. (1990). Deletions in epidermal keratins leading to alterations in filament organization in vivo and in intermediate filament assembly in vitro. *J Cell Biol* **111**, 3049-64.

Coulombe, P. A. and Omary, M. B. (2002). 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 110-22.

Dahlstrand, J., Zimmerman, L. B., McKay, R. D. and Lendahl, U. (1992). Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci* **103** (Pt 2), 589-97.

De Carli, L. and Larizza, L. (1988). Griseofulvin. *Mutat Res* **195**, 91-126.

Denk, H., Gschnait, F. and Wolff, K. (1975). Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation. *Lab Invest* **32**, 773-6.

Denk, H., Lackinger, E., Zatloukal, K. and Franke, W. W. (1987). Turnover of cytokeratin polypeptides in mouse hepatocytes. *Exp Cell Res* **173**, 137-43.

Denk, H., Stumptner, C. and Zatloukal, K. (2000). Mallory bodies revisited. *J Hepatol* **32**, 689-702.

Désaulniers, M., Riopel, K. and Cadrin, M. (To be submitted). Stress-Activated Protein Kinases, K8 phosphorylation on serine 79 and apoptosis in the response of mice hepatocytes to griseofulvin intoxication.

Develoux, M. (2001). [Griseofulvin]. *Ann Dermatol Venereol* **128**, 1317-25.

Fausther, M., Villeneuve, L. and Cadrin, M. (2004). Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice. *Comp Hepatol* **3**, 5.

Feng, L., Zhou, X., Liao, J. and Omary, M. B. (1999). Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Cell Sci* **112 (Pt 13)**, 2081-90.

French, B. A., van Leeuwen, F., Riley, N. E., Yuan, Q. X., Bardag-Gorce, F., Gaal, K., Lue, Y. H., Marceau, N. and French, S. W. (2001). Aggresome formation in liver cells in response to different toxic mechanisms: role of the ubiquitin-proteasome pathway and the frameshift mutant of ubiquitin. *Exp Mol Pathol* **71**, 241-6.

French, S. W. (1983). Present understanding of the development of Mallory's body. *Arch Pathol Lab Med* **107**, 445-50.

Fuchs, E. (1994). Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength. *J Cell Biol* **125**, 511-6.

Fuchs, E. and Cleveland, D. W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514-9.

Fuchs, E. and Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* **63**, 345-82.

Geisler, N., Schunemann, J. and Weber, K. (1992). Chemical cross-linking indicates a staggered and antiparallel protofilament of desmin intermediate filaments and characterizes one higher-level complex between protofilaments. *Eur J Biochem* **206**, 841-52.

Geisler, N. and Weber, K. (1982). The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins. *Embo J* **1**, 1649-56.

Geisler, N. and Weber, K. (1988). Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments; identification of three kinase A sites in the aminoterminal head domain. *Embo J* **7**, 15-20.

Georgatos, S. D., Gounari, F., Goulielmos, G. and Aebi, U. (1997). To bead or not to bead? Lens-specific intermediate filaments revisited. *J Cell Sci* **110 (Pt 21)**, 2629-34.

Gschnait, F., Konrad, K., Honigsmann, H., Denk, H. and Wolff, K. (1975). Mouse model for protoporphyria. I. The liver and hepatic protoporphyrin crystals. *J Invest Dermatol* **65**, 290-9.

Hatzfeld, M. and Weber, K. (1991). 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* **99 (Pt 2)**, 351-62.

He, T., Stepulak, A., Holmstrom, T. H., Omary, M. B. and Eriksson, J. E. (2002). The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **277**, 10767-74.

Heins, S. and Aebi, U. (1994). Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 25-33.

Heins, S., Wong, P. C., Muller, S., Goldie, K., Cleveland, D. W. and Aebi, U. (1993). The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation. *J Cell Biol* **123**, 1517-33.

Helfand, B. T., Mikami, A., Vallee, R. B. and Goldman, R. D. (2002). A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. *J Cell Biol* **157**, 795-806.

Herrmann, H. and Aebi, U. (1998a). Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 177-85.

Herrmann, H. and Aebi, U. (1998b). Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments. *Subcell Biochem* **31**, 319-62.

Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Muller, S. A., Goldie, K. N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W. W. and Aebi, U. (1996). Structure and assembly properties

of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol* **264**, 933-53.

Herrmann, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., Aebi, U. and Magin, T. M. (2003). Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int Rev Cytol* **223**, 83-175.

Hutter, H., Zatloukal, K., Winter, G., Stumptner, C. and Denk, H. (1993). Disturbance of keratin homeostasis in griseofulvin-intoxicated mouse liver. *Lab Invest* **69**, 576-82.

Inada, H., Togashi, H., Nakamura, Y., Kaibuchi, K., Nagata, K. and Inagaki, M. (1999). Balance between activities of Rho kinase and type 1 protein phosphatase modulates turnover of phosphorylation and dynamics of desmin/vimentin filaments. *J Biol Chem* **274**, 34932-9.

Jensen, K. and Gluud, C. (1994a). The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies (Part 1 of a literature survey). *Hepatology* **20**, 1061-77.

Jensen, K. and Gluud, C. (1994b). The Mallory body: theories on development and pathological significance (Part 2 of a literature survey). *Hepatology* **20**, 1330-42.

Kasahara, K., Kartasova, T., Ren, X. Q., Ikuta, T., Chida, K. and Kuroki, T. (1993). Hyperphosphorylation of keratins by treatment with okadaic acid of BALB/MK-2 mouse keratinocytes. *J Biol Chem* **268**, 23531-7.

Kirfel, J., Magin, T. M. and Reichelt, J. (2003). Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci* **60**, 56-71.

Krebs, E. G. (1994). The growth of research on protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* **19**, 439.

Ku, N. O., Azhar, S. and Omary, M. B. (2002a). Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation. *J Biol Chem* **277**, 10775-82.

Ku, N. O., Gish, R., Wright, T. L. and Omary, M. B. (2001). Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease. *N Engl J Med* **344**, 1580-7.

Ku, N. O., Liao, J., Chou, C. F. and Omary, M. B. (1996a). Implications of intermediate filament protein phosphorylation. *Cancer Metastasis Rev* **15**, 429-44.

Ku, N. O., Liao, J. and Omary, M. B. (1998a). Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *Embo J* **17**, 1892-906.

Ku, N. O., Michie, S., Oshima, R. G. and Omary, M. B. (1995). Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. *J Cell Biol* **131**, 1303-14.

Ku, N. O., Michie, S., Resurreccion, E. Z., Broome, R. L. and Omary, M. B. (2002b). Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4373-8.

Ku, N. O., Michie, S. A., Soetikno, R. M., Resurreccion, E. Z., Broome, R. L. and Omary, M. B. (1998b). Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice. *J Cell Biol* **143**, 2023-32.

Ku, N. O., Michie, S. A., Soetikno, R. M., Resurreccion, E. Z., Broome, R. L., Oshima, R. G. and Omary, M. B. (1996b). Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice that express a dominant-negative human keratin 18 mutant. *J Clin Invest* **98**, 1034-46.

Ku, N. O. and Omary, M. B. (2000). Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion. *J Cell Biol* **149**, 547-52.

Ku, N. O., Soetikno, R. M. and Omary, M. B. (2003). Keratin mutation in transgenic mice predisposes to Fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology* **37**, 1006-14.

Ku, N. O., Wright, T. L., Terrault, N. A., Gish, R. and Omary, M. B. (1997). Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis. *J Clin Invest* **99**, 19-23.

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**, G1108-37.

LaVia, M. F. and Hill, R. B. J. (1975). Principles of Pathobiology. New York.

Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* **283**, 249-256.

Liao, J., Ku, N. O. and Omary, M. B. (1996). Two-dimensional gel analysis of glandular keratin intermediate filament phosphorylation. *Electrophoresis* **17**, 1671-6.

Liao, J., Ku, N. O. and Omary, M. B. (1997). Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells. *J Biol Chem* **272**, 17565-73.

Liao, J., Lowthert, L. A., Ku, N. O., Fernandez, R. and Omary, M. B. (1995). Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. *J Cell Biol* **131**, 1291-301.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. E. (2000). *Molecular Cell Biology*. New York.

Loranger, A., Duclos, S., Grenier, A., Price, J., Wilson-Heiner, M., Baribault, H. and Marceau, N. (1997). Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity. *Am J Pathol* **151**, 1673-83.

Lowthert, L. A., Ku, N. O., Liao, J., Coulombe, P. A. and Omary, M. B. (1995). Empigen BB: a useful detergent for solubilization and biochemical analysis of keratins. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 370-9.

Magin, T. M. (1998). Lessons from keratin transgenic and knockout mice. *Subcell Biochem* **31**, 141-72.

Magin, T. M., Schroder, R., Leitgeb, S., Wanninger, F., Zatloukal, K., Grund, C. and Melton, D. W. (1998). 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* **140**, 1441-51.

Mallory, F. B. (1911). Cirrhosis of the liver: five different lesions which it may arise. *Bull Johns Hopkins Hospital*, 69-75.

Marceau, N., Loranger, A., Gilbert, S., Daigle, N. and Champetier, S. (2001). Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease. In *Biochem Cell Biol*, vol. 79, pp. 543-55.

McGowan, K. and Coulombe, P. A. (1998). The wound repair-associated keratins 6, 16, and 17. Insights into the role of intermediate filaments in specifying keratinocyte cytoarchitecture. *Subcell Biochem* **31**, 173-204.

Moll, R. (1998). Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *Subcell Biochem* **31**, 205-62.

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

Nakamichi, I., Hatakeyama, S. and Nakayama, K. I. (2002). Formation of Mallory body-like inclusions and cell death induced by deregulated expression of keratin 18. *Mol Biol Cell* **13**, 3441-51.

Omary, M. B., Ku, N. O., Liao, J. and Price, D. (1998). Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem* **31**, 105-40.

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

Oshima, R. G. (2002). Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death Differ* **9**, 486-92.

Oxford, A. E., Raistrick, H. and Simonart, P. (1939). Griseofulvin, $C_{17}H_{17}O_6Cl$, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierks. *Biochem J.* **33**, 240-8.

Paramio, J. M. (1999). A role for phosphorylation in the dynamics of keratin intermediate filaments. *Eur J Cell Biol* **78**, 33-43.

Paramio, J. M., Segrelles, C., Ruiz, S. and Jorcano, J. L. (2001). Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKC ζ mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* **21**, 7449-59.

Parker, L. L., Walter, S. A., Young, P. G. and Piwnica-Worms, H. (1993). Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase. *Nature* **363**, 736-8.

Parry, D. A., Marekov, L. N., Steinert, P. M. and Smith, T. A. (2002). A role for the 1A and L1 rod domain segments in head domain organization and function of intermediate filaments: structural analysis of trichocyte keratin. *J Struct Biol* **137**, 97-108.

Parry, D. A. and Steinert, P. M. (1999). Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q Rev Biophys* **32**, 99-187.

Ruebner, B. H., Montgomery, C. K. and French, S. W. (1991). Diagnostic Pathology of the Liver and Biliary Tract. United States.

Sahlgren, C. M., Mikhailov, A., Vaittinen, S., Pallari, H. M., Kalimo, H., Pant, H. C. and Eriksson, J. E. (2003). Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35. *Mol Cell Biol* **23**, 5090-106.

Santos, M., Paramio, J. M., Bravo, A., Ramirez, A. and Jorcano, J. L. (2002). The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J Biol Chem* **277**, 19122-30.

Soellner, P., Quinlan, R. A. and Franke, W. W. (1985). Identification of a distinct soluble subunit of an intermediate filament protein: tetrameric vimentin from living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7929-33.

Steinert, P. M., Marekov, L. N., Fraser, R. D. and Parry, D. A. (1993). Keratin intermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly. *J Mol Biol* **230**, 436-52.

Steinert, P. M. and Roop, D. R. (1988). Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem* **57**, 593-625.

Strelkov, S. V., Herrmann, H. and Aebi, U. (2003). Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* **25**, 243-51.

Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Lehner, M., Zatloukal, K. and Denk, H. (2001). 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* **34**, 665-75.

Tao, G. Z., Zhou, Q., Strnad, P., Salemi, M. R., Lee, Y. M. and Omary, M. B. (2005). Human Ran cysteine 112 oxidation by pervanadate regulates its binding to keratins. *J Biol Chem* **280**, 12162-7.

Toivola, D. M., Ku, N. O., Resurreccion, E. Z., Nelson, D. R., Wright, T. L. and Omary, M. B. (2004). Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology* **40**, 459-66.

Toivola, D. M., Omary, M. B., Ku, N. O., Peltola, O., Baribault, H. and Eriksson, J. E. (1998). 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* **28**, 116-28.

Toivola, D. M., Zhou, Q., English, L. S. and Omary, M. B. (2002). Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells. *Mol Biol Cell* **13**, 1857-70.

Vacheret, N. (1999). Histologie fonctionnelle des organes. In <http://cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/FrameAccueil.html>.

Vassar, R., Coulombe, P. A., Degenstein, L., Albers, K. and Fuchs, E. (1991). Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* **64**, 365-80.

Wong, P. and Coulombe, P. A. (2003). Loss of keratin 6 (K6) proteins reveals a function for intermediate filaments during wound repair. *J Cell Biol* **163**, 327-37.

Yamada, S., Wirtz, D. and Coulombe, P. A. (2003). The mechanical properties of simple epithelial keratins 8 and 18: discriminating between interfacial and bulk elasticities. *J Struct Biol* **143**, 45-55.

Yatsunami, J., Komori, A., Ohta, T., Suganuma, M., Yuspa, S. H. and Fujiki, H. (1993). Hyperphosphorylation of cytokeratins by okadaic acid class tumor promoters in primary human keratinocytes. *Cancer Res* **53**, 992-6.

Yokoo, H., Craig, R. M., Harwood, T. R. and Cochrane, C. (1979). Griseofulvin-induced cholestasis in Swiss albino mice. *Gastroenterology* **77**, 1082-7.

Zatloukal, K., Stumptner, C., Lehner, M., Denk, H., Baribault, H., Eshkind, L. G. and Franke, W. W. (2000). Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies. *Am J Pathol* **156**, 1263-74.