

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

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

**PAR
INGRID LABOUBA**

KÉRATINES 8 ET 18, STRESS TOXIQUE ET APOPTOSE

FÉVRIER 2008

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

Toute ma gratitude et ma reconnaissance vont à mon directeur de recherche, la professeure Monique Cadrin qui a témoigné de sa confiance en l'étudiante que je suis en m'accueillant dans son laboratoire pendant deux années durant lesquelles elle m'a encouragée et cru en mes capacités dans le domaine de la recherche.

Je tiens également à remercier ma collègue Anne-Marie Fortier aux côtés de qui j'ai travaillé ces deux dernières années et qui, par son soutien et ses conseils, a grandement participé à l'avancée de mes travaux. Valérie Villeneuve, étudiante-stagiaire, m'a été d'une aide technique précieuse dans le cadre de ses stages d'été et pour cela je la remercie également.

Je remercie tout particulièrement le professeur Éric Asselin et son équipe qui m'ont été d'un soutien technique et moral des plus précieux tout au long de ma maîtrise et sans lesquels mon projet n'aurait pu être réalisé. Je remercie spécialement, Céline Van Themsche, stagiaire post-doctorale au laboratoire du professeur Asselin, pour ses conseils, sa disponibilité et sa gentillesse.

Enfin je remercie ma famille et mes amis qui m'ont encouragée, supportée et dont la présence a été d'un grand réconfort pour moi.

RÉSUMÉ

L'hépatite alcoolique constitue une des pathologies du foie qui résulte en la formation d'inclusions cytoplasmiques connues sous le nom de Corps de Mallory. Les Corps de Mallory, essentiellement observables au sein d'hépatocytes lésés par un stress toxique, sont des agrégats majoritairement composés des kératines 8 et 18 (K8/18). Outre la présence de ces amas protéiques, on note également, dans les cas d'hépatite alcoolique, de la dégénérescence cellulaire caractérisée par une augmentation importante du taux d'apoptose parmi les cellules affectées.

Les K8/18 constituent les seules protéines de filaments intermédiaires présentes dans les hépatocytes. De nombreuses fonctions leur incombent au sein des cellules dans lesquelles elles sont exprimées. Elles assument, entre autre, un rôle de cytoprotection contre l'apoptose et différents stress d'ordre mécanique ou toxique. Bien que l'on ignore encore par quels mécanismes exacts les K8/18 protègent la cellule, de nombreuses études suggèrent que leur phosphorylation pourrait jouer un rôle de taille. La phosphorylation des K8/18, accrue au cours de processus tels que la mitose, le stress et l'apoptose, ressort comme étant un événement à la base de leur régulation fonctionnelle. Les conséquences fonctionnelles de la réorganisation des K8/18 dans la formation des Corps de Mallory sont encore mal cernées, de sorte que nul ne peut affirmer si ces inclusions sont bénéfiques ou nocives pour la survie hépatocytaire.

Le but de cette étude est de rechercher l'implication fonctionnelle de la formation des Corps de Mallory pour les K8/18. Se faisant, nous avons exploré le processus d'apoptose, notamment médiée par le récepteur de mort Fas, en tant que réponse au stress toxique de manière à préciser les mécanismes moléculaires que peuvent impliquer les K8/18 pour assumer leur rôle de protection cellulaire. Les précédentes études réalisées au laboratoire ont été faites *in vivo* à partir de souris C3H soumises à une diète contenant 2,5% (p/v) d'un antifongique nommé griséofulvine, modèle murin couramment utilisé dans le cadre d'études sur la formation des Corps de Mallory. Le présent projet de recherche a, quant à lui, été effectué *in vitro* dans le but de mieux

cibler les comportements moléculaires. Notre objectif premier a donc été de mettre au point un modèle *in vitro* au sein duquel il serait possible d'induire un stress toxique comparable à celui provoqué par la GF *in vivo* chez la souris. Les cellules HepG2, issues d'un hépatocarcinome humain, constituent le modèle d'étude que nous avons exploité tout au long de nos expériences. Le stress toxique induit par l'exposition continue des cellules HepG2 à la griséofulvine, agent plus couramment utilisé *in vivo*, nous a permis de préciser le rôle des K8/18 et de leur phosphorylation dans la réponse cellulaire au stress. Le second objectif de cette étude a été de mesurer l'impact du stress induit par la griséofulvine sur le taux d'apoptose et de définir la voie de signalisation impliquée. Enfin, le dernier objectif fixé a été d'explorer la voie de signalisation anti-apoptotique PI3K/Akt afin de mesurer l'effet de la GF sur celle-ci et de déterminer l'éventuelle relation avec les K8/18 et la protection des cellules contre l'apoptose.

Cette étude a, dans un premier temps, permis de proposer un modèle d'étude *in vitro* comparable au modèle murin jusqu'à lors utilisé, et pouvant être exploité dans le cadre d'étude sur la formation des Corps de Mallory. Dans un second temps, l'utilisation de techniques d'immunobuvardage de type western, de microscopie à fluorescence et de PCR ont conduit à mettre en évidence, d'une part l'implication de l'apoptose médiée par Fas dans ce phénomène de stress toxique; et, d'autre part, l'interaction du récepteur Fas et de la protéine Akt avec la kératine 8 via sa phosphorylation sur le site sérine 431.

Nos travaux ont ainsi montré le rôle que peut jouer la kératine 8 dans la régulation de l'apoptose, particulièrement à la suite d'un stress toxique. Ces évidences permettent ainsi de préciser l'implication de la K8 dans la protection cellulaire contre ce type de stress.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES	XI
CHAPITRE I	1
FOIE, HÉPATITES ET CORPS DE MALLORY.....	1
1.1 LE FOIE	1
1.1.1 STRUCTURE DU FOIE.....	1
1.1.2 FONCTIONS DU FOIE	3
1.2 L'HÉPATITE ALCOOLIQUE.....	4
1.3 LES CORPS DE MALLORY (CMs).....	6
1.3.1 COMPOSITION DES CORPS DE MALLORY.....	7
1.3.2 MODÈLES D'ÉTUDE.....	8
1.3.3 FORMATION DES CORPS DE MALLORY.....	9
CHAPITRE II	12
CYTOSQUELETTE, FILAMENTS INTERMÉDIAIRES ET KÉRATINES	12
2.1 LE CYTOSQUELETTE	12
2.2 LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES (FIs).....	14
2.2.1 CLASSIFICATION ET STRUCTURE.....	14
2.2.2 RÉGULATION DE LA FONCTION DES FIs.....	18
2.3 LES KÉRATINES	20
2.3.1 K8/18 ET HÉPATOCYTES	22
2.3.2 K8/18 ET STRESS TOXIQUE	25
2.3.3 K8/18 ET APOPTOSE.....	26
CHAPITRE III.....	28
APOPTOSE ET VOIES DE SIGNALISATION Fas ET PI3K/AKT.....	28

3.1	APOPTOSE : MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE	28
3.1.1	APOPTOSE ET NÉCROSE	28
3.1.2	MÉCANISMES MOLÉCULAIRES	30
3.1.3	RÉGULATION DE L’APOPTOSE	31
3.2	SIGNALISATION PRO-APOPTOTIQUE : RÉCEPTEUR FAS	31
3.2.1	FAS/FAS L ET HÉPATOCYTE	32
3.2.2	FAS ET K8/18	34
3.1	VOIE ANTI-APOPTOTIQUE : PI3K/AKT	35
	CHAPITRE IV	40
	PROJET DE RECHERCHE ET OBJECTIFS DE L’ÉTUDE	40
	CHAPITRE V	42
	MÉTHODOLOGIE	42
5.1	MODÈLE D’ÉTUDE : CELLULES HEPG2	42
5.1.1	CELLULES HEPG2	42
5.1.2	TRAITEMENT : EXPOSITION À LA GRISÉOFULVINE	43
5.1.3	GRISÉOFULVINE	43
5.1.4	DMSO	44
5.1.5	TRAITEMENT À LA GF	45
5.2	MÉTHODES D’ANALYSE	45
5.2.1	ANTICORPS PRIMAIRES UTILISÉS	46
5.2.2	MICROSCOPIE À FLUORESCENCE	47
5.2.3	IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN (WESTERN BLOT)	49
5.2.4	RT-PCR	50
5.2.5	ANALYSES STATISTIQUES	51
	CHAPITRE VI	53
	RÉSULTATS DE L’ÉTUDE	53
6.1	EFFETS DE LA GF SUR LES FIS ET LES MTs DES HEPG2	53
6.1.1	ORGANISATION DE LA FIS ET DES MTs	53
6.1.2	NIVEAUX D’EXPRESSION DES K8/18	57

6.2	PHOSPHORYLATION DES K8/18.....	58
6.2.1	PHOSPHORYLATION DE K8.....	58
6.2.2	PHOSPHORYLATION DE LA K18	64
6.2	EFFETS DE LA GF SUR L' APOPTOSE	68
6.3	EFFETS DE LA GF SUR LA VOIE DE SIGNALISATION FAS/FAS L	70
6.3.1	EXPRESSION DE FAS ET DE SON LIGAND.....	70
6.3.2	DISTRIBUTION DE FAS	72
6.4	EFFETS DE LA GF SUR LA VOIE DE SIGNALISATION PI3K/AKT	79
6.4.1	NIVEAU D'ACTIVATION DE LA PROTÉINE AKT.....	79
6.4.2	DISTRIBUTION DE PAKT	81
CHAPITRE VII.....		87
DISCUSSION		87
7.1	RÉPONSE DES CELLULES HEPG2 AU TRAITEMENT À LA GF	87
7.1.1	APOPTOSE	87
7.1.2	MODIFICATIONS DES K8/18	88
7.2	ACTIVATION DE LA VOIE FAS/FAS L PAR L'EXPOSITION DES HEPG2 À LA GF	89
7.3	VOIE PI3K/AKT APRÈS EXPOSITION DES HEPG2 À LA GF	91
7.4	HEPG2 COMME MODÈLE <i>IN VITRO</i> DES CMS.....	93
CHAPITRE VIII.....		95
CONCLUSION ET PERSPECTIVE D'AVENIR.....		95
BIBLIOGRAPHIE.....		97

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.1	Principaux composants des CMs.....	8
TABLEAU 2.1	Famille de protéines des filaments intermédiaires.....	15
TABLEAU 2.2	Classification et numérotation des kératines.....	21
TABLEAU 2.3	Quelques modèles animaux transgéniques pour les kératines d'épithéliales simples.....	24
TABLEAU 4.1	Liste des anticorps primaires utilisés.....	46
TABLEAU 4.1	Liste des anticorps secondaires utilisés et applications.....	48

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1	Aspect tridimensionnel du lobule hépatique.....	2
FIGURE 1.2	Ultrastructure du parenchyme hépatique.....	4
FIGURE 1.3	Répartition des maladies alcooliques du foie dans la population consommatrice d'alcool.....	5
FIGURE 1.4	Particularités histologiques de l'hépatite alcoolique.....	7
FIGURE 1.5	Dégradation protéique via le protéasome et formation des CMs.....	11
FIGURE 2.1	Polymérisation et organisation des MFs et MTs.....	13
FIGURE 2.2	Distribution des protéines de FIs dans le corps humain.....	16
FIGURE 2.3	Polymérisation des FIs	17
FIGURE 2.4	Phosphorylation d'une protéine.....	19
FIGURE 2.5	Domaines et modifications post-traductionnelles des FIs.....	20
FIGURE 2.6	Représentation schématique d'un dimère de K8/18 humain.....	25
FIGURE 3.1	Changements structuraux cellulaires de la nécrose et de l'apoptose.....	29
FIGURE 3.2	Différentes voies de l'apoptose.....	31
FIGURE 3.3	Représentation de l'activation de Fas via son agrégation au sein des lipides rafts.....	33
FIGURE 3.4	Induction d'apoptose médiée par Fas par des mécanismes autocrines et paracrines.....	34
FIGURE 3.5	Structure et activation de la protéine Akt.....	36
FIGURE 3.6	Vue d'ensemble de la voie PI3K/Akt.....	38
FIGURE 4.1	Structure chimique de la GF.....	44
FIGURE 4.2	Formule semi-développée du DMSO.....	44
FIGURE 5.1	Principales étapes du PCR et profils de réaction des amorces de Fas L et GAPDH.....	52
FIGURE 6.1	Effets de la GF sur l'organisation du cytosquelette des HepG2.....	55
FIGURE 6.2	Effets de la GF sur l'expression des K8/18.....	57
FIGURE 6.3	Niveaux de phosphorylation de la K8 S73.....	59
FIGURE 6.4	Effets de la GF sur la distribution de la K8 pS73.....	60

FIGURE 6.5	Effets de la GF sur la phosphorylation de la K8 S431.....	63
FIGURE 6.6	Effets de la GF sur la distribution de la K8 pS431.....	65
FIGURE 6.7	Effets de la GF sur la phosphorylation de la K18 S433 et de la K18 S52.....	67
FIGURE 6.8	GF et mort cellulaire.....	69
FIGURE 6.9	Effets de la GF sur l'activation de la procaspase 3.....	70
FIGURE 6.10	Effets de la GF sur l'expression de Fas.....	71
FIGURE 6.11	Effets de la GF sur l'expression de Fas L.....	72
FIGURE 6.12	Effets de la GF sur la distribution de Fas et de la K8 pS73.....	74
FIGURE 6.13	Distribution de Fas et de la K8 pS431 dans des HepG2 exposées à la GF.....	77
FIGURE 6.14	Effets de la GF sur l'expression et l'activation de Akt.....	80
FIGURE 6.15	Distribution de pAkt et de la K8 pS73 dans des HepG2 exposées à la GF.....	83
FIGURE 6.16	Distribution de pAkt et de la K8 pS431 dans des HepG2 exposées à la GF.....	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

<i>ADN</i>	Acide désoxyribonucléique
<i>ADP</i>	Adénosine diphosphate
<i>Akt_{thr308}</i>	Thréonine 308 de la protéine Akt
<i>AMPc</i>	Adénosine monophosphate cyclique
<i>ARNm</i>	Acide ribonucléique messenger
<i>ATP</i>	Adénosine triphosphate
<i>C-terminale</i>	Carboxy-terminale
<i>Cf.</i>	Confère
<i>CMs</i>	Corps de Mallory
<i>C3H</i>	Patrimoine génétique spécifique à une lignée de souris
<i>DDC</i>	3,5-diéthoxycarboxy-1,4-dihydrocollidine
<i>DMSO</i>	Diméthyl sulfoxyde
<i>ERK</i>	Extracellular signal-Regulated Kinase
<i>Fas L</i>	Ligand Fas
<i>Fas</i>	Récepteur Fas
<i>Fas/Fas L</i>	Voie de signalisation du récepteur Fas et de son ligand
<i>FIs</i>	Filaments intermédiaires
<i>GF</i>	Griséofulvine
<i>GTP</i>	Guanosine triphosphate
<i>Hsp70</i>	Heat shock protein 70
<i>kDa</i>	Kilo Dalton
<i>K8</i>	Kératine 8
<i>K8/18</i>	Paire formée par l'assemblage des kératines 8 et 18
<i>K8 G62C</i>	Substitution de la glycine 62 par une cystéine dans la kératine 8
<i>K8 G61C</i>	Substitution de la glycine 61 par une cystéine dans la kératine 8
<i>K8 S73</i>	Sérine en position 73 sur la kératine 8
<i>K8 S73A</i>	Substitution de la sérine 73 par une alanine dans la kératine 8
<i>K8 S79</i>	Sérine en position 79 sur la kératine 8
<i>K8 S431</i>	Sérine en position 431 sur la kératine 8

<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>K8 Y53H</i>	Substitution de la tyrosine 53 par une histidine dans la kératine 8
<i>K18</i>	Kératine 18
<i>K18 H127L</i>	Substitution de l'histidine 127 par une leucine dans la kératine 18
<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>K18 S52A</i>	Substitution de la sérine 52 par une alanine dans la kératine 18
<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>K18 R89C/H</i>	Substitution de l'arginine 89 par une cystéine ou une histidine dans la kératine 18
<i>Kn</i>	Kératine numéro n (n étant le numéro attribué à la kératine selon la nomenclature)
<i>MAPK</i>	Mitogen activated protein kinase
<i>MFs</i>	Microfilaments d'actine
<i>MTs</i>	Micotubules
<i>N-terminale</i>	Amino-terminale
<i>pAkt</i>	Protéine Akt phosphorylée sur la thréonine 308
<i>PI3K</i>	Phosphatidyl Inositol-3-kinase
<i>PIP₂</i>	Phosphatidyl Inositol 3, 4 diphosphate
<i>PIP₃</i>	Phosphatidyl Inositol 3, 4, 5 triphosphate
<i>p/p</i>	Poids pour poids
<i>RE</i>	Réticulum endoplasmique
<i>RT-PCR</i>	Reverse Transcriptase-Polymerase Reaction Chain
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor
<i>TRITC</i>	Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate
<i>FITC</i>	Fluoresceine Iso Thio Cyanate

CHAPITRE I

FOIE, HÉPATITES ET CORPS DE MALLORY

1.1 Le Foie

1.1.1 Structure du foie

Le foie est la glande la plus volumineuse de l'organisme. Sa masse varie entre 1,4 et 1,8kg et représente environ 1,8 à 3,1% de la masse corporelle. Annexe de l'intestin grêle et situé sous le diaphragme, dans le coté droit de la cavité abdominale, le foie est constitué de quatre lobes mal définis. Richement irrigué, il bénéficie d'une double vascularisation assurée par la veine porte où circule du sang pauvrement oxygéné qui représente 75% à 80% du sang afférent ; et par l'artère hépatique qui fournit 20% à 25% de sang oxygéné à l'organe (Kierszenbaum, 2002; Zakim and Boyer, 2006).

Le foie est une glande amphicrine dont l'unité fonctionnelle est le lobule hépatique. Ce dernier est de forme hexagonal et se compose essentiellement de trois types d'éléments : les lames hépatocytaires formées de travées monocellulaires irradiant de la veine centrolobulaire, les capillaires sinusoides et les canalicules biliaires. Le parenchyme hépatique est constitué de nombreux lobules accolés les uns aux autres. Entre ces derniers, on retrouve de petits interstices appelés espaces portes qui contiennent une artériole, une veinule, une fente lymphatique et un ou plusieurs canal(aux) biliaire(s) (Figure 1.1). L'artériole et la veinule de l'espace porte sont les branches respectives de l'artère hépatique et de la veine porte et forment, avec les canaux biliaires, la triade portale (Kierszenbaum, 2002; Zakim and Boyer, 2006).

Le lobule hépatique comprend des types cellulaires distincts participant à l'intégrité de l'organe. Les hépatocytes sont les principales cellules du foie et représentent les cellules fonctionnelles endocrines et exocrines du lobule. Les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie, assument le rôle de défense immunitaire de l'organe en plus de la destruction de macromolécules exogènes ou de cellules sénescents. Les cellules de Ito

ou cellules étoilées du foie, d'origine fibroblastique, sont spécialisées dans le stockage de lipides et sont impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes et le stockage de la vitamine A. Ces cellules ont la capacité de se différencier dans certaines situations afin de produire du tissu conjonctif matriciel (Chevallier, 1995). Les cellules de l'endothélium sinusoidal comptent également parmi les cellules comprises dans le lobule hépatique (Figure 1.2). (Vacheret, 1999)

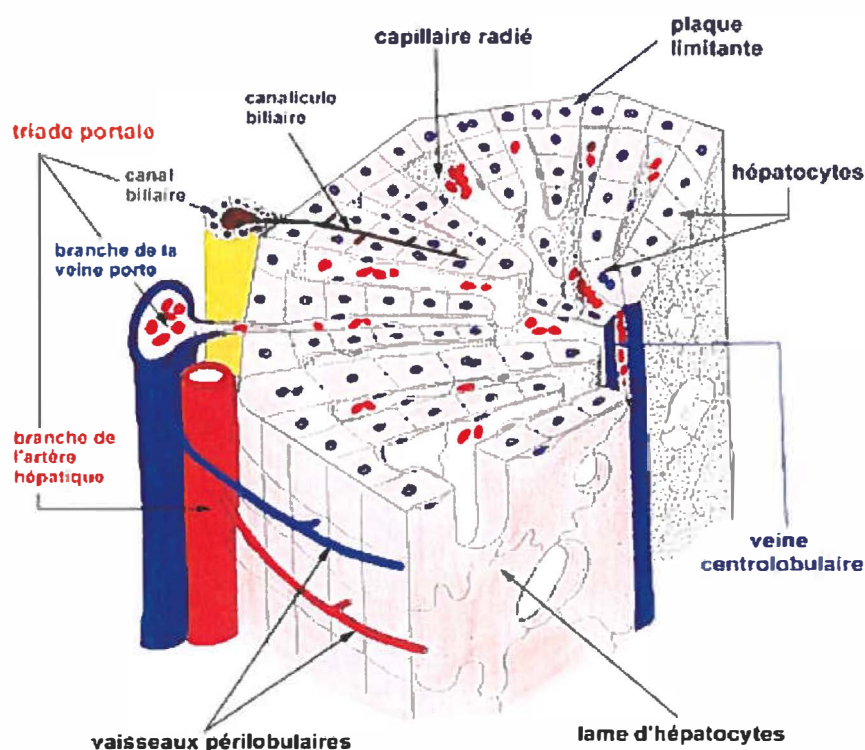


FIGURE 1.1 : Aspect tridimensionnel du lobule hépatique.

Le lobule hépatique est circonscrit par une rangée d'hépatocytes formant la *plaque limitante*. Les *hépatocytes* y sont organisés en travées monocellulaires, puis en *lames* irradiant de la *veine centrolobulaire*. La *triade portale*, constituée des *branches des veine et artère hépatiques* et du *canal biliaire*, est illustrée à la face externe de la *plaque limitante* du lobule.

Tiré de Vacheret (1999)

Légende par Ingrid Labouba

1.1.2 Fonctions du foie

Les hépatocytes sont les cellules fonctionnelles du foie et jouent un rôle important dans le métabolisme glucidique; c'est en effet dans ces cellules que les glucides sont stockés et catabolisés selon les besoins de l'organisme. Ils interviennent également dans le métabolisme lipidique en transformant les chylomicrons en lipoprotéines plasmatiques assimilables par l'organisme. Les hépatocytes assument également la fonction de détoxification via son réticulum endoplasmique (RE) qui contient les enzymes nécessaires à ce processus (Kierszenbaum, 2002; Zakim and Boyer, 2006). Les protéines de la famille des cytochromes *P450* contenues dans le RE lisse, sont les enzymes impliquées dans la détoxification de drogues et de métabolites nocifs apolaires. Ces composés, peu solubles en milieu aqueux, tendent à s'accumuler dans les membranes cellulaires. Le processus de détoxification consiste donc en une série de réactions visant à les rendre hydrosolubles dans le but d'en faciliter l'excrétion rénale (Alberts et al., 2002). De plus, les hépatocytes sont le siège de la synthèse de nombreuses protéines plasmatiques directement sécrétées dans la circulation sanguine (albumine, fibrinogène, facteurs de coagulation...) et sont donc des cellules endocrines. Ils produisent aussi la bile. Cette dernière est sécrétée dans les canalicules biliaires situés entre les hépatocytes, dans l'espace de Disse (Figure 1.2), et passe dans les ductules cholangioles pour gagner les canaux biliaires de l'espace porte via d'autres canaux dits de Hering. La fonction de production et de sécrétion de la bile fait de l'hépatocyte une cellule également exocrine. Ce sont ces propriétés endo- et exocrines qui caractérisent le foie comme un organe amphicrine.

Des fonctions n'impliquant pas les hépatocytes sont également associées au foie. En effet, la quantité de sang qui transite dans le foie et y demeure en permanence en fait un réservoir de sang pour l'organisme; il intervient ainsi dans la régulation du flux sanguin. Les vaisseaux lymphatiques compris dans l'espace porte et les macrophages qui y résident (cellules de Kuppfer) confèrent au foie un rôle immunitaire qui constitue alors un important siège de phagocytose du matériel circulant (Zakim and Boyer, 2006).

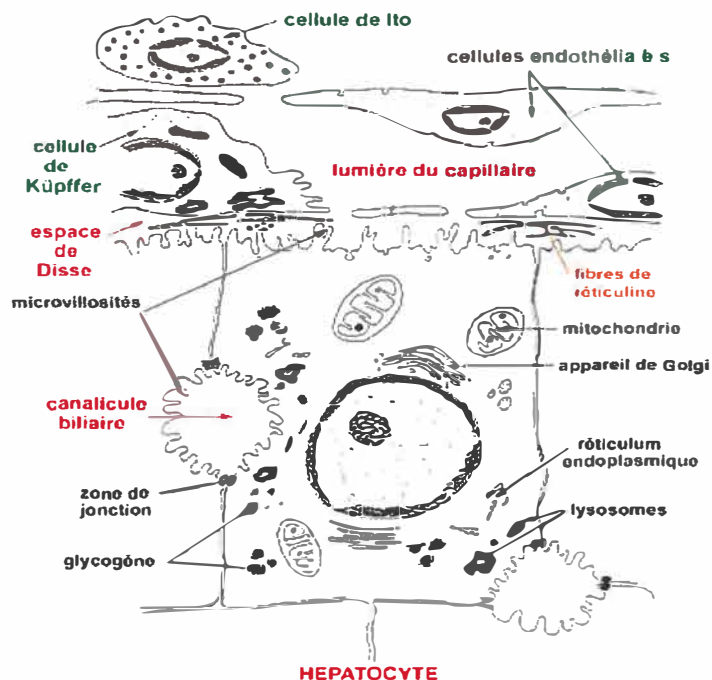


FIGURE 1.2 : Ultrastructure du parenchyme hépatique :

Le schéma représente un hépatocyte dans lequel sont illustrés ses différents organites de façon très simplifiée. On note la présence de structures adjacentes aux hépatocytes ; à savoir, les canalicules biliaires et les différents types cellulaires du foie localisés dans l'espace de Disse.

Tiré de Vacheret (1999)

Légende par Ingrid Labouba

1.2 L'hépatite alcoolique

L'hépatite est une affection du foie caractérisée par un état inflammatoire résultant en des dommages allant jusqu'à la destruction des hépatocytes. Selon la gravité et la fréquence des symptômes, l'hépatite peut être aiguë ou chronique. Elle est considérée comme chronique dès lors que la durée de l'affection excède six mois. Les causes de l'hépatite sont multiples et peuvent être la conséquence d'une infection virale ou bactérienne, d'un désordre auto-immun ou métabolique, ou d'une intoxication suite à la prise de diverses drogues (acétaminophène, barbituriques...). L'alcool (éthanol) est une des drogues dont la surconsommation entraîne l'apparition d'une hépatite qualifiée d'alcoolique.

Il est établi que la consommation abusive d'alcool est à l'origine de plusieurs affections aiguës et chroniques du foie. Les maladies alcooliques du foie regroupent la stéatose, l'hépatite et la cirrhose alcooliques. Ces maladies sont en étroite corrélation avec les quantités d'alcool ingérées et la fréquence de consommation. Cependant d'autres facteurs comme le bagage génétique, le sexe, les infections virales ou la diète ont une influence sur le développement de ces affections hépatiques.

Moins de 15% des individus qui consomment d'importantes quantités d'alcool (prise quotidienne de 120g/jour) développent une maladie alcoolique du foie. La stéatose qui est la plus précoce des trois précédemment citées peut évoluer soit en hépatite puis en cirrhose, soit directement en cirrhose (Figure 1.3). (Schiff, 2006)

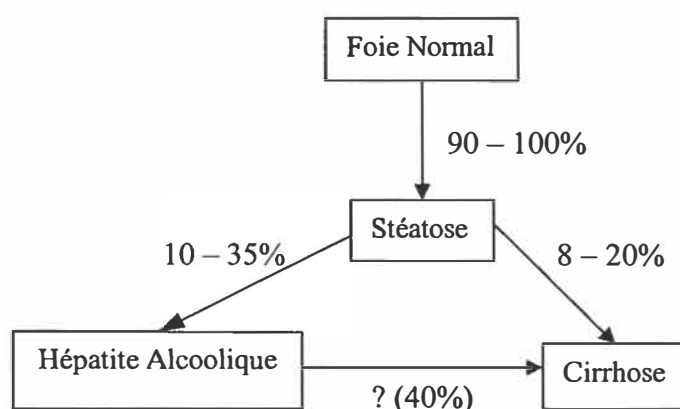


FIGURE 1.3 : Répartition des maladies alcooliques du foie dans la population consommatrice d'alcool atteinte.

90 à 100% des consommateurs d'alcool atteints d'une maladie alcoolique du foie développeront une stéatose qui, dans 8 à 20% des cas évoluera directement en cirrhose; et, dans 10 à 35% des cas, évoluera d'abord en hépatite alcoolique, puis en cirrhose dans des proportions pouvant atteindre 40%.

Tiré de Schiff (2006)

La stéatose alcoolique se caractérise par une accumulation de triglycérides dans une seule vacuole occupant la quasi-totalité du cytoplasme des hépatocytes affectés. La

cirrhose alcoolique, par contre, est la forme la plus sévère. Elle est caractérisée par une accumulation péri-cellulaire et péricellulaire de collagène. Cette dernière interfère dans les échanges entre hépatocytes et système vasculaire. La cirrhose alcoolique est habituellement micronodulaire ; on constate en effet la présence de petits nodules de régénération qui regroupent des cellules dont la localisation au sein de l'organe affecte non seulement les fonctions qu'elles occupent mais également l'ensemble de l'architecture hépatique normale. (Walsh and Alexander, 2000)

L'hépatite alcoolique peut être considérée comme l'affection intermédiaire des trois maladies alcooliques du foie. Elle se caractérise, d'un point de vue histologique, par une inflammation du parenchyme lobulaire consécutive à une infiltration leucocytaire à prédominance neutrophile. Les dommages cellulaires observés affectent, en majeure partie, les hépatocytes. On observe au sein des hépatocytes affectés une ballonnisation dégénérative secondaire à une accumulation d'eau et de protéines, et la présence de mitochondries géantes (mégamitochondria). Dans certains hépatocytes, on peut aussi observer la présence de structures cytoplasmiques hyalines irrégulières appelés Corps de Mallory (CMs), principalement composés de kératines (Figure 1.4.). On note également une importante augmentation du taux de mort cellulaire. (Haber et al., 2003; Zakim and Boyer, 2006)

1.3 Les Corps de Mallory (CMs)

Les CMs sont des structures qui ont été décrites, pour la première fois, en 1911 par le professeur Frank Mallory, suite à des analyses microscopiques de foies de patients atteints d'hépatite alcoolique (Figure 1.4 B). On reconnaît aujourd'hui qu'ils sont associés à d'autres pathologies et ne constituent donc pas un signe pathognomonique de l'hépatite alcoolique. (Zatloukal et al., 2007).

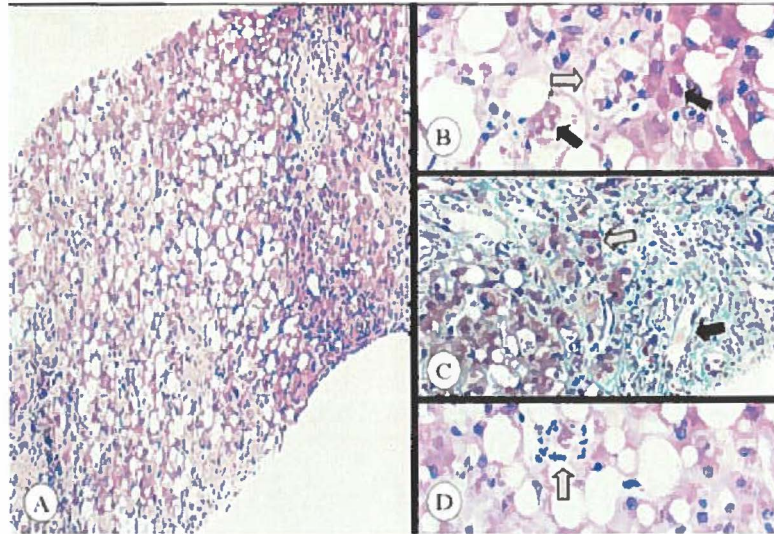


FIGURE 1.4 : Particularités histologiques de l'hépatite alcoolique.

A. Vue à faible grossissement montrant les particularités histologiques de la stéatose, de la fibrose, de l'inflammation et des dommages hépatocellulaires (X10). **B.** Les flèches noires indiquent les CMs, structures irrégulières cytoplasmiques éosinophiles à l'aspect de cordes. La flèche vide montre la ballonnisation dégénérative des hépatocytes (X40) **C.** La flèche ouverte pointe la fibrose péri-cellulaire entourant différents hépatocytes dégénérés ; la flèche noire, la fibrose périveineuse s'étendant de la veine centrale (X20) (coloration trichrome de Masson). **D.** La lésion d'unité, également appelée satellitose, comporte un hépatocyte en dégénérescence (pointé) avec des neutrophiles alentour. La stéatose marquée est également visible.

Tiré de Haber et al. (2003)

1.3.1 Composition des Corps de Mallory

Les kératines 8 et 18 (K8/18), protéines de filaments intermédiaires, représentent les principaux constituants des CMs. Cependant, il est aussi possible d'y détecter les kératines 7, 19 ou 20 qui appartiennent à d'autres types épithéliaux tels que l'épithélium biliaire (Tableau 1.1) (Pei et al., 2004; Zatloukal et al., 2007). Les CMs contiennent dans des proportions moins importantes d'autres protéines comme des protéines chaperonnes (ex : Hsp70 (Fausther et al., 2004; Riley et al., 2003)) et des protéines de la machinerie de dégradation telles que l'ubiquitine et la p62 (Tableau 1.1) (Bardag-Gorce et al., 2005; Zatloukal et al., 2007).

TABLEAU 1.1
Principaux composants des Corps de Mallory

Classe de protéines	Nom de protéines
Kératines	K8/18
	K7/19/20
	Kératines de haut poids moléculaire
	Kératines hyperphosphorylées
	Kératines ubiquitinylées
Chaperonnes	Hsp70
	Famille des Hsp90
	Famille des Hsp25
	α -B crystalline
Phosphoépitopes / kinases	Anticorps anti-MPM-2 (réaction croisée avec p62)
	Anticorps anti-SMI31 (réaction croisée avec p62)
	Phosphothréonine
	Phospho-p38 MAPK
Protéines de machinerie de dégradation	Ubiquitine
	UBB(+1)
	P62
	Protéine contenant de la vasoline et NEDD8
	Sous-unités du potéasome β 5, P25, Tbp7
Autres	Transglutaminase 2 (occasionnelle)
	Tubuline

Tiré de Zatloukal et al. (2007)

La prédominance de kératines dans la composition des CMs leur confère une structure fibrillaire à partir de laquelle on peut les classer en type I (fuseaux de filaments en rangées parallèles), type II (filaments orientés aléatoirement) et type III (matériel amorphe). Les CMs de type II et III sont les plus couramment observés et se retrouvent respectivement en périphérie et autour du noyau de la cellule (Denk et al., 2000).

1.3.2 Modèles d'étude

De nombreuses études sur les CMs et leur formation ont été réalisées à partir d'échantillons provenant de patients atteints d'hépatite alcoolique (Natori et al., 2001;

Stumptner et al., 2000). Ces travaux ont conduit à une meilleure compréhension de la composition des CMs. Cependant, des modèles animaux et cellulaires doivent être utilisés pour en comprendre la pathogénèse.

Il est apparu, suite à une observation faite par Denk et al. en 1975, que des souris, soumises de façon chronique à une diète contenant 2,5% (p/p) de griséofulvine (GF) (cf. section 5.1.3), développent au sein de leurs hépatocytes des inclusions cytoplasmiques similaires morphologiquement et biochimiquement aux CMs observés chez l'homme (Denk et al., 1975). Bien que cette observation ait été faite dans le cadre d'études sur la porphyrie, elle a mené à la mise au point d'un modèle animal qui est encore très utilisé pour l'étude des CMs. D'autres modèles animaux ont été développés et sont également utilisés pour ces études ; soit le traitement oral de souris à la colchicine ou à la DDC (3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine). Ces deux agents chimiques, tout comme la GF, ont la capacité d'entraîner la formation d'inclusions similaires aux CMs chez la souris (Denk and Eckerstorfer, 1977; Yokoo et al., 1982).

1.3.3 Formation des Corps de Mallory

Le processus exact de formation des CMs au sein des hépatocytes n'est pas totalement élucidé. Comme précédemment mentionné, les CMs sont principalement composés des kératines 8 et 18 (K8/18) et contiennent, en des proportions moins importantes, des protéines associées à la réponse cellulaire au stress et au processus de dégradation cellulaire via le protéasome. Récemment, un modèle de formation des CMs a été proposé et est illustré dans la figure 1.5.

L'intoxication de souris par des agents chimiques comme la GF, provoquent un stress à l'origine de modifications dans les niveaux d'expression des K8/18 au sein des hépatocytes lésés. Les K8/18 sont en effet surexprimées (Cadrin et al., 2000; Fausther et al., 2004) ; l'augmentation du niveau d'expression de la K8 étant plus importante que celle de la K18. D'autres protéines cellulaires comme p62 et Hsp70 augmentent

également suite au traitement (Bardag-Gorce et al., 2005; Fausther et al., 2004; Zatloukal et al., 2007).

Dans des conditions physiologiques, les kératines subissent un processus de recyclage («turn-over») qui s'effectue à travers leur dégradation par le protéasome ; processus requérant une étape préalable d'ubiquitinylation. L'interaction de protéines chaperonnes et de kératines destinées à la dégradation protéasomale permet de les marquer afin qu'elles puissent subir l'action des enzymes impliquées dans le processus d'ubiquitinylation (Figure 1.5.A) (Goldberg, 2003; Ku and Omary, 2000).

Les hausses dans les niveaux d'expression de protéines intracellulaires et les altérations fonctionnelles intrinsèques des hépatocytes consécutives à l'intoxication à la GF, conduisent à la production de protéines malformées (Howlett, 2003). Ces dernières sont dès lors prises en charge par les protéines chaperonnes, comme Hsp70 également surexprimées dans de telles circonstances, afin d'être dégradées par la voie protéasomale (Figure 1.5.A) (Fausther et al., 2004; Goldberg, 2003). Le stress toxique que subissent les hépatocytes finit par induire une production de protéines plus importante que le protéasome ne peut en gérer. Il en résulte alors une accumulation de protéines dont les K8/18 qui conduit à la formation de CMs (Figure 1.5.B) (Zatloukal et al., 2007).

L'augmentation de l'expression des K8/18 suggère qu'elles joueraient un rôle dans la réponse des hépatocytes à la présence d'agents toxiques. Il serait donc intéressant de préciser leur implication dans la réponse cellulaire aux stress d'ordre toxique afin de mieux comprendre leur rôle dans la formation des CMs et, ainsi, de mesurer l'influence de ces inclusions au sein des hépatocytes.

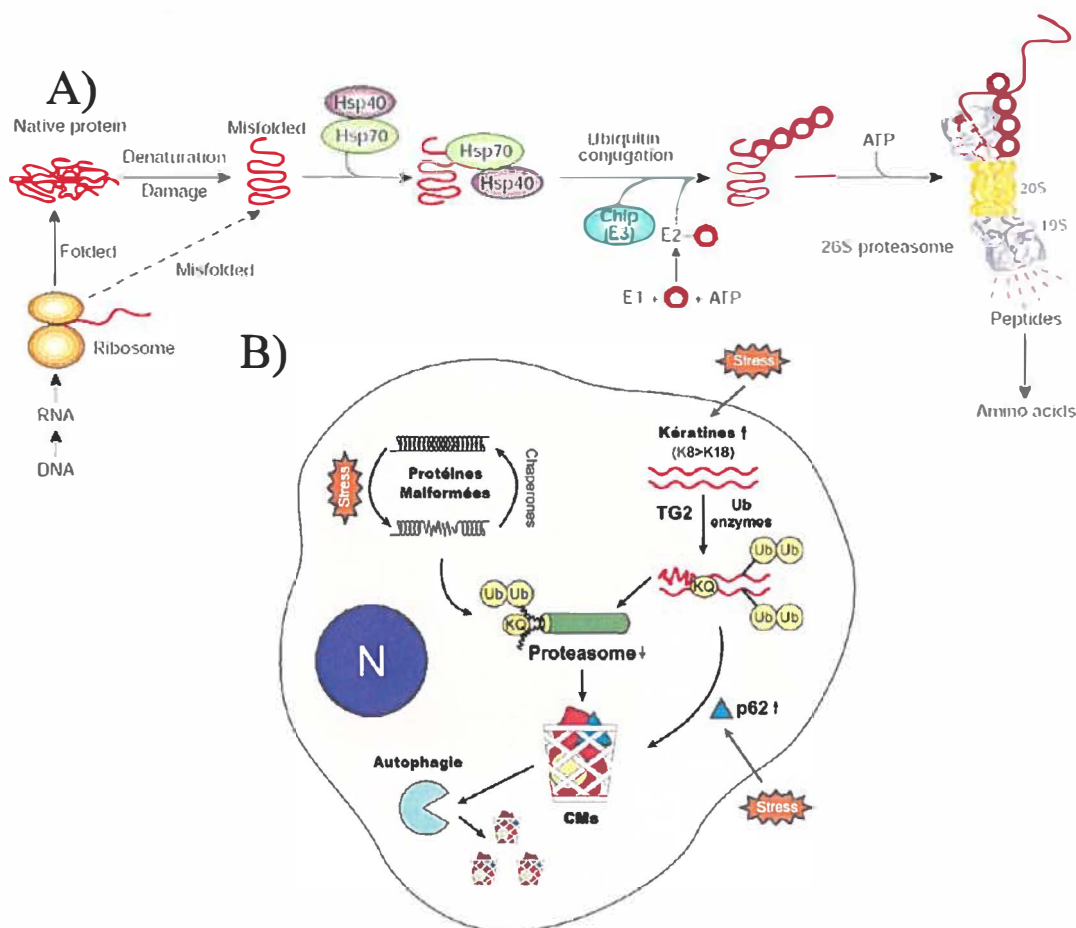


FIGURE 1.5 : Dégradation protéique via le protéasome et Formation des CMs :

A) Les protéines chaperonnes interviennent dans le repliement de protéines et dans la dégradation de protéines malformées. Par leur association aux domaines hydrophobes exposés, Hsp70/40 favorisent le repliement des protéines nouvellement synthétisées. Alternativement, elles peuvent faciliter l'identification des protéines anormales, menant à leur ubiquitylation par CHIP, à l'E3, et à leur dégradation par le protéasome 26S. Les cercles rouges représentent l'ubiquitine. B) Le stress déclenche la sur-régulation des K8/18 (K8 > K18) et de p62, l'ubiquitinylation (Ub) des kératines et l'activation de TG2 (TransGlutaminase-2), d'où la transamination des kératines (résidus amino-acides K et Q) et la formation de CMs. Le stress oxydatif cause aussi l'accumulation de protéines malformées qui peuvent engorger le protéasome via l'accumulation de protéines ubiquitylées et réticulées. Il en résulte la formation de CMs (illustrés par « les corbeilles de protéines ») caractérisés par la présence de kératines ubiquitylées et réticulées en plus de p62. L'autophagie joue également un rôle dans le processus.

A) Tiré de Golberg (2003)

B) Tiré de Zatloukal et al. (2007)

CHAPITRE II

CYTOSQUELETTE, FILAMENTS INTERMÉDIAIRES ET KÉRATINES

2.1 Le Cytosquelette

Le cytosquelette est un réseau de fibres intracellulaires constitué de trois grandes familles de protéines : les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules de tubuline.

Les microfilaments d'actine (MFs) sont les fibres les plus fines du cytosquelette avec un diamètre d'environ 7nm pour une longueur moyenne de 17 μ m. Ils sont composés d'actine-G, globulaire, dont les homodimères s'associent par un processus de polymérisation nécessitant l'hydrolyse d'ATP (Figure 2.1.C). Ils forment ainsi l'actine-F, filamenteuse, qui forme une double hélice. Les MFs se disposent, dans la cellule, principalement sous la surface membranaire (Figure 2.1.B). Cette organisation sub-membranaire ainsi que leur association avec des protéines membranaires comme la spectrine (globule rouge) leur permettent d'assurer le maintien de la forme cellulaire. Leurs interactions avec les protéines appartenant à la famille des myosines leur confèrent des propriétés contractiles à la base des fonctions qui leur sont associées, notamment les mouvements cellulaires de grande ampleur impliquant une déformation cellulaire (contraction, migration, pseudopodes...) (Alberts et al., 2002). Dans le foie, les MFs interviennent dans les contractions cellulaires des hépatocytes, importantes pour l'entretien du flux de la bile dans les canalicules biliaires (Watanabe et al., 1991).

Les microtubules (MTs), quant à eux, représentent les fibres les plus épaisses du cytosquelette avec un diamètre d'environ 25nm (Figure 2.1.A). Structures tubulaires, dans les cellules animales, les MTs irradiant d'un centre organisateur situé à proximité du noyau appelé centrosome. Ils sont composés de sous-unités globulaires hétérodimériques de tubuline- α et - β appelées protofilaments de tubuline.

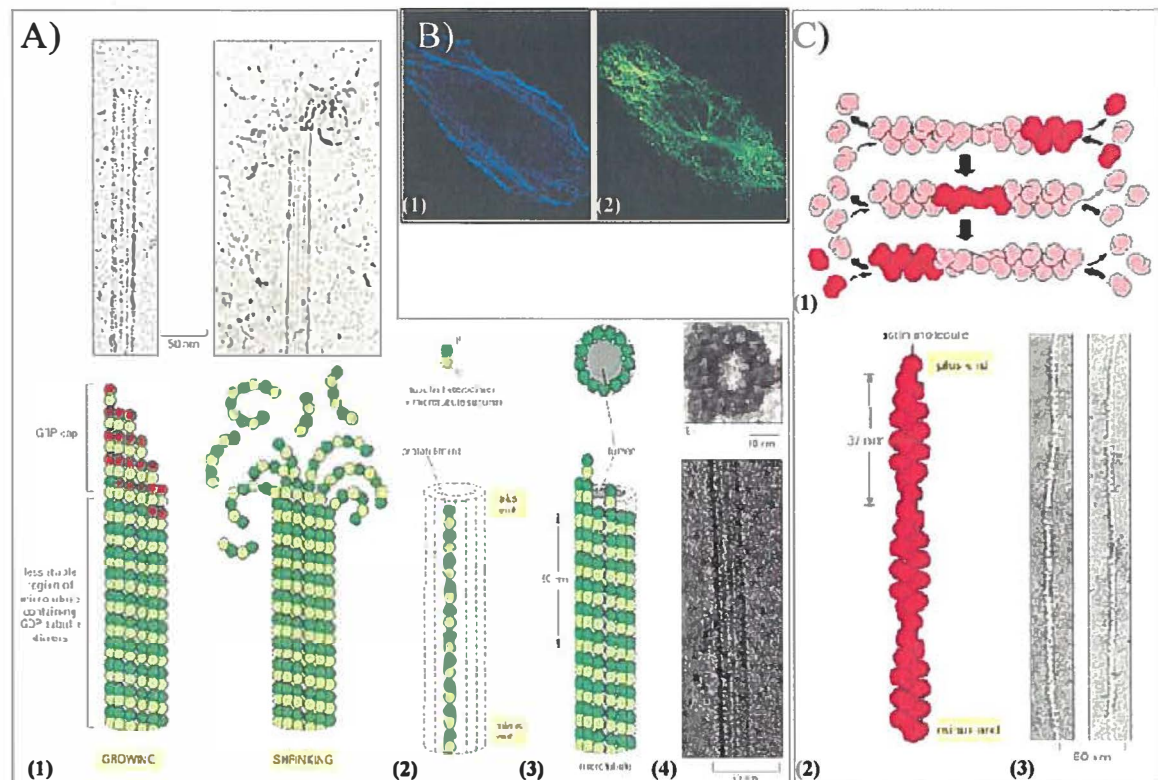


FIGURE 2.1 : Polymérisation, Structure et Organisation des MFs et des MTs.

A) (1) Polymérisation des microtubules et dynamique : l'instabilité dynamique des MTs est due aux différences structurales d'une de ses extrémités qui, en présence de la coiffe de GTP, polymérise et dépolymérise si la coiffe est perdue («catastrophe»). (2) Représentation d'un dimère de tubuline et d'un protofilament composé de nombreuses sous-unités adjacentes de même orientation. (3) Un MT se compose de 13 protofilaments. (4) Microscopie électronique : coupe transversale représentant un anneau de 13 protofilaments; court segment de MT. **B) Microscopie à fluorescence de kératinocyte humain Huh7** (1) Réseau de MTs marqué avec un anti-tubuline (vert) (2) MFs visualisé via la toxine phalloïdine (bleu). **C) (1) Polymérisation des MFs (2) Arrangement en hélice de monomères d'actine (3) vue de MFs par microscopie électronique (microphotographies par Roger Craig).**

A) et C) tirés de Albert et al (2002)

B) Tiré de Omary (2006)

Labiles et dynamiques, les MTs sont polarisés. Ils possèdent une extrémité (+) qui subit polymérisation/dépolymérisation selon qu'elle porte ou non sa coiffe de GTP, et une extrémité (-) interagissant avec le centrosome (Figure 2.1 A.(1)). On leur attribue comme fonction le transport intracellulaire de particules comme des récepteurs

cellulaires, et les mouvements d'expansions membranaires extracellulaires tels que les flagelles et les cils. Ce sont des éléments majeurs dans le processus de mitose puisqu'ils sont responsables de la ségrégation du matériel génétique via le fuseau mitotique dont ils sont les principaux constituants (Alberts et al., 2002; Gehring and Wehner, 1999).

2.2 Les Filaments intermédiaires (FIs)

2.2.1 Classification et Structure

Les protéines de FIs constituent une superfamille de protéines hétérogènes hélicoïdales issues de l'expression de 70 gènes. L'épissage alternatif de ces gènes donne lieu à au moins 74 protéines distinctes classées en 6 types selon leurs homologues de séquence (Tableau 2.1) (Omary et al., 2006; Pekny and Lane, 2007). Les protéines de FIs sont exprimées de façon spécifique selon la cellule, le type de tissu et le niveau de différenciation (Figure 2.2). Par exemple, les cellules de type fibroblastique expriment, comme protéines de FIs, de la vimentine tandis que celles de type épithéliale expriment des kératines et celles de type musculaire, de la desmine (Toivola et al., 2005).

Les FIs sont des fibres dont le diamètre (10nm) est intermédiaire entre celui des MFs et des MTs. Leurs sous-unités constitutives sont linéaires et se présentent sous forme d'homo- ou hétérodimères (Figure 2.3.A). Les protéines de FIs sont composées d'un domaine central α -hélicoïdal hautement conservé d'une protéine à l'autre. Il comprend quatre régions en hélice- α espacées de trois régions non hélicoïdales dont les positions sont également hautement conservées. Le domaine central est encadré par deux extrémités non hélicoïdales appelées tête (N-terminale) et queue (C-terminale) qui sont le siège de la diversité existant entre les protéines de FIs (Figure 2.5).

TABLEAU 2.1
Famille de protéines de FIs

Nom de FIs	Type	Taille (kDa)	Distribution Cellulaire/Tissulaire
Cytoplasmiques			
Kératines (K9-K20)	I	40-64	Épithélium (poils Ha 1-8)
Kératines (K1-K8)	II	52-68	Épithélium (poils Hb 1-6)
Vimentine	III	55	Mésenchyme
Desmine	III	53	Tous les muscles
GFAP	III	52	Astrocytes
Périphérine	III	54	Neurones périphériques
Syncoïline	III	54	Muscles (squelettique/cardiaque)
Neurofilaments(NF)-L	IV	61	Neurones centraux et périphériques
NF-M	IV	90	Neurones centraux et périphériques
NF-H	IV	110	Neurones centraux et périphériques
α -Internexine	IV	61	Neurones centraux
Nestine	IV	240	Neuroépithélium
Synémine	IV	180(α),150(β)	Tous les muscles
Nucléaires			
Lamines A/C	V	62 -78	Lamines nucléaires
Lamines B1, B2	V	62 -78	Lamines nucléaires
Autres			
Phakinine (CP49)	Orphe-	46	Cornée (œil)
Filensine (CP115)	lins	83	Cornée (œil)

Tiré de Omary et al. (2006)

L'assemblage des FIs ne requiert pas l'hydrolyse de nucléotides (ATP ou GTP). Les monomères de protéines de FIs forment spontanément des dimères surenroulés via leurs domaines centraux. Ces derniers s'associent rapidement en tétramères qui eux s'associent en filaments d'environ 55nm de long (« Unit Length Filaments » notés ULF) constitués de 16 à 48 monomères selon le type de FIs (Figure 2.3.B). L'arrangement longitudinal des ULF aboutit à la formation de FIs immatures de 16nm d'épaisseur sur quelques μ m de long. Après une étape de compaction, les FIs immatures deviennent matures et forment les fibres de 10nm de diamètre qui constituent le réseau de FIs (Parry et al., 2007)

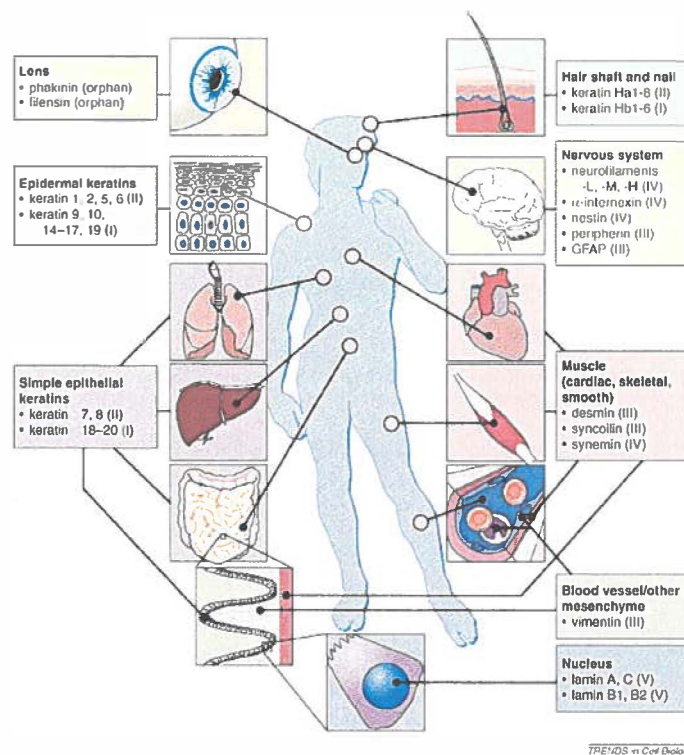


FIGURE 2.2 : Distribution des protéines de FIs dans le corps humain.

Les protéines de FIs incluent 5 types principaux (I-V) et une catégorie orpheline séparée (les types et catégorie de FIs sont entre parenthèses). Les lamines (type V) sont retrouvées dans le noyau de la plupart des cellules de mammifères, tandis que les autres protéines de FIs (types I-IV) sont cytoplasmiques et sont exprimées de façon sélective selon les cellules/tissus. Pour chaque tissu, les principaux FIs représentés sont répertoriés pour un principal type cellulaire. Pour simplifier le schéma, tous les tissus ne sont pas montrés (ex : œsophage dont la couche musculaire exprime la desmine et la couche épithéliale, les kératines K4 et K13), et le profil d'expression tissulaire typiquement complexe n'est pas exhaustivement listé. Par exemple, la cornée exprime la vimentine en plus de la phakinine (aussi nommée CP49) et de la filensine (CP115), l'épithélium cornéen exprime les kératines K3 et K12, les glandes de la peau expriment les K8 et K18, et les kératinocytes basaux de l'épiderme interfolliculaire normal exprime principalement les K5 et K14 alors que les kératinocytes supra basaux expriment les K1 et K10. La complexité et l'expression des FIs spécifique du type cellulaire peuvent être facilement appréciées au niveau de l'intestin qui exprime des kératines (couche épithéliale), de la vimentine (vascularisation), de la desmine (couche musculaire lisse) et des FIs neuronaux (système nerveux entérique) (non montré).

Tiré de Toivola et al. (2005)

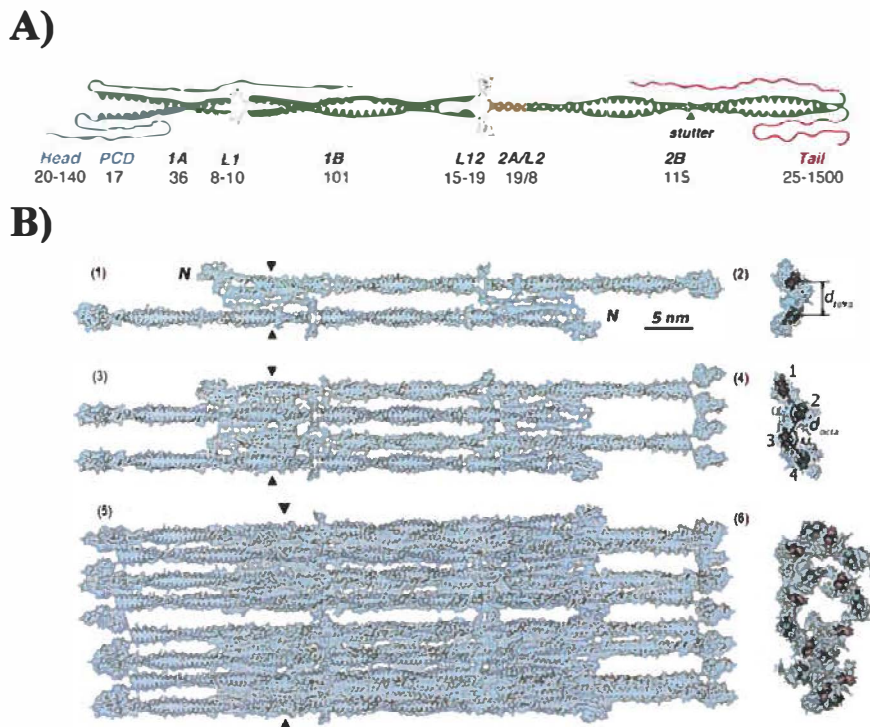


FIGURE 2.3 : Polymérisation des FIs.

A) Modèle de dimère de FI (Vimentine, type III) : Le dimère est formé par une paire de chaînes parallèles qui se situe dans l'axe du domaine central. Toute cette région montre un haut degré d'homologie de séquences parmi les protéines de FIs de tous les types. Les segments surenroulés 1A, 1B, 2A et 2B sont connectés par de courtes portions de chaînes droites connues sous le nom de « linkers » (respectivement L1, L12 et L2). Dans le segment 2B il y a un segment dit « stutter » au sein duquel une délétion de trois résidus survient dans ce qui serait autrement un modèle continu de sept résidus. Ceci conduit à un déroulement local de la molécule surenroulée. Les FIs peuvent former des hétéro- ou des homodimères dépendamment du type (I-IV) de protéines impliquées. Le domaine central est flanqué des domaines notés « tête » et « queue » qui montrent de grandes variations entre les différents types de protéines de FIs. PCD, le domaine avant celui enroulé est retrouvé dans les protéines de type III et le type IV. Sa séquence d'acides aminés est compatible avec la formation en hélice- α , semblable à celle du « linker » L2. **B) Modèle atomique de tétramère ((1) et (2)), d'octamère ((3) et (4)) et d'ULF ((5) et (6)) de vimentine.** Deux vues orthogonales de chaque modèle sont illustrées.

Tiré de Parry et al. (2007)

Les FIs se distribuent, au sein de la cellule, de la périphérie du noyau à la membrane plasmique à laquelle ils sont ancrés au niveau des jonctions cellulaires de type

desmosomes. Cette organisation intracellulaire est à la base d'une fonction qui leur est attribuée; à savoir le maintien de l'intégrité mécanique et de la morphologie cellulaires (Chou et al., 2007; Cooper, 1999). La fonction de soutien mécanique attribuée aux FIs a longtemps supporté l'hypothèse selon laquelle ces derniers constitueraient des éléments statiques du cytosquelette. Cependant, suite à de nombreux travaux réalisés au cours de la dernière décennie, il est ressorti qu'à l'instar des MTs et des MFs, les FIs sont des structures hautement dynamiques tant à leur état de FIs que de précurseurs (particules non filamenteuses et courts filaments) (Chou et al., 2007). On reconnaît aujourd'hui que les FIs jouent un rôle dans le transport de molécules et la distribution d'organelles (Ku et al., 2002; Tzivion et al., 2000), la croissance cellulaire (Kim et al., 2006; Reichelt and Magin, 2002; Toivola et al., 2005), et la réponse des cellules au stress d'ordre mécanique et/ou toxique (Liao et al., 1997; Marceau et al., 2001).

2.2.2 Régulation de la fonction des FIs

Étant données l'importance et la diversité fonctionnelles des éléments du cytosquelette, ces derniers sont soumis à des processus de régulation passant par des phénomènes de modifications post-traductionnelles et d'interactions intermoléculaires. La régulation des FIs reposent largement sur les modifications post-traductionnelles qu'ils subissent, comme la phosphorylation et la glycosylation; mais aussi, fort probablement, par leur association à d'autres protéines cellulaires (Omary et al., 2006; Tao et al., 2006). La plupart des processus cellulaires faisant intervenir les FIs impliquent leur phosphorylation : l'organisation des FIs au sein de la cellule (Goldman et al., 1999; Inagaki, 2006), leur réorganisation durant la mitose, et les réponses cellulaires induites par le stress (Kim et al., 2006; Liao et al., 1997; Toivola et al., 2002).

La phosphorylation d'une protéine est une réaction biochimique réversible consistant en l'addition d'un ou plusieurs groupement(s) phosphate ($-\text{PO}_3^{2-}$) par estérification de résidus aminoacyl portant un groupement hydroxyle ($-\text{OH}$) (Figure 2.4). Cette modification post-traductionnelle constitue un mécanisme de régulation cellulaire ubiquitaire essentiel à la physiologie de la cellule; notamment en permettant la

transmission de signaux à l'intérieur de la cellule. En effet, l'ajout d'un ou plusieurs acide(s) phosphorique(s) au sein d'une protéine en modifie les caractéristiques chimiques et induit un changement conformationnel dont l'impact fonctionnel est important. La phosphorylation est elle-même sujette à une régulation rigoureuse qui passe par le contrôle d'enzymes la catalysant, les protéines kinases, ou catalysant la réaction inverse (déphosphorylation), les phosphatases (Figure 2.4) (Secko, 2003).

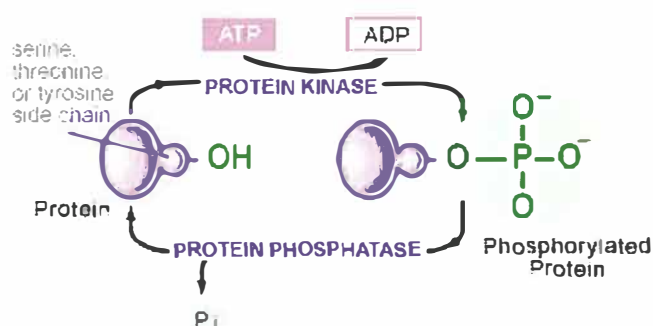


FIGURE 2.4 : Phosphorylation d'une protéine

La protéine kinase catalyse l'addition, sur un groupement hydroxyle d'un résidu aminoacyle, d'un groupement phosphate fourni par hydrolyse d'une molécule d'ATP dès lors transformée en ADP. La protéine phosphatase catalyse la libération d'un acide phosphorique, ramenant ainsi le résidu aminoacyle à son état initial.

Tiré de Secko (2003)

L'étude structurale des FIs révèle qu'ils ne peuvent subir de modifications post-traductionnelles qu'au niveau de leurs extrémités (Figure 2.5); ceci pourrait être le fait de la conformation en hélice- α du domaine central qui masquerait l'accès d'éventuels sites aux enzymes. La présence de ces sites au sein des domaines variables des protéines de FIs suggère un lien entre les modifications post-traductionnelles et les fonctions inhérentes aux tissus où elles sont spécifiquement exprimés. Les sites de phosphorylation les plus étudiés sont des résidus sérines et thréonines (Omary et al., 2006).

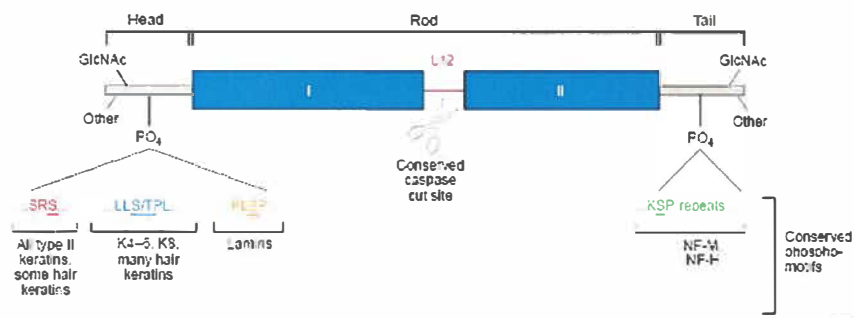


FIGURE 2.5 : Domaines et Modifications post-traductionnelles des FIs.

Les FIs subissent plusieurs modifications post-traductionnelles dans les domaines tête et queue, entre autres la phosphorylation (PO₄) et la glycosylation (GlcNAc). La région «linker» (L12) du domaine central inclut un site de coupure pour les caspases conservé qui est clivé pendant l'apoptose. L'hyperphosphorylation des FIs, qui se produit tôt exposition à un signal apoptotique, peut protéger contre la dégradation via les caspases tel qu'observé *in vitro* dans le cas de K18. Les motifs de phosphorylation *in vivo* sont : (i) Ser-Arg-Ser-Xaa, trouvé dans toutes les kératines de type II et quelques kératines de poils dont la fonction est peu claire; (ii) Leu-Leu-Ser/Thr-Pro-Leu, trouvé dans K4-K6, K8 et plusieurs kératines de poils, dont le rôle est important dans la protection contre l'apoptose; et (iii) Pro-Leu-Ser-Pro, trouvé dans les lamines qui est important pour la réorganisation de lamines pendant la mitose. D'autres motifs sont en plusieurs exemplaires dans le même FI, l'exemple classique étant 50 répétitions de Lys-Ser-Pro (KSP) (contenant plusieurs variations comprenant Xaa-Lys-Ser-Pro Glu-Lys et Xaa-Lys-Ser-Pro-Xaa-Xaa-Xaa-Lys) situé dans le domaine de queue de NF-H.

Tiré de Omary et al. (2006)

2.3 Les Kératines

Les kératines sont des protéines de FIs spécifiquement exprimées au sein des tissus épithéliaux. Elles constituent une importante famille de protéines hétérogènes qui se répartissent en deux groupes selon leur point isoélectrique; les kératines de type I sont acides tandis que celles de type II sont basiques ou neutres. Chacune des kératines répertoriée est numérotée (Tableau 2.2) (Shweizer et al., 2006). Au sein de la cellule, elles sont sous forme d'hétéropolymères obligatoires de sorte que kératines de type I et de type II se retrouvent au sein d'un même filament dans des proportions équimolaires (Kim et al., 1984; Zatloukal et al., 2000).

TABLEAU 2.2
Classification et numérotation des Kératines

Classes Catégories	Type I*	Type II*
Kératine épithéliale humaine	9-28	1-8 et 71-80
Kératines humaines de poils	31-40	81-86
Non humaines	41-70	87-120
Pseudogènes	121-220	<220

* Les numéros correspondent à ceux assignés aux kératines par la nouvelle nomenclature

Tiré de Schweizer et al. (2006)

Les kératines sont associées à de nombreuses fonctions communes aux FIs. Les études de maladies liées aux kératines comme les kératinopathies ont en effet montré leur implication dans le maintien de l'intégrité mécanique de la cellule. L'épidermolyse bulleuse simple en est un bel exemple (Magin et al., 2004). Cette maladie héréditaire de la peau se caractérise par la lyse de kératinocytes basaux qui entraîne la formation de cloches intra-épidermiques suite à des traumatismes mineurs (friction, variation de température...). La destruction des kératinocytes est la conséquence d'une fragilisation cellulaire provoquée par des mutations au sein des gènes codant pour la K5 et/ou la K14 (Okulicz et al., 2002). Il ressort de ces travaux que les kératines protègent les épithélium contre les stress d'ordre mécanique (Marceau et al., 2007; Pekny and Lane, 2007).

Les propriétés flexibles et viscoélastiques des kératines les rendent particulièrement efficaces dans la résistance aux déformations cellulaires; mais leurs rôles au sein de la cellule ne se limitent pas à des fonctions mécaniques (Magin et al., 2007; Marceau et al., 2007). L'étude de l'effet de différentes mutations des kératines, particulièrement au sein des hépatocytes, suggère qu'elles jouent un rôle dans certains processus cellulaires non structuraux et protègent la cellule contre différents types de stress, mécaniques ou toxiques (Coulombe and Omary, 2002; Toivola et al., 2005). On associe ainsi les kératines à la signalisation cellulaire, à la régulation de la disponibilité de protéines

cellulaires et à la résistance des cellules à la présence de diverses drogues (Bauman et al., 1994; Ku et al., 1999; Marceau et al., 2001).

L'étude des différentes modifications post traductionnelles susceptibles de se produire au sein des kératines (phosphorylation, glycosylation...) a permis de montrer que leur phosphorylation constitue un processus important dans la régulation de leurs fonctions (Ku et al., 1998a; Liao et al., 1997; Toivola et al., 2002). La phosphorylation des kératines représente, de plus, un facteur important pour leur solubilité, leur réorganisation au sein de la cellule et leur liaison avec d'autres protéines cytoplasmiques (Ex : 14-3-3 (Ku et al., 1998b)) (Omary et al., 1998). L'inhibition de phosphatases sérine/thréonine (types 1 et 2A) au sein de modèles animaux a, par exemple, révélé que la phosphorylation des kératines sur des sites sérines intervient dans la régulation de leur «turn-over» et leur réorganisation (Ku and Omary, 1994; Toivola et al., 1998).

2.3.1 K8/18 et Hépatocytes

Les hépatocytes sont des cellules épithéliales du parenchyme hépatique dont le réseau de FIs est composé uniquement des K8/18 chez l'adulte (Coulombe and Omary, 2002; Omary et al., 2002). Les K8/18 sont cependant particulièrement abondantes au niveau de l'épithélium simple qui tapisse le tube digestif dont les cellules peuvent également exprimer des kératines autres que les K8/18 (K7/19/20).

Des mutations des K8/18 ont été associées à diverses maladies inflammatoires du tractus digestif chez l'homme comme chez la souris (Magin et al., 2004; Omary et al., 2002). Une mutation de la K8 (K8 G62C) a été reliée à la pancréatite chronique tandis que dans les cas de colite ulcéreuse et de maladie de Crohn ce sont des mutations des deux kératines qui semblent être en cause (Magin et al., 2004). Au niveau du foie, les mutations des K8/18 constituent davantage un facteur de risque qu'une cause directe à l'apparition de pathologies hépatiques telles que les cirrhoses cryptogénétiques (Ku et al., 2003a; Omary et al., 2002). La substitution de la glycine 61 de la K8 par une cystéine (K8 G61C), associée à ce type de pathologies, est également observée dans des

cas de maladies hépatiques non cryptogénétiques. L'étude de cette mutation a montré qu'elle affecte l'organisation des kératines seulement suite à un stress cellulaire et compromet la capacité de récupération des hépatocytes après un stress. Les mutations K8 Y53H et K18 H127L représentent, avec la K8 G61C, 75% des mutations relevées dans les cas de maladies hépatiques et constituent également un facteur à l'apparition de maladies du foie (Ku et al., 2003a).

Les travaux réalisés à partir de modèles murins transgéniques (Tableau 2.3) ont permis de produire des phénotypes ayant contribué à la compréhension du rôle des K8/18 au sein des hépatocytes. L'étude des mutations de K8 et/ou K18 ou leur absence au sein de souris transgéniques tendent à montrer qu'elles accroissent leur susceptibilité aux lésions hépatiques et à l'apoptose (Gilbert et al., 2001; Ku et al., 1996; Ku and Omary, 2006; Marceau et al., 2001). Par exemple, la substitution de l'arginine 89 de la K18 très conservée par une cystéine ou une histidine (K18 R89C/H) induit une hépatite chronique chez la souris portant cette mutation. Cette dernière, en plus de fournir un modèle pour l'étude de l'hépatite chronique, est une des mutations qui a contribué à préciser le rôle des K8/18 au sein des hépatocytes (Ku et al., 1995).

L'absence de K8 ou de K18 accroît la fragilité des hépatocytes face à différents stress ; supportant ainsi l'idée que les kératines assument une fonction cytoprotectrice. En effet, l'absence ou la déficience de K8 accroît la susceptibilité du foie au sein duquel on note de l'inflammation et de la mort cellulaire après exposition à un stress (Paramio, 2006; Tao et al., 2003). L'absence de K18, quant à elle, provoque l'agrégation du réseau de kératines au sein des hépatocytes (Magin et al., 1998; Paramio, 2006) ainsi qu'une hépatotoxicité plus prononcée à certaines drogues (Ku et al., 1996).

Le rôle de cytoprotection assumé par les K8/18 semble être relié à leur phosphorylation. Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés comme les sérines 73 et 431 de la K8 (K8 S73 et K8 S431) ainsi que les sérines 33 et 52 de la K18 (K18 S33 et K18 S52) (Figure 2.6). L'étude de mutations localisées au niveau de ces sites a permis de mieux comprendre leur implication fonctionnelle. La surexpression du phénotype mutant K8

S73A ou K18 S52A dans des souris transgéniques a conduit à l'observation d'une hépatotoxicité accrue à différentes drogues (ex : GF, microcystine, acétaminophène...), suggérant que la phosphorylation de K8 S73 et K18 S52 est importante dans la protection des hépatocytes contre les stress d'ordre toxique (Ku et al., 1998a; Liao et al., 1997). D'autres travaux ont montré l'implication des phosphoprotéines de K8/18 dans les phénomènes de stress, de mitose et d'apoptose (Ku et al., 1998a; Liao et al., 1997; Toivola et al., 2002).

TABLEAU 2.3

Quelques modèles animaux transgéniques pour les kératines d'épithélium simples

Gènes	Phénotype des Souris Transgéniques
Surexpression	
K8 type sauvage	Normal ou désordres pancréatiques exocrines
K18 type sauvage	Normal
K19 type sauvage	Normal
K18 R89C	Hépatite chronique, fragilité cellulaire, susceptibilité aux dommages hépatiques
K18 S52A	Susceptibilité aux dommages hépatiques dus au stress
K18 S33A	Réorganisation des FIs dans le foie et le pancréas
K14 (ectopique)	Hépatite chronique, diminution de la sécrétion d'acides biliaires
Knock-out	
K4 nulle	Hyperplasie basale, hyperkératose, et noyau atypique au niveau de l'œsophage, la langue et la cornée
K8 nulle (C57Bl/6)	Embryo-léthalité, hémorragie hépatique massive
K8 nulle (FVB/N)	Hyperplasie colorectale, colite, prolapsus rectal, susceptibilité aux dommages hépatiques
K18 nulle	Accumulation de CMs dans le foie
K19 nulle	Normal

Tiré de Ku et al. (1999)

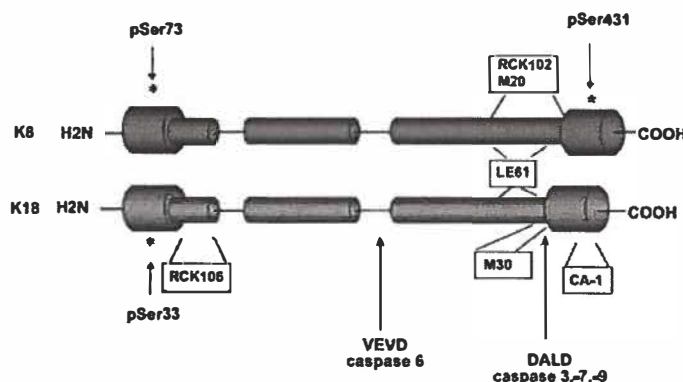


FIGURE 2.6 : Représentation schématique d'un dimère de K8/18

Les différents domaines (tête, queue, domaine central) sont indiqués par des cylindres et les «linkers» le sont par des lignes pleines reliant les cylindres. Les sites de phosphorylation, de clivage pour les caspases, ainsi que la localisation de différents épitopes reconnus par des anticorps spécifiques sont aussi illustrés.

Tiré de Schutte et al. (2004)

2.3.2 K8/18 et stress toxique

La phosphorylation des K8/18 semble constituer un processus impliqué dans la protection cellulaire face aux stress mécaniques ou non mécaniques. Dans les cas d'hépatites alcooliques où les hépatocytes sont soumis à un stress toxique par exposition à l'alcool, on observe une hyperphosphorylation des K8/18 sur chacun des sites sérines suivants : K8 S73, K8 S431 et K18 S33, K18 S52 (Stumptner et al., 2000). Une hyperphosphorylation des K8/18 est également observée dans d'autres cas de dommages hépatiques comme dans les cas de cirrhose et d'hépatite virale C (Toivola et al., 2004). L'étude plus exhaustive du niveau de phosphorylation des K8/18 dans des situations pathologiques a mené à la conclusion que l'hyperphosphorylation des K8/18 pourrait constituer un marqueur de la progression de maladies hépatiques (Toivola et al., 2004).

Les modèles animaux utilisés dans le cadre d'études portant sur la formation des CMs tendent à corréler l'observation d'une hyperphosphorylation des kératines lors d'un stress toxique. Fausther et al. (2004), par exemple, ont constaté que le traitement de souris à la GF induit une hyperphosphorylation de la K8 S79 et de la K8 S436 (orthologues murins de K8 S73 et K8 S431) et de la K18 S33.

Les données récoltées de ces études suggèrent que la phosphorylation des K8/18 constitue un élément clé dans leur rôle de cytoprotection contre le stress. Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation cellulaire sous-tendant cette fonction au sein d'hépatocytes soumis à un stress toxique restent encore à déterminer.

2.3.3 K8/18 et apoptose

La K18, contrairement à la K8, est sensible à l'action de plusieurs caspases (3, 6, 7 et 9) du fait qu'elle possède des sites de coupure spécifiques à l'action de ces protéases (Figure 2.6) (Caulín et al., 1997; Schutte et al., 2004). Des études ont, en effet, été réalisées afin d'observer l'organisation et les modifications des K8/18 durant l'apoptose. Il en ressort que, tandis que la digestion de la K18 par les caspases (notamment la caspase 3) constitue une étape précoce du processus d'apoptose, la K8 y est particulièrement résistante (Ku and Omary, 2001; Schutte et al., 2004). Des travaux complémentaires effectués ont permis d'observer que les K8/18 deviennent hyperphosphorylées suite à un signal de mort ; c'est le cas pour les sites K8 S73, K8 S431 et K18 S52 (Schutte et al., 2004). Cette hausse du niveau de phosphorylation ne semble pas avoir d'effet sur la susceptibilité de la K18 à l'action des caspases (Ku and Omary, 2001).

Fausther et al. ont montré que la GF induit la phosphorylation des K8 S79, K8 S436 et de la K18 S33. De l'apoptose au sein des hépatocytes lésés a également été observé dans le cadre de cette étude. Les cellules identifiées comme étant en apoptose semblent être entourées de cellules saines dont la K8 S79 est phosphorylée. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que la cellule apoptotique pourrait émettre un signal qui, une fois perçu par les cellules environnantes, déclencherait une voie de signalisation aboutissant à la phosphorylation de la K8 potentiellement impliquée dans la survie de ces cellules (Fausther et al., 2004).

L'implication des K8/18 dans la résistance au stress hépatotoxique laisse pressentir qu'elles pourraient avoir une incidence quelconque sur le processus apoptotique ; et ce,

autrement qu'en tant que substrat des caspases. Des études ont montré qu'elles seraient impliquées dans des phénomènes de résistance à l'apoptose sans pour autant déterminer le rôle exact qu'elles pourraient jouer (Marceau et al., 2007; Oshima, 2002). L'augmentation du niveau de phosphorylation des K8/18 durant le processus apoptotique suggère que cette modification post traductionnelle pourrait intervenir.

CHAPITRE III

APOPTOSE ET VOIES DE SIGNALISATION Fas ET PI3K/Akt

3.1 Apoptose : Mort cellulaire programmée

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus de mort physiologique indispensable au développement et au maintien de l'intégrité d'organismes pluricellulaires. L'apoptose est, en effet, nécessaire au développement embryonnaire durant lequel elle joue un rôle primordial dans l'histogenèse et l'organogenèse. À l'état physiologique, chez l'adulte, l'apoptose est en équilibre avec le processus de prolifération cellulaire afin de réguler la masse et le volume des tissus (Feldman, 1999).

3.1.1 Apoptose et nécrose

Toute circonstance affectant l'équilibre physiologique entre mort et prolifération cellulaire rend le processus de mort cellulaire pathologique pour le tissu. Dans un contexte pathologique apoptose et nécrose sont souvent mises en parallèle (Figure 3.1).

La nécrose est un processus de mort cellulaire consécutif à un arrêt pathologique de la cellule. Un traumatisme important comme un arrêt ou une diminution de la circulation sanguine au niveau d'un organe, l'hyperthermie, une intoxication par un produit chimique ou une toxine bactérienne peuvent causer la mort de cellules par nécrose. La nécrose est un processus passif au cours duquel la membrane plasmique est endommagée et le contenu cellulaire relargué dans le milieu environnant (Figure 3.1). La libération du matériel intracellulaire a comme conséquence directe des dommages au niveau de la matrice extracellulaire accompagnés d'une réaction inflammatoire (Kanduc et al., 2002).

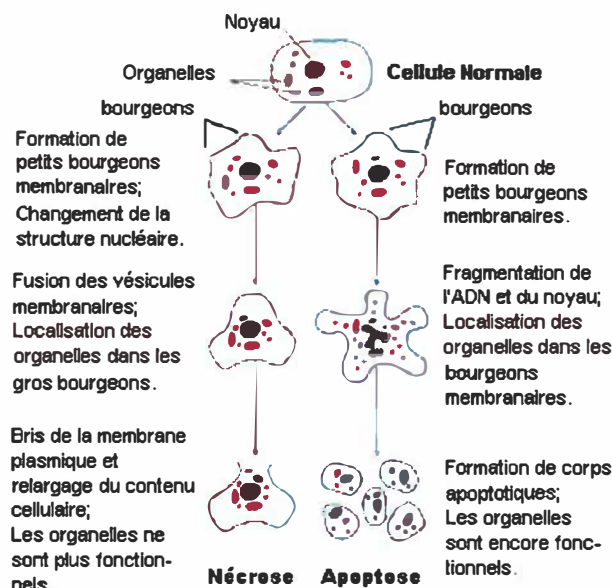


FIGURE 3.1 : Changements structuraux cellulaires de la Nécrose et de l'Apoptose.

Les étapes précoces de la nécrose et de l'apoptose sont similaires. Les deux processus divergent l'un de l'autre par l'état de la membrane plasmique dans la progression de la mort cellulaire. Dans le cas de la nécrose on note un bris de la membrane plasmique avec libération du contenu cellulaire ; dans le cas de l'apoptose, le matériel intracellulaire reste contenu dans des vésicules appelées corps apoptotiques.

Tiré de Goodlett et Horn (2001)

Contrairement à la nécrose, pathologique en toute circonstance, l'apoptose est un processus de mort cellulaire physiologique qui, dans des circonstances particulières (traumatismes), peut devenir nocive pour l'organisme. L'apoptose se produit tout en conservant l'intégrité de la membrane plasmique. Les changements structuraux cellulaires qu'elle implique la caractérisent : rétraction de la cellule, agglomération des organelles cytoplasmiques encore fonctionnels autour du noyau, condensation de la chromatine en de volumineux amas (Figure 3.1) (Feldman, 1999). On note également au cours du processus apoptotique que la mitochondrie subit des modifications majeures conduisant à la libération dans le cytoplasme de protéines qui, comme le cytochrome *c*, sont importantes dans le déroulement du processus apoptotique (Ockner, 2001; Ricci, 2000). Ces altérations progressives sont rapidement suivies par la fragmentation de la

cellule en corps apoptotiques qui se détachent alors du tissu pour être phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines (Figure 3.1). La fragmentation cellulaire s'effectue sans dommage membranaire de sorte que les conséquences pour le tissu environnant sont limitées (Feldman, 1999; Goodlett and Horn, 2001; Kanduc et al., 2002).

3.1.2 Mécanismes moléculaires

L'apoptose est initiée au sein de la cellule à partir de signaux provenant du milieu extracellulaire environnant. Selon le type de stimuli, elle peut être conduite de différente manière. On distingue ainsi deux voies apoptotiques dont l'activation dépend, dans un cas comme dans l'autre, des conditions prévalant dans le milieu extracellulaire (stress, présence de cytokines) : il s'agit de la voie intrinsèque et de la voie extrinsèque de l'apoptose (Figure 3.2). La voie intrinsèque regroupe les processus d'apoptose reliés aux phénomènes de stress qui affectent particulièrement la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique. La voie extrinsèque, quant à elle, fait référence à l'apoptose initiée par des récepteurs dits de mort cellulaire via leur liaison avec un ligand. Bien qu'elles diffèrent par les molécules qu'elles impliquent dans la signalisation apoptotique, ces deux voies se recoupent en différents points et induisent toutes deux des modifications mitochondriales dont l'issue finale est la mort cellulaire (Figure 3.2). (Gupta, 2005; Ockner, 2001).

L'apoptose est conduite à travers toute la cellule par une famille de protéases à cystéine baptisées caspases (Gupta, 2005; Okada and Mak, 2004). Ces dernières possèdent une spécificité stricte de clivage de leur substrat après un résidu d'acide aspartique. Elles sont initialement exprimées dans la cellule sous forme de zymogènes inactifs appelés procaspases. Les procaspases sont activées suite à un processus de maturation impliquant deux clivages successifs au niveau de liaison Asp-X (X étant un acide aminé) (Ricci, 2000). Les caspases actives agissent sur de nombreux substrats cellulaires dont le clivage fait partie intégrante du processus d'apoptose. Ceci contribue à la régulation dont fait l'objet ce processus.

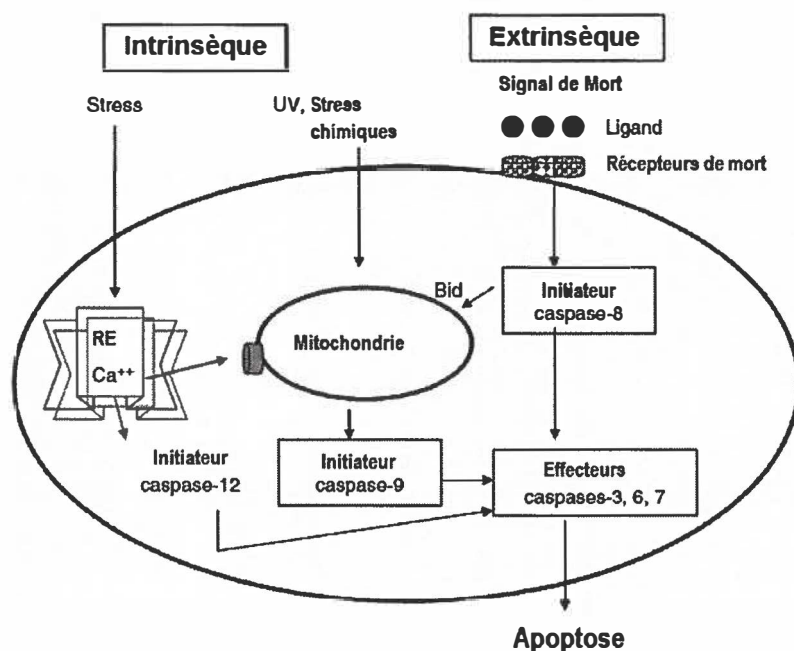


FIGURE 3.2 : Différentes voies de l'apoptose.

La voie extrinsèque est médiée par l'interaction des récepteurs de mort et leur ligand. La voie intrinsèque comprend la voie mitochondriale et la voie de stress du réticulum endoplasmique.

Tiré de Gupta (2005)

La perception de signaux de mort par la cellule déclenche le processus apoptotique en amorçant la phase initiatrice de l'apoptose. Cette phase consiste en l'auto activation des procaspases initiatrices (caspases 8, 9 et 12) qui une fois activées ont la capacité d'activer d'autres procaspases en caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7). Les caspases effectrices déclenchent la phase exécutoire de l'apoptose qui implique le clivage de nombreux substrats dont l'issue finale est la mort cellulaire (Gupta, 2005; Ricci, 2000).

3.1.3 Régulation de l'apoptose

3.2 Signalisation pro-apoptotique : Récepteur Fas

Tel que précédemment mentionné, l'apoptose peut être initiée à partir des récepteurs dits de mort cellulaire. Ces derniers sont représentés par des protéines appartenant à la superfamille des TNF-R (Tumor Necrosis Factor-Receptor) et incluent les récepteurs

Fas, TNF-R1, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2 et DR6. Les récepteurs de mort cellulaire se distinguent des autres membres de la superfamille des TNF-R par leur domaine de mort (Dead Domain) contenu dans leur portion cytosolique. Leur activation consécutive à la liaison avec un ligand spécifique déclenche le processus d'apoptose (Dempsey et al., 2003). L'apoptose médiée par les récepteurs Fas et TNF-R1 sont largement à l'étude dans un contexte pathologique (Malhi et al., 2006; Oshima, 2002).

3.2.1 Fas/Fas L et Hépatocyte

Le récepteur de mort Fas (Fas), encore appelé CD95 ou Apo1, est une glycoprotéine transmembranaire de 42-45 kDa dont l'interaction avec un ligand spécifique induit la transduction d'un signal de mort à travers la cellule. Le ligand de Fas (Fas L) est une cytokine existant sous forme membranaire, ou soluble après clivage par des métalloprotéinases. Le système Fas/Fas L constitue un important régulateur d'apoptose à la membrane de cellules de mammifère (Malhi et al., 2006; Mollinedo and Gajate, 2006).

L'apoptose médiée par la voie de Fas/Fas L est un processus de mort cellulaire qui participe à l'intégrité tissulaire et à l'élimination de cellules sénescents au niveau du foie. En effet, les hépatocytes, expriment de façon constitutive le récepteur Fas et peuvent ainsi mourir par apoptose induite par Fas/Fas L. Ce récepteur est sujet à un processus de régulation basé sur sa compartimentation au sein de la cellule. En situation physiologique, Fas est principalement localisé dans l'appareil de Golgi et seule une faible proportion se retrouve au niveau de la membrane plasmique. La stimulation de la cellule par un signal de mort induit la relocalisation du pool de Fas stocké au sein de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique par transport vésiculaire. Une fois à la membrane, Fas trimérise et peut alors interagir avec son ligand ou d'autres molécules pouvant l'activer (ex : HGF (Suzuki et al., 2000)). La liaison de Fas et de son ligand Fas L, sous l'action de la sphingomyélinase acide, induit la production de céramide qui favorise la formation de lipides rafts au sein desquels les complexes Fas/Fas L se regroupent, amplifiant ainsi le signal apoptotique transmis à la cellule (Dash, 2004). Il

en résulte la formation du complexe DISC (Death Inducing Signalling Complex) qui comprend Fas trimérisé, la protéine adaptatrice FADD et la pro-caspase 8 (Figure 3.3) (Dash, 2004; Mollinedo and Gajate, 2006). L'auto-activation de la pro-caspase 8 par dimérisation et auto-protéolyse induit la libération dans le cytoplasme de la caspase 8 active qui amorce alors la cascade enzymatique apoptotique.

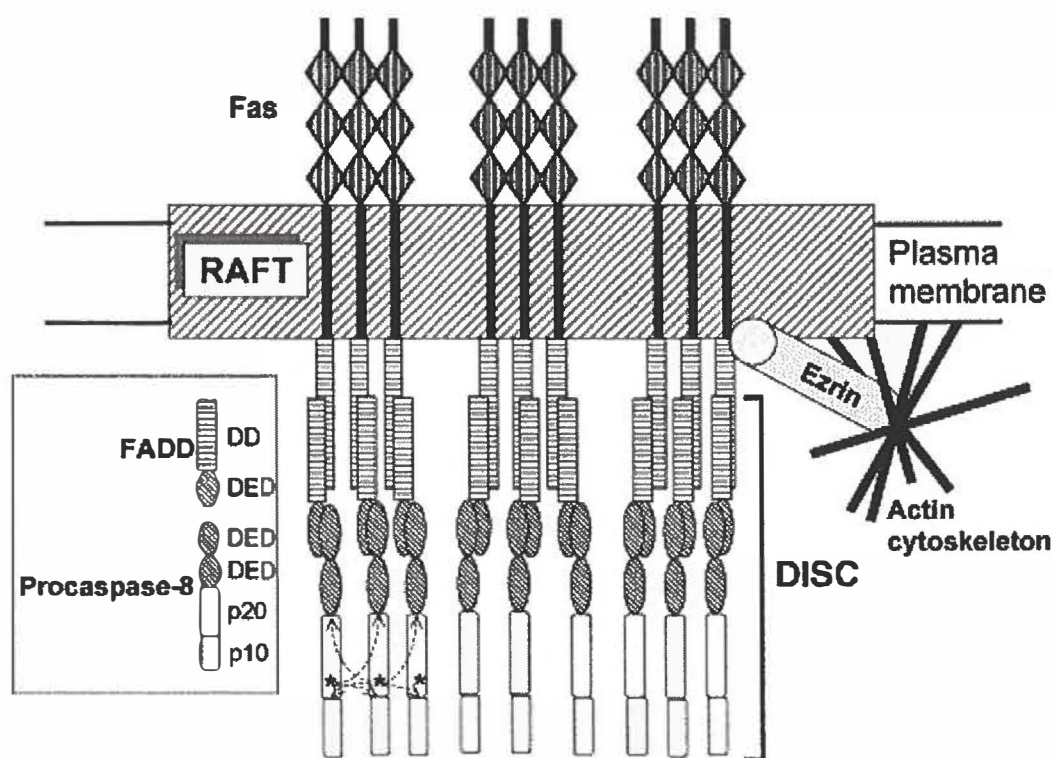


FIGURE 3.3 : Représentation de l'activation de Fas via son agrégation au sein des lipides rafts.

Les récepteurs Fas sont regroupés et concentrés dans les lipides rafts de manière à faciliter la formation des DISCs résultant de l'interaction Fas/FADD via leur domaine de mort (DD) respectif, et FADD/pro-caspase 8 via leur domaine effecteur de mort (DED). Le DISC mène à l'activation de la pro-caspase 8 par dimérisation et auto-protéolyse et à la libération de la caspase 8 active (hétérodimère de sous-unités p20/10) dans le cytoplasme. Les astérisques indiquent les sites cystéines actifs ; les flèches en pointillées montrent les sites protéolytiques. Les MFs sont impliqués, via l'ezrine, dans le regroupement de Fas au sein des lipides rafts.

Tiré de Mollinedo et Gajate (2006)

Fas L est surtout exprimé par les cellules immunitaires (ex : lymphocytes T activés) mais peut également l'être par d'autres types cellulaires. Les hépatocytes, par exemple, peuvent exprimer du Fas L dans certaines situations pathologiques telles que les cas d'hépatite auto-immune, d'accumulation de fer ou de cuivre et d'hépatotoxicité face à certaines drogues (Eichhorst, 2005; Minana et al., 2002; Ryan et al., 2006). Cette propriété leur confère la capacité d'induire l'apoptose selon des mécanismes auto- et paracrines (Figure 3.4). (Wajant, 2006)

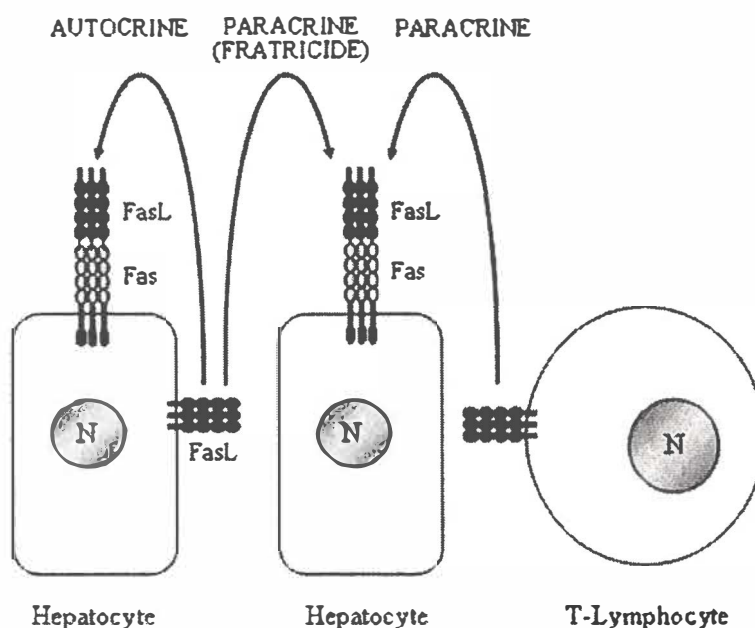


FIGURE 3.4 : Induction d'apoptose médiée par Fas par des mécanismes autocrines et paracrines. La mort cellulaire médiée par Fas peut être déclenchée par l'engagement de Fas avec son ligand exprimé par la même cellule (autocrine) ou des cellules différentes (paracrine).

Tiré de Wajant et al. (2006)

3.2.2 Fas et K8/18

Différentes études suggèrent que la K8 serait impliquée dans la résistance cellulaire à l'apoptose initiée via les récepteurs de la famille des TNF-R (Oshima, 2002). L'utilisation de modèles déficients en K8 révèle en effet une susceptibilité plus importante des hépatocytes à la mort cellulaire induite par Fas. Les travaux de Gilbert et al. (2001) ont montré que l'absence de K8 au sein des hépatocytes provoquait une

translocation de Fas à la membrane, et ce, sans modification d'expression de ce récepteur. Ces résultats suggèrent que les K8/18 pourraient intervenir dans la régulation de l'apoptose médiée par Fas/Fas L en agissant sur un des principes de sa régulation : la compartimentation cellulaire du récepteur (Wajant, 2006). En modulant la densité membranaire de Fas, la K8 limiteraient ainsi la sensibilité des hépatocytes à l'apoptose initiée via ce récepteur (Marceau et al., 2007).

Les études réalisées sur l'apoptose et son lien éventuel avec les K8/18 laissent supposer que ces kératines constitueraient des facteurs potentiellement important dans la résistance des hépatocytes à l'apoptose. Les mécanismes par lesquels les K8/18 sont impliquées dans le processus d'apoptose demeurent néanmoins encore peu clairs.

3.1 Voie anti-apoptotique : PI3K/Akt

La régulation de l'apoptose repose sur l'expression de gènes codant pour les protéines de la famille Bcl-2. Ces protéines constituent une variété de molécules aux propriétés pouvant soit favoriser l'apoptose (pro-apoptotique) comme Bax et Bad, soit l'inhiber (anti-apoptotique) comme Bcl-2 et Bcl-X_L. Le devenir de mort ou de survie de la cellule repose sur l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques dans le milieu intracellulaire. Cette balance est elle-même régulée par d'autres acteurs moléculaires au centre desquels on retrouve la protéine kinase Akt.

Akt, également appelée PKB, est une protéine sérine/thréonine kinase appartenant à la superfamille de protéines kinases AGC dépendantes de l'AMPc. La protéine Akt existe sous trois isoformes codés par des gènes distincts localisés sur différents chromosomes. Elle constitue une kinase qui joue un rôle central dans la signalisation impliquée dans la survie de la cellule (Datta et al., 1999; Song et al., 2005).

La protéine Akt sous sa forme inactive se localise dans le cytoplasme. Son activation fait intervenir une cascade initiée au niveau de la membrane plasmique par la liaison de facteurs de croissance à leur récepteur spécifique (couplé à la protéine G). Cette

interaction conduit à l'activation de la PI3K (Phosphatidyl Inositol-3-kinase) qui, à partir du phospholipide membranaire PIP₂ (Phosphatidyl Inositol 3, 4 diphosphate) génère du PIP₃ (Phosphatidyl Inositol 3, 4, 5 triphosphate). Le PIP₃ est un second messenger membranaire qui a une haute affinité pour le domaine amino-terminal (PH : pleckstrin homology) de la protéine Akt (Figure 3.5 A).

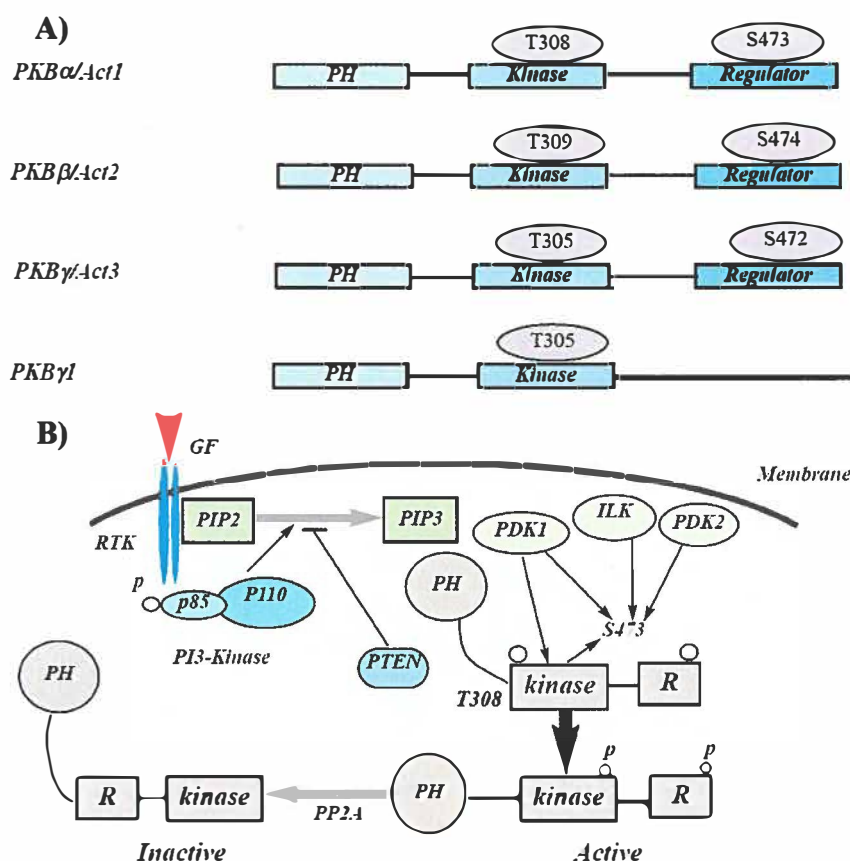


FIGURE 3.5 : Structure et Activation de la protéine Akt :

A) Structure en domaines des différents isoformes de la protéine Akt humaine et leurs deux principaux sites de phosphorylation. On note un domaine amino-terminal PH (pleckstrin homology), un domaine central kinase et un domaine carboxy-terminal régulateur contenant un motif hydrophobe caractéristique des kinases AGC. PKBγ1 est une variante de l'épissage de Akt3. **B) Mécanismes d'activation de Akt :** GF, growth factor ; RTK, récepteur tyrosine kinase ; R, régulateur.

Tiré de Song et al. (2005)

Le PIP₃ permet, grâce à cette affinité, le recrutement de la protéine Akt au niveau de la membrane où elle pourra être activée via différentes kinases telles que la PDK-1 (Phospho-inositide-Dependent kinase-1) (Figure 3.5 B). (Datta et al., 1999; Song et al., 2005; West et al., 2002)

La régulation de l'activité de la protéine Akt repose sur la phosphorylation de deux sites majeurs: une thréonine au sein du domaine kinase et une sérine localisée dans la portion régulatrice de la protéine (Figure 3.4.A). Dans le cas de l'isoforme Akt1 (Akt), il s'agit de la thréonine 308 (Akt_{thr308}) dont la phosphorylation seule active partiellement la protéine, et de la sérine 473 (Akt_{ser473}) qui, lorsque phosphorylée individuellement n'a qu'un faible impact sur l'activité de Akt. La pleine activation de la protéine Akt requiert la phosphorylation de ces deux sites (Song et al., 2005).

La conséquence de l'activation de la protéine Akt est la promotion de la survie cellulaire qui passe, en grande partie, par l'inhibition de l'apoptose (Figure 3.5). Akt active peut ainsi bloquer la mort cellulaire en agissant directement sur des protéines pro-apoptotiques telles que Bad (Figure 3.6). En effet, la phosphorylation de Bad par Akt entraîne sa séquestration dans le cytoplasme via son interaction avec les protéines 14-3-3, l'empêchant de cette manière de promouvoir l'apoptose (Rosenquist, 2003). Les protéines de la famille Forkhead (FKHR/FoxO1, FoxO2, FKHL1/FoxO3 et AFX/Fox4) (Song et al., 2005), facteurs de transcription impliqués dans l'expression de plusieurs gènes, constituent également un substrat de Akt activée (Figure 3.6). La phosphorylation des protéines FKHR et FKHL1 (Datta et al., 1999) induit leur interaction, là encore, avec les protéines 14-3-3, qui empêche leur translocation nucléaire. Akt agit ainsi sur la régulation de la localisation subcellulaire de ces facteurs de transcription en les séquestrant dans le cytoplasme de sorte qu'ils ne puissent agir sur la transcription de leurs gènes-cibles parmi lesquels on retrouve celui de Fas L (Datta et al., 1999; Song et al., 2005; West et al., 2002).

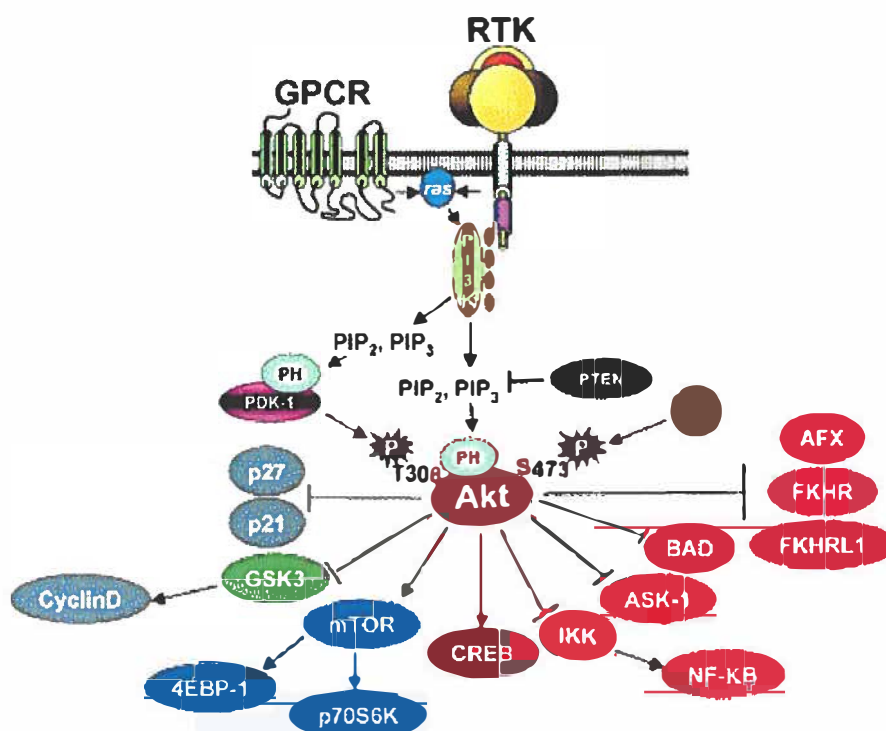


FIGURE 3.6 : Vue d'ensemble de la voie PI3K/Akt.

PI3K/Akt peut être activée des récepteurs tyrosine kinase (RTK), la protéine Ras activée, l'activation de récepteurs couplés à la protéine G ou l'inactivation du suppresseur de tumeur PTEN. Les produits PI3K, PIP₂ et PIP₃ stimulent la phosphorylation et l'activation de Akt. Une fois activée, Akt peut contrôler les processus-clés en phosphorylant des substrats impliqués dans l'apoptose (en rouge), synthèse de protéines (en bleu), le métabolisme (en vert) et le cycle cellulaire (en gris). Les flèches indiquent la stimulation de substrats en aval tandis que les lignes perpendiculaires indiquent l'inhibition.

Tiré de West et al. (2002)

Plusieurs études ont montré que les kératines interagissent avec les protéines 14-3-3 intervenant ainsi dans les voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire (Ku et al., 2002; Ku et al., 1998b; Reichelt and Magin, 2002). Ku et al. ont en effet montré que la phosphorylation de la K18 S33 interviendrait dans la liaison de la K18 aux protéines 14-3-3 (Ku et al., 1998b). Or, tel que précédemment mentionné, la fonction de survie cellulaire de la protéine Akt s'effectue également via les protéines 14-3-3. Ceci démontre la possibilité d'une collaboration entre les kératines et la voie de signalisation PI3K/Akt. De plus, les travaux de Kim et al. (2006) appuient la possibilité d'un lien plus étroit entre les kératines et la signalisation de Akt. Réalisés à partir de kératinocytes, ces

travaux démontrent le rôle de la K17 dans la croissance cellulaire et la réparation tissulaire après dommage de l'épiderme via son interaction avec la protéine 14-3-3 σ . Ces études suggèrent une relation entre les kératines et la signalisation de la protéine Akt pour la survie cellulaire (Kim et al., 2006). De récentes études également réalisées à partir de kératinocytes, montrent que la protéine Akt phosphorylée interagit avec les K10 et la K16 qui modulent ainsi le cycle cellulaire (Paramio et al., 2001). On suppose alors l'interaction de Akt et d'autres kératines possible.

Le rôle de promotion de la survie cellulaire de Akt et celui de cytoprotection des kératines visent, l'un comme l'autre à maintenir en vie la cellule. Le nombre croissant d'études reliant la protéine Akt aux kératines soulève la possibilité que leurs fonctions respectives pourraient être liées l'une à l'autre. Dans le but de mieux cerner l'implication des K8/18 dans la réponse cellulaire au stress, nous pensons qu'il serait intéressant d'explorer si leur rôle cytoprotecteur aurait une relation quelconque avec la protéine Akt.

CHAPITRE IV

PROJET DE RECHERCHE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les études portant sur les K8/18 et leurs fonctions cellulaires ont montré le rôle qu'elles occupent au sein des hépatocytes dans la protection du foie contre différents stress, toxiques ou mécaniques (Bauman et al., 1994). Certaines de ces études ont suggéré que la régulation de la phosphorylation des kératines est impliquée dans l'exercice de la fonction protectrice des K8/18 (Omary et al., 2006). Les K8/18 semblent également participer à la régulation du processus apoptotique, bien que l'on ne sache exactement par quels mécanismes elles interviendraient (Marceau et al., 2007).

Les travaux réalisés antérieurement dans notre laboratoire indiquent qu'il pourrait y avoir un lien entre la phosphorylation de la K8 S79, chez la souris, et la protection des hépatocytes contre la mort cellulaire par apoptose (Fausther et al., 2004). Suite au traitement de souris C3H à la GF, il a été observé une hyperphosphorylation de la K8 S79 au sein d'hépatocytes entourant une cellule en apoptose. D'après ces travaux, la cellule décrite comme étant en apoptose ne porte pas de K8 S79 phosphorylée (K8 pS79). Ces observations nous ont amené à supposer que l'émission d'un signal par la cellule mourante vers les cellules adjacentes entraînerait la phosphorylation de la K8 S79, résultant en la protection de ces cellules contre le processus d'apoptose. L'hypothèse que nous posons suite à cette étude est que la phosphorylation des K8/18 en réponse à un stress toxique constituerait un facteur clé dans la protection des hépatocytes contre le processus d'apoptose. Ceci a conduit aux problématiques suivantes : la formation d'agrégats comme les CMs observés dans les cas d'hépatite alcoolique affecte-t-elle la fonction cytoprotectrice des K8/18? Cette réorganisation des K8/18 ainsi que leur phosphorylation sont-elles en lien avec l'apoptose induite par ce type de stress? Le présent projet de recherche consiste à préciser le rôle des K8/18 et de sa phosphorylation dans la réponse d'hépatocytes soumis à un stress toxique et plus particulièrement dans le processus d'apoptose qui en résulte.

Afin de répondre à ces interrogations, nous nous sommes fixés trois principaux objectifs. Le premier objectif de cette étude a consisté en la mise au point d'un modèle *in vitro* au sein duquel il serait possible d'induire un stress toxique comparable à celui provoqué *in vivo* par la GF. Les travaux antérieurs réalisés à partir de modèles animaux nous ayant permis de cibler la K8 comme un acteur potentiellement important dans la réponse des hépatocytes à un stress toxique, l'utilisation d'un modèle *in vitro* nous apparaît pertinente pour préciser les mécanismes moléculaires par lesquels la K8 interviendrait. L'induction d'un stress toxique au sein de cellules en culture nous a donc permis d'analyser l'impact de ce type de stress sur le réseau de K8/18 d'un point de vue morphologique et fonctionnel. Le deuxième objectif de cette étude a été de mesurer l'effet du stress induit par la GF sur le processus d'apoptose. Certaines études tendent à associer la K8 à l'apoptose médiée par la voie Fas/Fas L (Gilbert et al., 2001). Nous avons donc exploré, d'une part, l'implication de cette voie de signalisation dans l'apoptose induite par le traitement à la GF ; et, d'autre part, la possibilité d'interactions entre la K8 et le récepteur Fas. Enfin, le troisième objectif de ces travaux a été de déterminer l'implication de la voie PI3K/Akt dans la réponse cellulaire à la présence de GF et son interaction potentielle avec les K8/18.

CHAPITRE V

MÉTHODOLOGIE

5.1 Modèle d'étude : Cellules HepG2

Les lignées cellulaires d'hépatocytes constituent des modèles d'étude couramment utilisés dans le cadre d'étude portant sur différents aspects du foie (physiologiques ou pathologiques). Il en existe plusieurs d'origine humaine comme les cellules HepG2, Huh7 ou encore HepB3 toutes issues d'hépatocarcinomes. Les cellules HepG2, isolées en 1979 d'un cancer hépatocellulaire, sont aujourd'hui bien caractérisées et couramment utilisées, particulièrement dans le cadre d'étude sur l'hépatotoxicité de diverses drogues (Vermeir et al., 2005). Les travaux de Nakamichi et al. ont suggéré que leur exposition à la GF peut y induire la formation d'amas de kératines (Nakamichi et al., 2002). Ce sont donc les cellules que nous avons choisi d'utiliser comme modèle *in vitro* pour nos travaux.

5.1.1 Cellules HepG2

Les cellules HepG2 (ATCC, American Type Culture Collection) ont été maintenues en culture selon les directives du fournisseur. Les cellules ont donc été cultivées dans du RPMI-1640 contenant 10% de FBS (Fetal Bovin Serum) qui constitue un apport en facteurs de croissance nécessaire à la prolifération cellulaire. De la gentamycine à 50µg/mL a été ajoutée dans des proportions de 50µg/100mL de milieu de culture afin de limiter le risque de contamination bactérienne. La croissance cellulaire s'effectue à 37°C sous une atmosphère enrichie à 5% de CO₂ (dioxyde de carbone). Selon la quantité de cellules initialement mises en culture et la surface du support utilisé, le temps d'incubation pour atteindre une confluence de 65 à 85% varie entre 24 et 72 heures.

5.1.2 Traitement : exposition à la Griséofulvine

La grisofulvine (GF) représente l'un des agents toxiques les plus utilisés sur des modèles animaux dans le cadre d'études sur la formation des CMs. Les travaux de Nakamichi et al. (2002) ont montré que l'exposition continue à la GF pouvait induire au sein de cellules HepG2 la formation d'agrégats cytoplasmiques de K8/18 qui contiennent également de l'ubiquitine et peuvent ressembler aux CMs. Ces résultats laissent supposer que les cellules HepG2 traitées à la GF pourraient constituer un modèle *in vitro* pour l'étude de la formation des CMs.

5.1.3 Griséofulvine

La GF est un agent chimique initialement isolé du mycète *Penicillium griseofulvum* en 1939 par Oxford et al. ; elle est également produite par d'autres espèces de *Penicillium*. C'est un antifongique couramment utilisé dans le traitement d'affections à dermatophytes, champignons causant des maladies dermatologiques chez les mammifères (*Epidermiphyton*, *Trichophyton* et *Microsporum*) (Develoux, 2001).

Les propriétés fungistatiques de la GF reposent en partie sur sa capacité à interrompre le processus de mitose en cours de métaphase (Develoux, 2001). La GF a un effet déstabilisateur sur les MTs, principaux constituants du fuseau mitotique (Mir et al., 1978). Plusieurs études *in vitro* ont été réalisées sur l'action potentielle de la GF dans les cellules de mammifères. Il apparaît que selon le type de cellules, la GF déstabilise le réseau de MTs soit en affectant leur dynamique par interruption de leur polymérisation soit en s'y liant de manière à en affecter l'organisation. La GF bloque ainsi le cycle cellulaire en phase G2/M des cellules tumorales humaines (Panda et al., 2005).

Encore appelé (2*S*, 6'*R*)-7-chloro-2', 4, 6-trimethoxy-6'-methyl-3*H*, 4'*H*-spiro[1-benzofuran-2, 1'-cyclohex[2]ene]-3, 4'-dione, sa formule est C₁₇H₁₇ClO₆ et sa structure chimique est illustrée dans la figure 4.1. Son poids moléculaire est de 352,8. La GF se présente sous la forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau pouvant néanmoins se

dissoudre dans des solvants tels que le méthanol, l'éthanol ou le diméthylformamide (Develoux, 2001). Pour les besoins de nos travaux, la GF a été solubilisée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

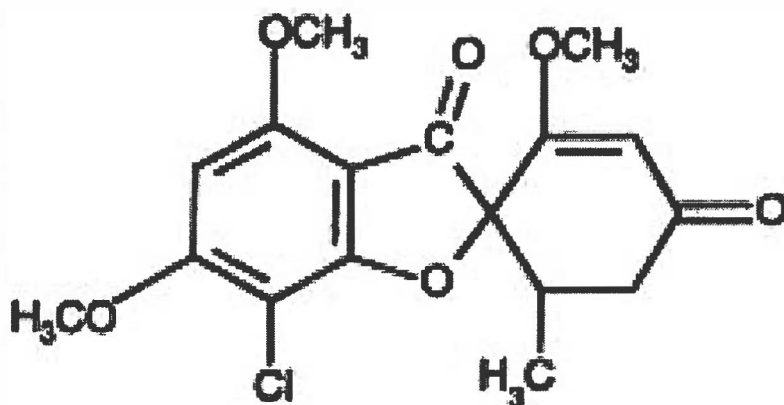


FIGURE 4.1 : Structure chimique de la Griséofulvine
Tiré de Develoux (2001)

5.1.4 DMSO

Le DMSO est un composé organique transparent, sans couleur ni odeur dont la toxicité est relativement faible. Sa formule chimique est $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (Figure 4.2). C'est un agent chimique dont les propriétés physicochimiques variées justifient sa large utilisation dans le domaine des sciences fondamentales.

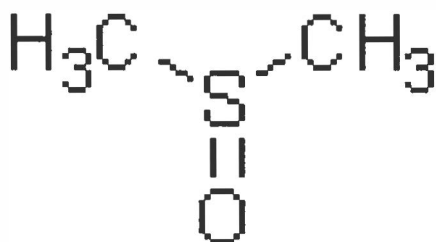


FIGURE 4.2 : Formule semi-développée du DMSO
Tiré de Yu et al. (1994)

Tel que nous l'indique sa structure chimique (Figure 4.2), le DMSO est une petite molécule amphiphile dont le poids moléculaire est de 78,13 g/mole. Son caractère hydrophile/hydrophobe et sa taille lui confèrent la capacité de pénétrer les membranes biologiques (bicouche lipidique) sans affecter les structures cellulaires internes (milieu aqueux). En tant que solvant, le DMSO présente l'avantage d'augmenter la perméabilité membranaire de certains composés dont les propriétés physico-chimiques rendent les échanges entre les milieux intra- et extracellulaires difficiles. Pour nos travaux, la solubilisation de la GF dans du DMSO nous a semblé des plus appropriées d'autant que la cytotoxicité de ce solvant est limitée à de faibles doses.

5.1.5 Traitement à la GF

Les HepG2 confluentes à 65-70% ont été exposées à 0.07mg/mL de GF pendant 6, 24, 48 et 72h (notées GF). La GF (Schering Corp., Kenilworth, NJ) en solution dans du DMSO (Sigma) à 0.07g/mL a en effet été ajouté au milieu de culture cellulaire dans des proportions de 1 :1000. Des cellules contrôles (notées DMSO) ont parallèlement été mises en culture en présence de milieu contenant du DMSO (1 :1000) dans des conditions semblables aux traitements à la GF. Des cellules exemptes de tout traitement (notées CTL) font également office de contrôle et permettent d'évaluer l'état initial des HepG2 au moment des différents traitements.

5.2 Méthodes d'analyse

Les analyses effectuées dans le but de répondre aux objectifs de cette étude ont été faites à partir de plusieurs techniques de biologies cellulaire et moléculaire, à savoir la microscopie à fluorescence, l'immunobuvardage de type western et le RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Reaction Chain).

5.2.1 Anticorps primaires utilisés

Les analyses des différentes protéines ciblées par notre étude se sont en grande partie effectuées via l'utilisation d'anticorps primaires qui leur sont spécifiques. Ces derniers sont répertoriés dans le tableau 4.1 avec les dilutions correspondant à chacune des applications pour lesquelles ils ont été utilisés (microscopie à fluorescence et immunobuvardage de type western).

TABLEAU 4.1
Liste des anticorps primaires utilisés

Protéines marquées	Anticorps primaires spécifiques	Références	Dilutions		Fournisseurs
			Microscopie à fluorescence	Western Blot	
Kératines:					
K8 totale	Troma I _{Rat}	(Boller et al., 1987)	1 : 2	1 :1500	Laboratoire Cadrin M.
K18 totale	L2A1 _{Souris}	(Chou and Omary, 1991)	-	1 :3000	cadeau de Bishr M. Omary*
K8 pS73	LJ4 _{Souris}	(Liao et al., 1997)	1 :100	1 :1000	cadeau de Bishr M. Omary*
K8 pS431	5B3 _{Souris}	(Ku and Omary, 1997)	1 :100	1:15000	cadeau de Bishr M. Omary*
Récepteur Fas:					
Fas	C20 _{Lapin}	(Kamitani et al., 1997)	1 :100	1 :1000	Santa Cruz Biotechnology
Protéine Akt :					
Akt totale	Clone13 _{Souris}	(Ballou et al., 2000; Hyduk and Cybulsky, 2002)	1 :50	1 :1000	BD Biosciences Cell Signaling
pAkt _{thr308}	9275 _{Lapin}		1 :50	1 :1500	
Autres :					
β -tubuline	TUB2.1 _{Souris}	(Wolff et al., 1988)	1 :100	1 :1000	Sigma Aldrich
Caspase 3 clivée	9661 _{Lapin}	(Hu et al., 2000)	-	1 :1000	Cell Singnaling
GAPDH	6C5 _{Souris}	(Sumner et al., 2003)	-	1 :50000	Abcam

* Département de médecine, Centre médical VA Palo Alto et École de Médecine de l'Université de Stanford, Palo Alto, CA

5.2.2 Microscopie à fluorescence

Pour les analyses microscopiques, les cellules ont été mises en culture sur des lamelles et traitées dans des plaques de six puits. Un nombre approximatif de 800 000 cellules ont été cultivées 24h avant d'être traitées ; leur confluence étant alors de 65-70%. Après chaque temps de traitement (0h (CTL), 6h, 24h, 48h et 72h) les cellules ont été, dans la plupart des cas, fixées 10 min dans de la paraformaldéhyde à 4% dans du PBS 1X (Phosphate Buffered Saline ; 137mM NaCl, 2.68mM KCl, 4.69mM Na₂PO₄, 1.47mM KH₂PO₄ à pH 7.2). La méthode de fixation est quelque peu différente pour les cellules destinées à l'observation des MTs, ces derniers étant labiles. Dans ce cas précis les HepG2 ont été fixées 5 min dans de la formaline diluée 1 :10 (Sigma) dans du PEM (PIPES 100mM, EDTA 5mM, MgCl₂ 2mM) contenant 0.2% de Triton-X100 (Sigma). Cette étape de fixation est suivie d'une post-fixation de 5 min au méthanol froid (-20°C) (U.Vielkind et S.H. Swierenga, 1989).

Les cellules traitées et fixées selon le protocole ont été immuno-marquées afin de permettre la visualisation en microscopie à fluorescence des protéines suivantes : les éléments du cytosquelette (K8 et MTs), les composantes phosphorylées de la K8 (K8 pS73 et K8 pS431) et de la protéine Akt phosphorylée sur la thréonine 308 (pAkt), et le récepteur Fas (Tableau 4.1). Les cellules fixées ont été incubées entre 45 min et 1h à température pièce en présence de l'anticorps primaire (Tableau 4.1); l'anti-pAkt nécessite cependant une incubation d'environ 24h à 4°C. Après 3 lavages successifs de 5 min sous agitation dans du PBS 1X afin de retirer l'excédant d'anticorps primaires, les anticorps secondaires ont ensuite été mis en présence des cellules (Tableau 4.2). Le temps d'incubation avec les anticorps secondaires est de 30 min à température pièce. Pour chacun des marquages effectués, l'ADN a été marqué avec du Hoechst 33342 (Hoechst) (Sigma). Ainsi, après 3 lavages successifs dans du PBS 1X, les cellules ont été incubées avec le Hoechst dilué 1 : 10000 durant 20 à 30 min. Les cellules marquées ont été montées sur lame, par inversion, sur du milieu composé de P-Phénylène diamine 0,1% contenant du glycérol (1 :2) (Sigma) destiné à en conserver la fluorescence.

Les anticorps secondaires utilisés sont des anti-isotypes d'espèces (IgG_{Ane}) conjugués à un fluorophore (Jackson Laboratories); à savoir la rhodamine (TRITC) ou la fluorescéine (FITC). Ils sont répertoriés dans le tableau 4.2 où sont également indiqués, entre parenthèses, les anticorps primaires contre lesquels ils sont dirigés.

TABLEAU 4.2
Applications des différents anticorps secondaires utilisés
(Jackson laboratories sauf exception*)

	Microscopie à fluorescence			Immunobuvardage de type Western
	<i>TRITC</i>	<i>FITC</i>	<i>Alexa 488*</i>	<i>Perocydase</i>
anti-Souris	#715-025-151 (LJ ₄ , 5B3)	#715-095-151 (LJ ₄ , 5B3, TUB2.1)	-	#715-035-151 (LJ ₄ , 5B3, L2A1)
anti-Rat	#715-025-153 (Troma 1)	-	-	#712-035153 (Troma 1)
anti-Lapin	-	-	#A21206 (C-20, 9275)	#711-035-152 (C-20, 9275)

*Anticorps provenant de Molecular Probes

Les anticorps primaires contre lesquels ils sont dirigés sont entre parenthèses.

En plus de l'observation classique entre lames et lamelles de nos cellules, nous avons procédé à un décompte de cellules en apoptose. Le marquage des cellules avec le Hoechst a permis l'identification des cellules apoptotiques selon l'aspect de leur chromatine marquée à l'aide de ce fluorophore (Allen et al., 2001). Les cellules apoptotiques sont caractérisées par une chromatine condensée souvent fragmentée en granules définis. Pour les besoins de cette technique, les cellules ont été cultivées directement dans des plaques de 6 puits (sans lamelles) et traitées selon les conditions précédemment décrites. Les cellules ont été récupérées par trypsinisation et rincées au PBS 1X avant d'être simultanément fixées et marquées en suspension dans une solution de PBS 1X contenant 0.2% de TritonX-100, 2% de formaline et du Hoechst dans des proportions de 1 :10000. Les cellules flottantes du milieu de culture ont également été récupérées et incluses dans le décompte.

Les cellules ont été visualisées au microscope à fluorescence (Olympus, Capsen Group Inc.) et photographiées par une caméra numérique (CoolSNAP-Pro_{cf} Monochrome, Media Cybernetics).

5.2.3 Immunobuvardage de type Western (Western Blot)

Les cellules destinées aux analyses biochimiques ont été mises en culture dans des pétris (100x15mm). Les HepG2 sont cultivées environ 24h de manière à atteindre une confluence de 65-70%. Elles ont ensuite été mises en présence de DMSO et de GF selon le protocole précédemment défini. Après traitement, les cellules ont été détachées de leur pétri par «scrapping», récupérées dans du PBS 1X froid (4°C) et lysées dans une solution contenant 2,3% de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), 50 mM de NaF (fluorure de sodium), 10 mM de EDTA (éthylène-diamine-tétraacétique), 1 mM de pyrophosphate de sodium, 1 mM de DTT (dithiothreitol), 1 mM de PMSF (phénylméthylsulfonylfluorure) et un inhibiteur complet de protéases (Roche). Les cellules lysées ont été homogénéisées à la seringue et dosées selon la méthode de Lowry modifiée pour la présence de SDS afin de déterminer la concentration en protéines (Harrington, 1990).

Les protéines ainsi obtenues ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE (30µg de protéines /puits). Les gels de protéines ont, soit été colorés au bleu de Coomassie, soit été transférés sur membrane de nitrocellulose (Biorad Laboratories) pour les analyses d'immunobuvardage de type western. Ce type d'analyses requiert une étape préalable de blocage (ou saturation) des membranes de nitrocellulose contenant les protéines séparées. Cette étape assure la spécificité de la technique en limitant le bruit de fond causé par la fixation non spécifique des anticorps primaires à la membrane. Selon l'anticorps primaire ultérieurement utilisé, les membranes ont été incubées 1h à température pièce ou 24h à 4°C dans du PBS 1X ou du TBS 1X (Tris buffered saline; 137mM NaCl, 20mM TrisHCl à pH 7.2) contenant 2% de lait en poudre exempt de matières grasses ou encore 5% de BSA (Bovine serum Albumin). Tandis que l'utilisation de PBS 1X à 2% de lait constitue les conditions standar de blocage pour la plupart de

nos anticorps primaires, l'usage de TBS 1X à 2% de lait et de PBS 1X à 5% de BSA s'applique respectivement pour les anticorps anti-Fas et anti-pAkt.

Les membranes bloquées ont été, après 3 lavages successifs de 5 min dans du PBS-T ou TBS-T (PBS ou TBS 1X contenant 0,05 à 0,2% de Tween 20 (Fisher scientific)), incubées à température pièce entre 45 min et 1h avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS ou TBS-lait à 2%. Elle a ensuite été incubée 45 min à température pièce en présence de l'anticorps secondaire, un anti-IgG spécifique de l'espèce source de l'anticorps primaire conjugué à de la peroxydase (Tableau 4.1). Après 3 lavages successifs, la membrane a été mise au contact d'une solution de surper ECL contenant du peroxyde et du luminol (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit de Pierce). Les bandes de protéines marquées ont été visualisées par chimiluminescence et photographiées par une caméra numérique (UVP, Inc. Upland, CA). Les analyses densitométriques ont été effectuées via un logiciel informatique à partir des photographies de membranes (Quantity One, Biorad Laboratories). La GAPDH (Glycéaldéhyde-3-phosphate) utilisée comme contrôle endogène pour chacune des membranes marquées permet de normaliser les analyses densitométriques pour en faciliter l'interprétation.

5.2.4 RT-PCR

Pour les besoins de nos analyses RT-PCR, les HepG2 sont cultivées directement dans des plaques de 6 puits (35x10mm). Après 24h de croissance cellulaire, pour une quantité initiale d'un million de cellules par puits, les cellules ont été traitées avec du DMSO et avec de la GF à 0.07µg/mL durant 24, 48 et 72 heures. Après traitement, les cellules sont extraites dans du TRIzol (Invitrogen) afin d'en isoler les ARN totaux selon le protocole proposé par la compagnie Invitrogen. Pour la suite de nos manipulations, il est important que l'ARN utilisé ne soit pas endommagé par l'action de RNAses. L'électrophorèse d'échantillons d'ARN dénaturé (0.8 µg/puit) sur gel d'agarose-formaldéhyde 1,2% contenant du SYBR safe (Invitrogen) permet la séparation et la

visualisation des sous-unités 18S et 28S des ARN à partir desquelles il nous est possible de déterminer l'état de l'ARN.

Les ARN totaux ont été rétro transcrits en ADN complémentaire (ADNc) par la MMLV-R (Moloney Murine Leukemia Reverse Transcriptase) (Invitrogen) selon le protocole suggéré par la compagnie. Les ADNc correspondant aux gènes de Fas L et de la GAPDH (contrôle endogène) ont été sélectionnés à partir de l'ADNc total et amplifiés par PCR via l'utilisation d'amorces spécifiques (Fas L : Maxim Biotech. ; GAPDH : cadeau du Pr. Éric Asselin, département de chimie-biologie UQTR) dont les séquences sont les suivantes :

Fas L :

Anti-sens : 5' GGT TCT GGT TGC CTT GGT AGG AT 3' (GenBank # D38122)

Sens : 3' CAG AAA GCA GGA CAA TTC CAT AGG T 5' (GenBank # U08137)

GAPDH :

Anti-sens : 5' GTC TGG GAT GGA ATT GTG AG 3'

Sens : 3' AT AGT TTC CAC CTT CTT ACC 5'

Les profils de réactions des deux amorces sont indiqués dans la figure 5.1.

Les amplicons produits ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Du SYBR safe ajouté à l'agarose avant sa polymérisation a permis de visualiser les produits PCR sous UV (rayons ultra violets). Les bandes obtenues après révélation du gel ont été analysées par densitométrie.

5.2.5 Analyses statistiques

Le test statistique utilisé pour la validité de nos résultats est le test non paramétrique Anova appliqué via un logiciel de traitement de données statistiques (Prism 3.03, Graph Pad Inc.)

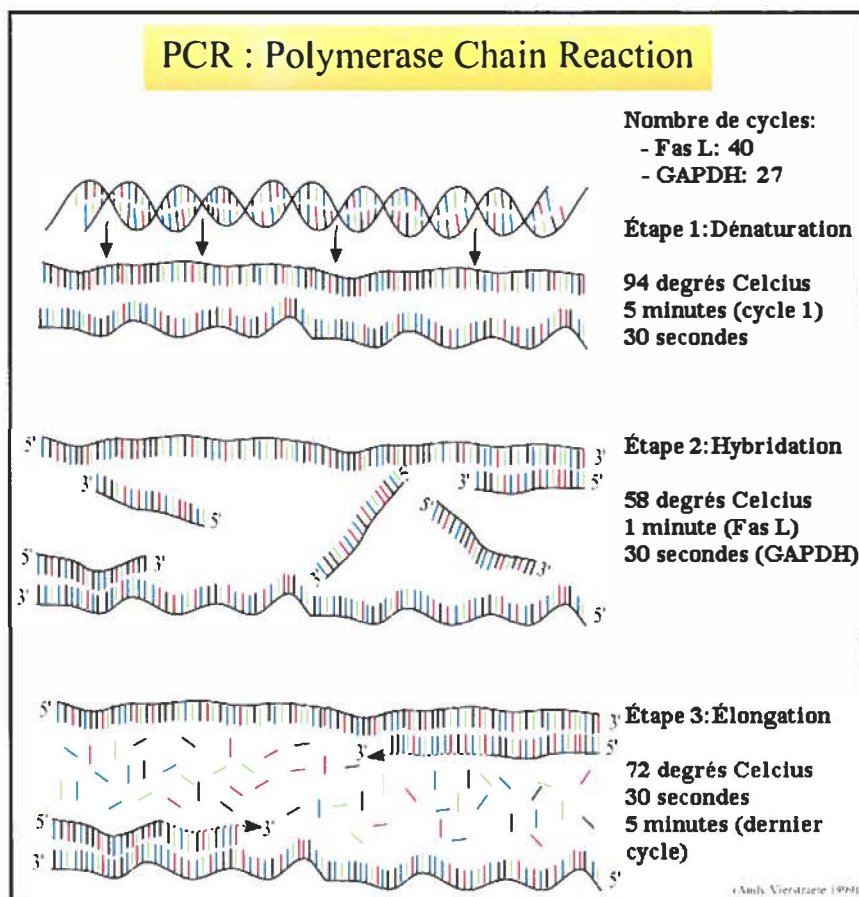


FIGURE 5.1 : Principales étapes du PCR et profils de réaction des amorces de Fas L et GAPDH. Les trois principales étapes du PCR sont la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces aux brins d'ADN et l'élongation par polymérisation grâce à la présence de dNTP (traits rouges, verts, noirs et bleus). Les profils de réaction des amorces spécifiques des séquences Fas L et GAPDH sont également indiqués.

Version originale tirée de (Vierstraete, 1999), adaptée par Ingrid Labouba.

CHAPITRE VI

RÉSULTATS DE L'ÉTUDE

6.1 Effets de la GF sur les FIs et les MTs des HepG2

La présente étude s'est, dans un premier temps, centrée sur l'effet d'une exposition continue de cellules HepG2 à la GF. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux modifications de l'organisation et du niveau de phosphorylation des kératines suite au traitement.

6.1.1 Organisation de la FIs et des MTs

Les effets de la GF sur l'organisation du cytosquelette ont été déterminés suite à l'observation par microscopie à fluorescence des kératines et des MTs des cellules HepG2 avant et après traitement au DMSO et à la GF. Les K8/18 étant étroitement liées au sein de la cellule, seule la K8 est représentée pour illustrer le réseau de K8/18. La K18 a néanmoins également été visualisée.

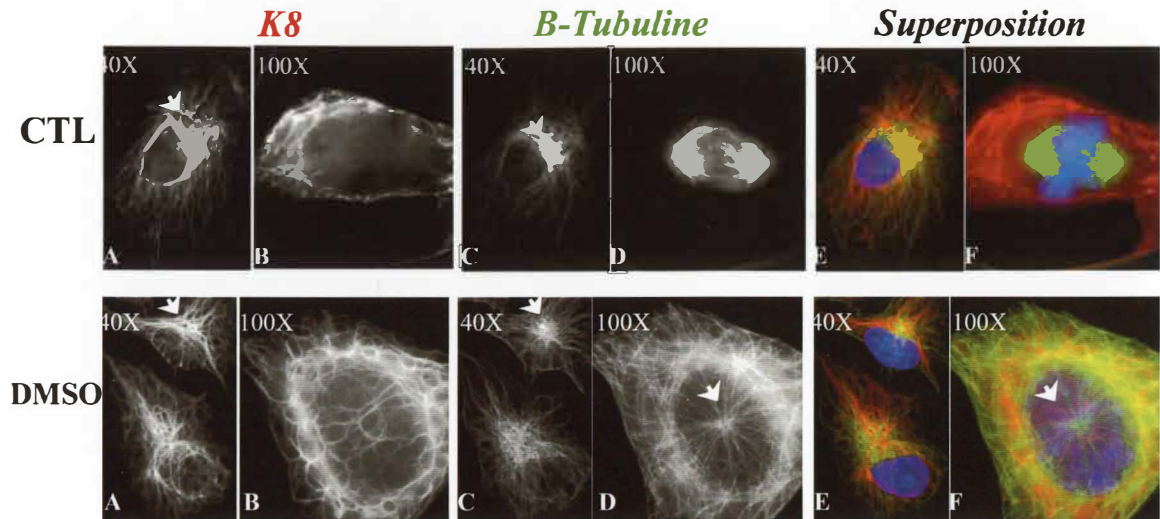
Avant traitement à la GF les cellules en interphase, au noyau ovoïde et à la chromatine décondensée, possèdent des réseaux de FIs et de MTs bien visibles. Le réseau de K8/18, dense autour du noyau, s'étend à travers le cytoplasme jusqu'à la membrane plasmique (Figure 6.1 CTL.A, E et DMSO A-B, E-F). Les MTs, également étendus dans le cytoplasme, irradiant du centrosome à partir duquel ils forment un réseau distinct (Figure 6.1 CTL.C, E et DMSO.C-F). Dans les cellules en mitose, on peut observer la réorganisation des MTs qui forment le fuseau mitotique indispensable à la ségrégation des chromosomes dont on peut distinguer la forme dans certains cas (Figure 6.1 CTL.D, F). Les K8/18, sont, quant à elles, distribuées à proximité de la membrane plasmique où elles forment un réseau filamenteux (Figure 6.1 CTL.B, F). L'exposition continue des HepG2 au DMSO ne semble pas affecter l'organisation des FIs et des MTs. On ne note en effet aucun changement important au sein de l'une ou l'autre de ces fibres.

Le traitement à la GF semble affecter l'organisation des réseaux de FIs au sein des cellules HepG2 ; et ce dès 24h de traitement. On observe, en effet, une agrégation progressive des K8/18. Dans les premiers temps de traitement, les K8/18 tendent à se rétracter en périphérie de la cellule et finissent par former des amas de plus en plus denses à mesure que la durée d'exposition à la GF augmente (Figure 6.1 24h.A-C, G-I et 48h.A-C, G-I). Ainsi, après 24 et 48h de traitement, on peut observer l'apparition d'amas de K8/18 enchevêtrées (Figure 6.1 24h.A-C, G-I et 48h.C, I). Les photographies 24h.B, H de la figure 6.1 montrent une importante agrégation des K8/18 illustrant ainsi l'effet précoce du traitement à la GF sur l'organisation des FIs des HepG2. Suite au traitement à plus long terme (72h), les amas de K8/18, filamenteux en début de traitement, tendent à devenir des granules denses et amorphes (Figure 6.1, 72h.A, D, J, L). On note néanmoins que plusieurs cellules possèdent un réseau de FIs encore intact (Figure 6.1 48h.B, H et 72h.A, I).

Après traitement à la GF, on observe la présence de nombreuses cellules qui semblent en mitose. Leur forme arrondie et le niveau de condensation de leur chromatine tendent à suggérer qu'elles sont, pour la plupart, en prométaphase (Figure 6.1 72h.K). La propriété anti-mitotique de la GF nous amène à déduire que ces cellules seraient bloquées en mitose plutôt qu'en cours de division cellulaire. On note au sein de ces cellules le réseau filamenteux des K8/18 tandis que celui des MTs est à peine visible voire absent (Figure 6.1 72h.C, G, K). Leur noyau de plus petite taille que dans les cellules en interphase contient une chromatine très condensée sans que l'on ne distingue, toutefois, la forme des chromosomes (Figure 6.1 72h.K). On peut également observer quelques cellules qui, d'après l'aspect fragmenté de leur chromatine, sont en cours d'apoptose (Figure 6.1 48h.H et 72h.J).

Les MTs, en réseau abondant bien défini dans les cellules CTL et DMSO, apparaissent endommagés, voire fragmentés après exposition des HepG2 à la GF (Figure 6.1 48h.C, F, I). Dans les cellules bloquées en mitose ils sont quasi-absents et ne persistent qu'à l'état de trace (Figure 6.1 72h.K).

HepG2 exemptes de traitement à la GF



HepG2 traitées à la GF

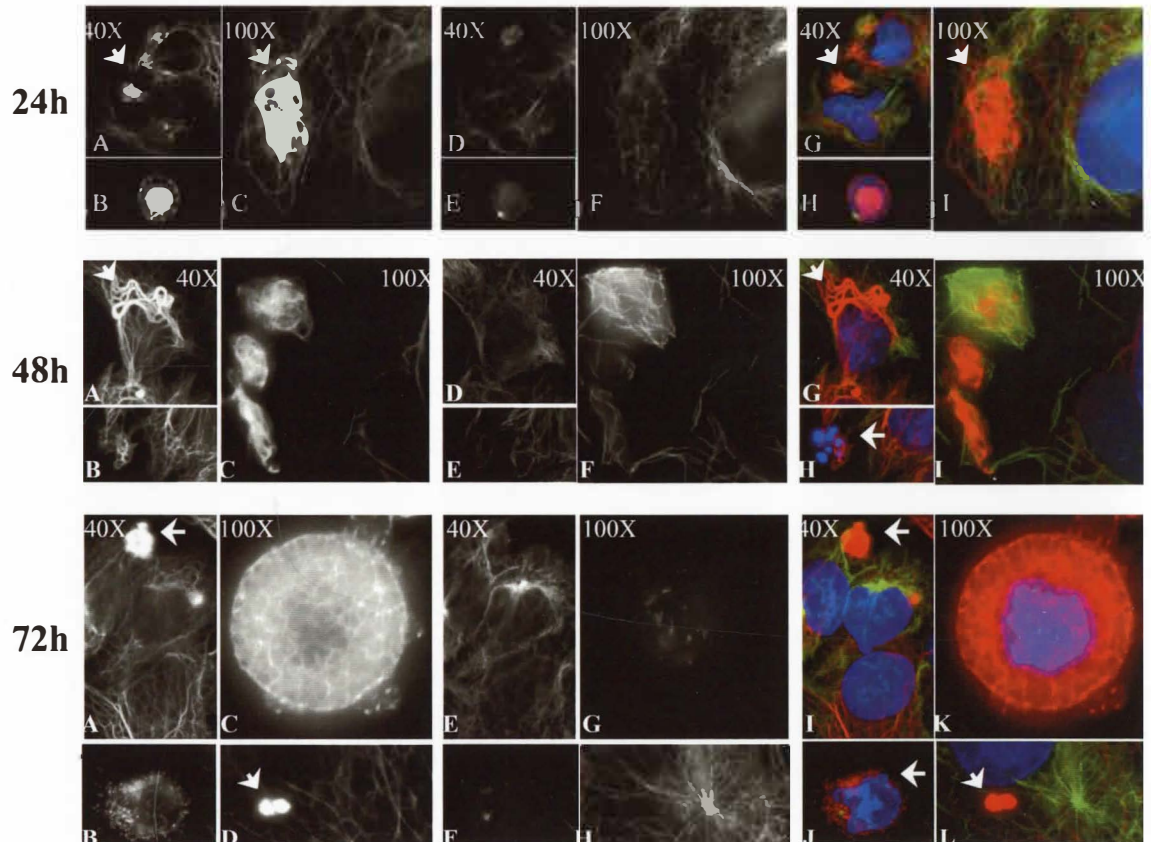


FIGURE 6.1 : Effets de la GF sur l'organisation du cytosquelette des HepG2 :
Description de la figure sur la page suivante.

FIGURE 6.1 : Effets de la GF sur l'organisation du cytosquelette des HepG2.

Les cellules HepG2 après traitement ont été extraites et fixées selon le protocole visant la conservation des MTs (cf. section 5.2.2). La K8 spécifiquement reconnue par Troma 1 est marquée au TRITC tandis que les MTs ciblés par TUB2.1 sont marqués au FITC. L'ADN nucléaire marqué avec le Hoechst apparaît en bleu sur les superpositions. Les photographies illustrent les HepG2 aux grossissements 40X et 100X.

CTL) Cellules exemptes de tout traitement. En A, la flèche pointe la région périnucléaire où le réseau de K8/18 apparaît plus dense dans les cellules en interphase. La structure pointée en C correspond au centrosome dans la même cellule que celle présentée en A.

DMSO) Cellules exposées au DMSO. En A, la flèche montre le réseau K8/18 plus dense autour du noyau dans une cellule en interphase ; en C, le centrosome est pointé au sein de la même cellule. Les structures pointées en D et en F correspondent au centrosome à plus fort grossissement.

24h) Cellules traitées 24h à la GF. Les flèches sur les photographies A, C, G et I indiquent les amas filamenteux de K8/18 induit par le traitement.

48h) Cellules traitées 48h à la GF. En A et en G, la structure pointée illustre la rétraction des K8/18 induite par le traitement à la GF. En H, la flèche montre une cellule en apoptose.

72h) Cellules traitées 72h à la GF. Des granules denses de K8/18 sont indiqués par des flèches en A, D, I et L. En J, la cellule pointée est en apoptose.

6.1.2 Niveaux d'expression des K8/18

Les analyses biochimiques des K8/18 ont été effectuées à partir de lysats de cellules HepG2 CTL et traitées au DMSO ou à la GF pendant 6, 24, 48 et 72 heures.

A)

Niveaux d'expression de K8/18

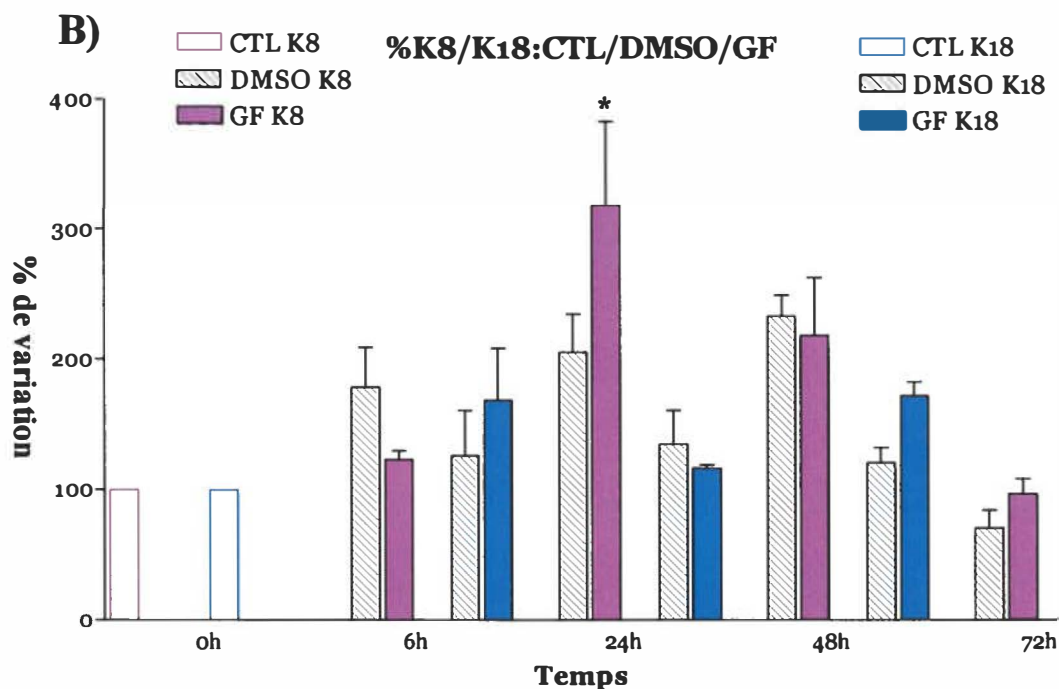
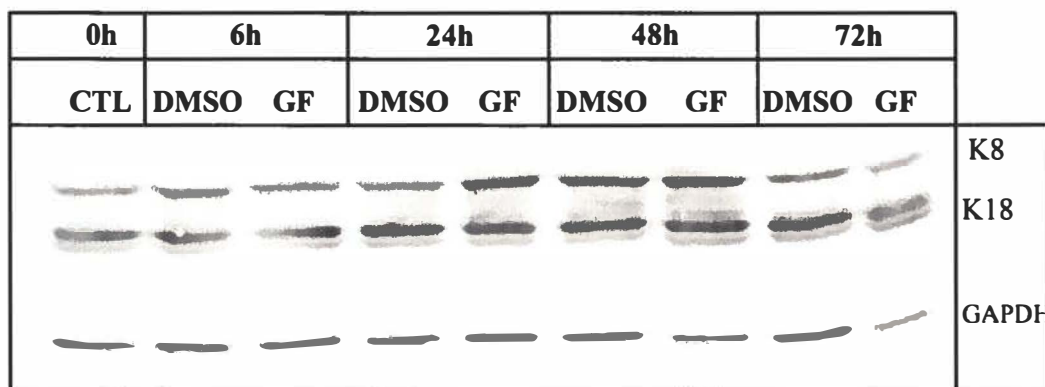


FIGURE 6.2 : Effets de la GF sur l'expression des K8/18.

A) Photographies des bandes de K8/18 obtenues à partir de lysats de HepG2 après analyses de type western. B) Analyses densitométriques des bandes de K8/18 ; l'histogramme violet représente la K8 tandis que le bleu représente la K18. (*: $p < 0,05$; $n=3$)

Les analyses densitométriques de nos résultats d'immunobuvardage de type western révèlent que la GF influe sur la quantité de K8 présente au sein des cellules HepG2, et donc, potentiellement sur son niveau d'expression. Le graphique de la figure 6.2 (B) indique le pourcentage de variation d'expression des K8/18 dans les HepG2 exposées à la GF ou au DMSO par rapport à leur état initial qui correspond aux cellules CTL (0h de traitement, Figure 6.2 B). Les cellules exposées au DMSO ne montrent pas de variation significative autant pour la K8 que pour la K18. On constate, par contre, qu'à 24h d'exposition à la GF, la K8 atteint un niveau 3 fois plus élevé que dans les cellules CTL ($p < 0,05$). Les niveaux de K18, quant à eux, varient peu tout au long du traitement. Ces observations sont illustrées sur la figure 6.2 A, B.

6.2 Phosphorylation des K8/18

6.2.1 Phosphorylation de K8

Les niveaux de phosphorylation de la K8 sont analysés par immunofluorescence et immunobuvardage de type western. Les sites de phosphorylation considérés sont les sérines 73 et 431 (K8 S73 et K8 S431) et les composantes phosphorylées de la K8 sont notées K8 pS73 et K8 pS431.

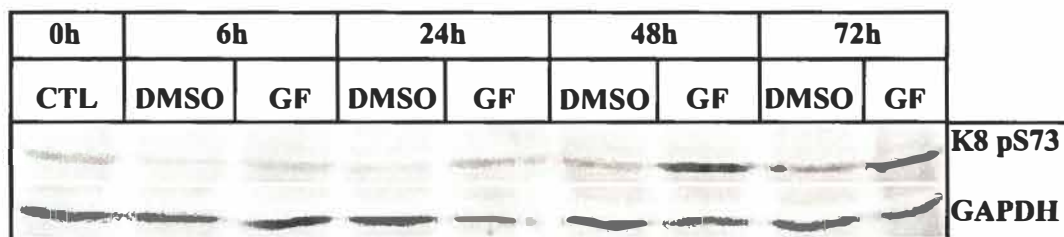
K8 S73 :

Les analyses de type western des lysats de HepG2 traitées à la GF montrent une augmentation du niveau de phosphorylation de la K8 sur la sérine 73 par rapport aux cellules contrôles (CTL et DMSO). Bien que la K8 pS73 soit présente parmi les cellules CTL et DMSO, on note que le niveau de phosphorylation de K8 S73 est relativement bas comparé aux cellules traitées à la GF, tel qu'on peut le voir sur la figure 6.3 (A et B). On constate en effet, à partir des représentations graphiques de données densitométriques que la quantité de K8 pS73 augmente de façon constante avec le temps d'exposition des cellules HepG2 à la GF (Figure 6.3.B). Après 48h et 72h de traitement à la GF le niveau de phosphorylation de la K8 S73 augmente de façon significative tant

par rapport à l'état initial des cellules (CTL) que par rapport à leurs contrôles DMSO respectifs (DMSO 48h et 72h) ($p < 0,05$)

A)

Niveaux de phosphorylation de K8: Sérine 73



B)

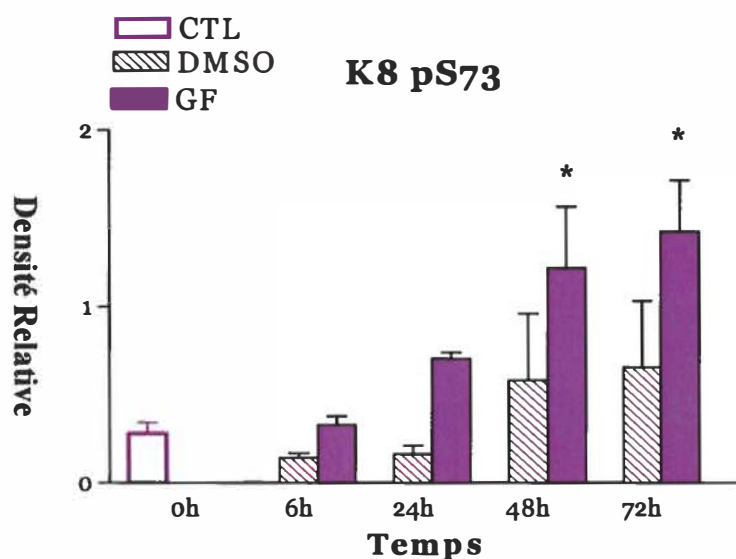
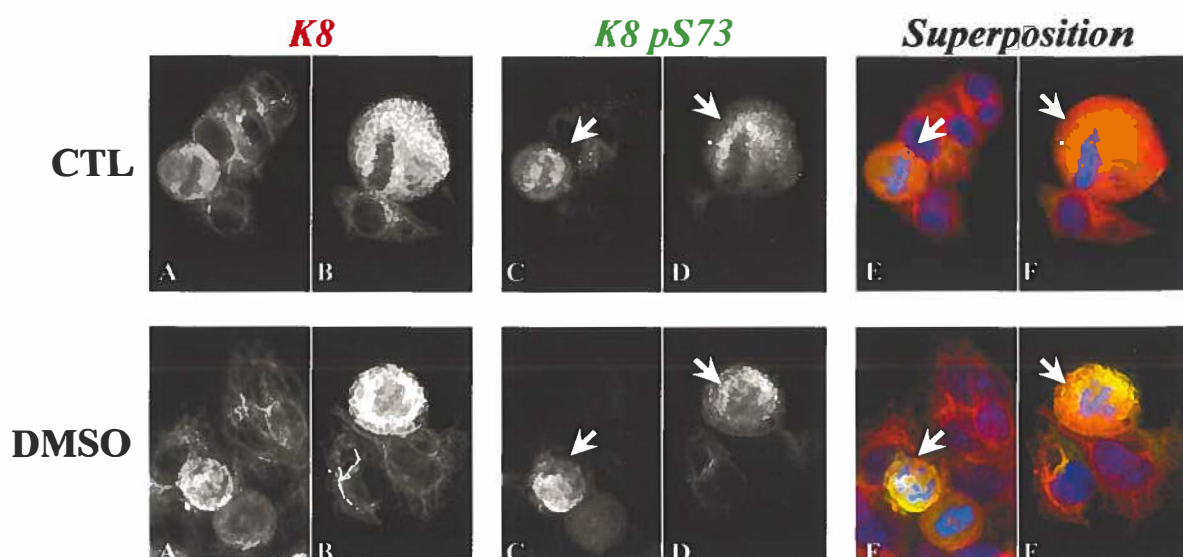


FIGURE 6.3 : Effets de la GF sur la phosphorylation de K8 S73.

A) Photographies des bandes de K8 pS73 obtenues à partir de lysats de HepG2 après analyses de type western. B) Analyses densitométriques des bandes de K8 pS73. (* : $p < 0,05$; $n=3$)

L'observation microscopique de la K8 pS73 au sein des HepG2 confirme sa présence aussi bien parmi les cellules CTL et traitées au DMSO qu'au sein des cellules exposées à la GF. Dans les cellules contrôles (CTL et DMSO), la K8 pS73 est essentiellement présente au sein de cellules en mitose comme l'illustre la figure 6.4 (CTL.C-F et DMSO.C-F). On peut distinguer l'aspect filamenteux de la K8 pS73 dans ces cellules arrondies à la chromatine condensée en chromosomes.

HepG2 exemptes de traitement à la GF



HepG2 traitées à la GF

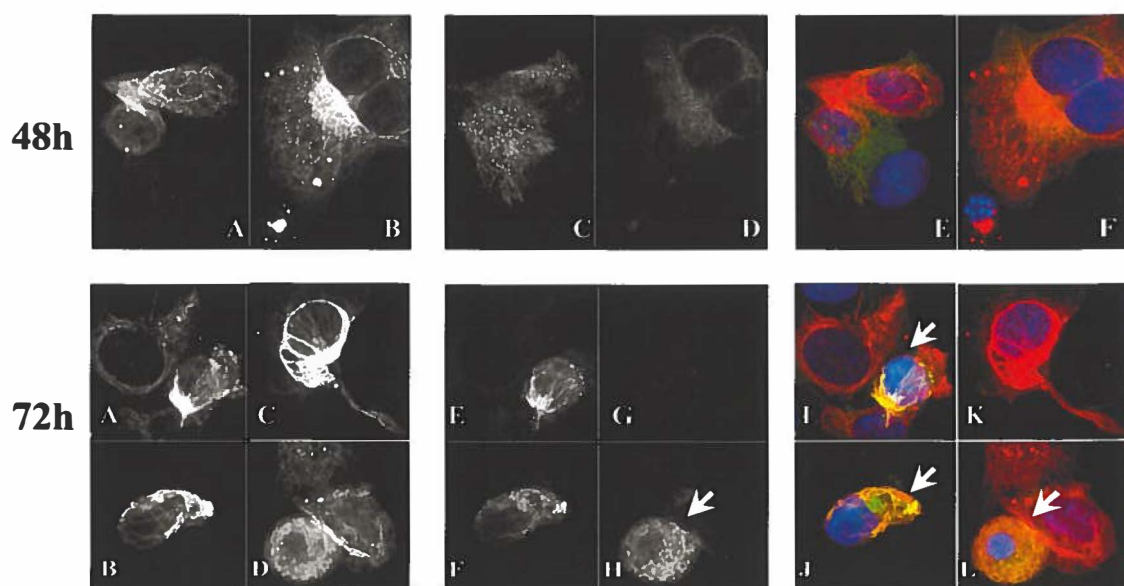


FIGURE 6.4 : Effet de la GF sur la distribution de la K8 S73.
Description de la figure sur la page suivante.

FIGURE 6.4 : Effet de la GF sur la distribution de la K8 S73.

Les cellules HepG2 après traitement ont été fixées, sans perméabilisation préalable, à la PFA 4%. La K8 est marquée au TRITC tandis que la K8 pS73 ciblée par LJ4 est marquée au FITC. L'ADN nucléaire marqué avec le Hoescht apparaît en bleu sur les superpositions. Les différentes photographies illustrent les HepG2 à un grossissement de 40X.

CTL) Cellules exemptes de tout traitement. Les cellules en mitose pointées sur les photographies C à F contiennent de la K8 pS73.

DMSO) Cellules exposées au DMSO. Les cellules pointées sur les photographies C à F contiennent de la K8 pS73 et sont en mitose.

48h) Cellules traitées 48h à la GF. En C et en D, les flèches indiquent des cellules en interphase dont le réseau de K8/18 intact est phosphorylé sur la K8 S73. Les photographies E et F illustrent la distribution de K8 pS73 calqué sur le réseau filamenteux de K8/18 (cellules pointées).

72h) Cellules traitées 72h à la GF. Les structures pointées en I et en J correspondent à des amas de K8/18 contenant de la K8 pS73. Les flèches des photographies H et L indiquent la présence de K8 pS73 dans une cellule bloquée en mitose.

Après exposition à la GF, le nombre de cellules contenant la K8 pS73 tend à augmenter et on compte plusieurs cellules bloquées en mitose (Figure 6.4 72h.D, H, L). On remarque néanmoins que, parmi les HepG2 traitées à la GF, les cellules engagées dans le processus mitotique ne sont pas les seules au sein desquelles on peut retrouver de la K8 pS73. On constate la présence de K8 pS73 au sein de cellules en interphase (Figure 6.4 48h.C, D). Ces cellules, dont le nombre croît avec le temps d'exposition à la GF, sont étalées, leur ADN décondensé, et possèdent un réseau de K8/18 intact en partie phosphorylé sur la K8 S73, de sorte que la K8 pS73 forme un réseau filamentueux calqué sur celui des kératines totales (Figure 6.4 48h.F).

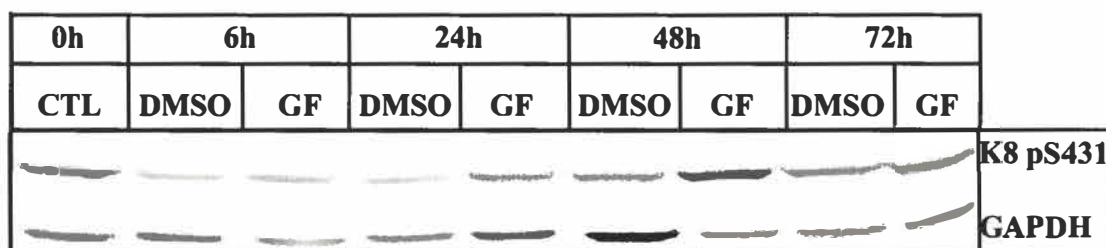
On constate également que la réorganisation des K8/18 induite par le traitement à la GF affecte la distribution de la K8 pS73 qui se retrouve incluse au sein d'amas de K8/18 (Figure 6.4 72h.A-B, E-F, I-J). Ceci s'illustre par la colocalisation (en jaune sur les superpositions de la figure 6.4) que l'on peut constater entre les agrégats de K8/18 et la K8 pS73 après 72h de traitement (Figure 6.4 I, J). On note cependant que tous les agrégats de K8/18 observés ne contiennent pas de K8 pS73 (Figure 6.4 72h.K).

K8 S431 :

On note, à partir d'analyses de type western, la présence de la phosphokératine K8 pS431 tant dans les cellules contrôle qu'au sein des cellules traitées à la GF. On constate cependant sur la figure 6.5 une hausse du niveau de phosphorylation de la K8 S431 dès 6h d'exposition à la GF. La quantité de K8 pS431 tend à augmenter avec le temps d'exposition des cellules à la GF (Figure 6.5 A et B). Les hausses des niveaux de K8 pS431 deviennent significatives après 72h de traitement ($p < 0.05$) (Figure 6.5 B).

A)

Niveaux de phosphorylation de K8: Sérine 431



B)

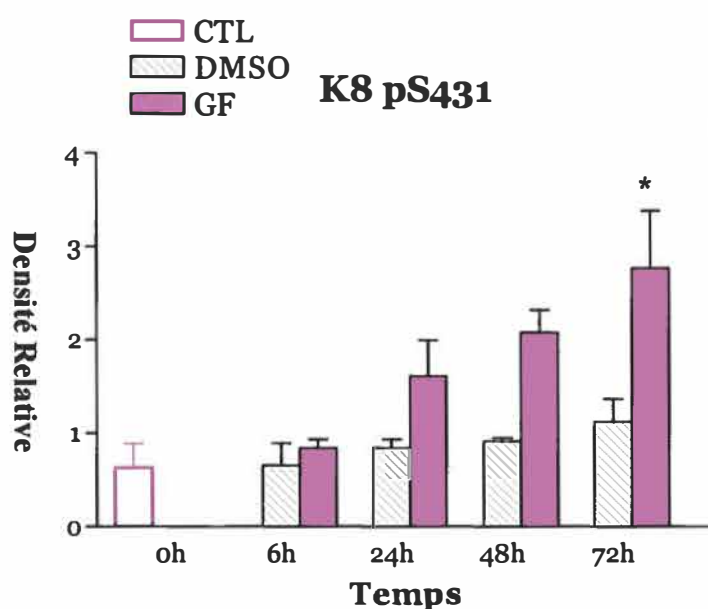


FIGURE 6.5 : Effets de la GF sur la phosphorylation de la K8 S431.

A) Photographies des bandes de K8 pS431 obtenues à partir de lysats de HepG2 après analyses de type western. B) Analyses densitométriques des bandes de K8 pS431. (*: $p < 0,05$)

L'analyse en microscopie à fluorescence de la distribution de la K8 pS431 appuie les résultats obtenus en immunobuvardage de type western ; à savoir que cette phosphokératine est présente autant dans les cellules contrôles (CTL et DMSO) que dans les cellules traitées à la GF. Avant exposition à la GF, on constate la présence de la K8 pS431 dans les cellules en mitose et en interphase. Dans les cellules en mitose, la K8 pS431 semble se répartir au niveau de la membrane plasmique (Figure 6.6 CTL.C, E).

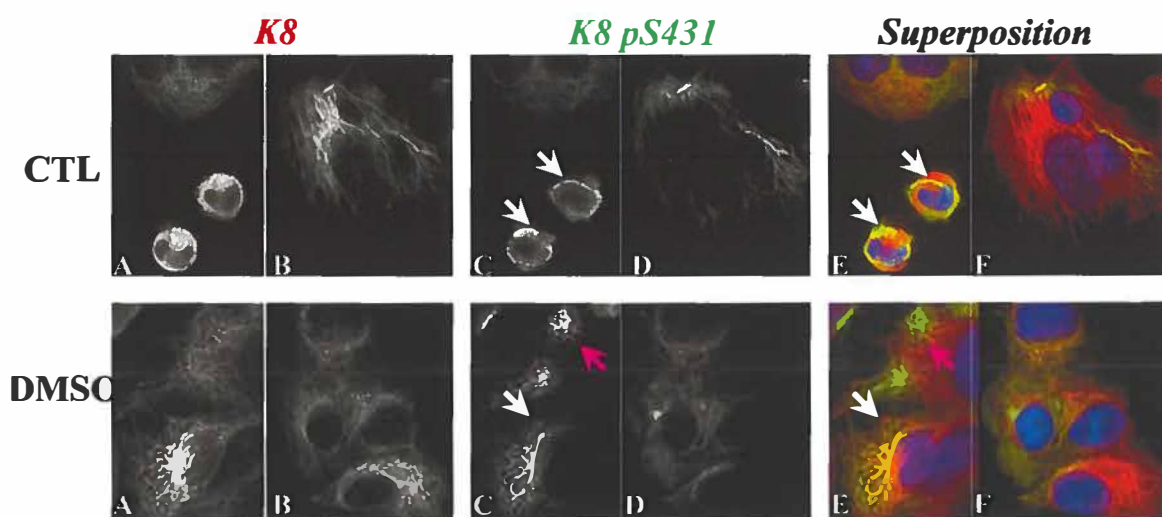
Au sein des cellules en interphase, la K8 pS431 s'étend soit à l'ensemble du réseau de kératines, soit se distribue en des régions localisées du cytosquelette, formant ainsi des plages de phosphorylation (Figure 6.6 CTL.D, F et DMSO.C-F).

L'observation des cellules exposées à la GF tend à indiquer que le traitement affecte la répartition cellulaire de la K8 pS431. On constate en effet que la K8 pS431 est majoritairement distribuée au niveau de plages du réseau de kératines (Figure 6.6 48h.D, G et 72h.G, F, H, J, K, L). Cette répartition est également observée dans les cellules bloquées en mitose (Figure 6.6 72h.G, F, J, K). On note néanmoins dans un nombre restreint de cellules en interphase que la K8 pS431 est étendue à l'ensemble de la cellule tel qu'observé dans les cellules contrôles (Figure 6.6 48h.B, E, H). De plus, comme on a pu le constater pour les K8/18, la GF semble induire l'agrégation de la K8 pS431 (Figure 6.6 48h.F et 72h.E). La colocalisation entre les granules de K8 pS431 et les amas de K8/18, notée sur les superpositions de la figure 6.6, suggère que la réorganisation des K8/18 aurait un impact sur la distribution de cette phosphokératine (Figure 6.6 48h.I et 72h.I).

6.2.2 Phosphorylation de la K18

Nous avons également procédé à des analyses préliminaires de type western sur les niveaux de phosphorylation de la K18 ; les sites de phosphorylation alors étudiés sont les sérines 33 et 52. Il en ressort que la GF induit l'hyperphosphorylation de la K18 sur chacun des deux sites. On constate en effet une augmentation significative du niveau de K18 pS33 dans les traitements de 48 et 72 heures par rapport aux cellules contrôles (CTL et DMSO) ($p < 0.05$) (Figure 6.7 B.a). Pour ce qui est de la K18 pS52, les observations sont similaires ; après 48 et 72 heures de traitement à la GF on note que les niveaux de K18 pS52 augmentent de façon significative par rapport aux cellules CTL et DMSO ($p < 0.05$) (Figure 6.7.B.b).

HepG2 exemptes de traitement à la GF



HepG2 traitées à la GF

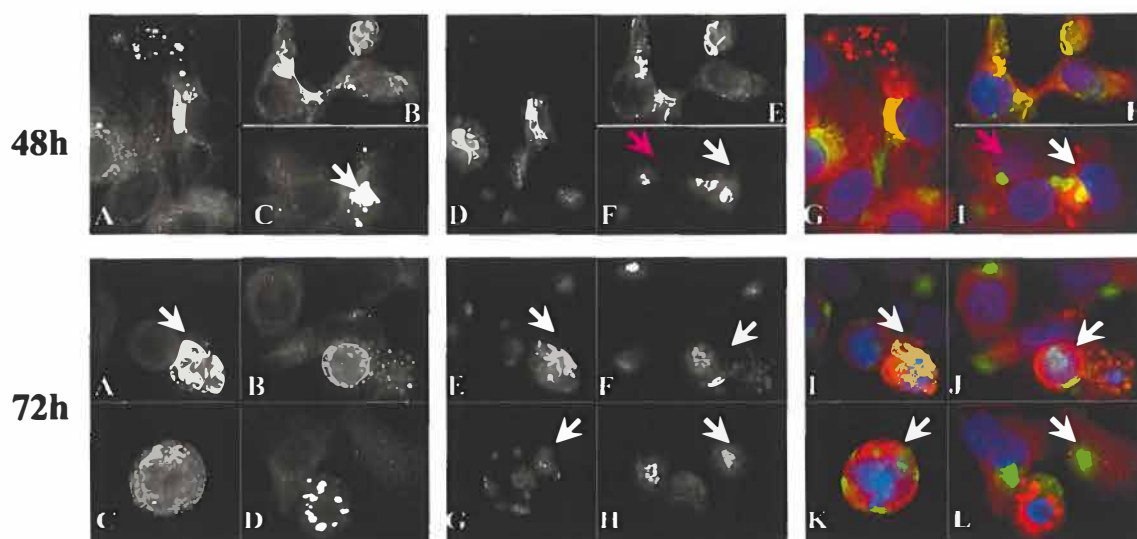


FIGURE 6.6 : Effet de la GF sur la distribution de la K8 S431.
Description de la figure page suivante.

FIGURE 6.6 : Effet de la GF sur la distribution de la K8 S431.

Les cellules HepG2 après traitement ont été fixées, sans perméabilisation préalable, à la PFA 4%. La K8 est marquée au TRITC tandis que la K8 pS431 ciblée par 5B3 est marquée au FITC. L'ADN nucléaire marqué au Hoescht apparaît en bleu sur les superpositions. Les différentes photographies illustrent les HepG2 à un grossissement de 40X.

CTL) Cellules exemptes de tout traitement. En C, les flèches indiquent la distribution membranaire de K8 pS431 au sein de cellules en mitose également pointées en E où on peut voir le niveau de condensation de la chromatine en chromosome.

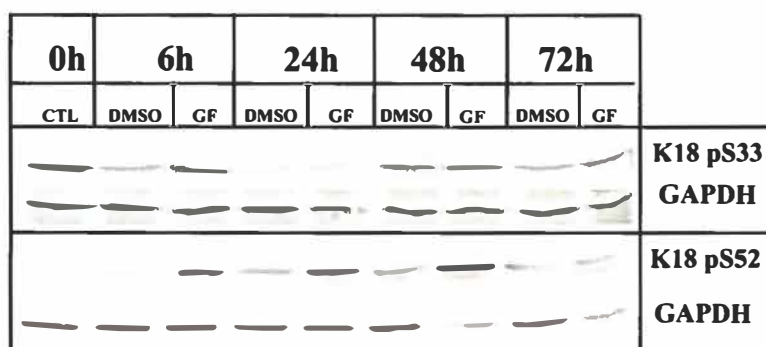
DMSO) Cellules exposées au DMSO. En C et en E, la flèche blanche montre la K8 pS431 étendue à l'ensemble du réseau de K8/18 tandis que la flèche rose indique les plages de phosphorylation de la K8 S431.

48h) Cellules traitées 48h à la GF. En C, la structure pointée correspond à un amas de K8/18 ; en F, la flèche blanche montre des amas de K8 pS431 au sein de la même cellule. La photographie I est la superposition de C et F et illustre la colocalisation entre les amas de K8/18 et de K8 pS431 pointée par la flèche blanche. Les flèches roses en F et I montrent l'aspect de plages de la K8 pS431 dans une cellule en interphase.

72h) Cellules traitées 72h à la GF. En A, la structure pointée correspond à un amas de K8/18 ; en E, la flèche montre des amas de K8 pS431 au sein de la même cellule. La photographie I est la superposition de A et E et illustre la colocalisation entre les amas de K8/18 et de K8 pS431 pointée par la flèche. Les cellules pointées en G, F, J et K sont bloquées en mitose et contiennent de la K8 pS431 distribuée au niveau de plage de phosphorylation. Ce patron de distribution est également observé dans des cellules en interphase pointées sur les photographies H et L.

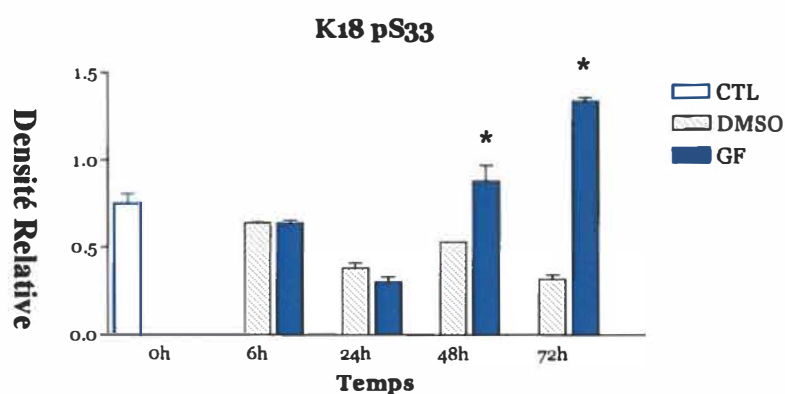
A)

Niveaux de phosphorylation de la K18: sérines 33 et 52



B)

a.



b.

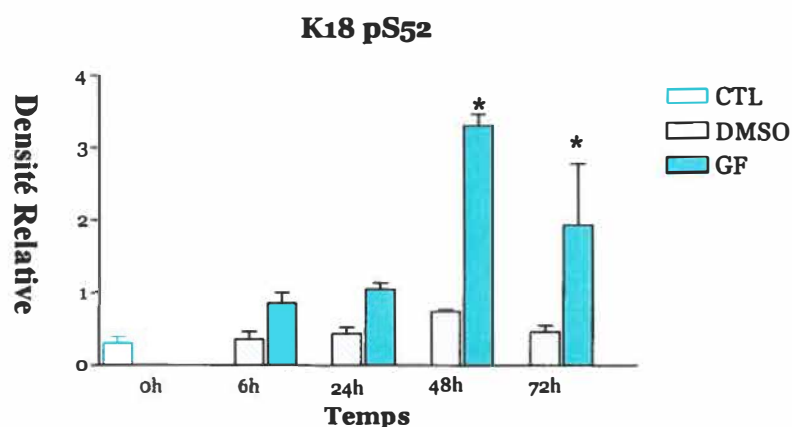


FIGURE 6.7 : Effets de la GF sur la phosphorylation de K18 S33/52.

A) Photographies des bandes de K18 pS33 et K18 pS52 obtenues à partir de lysats de HepG2 après analyses de type western. B) Analyses densitométriques des bandes de K18 pS33 et K18 pS52: a. Représentation graphique des niveaux de K18 pS33 (* : $p < 0.05$; $n=2$). b. Représentation graphique des niveaux de K18 pS52 (* : $p < 0.05$; $n=3$).

6.2 Effets de la GF sur l'apoptose

Le suivi de nos cellules HepG2 nous a permis de noter que l'exposition à la GF entraîne une diminution importante du nombre de cellules fixées au support de culture cellulaire tandis que la proportion de cellules flottant dans le milieu de culture augmente. Nous avons alors émis l'hypothèse que les cellules flottantes sont composées de cellules mortes. Pour illustrer le bien fondé de cette hypothèse, nous avons procédé à différentes analyses en vue de déterminer si le traitement à la GF provoque la mort des cellules par apoptose.

La coloration de l'ADN nucléaire des HepG2 avec le Hoechst a permis d'observer les caractéristiques morphologiques de la chromatine et d'identifier les cellules en apoptose. Le décompte des cellules apoptotiques et non apoptotiques dans différentes fractions (cellules fixées au substrat et flottantes) a montré que la GF induit une augmentation de la mort cellulaire par apoptose qui croît avec le temps d'exposition à la GF (Figure 6.8).

L'analyse de la morphologie des noyaux cellulaires montre que les cellules meurent par apoptose. L'analyse de type western de la procaspase 3 et de sa forme active (la caspase 3 clivée) supporte cette observation. En effet, on constate que le traitement à la GF entraîne une augmentation du niveau d'expression de la procaspase 3. La quantité de caspase 3 clivée est également augmentée par le traitement. On remarque, après 24h d'exposition à la GF, la présence de caspase 3 clivée sans variation notable dans la quantité de sa forme inactive. Par contre, des expositions plus prolongées, de 48 et 72 heures, induisent une augmentation du niveau d'expression (procaspase 3) et d'activation de la caspase 3 (Figure 6.9).

La somme de ces observations montre que l'augmentation du taux de mort cellulaire observée après traitement à la GF est, du moins en partie, imputable au processus d'apoptose.

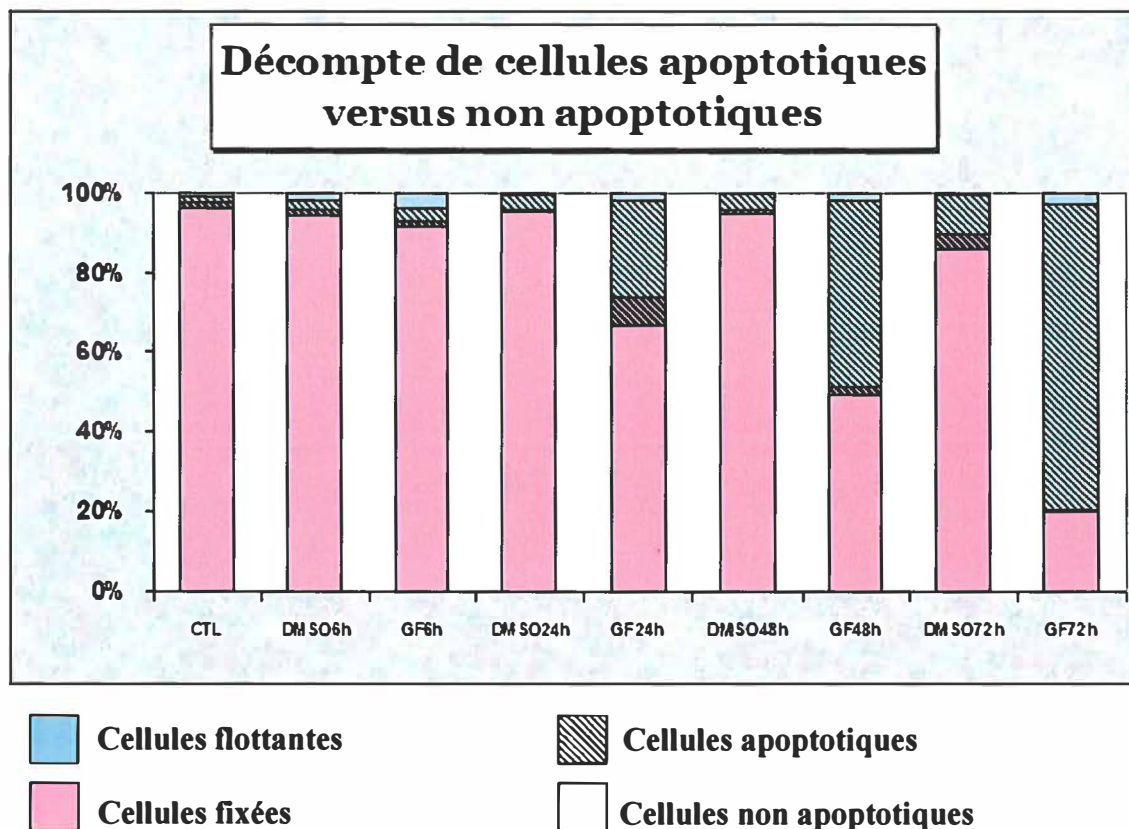


FIGURE 6.8 : GF et morts cellulaires.

Le décompte de cellules a été effectué à partir des cellules fixées ayant été trypsinisées, et des cellules flottantes contenues dans le milieu de culture. Le graphique représente le pourcentage de cellules de chacune des deux fractions. Les fractions de cellules fixées et de cellules flottantes sont respectivement indiquées sur le graphique en rose et en bleu. La portion hachurée correspond au pourcentage de cellules apoptotiques de chacune des fractions tandis que les cellules non apoptotiques sont illustrées par la portion pleine du graphique.

Niveaux d'activation de la Caspase 3

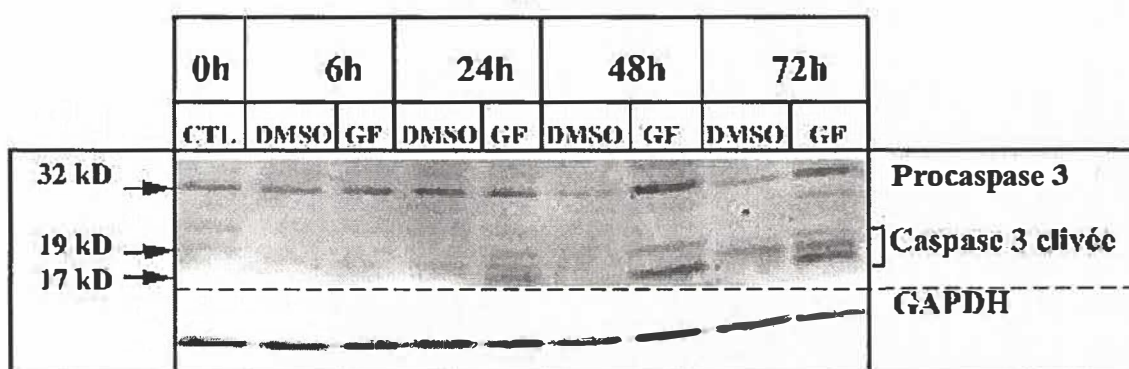


FIGURE 6.9 : Effets de la GF sur l'activation de la caspase 3.

Photographie de membrane de nitrocellulose après analyses de type western de la caspase 3 clivée. La procaspase est visible à 32kD. A 17 et 19kD sont illustrés les fragments de caspase 3 obtenus après deux clivages séquentiels de la procaspase 3 qu'implique le processus d'activation. La GAPDH fait office de contrôle interne.

6.3 Effets de la GF sur la voie de signalisation Fas/Fas L

Nous avons établi que le traitement à la GF provoque la mort des cellules HepG2 par apoptose. Les voies de signalisation apoptotiques mises en cause sont néanmoins encore inconnues. Nous avons exploré la possibilité que la voie de Fas/Fas L pourrait jouer un rôle. Des analyses de type western, de RT-PCR et de microscopie à fluorescence ont été alors réalisées.

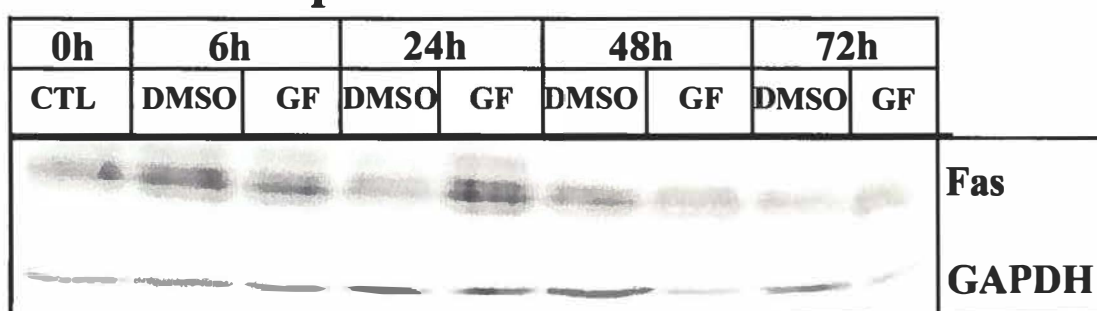
6.3.1 Expression de Fas et de son ligand

Fas L est une protéine sécrétée par les hépatocytes et ne peut donc être analysée par microscopie ou encore par immunobuvardage de type western à partir de lysats cellulaires. Pour étudier l'expression de Fas L nous avons procédé à l'analyse de son ARNm par RT-PCR. Fas a, quant à lui, été étudié via des analyses de type western et par microscopie à fluorescence.

L'analyse de Fas dans les cellules HepG2 montre que le traitement à la GF n'affecte pas son niveau d'expression. Bien que la quantité de Fas diminue dans le temps, autant au sein de cellules traitées au DMSO qu'à la GF, on ne note pas de variation significative imputable à l'exposition à la GF (Figure 6.10, DMSO versus GF). Les analyses qualitatives et quantitatives des ANRm de Fas L ont, par contre, révélé une augmentation importante après 72h de traitement (Figure 6.11 A, B). Ces variations de l'expression de Fas L suggèrent que la voie Fas/Fas L est sollicitée après exposition à la GF.

A)

Niveaux d'expression de Fas : Protéines



B)

Fas

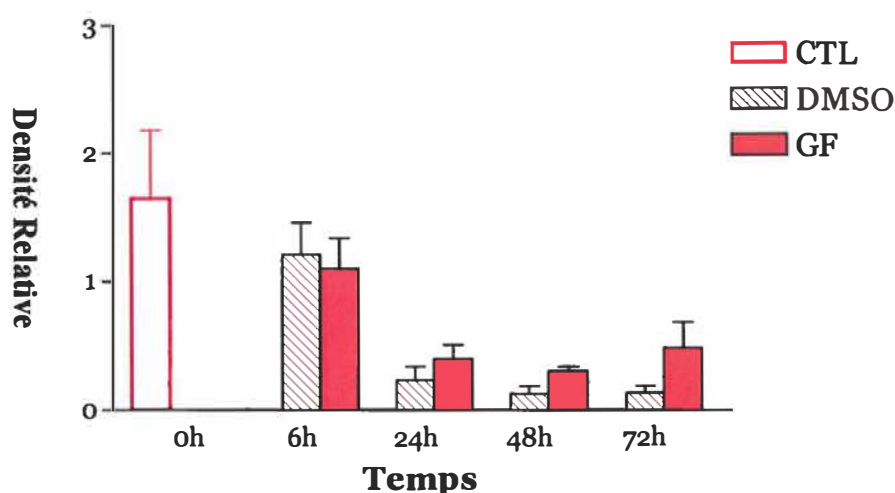


FIGURE 6.10 : Effets de la GF sur l'expression de Fas.

A) Photographies des bandes de Fas obtenues à partir de lysats de HepG2 après analyses de type western. B) Analyses densitométriques des bandes de Fas. B) Représentation graphique des niveaux de Fas.

A)

Niveau d'expression de Fas L: ARNm

0h	6h		24h		48h		72h		
CTL	DMSO	GF	DMSO	GF	DMSO	GF	DMSO	GF	
									Fas L
									GAPDH

B)

ARNm Fas L

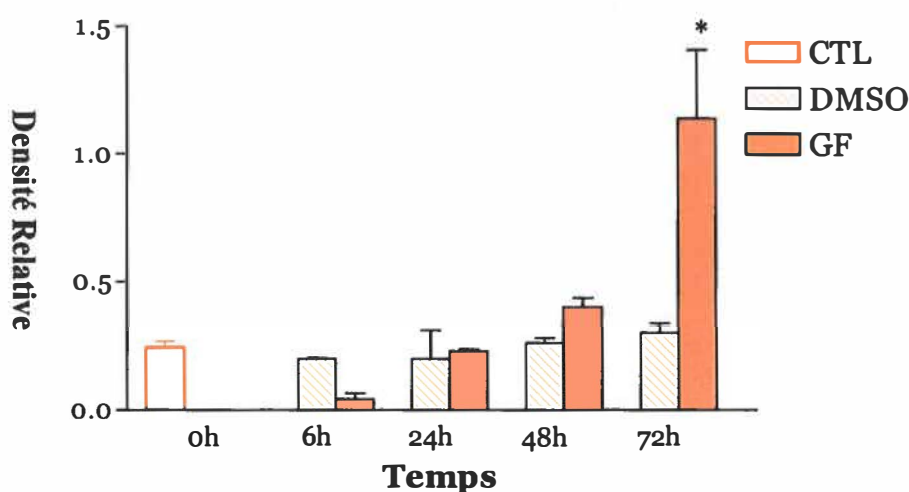


FIGURE 6.11 : Effets de la GF sur l'expression de Fas L.

A) Gel d'agarose 2% d'amplicons d'ADNc de Fas L et de GAPDH obtenus après RT-PCR sur les ARN totaux de cellules HepG2. B) Représentation graphique des analyses densitométriques des bandes d'ADNc de Fas L ($p < 0.05$; $n = 2$).

6.3.2 Distribution de Fas

Avant le traitement à la GF, on observe dans les cellules HepG2 deux profils de distribution de Fas. On constate, en effet, dans les cellules contrôles que Fas est tantôt diffus dans le cytoplasme, tantôt concentré à proximité du noyau où il prend un aspect vésiculaire (Figure 6.12 CTL.A-E et DMSO.A-L ; Figure 6.13 CTL.D-I et DMSO.F-G, J-K). Après exposition à la GF, on note des changements dans sa localisation. Fas, cytoplasmique dans les cellules contrôles, tend à se redistribuer à la membrane dans

certaines cellules (Figure 6.12 24h.E-F, H-I ; 48h.D, F, G, I et 72h.E-F, H-I ; Figure 6.13 48h.E-L et 72h.F-O). De plus, on observe, dans les traitements à plus long terme, des régions de la membrane plasmique où Fas semble plus agrégé (Figure 6.12 48h.F, I et 72h.E-F, H-I ; Figure 6.13 48h.H, L et 72h.G, L). De nombreuses cellules, cependant, ont un profil de distribution de Fas identique à celui observé dans les cellules contrôles ; Fas demeure diffus à travers le cytoplasme cellulaire (Figure 6.12 24h.D, G ; Figure 6.13 24h.D-I).

Afin de déterminer s'il existe un lien entre la distribution de Fas et les kératines, nous avons procédé à un double immunomarquage en microscopie à fluorescence de Fas avec la K8 pS73 d'une part, et la K8 pS431 d'autre part.

Fas et K8 pS73 :

Dans les cellules contrôles, la K8 pS73 n'est présente qu'au sein de cellules en mitose dans lesquelles Fas est étendu à travers tout le cytoplasme de façon diffuse (Figure 6.12.DMSO.G,K). La K8 pS73 et Fas ne paraissent pas associés.

Après 24h de traitement à la GF on note déjà la translocation de Fas vers la membrane plasmique. On constate, dans certaines cellules, de la colocalisation entre Fas membranaire et la K8 pS73 (Figure 6.12 24h.H). La GF provoque également dans les HepG2 une redistribution de la K8 pS73 qui se retrouve incluse dans des granules (Figure 6.12 48h.A-C, G-I et 72h.A-C, G-I). Après des expositions de 48 et 72 heures, l'importante relocalisation membranaire de Fas est essentiellement observée au niveau de cellules dans lesquelles on note la présence de granules contenant de la K8 pS73 (Figure 6.12 48h.G, I et 72h.H, I). On n'observe pas de colocalisation dans ces cellules. Ces résultats suggèrent que la réorganisation des kératines phosphorylées pourrait avoir un impact sur la distribution de Fas et son interaction avec la K8 pS73.

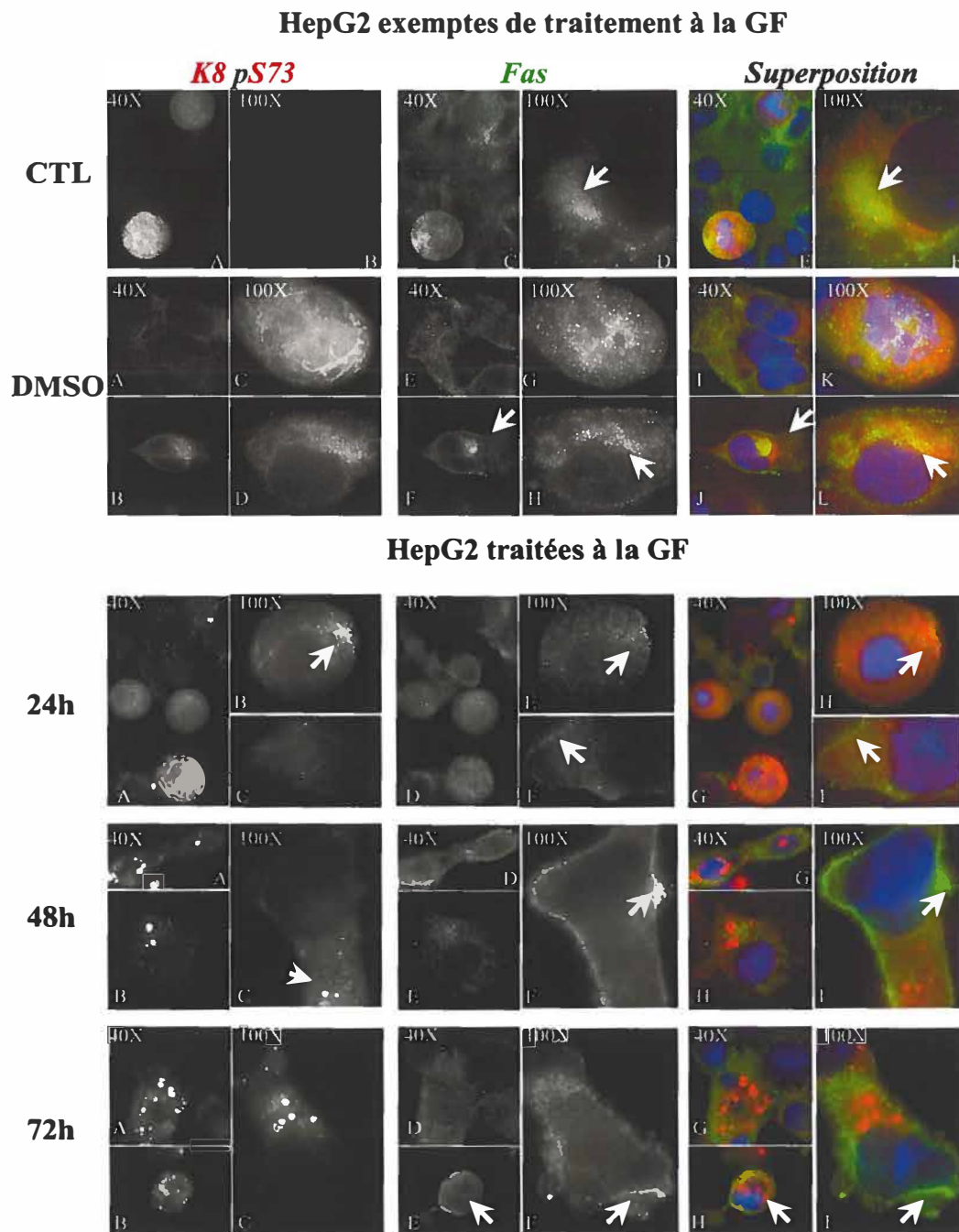


FIGURE 6.12 : Distribution de Fas et de la K8 pS73 dans les HepG2 exposées à la GF. Description de la figure page suivante.

FIGURE 6.12 : Distribution de Fas et de la K8 pS73 dans les HepG2 exposées à la GF. Les cellules HepG2 après traitement ont été fixées, sans perméabilisation préalable, à la PFA 4%. La K8 pS73 ciblée par LJ4 est marquée au TRITC tandis que Fas l'est au FITC. L'ADN nucléaire marqué au Hoeschst apparaît en bleu sur les superpositions. Les différentes photographies illustrent les HepG2 à 40X et 100X.

CTL) Cellules exemptes de tout traitement. En D et en F, on peut noter la distribution cytoplasmique de Fas autour du noyau.

DMSO) Cellules exposées au DMSO. En F et en H, les flèches indiquent l'aspect vésiculaire de Fas lorsqu'il est localisé autour du noyau.

24h) Cellules traitées 24h à la GF. La photographie B montre l'aspect filamenteux de la K8 pS73 au sein d'une cellule bloquée en mitose ; en E, la flèche indique la localisation membranaire de Fas dans la même cellule. En H, on peut constater la colocalisation entre les structures pointées en B et en E. Les structures pointées en F et en I illustrent également la localisation membranaire de Fas.

48h) Cellules traitées 48h à la GF. L'agrégation membranaire de Fas induite par le traitement est illustrée par la structure pointée en F et en I. On peut observer dans cette cellule de petits agrégats de K8 pS73 pointés en C.

72h) Cellules traitées 72h à la GF. Sur les photographies E et H est indiquée une cellule bloquée en mitose dans laquelle on peut voir l'agrégation membranaire de Fas et celle de la K8 pS73 dans le cytoplasme. En F et en I, on peut également voir cette agrégation mais dans une cellule en interphase où l'on peut distinguer des amas de K8 pS73.

Fas et K8 pS431 :

Dans les cellules contrôles, la K8 pS431 s'étend à l'ensemble du réseau de kératines ou se restreint à certaines régions du cytoplasme, formant ainsi des plages de K8 pS431 (Figure 6.13 CTL.A-C, G-I et DMSO.A-D, I-L). Fas localisé à proximité du noyau tend à se retrouver dans les zones où la K8 est phosphorylée sur sa sérine 431. On note ainsi une colocalisation entre la K8 pS431 et Fas dans ces régions de la cellule (figure 6.13 CTL.H, L et DMSO.J, L). Cette colocalisation n'est cependant pas observée dans les cellules où la K8 pS431 se distribue à travers tout le réseau de kératines (Figure 6.13 CTL.G et DMSO.I, K).

Le traitement à la GF induit des changements dans le patron de phosphorylation de la K8 S431. La réorganisation de la K8 pS431 semble affecter sa colocalisation avec Fas notées dans les cellules contrôles. À 24h de traitement, on constate l'apparition de granules contenant de la K8 pS431 dans de nombreuses cellules qui possèdent également un réseau filamenteux de K8 pS431 (Figure 6.13 24h.A-I). Dans ces cellules Fas est diffus dans le cytoplasme et ne colocalise pas avec la K8 pS431. Après 48 et 72 heures, on peut noter l'importante relocalisation de Fas et son agrégation membranaire (Figure 6.13 48h.E-L et 72h.F-H, J, K-M, O). Cette distribution de Fas coïncide avec la présence de granules de K8 pS431 dans de nombreuses cellules au sein desquelles on n'observe pas, non plus, de colocalisation entre les deux protéines (Figure 6.13 72h.B, D, E, G, I, J, L, N, O). Cependant, dans quelques cellules traitées, on peut observer une colocalisation entre Fas membranaire et la K8 pS431 qui forme alors des plages de phosphorylation filamenteuse à proximité de la membrane (Figure 48h.A, E, I et 72h.A, C, F, H, K, M).

La somme de ces observations suggère, dans un premier temps, que la K8 pS431 interagit avec Fas et, dans un second temps, que le traitement à la GF affecte cette interaction en induisant la réorganisation du réseau de K8/18.

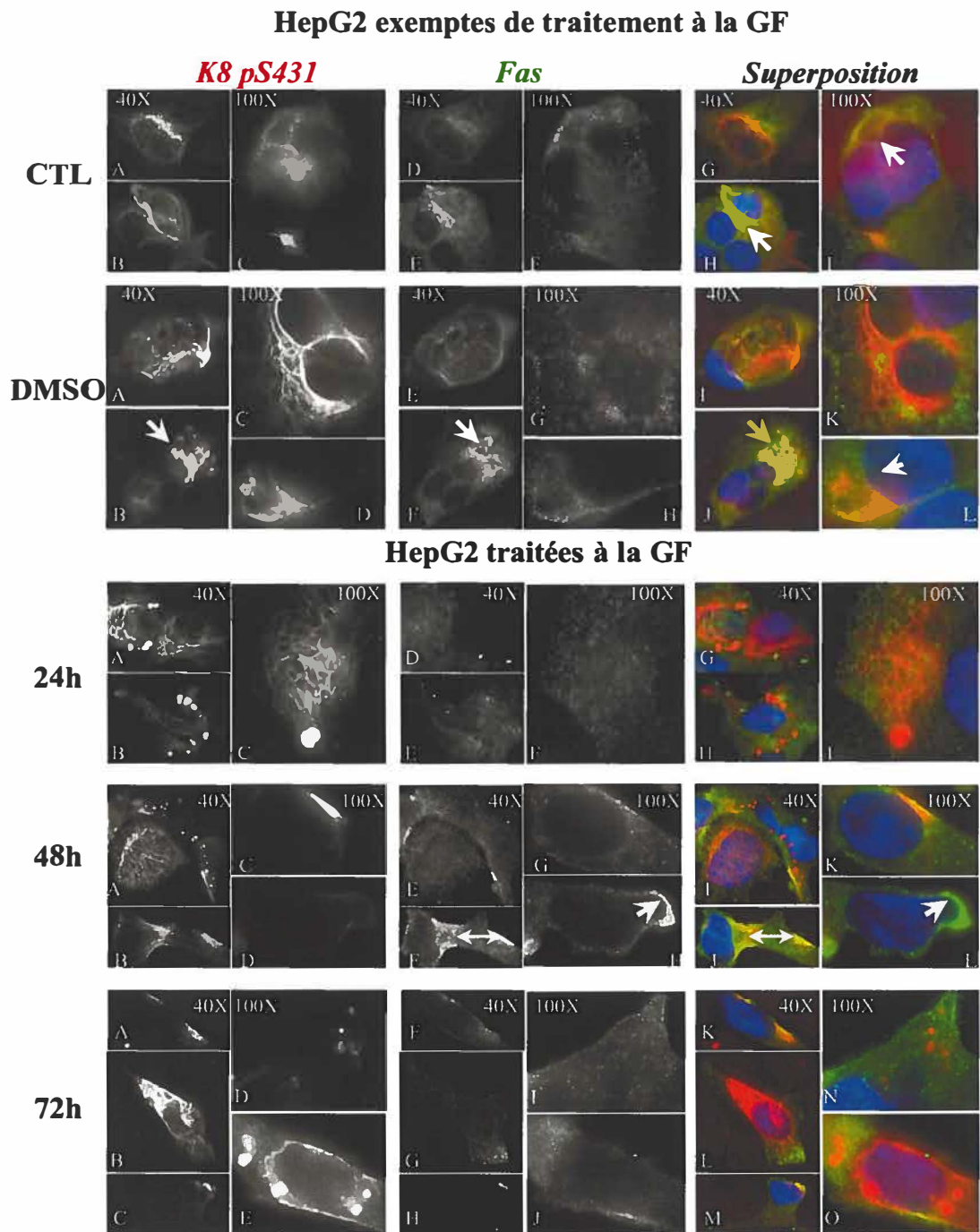


FIGURE 6.13 : Distribution de Fas et K8 pS431 dans les HepG2 exposées à la GF.
Description de la figure page suivante.

FIGURE 6.13 : Distribution de Fas et de la K8 pS431 dans les HepG2 exposées à la GF. Les cellules HepG2 après traitement ont été fixées, sans perméabilisation préalable, à la PFA 4%. La K8 pS431 ciblée par 5B3 est marquée au TRITC tandis que Fas l'est au FITC. L'ADN nucléaire marqué au Hoeschst apparaît en bleu sur les superpositions. Les différentes photographies illustrent les HepG2 à 40X et 100X.

CTL) Cellules exemptes de tout traitement. Les flèches en H et en I indiquent des cellules en interphase dans lesquelles on note la colocalisation de Fas et de K8 pS431.

DMSO) Cellules exposées au DMSO. En B, la flèche indique une plage de K8 pS431 tandis qu'en F elle montre l'aspect vésiculaire de Fas localisé près du noyau. La superposition de B et F (L) constitue un autre exemple de colocalisation entre Fas et la K8 pS431.

48h) Cellules traitées 48h à la GF. La double flèche en F et en J indique la distribution membranaire de Fas qui colocalise avec la K8 pS431. L'agrégation membranaire de Fas est illustrée en H et en L.

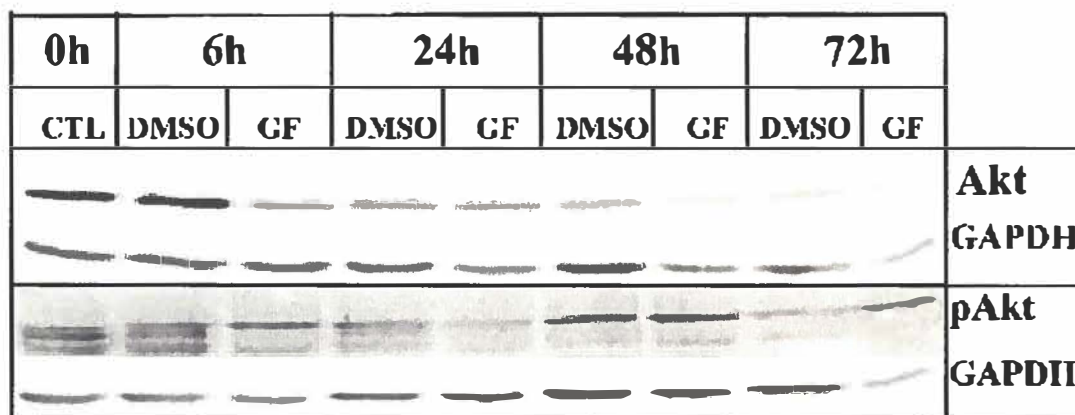
6.4 Effets de la GF sur la voie de signalisation PI3K/Akt

Au cours de cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'influence que peut avoir l'exposition des cellules HepG2 sur l'activation de Akt, protéine centrale dans la survie cellulaire. Nous avons donc analysé, par immunobuvardage de type western, son niveau de phosphorylation sur la thréonine 308, et observé, en microscopie à fluorescence, la distribution de la protéine phospho-Akt_{thr308} (pAkt) avant et après traitement à la GF.

6.4.1 Niveau d'activation de la protéine Akt

Les analyses de type western de la protéine Akt révèlent que son expression tend à diminuer avec le temps indépendamment du traitement auquel les cellules sont soumises. On n'observe pas de variation significative entre les niveaux de Akt dans les cellules DMSO et les cellules GF de chacun des temps de traitement (Figure 6.14 A, B). Les analyses de pAkt ne montrent pas non plus de changement significatif dans les niveaux d'activation de Akt après traitement à la GF (Figure 6.14 B).

A) Expression et Phosphorylation de Akt



B)

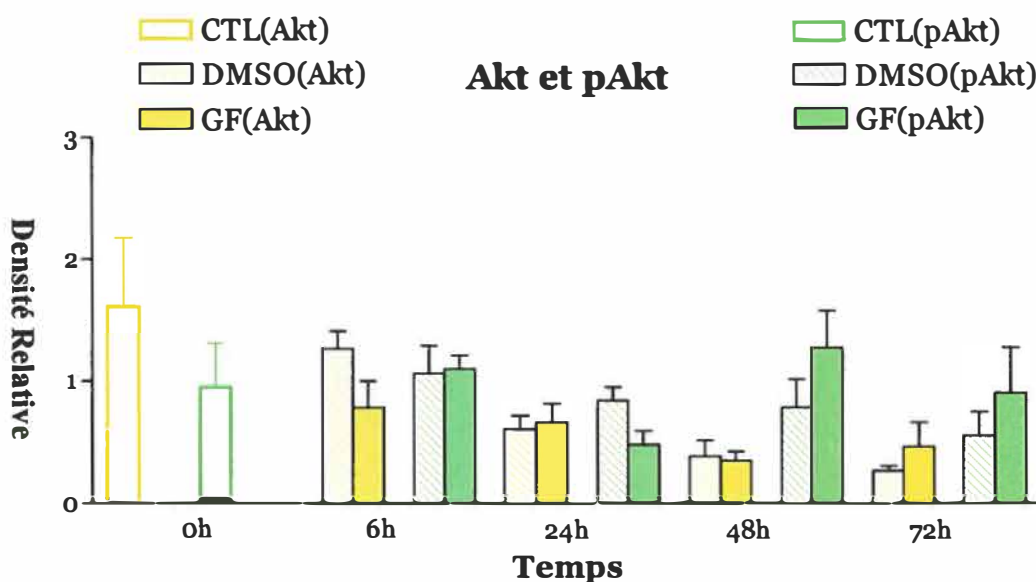


FIGURE 6.14 : Effets de la GF sur l'expression et l'activation de Akt.

A) Photographies des bandes de Akt et pAkt obtenues à partir de lysats de HepG2 après analyses de type western sur membrane de nitrocellulose. B) Analyses densitométriques; l'histogramme jaune moutarde représente la protéine Akt tandis que l'histogramme vert représente pAkt.

6.4.2 Distribution de pAkt

Le double marquage immunofluorescent de pAkt avec les K8 pS73 et K8 pS431 a permis de visualiser en microscopie le patron de distribution de la protéine Akt phosphorylée avant et après traitement à la GF.

Dans les cellules contrôles, on note la présence de pAkt au sein de quelques cellules en mitose ou en interphase (Figure 6.15 CTL.A-F et DMSO.A-L ; Figure 6.16 CTL.A-L et DMSO.A-L). La distribution de pAkt diffère d'une cellule à l'autre indépendamment du stade du cycle cellulaire (mitose ou interphase). Dans certaines cellules, pAkt est diffuse à travers l'ensemble du cytoplasme alors que dans d'autres elle est localisée à la membrane où elle peut former des amas informes (Figure 6.15 DMSO.E, I et Figure 6.16 CTL.F, H, J, L) ou encore un réseau filamenteux (Figure 6.15 CTL.D, F et Figure 6.16 CTL.E, I et DMSO.G, K).

L'exposition à la GF affecte la distribution de pAkt au sein des cellules et ce, dès 24h de traitement. On peut en effet constater que pAkt tend à former des plages au niveau de la membrane plasmique. Ceci laisse suggérer que la GF provoquerait l'agrégation membranaire de pAkt (Figure 6.15 24h.F, J et Figure 6.16 24h.H-I, N-O). Cette distribution est observée également dans les traitements de 48 et 72 heures (Figure 6.15 48h.F, H, J, L et 72h.I, N ; Figure 6.16 48h.G, K). On note, de plus, que l'exposition de 48 et 72 heures des cellules HepG2 à la GF induit la formation de granules cytoplasmiques contenant pAkt (Figure 6.15 48h.g, K et 72h.H, M ; Figure 6.16 48h.E-F, H, I-J, L et 72h.H-J, M-O).

pAkt et K8 pS73 :

Dans les cellules en mitose présentes dans les cellules contrôles, la K8 pS73 se retrouve étendue à l'ensemble du réseau de K8 et ne semble par interagir avec pAkt dont la localisation est, dans de nombreuses cellules, diffuse dans le cytoplasme. Dans les cas où pAkt est à la membrane, aucune colocalisation entre pAkt et K8 pS73 n'est alors

observée (Figure 6.15 CTL.A-F et DMSO.A-F). Cependant, suite au traitement à la GF, de la colocalisation est notée entre la K8 pS73 et pAkt au niveau d'agrégats cytoplasmiques (Figure 6.15 48h.C, G, K et 72h.C, H, M). Ces résultats suggèrent que la GF amène ces deux molécules à interagir l'une avec l'autre.

K8 pS431 :

La distribution de la K8 pS431 peut différer d'une cellule à l'autre dans les cellules contrôles. Elle peut s'étendre à l'ensemble du réseau de kératines ou être limitée à des régions formant des plages de K8 pS431 (Figure 6.16 CTL.A-L et DMSO.A-L). On note de la colocalisation entre pAkt et la K8 pS431 distribuée à l'ensemble du réseau de K8/18 (Figure 6.16 CTL E, K et DMSO.I, K-L). Après traitement à la GF, la colocalisation entre pAkt et la K8 pS431 est conservée ; particulièrement au niveau des amas contenant de la K8 pS431 formés suite au traitement (Figure 6.16 48h. A-B, D, E-F, H, I-J, L et 72h.C-D, H-J, M-O). On constate cependant que lorsque pAkt se concentre au niveau de plages à la membrane, elle ne colocalise pas avec la K8 pS431 (Figure 6.16 24h.N et 48h.K). Ces observations suggèrent que la K8 pS431 interagit avec pAkt localisée dans le cytoplasme ; ce n'est pas le cas lorsque pAkt a une distribution membranaire.

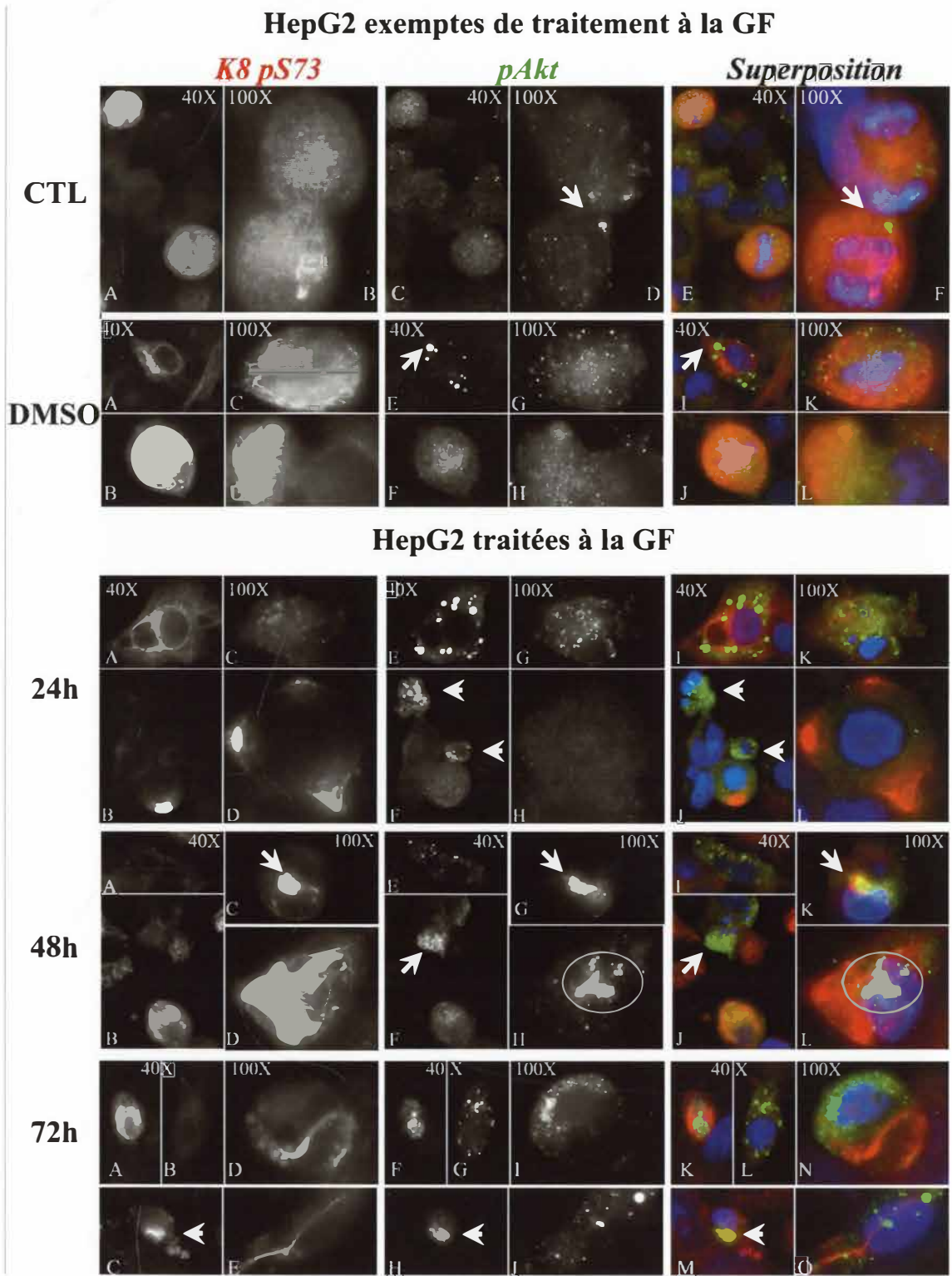


FIGURE 6.15 : Distribution du pAkt et de la K8 pS73 dans les HepG2 exposées à la GF. Description de la figure page suivante.

FIGURE 6.15 : Distribution du pAkt et de la K8 pS73 dans les HepG2 exposées à la GF. Les cellules HepG2 après traitement ont été fixées, sans perméabilisation préalable, à la PFA 4%. La K8 pS73 ciblée par LJ4 est marquée au TRITC tandis que pAkt l'est au FITC. L'ADN nucléaire marqué au Hoechst apparaît en bleu sur les superpositions. Les différentes photographies illustrent les HepG2 à 40X et 100X.

CTL) Cellules exemptes de tout traitement. En D et en F, la flèche indique la distribution en réseau filamenteux de pAkt au niveau de la membrane plasmique de cellules en mitose.

DMSO) Cellules exposées au DMSO. Sur les photographies E et I on note l'aspect granulaire de pAkt au sein d'une cellule en interphase.

24h) Cellules traitées 24h à la GF. En E et en I, on peut constater la distribution en granules membranaires de pAkt également au sein de cellules traitées (cellule pointée).

48h) Cellules traitées 48h à la GF. En C, la structure pointée correspond à un amas de K8/18 contenant de la K8 pS73 dans une cellule; tandis que la flèche en G montre un agrégat contenant pAkt dans la même cellule. La superposition (K) de ces photographies (C et G) indique de la colocalisation en pAkt et K8 pS73 au niveau de ces structures. En H et en L, la zone encadrée met en évidence les plages membranaires de pAkt observées suite au traitement.

72h) Cellules traitées 72h à la GF. Les structures pointées en C, en H et en M illustrent la colocalisation de la K8 pS73 et pAkt au niveau de granules cytoplasmiques.

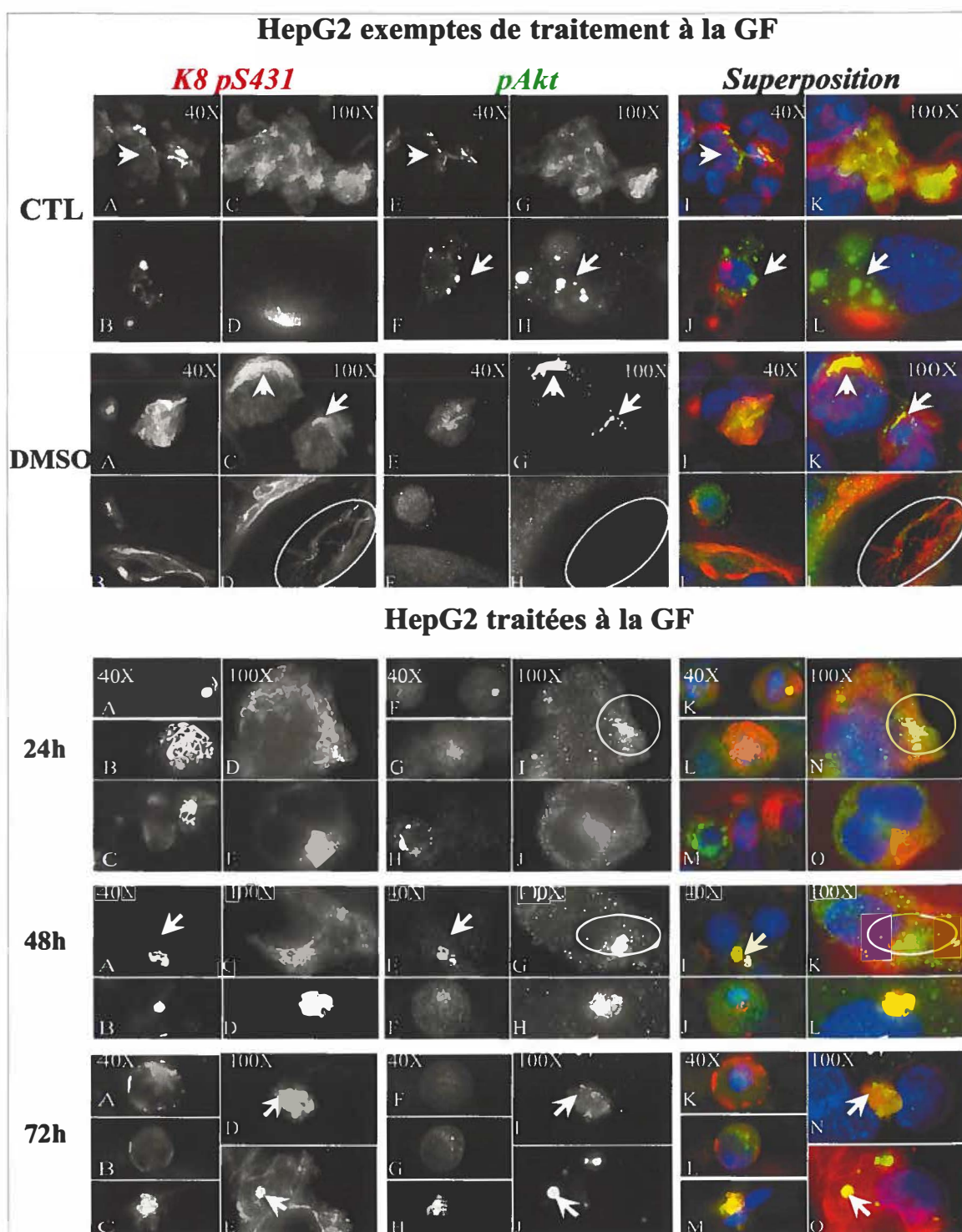


FIGURE 6.16 : Distribution de pAkt et de la K8 pS431 dans les HepG2 exposées à la GF. Description de la figure page suivante.

FIGURE 6.16 : Distribution de pAkt et de la K8 pS431 dans les HepG2 exposées à la GF. Les cellules HepG2 après traitement ont été fixées, sans perméabilisation préalable, à la PFA 4%. La K8 pS431 ciblée par 5B3 est marquée au TRITC tandis que pAkt l'est au FITC. L'ADN nucléaire marqué au Hoechst apparaît en bleu sur les superpositions. Les différentes photographies illustrent les HepG2 à 40X et 100X.

CTL) Cellules exemptes de tout traitement. En A la structure pointée correspond à la distribution de la K8 pS431 le long du réseau de K8/18 dans un ensemble de cellules; tandis que la flèche en E illustre l'aspect filamentueux de pAkt au sein du même groupe de cellules. La superposition de ces photographies (I) indique de la colocalisation entre pAkt et K8 pS431 au niveau de ces structures. Les structures pointées sur les photographies F, H, J et L correspondent aux granules membranaires de pAkt que l'on peut retrouver au sein des cellules contrôles.

DMSO) Cellules exposées au DMSO. En C la structure pointée correspond à la distribution de la K8 pS431 le long du réseau de K8/18 au sein de cellules en mitose; tandis que la flèche en G illustre l'aspect filamentueux de pAkt au sein de ces cellules. La superposition de ces photographies (K) indique de la colocalisation en pAkt et K8 pS73 au niveau de ces structures. Les zones encadrées sur les photographies D, H et L illustrent la distribution de pAkt le long du réseau de K8 pS431.

24h) Cellules traitées 24h à la GF. Les zones encadrées sur les photographies I et N montrent la distribution de pAkt au niveau de plages localisées à la membrane plasmique.

48h) Cellules traitées 48h à la GF. En A, la structure pointée correspond à un amas de K8/18 contenant de la K8 pS73 dans une cellule; tandis que la flèche en E montre un agrégat contenant pAkt dans la même cellule. La superposition de ces photographies (C et G) illustre de la colocalisation entre pAkt et K8 pS73 au niveau de ces structures. En G et en I, les zones encadrées mettent en évidence les plages membranaires de pAkt observée suite au traitement.

72h) Cellules traitées 72h à la GF. Les flèches des photographies D-E, I-J et N-O illustrent la colocalisation de la K8 pS431 et pAkt au niveau de granules cytoplasmiques.

CHAPITRE VII

DISCUSSION

7.1 Réponse des cellules HepG2 au traitement à la GF

7.1.1 Apoptose

Nous avons montré au cours de cette étude que la GF entraînait une augmentation du taux de mort cellulaire par apoptose au sein des cellules HepG2 traitées en comparaison avec les contrôles. L'observation de la morphologie nucléaire ainsi que l'analyse des niveaux d'activation de la caspase 3 par clivage nous ont menées à cette conclusion. Nos analyses de type western de la caspase 3 clivée ont permis de montrer une augmentation au sein des cellules traitées. Les caspases étant des protéases spécifiquement associées au processus d'apoptose, la hausse du niveau d'activation de la procaspase 3 indique que le traitement à la GF entraîne la mort des HepG2 par apoptose. Nos travaux montrent, de plus, que le processus menant à l'apoptose des HepG2 ne se limite pas à l'activation de la caspase 3, mais implique également le niveau d'expression de la procaspase 3. Différentes études réalisées à partir de plusieurs lignées cellulaires ont déjà montré que l'exposition à certaines drogues peut conduire à la surexpression de protéines pro-apoptotiques parmi lesquelles la procaspase 3 (Micheau et al., 1999).

L'expression des caspases est sujette à une régulation rigoureuse visant le contrôle de l'apoptose. Cette régulation fait appel à des phénomènes d'épigénétique, agissant ainsi sur la transcription de leurs gènes, ou d'épissage alternatif de l'ARN (Fulda et al., 2001; Srinivasula et al., 1999) qui dépendent, en amont, de voies de signalisation cellulaire. L'expression de la procaspase 3 est, pour sa part, régie par la voie des ERK/MAPK (Extracellular signal-Regulated Kinase / Mitogen-Activated Protein Kinase) (Song et al., 2004). Les protéines de la famille des ERK/MAPK peuvent être activées suite à de nombreux stimuli généralement mitogènes mais sont également impliquées dans les réponses cellulaires aux stress et à l'apoptose (Kaushal et al., 2004; Lee et al., 2005; Tantini et al., 2004). Ces informations associées à nos observations pourraient suggérer

que le stress induit par la GF provoque des changements au niveau de l'expression et de l'activation de la procaspase 3 pouvant impliquer certaines de ces kinases. Des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire (Riopel et Desaulniers, en cours de production) indiquent, qu'*in vivo* (au sein de souris C3H), les protéines p38 et JNK de la famille des MAPK, ne sont pas impliquées dans la réponse des hépatocytes à l'exposition à la GF. Cependant, des travaux préliminaires réalisés au cours de l'été 2007 (par Valérie Villeneuve) indiquent que JNK est activée au cours du traitement des HepG2 à la GF suggérant ainsi une possible relation avec la hausse d'expression de la procaspase 3. Il serait intéressant d'explorer plus en profondeur cette kinase et d'autres membres de la famille des ERK/MAPK ainsi que leurs signalisations en amont afin de déterminer le lien pouvant exister entre elles et les variations d'expression de la procaspase 3 observées après traitement des HepG2 à la GF.

7.1.2 Modifications des K8/18

Au cours de cette étude nous avons analysé les éventuelles modifications des K8/18 induites par le traitement à la GF. Nos résultats montrent des variations dans les niveaux d'expression de la K8 qui augmentent après 24h de traitement pour revenir à des valeurs normales (par rapport aux CTL) par la suite. Le niveau d'expression de K18 ne semble pas affecté par le traitement. L'implication du niveau d'expression des kératines dans la réponse cellulaire au stress toxique est relativement bien documentée. De nombreuses études ont non seulement montré que la surexpression de kératines constitue une réponse des cellules à la présence de différents stress toxiques (Fausther et al., 2004; Zatloukal et al., 2004) mais également que la concentration élevée de kératines confère aux cellules une résistance à diverses drogues (Bauman et al., 1994). La hausse du niveau d'expression de la K8 joue vraisemblablement un rôle protecteur dans les cellules HepG2 mises en présence de GF.

Outre l'augmentation de l'expression de la K8, nous avons observé que la GF induit également, au sein des HepG2, l'hyperphosphorylation de différents sites sérines des K8/18 ; à savoir les K8 S73, K8 S431 et les K18 S33, K8 S52. De nombreuses études

réalisées *in vivo* ont permis de mettre en évidence l'importance de la phosphorylation des kératines dans la protection des hépatocytes contre des agents toxiques (Bauman et al., 1994; Cadrin et al., 1993; Ku et al., 1996; Negron and Eckert, 2000; Salmhofer et al., 1994). En effet, les hépatocytes de souris K8/18 null sont particulièrement susceptibles à la présence de stress ; ceci place les K8/18 comme des éléments clés dans les phénomènes de cytoprotection (Ku et al., 1996). D'autres travaux visant à préciser l'implication des K8/18 dans la protection des cellules contre le stress ont démontré que la présence de mutations au niveau de sites de phosphorylation affecte également la réponse cellulaire aux stress, les cellules devenant plus sensibles aux stress toxiques. Ceci met en évidence l'importance de la phosphorylation des kératines dans la résistance des cellules à différents stress (Ku et al., 1996; Ku and Omary, 2006; Omary et al., 2002). Notre étude est en accord avec ces données puisqu'elle montre que l'hyperphosphorylation des K8 S73, K8 S431 et K18 S33 , K18 S52 fait partie de la réponse cellulaire des HepG2 au stress induit par la GF (Fausther et al., 2004; Salmhofer et al., 1994).

7.2 Activation de la voie Fas/Fas L par l'exposition des HepG2 à la GF

Nos travaux ont démontré l'implication de la voie de signalisation Fas/Fas L dans l'apoptose induite par l'exposition des cellules HepG2 à la GF. L'analyse de l'expression de Fas a révélé que le traitement à la GF n'en affecte pas le niveau d'expression. On a cependant noté une diminution, dans le temps, de l'expression de Fas dans les cellules traitées à la GF ainsi que dans les cellules contrôles. La croissance cellulaire, qui est exponentielle en début de culture cellulaire et ralentit à mesure que le nombre de cellules tend vers la confluence, pourrait expliquer cette baisse. Des travaux réalisés sur des cellules HeLa ont démontré que l'expression de Fas est plus importante au sein de cellules engagées dans le cycle cellulaire qu'au sein de cellules quiescentes (Yotsuyanagi et al., 1998). Nos résultats sont en accord avec cette interprétation puisque la proportion de cellules progressant dans le cycle cellulaire est plus importante lorsque la croissance cellulaire est optimale (en début de culture cellulaire).

Bien qu'à priori l'exposition des cellules HepG2 à la GF n'induit pas d'augmentation dans l'expression de Fas, l'analyse de sa distribution cellulaire indique que ce dernier subit une relocalisation du cytoplasme vers la membrane plasmique. Fas est, dans nos cellules contrôles, principalement localisé dans le cytoplasme, rendant ainsi les cellules moins sensibles à l'apoptose (Yano et al., 1996). En réponse à un signal apoptotique perçu par la cellule, comme l'IFN - γ , Fas se relocalise à la membrane plasmique. Cette translocation membranaire indique une activation de la voie pro-apoptique Fas/Fas L au sein de cellules qui deviennent à même de répondre plus promptement aux signaux de mort. Ainsi la redistribution de Fas dans les cellules HepG2 suite à leur exposition à la GF suggère fortement que le stress provoqué entraîne l'activation de la voie pro-apoptotique Fas/Fas L.

Bien que l'agrégation seule du récepteur Fas au niveau des lipides raft puisse suffire à son activation, le Fas L constitue le principal activateur de la voie Fas/Fas L (Wajant, 2006). Nos résultats indiquent que le niveau d'ARNm de Fas L augmente avec le temps de traitement à la GF, suggérant une hausse d'expression de la protéine. Ajouté à la relocalisation du récepteur Fas observée dans les cellules HepG2 exposées à la GF, ce résultat tend à appuyer l'hypothèse selon laquelle la voie pro-apoptotique Fas/Fas L serait impliquée dans la réponse cellulaire au stress toxique causé. Des analyses complémentaires telles que des tests ELISA permettraient d'établir si le Fas L exprimé est bel et bien sécrété par les HepG2 dans ces conditions, et confirmeraient l'implication de la voie Fas/Fas L.

Certains chercheurs ont proposé, sur la base de travaux effectués à partir de modèles K8-null, que la K8 pourrait être impliquée dans la régulation de la translocation membranaire de Fas (Gilbert et al., 2001; Ku et al., 2003b; Marceau et al., 2001). Gilbert et al. (2001) ont en effet démontré que, dans des hépatocytes dépourvus de K8, Fas est principalement distribué à la membrane. Ces hépatocytes sont dès lors plus sensibles à l'induction d'apoptose. La co-observation de Fas et des K8 pS73 et K8 pS431 tend à montrer que la K8 pourrait interagir avec Fas lorsque phosphorylée sur la sérine 431. Nos travaux suggèrent en effet que la K8 pS431 est en étroite relation avec

Fas autant dans les cellules cultivées dans les conditions normales qu'en présence de DMSO ou de GF. Nos résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle la K8 interviendrait dans le processus de redistribution intracellulaire de Fas par des interactions avec les protéines de kératines incluant la K8 pS431. La réorganisation du réseau de FIs que provoque la GF affecte le patron de distribution de la K8 pS431 qui apparaît alors sous forme de granules. Ces changements dans l'organisation de la K8 pS431 semblent promouvoir la translocation membranaire de Fas. Ceci nous amène à la conclusion que la K8 pS431, par son interaction potentielle avec Fas, serait impliquée dans la régulation de l'apoptose médiée par Fas en contrôlant sa présence à la membrane.

7.3 Voie PI3K/Akt après exposition des HepG2 à la GF

Au cours de notre étude nous avons exploré l'éventuelle implication de la voie PI3K/Akt dans la réponse des HepG2 au stress toxique infligé par la GF. Les analyses de type western du niveau de phosphorylation de la protéine Akt ne montrent pas d'augmentation du niveau de pAkt après exposition à la GF, suggérant que la réponse cellulaire induite par le stress toxique n'implique pas la voie PI3K/Akt. La voie PI3K/Akt au centre du processus de survie cellulaire peut être activée suite à différents types de stress dans le but ultime de protéger la cellule contre la mort (Hatano and Brenner, 2001; West et al., 2002). Nos travaux suggèrent que la protection des cellules HepG2 contre le stress induit par la GF ne passe pas par l'activation de cette voie. Étant donné que pAkt est tout de même présente dans les cellules HepG2 avant et après traitement à la GF, nous avons exploré la possibilité d'interaction entre pAkt et les K8/18.

L'observation de la distribution de pAkt en microscopie à fluorescence avant et après traitement à la GF a révélé des particularités intéressantes. Les co-marquages immunofluorescents avec les composantes phosphorylées de la K8 (K8 pS73 et K8 pS431) ont mis en évidence la forte probabilité d'interactions entre pAkt et la K8 pS431 dans les HepG2. Cette observation est illustrée par la colocalisation constatée autant

dans les conditions normales de culture cellulaire qu'en situation de stress toxique. Nous avons de plus noté que, à l'instar de la K8 et de ses composantes phosphorylées, pAkt forme des agrégats irréguliers suite au traitement à la GF. La co-observation des K8 pS73 et K8 pS431 indique que les granules de K8 phosphorylés induits par la GF colocalisent avec ceux de pAkt, suggérant fortement que les agrégats de pAkt sont inclus dans ceux de K8 pS73/431. L'interaction observée entre la K8 pS431 et pAkt ne semble pas être affectée par le stress toxique induit par la GF. En revanche, la soudaine colocalisation de K8 pS73 avec pAkt, inexistante dans nos contrôles, nous amène à penser que les granules contenant la K8 pS431 et pAkt renferment également de la K8 pS73. Nous suggérons donc que l'agrégation des K8/18 conduit à la séquestration de pAkt dans des agrégats contenant les K8/18 qui pourraient correspondre aux CMs (voir partie 7.4). Ceci expliquerait la présence de pAkt au sein de ce qui pourrait être considéré comme des CMs au sein de cellules HepG2 traitées *in vitro* à la GF.

La protéine pAkt agit sur de nombreux substrats cellulaires intervenant dans l'apoptose afin d'inhiber ce processus de mort cellulaire (Hatano and Brenner, 2001; Song et al., 2005). Son action anti-apoptotique s'exerce, entre autre, sur la régulation de la voie pro-apoptotique Fas/Fas L. Certaines études ont en effet démontré l'implication de la voie PI3K/Akt tant dans le contrôle de l'expression de Fas que de son ligand. Des travaux réalisés dans le cadre d'étude sur la résistance de cellules tumorales à l'apoptose suggèrent que le niveau d'expression de Fas est sous le contrôle de facteurs de transcription (STAT 3, c-Jun) dont l'activation dépend de pAkt (Ivanov et al., 2002). Il est de plus reconnu que pAkt agit directement sur la phosphorylation de protéines de la famille Forkhead contrôlant ainsi leur disponibilité nucléaire pour la transcription du gène Fas L (Datta et al., 1999; Song et al., 2005). Les observations faites au cours de cette étude nous ont conduit à la supposition que le stress induit par la GF au sein des cellules HepG2 provoque la séquestration de pAkt. Nous avons de plus mis en évidence l'augmentation du taux d'apoptose parmi les cellules exposées à l'antifongique. Etant donné le rôle anti-apoptotique de pAkt, nous suggérons que son agrégation pourrait limiter sa disponibilité au sein de la cellule, affectant ainsi sa fonction de promotion de la survie cellulaire.

7.4 HepG2 comme modèle *in vitro* des CMs

L'analyse en microscopie électronique de l'ultrastructure des agrégats de K8/18 observés au cours de notre étude permettrait de déterminer si les similitudes avec les CMs ne se limitent pas à la présence de K8 phosphorylées. Cependant, nos observations nous amènent à proposer que les cellules HepG2 traitées de façon continue à la GF pourraient constituer un modèle *in vitro* intéressant dans le contexte d'études des mécanismes moléculaires menant à la formation des CMs.

Le traitement des cellules HepG2 à la GF induit des modifications dans l'expression et la phosphorylation des K8/18. Nos travaux ont en effet montré que ce stress provoquait une hausse du niveau d'expression et de phosphorylation des K8/18. Nous avons également montré que la GF provoque la réorganisation des filaments de kératines et la formation d'amas cytoplasmiques. Des expériences réalisées dans notre laboratoire (par Anne-Marie Fortier, B.Sc) ont montré qu'une grande proportion de ces agrégats de K8 contient de l'ubiquitine. Ceci nous amène à proposer que les amas de kératines observés au cours de nos expériences ressemblent aux CMs. Nos travaux sont donc en accord avec les observations faites antérieurement par Nakamichi et al. (2002).

Il est établi que la GF entraîne la formation d'inclusions morphologiquement et biochimiquement similaires aux CMs dans les hépatocytes de souris soumises à une diète en contenant. L'étude de la formation des CMs s'est, de façon importante, reposée sur l'étude des FIs dans des souris traitées oralement et de façon chronique à la GF, modèle animale par excellence dans le cadre d'études sur les CMs. Des études *in vitro* ont également été réalisées dans le cadre de la formation des CMs mais peu d'entre elles se sont appuyées sur la formation d'amas de cytokératines dans les hépatocytes en tant que réponse cellulaire à un stress d'ordre toxique. Les travaux réalisés au cours de ce projet ont mis en évidence l'effet toxique de la GF sur les cellules HepG2 révélant ainsi la possibilité que le traitement de ces cellules constituerait un modèle *in vitro* adéquat pour l'étude des CMs.

L'étude de la phosphorylation des K8/18 suite au traitement à la GF des cellules HepG2 suggère que l'hyperphosphorylation de la K8 S73, la K8 S431 et de la K18 S33, la K18 S52 constitue une réponse cellulaire importante causée par la présence de la GF. De nombreux travaux effectués *in vivo* sur des souris traitées à la GF ont établi que l'augmentation du niveau de phosphorylation des K8/18 sur l'un et l'autre des sites sérines est impliquée dans la réponse des hépatocytes à différents types de stress incluant ceux d'ordre toxique et mécanique (Fausther et al., 2004; Pekny and Lane, 2007; Toivola et al., 2004; Toivola et al., 2002). Nous avons de plus, suite à l'observation en microscopie à fluorescence des composantes phosphorylées de la K8, mis en évidence le fait que les amas de K8 contiennent de la K8 pS73 et de la K8 pS431. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle les amas de kératines formés suite au traitement des cellules HepG2 à la GF sont apparentés aux CMs. En effet, les CMs sont composés de K8/18 intactes, partiellement dégradées et/ou phosphorylées (Zatloukal et al., 2007). Nous proposons donc, à l'issue de cette étude, le traitement continu à la GF des cellules HepG2 comme modèle d'étude *in vitro* pour la formation des CMs.

CHAPITRE VIII

CONCLUSION ET PERSPECTIVE D'AVENIR

En définitive cette étude aura permis de mettre en évidence certains des mécanismes moléculaires pouvant être impliqués dans la fonction cytoprotectrice des K8/18, et plus particulièrement de la K8. La K8 ressort ici comme un facteur important dans la régulation de la localisation intracellulaire de Fas et de la protéine Akt. Ceci place donc la K8 comme un facteur clé dans la balance entre les signalisations pro- et anti-apoptotique primordiale dans la définition du devenir de la cellule face à un stress toxique. La phosphorylation de la K8 S431 apparaît comme le processus régissant les interactions de la K8 avec ces deux protéines.

La réorganisation des K8/18 consécutive au stress toxique induit par l'exposition des HepG2 à la GF affecte la distribution de Fas et de pAkt, et interfère donc avec sa capacité à réguler la localisation des ces protéines. Fas relocalisé à la membrane, suite à l'agrégation des K8/18, ainsi que la séquestration de pAkt au sein de granules de K8/18 tendent à rendre les cellules HepG2 plus susceptibles au processus d'apoptose. Ceci amène à déduire que la formation de CMs pourrait amoindrir la propriété cytoprotectrice des kératines suggérant ainsi que la formation de CMs aurait une influence néfaste pour la survie de la cellule. Au niveau cellulaire, la présence de CMs apparaît nocive mais la possibilité que la mort de cellules lésées par un stress toxique soit bénéfique à l'échelle tissulaire est à considérer.

A la lumière de l'implication de la K8 dans la régulation de l'apoptose via Fas, et de la survie cellulaire via son interaction avec pAkt, définir le rôle de la K18 semble la suite logique dans la compréhension de l'importance du réseau de FIs dans la protection des hépatocytes. Mais il paraît néanmoins essentiel de préciser la nature de l'interaction de la K8 avec les protéines Fas et pAkt par des techniques plus précises que la microscopie. La présente étude constitue une base pour des travaux reposant sur l'inhibition des K8/18 via la technique des ARN interférence et la modulation de leur expression afin de préciser le rôle des K8/18 dans la protection cellulaire contre le stress toxique.

L'utilisation de traitements pro- ou anti-apoptotiques pourrait également fournir des informations précieuses. Ceci permettra ultimement de mieux cerner l'impact de la formation des CMs dans les cellules et ainsi de définir de quelle façon il conviendrait de les exploiter pour traiter l'hépatite alcoolique.

BIBLIOGRAPHIE

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P eds (2002) *Biologie Moléculaire de la cellule*. Médecine-Sciences/Flammarion, p 692.
- Allen S, Sotos J, Sylte MJ, Czuprynski CJ (2001) Use of Hoechst 33342 Staining To Detect Apoptotic Changes in Bovine Mononuclear Phagocytes Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 8(2):460-464.
- Ballou LM, Cross ME, Huang S, McReynolds EM, Zhang B-X, Lin RZ (2000) Differential Regulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and p70 S6 Kinase Pathways by the 1A-Adrenergic Receptor in Rat-1 Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 275(7):4803-4809.
- Bardag-Gorce F, Francis T, Nan L, Li J, Lue YH, French BA, French SW (2005) Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease
Life Sciences 77(20):2594-2602
- Bauman P, Dalton W, Anderson J, Cress A (1994) Expression of Cytokeratin Confers Multiple Drug Resistance. *PNAS* 91(12):5311-5314.
- Boller K, Kemler R, Baribault H, Doetschman T (1987) Differential distribution of cytokeratins after microinjection of anti-cytokeratin monoclonal antibodies. *European journal of Biology* 43(3):459-468.
- Cadrin M, Brown DL, Reuhl KR (1993) Effects of Environmental Toxicants on the Cytoskeleton. *HandBook of Hazardous Materials*:233-239.
- Cadrin M, Hovington H, Marceau N, McFarlane-Anderson N (2000) Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver *Journal of Hepatology* 33(2):199-207.
- Caulín C, Salvesen GS, Oshima RG (1997) Caspase Cleavage of Keratin 18 and Reorganization of Intermediate Filaments during Epithelial Cell Apoptosis *JCB* 138(6).
- Chevallier M (1995) Fibrose hépatique : des mécanismes aux stratégies thérapeutiques. *Hépatogastro* 2(1):13-15.
- Chou C, Omary M (1991) Phorbol acetate enhances the phosphorylation of cytokeratins 8 and 18 in human colonic epithelial cells. *FEBS letters* 282(1):200-204.

- Chou Y-H, Flitney FW, Chang L, Mendez M, Gin B, Goldman RD (2007) The motility and dynamic properties of intermediate filaments and their constituent proteins. *Experimental Cell Research*.
- Cooper GM ed (1999) *LA CELLULE: une approche moléculaire*. 1ère ed. De Boeck Université.
- Coulombe PA, Omary MB (2002) 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments *Current Opinion in Cell Biology* 14:110-122.
- Dash P (2004) Cell death. Reproductive and Cardiovascular Disease Research Group, <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/receptors.htm>, London.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *GENES & DEVELOPMENT* 13:2905-2927.
- Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G (2003) The signaling adaptators and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14:193-209.
- Denk H, Eckerstorfer R (1977) Colchicine-induced Mallory body formation in the mouse. *Laboratory investigation* 36(6):563-565.
- Denk H, Gschnait F, Wolff K (1975) Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 32(6):773-776.
- Denk H, Stumptner C, Zatloukal K (2000) Mallory bodies revisited. *Journal Of Hepatology* 32(4):689-702.
- Develoux M (2001) Griseofulvin. *Annual Dermatology Venereology* 127:1317-1325.
- Eichhorst S (2005) Modulation of apoptosis as a target for liver disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 9(1):83-99.
- Fausther M, Villeneuve L, Cadrin M (2004) Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice. *Comparative Hepatology*:3-5.
- Feldman G (1999) Le Concept d'apoptose. *Revue Française de Laboratoires* 311:27-30.

- Fulda S, Küfer M, Meyer E, Valen Fv, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin K (2001) Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20(41):5865-5877.
- Gehring WJ, Wehner R eds (1999) *Biologie et Physiologie Animales*. 23e ed. De Boeck Université.
- Gilbert S, Loranger A, Daigle N, Marceau N (2001) Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation *JCB* 154(4):763-776.
- Goldberg AL (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins *NATURE* 426(6968):895-899.
- Goldman RD, Ghou Y-H, Prahlad V, Yoon M (1999) Intermediate filaments: dynamic processes regulating their assembly, motility, and interactions with other cytoskeletal systems. *FASEB Journal* 13(suplement 1999):S261-S265.
- Goodlett CR, Horn KH (2001) Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Research & Health* 25(3):175-184.
- Gupta S (2005) Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging. *Immunological Reviews* 205:114-129.
- Haber PS, Warner R, Seth D, Gorrell MD, Mccaughan GW (2003) Pathogenesis and Management of Alcoholic Hepatitis. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* 18(12):1332-1344.
- Harrington C (1990) Lowry protein assay containing sodium dodecyl sulfate in microtiter plates for protein determinations on fractions from brain tissue. *Analytic Biochemistry* 186(2):285-287.
- Hatano E, Brenner DA (2001) Akt protects mouse hepatocytes from TNF-- and Fas-mediated apoptosis through NK-B activation *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 281(6):G1357-G1368.
- Howlett DR (2003) Protein Misfolding in Disease: Cause or Response? *Current Medecinal Chemistry – Immunological, Endocrine & Metabolic Agents* 3:371-383.
- Hu BR, Liu CL, Ouyang Y, Blomgren K, Siesjö BK (2000) Involvement of Caspase-3 in Cell Death After Hypoxia-Ischemia Declines During Brain Maturation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 20:1294-1300.
- Hyduk SJ, Cybulsky MI (2002) 4 Integrin Signaling Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase and Stimulates T Cell Adhesion to Intercellular Adhesion Molecule-1 to

a Similar Extent As CD3, but Induces a Distinct Rearrangement of the Actin Cytoskeleton. *Journal of Immunology* 168:696-704.

Inagaki IlaM (2006) Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments : A study using site and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci* 2006 97(3):167-174.

Ivanov VN, Krasilnikov M, Ronais Ze (2002) Regulation of Fas Expression by STAT3 and c-Jun Is Mediated by Phosphatidylinositol 3Kinase-Akt Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 277(7):4932-4944.

Kamitani T, Nguyen HP, Yeh ETH (1997) Activation-induced Aggregation and Processing of the Human Fas Antigen. *Journal of Biological Chemistry* 272(35):22307-22314.

Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, M. Grazia Di Corcia, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E (2002) Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review). *International Journal of Oncology* 21:165-170.

Kaushal GP, Liu L, Kaushal V, Hong X, Melnyk O, Seth R, Safirstein R, Shah SV (2004) Regulation of caspase-3 and -9 activation in oxidant stress to RTE by forkhead transcription factors, Bcl-2 proteins, and MAP kinases *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 287:1258-1268.

Kierszenbaum ed (2002) *Histologie et Biologie cellulaire*. de Boeck, pp 459-465.

Kim K, Marchuk D, Fuchs E (1984) Expression of unusually large keratins during terminal differentiation: balance of type I and type II keratins is not disrupted. *JCB* 99(5):1872-1877.

Kim S, Wong P, Coulombe P (2006) A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *NATURE* 441(7091):362-365.

Ku N-O, Darling JM, Krams SM, Esquivel CO, Keefe EB, Sibley RK, Lee YM, Wright TL, Omary MB (2003a) Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies *PNAS* 100(10):6063-6068.

Ku N-O, Michie S, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB (2002) Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *PNAS* 99(7):4373-4378.

Ku N-O, Michie SA, Soetikno RM, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB (1998a) Mutation of a Major Keratin Phosphorylation Site Predisposes to Hepatotoxic Injury in Transgenic Mice *JCB* 143(7):2023-2032.

- Ku N-O, Michie SA, Soetikno RM, Resurreccion EZ, Broome RL, Oshima RG, Omary MB (1996) Susceptibility to Hepatotoxicity in Transgenic Mice That Express a Dominant-Negative Human Keratin 18 Mutant *Journal of Clinical Investigation* 98(4):1034-1046.
- Ku N-O, Omary MB (1994) Identification of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 18 : Potential kinases and role in filament organization. *JCB* 127(1):161-171.
- Ku N-O, Omary MB (2000) Keratins Turn Over by Ubiquitination in a Phosphorylation-modulated Fashion. *JCB* 149(3):547-552.
- Ku N-O, Omary MB (2001) Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation. *Journal of Biological chemistry* 276(29):26792-26798.
- Ku N-O, Omary MB (2006) Disease and Phosphorylation related non mechanical function for keratin 8. *JCB* 174(1):115-125.
- Ku N-O, Soetikno RM, Omary MB (2003b) Keratin mutation in transgenic mice predisposes to Fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology* 7(5):1006-1014.
- Ku N-O, Zhou X, Toivola DM, Omary MB (1999) The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277(Issue 6): G1108-G1137.
- Ku N, Michie S, Oshima R, Omary M (1995) Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. *JCB* 131(5):1303-1314.
- Ku N, Omary M (1997) Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431. *Journal of Biological Chemistry* 272(11):7556-75664.
- Ku NO, Liao J, Omary MB (1998b) Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *The EMBO Journal* 17(7):1892-1906.
- Lee E-R, Kang Y-J, Kim J-H, Lee HT, Cho S-G (2005) Modulation of Apoptosis in HaCaT Keratinocytes via Differential Regulation of ERK Signaling Pathway by Flavonoids. *The Journal of Biological Chemistry* 280(36):31498–31507.
- Liao J, Ku N-o, Omary MB (1997) Stress, Apoptosis and Mitosis Induce Phosphorylation of Human Keratin 8 at Ser-73 in Tissues and Cutured Cells. *Journal of Biological Chemistry* 272(28):17565-15573.

- Magin TM, Reichelt J, Hatzfeld M (2004) Emerging functions: diseases and animal models reshape our view of the cytoskeleton. *Experimental Cell Research* 301:91-102.
- Magin TM, Schröder R, Leitgeb S, Wanninger F, Zatloukal K, Grund C, Melton DW (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. *JCB* 140(6):1441-1451.
- Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE (2007) Structural and regulatory functions of keratins. *Experimental Cell Research*.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ (2006) Apoptosis and necrosis in the liver: A tale of two deaths? *Liver Biology and Pathobiology* Volume 43(Issue S1):S31-S44.
- Marceau N, Loranger A, Gilbert S, Daigle N, Champetier S (2001) Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease. *Biochemistry Cell Biology* 79:543-555.
- Marceau N, Schutte B, Gilbert S, Loranger A, Henfling MER, Broers JLV, Mathew J, Ramaekers FCS (2007) Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. *Experimental Cell Research*.
- Micheau O, Hammann A, Solary E, Dimanche-Boitrel M (1999) STAT-1-independent upregulation of FADD and procaspase-3 and -8 in cancer cells treated with cytotoxic drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256(3):603-607.
- Minana J, Gomes-Gambroner L, Lloret A, Pallardò FV, Olmo JD, Escudero A, Rodrigo JM, Pellin A, Vina JR, Vina J, Sastre J (2002) Mitochondrial Oxidative Stress and CD95 Ligand: A Dual Mechanism for Hepatocyte Apoptosis in Chronic Alcoholism. *Hepatology*:1206-1214.
- Mir L, Oustrin M-L, Lecointe P, Wright M (1978) Correlation between the in vivo effects of some griseofulvin derivatives and their in vitro interactions with mammalian microtubules. *FEBS Letters* 88(2):259-263.
- Mollinedo F, Gajate C (2006) Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: New targets for apoptosis-directed cancer therapy *Drugs Resistance Updates* 9(1-2):51-73.
- Nakamichi I, Hatakeyama S, Nakayama KI (2002) Formation of Mallory Body-like Inclusions and Cell Death Induced by Dereglated Expression of Keratin 18 *Molecular Biology of Cell* 13(10):3441-3451.
- Natori S, Rust C, Stadheim LM, Srinivasan A, Burgart LJ (2001) Hepatocyte apoptosis is a feature of human alcoholic hepatitis *Journal of Hepatology* 34:248-253.

- Negron G, Eckert BS (2000) Role of Phosphorylation in Ethanol-Induced Aggregation of Keratin Intermediate Filaments. . *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 24(9):1343-1352.
- Ockner RK (2001) Apoptosis and liver diseases: Recent concepts of mechanism and significance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 16:248-260.
- Okada H, Mak TW (2004) Pathways of apoptotic and non apoptotic death in tumour cells. *NATURE* 4:592-603.
- Okulicz JF, Kihiczak NI, Janniger CK (2002) Epidermolysis Bullosa Simplex. *Pediatric Dermatology* 70:19-21.
- Omary M, Ku N, Liao J, Price D (1998) Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcellular Biochemistry*. 31:105-140.
- Omary MB, Ku N-O, Tao G-Z, Toivola DM, Liao J (2006) 'Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *TRENDS in Biochemical sciences* 31(7):383-394.
- Omary MB, Ku N-O, Toivola D (2002) Keratins : Guardians of the Liver. *Concise review* 35(2):251-257.
- Oshima R (2002) Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Death and Differentiation* 9:48-492.
- Panda D, Rathinasamy K, Santra MK, Wilson L (2005) Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: Implications for its possible use in the treatment of cancer. *Medical Science* 102(28):9878-9883.
- Paramio J ed (2006) *Intermediate Filaments, CHAPTER 8: Simple Epithelial Keratins; Expression, Function and Disease*. . Landes Bioscience et Springer Science+Business Media. pp 110-119.
- Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, Jorcano JL (2001) Inhibition of Protein Kinase B (PKB) and PKC Mediates Keratin K10-Induced Cell Cycle Arrest Molecular and Cellular Biology 21(21):7449-7459.
- Parry DAD, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U, Hermann H (2007) Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Experimental Cell Research*.
- Pei R-J, Danbara N, Tsujita-Kuytoku M, Yuri T, Tsubura A (2004) Immunohistochemical profiles of Mallory body by a panel of anti-cytokeratin antibodies. *Med Electron Microsc* 37:114-118.

- Pekny M, Lane EB (2007) Intermediate filaments and stress. *Experimental Cell Research*.
- Reichelt J, Magin TM (2002) Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma but no cell fragility in keratin-10-null mice. *Journal of Cell Science* 115(2639-2690).
- Ricci J-E (2000) Rôle de la tyrosine kinase p59fyn et des protéines du choc thermique dans l'apoptose induite par l'engagement des récepteurs de mort et du récepteur T. Thèse de doctorat. Université de Nice - Sophia Antipolis
- Riley NE, Li J, McPhaul LW, Bardag-Gorce F, Lue YH, French SW (2003) Heat shock proteins are present in mallory bodies (cytokeratin aggresomes) in human liver biopsy specimens *Experimental and Molecular Pathology* 74(2):168-172.
- Rosenquist M (2003) 14-3-3 proteins in apoptosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36(4):403-408.
- Ryan AE, Lane S, Shanahan F, O'Connell J, Houston AM (2006) Fas ligand expression in human and mouse cancer cell lines; a caveat on over-reliance on ARNm data. *Journal of Carcinogenesis* 5(5).
- Salmhofer H, Rainer I, Zatloukal K, Denk H (1994) Posttranslational events involved in griseofulvin-induced keratin cytoskeleton alterations. *Hepatology* 20(3):731-740.
- Schiff ed (2006) *SCHIFF'S Diseases of the Liver*. vol 2 10th ed.
- Schutte B, Henfling M, Kolgen W, Bouman M, Stephan Meex a, Leers MPG, Nap M, Bjorklund V, Bjorklund P, Bjorklund B, Lane EB, Omary MB, Jornvall H, Ramaekers FCS (2004) Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Experimental Cell Research* 297(1):11 – 26.
- Secko D (2003) Protein Phosphorylation: A Global Regulator of Cellular Activity. *The science creative quarterly*, <http://www.scq.ubc.ca/?p=372>.
- Shweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DAD, Rogers MA, W.Wight M (2006) New consensus nomenclature for mammalian keratins. *JCB: COMMENT* 174(2):169-174.
- Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9(1):59-71.
- Song P, Wei J, Plummer H, Wang H-CR (2004) Potentiated caspase-3 in Ras-transformed 10T1/2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322:557-564.

- Srinivasula SM, Ahmad M, Guo Y, Zhan Y, Lazebnik Y, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1999) Identification of an Endogenous Dominant-Negative Short Isoform of Caspase-9 That Can Regulate Apoptosis. *Cancer Research* 59(5):999-1002.
- Stumptner C, Omary MB, Fickert P, Denk H, Zatloukal K (2000) Hepatocyte Cytokeratins are Hyperphosphorylated at Multiple Sites in Human Alcoholic Hepatitis and in a Mallory Body Mouse Model. *American Journal of Pathology* 156:77-90.
- Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, Perhac JS, Hill B, Coover DD, Schussler K, Chen X, Jarecki J, Burghes AHM, Taylor JP, Fischbeck KH (2003) Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Annual Neurology* 54(5):647-654.
- Suzuki A, Hayashida M, Kawano H, Sugimoto K, Nakano T, Shiraki K (2000) Hepatocyte Growth Factor Promotes Cell Survival From Fas-Mediated Cell Death in Hepatocellular Carcinoma Cells via Akt Activation and Fas-Death-Inducing Signaling Complex Suppression. *Hepatology* 32(4):796-802.
- Tantini B, Pignatti C, Fattori M, Fiumana E, Facchini A, C. Stefanelli I, Caldarella CM, Pegg AE, Flamigni F (2004) Polyamine depletion inhibits etoposide-induced NF- κ B activation in transformed mouse fibroblasts. *Amino Acids* 27:207-214.
- Tao G-Z, Kirby C, Whelan SA, Rossi F, Bi X, MacLaren M, Gentlen E, O'Neill RA, Hart GW, Omary MB (2006) Reciprocal keratin 18 Ser48 O-GlcNAcylation and Ser52 phosphorylation using peptide analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351:708-712.
- Tao G-Z, Toivola DM, Zhong B, Michie SA, Resurreccion EZ, Tamai Y, Taketo MM, Omary MB (2003) Keratin-8 null mice have different gallbladder and liver susceptibility to lithogenic diet-induced injury. *JCB* 116(22):4629-4638.
- Toivola D, Omary M, Ku N, Peltola O, Baribault H, Eriksson J (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* 1:116-128.
- Toivola D, Tao G, Habtezion A, Liao J, Omary M (2005) Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* 15(11):608-617.
- Toivola DM, Ku N-O, Resurreccion E, Nelson DR, Wright TL, Omary MB (2004) Keratin 8 and 18 Hyperphosphorylation Is a Marker Progression of Human Liver Disease. *Hepatology*:459-466.

- Toivola DM, Zhou Q, English LS, Omary MB (2002) Type II Keratins Are Phosphorylated on a Unique Motif during Stress and Mitosis in Tissues and Cultured Cells *Molecular Biology of Cell* 13:1857-1870.
- Tzivion G, Luo Z-J, Avruch J (2000) Calyculin A-induced Vimentin Phosphorylation Sequesters 14-3-3 and Displaces Other 14-3-3 Partners in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 275(38):29772-29778.
- Vacheret N (1999) *Histologie fonctionnelle des organes*.
- Vermeir M, Annaert P, Mamidi RN, Roymans D, Meuldermans W, Mannens G (2005) Cell-based models to study hepatic drug metabolism and enzyme induction in humans. *Experimental Opinion Drug Metabolism and Toxocology* 1(1):75-90.
- Vierstraete A (1999) Principle of the PCR, <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. University Of Ghent.
- Wajant H ed (2006) *Fas signaling*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp 13-27, pp 103-105.
- Walsh K, Alexander G (2000) Alcoholic liver disease. *Postgraduate Medicine Journal* 76.
- Watanabe N, Tsukada N, Smith CR, Phillips MJ (1991) Motility of Bile Canaliculi in the Living Animal: Implications for Bile Flow. *JCB* 113(5):1069-1080.
- West KA, Castillo SS, Dennis PA (2002) Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance *Drug Resistance Updates* 5(6):234-248.
- Wolff AA, Nechaud BBd, Chillet DD, Gros FF (1988) The aminoterminal domain of alpha-tubulin probed by monoclonal antibodies. Recognition of a rarely exposed epitope by the monoclonal antibody 111 B52 C2. *Biology of the Cell* 63:319-326.
- Yano H, Fukuda K, Haramaki M, Momosaki S, Ogasawara S, Higaki K, Kojiro M (1996) Expression of Fas and anti-Fas-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Journal of Hepatology* 25:454-463.
- Yokoo H, Harwood T, Racker D, Arak S (1982) Experimental production of Mallory bodies in mice by diet containing 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine. *Gastroenterology* 83(1 pt 1):109-113.
- Yotsuyanagi H, Shintani Y, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K (1998) Regulation of Fas gene expression in HeLa cells as determined by modified RT-PCR. *Cellular and Molecular Life Science* 24:186-190.

- Zakim, Boyer eds (2006) *HEPATOLOGY, A Textbook of Liver Disease*. vol 1 5th ed. SAUNDERS Elsevier, pp 6-17.
- Zatloukal K, French SW, Stumptner C, Strnad P, Hanada M, Toivola DM, Cadrin M, Omary MB (2007) From mallory to mallory-denk inclusions bodies : what, how and why ? . *Experimental Cell Research*
- Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Fickert P, Lackner C, Trauner M, Denk H (2004) The keratin cytoskeleton in liver diseases
Journal of pathology 204(4):367-376.
- Zatloukal K, Stumptner C, Lehner M, Denk H, Baribault H, Eshkind LG, Franke WW (2000) Cytokeratin 8 Protects from Hepatotoxicity, and Its Ratio to Cytokeratin 18 Determines the Ability of Hepatocytes to Form Mallory Bodies *American Journal of Pathology* 156(4):1263-1274.