

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

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

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

**PAR  
MARTIN DÉSAULNIERS, B. Sc.**

**PROTÉINES KINASES ACTIVÉES PAR LE STRESS,  
PHOSPHORYLATION DE LA SÉRINE 79 DE LA KÉRATINE 8 ET  
APOPTOSE DANS LA RÉPONSE DES HÉPATOCYTES DE  
SOURIS TRAITÉES À LA GRISÉOFULVINE**

**AVRIL 2005**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

## REMERCIEMENTS

Je remercie du fond du cœur toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à atteindre mes objectifs académiques et compléter mon projet de maîtrise. Je tiens spécialement à remercier ma directrice de recherche, madame Monique Cadrin Ph.D. qui m'a permis de poursuivre mes études à la maîtrise dans son laboratoire et qui a toujours fait en sorte que mon travail soit fait dans un milieu agréable, stimulant et enrichissant.

Je remercie également Kathleen Riopel qui a été une merveilleuse collègue de travail, mon guide dans l'apprentissage de nouvelles techniques ainsi que mon soutien moral dans les périodes difficiles. Je remercie aussi mes autres collègues, Michel Fausther et Anne-Marie Fortier avec qui j'ai partagé la vie de laboratoire pendant la maîtrise.

De plus, je tiens à souligner le travail extraordinaire des professeurs qui m'ont permis d'utiliser leurs matériels, qui m'ont dépanné en cas de besoin ou qui m'ont simplement fait sourire par leur agréable compagnie.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis qui m'ont encouragé et supporté tout au long de mes deux années de maîtrise.

## RÉSUMÉ

Plusieurs maladies du foie, comme l'hépatite alcoolique, sont accompagnées par la formation d'agrégats protéiques nommés Corps de Mallory (CMs). Ces CMs sont principalement constitués par les protéines de filaments intermédiaires (FIs) retrouvées dans les hépatocytes, les kératines 8 et 18 (K8/18). La formation de ces corps d'inclusions cytoplasmiques résulte généralement d'un stress comme l'exposition chronique à un agent hépatotoxique.

Des souris nourries avec une diète contenant de la griséofulvine (GF), développent dans leurs hépatocytes des CMs similaires à ceux retrouvés chez des patients humains. Ceci constitue donc un modèle idéal pour l'étude du développement des CMs *in vivo* en situation de stress toxique. Des études précédentes ont montré que l'intoxication à la GF mène à des modifications de l'expression, de l'organisation et de la phosphorylation des K8/18.

Des études ont proposé que la phosphorylation des kératines serait impliquée dans la réorganisation du réseau de FIs ainsi que dans la formation des CMs dans les hépatocytes. Le site de phosphorylation le plus phosphorylé lors du développement des CMs chez l'homme est la sérine 73 de la K8 (K8 Ser73). Son équivalent chez la souris est la K8 Ser79. Il a été démontré, chez des cultures cellulaires, que la K8 Ser73 peut être phosphorylée par les MAPKs p38 et JNK chez des cellules HT-29 (carcinomes de colon humain).

Le premier objectif de cette étude était de caractériser l'implication de p38 et JNK dans la phosphorylation de la K8 Ser79 pendant la réponse des hépatocytes de souris au stress induit par le traitement à la GF *in vivo*. Le deuxième objectif de ce projet de recherche était de définir les relations entre la phosphorylation de la K8 Ser79, l'apoptose et l'activité des kinases p38 et JNK.



Ces objectifs ont été réalisés à l'aide des techniques d'électrophorèse SDS-PAGE, d'immunoprécipitation, d'immunobuvardage de type Western, de double marquage par immunofluorescence et de la méthode de TUNEL pour la détection de cellules en apoptose.

Nos résultats ont montré que le niveau de JNK n'est pas influencé par le traitement à la GF. Cependant, l'expression de la forme active de p38 augmente suite à ce traitement. Les études d'immunoprécipitation ne nous ont pas permis d'observer une association entre les kératines et les kinases p38 et JNK. Les études d'immunofluorescences nous ont par contre révélé une colocalisation entre la K8 Ser79 phosphorylée (K8 pSer79) et p38 dans les hépatocytes en mitose. Cependant, la kinase responsable de la phosphorylation de la K8 pSer79 chez les souris traitées à la GF n'a pas été identifiée. Nous avons également démontré que des hépatocytes en apoptose sont fréquemment retrouvés au centre d'amas cellulaire contenant la K8 pSer79. Cependant, ces cellules apoptotiques ne contiennent pas de K8 pSer79, tandis que les cellules autour de celles-ci, contenant la K8 Ser73, ne sont jamais en apoptose.

L'ensemble de nos résultats nous ont mené à suggérer que les hépatocytes en apoptose, contenus dans la zone endommagée au centre des amas de cellules contenant la K8 pS79, seraient le point de départ d'un signal de transduction dirigé vers les hépatocytes entourant la zone endommagée. Ce signal aurait comme rôle d'induire un mécanisme de défense contre la mort cellulaire programmée. Nos résultats démontrent que ce mécanisme de défense est caractérisé par la phosphorylation de la K8 S79. Nos perspectives d'avenir sont d'identifier les acteurs impliqués dans ce signal de transduction et leur relation avec les K8/18 dans le foie des souris traitée à la GF.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES.....</b>	<b>IX</b>
<b>CHAPITRE 1.....</b>	<b>1</b>
<b>LE FOIE ET LES HÉPATITES.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>LE FOIE :</i> .....	1
1.2 <i>LES HÉPATITES :</i> .....	2
1.3 <i>LES CORPS DE MALLORY :</i> .....	3
<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>6</b>
<b>CYTOSQUELETTE, FILAMENTS INTERMÉDIAIRES ET KÉRATINES.....</b>	<b>6</b>
2.1 <i>CYTOSQUELETTE :</i> .....	6
2.2 <i>LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES :</i> .....	6
2.3 <i>LES KÉRATINES :</i> .....	8
2.4 <i>STRUCTURES DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES :</i> .....	9
2.5 <i>POLYMÉRISATION DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES :</i> .....	10
2.6 <i>RÉGIONS TERMINALES DES FIs :</i> .....	12
2.7 <i>RÔLES DES FIs :</i> .....	14
<b>CHAPITRE 3.....</b>	<b>16</b>
<b>HÉPATOCYTES ET FILAMENTS INTERMÉDIAIRES.....</b>	<b>16</b>
3.1 <i>LES KÉRATINES DANS LES HÉPATOCYTES :</i> .....	16
3.2 <i>KÉRATINES ET PROTECTION DES HÉPATOCYTES :</i> .....	18
3.3 <i>PHOSPHORYLATION DES KÉRATINES :</i> .....	20
3.4 <i>PHOSPHORYLATION DE LA SÉRINE 73 DE LA K8 :</i> .....	23
3.5 <i>Les MAPKs :</i> .....	24
3.6 <i>p38 MAPK :</i> .....	25
3.7 <i>SAPKs/JNK :</i> .....	28
3.8 <i>Phosphorylation de K8 S73 par p38 et JNK :</i> .....	31
<b>CHAPITRE 4.....</b>	<b>34</b>
<b>APOPTOSE ET FILAMENTS INTERMÉDIAIRES DE KÉRATINES.....</b>	<b>34</b>
4.1 <i>APOPTOSE, CASPASES ET KÉRATINES:</i> .....	34
4.2 <i>TUMOR NECROSIS FACTOR ET KÉRATINES:</i> .....	36
4.3 <i>Fas ET KÉRATINES:</i> .....	37
4.4 <i>SYSTÈME UBIQUITINE-PROTÉASOME:</i> .....	38
<b>CHAPITRE 5.....</b>	<b>40</b>
<b>MODÈLE ANIMAL ET HÉPATITE ALCOOLIQUE.....</b>	<b>40</b>

5.1 MODÈLE ANIMAL:.....	40
5.2 LA GRISÉOFULVINE : .....	41
<b>CHAPITRE 6.....</b>	<b>43</b>
PROJET DE RECHERCHE .....	43
6.1 TRAVAUX ANTÉRIEURS ET HYPOTHÈSES : .....	43
6.2 OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE : .....	44
<b>CHAPITRE 7.....</b>	<b>45</b>
CORPS DU TRAVAIL .....	45
7.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE : .....	45
7.2 ARTICLE SCIENTIFIQUE : .....	47
<b>CHAPITRE 8.....</b>	<b>75</b>
DISCUSSION .....	75
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>84</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>TABLEAU 2.1 : Caractéristiques des protéines de filaments intermédiaires.....</b>	<b>7</b>
<b>TABLEAU 2.2 : Kératines exprimées dans différents tissus.....</b>	<b>8</b>
<b>TABLEAU 2.3 : Maladies causées par une mutation sur les kératines.....</b>	<b>15</b>
<b>TABLEAU 3.1 : Effet de la délétion ou d'une mutation de la kératine 8 ou 18 chez la souris.....</b>	<b>16</b>
<b>TABLEAU 3.2 : Effet du stress dans les hépatocytes de souris transgéniques.....</b>	<b>18</b>
<b>TABLEAU 3.3 : Phosphorylation des K8/18 associée à certain événement cellulaire .....</b>	<b>23</b>
<b>TABLEAU 5.1 : Structure chimique de la GF.....</b>	<b>40</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>FIGURE 1.1 : ÉLÉMENTS DU LOBULE HÉPATIQUE.</b> .....	2
<b>FIGURE 2.1 : SCHÉMA DE LA STRUCTURE DES PROTÉINES DE IFS</b> <b>CYTOPLASMIQUES (A) ET NUCLÉAIRES (B).</b> .....	10
<b>FIGURE 2.2 : ASSEMBLAGE DE DEUX PROTÉINES DE FIS.</b> .....	11
<b>FIGURE 2.3 : MODÈLE D'ASSOCIATION DES TÉTRAMÈRES DE FIS.</b> .....	11
<b>FIGURE 3.1 : SITES DE PHOSPHORYLATION DES K8/18 CARACTÉRISÉS.</b> ....	22
<b>FIGURE 3.2 : PRINCIPALES VOIES D'ACTIVATION DES MAPKS.</b> .....	25
<b>FIGURE 3.3 : VOIES DE SIGNALISATION ACTIVANT P38 MAPK.</b> .....	27
<b>FIGURE 3.4 : VOIES DE SIGNALISATION ACTIVANT P38 MAPK.</b> .....	30
<b>FIGURE 4.1 : CASPASES ET APOPTOSE</b> .....	35
<b>FIGURE 5.1 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA GF</b> .....	42

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

A	Alanine
ACT	Acétaminophène
BHK	Baby hamster kidney
C	Cystéine
CAAX	Séquences propres aux filaments intermédiaires nucléaires
ConA	Concanavaline A
CMs	Corps de Mallory
C3H	Patrimoine génétique spécifique à une lignée de souris
C57/B16	Patrimoine génétique spécifique à une lignée de souris
D	Aspartate
DDC	3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine
E	Glutamate
EBS	Épidermolyse bulleuse simple
ERKs	Extracellular signal-regulated kinases
Fas-R	Récepteur de Fas
FIs	Filaments intermédiaires
FVB/n	Patrimoine génétique spécifique à une lignée de souris
GF	Griséofulvine
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HSP 27	Heat shock protein 27
IL-1	Interleukine-1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
K8	Kératine 8
K8/18	Paire formée par l'assemblage des kératines 8 et 18
K8 pS73	Kératine 8 phosphorylée au niveau de la sérine en position 73
K8 R89C	Kératine 8 mutée avec l'arginine en position 89 remplacée par une cystéine
L	Leucine
LT- $\beta$ R	Récepteur de la lymphotoxine- $\beta$

MAPKKKs	Mitogen-activated protein kinases kinases kinases
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases
MFs	Microfilaments
Mm 120-1	Molecular marker 120-1
MMS	Méthyl méthane sulfonate
MPM-2	Mitotic phosphoproteins marker 2
MTs	Microtubules
NF-H	Neurofilaments de haut poids moléculaire
NF-L	Neurofilaments de poids moléculaire léger
NF-M	Neurofilaments de poids moléculaire moyen
nm	Nanomètres
% p/p	Pourcentage poids pour poids
pI	Point isoélectrique
PM	Poids moléculaire
R	Arginine
S	Sérine
SAPKs	Stress-activated protein kinases
SNL	Signal de localisation nucléaire
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TNF	Tumor necrosis factor
TNF-r	Récepteur du tumor necrosis factor
TRADD	TNFr1-associated death domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TUNEL	Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated d'UTP nick end labeling
UV	Ultraviolet
V	Valine

# INTRODUCTION

## CHAPITRE 1

### *Le foie et les hépatites*

#### 1.1 LE FOIE :

Annexe à l'intestin grêle, le foie est une glande amphicrine (qui assure des fonctions endocrines et exocrines) représentant un des organes les plus importants du corps humain. Le foie est une glande exocrine pour ce qui est de la sécrétion de la bile puisqu'elle est acheminée par les canaux biliaires vers le duodénum. Le foie se comporte aussi comme une glande endocrine puisque les produits métabolisés sont, pour la plupart, déversés dans le sang. L'albumine, un facteur de coagulation synthétisé exclusivement par le foie, est un bon exemple de produit synthétisé par le foie et excrété dans le sang. Environ 70 % des cellules du foie sont des hépatocytes regroupées sous la forme de lobules hépatique entourant une veine centrolobulaire (figure 1.1). Les lobules hépatiques possèdent à leur périphérie des interstices nommés espace de Kiernan ou espaces portes. Ces espaces sont le lieu de rencontre des branches de l'artère hépatique, de la veine porte et des canalicules biliaires.

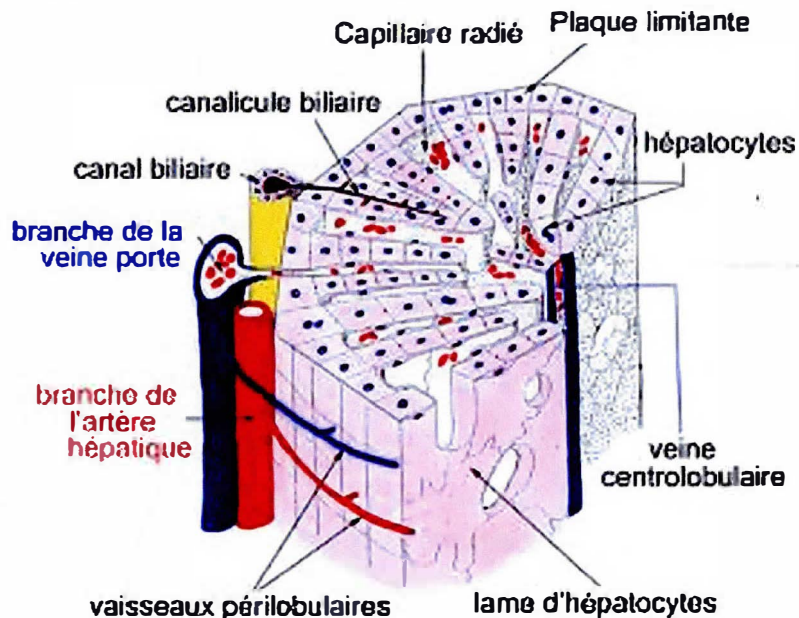
Parmi les autres cellules retrouvées dans le foie, on retrouve les cellules de Küpffer qui sont des macrophages responsables de la défense du foie en assurant la phagocytose des bactéries, virus, particules étrangères et des débris cellulaires. Le stockage des lipides et de la vitamine A est assuré par les cellules de Ito. Les cellules ovales sont impliquées dans la régénération hépatique. Les capillaires sinusoides sont recouverts par des cellules endothéliales tandis que les cellules épithéliales recouvrent les canaux biliaires (Vacheret 1999).

Les principales fonctions du foie sont de filtrer le sang chargé de nutriments, de convertir les sucres en énergie utilisable par l'organisme, d'entreposer du glucose et les lipides, de synthétiser et sécréter la bile, de synthétiser de nombreuses substances physiologiques comme les vitamines et les facteurs de coagulation. Le foie est aussi



responsable du métabolisme, de la clairance de l'excrétion des médicaments en filtrant le sang des substances toxiques et les dégradent par voies enzymatiques.

## Schéma du lobule hépatique



**FIGURE 1.1 : Éléments du lobule hépatique.**

Tiré de : (Vacheret 1999)

## 1.2 LES HÉPATITES :

L'hépatite est une des maladies les plus courantes du foie. L'origine de l'hépatite peut être variée. En effet, elle peut être causée par une infection virale (virus A, B, C, D, E, F, G, et virus d'Epstein Barr), une infection bactérienne (tuberculose et leptospirose), ou une exposition massive ou chronique à des substances toxiques comme les médicaments (tétracyclines, le paracétamol et l'aspirine) et l'alcool (hépatite alcoolique).

L'hépatite est caractérisée par une inflammation du foie ainsi que l'augmentation de son volume pouvant aller jusqu'à trois fois sa taille initiale. Au niveau

microscopique, l'hépatite se traduit par une hypertrophie des hépatocytes, une dilatation des canalicules biliaires, l'accumulation de protoporphyrines, l'accumulation de triglycérides sous forme de vacuoles intracytoplasmiques et une augmentation de la quantité de réticulum endoplasmiques lisses dans les hépatocytes (LaVia et Hill 1975; Yokoo, Craig *et al.* 1979; Ruebner, Montgomery *et al.* 1991; Fuchs et Weber 1994).

Si elle n'est pas soignée, l'hépatite chronique peut causer une insuffisance hépatique, une hypertension portale et même dégénérer en cirrhose. À un stade avancé de la maladie, il y a apparition de lésions hépatiques irréversibles ainsi qu'une altération des fonctions du foie, ce qui peut représenter un danger pour la survie de la personne atteinte de l'hépatite.

### 1.3 LES CORPS DE MALLORY :

Le cytosquelette des hépatocytes peut être perturbé par le développement d'une hépatite. Dans le cas de l'hépatite alcoolique, causée par la consommation chronique d'alcool, on assiste à des modifications au niveau des filaments intermédiaires (FIs) menant à une réorganisation importante du réseau formé par les FIs. Dans certain cas, on assiste également à l'apparition d'amas protéiques intracytoplasmiques dans les hépatocytes: les Corps de Mallory (CMs). D'autres pathologies du foie conduisent également au développement des CMs comme la cirrhose infantile indienne, la maladie de Wilson et l'obésité (French 1983; Jensen et Gluud 1994; Denk, Stumptner *et al.* 2000).

Frank Mallory a été le premier chercheur à décrire, lors de l'hépatite alcoolique, les CMs dans les hépatocytes en 1911 (Mallory 1911). Ces inclusions hyalines intracytoplasmiques sont de taille et de localisation variables. Ils sont également très insolubles et résistants aux protéases (Denk, Stumptner *et al.* 2000). Les CMs sont principalement composés de protéines altérées provenant des FIs, les kératines 8 et 18 (K8 et K18). Ils contiennent aussi des protéines de stress (heat shock protein) et de l'ubiquitine, deux classes de protéines impliquées dans la protéolyse cellulaire (Denk,

Stumptner *et al.* 2000). Les molécules phosphorylées Mm 120-1 et MPM-2 sont aussi présentes dans les CMs (Denk, Stumptner *et al.* 2000). L'antigène Mm 120-1 est une protéine non caractérisée exclusive aux CMs *in vivo*, tandis que MPM-2 est épitope retrouvé sur la protéine p62 connues pour interagir avec l'ubiquitine (Denk, Stumptner *et al.* 2000; Zatloukal, Stumptner *et al.* 2002). D'autres molécules comme du glycogène, des phospholipides et de la transglutaminase sont également retrouvées dans les CMs. Le rôle de ces molécules dans les CMs reste à être élucidé (Jensen et Gluud 1994; Denk, Stumptner *et al.* 2000).

Des études réalisées sur le foie de souris traitées à la griséofulvine (GF), une drogue qui permet le développement de CMs similaire à ceux retrouvé dans les cas d'hépatite alcoolique humaine, ont démontré que la présence des CMs dans les hépatocytes est reliée à des altérations du réseau de FIs (Hazan, Denk *et al.* 1986; Denk, Stumptner *et al.* 2000). Par contre, à ce jour, le rôle exact des CMs dans les hépatocytes demeure inconnu des scientifiques. Malgré les efforts effectués pour identifier les mécanismes cellulaires menant à la formation des CMs et pour déterminer l'implication des kératines dans leur processus de formation, les chercheurs ne savent toujours pas si la présence de CMs est nocive ou bénéfique pour les cellules (Jensen et Gluud 1994). Il est cependant généralement accepté que le développement des CMs est toujours associé à une hépatite, alors qu'une hépatite ne mène pas nécessairement à l'apparition des CMs (Jensen et Gluud 1994).

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la présence des CMs dans les hépatocytes. Des chercheurs croient que l'hépatite créerait une saturation du mécanisme ubiquitine-protéasome, responsable de l'identification et de la dégradation des protéines altérées (French, van Leeuwen *et al.* 2001; Bardag-Gorce, Vu *et al.* 2004). Les protéines endommagées, mais non dégradées par le processus ubiquitine-protéasome, s'accumuleraient alors pour former des agrégats dans le cytoplasme des cellules. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que l'inhibition du mécanisme ubiquitine-protéasome, par le PS431, entraîne la formation des CMs (French, van Leeuwen *et al.* 2001; Bardag-Gorce, Vu *et al.* 2004). D'autre recherches renforcent cette hypothèse en

montrant que, dans les hépatocytes, certaines substances hépatotoxiques utilisées pour l'induction des CMs chez les modèles animaux génèrent un stress oxydatif (Denk, Stumptner *et al.* 2000) qui peut bloquer l'activité des protéasomes (Fataccioli, Andraud *et al.* 1999).

D'autres chercheurs croient que l'augmentation de l'expression des protéines de FIs dans les hépatocytes, les K8 et K18 seraient à l'origine du développement de ces corps d'inclusion (Hutter, Zatloukal *et al.* 1993; Kachi, Cadrin *et al.* 1993; Cadrin et Martinoli 1995). De plus, une étude a démontré que le traitement des souris à la tautomycine mène à la formation de CMs contenant des kératines phosphorylées au niveau des résidus sérines (French, van Leeuwen *et al.* 2001). La tautomycine est utilisée ici comme une drogue qui provoque des dommages hépatique et des CMs par l'inhibition des phosphatases, principalement la pp-1, une phosphatases de sérine et thréonine (Faire 1993). Ceci suggère que la phosphorylation des kératines aurait un rôle important dans l'apparition de ces corps d'inclusion.

D'autres mécanismes menant à la formation des CMs ont été proposés. Par exemple, dans les hépatocytes, un débalancement entre le niveau des deux kératines, par une surexpression de K8 ou K18, favorise l'apparition de ces amas protéiques (Nakamichi, Hatakeyama *et al.* 2002). De plus, des études réalisées sur des souris transgéniques déficientes en K8 ou K18 suggèrent que la simple présence de K8 serait nécessaire pour le développement des CMs (Magin 1998; Magin, Schroder *et al.* 1998; Zatloukal, Stumptner *et al.* 2000). En effets, des souris déficientes en K8 ne développent pas de corps d'inclusion, et ce même après le traitement par une drogue hépatotoxique menant, chez des souris normales, à la formation de CMs. Par contre, les souris déficientes en K18 développent spontanément des agrégats protéiques avec l'âge (Magin 1998; Magin, Schroder *et al.* 1998; Zatloukal, Stumptner *et al.* 2000).

## CHAPITRE 2

### *Cytosquelette, filaments intermédiaires et kératines*

#### 2.1 CYTOSQUELETTE :

Le cytosquelette des cellules animales est composé de trois classes de filaments protéiques : les microfilaments d'actine (MFs), les microtubules (MTs) et FIs. Les MFs (7 nm) assurent la mobilité cellulaire, l'organisation de la membrane plasmique et la contraction musculaire (Mermall, Post *et al.* 1998; Huang, Brady *et al.* 1999). Les MTs (24 nm) assurent la séparation des chromosomes au cours de la mitose, le mouvement et le positionnement des organites dans la cellule (Drewes, Ebner *et al.* 1998; Hamm-Alvarez et Sheetz 1998). Par rapport aux autres éléments du cytosquelette, le rôle des FIs (10 nm) est beaucoup moins bien connu. Les FIs assurent l'intégrité mécanique des cellules, mais des études récentes suggèrent que les FIs pourraient posséder d'autres fonctions (Cadrin, Brown *et al.* 1993; McGowan et Coulombe 1998; Wong et Coulombe 2003).

#### 2.2 LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES :

Les FIs peuvent être formés à partir d'un grand nombre de protéines. Ces protéines de FIs sont regroupés en cinq types selon leur homologie de séquence, leur point isoélectrique (pI) et leur masse moléculaire (PM) (tableau 2.1) (Steinert et Roop 1988; Fuchs et Weber 1994; Herrmann et Aebi 1998).

Il est intéressant de noter que les quatre premiers types de protéines de FIs sont localisés au niveau du cytoplasme des cellules tandis que les protéines du type V regroupent les lamines A, B et C qui sont présentes uniquement dans le noyau des cellules (Fuchs et Weber 1994; Ku, Liao *et al.* 1996). De plus, le type de protéines de FIs exprimées dans une cellule dépend directement de la nature de cette cellule (Fuchs et Weber 1994; Herrmann et Aebi 1998).

**TABLEAU 2.1**  
**Caractéristiques des protéines de filaments intermédiaires.**

Nom	Classe	PM (x10 <sup>-3</sup> )	Occurrence typique chez les mammifères
<i>Protéine de FIs cytoplasmique</i>			
Kératine acide K9-20	I	40-64	épithélium
Kératine basique K1-8	II	52-68	épithélium
Vimentine <sup>a</sup>	III	55	Cellules mésenchymateuses
Desmine	III	53	Cellules musculaires
protéine fibrillaire acide giale (GFAP)	III	50-52	Cellules gliales, astrocytes
Périphérine	III	54	Cellules neuronales diverses
Nestine	[III/IV] <sup>b</sup>	240 <sup>c</sup>	Cellules souches neuroépithéliales, cellules musculaires
α-internexine	IV	56 <sup>c</sup>	Neurones
Triplet de protéine de neurofilaments			
NF-L	IV	68 <sup>c</sup>	Neurones
NF-M	IV	110 <sup>c</sup>	Neurones, copolymère avec NF-L
NF-H	IV	130 <sup>c</sup>	Neurones, copolymère avec NF-L
Phakinine	[I?] <sup>d</sup>	46	Cristallin, copolymère avec filensine
Filensine	[IV?] <sup>d</sup>	83 <sup>c</sup>	Cristallin, copolymère avec phakinine
Protéine de FIs nucléaire			
<i>Lamines</i>			Lamines nucléaires
Type A et C	V	62-72	La plupart mais pas toutes les cellules
Type B	V	65-68	Toutes les cellules

<sup>a</sup> La vimentine est exprimé dans toutes les cellules en culture du à la présence d'un élément de réponse au sérum dans son promoteur.

<sup>b</sup> La nestine montre une homologie de séquence avec les protéines de type III et le type IV. Selon sa structure de gène, il serait placé avec le type IV (Dahlstrand, Zimmerman *et al.* 1992).

<sup>c</sup> Le poids moléculaire donnés est déduit de la séquence en acide aminés. Le poids moléculaire apparent sur un gel de polyacrylamide peut être considérablement plus élevé.

<sup>d</sup> Phakinine montre une grande homologie de séquence avec la K18 mais ne polymérise pas avec les cytokératines. Filensine montre une grande homologie de séquence avec NF-L (coil-1) et aussi bien qu'avec la nestine et la vimentine (coil-2). (Georgatos, Gounari *et al.* 1997).

Tiré de : (Herrmann et Aebi 1998)

## 2.3 LES KÉRATINES :

Les kératines constituent une grande famille de protéines qui sont divisées en deux groupes, les kératines de type I et les kératines de type II. Le type I regroupe les kératines acides K9 à K20 qui ont un pI variant de 4 à 6. Le type II est quant à lui composé des kératines relativement basiques K1 à K8 ayant un pI variant de 6-8 (Fuchs et Weber 1994; Omary, Ku *et al.* 1998).

Les kératines sont retrouvées dans toutes les cellules épithéliales, soit au niveau des épithéliums glandulaires, sécrétoires et de recouvrement. (Moll, Franke *et al.* 1982; Fuchs et Weber 1994). L'expression des kératines est spécifique à chaque type d'épithélium. Les kératines sont des hétérodimères obligatoires, ce qui signifie que toutes les cellules épithéliales expriment au moins une kératine de type I et une kératine de type II pour former les FIs de ces cellules (tableau 2.2) (Fuchs et Weber 1994; Cadrin, Hovington *et al.* 2000).

**TABLEAU 2.2**  
**Kératines exprimées dans différents tissus**

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

<sup>A</sup> Peu de kératines dans le tissu, <sup>B</sup> K19 est localisé seulement dans la partie apical des cellules de l'acinus (Toivola et al., résultats non-publié)

Tiré de : (Ku, Zhou *et al.* 1999)

Par exemple, au niveau du foie, les cellules formant les canaux biliaires expriment les K8 (type I) et K19 (type II) en plus d'une faible quantité de K7 (type I) et K18 (type II). Par contre, les hépatocytes du foie expriment uniquement les K8 et K18 (Moll, Franke *et al.* 1982; Ku, Zhou *et al.* 1999). L'expression des combinaisons de kératines dépend également du stade de différenciation cellulaire. Dans l'épithélium stratifié de la peau par exemple, les K5 et K14 sont exprimées dans les kératinocytes basaux alors que dans les kératinocytes suprabasals matures et différenciées, on retrouve les K1 et K10 (Moll, Franke *et al.* 1982).

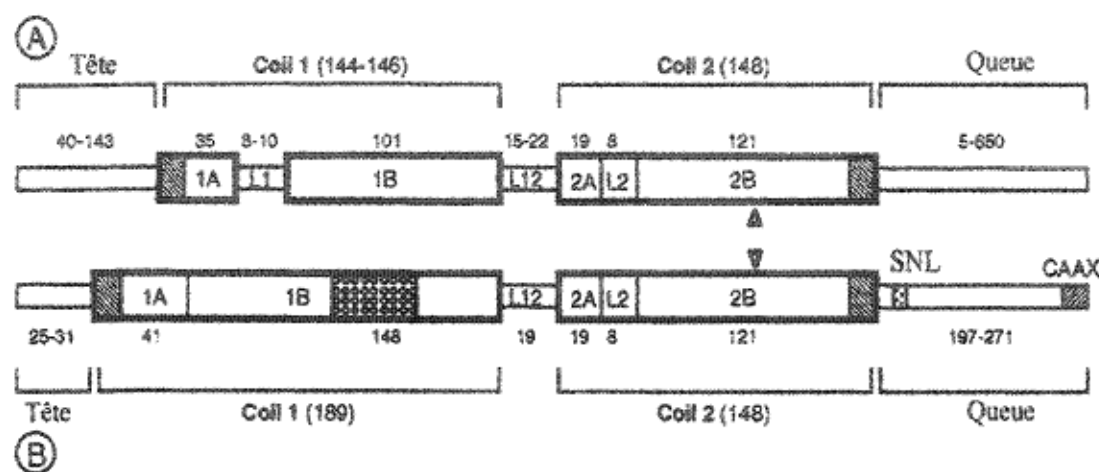
## 2.4 STRUCTURES DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES :

Les différentes protéines de FIs possèdent une portion centrale commune caractérisée par la présence de 4 hélices  $\alpha$  (1A, 1B, 2A et 2B) séparées par des régions intercalaires (L1, L1-2 et L2) (Geisler et Weber 1982). Cette portion centrale est flanquée de deux domaines globulaires, une tête amino-terminale ainsi qu'une queue carboxy-terminale dont les séquences varient en fonction de la protéine de FIs (figure 2.1) (Lazarides 1980; Steinert et Roop 1988). Pour les protéines de type I à IV, la portion centrale est composée de 310 acides aminés et possède une longueur de 46 nm. Pour les protéines nucléaires de type V, la portion en hélices  $\alpha$  comprend 356 acides aminés pour une longueur de 53 nm (Fuchs et Weber 1994; Parry et Steinert 1999).

Au niveau moléculaire, la portion centrale des protéines de FIs est caractérisée par la présence d'acides aminés hydrophobes en position 1 et 4 de tous les cycles de 7 résidus. Cette distribution de résidus hydrophobes crée une situation propice à l'assemblage des protéines des FIs en favorisant la formation de la structure en superhélice des FIs (Fuchs et Weber 1994; Parry et Steinert 1999; Herrmann, Hesse *et al.* 2003). De plus, on peut noter la présence d'une répartition périodique des résidus acides et basiques à tous les 9.5 acides aminés au sein de la portion hélicoïdale. Cette distribution favorise l'apparition de ponts hydrogènes, ce qui augmente considérablement la stabilité des FIs, tant au niveau des interactions entre les protéines



qu'au niveau des interactions à l'intérieur des hélices  $\alpha$  de chaque monomère (Conway et Parry 1990; Fuchs et Weber 1994; Parry et Steinert 1999; Kirfel, Magin *et al.* 2003).



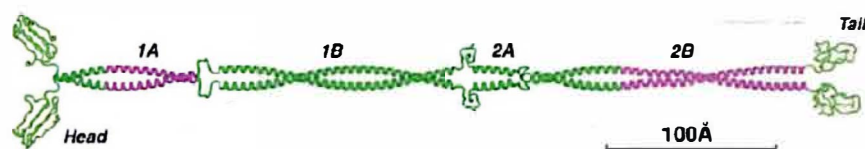
**FIGURE 2.1 : Schéma de la structure des protéines de IFs cytoplasmiques (A) et nucléaires (B).** SNL : signal de localisation nucléaire et CAAX, séquences propres aux IFs nucléaires

Tiré de : (Herrmann et Aebi 1998).

## 2.5 POLYMÉRISATION DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES :

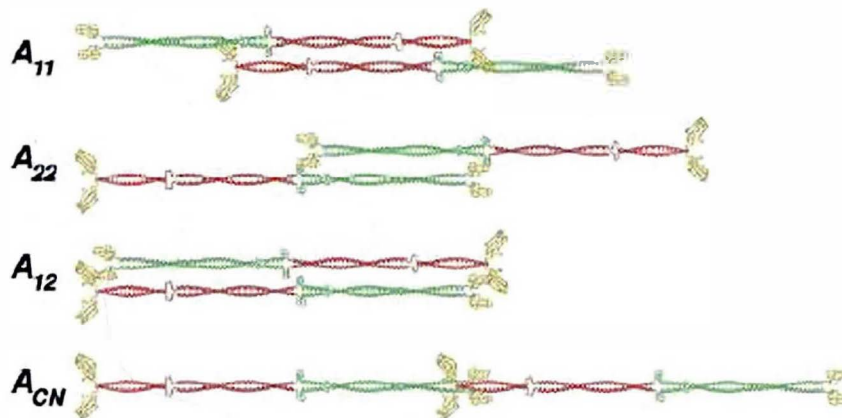
Le processus de polymérisation des FIs est encore mal connu et controversé. Les dernières données qui ont été publiées suggèrent que la polymérisation débute par l'association parallèle et en superhélice de deux protéines de FIs au niveau de la partie hélicoïdale centrale pour former un dimère (Alberts 2002; Strelkov, Herrmann *et al.* 2003) (figure 2.2). Par la suite, il y aurait association de deux dimères pour former un tétramère stable. Il existe quatre types d'associations possibles entre les dimères (figure 2.3). L'association antiparallèle et latérale des dimères peut se faire de trois façons différentes (Geisler, Schunemann *et al.* 1992; Steinert, Marekov *et al.* 1993; Herrmann et Aebi 1998; Parry et Steinert 1999). Les segments 1B peuvent se placer côte à côte pour former le premier type d'association latérale de dimère (figure 2.3 mode A<sub>11</sub>). L'association des dimères peut également se faire par l'alignement des segments 2B (figure 2.3 mode A<sub>22</sub>) (Strelkov, Herrmann *et al.* 2003). L'association latérale non

décalée représente la troisième possibilité d'association latérale (figure 2.3 mode  $A_{12}$ ) (Parry et Steinert 1999). Le dernier mode d'association des dimères prévoit le chevauchement des domaines N- et C-terminaux pour créer une association longitudinale des dimères (figure 2.3 mode  $A_{CN}$ ) (Heins, Wong *et al.* 1993).. Les tétramères ainsi formés pourraient se lier bout à bout pour former des protofilaments. Deux protofilaments pourraient alors se joindre latéralement de façon légèrement décalée pour former les protofibrilles. Finalement, un FIs mature et stable serait formé par l'association latérale de quatre protofibrilles (Fuchs et Weber 1994; Herrmann et Aebi 1998; Herrmann, Hesse *et al.* 2003).



**FIGURE 2.2 : Assemblage de deux protéines de FIs.**

Tiré de : (Strelkov, Herrmann *et al.* 2003)



**FIGURE 2.3 : Modèle d'association des tétramères de FIs.**

Tiré de : (Strelkov, Herrmann *et al.* 2003)

Les FIs peuvent être formés de façon homopolymérique, à partir de deux protéines identiques (desmine, vimentine) ou de façon hétéropolymérique

(neurofilaments, kératines) à partir de l'association de deux protéines de FIs différentes pour former des dimères hétérogènes (Fuchs et Weber 1994; Herrmann, Hesse *et al.* 2003). Les kératines représentent un bon exemple de protéines de FIs formant des hétérodimères. En effet, l'association en proportion 1 : 1 d'une kératine de type I et d'une kératine de type II est obligatoire pour la formation des FIs de kératines (Fuchs et Weber 1994; Coulombe et Omary 2002).

La région centrale des protéines de FIs joue un rôle très important dans la polymérisation des FIs. En effet, la présence de mutations à l'intérieure de séquences très conservées localisées au niveau de l'extrémité N-terminale de la portion centrale perturbe sévèrement l'assemblage des FIs autant *in vitro* que *in vivo*. Les chercheurs ont également constaté que plus la délétion au niveau du bout N-terminale ou C-terminale de la partie centrale est importante, plus le processus d'assemblage des FIs est affecté (Coulombe, Chan *et al.* 1990; Hatzfeld et Weber 1991).

## 2.6 RÉGIONS TERMINALES DES FIs :

Bien que la partie centrale en hélice  $\alpha$  des protéines de FIs est hautement conservée, les domaines terminaux (tête et queue) diffèrent grandement d'une protéine à l'autre, tant au niveau de la taille que de la séquence. Lors de la polymérisation, les régions terminales des protéines de FIs sont poussées vers l'extérieur des filaments, ce qui les expose à l'environnement cytosolique. Les régions N- et C-terminales exposées subissent plusieurs modifications post-traductionnelles dynamiques suite à des interactions avec différentes molécules présentes dans le cytoplasme. Les modifications post-traductionnelles tel que la phosphorylation, la glycosylation, la transglutamination et l'acétylation peuvent moduler la structure des FIs, influencer leur organisation ainsi que leur interaction avec d'autres protéines. Les régions N- et C-terminales auraient donc un rôle déterminant dans la régulation des fonctions des FIs (Chou, Smith *et al.* 1992; Ku, Liao *et al.* 1996; Omary, Ku *et al.* 1998; Coulombe et Omary 2002).

La région N-terminale des protéines de FIs peut, comme la portion centrale, jouer un rôle lors de la polymérisation des FIs. Par exemple, lors de la formation de FIs à partir des K5/K14, l'absence de la région N-terminale de la K5 empêche la polymérisation. Par contre, ce phénomène n'est pas observé pour toutes les protéines de FIs. Le même exemple révèle que la délétion de la tête de la K14 ne semble pas affecter la polymérisation des FIs de K5/K14 (Coulombe, Chan *et al.* 1990). D'autres chercheurs ont montré que des digestions protéolytiques du domaine N-terminale de la vimentine, de la desmine et des neurofilaments interfèrent avec la formation des FIs (Kaufmann, Weber *et al.* 1985).

Le rôle de la région C-terminale dans la polymérisation des FIs semble diverger selon le type de protéines et les conditions intracellulaires. Des études ont montré que la délétion du domaine C-terminal de la vimentine ne semble pas affecter le processus d'assemblage des FIs (Herrmann, Haner *et al.* 1996). Des expériences de transfections de différentes kératines dépourvues de leur domaine C-terminal dans des cellules 3T3-L1, préadipocytes de souris ne contenant pas de cytokératines, ont montré que le réseau de FIs formé dans les cellules transfectées des est similaire à celui formé avec des kératines intactes (Bader, Magin *et al.* 1991). Ces expériences suggèrent donc que le domaine C-terminal des protéines de FIs n'intervient pas dans le processus de polymérisation des FIs. Par contre, d'autres études montrent que ce peut avoir un rôle à jouer dans l'assemblage des protéines de FIs. Des chercheurs ont démontré que l'utilisation de protéines dont le domaine C-terminal a été modifié par des délétions partielles a un impacte important sur la polymérisation des FIs (McCormick, Kouklis *et al.* 1993; Makarova, Carpenter *et al.* 1994). D'autres chercheurs ont rapporté que des délétions partielles au niveau du domaine C-terminal des protéines de FIs de type III causent une altération structurale des filaments et prédisposent ces derniers à l'agrégation (Kouklis, Hatzfeld *et al.* 1993). L'ensemble de ces résultats montre donc que le rôle du domaine C-terminal dans l'assemblage des FIs est toujours incompris à ce jours.

## 2.7 RÔLES DES FIs :

Les scientifiques ont longtemps pensés que l'unique rôle des FIs, structure qui semblait être la plus stable de la cellule, était d'assurer l'intégrité mécanique des cellules. En effet, comme les FIs forment un réseau cytoplasmique lié aux jonctions cellulaires de types desmosomes et hémidesmosomes de la membrane plasmique, les chercheurs pensaient que les FIs ne servaient qu'à assurer les rôles de soutien élastique de la membrane cellulaire et de maintien de l'architecture générale de la cellule (Lodish, Berk *et al.* 2000). Par contre, des études récentes ont révélé que les FIs ne joueraient pas seulement un rôle structural au niveau de la cellule (Fuchs et Cleveland 1998; Yamada, Wirtz *et al.* 2003).

Des études menées sur des souris transgéniques ont montré que l'expression de kératines comportant des mutations conduisait au développement de maladies similaires à des pathologies humaines. Par exemple, des souris transgéniques portant une mutation sur la K14 qui affecte la polymérisation des FIs, développent une pathologie dont le phénotype ressemble à l'épidermolyse bulleuse simple (EBS) chez l'homme (Vassar, Coulombe *et al.* 1991). Cette pathologie est caractérisée par la formation de cloques au niveau de la muqueuse superficielle de la peau ainsi que par la présence d'agrégats protéiques intracytoplasmiques composés principalement de protéines de FIs au niveau de la couche basale des kératinocytes. La fragilisation des tissus due à la perte de protection contre le stress mécanique mène à un décollement de l'épiderme. L'étude du génotype des patients atteints de EBS a permis de montrer la présence de mutation identique sur la K14, ainsi que d'établir un lien entre des altérations des protéines de FIs et certaines pathologies humaines (Coulombe, Hutton *et al.* 1991; Fuchs et Weber 1994; Magin 1998; Arin et Roop 2001; Coulombe et Omary 2002; McLean 2003; Porter et Lane 2003). D'autres études sur l'EBS ont montré que des mutations sur la K5 pourraient aussi être responsable de la maladie (Fuchs 1994).

Ces expériences ont permis de montrer pour la première fois que les FIs jouent un rôle dans la protection des cellules et des tissus contre un stress mécanique (McGowan

et Coulombe 1998). Suite à ces premières études, de nombreuses mutations sur les kératines ont été répertoriées et associées à des maladies de la peau chez l'humain (tableau 2.3).

**TABLEAU 2.3**  
**Maladies causées par une mutation sur les kératines**

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

Tiré de : (McGowan et Coulombe 1998)

## CHAPITRE 3

### *Hépatocytes et filaments intermédiaires*

#### 3.1 LES KÉRATINES DANS LES HÉPATOCYTES :

Comme indiqué dans le tableau 2.2, les K8 et K18 sont les seules kératines retrouvées dans les hépatocytes. L'altération de l'une ou l'autre des kératines peut donc affecter la formation des CMs (Ku, Zhou *et al.* 1999; Omary, Ku *et al.* 2002). Les K8 et K18 des hépatocytes forment un réseau cytoplasmique complexe plus dense au niveau de la membrane nucléaire, de la membrane plasmique et autour de canalicules biliaires (Omary, Ku *et al.* 2002). Le rôle des FIs dans les hépatocytes est encore méconnu, mais différentes études ont déjà été réalisées pour tenter d'élucider le rôle des K8/18 dans le foie. Des souris transgéniques déficientes en K8 ou K18, ou possédant des K8 et K18 surexprimées ou mutées ont été utilisées pour étudier le rôle des K8/18 dans les hépatocytes (tableau 3.1) (Baribault, Price *et al.* 1993; Baribault, Penner *et al.* 1994; Magin 1998; Magin, Schroder *et al.* 1998; Ku, Zhou *et al.* 1999; Omary, Ku *et al.* 2002; Oshima 2002).

**TABLEAU 3.1**

**Effet de la délétion ou d'une mutation de la kératine 8 ou 18 chez la souris**

Souris	Kératine	Phénotype de la souris
<b>Mutation de la K8 ou de la K18</b>	K18 R89C	Hépatite chronique, fragilité cellulaire et sensibilité aux lésions hépatiques.
	K18 S52A	Sensibilité aux lésions hépatiques causées par le stress
	K18 S33A	Réorganisation des FIs dans le foie et le pancréas.
<b>Délétion de la K8 ou de la K18</b>	K8 (souris C57/B16)	Mortalité durant l'embryogenèse, hémorragie massive du foie.
	K8 (souris FVB/n)	Hyperplasie collatérale, colite, susceptibilité aux lésions hépatiques.
	K18	Corps de Mallory dans les hépatocytes de souris âgées.

Tiré de : (Ku, Zhou *et al.* 1999)

Différentes souches de souris ont donc été utilisées pour déterminer l'impacte du patrimoine génétique sur le rôle des K8/18. Les souris C3H réagissent bien aux traitements hépatotoxiques tout en permettant l'apparition de CMs dans les hépatocytes. Les souches de souris FVB/N et C57/B16 sont surtout populaires car elles résistent bien à l'induction de modifications génétiques comme les mutations et les délétions (Denk, Gschnait *et al.* 1975; Denk, Eckerstorfer *et al.* 1976; Jensen et Gluud 1994).

Les souris déficientes en K8 présentent un taux de mortalité intra-utérin qui varie en fonction du patrimoine génétique. Par exemple, en l'absence de la K8, 95 % des souris de la lignée C57/B16 meurent au stade embryonnaire suite à une hémorragie hépatique massive (Baribault, Price *et al.* 1993). Ce taux de mortalité chute à 50 % chez les embryons issus du croisement entre les souris FVB/N dépourvues de K8 et les souris C57/B16 (Baribault, Penner *et al.* 1994). Cependant, vers l'âge de 6 mois, les souris survivantes développent une hépatite similaire du point de vu microscopique à l'hépatite alcoolique humaine (Denk, Franke *et al.* 1979; Oshima 2002). Les chercheurs ont observé que les hépatocytes de ces souris deviennent plus susceptibles au stress mécanique créé par une perfusion (Baribault, Penner *et al.* 1994).

D'autre part, les souris FVB/N déficientes en K18 ne présentent aucun réseau de FIs dans leurs hépatocytes bien que les desmosomes soient toujours présents (Oshima 2002). Ces souris sont viables et ne développent qu'une hépatite modérée. Chez les souris âgées, il y a apparition d'agrégats de K8 (Magin 1998; Magin, Schroder *et al.* 1998; Oshima 2002). Ces études suggèrent donc que la K8 serait essentielle dans les hépatocytes (Baribault, Penner *et al.* 1994) et que la K18 aurait un rôle différent de la K8 dans les hépatocytes, puisque le phénotype pathologique est plus important chez les souris déficientes en K8 (Oshima 2002).



### 3.2 KÉRATINES ET PROTECTION DES HÉPATOCYTES :

À la suite des études faites sur les souris transgéniques, un rôle de protection assuré par les K8/18 a été proposé dans les hépatocytes placés en situation de stress mécanique ou toxique (tableau 3.2). En effet, les chercheurs ont observé que les hépatocytes des souris transgéniques étaient plus sensible à un stress mécanique comme la perfusion ou un stress de type toxique comme l'administration de certains produits hépatotoxiques (Ku, Michie *et al.* 1995; Loranger, Duclos *et al.* 1997; Cadrin, Hovington *et al.* 2000; Omary, Ku *et al.* 2002).

TABLEAU 3.2

Effet du stress dans les hépatocytes de souris transgéniques

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

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

Tiré de : (Omary, Ku *et al.* 2002)

Par exemple, l'administration de substances hépatotoxiques produisant une hépatite comme la GF, la 3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC), la concanavaline A (ConA) ou l'acétaminophène (ACT) chez des souris déficientes en K8

ou portant la mutation K18 R89C provoque le développement rapide d'une hépatite et une augmentation de la létalité associée à une nécrose du foie (Omary, Ku *et al.* 2002). De plus, des cellule transfectées avec la K18 R89C présentent des perturbations dans l'assemblage et l'organisation des FIs (Ku, Michie *et al.* 1995). Ces expériences ont permis de mettre en évidence que les FIs protègent les hépatocytes contre un stress provoqué par une substances hépatotoxique.

Des fonctions communes ont également été répertoriées pour les K8/18 dans le foie. Par exemple, des chercheurs ont traité des souris de la lignée FVB/n déficientes en K8 ou K18 avec la ConA, une substance hépatotoxique produisant une hépatite (Caulin, Ware *et al.* 2000). Ils ont observés que, suite à l'exposition d'un inducteur de mort cellulaire, le "tumor necrosis factor" (TNF), les deux types de souris présentaient une plus grande susceptibilité d'induction de l'apoptose comparativement aux souris de type sauvage (Caulin, Ware *et al.* 2000). Il a été proposé que les K8/18 protégeraient les hépatocytes en jouant un rôle dans la régulation des mécanismes apoptotiques au niveau des hépatocytes (Oshima 2002). D'autres études ont permis de démontrer que les kératines protègent les hépatocytes contre un stress toxique provoqué par des drogues hépatotoxiques comme l'ACT et la GF (Ku, Michie *et al.* 1996; Toivola, Omary *et al.* 1998). En effet, le remplacement de l'arginine en position 89 par une cystéine de la K18 est un motif de mutation caractéristique chez les patients atteints d'EBS. Cette mutation rend les souris plus sensibles aux traitements à la GF ou à l'ACT que des souris de type sauvage (Ku, Michie *et al.* 1996; Toivola, Omary *et al.* 1998). L'expression *in vitro* de la même mutation de la K18 (R89C), entraîne des dérèglements dans la polymérisation des FIs dans les cellules. De plus, en situation de stress, la réorganisation du réseau de kératines est perturbée par la présence de cette mutation (Ku, Michie *et al.* 1995). Ceci démontre qu'une mutation ponctuelle sur la K18 peut provoquer des problèmes importants au niveau de l'organisation et de l'assemblage des FIs au sein des cellules et plus particulièrement au niveau des hépatocytes. (Ku et Omary 1995; Ku, Michie *et al.* 1996).

Dans le cas de cirrhose cryptogénétique (cirrhose d'origine inconnue), des mutations ont été identifiées sur les K8 et K18 des hépatocytes (Ku, Wright *et al.* 1997; Ku, Gish *et al.* 2001). Des kératines mutées, provenant de patients atteints de cirrhose cryptogénétique, ont été transfectées dans des cellules en culture. Ces cellules ont par la suite présenté des anomalies au niveau de la flexibilité, de la stabilité, de l'assemblage et de l'organisation des FIs à la suite d'une exposition à un stress (Ku, Wright *et al.* 1997).

Le regroupement des connaissances acquises suite aux études réalisées sur les souris transgéniques et également en culture cellulaire ont permis de mieux saisir l'importance fonctionnelles des protéines de FIs contenues dans les hépatocytes. Les résultats présentés précédemment montrent clairement que des mutations ponctuelles ou la délétion des kératines fragilisent les hépatocytes et rend le foie beaucoup plus susceptible au développement d'hépatite (Ku, Wright *et al.* 1997; Ku, Gish *et al.* 2001; Omary, Ku *et al.* 2002; Ku, Darling *et al.* 2003). Chez l'homme comme chez la souris, les kératines disposeraient donc de la capacité de protéger les hépatocytes en situation de stress provoquée par l'exposition aux agents hépatotoxiques (Omary, Ku *et al.* 1998; Ku, Zhou *et al.* 1999; Omary, Ku *et al.* 2002). Elles pourraient également être impliquées dans les mécanismes anti-apoptotiques des hépatocytes (Oshima 2002).

### 3.3 PHOSPHORYLATION DES KÉRATINES :

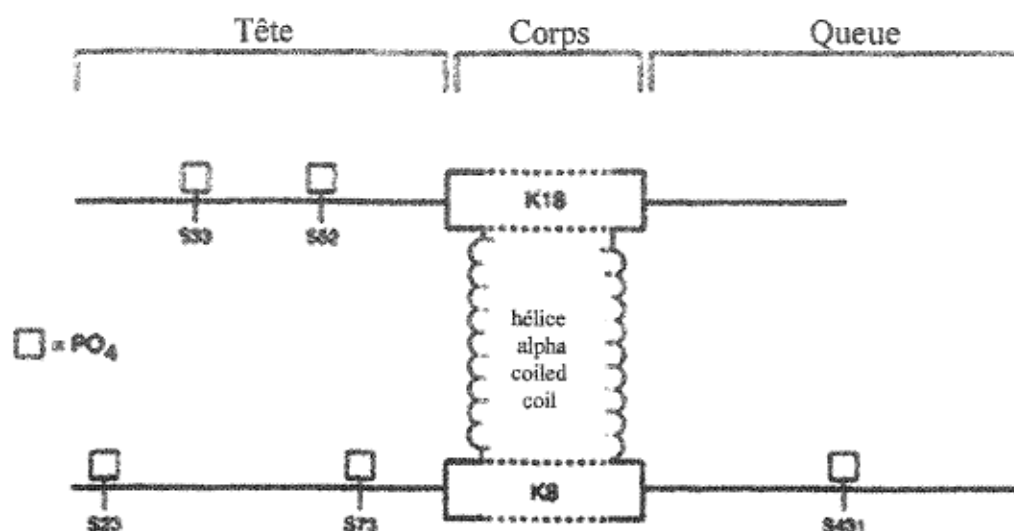
La phosphorylation est une modification post-traductionnelle qui se traduit par le remplacement d'une fonction hydroxyle d'un acide aminé par une fonction phosphate. Cette modification post-traductionnelle joue un rôle important de régulation des fonctions d'un grand nombre de protéines dans l'organisme. L'activation et l'inhibition des kinases dépendantes des cyclines par le processus de phosphorylation-déphosphorylation, essentiel au bon déroulement du cycle cellulaire, est un bon exemple de mécanismes importants régulés par la phosphorylation et la déphosphorylation des protéines (Parker, Walter *et al.* 1993).

Plusieurs évidences ont démontré que les K8 et K18, responsable du maintien de l'intégrité mécanique des hépatocytes, possèdent d'autres rôles comme la protection des hépatocyte en situation de stress. La phosphorylation a été proposée comme étant impliquée de façon importante dans les processus de régulation des fonctions des kératines, comme la réorganisation des FIs et l'association avec d'autres protéines (Omary, Ku *et al.* 1998).

Les kératines sont également affectées par diverses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la glycosylation, la transglutamination ou l'acétylation. Ces dernières peuvent entre autre affecter la localisation et l'organisation des kératines dans une situation physiologique ou en condition de stress (Ku et Omary 1994; Ku, Liao *et al.* 1996; Omary, Ku *et al.* 1998). La modification post-traductionnelle la plus étudiée chez les kératines est la phosphorylation (Ku, Liao *et al.* 1996). Des études ont démontré que la phosphorylation se produit seulement au niveau de la tête et la queue des kératines (Geisler et Weber 1988; Chou, Opal *et al.* 1996). Comme ces domaines sont directement responsables de l'hétérogénéité des kératines et qu'elles sont projetées vers l'extérieur du filament, la modulation de la phosphorylation des kératines pourrait jouer un rôle dans la régulation de la fonction des kératines (Liao, Ku *et al.* 1997; Coulombe 2002; He, Stepulak *et al.* 2002).

La serine (S) est l'acide aminé le plus phosphorylé chez les kératines (Omary, Ku *et al.* 1998). D'autre résidus comme la thréonine et la tyrosine peuvent aussi subir cette modification post-traductionnelle (Omary, Ku *et al.* 1998; Feng, Zhou *et al.* 1999; Ku, Zhou *et al.* 1999; Lodish, Berk *et al.* 2000). Des études ont permis de déterminer une possibilité de 61 résidus S pour la K8 et 37 pour la K18 chez l'homme (Oshima, Millan *et al.* 1986; Ku et Omary 1997). La présence d'autant de sites potentiellement phosphorylables rends l'étude du rôle de la phosphorylation des K8/18 très complexe. Dans les hépatocytes humains, cinq sites de phosphorylation de K8/K18 impliquant la sérine ont été caractérisés (Omary, Ku *et al.* 1998). On retrouve les sites S73, S431 et S23 chez la K8 et les sites S33 et S52 chez la K18 (figure 3.1). Des sites de phosphorylation identiques ou équivalents sont également retrouvés chez la souris. On

retrouve respectivement les sites S79, S436 et S23 chez la K8 et les sites S33 chez la K18 (Omary, Ku *et al.* 1998).



**FIGURE 3.1 : Sites de phosphorylation des K8/18 caractérisés.**

Tiré de : (Omary, Ku *et al.* 1998)

Il semble que la phosphorylation de chaque sérine soit impliquée dans une fonction spécifique des K8 et K18 (Omary, Ku *et al.* 1998). Pour certains sites spécifiques, la phosphorylation est présente à un niveau basal. Dans d'autre cas, cette modification post-traductionnelle apparaît lors d'événement cellulaire précis comme la mitose, l'apoptose ou encore en situation de stress (tableau 3.3) (Omary, Ku *et al.* 1998; Ku, Zhou *et al.* 1999). Les quantités relatives de phosphorylation sur chacun des sites pourraient aussi affecter la fonction du réseau de FIs dans les cellules. (Ku, Liao *et al.* 1996).

**TABLEAU 3.3**  
**Phosphorylation des K8/18 associée à certain événement cellulaire**

Fonction ou événement cellulaire	Kératine et sites	Évidences
Réorganisation des filaments et solubilité	K18 S52	-Analyse des mutations en culture cellulaire -Cellules en culture marquées avec un anticorps contre les phosphoépitopes
Stimulation aux facteurs de croissance / mitose	K8 S33, S73	-Analyse en culture cellulaire -Hépatectomie partielle chez la souris
Interaction avec la famille de protéine 14-3-3	K18 S33	-Analyse des mutations en culture cellulaire
Compartiment cellulaire spécifique	K18 S33, S52	-Tissus marqués avec un anticorps contre les phosphoépitopes
Protection contre un stress cellulaire	K8 S73	-Association de l'hyperphosphorylation des K8/18 avec une variété de stress chez des cultures cellulaires et des souris
Apoptose	K8 S73, S431 K18 S52	Induction de l'apoptose en cultures cellulaires

Tiré de : (Omary, Ku *et al.* 1998)

### 3.4 PHOSPHORYLATION DE LA SÉRINE 73 DE LA K8 :

Plusieurs études ont démontrées que la phosphorylation des K8/18 est augmentée en situation de stress (Liao, Lowthert *et al.* 1995; Ku, Michie *et al.* 1996). La phosphorylation de la sérine 73 de la K8 (K8 pS73) est impliquée dans de nombreux événements cellulaires (tableau 3.3). En fait, la phosphorylation de la K8 S73 se comporte comme un interrupteur activé (présence de phosphorylation) pendant la mitose, suite une variété de stress cellulaire comme un choc thermique ou l'exposition à des drogues, et au cours de l'apoptose (Ku, Liao *et al.* 1997; Ku, Azhar *et al.* 2002). La K8 S73 est donc considérée comme un des sites de phosphorylation important de la K8. Au niveau du foie, la phosphorylation de la K8 S73 chez l'homme, ou la K8 S79 chez la souris, est associée à une réorganisation du réseau de FIs (Liao, Ku *et al.* 1997; Ku et Omary 2000). La phosphorylation de la K8 S73 serait également un bon indicateur de stress cellulaire (Toivola, Zhou *et al.* 2002). Leurs recherches ont montré que

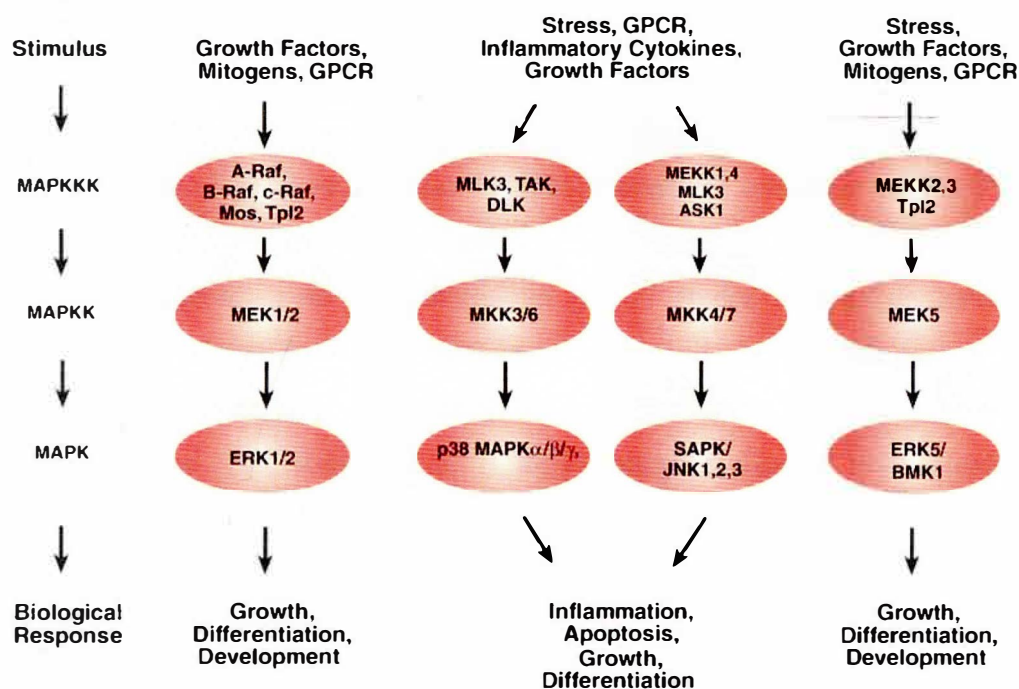
l'anisomycine, une substance induisant l'apoptose, ainsi que la GF crée une augmentation de la phosphorylation de ce site de phosphorylation chez des souris normales (Ku et Omary 1997; Liao, Ku *et al.* 1997; Marceau, Loranger *et al.* 2001; Stumptner, Fuchsbichler *et al.* 2001).

Les chercheurs soupçonnent la K8 pS73 d'avoir une importance capitale au niveau de la régulation des fonctions associées aux kératines (Marceau, Loranger *et al.* 2001; Coulombe et Omary 2002). Découvrir les kinases ainsi que les voies de signalisation qui médient la phosphorylation de ce site est donc primordiale et pourrait apporter des éléments très utiles pour prévenir, contrôler ou même guérir certaines maladies, particulièrement au niveau du foie (Marceau, Loranger *et al.* 2001; Coulombe et Omary 2002). Plusieurs chercheurs ont donc tenté d'identifier les kinases impliquées dans la phosphorylation de la K8 S73. Les mitogen-activated protein kinases (MAPKs) représentent une famille de protéines qui peuvent être activées en cas de mitose, d'apoptose ou de stress cellulaire tout comme la K8 pS73 (Liao, Ku *et al.* 1997; Martin-Blanco 2000; Campos, Bedard *et al.* 2002; Hall et Davis 2002). La K8 S73 pourrait donc être une cible pour les protéines de la famille des MAPKs activées par le stress (He, Stepulak *et al.* 2002).

### 3.5 Les MAPKs :

Les cellules d'un organisme multicellulaire doivent communiquer entre elles pour contrôler leur croissance, réguler leur développement et coordonner leur fonction. Parmi les cascades enzymatiques impliquées dans la réponse aux facteurs de croissances, aux cytokines et au stress, on retrouve les protéines appartenant à la famille des MAPKs (Martin-Blanco 2000; Hall et Davis 2002). Deux classes distinctes de MAPKs ont été identifiées, les "stress-activated protein kinase" (SAPKs) et les "extracellular signal-regulated kinases" (ERKs). Les SAPKs sont des kinases activées par la réponse pro-inflammatoire des cytokines et par différentes formes de stress cellulaires. La famille des SAPKs regroupe entre autre les kinases p38, p46-p54 et JNK (c-Jun N-terminal kinase) (figure 3.2) (Hall et Davis 2002). La famille des ERKs

regroupe les MAPKs qui sont principalement activées par le déclenchement de la mitose et par des facteurs de croissance (Hall et Davis 2002). Chaque classe de MAPKs est activée par des stimuli distincts et induits des réponses physiologiques spécifiques. Bien que la fonction principale des MAPKs est de réguler l'activité de plusieurs facteurs de transcriptions, certaines protéines cytoplasmiques comme Tau, une protéine neuronale associée aux MTs, HSP 27 et la kératine 8 peuvent aussi être phosphorylées par les MAPKs (Stokoe, Engel *et al.* 1992; Reynolds, Utton *et al.* 1997; Feng, Zhou *et al.* 1999; He, Stepulak *et al.* 2002; Ku, Azhar *et al.* 2002).



**FIGURE 3.2 : Principales voies d'activation des MAPKs.**

Tiré de : Catalogue 2003-2004 de Cell Signaling Technology inc.

### 3.6 p38 MAPK :

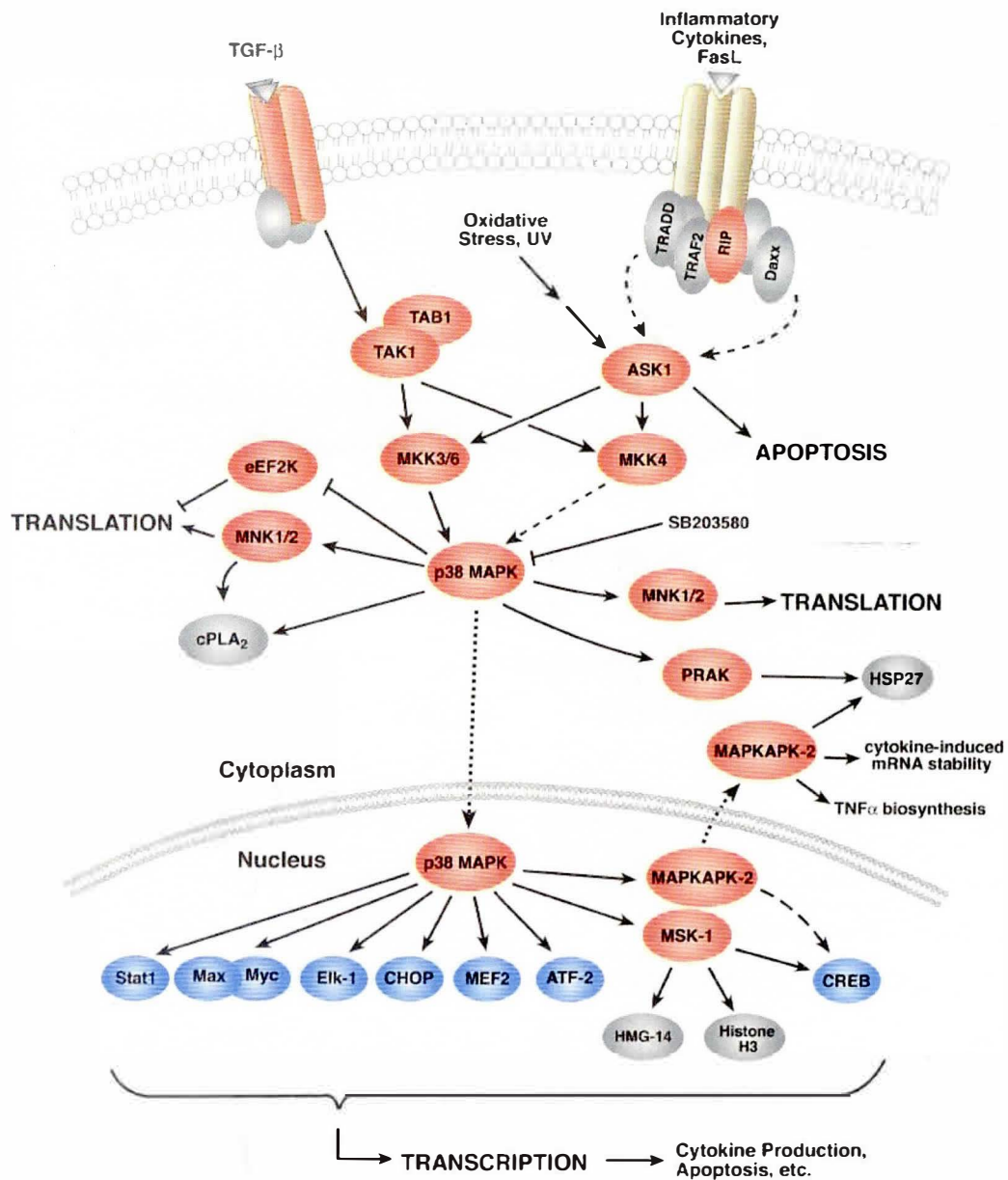
La kinase p38 est une protéine de la famille des SAPKs/MAPKs. Chez les mammifères, cinq isoformes de p38 ont été identifiées. Ces isoformes nommés p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\beta$ 2, p38 $\gamma$ /SAPK3 et p38 $\delta$ /SAPK4 (Han, Lee *et al.* 1994; Jiang, Chen *et al.* 1996; Lechner, Zahalka *et al.* 1996; Goedert, Cuenda *et al.* 1997; Jiang, Gram *et al.* 1997; Kumar, McDonnell *et al.* 1997) possèdent des poids moléculaires semblables



(360-372 acides aminés), présentent une homologie de séquence d'environ 65-70 % et sont tous activés par le TNF, l'interleukine-1 (IL-1) et les rayons UV (Raingeaud, Gupta *et al.* 1995). Chez les souris, p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  sont exprimés de façon ubiquitaire, p38 $\gamma$ /SAPK3 est principalement retrouvé dans les cellules musculaires tandis que les poumon et les reins sont riches en p38 $\delta$ /SAPK4 (Martin-Blanco 2000).

La kinase p38 représente la dernière étape de la cascade des MAPKs (Martin-Blanco 2000). En effet, p38 phosphoryle plusieurs facteurs de transcription impliqués en outre dans l'apoptose et la production de cytokines comme ATF2, Elk-1, CHOP, MEF2C et CREB (Raingeaud, Gupta *et al.* 1995; Raingeaud, Whitmarsh *et al.* 1996; Wang et Ron 1996; Iordanov, Bender *et al.* 1997; Wang, Flynn *et al.* 1998; Zhao, New *et al.* 1999) (figure 3.3). Pour amplifier le signal menant à l'activation des MAPKs, p38 peut phosphoryler des kinases comme MAPKAPK2 et MAPKAPK3, en plus de phosphoryler la protéine de choc thermique HSP27 et des facteurs de transcription (Stokoe, Engel *et al.* 1992). Cette amplification de l'activité des MAPKs peut entre autre activer les cytokines et la synthèse de TNF $\alpha$  et mener à des phénomènes cellulaires comme l'apoptose (Tan, Rouse *et al.* 1996; Fukunaga et Hunter 1997; Heidenreich, Neininger *et al.* 1999).

Bien que les fonctions de p38 *in vitro*, qui ont fait l'objet de nombreuses études, soient relativement bien connues, le rôle de p38 *in vivo* demeure mal connu. Chez les mammifères, p38 est une protéine homologue à la protéine kinase HOG1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui est impliquée dans la réponse au stress hyperosmotique (Brewster, de Valoir *et al.* 1993; Han, Lee *et al.* 1994). Plusieurs formes de stress menant à l'activation de p38 ont été identifiés (Kyriakis et Avruch 1996). Les chercheurs ont déterminé que p38 est principalement activée par les cytokines inflammatoires, en cas de stress, lors de la croissance et de l'apoptose (Davis 1994; Kyriakis et Avruch 1996; Ip et Davis 1998; Kuan, Yang *et al.* 1999; Davis 2000).



**FIGURE 3.3 : Voies de signalisation activant p38 MAPK.**

Tiré de : Catalogue 2003-2004 de Cell Signaling Technology inc.

Le rôle de p38 varie donc grandement en fonction du type de cellules et des conditions cellulaires. Les exemples suivants démontrent bien ce phénomène. Des études ont démontré que l'activation de p38, en réponse à des médiateurs non physiologiques comme le  $H_2O_2$ , les rayons UV et les rayons X ainsi que par des médiateurs physiologiques comme le "transforming growth factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) et les

cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , peut mener à une grande variété de réponses cellulaires *in vitro* : induction de l'apoptose dans plusieurs types de cellules (Xia, Dickens *et al.* 1995; Kummer, Rao *et al.* 1997); la différenciation (Ip et Davis 1998); maintien de l'homéostasie des fibroblastes (Ellinger-Ziegelbauer, Kelly *et al.* 1999); stimulation de la prolifération des lymphocytes B et T (Craxton, Shu *et al.* 1998); différenciation neuronale (Morooka et Nishida 1998); hypertrophie des cellules musculaires cardiaques (Nemoto, Sheng *et al.* 1998) ou encore l'agrégation des plaquettaire (Saklatvala, Rawlinson *et al.* 1996). p38 est également impliquée dans la prolifération des thymocytes *in vivo* (Diehl, Enslen *et al.* 2000), dans la régulation de l'apoptose des cellules T (Merritt, Enslen *et al.* 2000) et dans la production de cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire (Rincon, Enslen *et al.* 1998; Lu, Yang *et al.* 1999; Wysk, Yang *et al.* 1999). Des chercheurs ont récemment démontré que, dans les cellules rétiennes, l'activité de p38 est nécessaire en situation normale de mitose et que l'inhibition de cette kinase mène à l'arrêt de la mitose (Campos, Bedard *et al.* 2002).

Dépendamment du type de cellules et des stimulus, p38 peut avoir un rôle d'activateur ou d'inhibiteur pour plusieurs des fonctions décrites précédemment (Nebreda et Porras 2000). Par exemple, plusieurs études ont montré que p38 peut induire l'apoptose des neurones (Kawasaki, Morooka *et al.* 1997; Kikuchi, Tenneti *et al.* 2000), tandis que dans d'autre cas, cette kinase peut protéger les neurones contre la mort cellulaire programmée (Mielke, Brecht *et al.* 1999). L'ensemble de ces observations montre bien l'étendue des multiples fonctions ainsi que la complexité de cette kinase.

### 3.7 SAPKs/JNK :

La kinase JNK est un autre membre des SAPKs. Comme p38, JNK est activée par le stress, les cytokines inflammatoires, lors de la croissance et de l'apoptose (Davis 1994; Kyriakis et Avruch 1996; Ip et Davis 1998; Kuan, Yang *et al.* 1999; Davis 2000). Il existe trois isoformes de JNK nommés JNK1, JNK2 et JNK3. L'isoforme le moins répandu est JNK3. Chez la souris, ce dernier n'est en effet retrouvé que dans le cerveau, le cœur et les testicules (Gupta, Barrett *et al.* 1996; Yang, Kuan *et al.* 1997; Hall et

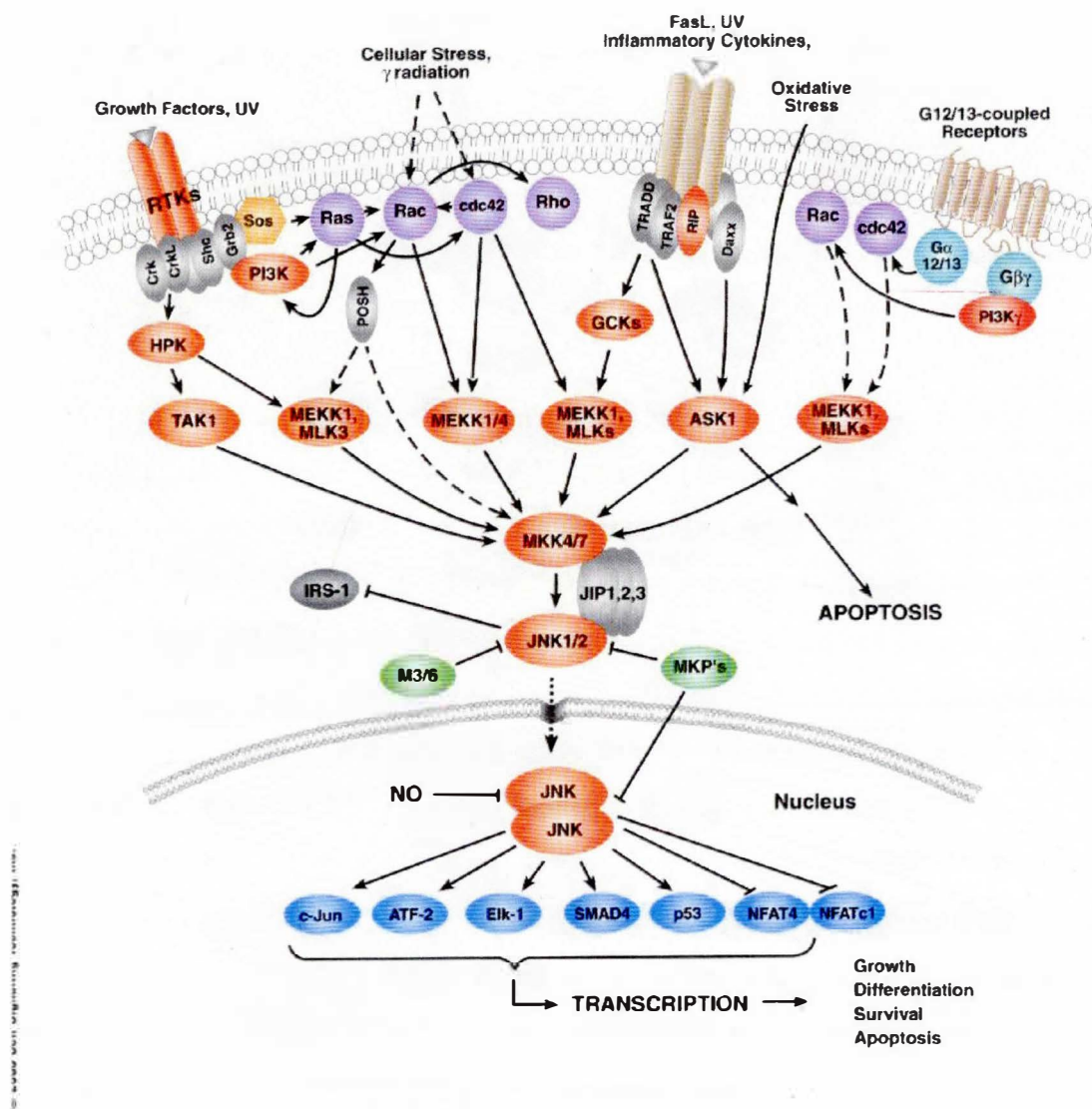
Davis 2002) contrairement aux autres types de JNK qui sont beaucoup plus répandus. Les isoformes JNK1 et JNK2 ont des poids moléculaires respectifs de 46 et 54 kDa (Gupta, Barrett *et al.* 1996). Pour être activée, JNK doit être phosphorylée au niveau de son motif thréonine-X-tyrosine identique pour tous les isoformes de cette kinase. Ce motif comprend les résidus thréonine 183 et tyrosine 184 qui doivent donc être phosphorylés pour rendre la kinase active (Hall et Davis 2002).

La protéine JNK a été identifiée pour la première fois comme une kinase spécifique au facteur de transcription c-Jun (Pulverer, Kyriakis *et al.* 1991). Depuis, plusieurs autres substrats de JNK ont été identifiés. Ces derniers, principalement des facteurs de transcription, incluent Elk-1, ATF, p53, DPC4, NFAT4 et Sap-1 (Whitmarsh et Davis 1996; Widmann, Gibson *et al.* 1999) (figure 3.4). Au niveau du cytoplasme, on compte de plus en plus de cibles de JNK. Des études rapportent que certaines protéines composant le cytosquelette comme Tau (Reynolds, Utton *et al.* 1997; Reynolds, Betts *et al.* 2000), ainsi que des protéines de FIs comme NF-H et la K8 sont des substrats de JNK (Giasson et Mushynski 1996; He, Stepulak *et al.* 2002).

Les activateurs de JNK comme MKK4 et les protéines de la familles des MKKKs peuvent souvent activer d'autres MAPKs comme p38 ou ERK (Derijard, Raingeaud *et al.* 1995). Par contre, une surexpression de ces activateurs peut spécifiquement induire l'activation de JNK (Tournier, Whitmarsh *et al.* 1997; Tournier, Whitmarsh *et al.* 1999).

Parmi les activateurs physiologiques de JNK, on retrouve les récepteurs de mort cellulaire récepteur Fas (Fas-R) et récepteur TNF (TNF-R) (Davis 2000). Il sera question de l'activation de p38 par ces récepteurs de mort cellulaire dans le chapitre de l'apoptose. Fas-R est un activateur physiologique de l'apoptose pour une grande variété de cellules et la kinase JNK fait intégralement partie du signal médié par Fas-R, autant dans les cellules sensibles et insensibles à l'induction de l'apoptose par Fas-R (He, Stepulak *et al.* 2002). Suite à l'activation de Fas-R, JNK peut être activée par plusieurs mécanismes comme par la protéine Daxx, impliquée dans l'apoptose médié par Fas

(Yang, Khosravi-Far *et al.* 1997), par l'activation de MKK1 par les caspases (He, Stepulak *et al.* 2002), par la JNK kinase kinase (Cardone, Salvesen *et al.* 1997; Rudel et Bokoch 1997; Deak, Cross *et al.* 1998; Ip et Davis 1998), et par une augmentation de la quantité de céramide résultante de l'hydrolyse de la sphingomyéline (Verheij, Bose *et al.* 1996).



**FIGURE 3.4 : Voies de signalisation activant JNK.**

Tiré de : Catalogue 2003-2004 de Cell Signaling Technology inc.

Plusieurs études ont montré que l'activation de JNK est indépendante de l'apoptose, tandis que d'autres chercheurs ont rapporté que le déclenchement de la mort

cellulaire programmée médiée par Fas-R semble nécessiter l'activation de JNK (Goillot, Raingeaud *et al.* 1997; Lenczowski, Dominguez *et al.* 1997; Ip et Davis 1998). Le mécanisme de régulation de l'activation de JNK est donc complexe et dépend de chaque type de cellule.

### 3.8 Phosphorylation de K8 S73 par p38 et JNK :

La K8, p38 et JNK sont des protéines qui ont toutes été reliées à l'apoptose, la croissance et la réponse cellulaire au stress. Des études récentes, réalisées sur des cultures cellulaires, ont révélé que JNK et p38 seraient les kinases responsables de la phosphorylation de K8 S73 (He, Stepulak *et al.* 2002; Ku, Azhar *et al.* 2002).

Les travaux de He et ses collaborateurs ont montré que, dans les cellules cancéreuses de colon HT-29, la K8 S73 est phosphorylée suite à une stimulation du récepteur de mort cellulaire Fas-R ou à une exposition aux rayons UV (He, Stepulak *et al.* 2002). Ces traitements entraînaient une augmentation de l'activité de JNK (He, Stepulak *et al.* 2002). JNK est également activée par la stimulation de Fas-R dans plusieurs lignées cellulaires (Abreu-Martin, Palladino *et al.* 1999; Holmstrom, Tran *et al.* 1999). La kinase JNK pourrait donc être responsable de la régulation de la phosphorylation de la K8 S73 suite à l'induction de l'apoptose.

Il est intéressant de noter que la majorité des MAPKs sont impliquées dans la réponse de l'activation de Fas-R (Juo, Kuo *et al.* 1997; Holmstrom, Schmitz *et al.* 2000) mais que p38 et ERK ne semble pas être significativement activées par Fas-R dans les cellules HT-29. Bien que les tests *in vitro* indique que p38 et ERK semble être capable d'interagir avec la K8 S73 dans les cellules HT-29, la kinase JNK semble être la MAPKs la plus fortement impliquée dans la phosphorylation de K8 S73 en réponse à l'activation de Fas-R. Il a aussi été démontré par immunoprécipitation que JNK et la K8 pS73 sont associées un à l'autre dans les cellules HT-29 suite à une exposition aux rayons UV ou à la stimulation de Fas-R. Selon ces chercheurs, JNK pourrait même être

séquestrée par la K8, ce qui impliquerait que les kératines peuvent participer à la régulation des fonctions de JNK (He, Stepulak *et al.* 2002).

Une relation possible entre la K8 pS73 et la p38 MAPK a été proposée pour la première fois dans les travaux de Feng *et al.* 1999. Ces derniers ont utilisé le pervandante, un inhibiteur de phosphatases des tyrosines, chez des cellules HT-29 pour augmenter la phosphorylation des tyrosines des K8/19. Ils ont alors noté que la phosphorylation de la K8 S73 augmentait du même coup. Ces chercheurs ont proposé que la p38 phosphoryle la K8 S73 ainsi que les tyrosines des K8/19 (Feng, Zhou *et al.* 1999).

Les travaux de Ku *et al.* 2002 ont par la suite tenté de démontrer la relation exacte entre p38 et la K8 pS73. Les tests *in vitro*, effectués à partir de kératines isolées des cellules HT-29, ont clairement montré que l'activation de p38 ou de p42 entraînait la phosphorylation sur la K8 S73. Ces chercheurs ont aussi déterminé que p38 est la MAPK la plus efficace pour phosphoryler la K8 S73. Pour ce faire, des cellules de reins de bébés hamsters (BHK), dont les FIs sont normalement dépourvues de kératines, ont été utilisées. Les gènes des protéines K8 et K18 de types sauvages ont été co-transfectés dans ces cellules BHK. Cette démarche a aussi été réalisée avec des gènes de K8 mutés au niveau de la S73, de la S23 ou de la S431. Trois jours après la transfection, les kératines ont été immunoprécipitées et mises en présence de  $^{32}\text{P}$  et de l'une des kinases p38, p42 ou JNK. Ces tests de phosphorylation *in vitro* ont montré que la présence de JNK ou de p42 menait à une légère phosphorylation sur la K8 tandis que la présence de p38 conduisait à une hyperphosphorylation de la K8. De plus, seule la mutation de la S73 cause la perte de l'hyperphosphorylation de la K8 tandis que les autres mutations n'ont pas d'effet sur le niveau de phosphorylation. Ceci suggère que la K8 S73 est le substrat principal de p38 (Ku, Azhar *et al.* 2002).

Dans le but de déterminer si p38 est la kinase responsable de la phosphorylation de K8 S73 *in vivo*, les mêmes chercheurs ont traité des cellules HT-29 avec l'anisomycine pour activer la p38 (Cano, Doza *et al.* 1996). Bien que le niveau de p38 ne varie pas au

cours du traitement, les niveaux de phospho-p38 et de K8 pS73 augmentent rapidement. Cette expérience est en accord avec les résultats *in vitro* et l'hypothèse selon laquelle p38 régule la phosphorylation de la K8 S73 puisque seule la kinase active phospho-p38 augmente avec le traitement et que K8 pS73 augmente de façon parallèle. Le traitement des cellules HT-29 avec un autre activateur de p38, le MMS (méthyl méthanesulfonate) donne des résultats semblables. Cette étude a également démontré par immunoprécipitation que p38 est associée à la K8 dans les cellules BHK co-transfectées pour exprimer les K8/18 et p38. Cette association *in vivo* n'a cependant pas été détectée dans des cellules non-transfectées comme HT-29 (Ku, Azhar *et al.* 2002).



## CHAPITRE 4

### *Apoptose et filaments intermédiaires de kératines*

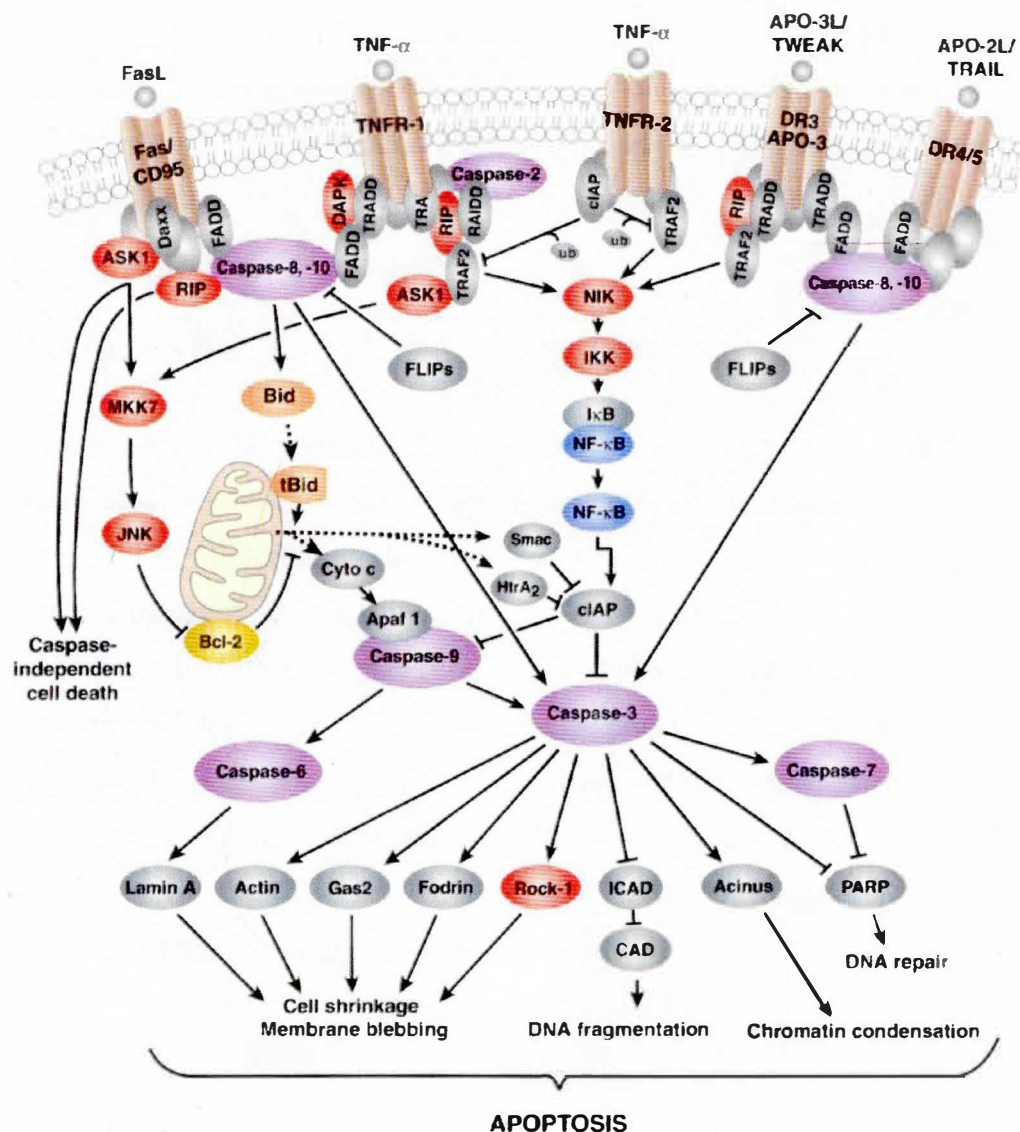
#### 4.1 APOPTOSE, CASPASES ET KÉRATINES:

Les organismes pluricellulaires ont mis au point un mécanisme pour éliminer une cellule endommagée et potentiellement dangereuse en affectant le moins possible son environnement. Ce mécanisme d'autodestruction est nommé mort cellulaire programmée ou apoptose. Le mot apoptose vient du mot grec "apoptosis" qui fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne. Lors de l'apoptose, il y a condensation du noyau, l'ADN est fragmenté et la cellule se rompt en corps apoptotiques qui sont par la suite rapidement phagocytés. L'apoptose est fréquente durant le développement embryonnaire mais elle existe aussi dans les tissus adultes. Par exemple, elle représente une arme particulièrement importante pour la destruction de cellules capables de se développer et tumeurs malignes (Karp 2004).

Le processus menant à la mort cellulaire programmée emprunte généralement la voie des caspases. Les caspases sont un groupe d'enzymes protéolytiques activées au début de l'apoptose et responsable du déclenchement de la plupart des changements observés pendant la mort cellulaire programmée. Les caspases remplissent ce rôle par le clivage de protéines essentielles comme des kinases, les lamines nucléaires et certaines protéines du cytosquelette (Karp 2004).

De nombreux facteurs, comme les récepteurs de mort cellulaire, interviennent pour susciter l'apoptose, mais tous aboutissent à une voie commune passant par la mitochondrie, la protéine Bcl-2 et les caspases. Au niveau de la mitochondrie, on assiste à l'ouverture de mégapores suite à la disparition de l'effet protecteur des protéines Bcl-2. L'ensemble des protéines Bcl-2, Bax et Bad ont un effet régulateur sur l'ouverture et la fermeture de ces pores, ce qui régule du même coup la libération du cytochrome C. Ce dernier active des enzymes, les caspases clivées, ayant une activité de protéase à

cystéine qui clivent les protéines spécifiquement au niveau d'un aspartate. La transition des précurseurs des caspases clivées, les procaspases, en caspases actives suite à la libération du cytochrome C de la mitochondrie, mène à l'activation d'endonucléases responsables de la fragmentation de l'ADN (Lodish, Berk *et al.* 2000; Karp 2004) (figure 4.1).



**FIGURE 4.1 : Caspases et apoptose**

Tiré de : Catalogue 2003-2004 de Cell Signaling Technology inc.

Les caspases sont responsable du clivage des protéines structurales pendant l'apoptose. Des protéines comme l'actine, la lamine nucléaire A et de certaines protéines de FIs comme la K18 représentent quelques exemples de substrats des caspases identifiées à ce jour (Lazebnik, Takahashi *et al.* 1995; Takahashi, Alnemri *et al.* 1996). Au niveau des kératines, des chercheurs ont démontré que la K18, mais pas la K8, est un substrat de la caspase 3 clivée au cours de l'apoptose (Caulin, Salvesen *et al.* 1997). La caspase 3 clivée coupe une séquence spécifique, DEVD<sup>238</sup> qui est également reconnue par les caspases 6 et 7 clivées (Caulin, Salvesen *et al.* 1997; Ku, Liao *et al.* 1997). La K18 contient une seconde séquence, DALD<sup>397</sup>, reconnue et clivée par les caspases 3 et 7 clivées (Ku et Omary 2001) (Leers, Kolgen *et al.* 1999).

#### 4.2 TUMOR NECROSIS FACTOR ET KÉRATINES:

Au niveau des kératines, des observations récentes suggèrent que les K8/18 sont impliquées dans la protection des cellules contre l'apoptose induite par la famille des récepteurs du TNF. En effet, plusieurs lignées cellulaires déficientes en K8/18 sont plus sensibles à l'induction de l'apoptose par le TNF (Caulin, Ware *et al.* 2000). Les chercheurs ont aussi observé que le récepteur TNFr2 et les K8/18 colocalisent en périphérie des cellules. En effet, la K8 peut lier le domaine cytoplasmique du TNFr2 et du récepteur lymphotoxine- $\beta$  (LT $\beta$ R). Il est aussi intéressant de noter que d'autres récepteurs de mort cellulaire comme Fas et TNFr1 ne sont pas associés aux K8/18. Au niveau des hépatocytes, le traitement d'animaux déficients en K8 ou en K18 par la ConA, une substance hépatotoxique produisant une hépatite, a montré que l'absence de l'une ou l'autre des kératines sensibilise les animaux à l'apoptose. Suite à ce traitement, on observe également une augmentation hépatique des ligands Fas et TNF (Ksontini, Colagiovanni *et al.* 1998; Tagawa, Kakuta *et al.* 1998; Zhang, Cook *et al.* 2000).

Il a été démontré que l'induction de l'apoptose par le TNF peut être inhibé par une interférence dans le transport du TNFr1 de l'appareil de Golgi à la surface de la cellule (Neznanov, Kondratova *et al.* 2001). Les K8/18 pourraient donc avoir un effet anti-apoptotique en régulant le transport des récepteurs de mort cellulaire vers la surface

de la cellule. D'autres études suggèrent que la K8 pourrait également avoir un effet modérateur sur la signalisation produite par les récepteurs du TNF (Ku, Liao *et al.* 1996; Liao et Omary 1996; Caulin, Ware *et al.* 2000). Par exemple, des cellules déficientes en kératines montrent une augmentation de l'activité de NF- $\kappa$ B et de JNK en réponse au TNF (Caulin, Ware *et al.* 2000).

À un autre niveau, il a été montré que la K18 peut se lier au "TNFr1-associated death domain protein" (TRADD) (Inada, Izawa *et al.* 2001). Cette découverte met en évidence l'existence d'une compétition entre les kératines et le TNFr1 pour la liaison du TRADD. La liaison du TNFr1 et de TRADD mène à l'activation de la caspase 8 et au processus apoptotique, ce qui montre bien que les K8/18 peuvent avoir un effet protecteur important contre l'apoptose (Oshima 2002). L'ensemble de ces observations suggère donc que les K8/18 possèderaient un rôle de protection des hépatocytes contre l'apoptose induit par le TNF.

#### **4.3 Fas ET KÉRATINES:**

Très récemment, une étude a permis de montrer que la K8 possédait un rôle de protection similaire contre l'apoptose induite par Fas dans les hépatocytes (Gilbert, Loranger *et al.* 2001). Des hépatocytes en culture provenant de souris déficientes en K8 sont particulièrement sensibles à l'anticorps activateur de Fas. Cette sensibilité des hépatocytes n'a pas été observée pour le TNF et le "TNF-related apoptosis inducing ligand" (TRAIL). Aussi, les hépatocytes déficients en K8 présentent une répartition différente de Fas par rapport aux hépatocytes sauvages. En effet, la délétion de la K8 est liée à une augmentation de Fas à la surface des cellules (Gilbert, Loranger *et al.* 2001). Par contre, la quantité totale de Fas est similaire entre les hépatocytes sauvages et ceux ayant subi la délétion d'une kératine. Cette augmentation de Fas à la surface des hépatocytes peut induire l'apoptose car la surexpression des récepteurs de mort cellulaire peut déclencher les cascades apoptotiques même en absence de ligand (Gilbert, Loranger *et al.* 2001). Il a été suggéré que les K8/18 pourraient médier l'apoptose en jouant un

rôle dans la régulation du transport de Fas de l'appareil de Golgi vers la surface de la cellule (Gilbert, Loranger *et al.* 2001; Oshima 2002).

Cette hypothèse est appuyée par des études qui montrent que, chez plusieurs lignées cellulaires, la relation de K8/18 avec les récepteurs de mort cellulaire est reliée au phénomène de résistance aux drogues, comme la GF, pouvant mener à l'apoptose (Bauman, Dalton *et al.* 1994; Anderson, Heindl *et al.* 1996; Oshima 2002). En effet, certaines lignées cellulaires déficientes en K8/18 se sont montrées plus sensibles aux agents mutagènes qui induisent l'expression de Fas à la surface des cellules dans plusieurs cellules cancéreuses (Muller, Wilder *et al.* 1998).

#### **4.4 SYSTÈME UBIQUITINE-PROTÉASOME:**

Le système ubiquitine-protéasome est autre mécanisme affectant les kératines lors de l'hépatite alcoolique qui peut mener à l'apoptose (Bardag-Gorce, van Leeuwen *et al.* 2002; Joshi-Barve, Barve *et al.* 2003). La dégradation des protéines dans les cellules est principalement assurée par le système ubiquitine-protéasome (Lee et Goldberg 1998). Ce dernier contrôle le niveau de plusieurs protéines impliquées dans l'expression des gènes, la division cellulaire, l'expression des récepteurs de la surface cellulaire, l'inflammation et la réponse au stress. Les protéasomes représentent également un mécanisme de défense cellulaire puisqu'ils assurent l'élimination des protéines endommagées par des mutations, des erreurs de traduction ou le stress oxydatif (Lee et Goldberg 1998).

La consommation massive d'éthanol altère le niveau d'ubiquitine chez les patients souffrants d'hépatite alcoolique, ce qui suggère l'existence d'anomalie dans les fonctions du système ubiquitine-protéasome (Takagi, Yamauchi *et al.* 1999). Des études réalisées sur des animaux nourris avec une diète contenant de l'éthanol ont montré une diminution significative de l'activité protéolytique des protéasomes ainsi que des erreurs de fonction de ces protéasomes (Fataccioli, Andraud *et al.* 1999; Donohue 2002). D'autres études ont montré que les hépatocytes de personnes alcooliques contiennent

beaucoup d'ubiquitines accumulées dans les CMs, ce qui suggèrent que la formation des CMs résulterait de l'inhibition du système ubiquitine-protéasome (Bardag-Gorce, van Leeuwen *et al.* 2002). Une étude récente a démontré que l'inhibition du système ubiquitine-protéasome dans les hépatocytes humains mène à l'apoptose et à l'augmentation massive de l'expression de la cytokine inflammatoire IL-8 par ces même cellules (Joshi-Barve, Barve *et al.* 2003). L'ensemble de ces études montrent que le système ubiquitine-protéasome a un rôle important dans le développement des maladies du foie, surtout en ce qui concerne l'hépatite alcoolique (Donohue 2002).

## CHAPITRE 5

### *Modèle animal et hépatite alcoolique*

#### 5.1 MODÈLE ANIMAL:

Le développement de l'hépatite alcoolique humaine est associée à des modifications dans l'organisation des FIs et à formation de CMs. Différents modèles animaux ont été développés pour la recherche scientifique sur les maladies humaines comme l'hépatite alcoolique. Plusieurs drogues ont été utilisées chez la souris pour recréer certaines modifications, comme la réorganisation des FIs et la formation des CMs, observées chez les humains atteints d'hépatite alcoolique (tableau 3.1) (Jensen et Gluud 1994).

**TABLEAU 5.1**

**Agents hépatotoxiques utilisé pour le développement des CMs chez la souris.**

<b>Drogue expérimentale</b>	<b>Durée de l'exposition</b>
Griséofulvine	Mois
Griséofulvine avec maléate de perhexiline	Semaines
3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocholidine	Mois
Colchicine	Mois
Dieldrine	Années

Tiré de : (Jensen et Gluud 1994)

En effet, l'exposition de souris à des agents hépatotoxiques comme la colchicine, la DDC ou la GF induit le développement d'une hépatite et, à long terme, la formation des CMs. Il est intéressant de noter que les CMs formés suite à l'exposition à ces drogues sont biochimiquement et morphologiquement semblables à ceux qu'on observe au niveau de l'hépatite alcoolique humaine (Denk, Gschnait *et al.* 1975; Denk, Stumptner *et al.* 2000). La souris représente donc un excellent modèle animal pour

l'étude des fonctions des kératines dans les tissus et la recherche sur l'hépatite alcoolique.

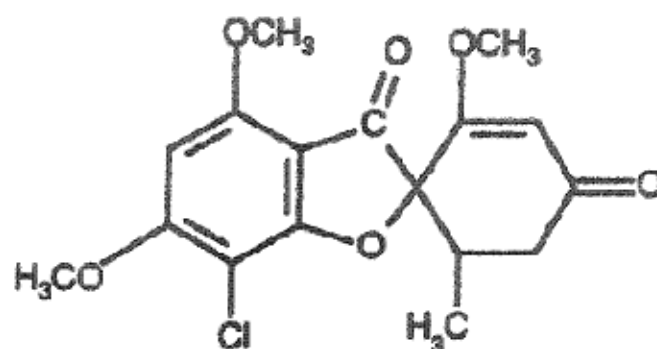
## 5.2 LA GRISÉOFULVINE :

La GF (figure 5.1) est un des agents hépatotoxiques le plus utilisé pour l'étude du développement de l'hépatite alcoolique et de la formation des CMs chez la souris. Un traitement orale, chronique et à forte dose (2,5% p/p) de GF chez la souris, provoque le développement d'une hépatite caractérisée par une augmentation du volume des hépatocytes, une dilatation des canalicules biliaires, des dommages cellulaires comme l'apoptose, l'inflammation, l'accumulation hépatique de porphyrines et une augmentation de la densité du réseau de FIs (Denk, Gschnait *et al.* 1975; Gschnait, Konrad *et al.* 1975; Yokoo, Craig *et al.* 1979; Cadrin, Hovington *et al.* 2000). Les effets du traitement à la GF sont rapidement observables chez les souris car après seulement deux semaines de traitement, on observe des hépatocytes contenant des K8 S79 phosphorylées (Fausther, Villeneuve *et al.* 2004). Ces cellules sont souvent regroupées sous forme d'amas contenant au centre une cellule dépourvue de K8 pS79. Il a été suggéré que cette cellule soit un hépatocyte en apoptose, mais des recherches plus approfondies seront nécessaires pour mieux comprendre ce phénomène (Fausther, Villeneuve *et al.* 2004). Après trois mois de traitement, on observe que le foie des souris a quelque peu récupéré des effets néfastes causés par la GF. Les hépatocytes semblent en effet s'adapter au traitement puisque les canalicules biliaires retrouvent une taille comparable à ceux des foies de souris non traitées et la densité des FIs revient aussi à la normale (Cadrin, Hovington *et al.* 2000).

Après quatre à cinq mois de traitement à la GF, un bon nombre d'hépatocytes possèdent une forme irrégulière bien que leur réseau de FIs semble demeurer normal. D'autres hépatocytes ont par contre complètement perdu leur réseau de FIs au profit de l'apparition de CMs similaires au niveau microscopique et biochimique aux CMs observés dans le cas d'hépatite alcoolique chez l'humain (Jensen et Gluud 1994; Jensen et Gluud 1994; Cadrin, Hovington *et al.* 2000). Les souris traitées à la GF représente



donc un modèle animal possédant tous les éléments essentiels pour étudier les modifications des FIs et la formation des CMs au cours du développement de l'hépatite, ce qui en fait un modèle animal idéal pour nos recherches.



**FIGURE 5.1 : Structure chimique de la GF**

La GF est un antifongique, isolé de *Penicillium Griseofulvum* pour la première fois en 1939, a été utilisé tout d'abord chez le porc et ensuite chez l'humain comme antibiotique fongistatique pour les traitements des dermatophytes comme *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Tricophyton* (Oxford, Raistrick *et al.* 1939; De Carli et Larizza 1988; Knasmuller, Parzefall *et al.* 1997; Duriez, Dujardin *et al.* 2003). Bien que le mécanisme d'action de la GF n'est pas encore été complètement élucidé, il est connu qu'elle possède un effet anti-microtubules traduit par une inhibition du fuseau mitotique (Develoux 2001).

Tiré de : (Develoux 2001).

## CHAPITRE 6

### *Projet de recherche*

#### 6.1 TRAVAUX ANTÉRIEURS ET HYPOTHÈSES :

Comme décrit dans les chapitres précédents, la K8 S79 (équivalent chez la souris de la K8 S73 humaine) est un des sites de phosphorylation les plus importants des kératines retrouvées dans les hépatocytes. Des études ont démontré que la phosphorylation de la K8 S79 se comporte comme un interrupteur activé (présence de phosphorylation) suite des stress cellulaires comme un choc thermique ou l'exposition à des drogues, et également au cours de la mitose et de l'apoptose (Ku, Liao *et al.* 1997; Ku, Azhar *et al.* 2002). Ce site est phosphorylé en situation de mitose, de stress toxique et d'apoptose (Omary, Ku *et al.* 1998; Ku, Zhou *et al.* 1999), trois conditions cellulaires retrouvées chez les hépatocytes de souris traitées à la GF.

Très récemment, des travaux faits dans notre laboratoire ont montré que, suite au traitement à la GF, on observe des amas d'hépatocytes contenant la K8 pS79 (Fausther, Villeneuve *et al.* 2004). Ces amas cellulaires contiennent fréquemment en leur centre une zone dépourvue de cette phosphorylation. Suite à ces observations, il a été proposé que cette zone soit formée par un ou quelques hépatocytes en apoptose (Fausther, Villeneuve *et al.* 2004). Ce phénomène d'amas d'hépatocytes a aussi été observé chez des souris nourries avec une diète lithogénique (Tao, Toivola *et al.* 2003). Suite aux récentes études réalisées dans notre laboratoire, nous avons suggéré que les cellules situées au centre de ces amas sont le point de départ d'un signal de transduction dirigé vers les cellules voisines, ce qui y activerait des kinases spécifiques responsables de la phosphorylation des kératines. Cette phosphorylation serait alors à l'origine d'un mécanisme de résistance des hépatocytes à l'apoptose (Fausther, Villeneuve *et al.* 2004). Il est intéressant de noter que cette hypothèse est en accord avec la notion que K8/18 jouent un rôle de protection des hépatocytes contre l'apoptose (Omary, Ku *et al.* 1998;

Omary, Ku *et al.* 2002). Il serait donc intéressant d'identifier quelles sont les kinases responsables de la phosphorylation de la K8 S79 dans les hépatocytes.

Des travaux récents ont permis d'identifier deux kinases, p38 et JNK, capables de phosphoryler la K8 S73 chez des cellules HT-29. Ces protéines appartenant à la famille des MAPKs peuvent être activées en situation de stress, de croissance cellulaire et d'apoptose tout comme la K8 pS79. JNK et p38 représentent donc des kinases très intéressantes dans l'étude des voies de signalisation menant à la phosphorylation de la K8 S79 dans les hépatocytes de souris traitées à la griséofulvine.

## **6.2 OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIE :**

Dans le premier volet de ce projet de recherche, nous avons déterminé le rôle des SAPKs p38 et JNK dans la phosphorylation de la K8 S79 dans les hépatocytes de souris traitées à la GF. Nous avons aussi déterminé s'il y a des liens entre le rôle de ces kinases et certaine condition cellulaire comme la mitose, l'apoptose, la présence de CMs et l'organisation des hépatocytes en amas cellulaires contenant la K8 pS79.

Le second volet d'étude a été orienté vers l'apoptose dans le but de vérifier l'hypothèse de la présence d'un hépatocyte en apoptose dans le centre des amas cellulaires contenant la K8 pS79.

Ces objectifs ont été réalisés à l'aide des techniques d'électrophorèse SDS-PAGE, d'immunoprécipitation, d'immunobuvardage Western, de double marquage par immunofluorescence et de la méthode de TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated d'UTP nick end labeling) pour la détection de cellules en apoptose.

## CHAPITRE 7

### *Corps du travail*

#### 7.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE :

Le cytosquelette des cellules animales est constitué de trois types de filaments : les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires (FIs). Les kératines 8 et 18 (K8/18) sont les protéines de FIs les plus fréquemment retrouvées chez les cellules épithéliales.

Plusieurs maladies humaines du foie comme l'hépatite alcoolique sont associées à une réorganisation du réseau de FIs et à la formation de corps d'inclusions nommés Corps de Mallory (CMs). Il est maintenant généralement accepté que les kératines possèdent la capacité de protéger les hépatocytes contre le stress induit par un agent hépatotoxique. Le rôle de protection attribué aux kératines est associé à des modifications de leur expression, de leur organisation, de leur niveau de phosphorylation et de leur interaction avec des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire.

La K8 S73 humain (équivalente à la K8 S79 de la souris) fait partie des sites de phosphorylation les plus étudiés, elle est phosphorylée lors de la mitose, du stress cellulaire et de l'apoptose. Il a été démontré, chez des cellules HT-29 (carcinomes de colon humain), que la K8 S73 peut être phosphorylée par les "stress-activated protein kinases" (SAPKs) p38 et JNK *in vitro* suite à une exposition aux rayons UV. JNK et p38 appartiennent également à la famille des "mitogen-activated protein kinases" (MAPKs). JNK et p38 représentent des protéines intéressantes pour la recherche des kinases pouvant phosphoryler la K8 S73 puisqu'elles peuvent être activées en cas de mitose, d'apoptose ou de stress cellulaire tout comme la phosphorylation de la K8 S73.

Dans la présente étude, nous avons étudié l'implication des kinase p38 et JNK dans la phosphorylation de la K8 S79 dans les foies de souris traitées à la griséofulvine

(GF). La GF est un agent hépatotoxique utilisé pour induire une hépatite similaire à l'hépatite alcoolique humaine. L'intoxication chronique et à forte dose de souris à la GF mène au développement de corps d'inclusions morphologiquement et biochimiquement similaires aux CMs retrouvés chez l'être humain.

Nos résultats nous ont permis de démontrer que les hépatocytes contenant la K8 pS79 forment fréquemment des amas cellulaires après 2 semaines de traitement. Ces amas deviennent plus rare et contiennent moins de cellules après 5 mois de traitement. Les marquages de la K8 pS79 nous ont montré que des hépatocytes dépourvus de K8 pS79 sont présent au centre des amas cellulaire décrits précédemment. Dans ces cellules centrales, nous avons observé la présence de fragments de K18 et de la kinase p38, deux éléments souvent associés à l'apoptose. Les observations de la caspase 3 clivée et du marquage TUNEL dans ces mêmes cellules centrales démontrent clairement que, suite au traitement à la GF, des hépatocytes en apoptose se retrouvent entourés d'autre hépatocytes contenant la K8 pS79 qui ne sont pas en processus d'apoptose. L'ensemble de nos résultats nous amènes à suggérer que les hépatocytes en apoptose, constituant la zone apoptotique (ou endommagée) au centre des amas de cellules contenant la K8 pS79, seraient le point de départ d'un signal de transduction dirigé vers les cellules environnantes. Ce signal induirait l'activation de kinases spécifiques responsables de la phosphorylation des kératines ce qui mènerait à la résistance contre l'apoptose chez ces hépatocytes environnants.

## CONTRIBUTION DES AUTEURS

Martin Désaulniers a réalisé presque en totalité les expériences présentées dans ce travail de recherche. Kathleen Riopel a apporté une assistance technique au niveau de l'immunofluorescence et Anne-Marie Fortier a contribué à la production de la figure 6 de l'article. La supervision du travail en laboratoire de Martin Désaulniers et la conception du projet d'étude ont été réalisées par la directrice de mémoire Monique Cadrin. Martin Désaulniers et Monique Cadrin ont participé à la rédaction de l'article scientifique présenté dans le présent mémoire.

## 7.2 ARTICLE SCIENTIFIQUE :

### **Stress-Activated Protein Kinases, K8 phosphorylation on serine 79 and apoptosis in the response of mice hepatocytes to griseofulvin intoxication**

MARTIN DÉSAULNIERS<sup>1</sup>, KATHLEEN RIOPEL<sup>1</sup> AND MONIQUE CADRIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, Québec, CANADA.

Address requests to: MONIQUE CADRIN, Ph D.

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

Tel: (819) 376-5053

Fax: (819) 376-5084

Article soumis à la revue :

Laboratory Investigation

**Keywords:** apoptosis, stress, griseofulvin, keratin, intermediate filament, p38, JNK, hepatocyte, phosphorylation.

**Abbreviations :** IFs, intermediate filaments; K8, keratin 8; K8/K18, IFs composed of K8 and K18; K8 S79, serine 79 on K8; K8 pS79, phosphorylation of K8 pS79; MBs, Mallory Bodies; GF, griseofulvin; JNK, c-Jun N-terminal kinase; SAPK, stress-activated protein kinases; MAPK, mitosis-activated protein kinases; HSP, heat shock protein; PARP, poly-ADP-ribose polymerase; Abs, antibodies; TUNEL, terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling.

## Abstract:

K8 and 18 are the major intermediate filaments (IFs) proteins present in simple epithelia. Many human liver diseases, such as alcoholic hepatitis, are associated with IFs reorganization and formation of Mallory body. It is now generally accepted that keratins can protect hepatocytes against drug-induced stress liver injuries by modifications in their expression, organization, interaction with signalling molecules and phosphorylation. Human K8 S73 is one of the most studied phosphorylation site on K8. Phosphorylation on this site is induced during cell mitosis, cell stress and apoptosis. Recent studies have shown that both JNK and p38 MAPKs could phosphorylate K8 S73 *in vitro*. Those kinases can be implicated in cellular proliferation, differentiation and apoptosis. In this report, we analysed the implication of JNK and p38 MAPK in phosphorylation of K8 S79 (human K8 S73 equivalent) *in vivo* in griseofulvin-treated mice livers. Moreover, we analysed the relationship between K8 S79 phosphorylation, pJNK, p-p38 and apoptosis *in vivo*. We observed an increase of phospho-p38 in mitotic and apoptotic cells. However, K8 S79 phosphorylation was observed in mitotic cells but not in apoptotic cells. Phosphorylation of K8 S79 was rather localized in the neighbourhoods of apoptotic hepatocytes. These results suggest that *in vivo* p38 kinase may phosphorylate K8 in mitotic cells but is not involved in K8 phosphorylation in other hepatocytes. Moreover, we propose that apoptotic cells may provide a signal to surrounding cells that would induce phosphorylation of K8 S79 in cells that are in close proximity to apoptotic cells.

## Introduction:

Intermediate filaments (IFs) constitute with tubulin microtubules and actin microfilaments the three major cytoskeletal components of most mammalian cells. IFs proteins represent a large family of proteins expressed in a tissue and differentiation specific manner. Keratins constitute the largest group of IF protein family. They are divided into two types and form obligatory heteropolymers composed of equimolar amounts of the acidic type I (K9 - K20) and the neutral-basic type II (K1 - K8) keratins. [1-3].

It is now generally accepted that one function of keratin IFs network in multilayer epithelium is to provide tissue resistance to mechanical stress [4-6]. For instance, transgenic mice carrying keratin mutations that affect the proper polymerisation of IFs in epidermal cells present skin

blistering diseases. Similarly, human skin diseases such as epidermolysis bullosa simplex are caused by keratins mutations [4, 7-9].

As for epidermal keratins, the studies of transgenic mice targeting keratin 8 or keratin 18 (K8/K18) have allowed unraveling IF functions in simple epithelium such as in the liver. K8/18 is the only keratin pair present in hepatocytes thus, they are both necessary to form the IFs network [10, 11]. Transgenic mice that overexpress a dominant-negative K18 mutation (K18 R89C) as well as K8 or K18 null mice develop mild hepatitis and display greater liver sensitivity to mechanical and toxic stress than wild type animals. These results indicate that keratins protect hepatocytes from mechanical and toxic stress [11].

In humans, liver diseases such as alcoholic hepatitis, Wilson's disease, Indian childhood cirrhosis and liver steatosis in obesity are associated with modifications in hepatocytes IF organization and the formation of keratin containing aggregates called Mallory bodies (MBs) [12-15]. Recent studies have shown that mutations on K8 or 18 predispose to the development of human liver disease [16]. Taken together, these results support the hypothesis that in humans as well as in mice, keratins are necessary to preserve hepatocytes integrity upon stressful conditions. The mechanisms by which keratins accomplish these protective roles remain poorly understood [16].

Protein phosphorylation, which is mediated by specific kinases, plays a critical role in the regulation of numerous cellular events. Phosphorylation represent an important keratin post-translational modification and most likely regulates keratins functions. For instance, modulation of K8/18 phosphorylation at specific sites (K8 S79/S436/S33 and K18 S52) has been shown to be associated with various cellular events such as mitosis, apoptosis and stress response [17-19]. For example, K8 phosphorylation on S73 (mice K8 S79 equivalent) seems to operate like an on/off control in cultured cells and in tissue. K8 S73 is not phosphorylated in normal condition, but becomes phosphorylated when cells respond to specific stimuli such as mitosis or various stresses such as heat shock and exposure to drugs [20, 21]. Other studies have shown that the stress-activated protein kinases (SAPK) p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) are both able to phosphorylate the K8 S73 in human cultured cells [21, 22]. Interestingly, p38 and JNK are involved in cellular growth, proliferation, differentiation and apoptosis [23-27].



Chronic treatment of mice with a diet containing griseofulvin (GF) induces a series of modification in IF organization that lead on the long term to the formation of MBs, which are morphologically and biochemically identical to human MBs [28]. In a recent study, we have demonstrated that GF intoxication represent a stress condition for hepatocytes by showing that the treatment induces the expression of the stress inducible form of the heat shock protein 70 (HSP70i) [29]. Moreover, the treatment induces a dramatic increase in K8/18 phosphorylation on different phosphorylation sites [29].

Given that GF intoxication represent a stress for hepatocytes and K8 S79 becomes phosphorylated in some hepatocytes during the treatment, we investigated whether a relationship exists between the 'switch on' of this phosphorylation site and apoptosis. In addition, we verified if the stress activated kinases p38 and JNK were involved *in vivo* in keratin phosphorylation on this specific site.

In the present report, we analysed by Western blotting and immunofluorescence livers from mice treated with GF for 0 to 5 months. The expression and localization of cleaved caspase 3 was analysed for the detection of apoptosis. Cleaved caspase-3 is one of the key executioners of apoptosis, as it is either partially or totally responsible for the proteolytic cleavage of many key proteins such as the nuclear enzyme poly-ADP-ribose polymerase (PARP) [30]. We compared these results with the expression and localization of K8, K8 phospho(p)S79, activated p38 and JNK. In agreement with our past report [29], the presence of K8 pS79 was frequently detected in clusters of cells surrounding unstained cell.

## MATERIALS AND METHODS

### ANTIBODIES (Abs)

Primary antibodies : rat monoclonal anti-K8 (Troma 1); mouse monoclonal anti-K8 pS73 Ab (LJ4) (a generous gift from Dr. Bishr Omary); rabbit polyclonal anti-caspase 3, anti-cleaved-caspase 3, anti-p38, anti-phospho-p38, anti-JNK, anti-phospho-JNK (Cell Signaling Technology Beverly, MA).

Secondary antibodies : TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate)-conjugated and peroxidase-conjugated goat anti-rat (Jackson Immunoresearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON); TRITC-conjugated and peroxidase-conjugated donkey anti-mouse; TRITC-conjugated and peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit (Jackson Immunoresearch, Bio/Can Scientific, Mississauga, ON) or Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit (Molecular Probes, Eugene, OR).

#### **ANIMAL MODEL AND TREATMENT**

Adult male C3H mice (Charles Rivers Canada, St-Constant, QC) were fed a semi-synthetic diet (Teklab Test Diet, Madison, WI) containing 2.5% GF (W/W) (a generous gift from Schering Corp., Bloomfield NJ) [28]. Control mice were fed the same diet without GF. Both control and treated mice were sacrificed by cervical dislocation after 2 weeks and 5 months of treatment. Livers were quickly frozen in 2-methylbutane in liquid nitrogen and kept at -80°C in 2-methylbutane (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON).

#### **PROTEIN PREPARATION AND IMMUNOPRECIPITATION**

20 mg of control or treated mice liver were homogenized in 1 ml of ice-cold PBS containing 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM NaF, 1mM PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatine pH 7.4. Samples were kept at -20°C until immunoprecipitation or electrophoresis. Keratins were immunoprecipitated from the whole homogenate using protein G-agarose beads with dusuccinimidyl covalently bound antibodies (Pierce Biotechnology inc., Rockford, IL.). After incubation with the complexe, proteins were recovered by solubilization in 25  $\mu\text{l}$  of Laemmli samples buffer without  $\beta$ -mercaptoethanol (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3 % SDS, 0.1 % bromophenol blue, 10 % glycerol).

#### **GEL ELECTROPHORESIS AND WESTERN BLOTTING**

Protein concentration was determined by the Lowry method modified for the presence of SDS [29, 31] and equal amounts of proteins 50  $\mu\text{g}$  were loaded on each well and resolved by electrophoresis on 10% or 15% SDS-PAGE gel [32]. Gels were stained with Coomassie blue to

confirm equal protein loading or processed for immunoblotting after transfer to nitrocellulose membranes (Bio-Rad laboratories Canada, Mississauga, ON). The membranes were blocked for 1 hour in PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 4.29 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2), or TBS (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6) containing 5 % skim milk (Carnation, Nestlé®, Wilkes-Barre, PA), washed three times with PBS-T or TBS-T (PBS or TBS containing 0.2% Tween 20), incubated with the different primary antibodies in PBS- or TBS-skim milk: anti-K8 for 1 hour, anti-K8 pS73 for 1 hour or overnight with the anti-procaspase-3, the anti-cleaved-caspase-3, the anti-p38, the anti-phospho-p38, the anti-JNK and the anti-phospho-JNK. The membranes were washed and incubated for 1 hour with the appropriate secondary peroxidase-conjugated antibody and washed. The chemiluminescent horseradish peroxidase substrate Luminol (Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON) was added to the membranes according to recommendations of the company, and membranes were exposed to Blue X-Omat X-ray film sheets (Mandel Scientific Company, Guelph, ON) to locate antibodies binding.

## IMMUNOFLUORESCENCE

5 µm cryosections of fresh liver were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS or TBS (pH 7.2), for 10 min at room temperature (RT), washed two times with PBS or TBS, and incubated with the different primary antibodies in PBS or TBS : Incubation was done for 1 hour at RT for the anti-K8 antibodies or overnight at 4°C for the anti-procaspase-3, anti-cleaved-caspase-3, anti-p38, anti-phospho-p38, anti-JNK, anti-phospho-JNK antibodies. Anti-K8 pS73 immunostaining was performed using the M.O.M. detection kit (Vector® Laboratories Canada, Burlington, ON) and an Avidin/Biotin blocking kit (Vector® Laboratories, Canada, Burlington, ON) according to the company's protocol. Sections were then incubated for 30 min with TRITC-conjugated or Alexa 488-labeled secondary antibodies and washed. For apoptosis detection, the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) was used to label the 3'-OH ends of DNA breaks with dUTP-fluorescein (TUNEL) for 60 min at 37°C (Roche Diagnostics, Mississauga, ON). The sections were mounted in P-phenylene diamine diluted 1:1 in glycerol and kept at -20°C. The sections were analysed using an Olympus® BX60 microscope (Olympus America Inc., Melville, NY) coupled with a CoolSNAP-PROcf monochrome camera (Meyer Instruments Inc., Houston, TX).

## RESULTS

### **K8 S79 phosphorylation, p38, JNK and caspase-3 in GF treated mice livers.**

The amount of K8, K18, K8 pS79, p38, JNK and caspase-3 was analyzed by Western Blotting of total proteins from control and GF-treated mice livers (2 weeks and 5 months). As described in our previous studies, GF intoxication induces an increase in the level of K8 and K18 in mice livers (Fig. 1A) [33]. Western blotting analysis show that K8 pS79 is not present in control mice livers. However we observed an important increase of the K8 pS79 level after 2 weeks of treatment. After 5 months of treatment, the level of phosphorylation decreased in comparison with the amount observed after 2 weeks of treatment (Fig. 1B). These results are in agreement with other studies and indicate that phosphorylation of K8 on S79 represent an early event in the response of the liver to GF intoxication [29].

MAPK/SAPK p38 and JNK have been identified as human K8 S73 (equivalent of mouse K8 S79) kinases in cultured cells [21, 22]. We wondered whether these kinases could be responsible for the K8 S79 phosphorylation observed in GF treated mice livers. Western blot analysis showed that both p38 and JNK are present in control and GF treated mice livers (Fig. 1C, 1E). To be active, p38 and JNK have to be respectively phosphorylated on Thr180/Tyr182 and Thr183/Tyr185. The modification in p38 and JNK activity after GF intoxication was thus analyzed by using antibodies against phospho-p38 and phospho-JNK. The results show that the level of phospho-p38 is increased after 2 weeks and 5 months of GF treatment (Fig. 1D). However, phospho-JNK is not detected in both control and treated livers (Fig. 1F).

To determine if apoptosis is involved in the response of the liver to GF intoxication, we analyzed the amount of procaspase 3 and cleaved caspase 3 in livers after different period of treatment. Control and treated livers contained procaspase-3 (Fig. 1G). Cleaved caspase-3 is present in both 2 weeks and 5 months treated livers which indicate that apoptosis occur in livers from GF treated mice.

**Association of K8/18 with p38 and JNK.** The work of Ku *et al.* 2002 and He *et al.* 2002 respectively revealed that p38 and JNK can co-immunoprecipitated with K8/18 in cultured cells

[21, 22]. If these kinases mediate keratins phosphorylation in GF treated mice livers, there is a possibility that they directly associate with keratins. We proceeded to immunoprecipitation of K8/18 and were not able to show by Western blotting the presence of JNK or p38 in the immunoprecipitate (Fig. 2). These results suggest that in the liver, JNK and p38 are not associated with keratins. However, the amount of JNK and p38 associated with K8/18 may have been too little to be detected. Thus, the possibility of the association between K8/18 and the kinases p38 and JNK cannot be totally excluded by these experiments.

**Analysis of the relationship between p38, phospho-p38 and K8 pS79 localisation in livers from GF treated mice.** In order to further analyze if a relationship exist between p38 and K8 pS79, we performed double immunostaining for the presence of p38 and K8 pS79 on GF treated mice liver sections. Previous studies have shown that , K8 pS79 is present in a subpopulation of cells, indicating that all hepatocytes are not affect the same way by the GF intoxication [29, 34]. For instance, K8 pS79 is frequently detected in clusters of cells surrounding unstained cells which were suggested to be undergoing apoptosis [29, 35]. K8 pS79 was also detected in mitotic hepatocytes.

In accordance with the work of Fausther *et al.* and Zatlouka *et al.*, our result clearly show that 2 weeks GF treatment leads to the phosphorylation of K8 S79 in cluster of cells cluster surrounding unstained cells (Fig. 3D, 4D) [29, 34]. After 5 months of GF treatment, the distribution of hepatocytes containing K8 pS79 was different from the one observed after 2 weeks of treatment. Clusters of labeled cells were smaller after 5 months of treatment (Fig. 3G, 4G). Immunofluorescence staining of p38 and phospho-p38, show that these proteins are not present in the clusters of K8 pS79 positives cells (Fig. 3E, 3H, 4E, 4H). However, active p38 is detected in K8 pS79 negative cells localized in the center of the clusters of K8 pS79 positive hepatocytes (Fig. 3E, 3H, 4E, 4H). This kinase can be involved in apoptotic process [25, 36, 37], Thus, cells positives for p38 kinase and surrounded by K8 pS79 positives hepatocytes may represent injured cells in apoptotic process [29].

Nevertheless, colocalization between phospho-p38 and K8 pS79 was observed in doublet hepatocytes which are suggested to be in post-mitotic stage (Fig. 4 F, G, H). This colocalization

does not depend on treatment since it was also observed in hepatocytes in mitosis in control mice livers (data not shown). The presence of p38 in mitotic cells is in agreement with its involvement in cell cycle control [38-43].

**Localization of JNK, phospho-JNK, K8 and K8 pS79 in hepatocytes of GF treated mice.** Irrespective of the fact that we did not detect phospho-JNK by Western blotting, we performed double immunofluorescence staining for the detection of K8 pS79 and JNK or phospho-JNK. Our results show that no hepatocytes are stained with the anti-phospho-JNK Ab in control and GF treated livers, (Fig. 5A,C,F,I). Thus no colocalization is observed between phospho-JNK and K8 pSer79 after 2 weeks treatment (Fig. 5E). Moreover, cells presents in the center of the K8 pS79 positive cells clusters, did not contain phospho-JNK (Fig. 5E). Mitotic cells stained with anti-K8 pS79 Ab, were not positive for JNK or phosphor-JNK (data not shown). K8 staining allowed the detection of MBs in some hepatocytes after 5 months of GF treatment. Colocalization between phospho-JNK and MBs was not observed (Fig. 5H). Phospho-JNK was not totally absent from the liver and a strong phospho-JNK staining was observed in bile ductular cells (Fig. 5A,F).

**Relationship between K8 pS79 and apoptosis.** Previous studies have shown that, K8 pS79 is present in a subpopulation of cells, indicating that all hepatocytes are not affect the same way by the GF intoxication [29, 34]. For instance, as mentioned above, K8 pS79 was frequently detected in clusters of cells surrounding unstained cells which were suggested to be undergoing apoptosis [29, 35]. In the present study, our biochemical analysis for the presence of cleaved caspase 3 indicates that apoptosis occur in the liver following GF intoxication.

To determine if a relationship exists between apoptosis and K8 p79, we proceeded to double immunostaining with anti-K8 pS79 and anti-caspase-3 antibodies. To confirm the result, we stained cells with TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) method in a double staining with anti-K8 pS79.

Our results show that after 2 weeks of treatment, the injured areas surrounded by a K8 pS79 stained hepatocytes, contain cells stained by both caspase-3 and TUNEL (Fig. 7E and 8E). After 5 months of GF treatment, K8 pS79 stained hepatocytes clusters are reduced to only a few cells, but we still observed caspase-3 and TUNEL stained cells in the center of the cluster (Fig. 7H and

8H). Interestingly, no apoptotic cells were stained by K8 pS79 and vice versa. Moreover, these results indicate that p38 stained hepatocytes, present in the center of the K8 pS79 stained cluster, are in apoptosis. Thus MAPK p38 would be involved in apoptosis, but not in K8 S79 phosphorylation during GF treatment.

To determine if positive cells for p38 and apoptosis staining are hepatocytes, we first carried out a double immunostaining with the anti-K8 pS79 and anti-K18 apoptotic fragments (M30) antibodies. The results show that K8 p79 positive cells cluster did not contained K18 fragments. However, K8 p79 negative cells, present in the middle of the clusters, contained the K18 fragment (Fig. 6). K18 fragments staining allows observation of the morphology of the cell containing the K18 apoptotic fragments which indicates that these cells are hepatocytes undergoing apoptosis [44].

## DISCUSSION

The role of intermediate filaments in simple epithelium has been the subject of numerous studies over the last decade. Although most of these reports suggest roles for K8/18 in the response of cells to mechanical stress, toxic stress and apoptosis. The molecular mechanisms which accomplish these functions remains to be elucidated. Our current knowledge about involvement of keratins in the cellular response to stress and apoptosis comes from studies on various cell lines [21, 45-51]. Increase keratin phosphorylation has been shown to occur in cells following exposure to various stresses (toxic stress, oxydative stress, UV, etc) [18]. Keratins phosphorylation at specific sites was proposed as being an important factor in the regulation of the K8/18 functions. K8 pS79 represent the most studied K8/18 phosphorylation site and has been shown to be associated with different cellular events such as mitosis, stress response and apoptosis [52]. These characteristics make K8 pS79 an interesting target in our attempt to understand how keratins protects hepatocytes against stress injuries.

In the present study, we have shown that K8 pS79 stained hepatocytes frequently formed cell clusters containing a zone deprived of staining in its center. This observation is in agreement with the results of Fausther *et al.* 2004 [29]. A similar hepatocytes organization was also observed in

the liver of mouse fed with a lithogenic diet [35]. Tao *et al.* 2003 also observed that K8 pS79 was present in a few hepatocytes surrounding unstained cells (described as injury areas) in high-fat lithogenic diet treated mice liver [35].

We also tried to determine if a relationship exist between K8 pS79, the SAPKs p38 and JNK and apoptosis in GF treated mice liver. Recent studies have shown that K8 S73 (equivalent of mouse K8 S79) is a substrate for the kinases p38 and JNK in HT-29 cells [21, 22]. These results raised the possibility that p38 and JNK could be involved in K8 S79 phosphorylation that occurs in mice hepatocytes during GF intoxication [21, 22]. Both JNK and p38 kinases are know to be involved in cellular responses to physical stresses, inflammatory cytokines, and apoptosis [23, 25-27].

Our results show that phopho-p38 kinase is increase following GF treatment. However, our immunofluorescence staining show that phospho-p38 is not present in cluster of K8 pS79 positive cells. These results suggest that phospho-p38 kinase do not mediate the phosphorylation of K8 S79 in hepatocytes exposed to GF. JNK, an other kinase that was shown *in vitro* to be involved in the phosphorylation of K8 S79, is apparently not involved in the response of hepatocytes to GF intoxication. Our immunoblotting study of immunoprecipitated or total proteins show that JNK is present in mice liver and is not activated by the treatment. These results were confirmed by immunofluorescence staining.

He *et al.* 2002 as mentioned above have shown that JNK and p38 can phosphorylate K8 S73 (S79 in mice) in stress situation [22]. The discrepancy between He *et al.* 2002 results and our results could be explained by the model studied (liver tissues *vs* cultured cells), the difference in the type of stress (GF feeding *vs* UV light exposure) and cell types (hepatocytes *vs* HT-29) use in these studies. We believe that the type of cells and cellular environment can affect kinase activation and cellular response to stress.

It was shown that human K8 S73 (mouse K8 S79 equivalent) is phosphorylated in the liver during mitosis [17, 52]. Former studies showed that p38 activation can play different role in cell



cycle control [38-43]. A recent report showed that activation of p38 is required for normal mitosis in the developing retina and that p38 inhibition leads to mitotic arrest [53]. On the other hand, the work of Ku et al. 2002 have shown that the kinase p38 is able to phosphorylate the human K8 S73, equivalent to the mouse K8 S79 [21, 54]. Our results show that phospho-p38 is present in mitotic cells that contain K8 pS79 suggesting the *in vivo* involvement of this kinase in the process of K8 S79 phosphorylation during mitosis in hepatocytes.

The p38 kinase can be activated during many cellular mechanisms and its activation depends on cell type and cellular condition [23-27]. Apoptosis is one of the cellular mechanisms in which p38 can be involve [36, 37]. Our results showed that p38 kinase was activated in apoptotic hepatocytes in GF treated mice livers. In a previous study, we suggested that these cells, present in the center of the clusters of hepatocytes stained with K8 pS79, could be hepatocytes in apoptosis [29]. Double immunostaining with anti-K8 pS79 and anti-K18 apoptotic fragments (M30) antibodies were done to determine if apoptotic cells, in center of the clusters, are hepatocytes. M30 antibody can detected hepatocytes K18 apoptotic fragments [44]. The morphology and the presence of K18 apoptotic fragments in these cells indicate that indeed these cells are hepatocytes in apoptosis. The apoptotic status of these cells was confirmed by the presence of cleaved caspase 3 and positive TUNEL staining. Interestingly, no apoptotic hepatocytes contained K8 pS79. Also, our results have shown that hepatocytes which contain K8 pS79 are not in the GF-mediated apoptosis.

Our results clearly confirm our previous assumption, that cells present in the center of the K8 pS79 stained hepatocytes clusters could be apoptotic hepatocytes [29]. Moreover, Fausther *et al.* 2004 suggest that these cells could be the starting point of a transduction signaling pathway directed towards neighboring cells. Apoptotic hepatocytes could thereafter lead to specific kinases activation, which could phosphorylate keratins and provide these surrounding cells apoptosis resistance [29]. This hypothesis is supported by the fact that no apoptotic hepatocytes contained K8 pS79. Moreover, this hypothesis is in agreement with the notion that K8/18 intermediate filaments play a key role in the protection of cells against apoptosis [55]. Although the phosphorylation of several sites on keratins could be involved in the protection of hepatocytes

against stress and apoptosis, the phosphorylation of K8 S79 could play a key role in apoptosis resistance [55, 56].

## CONCLUSION

Although studies have shown that kinases p38 and JNK are able to phosphorylate human K8 S73 in stress situation [21, 22], these kinases are not involved in the K8 S79 phosphorylation in GF treated mice livers hepatocytes. However, we showed that p38 is implicated in the apoptosis process in the GF treated mice liver. Moreover, our study showed an involvement of the kinase p38 in the phosphorylation of K8 S79 during mitosis *in vivo*.

The relationship between apoptotic hepatocytes and hepatocytes containing K8 pS79 raise the possibility that apoptotic hepatocytes represent a starting point of a signalization pathway directed towards the surrounding cells and initiate a protection mechanism against apoptosis induced by the GF treatment. Further studies to better understand which signalization pathways are involved in keratin phosphorylation and the response of hepatocytes to stress.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr B. Omary from the Department of Medicine, Palo Alto VA Medical Center and Stanford University, Palo Alto, California, for providing antibodies directed against phosphorylated keratins. We also thank Dr N. Marceau from the “Centre de recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ)”, Québec, for providing Troma 1.

This work was supported by a grant from NSERC.

## FIGURE LEGENDS :

Figure 1.

*Western Blotting analysis of control and GF-intoxicated mice livers.* Protein were prepared as described in "Material and Methods". A: K8, B: K8 pSer79, C: p38, D: phospho-p38, E: JNK, F: phospho-JNK, G: casp-3, H: c-casp-3, I: Positive controls of p38, phospho-p38, JNK and phospho-JNK have been performed using positive cell samples of PhosphoPlus p38 and JNK antibody kits from Cell Signaling Technology inc.

Figure 2.

*Coomassie blue staining and immunoprecipitation analysis.* A : Whole protein were separated by SDS-PAGE gel, B: Immunoprecipitated proteins with anti-K8 were separated by SDS-PAGE gel. Immunoprecipitated proteins gels were transferred on nitrocellulose membrane, and analysed by Western Blotting with C : anti-p38, D : anti-JNK and E : anti-K8 antibody.

Figure 3.

*Immunofluorescence analysis of hepatocytes from control and GF-treated mice. Double-immunostaining with anti-p38 (green) and anti-K8 pSer79 (red).* A, B: control liver. C, D, E: 2 weeks treatment. F, G, H: 5 months treatment. A, C, F: p38. B, D, G: K8 pSer79. E, H: merge

Figure 4.

*Immunofluorescence analysis of hepatocytes from control and GF-treated mice. Double-immunostaining with anti-phospho-p38 (green) and anti-K8 pSer79 (red).* A, B: control liver. C, D, E: 2 weeks treatment. F, G, H: 5 months treatment. A, C, F: phospho-38. B, D, G: K8 pSer79. E, H: merge.

Figure 5.

*Immunofluorescence analysis of hepatocytes from control and GF-treated mice. Double-immunostaining with anti-phospho-JNK (green) and anti-K8 pSer79 (red) or anti-K8 (red). A, B: 2 weeks control liver. F, G, H: control liver. C, D, E: 2 weeks treatment. I, J, K: 5 months treatment. A, C, F, I: phospho-JNK. B, D: K8 pSer79. G, J: K8. E, H, K: merge.*

Figure 6.

*Immunofluorescence analysis of hepatocytes from control and GF-treated mice. Double-immunostaining with anti-K8 pSer79 (red) and anti-cleaved K18 (green). A, B: control liver. C, D, E: 1 month treatment. F, G, H: 5 months treatment. A, C, F: K8 pSer79. B, D, G: cleaved K18. E, H: merge.*

Figure 7.

*Immunofluorescence analysis of hepatocytes from control and GF-treated mice. Double-immunostaining with anti-K8 pSer79 (red) and anti-casp-3 (green). A, B: control liver. C, D, E: 2 weeks treatment. F, G, H: 5 months treatment. A, C, F: K8 pSer79. B, D, G: c-casp-3. E, H: merge.*

Figure 8.

*Immunofluorescence analysis of hepatocytes from control and GF-treated mice. Double-immunostaining with anti-K8 pSer79 (red) and TUNEL (green). A, B: control liver. C, D, E: 2 weeks treatment. F, G, H: 5 months treatment. A, C, F: K8 pSer79. B, D, G: TUNEL. E, H: merge.*

## REFERENCES

1. Fuchs, E. and K. Weber, *Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 345-82.
2. Herrmann, H., M. Hesse, M. Reichenzeller, U. Aebi, and T.M. Magin, *Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation*. Int Rev Cytol, 2003. **223**: p. 83-175.
3. Lazarides, E., *Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space*. Nature, 1980. **283**(5744): p. 249-256.
4. Vassar, R., P.A. Coulombe, L. Degenstein, K. Albers, and E. Fuchs, *Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease*. Cell, 1991. **64**(2): p. 365-80.
5. Coulombe, P.A. and M.B. Omary, *'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(1): p. 110-22.
6. Fuchs, E. and D.W. Cleveland, *A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease*. Science, 1998. **279**(5350): p. 514-9.
7. Porter, R.M. and E.B. Lane, *Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function*. Trends Genet, 2003. **19**(5): p. 278-85.
8. McLean, W.H. and E.B. Lane, *Intermediate filaments in disease*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(1): p. 118-25.
9. Coulombe, P.A., M.E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A.S. Paller, and E. Fuchs, *Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses*. Cell, 1991. **66**(6): p. 1301-11.
10. Loranger, A., S. Duclos, A. Grenier, J. Price, M. Wilson-Heiner, H. Baribault, and N. Marceau, *Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity*. Am J Pathol, 1997. **151**(6): p. 1673-83.
11. Ku, N.O., S. Michie, R.G. Oshima, and M.B. Omary, *Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant*. J Cell Biol, 1995. **131**(5): p. 1303-14.

12. Denk, H., C. Stumptner, and K. Zatloukal, *Mallory bodies revisited*. J Hepatol, 2000. **32**(4): p. 689-702.
13. Jensen, K. and C. Gluud, *The Mallory body: theories on development and pathological significance (Part 2 of a literature survey)*. Hepatology, 1994. **20**(5): p. 1330-42.
14. Hazan, R., H. Denk, W.W. Franke, E. Lackinger, and D.L. Schiller, *Change of cytokeratin organization during development of Mallory bodies as revealed by a monoclonal antibody*. Lab Invest, 1986. **54**(5): p. 543-53.
15. Denk, H., R. Krepler, E. Lackinger, U. Artlieb, and W.W. Franke, *Immunological and biochemical characterization of the keratin-related component of Mallory bodies: a pathological pattern of hepatocytic cytokeratins*. Liver, 1982. **2**(3): p. 165-75.
16. Omary, M.B. and N.O. Ku, *Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions*. Hepatology, 1997. **25**(5): p. 1043-8.
17. Liao, J., N.O. Ku, and M.B. Omary, *Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17565-73.
18. Omary, M.B., N.O. Ku, J. Liao, and D. Price, *Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro*. Subcell Biochem, 1998. **31**: p. 105-40.
19. Toivola, D.M., Q. Zhou, L.S. English, and M.B. Omary, *Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(6): p. 1857-70.
20. Ku, N.O., J. Liao, and M.B. Omary, *Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 33197-203.
21. Ku, N.O., S. Azhar, and M.B. Omary, *Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 10775-82.
22. He, T., A. Stepulak, T.H. Holmstrom, M.B. Omary, and J.E. Eriksson, *The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase*. J Biol Chem, 2002. **277**(13): p. 10767-74.
23. Ip, Y.T. and R.J. Davis, *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 205-19.

24. Kuan, C.Y., D.D. Yang, D.R. Samanta Roy, R.J. Davis, P. Rakic, and R.A. Flavell, *The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development*. Neuron, 1999. 22(4): p. 667-76.
25. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation*. J Biol Chem, 1996. 271(40): p. 24313-6.
26. Davis, R.J., *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases*. Cell, 2000. 103(2): p. 239-52.
27. Davis, R.J., *MAPKs: new JNK expands the group*. Trends Biochem Sci, 1994. 19(11): p. 470-3.
28. Denk, H., F. Gschnait, and K. Wolff, *Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation*. Lab Invest, 1975. 32(6): p. 773-6.
29. Fausther, M., L. Villeneuve, and M. Cadrin, *Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice*. Comp Hepatol, 2004. 3(1): p. 5.
30. Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack, and E.S. Alnemri, *CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. J Biol Chem, 1994. 269(49): p. 30761-4.
31. Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr, and R. Randall, *Protein measurement with the Phenol folin reagent*. J. Biol. Chem., 1951. 193: p. 265-275.
32. Laemmli, U., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(259): p. 680-5.
33. Cadrin, M., H. Hovington, N. Marceau, and N. McFarlane-Anderson, *Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver*. J Hepatol, 2000. 33(2): p. 199-207.
34. Hutter, H., K. Zatloukal, G. Winter, C. Stumptner, and H. Denk, *Disturbance of keratin homeostasis in griseofulvin-intoxicated mouse liver*. Lab Invest, 1993. 69(5): p. 576-82.
35. Tao, G.Z., D.M. Toivola, B. Zhong, S.A. Michie, E.Z. Resurreccion, Y. Tamai, M.M. Taketo, and M.B. Omary, *Keratin-8 null mice have different gallbladder and liver susceptibility to lithogenic diet-induced injury*. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 22): p. 4629-38.

36. Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R.J. Davis, and M.E. Greenberg, *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis*. Science, 1995. **270**(5240): p. 1326-31.
37. Kummer, J.L., P.K. Rao, and K.A. Heidenreich, *Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20490-4.
38. Bulavin, D.V., Y. Higashimoto, I.J. Popoff, W.A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella, and A.J. Fornace, Jr., *Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase*. Nature, 2001. **411**(6833): p. 102-7.
39. Lavoie, J.N., G. L'Allemain, A. Brunet, R. Muller, and J. Pouyssegur, *Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20608-16.
40. Molnar, A., A.M. Theodoras, L.I. Zon, and J.M. Kyriakis, *Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK*. J Biol Chem, 1997. **272**(20): p. 13229-35.
41. Kurata, S., *Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress*. J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23413-6.
42. Diehl, N.L., H. Enslen, K.A. Fortner, C. Merritt, N. Stetson, C. Charland, R.A. Flavell, R.J. Davis, and M. Rinc inverted question markon, *Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway arrests cell cycle progression and differentiation of immature thymocytes in vivo*. J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 321-34.
43. Wang, X., C.H. McGowan, M. Zhao, L. He, J.S. Downey, C. Fearn, Y. Wang, S. Huang, and J. Han, *Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4543-52.
44. Caulin, C., G.S. Salvesen, and R.G. Oshima, *Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis*. J Cell Biol, 1997. **138**(6): p. 1379-94.
45. Ku, N.O. and M.B. Omary, *Expression, glycosylation, and phosphorylation of human keratins 8 and 18 in insect cells*. Exp Cell Res, 1994. **211**(1): p. 24-35.
46. Liao, J., L.A. Lowthert, and M.B. Omary, *Heat stress or rotavirus infection of human epithelial cells generates a distinct hyperphosphorylated form of keratin 8*. Exp Cell Res, 1995. **219**(2): p. 348-57.



47. Schutte, B., M. Henfling, W. Kolgen, M. Bouman, S. Meex, M.P. Leers, M. Nap, V. Bjorklund, P. Bjorklund, B. Bjorklund, E.B. Lane, M.B. Omary, H. Jornvall, and F.C. Ramaekers, *Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis*. Exp Cell Res, 2004. **297**(1): p. 11-26.
48. Inada, H., I. Izawa, M. Nishizawa, E. Fujita, T. Kiyono, T. Takahashi, T. Momoi, and M. Inagaki, *Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD*. J Cell Biol, 2001. **155**(3): p. 415-26.
49. Gilbert, S., A. Loranger, N. Daigle, and N. Marceau, *Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation*. J Cell Biol, 2001. **154**(4): p. 763-73.
50. Caulin, C., C.F. Ware, T.M. Magin, and R.G. Oshima, *Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis*. J Cell Biol, 2000. **149**(1): p. 17-22.
51. Lee, J.C., O. Schickling, A.H. Stegh, R.G. Oshima, D. Dinsdale, G.M. Cohen, and M.E. Peter, *DEDD regulates degradation of intermediate filaments during apoptosis*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1051-66.
52. Ku, N.O., J. Liao, C.F. Chou, and M.B. Omary, *Implications of intermediate filament protein phosphorylation*. Cancer Metastasis Rev, 1996. **15**(4): p. 429-44.
53. Campos, C.B., P.A. Bedard, and R. Linden, *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase during normal mitosis in the developing retina*. Neuroscience, 2002. **112**(3): p. 583-91.
54. Feng, L., X. Zhou, J. Liao, and M.B. Omary, *Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway*. J Cell Sci, 1999. **112** ( Pt 13): p. 2081-90.
55. Omary, M.B., N.O. Ku, and D.M. Toivola, *Keratins: guardians of the liver*. Hepatology, 2002. **35**(2): p. 251-7.
56. Omary, M.B., N.O. Ku, J. Liao, and D. Price, *Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro*, in *Subcell Biochem*. 1998. p. 105-40.

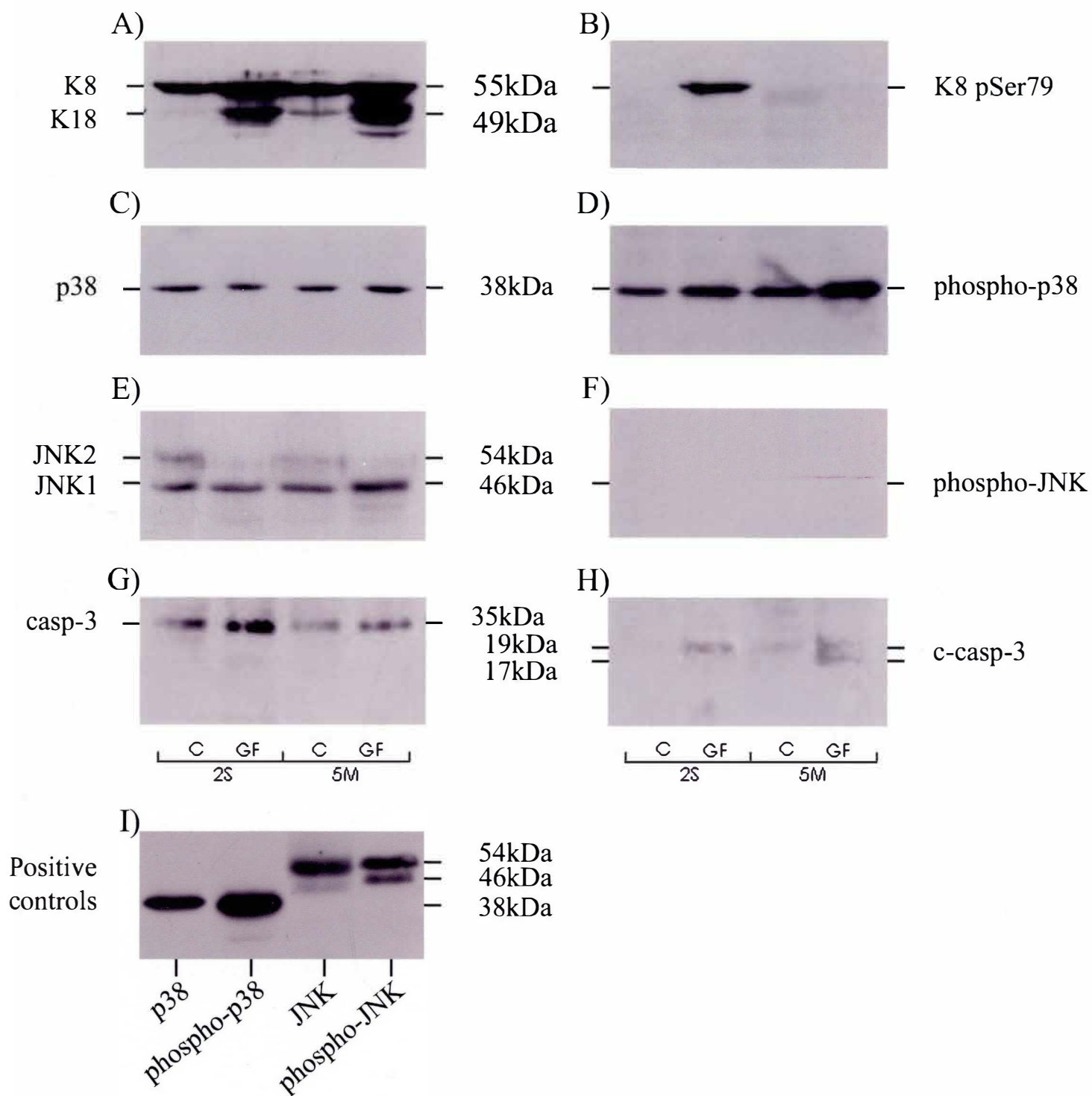
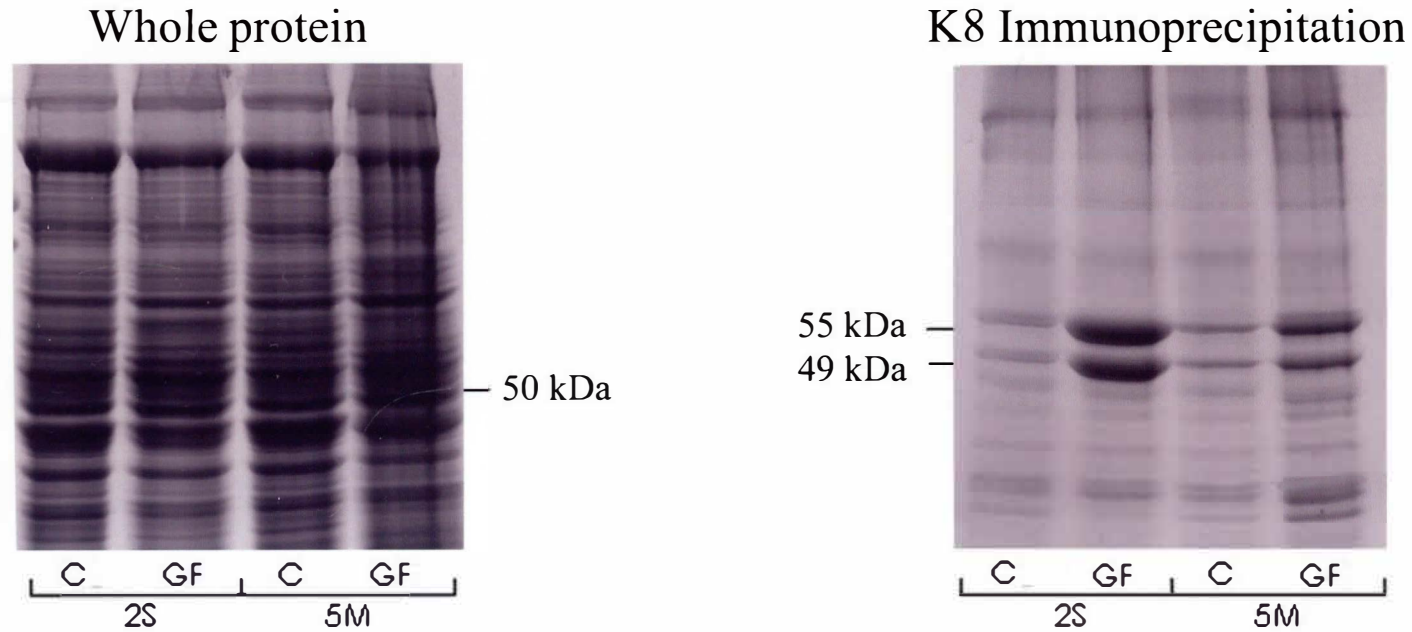
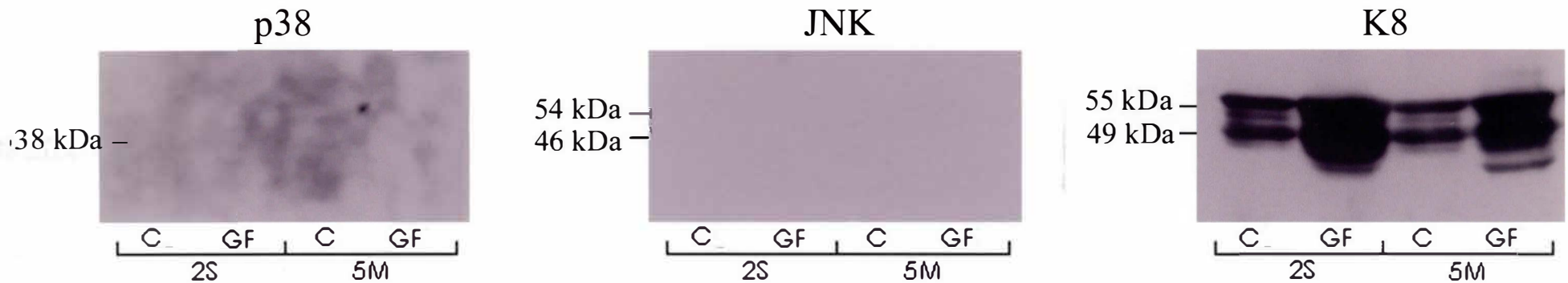


Figure 1; Désaulniers et al.

# Coomassie Blue Staining



## Western blotting and K8 immunoprecipitation



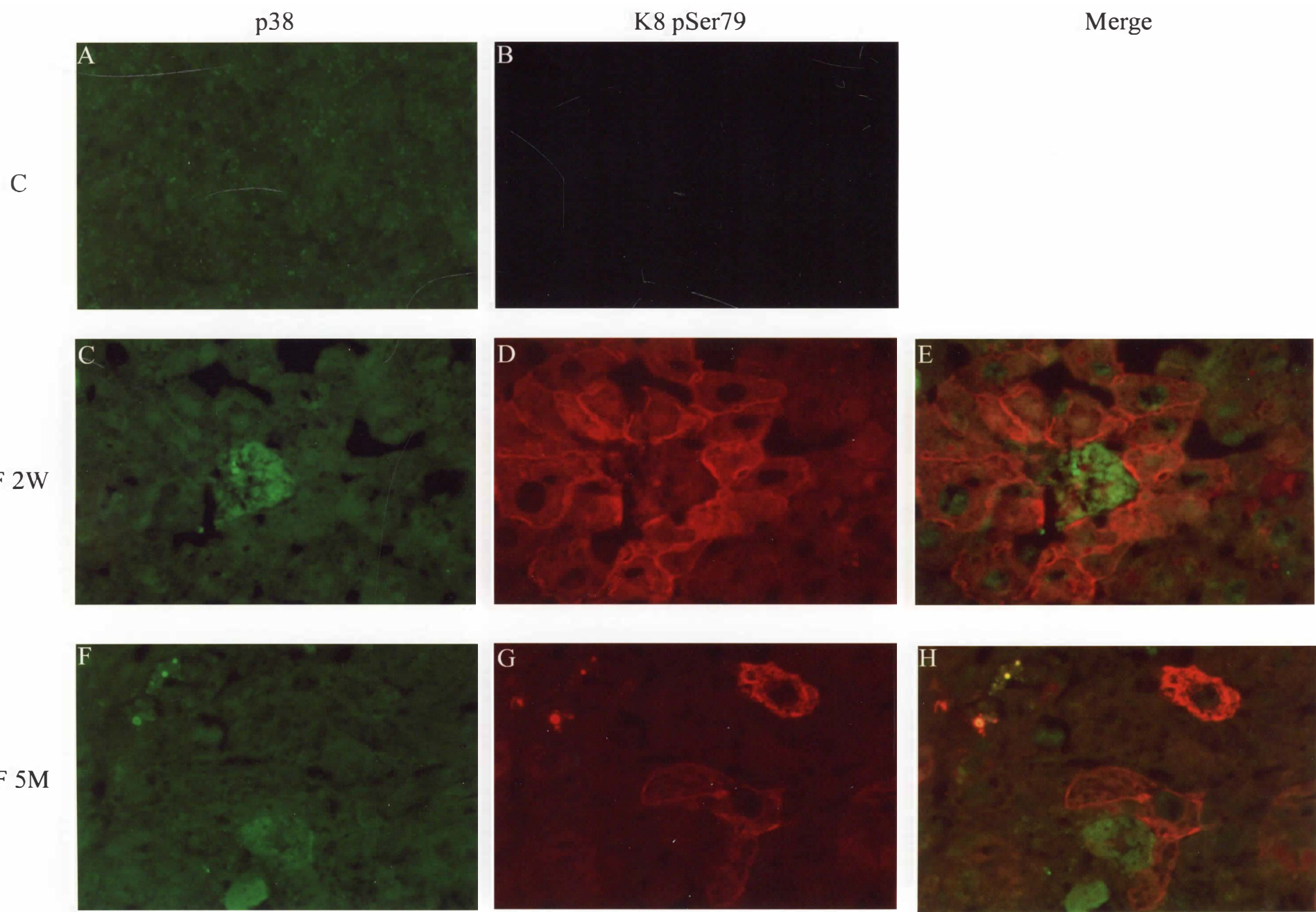


Figure 3; Désaulniers et al.



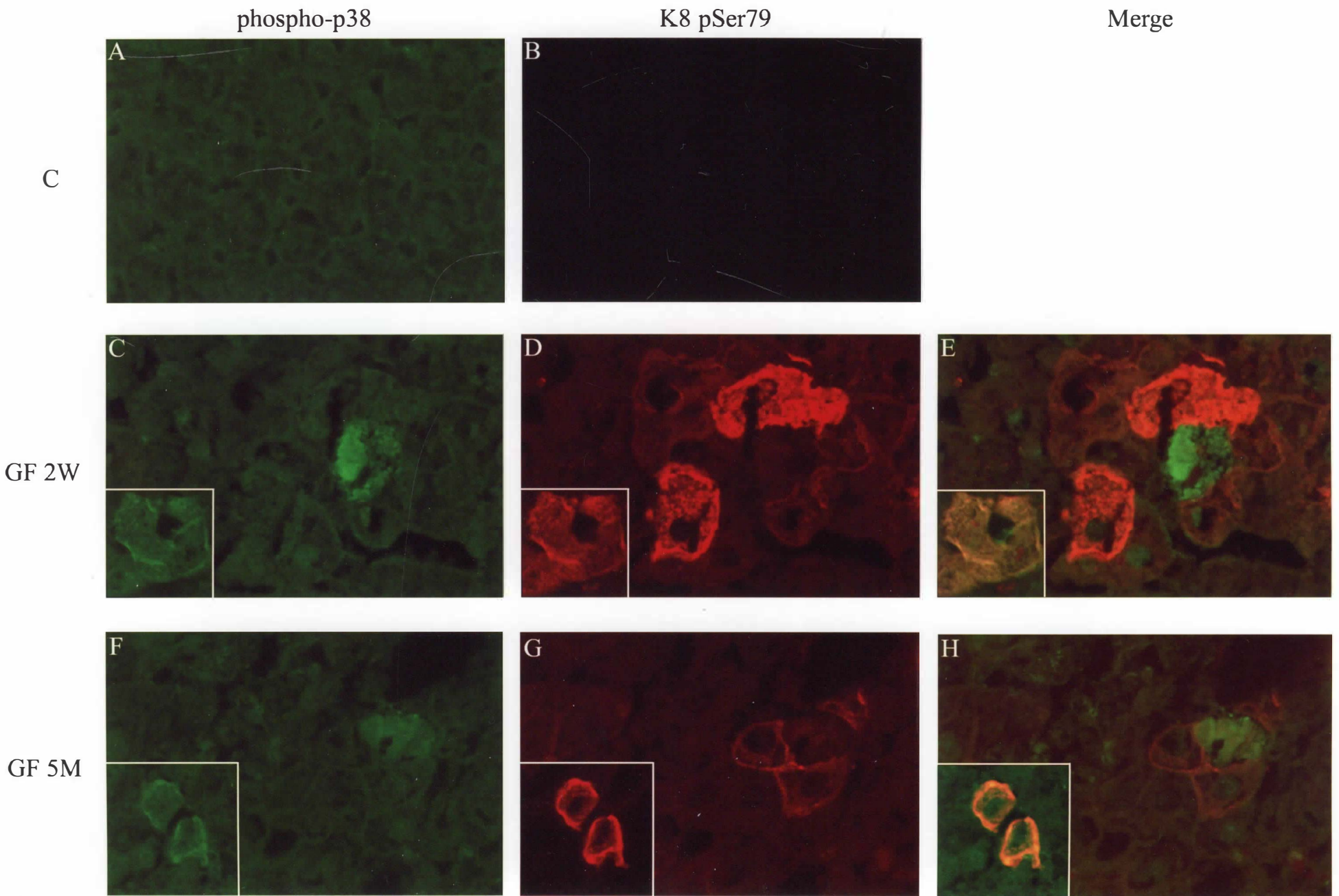


Figure 4; Désaulniers et al.

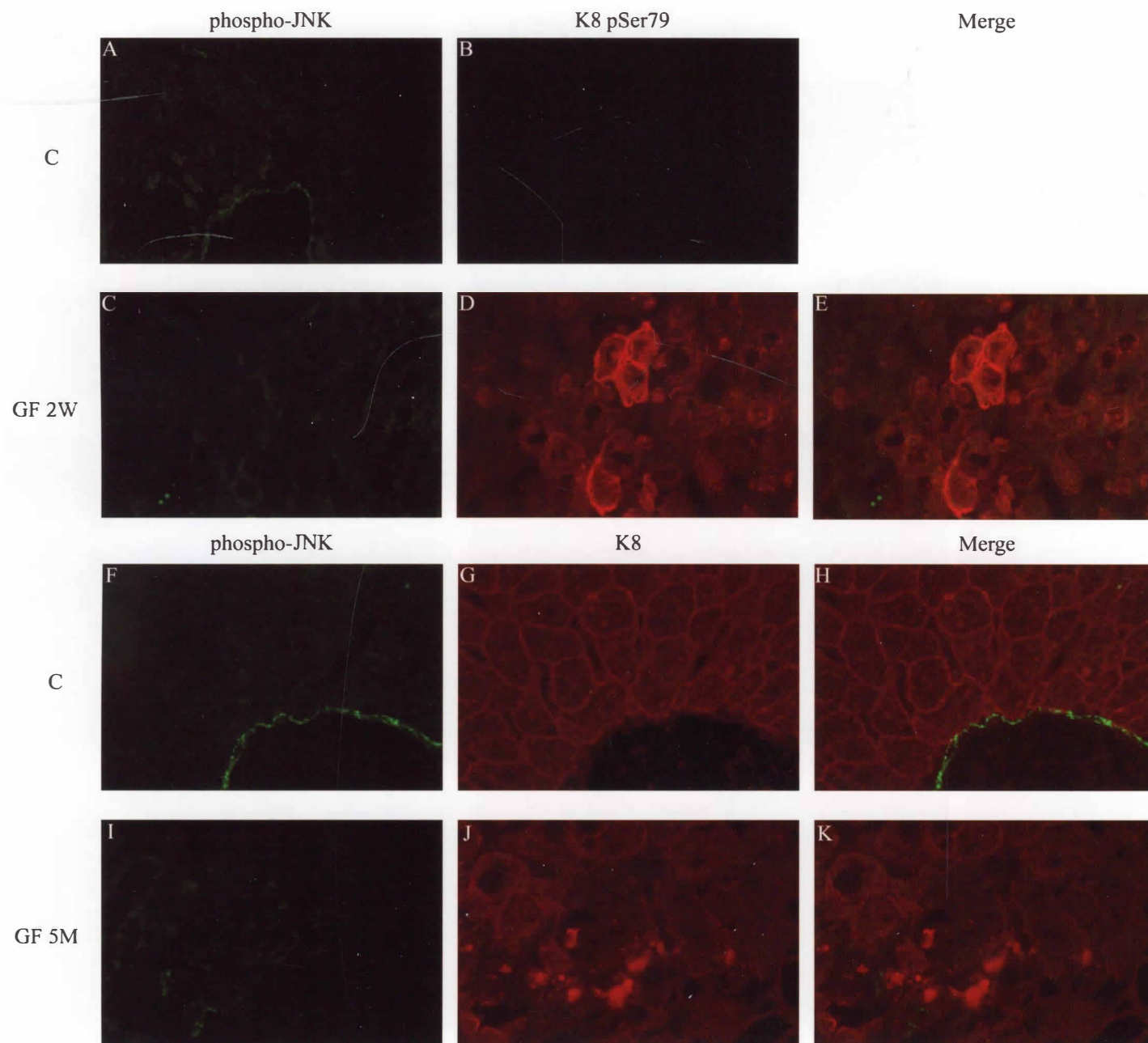


Figure 5; Désaulniers et al.

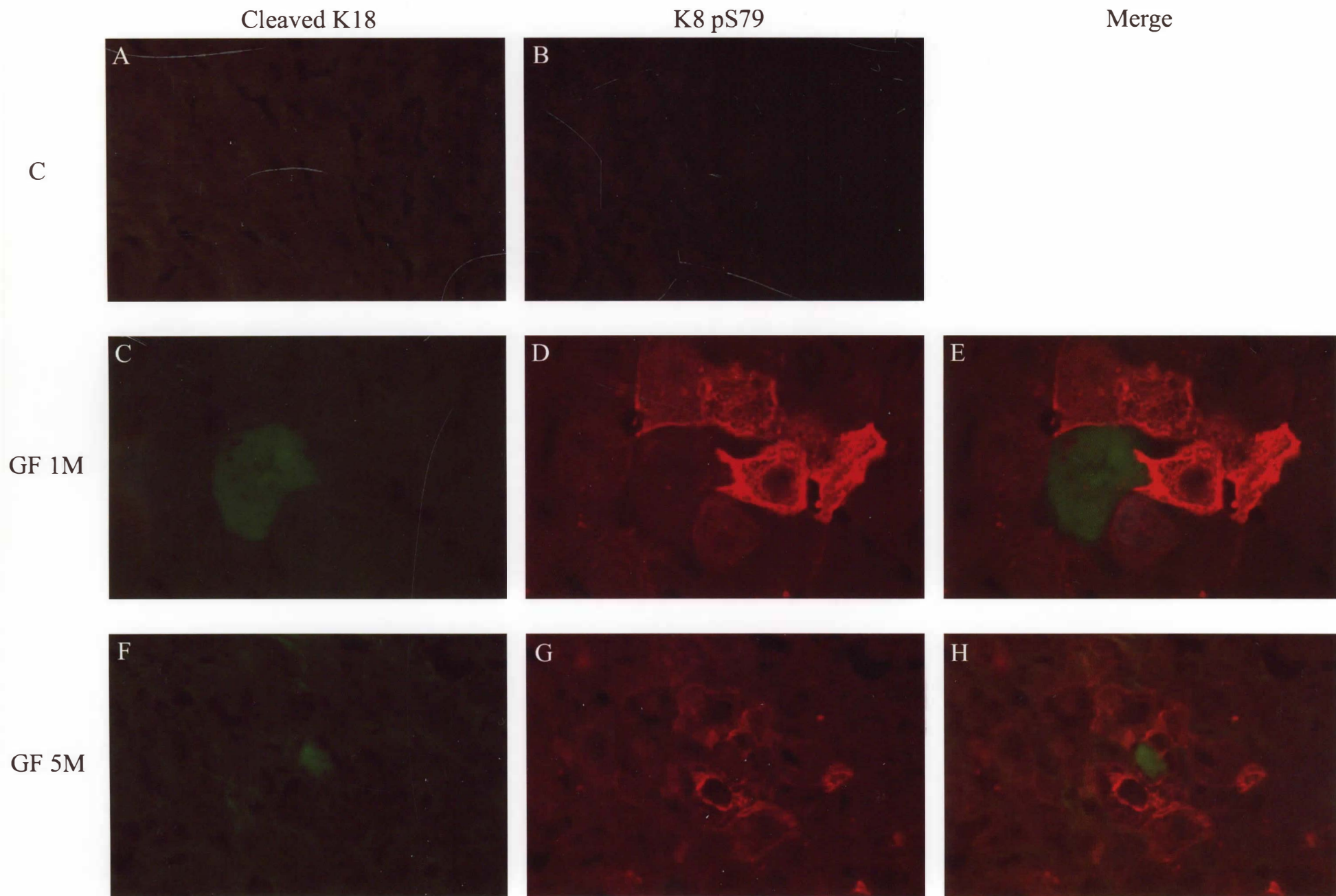


Figure 6 ; Désaulniers et al.



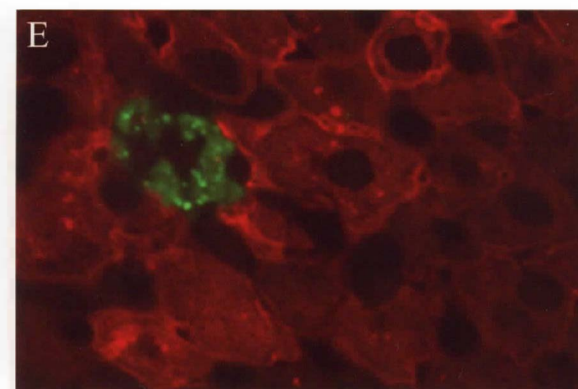
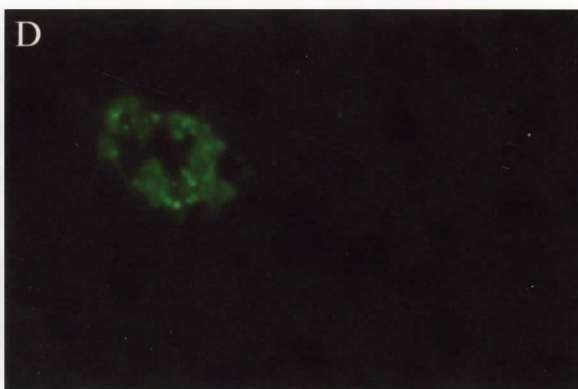
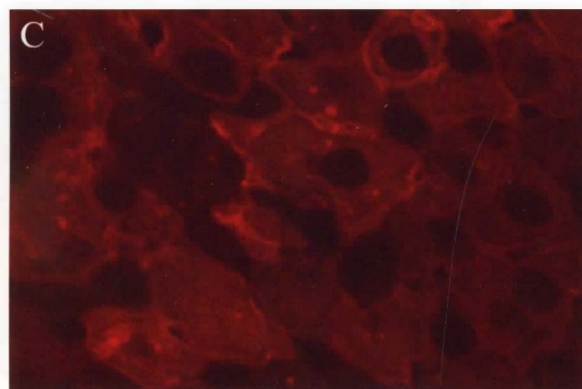
K8 pSer79

c-casp-3

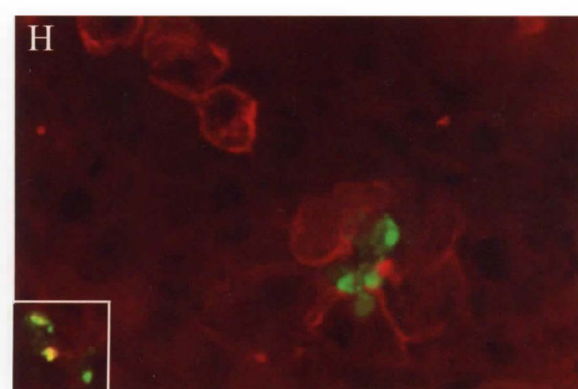
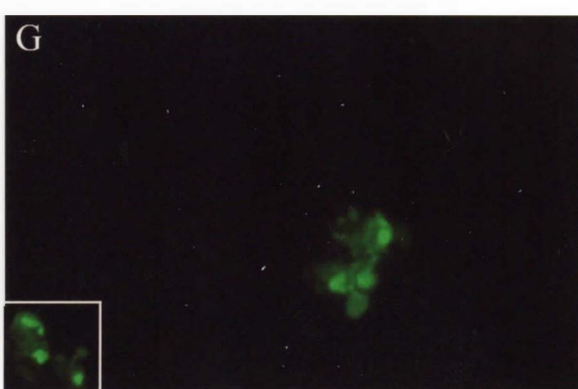
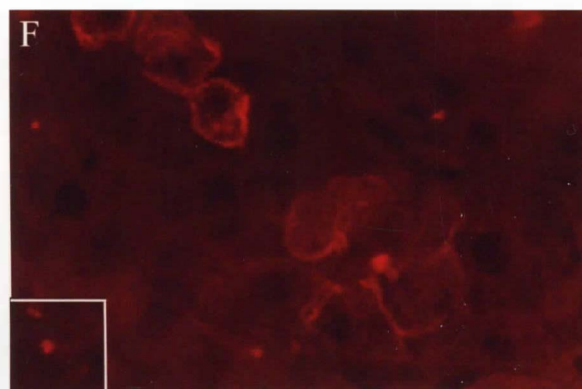
Merge



C



GF 2W



GF 5M

Figure 7; Désaulniers et al.



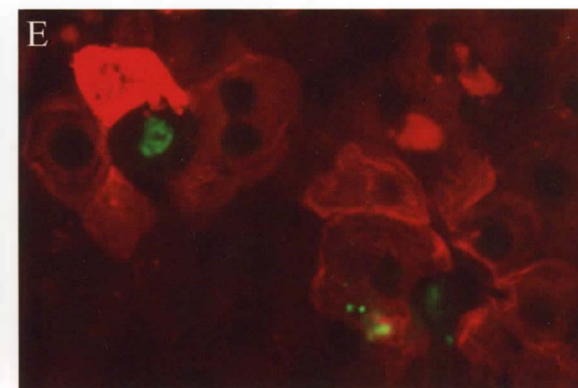
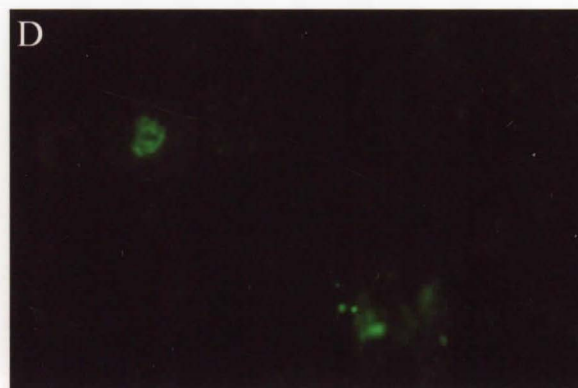
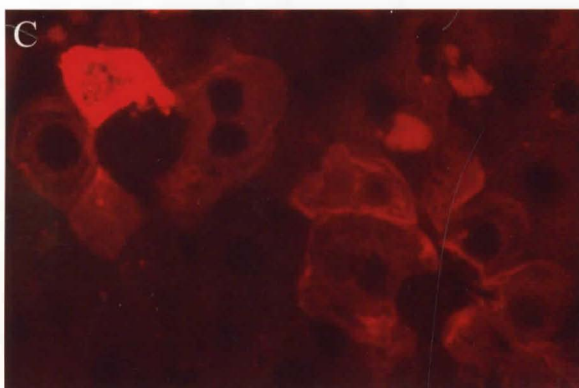
K8 pSer79

TUNEL

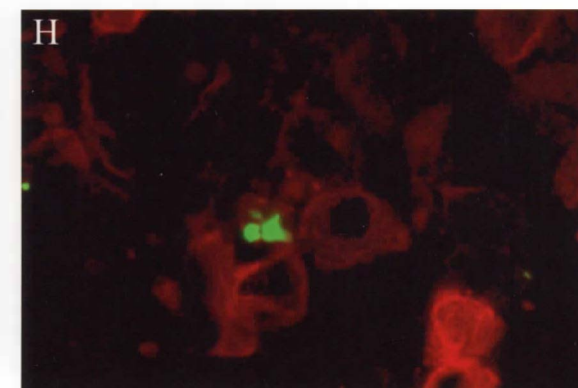
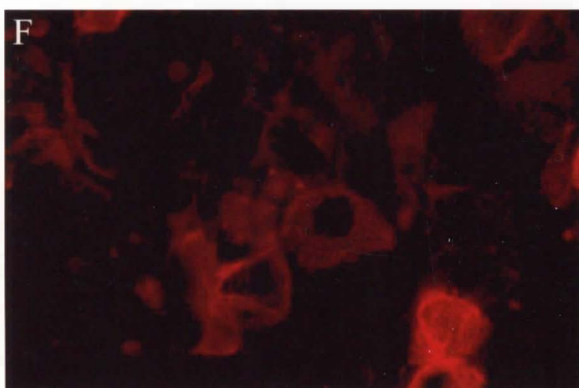
Merge



C



GF 2W



GF 5M

Figure 8; Désaulniers et al.

## CHAPITRE 8

### *Discussion*

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont été réalisées dans le but d'éclaircir le rôle des FIs dans les épithélium simples. Les résultats de ces études suggèrent que les kératines présentes dans tous ces épithélium possèdent un rôle de protection des cellules contre les stress mécaniques, toxiques ou contre l'apoptose. Malgré les efforts réalisés par les chercheurs, les mécanismes moléculaires qui régissent les fonctions des K8/18 demeurent inconnus. Les découvertes récentes suggèrent que la phosphorylation des kératines sur des sites spécifiques représenterait un processus important de régulation des fonctions des K8/18. La K8 S73 est un des sites de phosphorylation les plus étudié des K8/18. Dans les cultures cellulaires, la K8 S73 est phosphorylée en situation de stress induit par un agent toxique, lors de la mitose et de l'apoptose (Ku, Liao *et al.* 1996). L'étude de la régulation de la phosphorylation de la K8 S73 pourrait donc se révéler être très utile pour mieux comprendre le rôle des kératines dans les cellules soumises à un stress toxique dans les tissus humains. Des études récentes ont montré que la K8 S73 peut être phosphorylée par les kinases p38 et JNK dans les cellules humaine HT-29 (He, Stepulak *et al.* 2002; Ku, Azhar *et al.* 2002). Ces SAPKs sont généralement activées lors de la croissance et de la prolifération cellulaire, en cas de stress et au cours de l'apoptose (Davis 1994; Kyriakis et Avruch 1996; Ip et Davis 1998; Kuan, Yang *et al.* 1999; Davis 2000).

### 8.1 ANALYSES DE TYPE WESTERN :

Le but de nos travaux était de déterminer la relation entre les kinases p38 et JNK, l'apoptose des hépatocytes et la phosphorylation de la K8 S79 (équivalent à la K8 S73 humaine) dans le foie de souris traitées à la GF. Les analyses de type Western ont révélé que la K8 pS79 est présente dans les foies de souris traitées à la GF. Le niveau de

phosphorylation de ce site atteint son maximum après deux semaines de traitement à la GF. Après cinq mois de traitement, la quantité de K8 pS79 chute dramatiquement.

Nous avons également observé que les foies de souris contenaient un niveau basal de p38 et de JNK qui ne semblait pas varier en fonction du traitement à la GF. Comme ces deux kinases doivent être phosphorylées pour être activées, nous avons vérifié la quantité de phospho-p38 et de phospho-JNK dans les foies de souris contrôles et traitées à la GF. Les analyses de type Western n'ont pas permis la détection de la protéine phospho-JNK. Il est possible que la quantité de phospho-JNK contenue dans les hépatocytes soit trop petite pour être détecté par notre méthode d'analyse Western. Néanmoins, l'absence de détection de phospho-JNK suggère que cette kinase ne serait pas impliquée dans la phosphorylation de la K8 S79 des hépatocytes de souris traitées à la GF. Dans le cas de la kinase p38 active, nous avons observé que le niveau de phospho-p38 augmentait avec la durée du traitement. Les résultats des analyses de type Western suggèrent donc que la forme active de p38 pourrait être responsable de la phosphorylation de la K8 S79 dans les hépatocytes de souris traité à la GF. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des analyses par microscopie à fluorescence. Les résultats de ces études seront analysés plus loin.

Les travaux de Fausther *et al.* 2004 suggèrent que certaines cellules, plus sensibles au stress toxique, peuvent subir l'apoptose dans les foies de souris traitées à la GF (Fausther, Villeneuve *et al.* 2004). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des analyses de type Western dans le but de détecter la présence de caspase 3 clivée dans les foies de souris traitées à la GF. La caspase 3 clivée est responsable du clivage de la K18 et est impliquée dans le déclenchement de l'apoptose (Caulin, Salvesen *et al.* 1997; Lodish, Berk *et al.* 2000). Nos résultats montrent que la caspase 3 clivée est présente en très petite quantité dans le foie des souris traitées à la GF. Comme les hépatocytes qui subissent l'apoptose représentent un faible pourcentage de l'ensemble des cellules hépatique, il est normal que la quantité de caspase 3 clivée observée dans un homogénat de foie soit très faible. Dans les foies contrôles, la caspase 3 clivée est quasi

indétectable. Ces résultats confirment donc l'hypothèse que le traitement à la GF induit l'apoptose de certaines cellules du foie.

## 8.2 ANALYSES PAR IMMUNOFLUORESCENCE :

Les analyses de type Western ne permettent pas d'observer l'expression des protéines dans chacune des cellules du foie. Des analyses de doubles marquages par immunofluorescence nous ont permis d'observer au niveau cellulaire la présence de chaque protéines décrites précédemment. Les résultats des ces doubles marquages nous ont permis de démontrer que les hépatocytes contenant la K8 pS79 forment fréquemment des amas cellulaires après 2 semaines de traitement. Ces amas deviennent plus rare et contiennent moins de cellules après 5 mois de traitement.

Nous avons également observé que plusieurs de ces amas cellulaires possèdent une zone centrale dépourvue de marquage contre la K8 pS79. Ces observations sont en accord avec les travaux de Fausther *et al.* 2004, qui ont été les premiers à rapporter, dans les foies de souris traitées à la GF, l'existence d'amas d'hépatocytes contenant la K8 pS79 avec, au centre, une zone contenant des cellules dépourvue de marquage contre la K8 pS79 (Fausther, Villeneuve *et al.* 2004). Une autre étude a rapporté la présence d'amas d'hépatocytes contenant la K8 pS79 dans le foie des souris traitées avec une diète lithogénique. Ces amas contenaient également une zone centrale dépourvue de marquage que les chercheurs ont qualifié de "zone endommagée" (Tao, Toivola *et al.* 2003).

Nos résultats d'immunofluorescence ont démontré que les hépatocytes des amas cellulaires contenant la K8 pS79 ne sont pas significativement marqués par les anticorps dirigés contre les kinases p38 et JNK. De plus, le très faible marquage des kinases p38 et JNK présent dans les amas ne colocalise pas avec les FIs. Ces résultats suggèrent donc qu'il n'y aurait pas de relation directe entre la phosphorylation de la K8 pS79 et ces kinases. Les résultats d'immunoprécipitation appuient cette constatation. En effet, nous

avons immunoprécipité les K8/18 dans le but de déterminer si les kinases p38 et JNK sont co-immunoprécipitées avec les FIs, mais la détection des kinases par les analyses Western s'est révélée négative. Nous avons également observé que les hépatocytes isolés (cellule marquée contre la K8 pS79 sans faire partie d'un amas cellulaire) ainsi que les amas composés uniquement de cellules contenant la K8 pS79 sans zone centrale endommagée, ne sont pas significativement marqué par les anticorps contre p38 et JNK. Cependant, la présence massive de la p38, activée et non activée, a été détectée dans les zones dépourvues de K8 pS79 au centre des amas cellulaires. L'ensemble de ces résultats suggère que les SAPKs p38 et JNK ne sont pas responsables de la phosphorylation de la K8 S79 dans le foie, suite au traitement à la GF *in vivo*.

Le traitement des souris à la GF représente un stress toxique qui mène à la phosphorylation de la K8 S79 dans plusieurs hépatocytes souvent organisés en amas cellulaires. Comme les kinases p38 et JNK ne sont pas exprimées de façon significative dans ces hépatocytes, la phosphorylation de la K8 S79 en situation de stress doit donc être assurée par une autre kinase. Nos résultats semblent contredire les travaux de He *et al.* 2002 et de Ku *et al.* 2002 qui ont respectivement montré que JNK et p38 sont responsable de la phosphorylation de K8 S73 en situation de stress chez les cellules humaines HT-29 (He, Stepulak *et al.* 2002; Ku, Azhar *et al.* 2002). Cependant, les conditions expérimentales entre ces études et nos travaux sont très différentes. Nous avons réalisé nos expériences sur des hépatocytes de souris. Les travaux de He *et al.* 2002 et de Ku *et al.* 2002 ont été réalisés à l'aide cellules cancéreuses humaines de colons (adénocarcinome HT-29). Nos recherches ont été faites directement sur des coupes congelées (cyrocoupes) de tissus et non sur une lignée cellulaire. De plus, l'utilisation chronique de GF comme agent de stress peut probablement induire des mécanismes moléculaires différents de ceux induits par une exposition aux rayons UV (He, Stepulak *et al.* 2002; Ku, Azhar *et al.* 2002). L'ensemble de ces trois études démontre que p38 et JNK peuvent phosphoryler la K8 dans des conditions précises comprenant le modèle d'étude utilisé, le type de cellule, la condition cellulaire (mitose, apoptose), l'environnement cellulaire et le type de stress.

Nous avons observé la présence de p38 dans les doublets d'hépatocytes. Ces doublets représentent des hépatocytes en mitose et contiennent également la K8 pS79. Des recherches ont démontré que la K8 S73 est phosphorylée pendant la mitose au niveau du foie (Ku, Liao *et al.* 1996; Liao, Ku *et al.* 1997). D'un autre côté, plusieurs études ont démontré que p38 peut être impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire (Lavoie, L'Allemain *et al.* 1996; Molnar, Theodoras *et al.* 1997; Diehl, Enslen *et al.* 2000; Kurata 2000; Wang, McGowan *et al.* 2000; Bulavin, Higashimoto *et al.* 2001). De plus, une étude récente a montré que l'activation de p38 est nécessaire à la mitose lors du développement de la rétine et que l'ajout de l'inhibiteur de cette kinase, le SB203580, provoque l'arrêt de la mitose (Campos, Bedard *et al.* 2002). Nos résultats démontrent pour la première fois que p38 est impliqué dans le processus de mitose des hépatocytes *in vivo*. Cette conclusion est en accord avec les travaux de Ku *et al.* 2002, qui montre que la K8 S73 humaine peut être un substrat de la kinase p38 (Ku, Azhar *et al.* 2002).

Les travaux de Fausther *et al.* 2004 ont mené à l'hypothèse que la zone endommagée, au centre des amas d'hépatocytes, contenant la K8 pS79, serait composée d'hépatocytes en apoptoses (Fausther, Villeneuve *et al.* 2004). La présence de p38 dans cette zone dépourvue de K8 pS79 appuie cette hypothèse puisque p38 peut être activé en situation d'apoptose (Xia, Dickens *et al.* 1995; Kummer, Rao *et al.* 1997). Nous avons donc vérifié si la zone endommagée contenait des hépatocytes et si ces cellules étaient en apoptose. Des marquages à l'aide d'un anticorps dirigé contre les fragments de la K18 ont montré par leur morphologie que les cellules composant la zone endommagée étaient effectivement des hépatocytes. Les fragments de K18 présents dans ces cellules sont le résultat de l'action de la caspase 3 clivée qui clive la K18 au début du processus d'apoptose dans les hépatocytes (Caulin, Salvesen *et al.* 1997; Leers, Kolgen *et al.* 1999). La présence de fragments de K18 à l'intérieur des zones endommagées suggère donc que des hépatocytes en apoptose et dépourvus de K8 pS79 sont entourés par une ceinture d'hépatocytes contenant la K8 pS79. Ainsi, nous avons confirmé que la zone endommagée était constituée de cellules en apoptose par des marquages avec l'anticorps anti-caspase 3 clivée et de la méthode TUNEL. Nos résultats confirment donc l'hypothèse émise par Fausther *et al.* 2004 en montrant que la zone endommagée, au

centre des amas de cellules contenant la K8 pS79, est constituée d'hépatocytes en apoptose. Suite à nos observations, nous croyons que ces hépatocytes en apoptose présentent des caractéristiques de l'anoïkis, un processus d'apoptose induit par la perte des ancrages avec les cellules environnantes (Frisch et Screaton 2001; Grossmann 2002).

Les travaux de Fausther *et al.* 2004 proposent que les hépatocytes en apoptose, constituant la zone endommagée au centre des amas de cellules contenant la K8 pS79, seraient le point de départ d'un signal de transduction dirigé vers les cellules environnantes. Ce signal induirait l'activation de kinases spécifiques responsables de la phosphorylation des kératines ce qui mènerait à la résistance contre l'apoptose chez ces hépatocytes environnants (Fausther, Villeneuve *et al.* 2004). Cette hypothèse est en accord avec la notion que les FIs de kératines pourraient jouer un rôle clé dans la protection des cellules contre l'apoptose (Omary, Ku *et al.* 1998; Omary, Ku *et al.* 2002). Bien que plusieurs sites de phosphorylation des kératines puissent être impliqués dans le rôle de protection des hépatocytes contre le stress et l'apoptose, il semble que la K8 pS79 pourrait jouer un rôle clé dans la protection cellulaire contre l'apoptose (Fausther, Villeneuve *et al.* 2004).

Il est intéressant de constater que nos résultats appuient toutes ces hypothèses. Nous avons remarqué que, dans tout les doubles marquages effectués contre la K8 pS79 et l'apoptose (anti-K18 fragmentée, anti-caspase 3 clivée et TUNEL), les hépatocytes qui contenaient un haut niveau de K8 pS79 n'étaient jamais en apoptose. Cette observation inclut tant les cellules composant les amas décrits précédemment que les hépatocytes isolés, contenant la K8 pS79. La situation inverse a également été vérifiée et nous avons observé que les cellules reconnues par les marqueurs d'apoptoses ne sont jamais significativement marquées par la K8 pS79. La phosphorylation de la K8 S79 semble donc être une étape cruciale à l'intérieur d'une série d'événement permettant aux kératines d'effectuer leur rôle de protection des hépatocytes contre le stress et l'apoptose *in vivo*.

### 8.3 PERSPECTIVES D'AVENIR :

Malgré les nombreuses études réalisées sur les FIs, les mécanismes moléculaires par lesquels les kératines protègent les cellules contre l'apoptose demeurent incompris. Pour éclaircir ces mécanismes à l'intérieur des foies de souris traitées à la GF, nous devrons étudier les différents acteurs de l'apoptose et découvrir s'ils interagissent de près ou de loin avec les kératines hépatiques.

Un des acteurs important de l'apoptose est la voie de signalisation phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt. Akt est une kinase connue pour sa capacité d'induire la survie cellulaire en phosphorylant BAD, un antagoniste de mort cellulaire de BCL-2 (Datta, Dudek *et al.* 1997). Une fois phosphorylée, la protéine BAD est séquestrée par la 14-3-3, une protéine qui peut également séquestrer la K18 au niveau de la S33 phosphorylée (Ku, Liao *et al.* 1998; Coulombe et Omary 2002; Ku, Michie *et al.* 2002). La séquestration de BAD par la 14-3-3 empêche le largage du cytochrome C hors de la mitochondrie et l'induction de l'apoptose par la cascade des caspases (Datta, Dudek *et al.* 1997). Des études récentes ont montré que l'activité de Akt et de PKC $\zeta$  peut être inhibée suite à la séquestration de cette kinase par la kératine 10 (Paramio, Segrelles *et al.* 2001; Santos, Paramio *et al.* 2002). L'étude de la voie de signalisation phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt dans notre modèle animal pourrait être très intéressante pour éclaircir le rôle de protection des hépatocytes par les K8/18.

Pour bien définir la voie de signalisation empruntée par les hépatocytes de souris traitées à la GF pour induire l'apoptose, il serait intéressant d'étudier le niveau d'expression et la localisation des agents pro- et anti-apoptotiques associés à la voie de survie cellulaire PI3K/Akt comme PTEN, BAD, 14-3-3, BCL-2, BCL-XL, I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B et la caspase 9. L'étude de l'activité de ces protéines et de leur interaction avec les filaments de K8/18 dans notre modèle animal nous permettra de mieux comprendre le rôle des kératines lorsque les hépatocytes sont soumis à un stress toxique.



Les résultats obtenus dans la présente étude nous ont mené à suggérer que les hépatocytes en apoptose, contenus dans la zone endommagée au centre des amas de cellules contenant la K8 pS79, seraient le point de départ d'un signal de transduction dirigé vers les hépatocytes entourant la zone endommagée. Ce signal aurait comme rôle d'induire un mécanisme de défense contre la mort cellulaire programmée. Nos résultats démontrent que ce mécanisme de défense est caractérisé par la phosphorylation de la K8 S79. Nos perspectives d'avenir sont d'identifier les acteurs impliqués dans ce signal de transduction et leur relation avec les K8/18 dans le foie des souris traitées à la GF.

L'étude des récepteurs de mort cellulaire nous aidera à mieux comprendre comment ce signal de transduction est transmis d'une cellule en apoptose aux hépatocytes environnant. Nous croyons aussi que l'étude des récepteurs de mort cellulaire et de leur cible nous permettront de découvrir les mécanismes qui mènent à la phosphorylation de la K8 S79. Des observations récentes suggèrent que K8/18 est impliquées dans la protection des cellules contre l'apoptose induite par la famille des récepteurs du TNF (Caulin, Ware *et al.* 2000). Des chercheurs ont observé que le récepteur TNFr2 et les K8/18 colocalisent en périphérie des cellules. Ils ont aussi démontré que les K8/18 peuvent lier le domaine cytoplasmique du TNFr2, du LTβR et du TRADD. Par contre, d'autres récepteurs de mort cellulaire comme Fas et TNFr1 ne semble pas être associés aux K8/18 (Ksontini, Colagiovanni *et al.* 1998; Tagawa, Kakuta *et al.* 1998; Zhang, Cook *et al.* 2000; Inada, Izawa *et al.* 2001). Il semble donc que les K8/18 possèderaient un effet anti-apoptotique en régulant le transport vers la surface de la cellule de certaines molécules de la famille des récepteurs de mort cellulaire. Ainsi l'étude de protéines comme TNFr2 et TRADD, des éléments qui peuvent se lier aux K8/18, pourrait révéler des informations cruciales pour déterminer les liens entre le signal de survie cellulaire et les K8/18 chez les souris traitées à la GF.

#### 8.4 CONCLUSION :

Bien que la présente étude n'ait pas permis d'identifier la ou les kinases responsables de la phosphorylation de la K8 pS79 en situation de stress induit par la GF,

nos travaux démontrent pour la première fois que p38 est impliqué dans le processus de mitose des hépatocytes *in vivo*. Nous avons également démontré que le traitement à la GF mène au développement de zones endommagées contenant des hépatocytes en apoptose. Ces zones endommagées sont situées au centre d'amas d'hépatocytes contenant la K8 pS79. Nous avons également démontré que les cellules de la zone centrale endommagée ne contiennent pas de K8 pS79 et que les hépatocytes entourant cette zone ne sont pas en apoptose. L'ensemble de nos résultats nous amène à proposer que les hépatocytes en apoptose, situés dans la zone endommagée, seraient le point de départ d'un signal de transduction dirigé vers les cellules environnantes. Ce signal induirait la phosphorylation des kératines ce qui mènerait à la résistance contre l'apoptose chez ces hépatocytes environnants.

Nos travaux sur de la protection cellulaire contre un stress hépatotoxique, ainsi que les découvertes à venir dans ce domaine mèneront éventuellement à la mise au point d'une stratégie thérapeutique pour diminuer ou même enrayer la dégénérescence cellulaire causée par l'alcool et d'autres substances hépatotoxiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abreu-Martin, M. T., A. A. Palladino, M. Faris, N. M. Carramanzana, A. E. Nel et S. R. Targan (1999). "Fas activates the JNK pathway in human colonic epithelial cells: lack of a direct role in apoptosis." Am J Physiol **276**(3 Pt 1): G599-605.
- Alberts, B. e. a. (2002). Molecular Biology of the cell. 4e ed, **Garland Science, N.Y., U.S.A.**: pp924.
- Anderson, J. M., L. M. Heindl, P. A. Bauman, C. W. Ludi, W. S. Dalton et A. E. Cress (1996). "Cytokeratin expression results in a drug-resistant phenotype to six different chemotherapeutic agents." Clin Cancer Res **2**(1): 97-105.
- Arin, M. J. et D. R. Roop (2001). "Disease model: heritable skin blistering." Trends Mol Med **7**(9): 422-4.
- Bader, B. L., T. M. Magin, M. Freudenmann, S. Stumpp et W. W. Franke (1991). "Intermediate filaments formed de novo from tail-less cytokeratins in the cytoplasm and in the nucleus." J Cell Biol **115**(5): 1293-307.
- Bardag-Gorce, F., F. W. van Leeuwen, V. Nguyen, B. A. French, J. Li, N. Riley, L. W. McPhaul, Y. H. Lue et S. W. French (2002). "The role of the ubiquitin-proteasome pathway in the formation of mallory bodies." Exp Mol Pathol **73**(2): 75-83.
- Bardag-Gorce, F., J. Vu, L. Nan, N. Riley, J. Li et S. W. French (2004). "Proteasome inhibition induces cytokeratin accumulation in vivo." Exp Mol Pathol **76**(2): 83-9.
- Baribault, H., J. Penner, R. V. Iozzo et M. Wilson-Heiner (1994). "Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice." Genes Dev **8**(24): 2964-73.
- Baribault, H., J. Price, K. Miyai et R. G. Oshima (1993). "Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8." Genes Dev **7**(7A): 1191-202.
- Bauman, P. A., W. S. Dalton, J. M. Anderson et A. E. Cress (1994). "Expression of cytokeratin confers multiple drug resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(12): 5311-4.

- Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter et M. C. Gustin (1993). "An osmosensing signal transduction pathway in yeast." Science **259**(5102): 1760-3.
- Bulavin, D. V., Y. Higashimoto, I. J. Popoff, W. A. Gaarde, V. Basrur, O. Potapova, E. Appella et A. J. Fornace, Jr. (2001). "Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase." Nature **411**(6833): 102-7.
- Cadrin, M., D. L. Brown et K. R. Reulh (1993). Effects of Environmental Toxicants on the Cytoskeleton. Handbook of Hazardous Materials. A. Press: 233-239.
- Cadrin, M., H. Hovington, N. Marceau et N. McFarlane-Anderson (2000). "Early perturbations in keratin and actin gene expression and fibrillar organisation in griseofulvin-fed mouse liver." J Hepatol **33**(2): 199-207.
- Cadrin, M. et M. G. Martinoli (1995). "Alterations of intermediate filaments in various histopathological conditions." Biochem Cell Biol **73**(9-10): 627-34.
- Campos, C. B., P. A. Bedard et R. Linden (2002). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase during normal mitosis in the developing retina." Neuroscience **112**(3): 583-91.
- Cano, E., Y. N. Doza, R. Ben-Levy, P. Cohen et L. C. Mahadevan (1996). "Identification of anisomycin-activated kinases p45 and p55 in murine cells as MAPKAP kinase-2." Oncogene **12**(4): 805-12.
- Cardone, M. H., G. S. Salvesen, C. Widmann, G. Johnson et S. M. Frisch (1997). "The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases." Cell **90**(2): 315-23.
- Caulin, C., G. S. Salvesen et R. G. Oshima (1997). "Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis." J Cell Biol **138**(6): 1379-94.
- Caulin, C., C. F. Ware, T. M. Magin et R. G. Oshima (2000). "Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis." J Cell Biol **149**(1): 17-22.
- Chou, C. F., A. J. Smith et M. B. Omary (1992). "Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18." J Biol Chem **267**(6): 3901-6.

- Chou, Y. H., P. Opal, R. A. Quinlan et R. D. Goldman (1996). "The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells." J Cell Sci **109** ( Pt 4): 817-26.
- Conway, J. F. et D. A. Parry (1990). "Structural features in the heptad substructure and longer range repeats of two-stranded alpha-fibrous proteins." Int J Biol Macromol **12**(5): 328-34.
- Coulombe, P. A. (2002). "A new fold on an old story: attachment of intermediate filaments to desmosomes." Nat Struct Biol **9**(8): 560-2.
- Coulombe, P. A., Y. M. Chan, K. Albers et E. Fuchs (1990). "Deletions in epidermal keratins leading to alterations in filament organization in vivo and in intermediate filament assembly in vitro." J Cell Biol **111**(6 Pt 2): 3049-64.
- Coulombe, P. A., M. E. Hutton, A. Letai, A. Hebert, A. S. Paller et E. Fuchs (1991). "Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses." Cell **66**(6): 1301-11.
- Coulombe, P. A. et M. B. Omary (2002). "'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments." Curr Opin Cell Biol **14**(1): 110-22.
- Craxton, A., G. Shu, J. D. Graves, J. Saklatvala, E. G. Krebs et E. A. Clark (1998). "p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes." J Immunol **161**(7): 3225-36.
- Dahlstrand, J., L. B. Zimmerman, R. D. McKay et U. Lendahl (1992). "Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments." J Cell Sci **103** ( Pt 2): 589-97.
- Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh et M. E. Greenberg (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell **91**(2): 231-41.
- Davis, R. J. (1994). "MAPKs: new JNK expands the group." Trends Biochem Sci **19**(11): 470-3.
- Davis, R. J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." Cell **103**(2): 239-52.
- De Carli, L. et L. Larizza (1988). "Griseofulvin." Mutat Res **195**(2): 91-126.

- Deak, J. C., J. V. Cross, M. Lewis, Y. Qian, L. A. Parrott, C. W. Distelhorst et D. J. Templeton (1998). "Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5595-600.
- Denk, H., R. Eckerstorfer, F. Gschnait, K. Konrad et K. Wolff (1976). "Experimental induction of hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in mice by griseofulvin treatment. 1. Light microscopic observation." Lab Invest **35**(4): 377-82.
- Denk, H., W. W. Franke, R. Eckerstorfer, E. Schmid et D. Kerjaschki (1979). "Formation and involution of Mallory bodies ("alcoholic hyalin") in murine and human liver revealed by immunofluorescence microscopy with antibodies to prekeratin." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(8): 4112-6.
- Denk, H., F. Gschnait et K. Wolff (1975). "Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation." Lab Invest **32**(6): 773-6.
- Denk, H., C. Stumptner et K. Zatloukal (2000). "Mallory bodies revisited." J Hepatol **32**(4): 689-702.
- Derijard, B., J. Raingeaud, T. Barrett, I. H. Wu, J. Han, R. J. Ulevitch et R. J. Davis (1995). "Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms." Science **267**(5198): 682-5.
- Develoux, M. (2001). "[Griseofulvin]." Ann Dermatol Venereol **128**(12): 1317-25.
- Diehl, N. L., H. Enslen, K. A. Fortner, C. Merritt, N. Stetson, C. Charland, R. A. Flavell, R. J. Davis et M. Rinc inverted question markon (2000). "Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway arrests cell cycle progression and differentiation of immature thymocytes in vivo." J Exp Med **191**(2): 321-34.
- Donohue, T. M., Jr. (2002). "The ubiquitin-proteasome system and its role in ethanol-induced disorders." Addict Biol **7**(1): 15-28.
- Drewes, G., A. Ebner et E. M. Mandelkow (1998). "MAPs, MARKs and microtubule dynamics." Trends Biochem Sci **23**(8): 307-11.
- Duriez, T., L. Dujardin et D. Afchain (2003). AUTRES ANTIFONGIQUES UTILISÉS PAR VOIE GÉNÉRALE. Lille, Laboratoire de Parasitologie Faculté de Pharmacie. 2003.

- Ellinger-Ziegelbauer, H., K. Kelly et U. Siebenlist (1999). "Cell cycle arrest and reversion of Ras-induced transformation by a conditionally activated form of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3." Mol Cell Biol **19**(5): 3857-68.
- Faire, B., Tyrowski, P., Hemmings, B. A. (1993). "Differential inhibition and posttranslational modification of protein phosphatase 1 and 2A in MCF T cells treated with calyculin-A, okadaic acid and tautomycin." J. Cell Biol. **272**: 13856–13863.
- Fataccioli, V., E. Andraud, M. Gentil, S. W. French et H. Rouach (1999). "Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities: relationship with oxidative stress." Hepatology **29**(1): 14-20.
- Fausther, M., L. Villeneuve et M. Cadrin (2004). "Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice." Comp Hepatol **3**(1): 5.
- Fausther, M., L. Villeneuve et M. Cadrin (2004). "HSP expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice." Comparative Hepathology. **Submitted**.
- Feng, L., X. Zhou, J. Liao et M. B. Omary (1999). "Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway." J Cell Sci **112** ( Pt 13): 2081-90.
- French, B. A., F. van Leeuwen, N. E. Riley, Q. X. Yuan, F. Bardag-Gorce, K. Gaal, Y. H. Lue, N. Marceau et S. W. French (2001). "Aggresome formation in liver cells in response to different toxic mechanisms: role of the ubiquitin-proteasome pathway and the frameshift mutant of ubiquitin." Exp Mol Pathol **71**(3): 241-6.
- French, S. W. (1983). "Present understanding of the development of Mallory's body." Arch Pathol Lab Med **107**(9): 445-50.
- Frisch, S. M. et R. A. Screaton (2001). "Anoikis mechanisms." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 555-62.
- Fuchs, E. (1994). "Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength." J Cell Biol **125**(3): 511-6.
- Fuchs, E. et D. W. Cleveland (1998). "A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease." Science **279**(5350): 514-9.

- Fuchs, E. et K. Weber (1994). "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease." Annu Rev Biochem **63**: 345-82.
- Fukunaga, R. et T. Hunter (1997). "MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates." Embo J **16**(8): 1921-33.
- Geisler, N., J. Schunemann et K. Weber (1992). "Chemical cross-linking indicates a staggered and antiparallel protofilament of desmin intermediate filaments and characterizes one higher-level complex between protofilaments." Eur J Biochem **206**(3): 841-52.
- Geisler, N. et K. Weber (1982). "The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins." Embo J **1**(12): 1649-56.
- Geisler, N. et K. Weber (1988). "Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments; identification of three kinase A sites in the aminoterminal head domain." Embo J **7**(1): 15-20.
- Georgatos, S. D., F. Gounari, G. Goulielmos et U. Aepli (1997). "To bead or not to bead? Lens-specific intermediate filaments revisited." J Cell Sci **110** ( Pt 21): 2629-34.
- Giasson, B. I. et W. E. Mushynski (1996). "Aberrant stress-induced phosphorylation of perikaryal neurofilaments." J Biol Chem **271**(48): 30404-9.
- Gilbert, S., A. Loranger, N. Daigle et N. Marceau (2001). "Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation." J Cell Biol **154**(4): 763-73.
- Goedert, M., A. Cuenda, M. Craxton, R. Jakes et P. Cohen (1997). "Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases." Embo J **16**(12): 3563-71.
- Goillot, E., J. Raingeaud, A. Ranger, R. I. Tepper, R. J. Davis, E. Harlow et I. Sanchez (1997). "Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3302-7.
- Grossmann, J. (2002). "Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis"." Apoptosis **7**(3): 247-60.



- Gschnait, F., K. Konrad, H. Honigsmann, H. Denk et K. Wolff (1975). "Mouse model for protoporphyria. I. The liver and hepatic protoporphyrin crystals." J Invest Dermatol **65**(3): 290-9.
- Gupta, S., T. Barrett, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, H. K. Sluss, B. Derijard et R. J. Davis (1996). "Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors." Embo J **15**(11): 2760-70.
- Hall, J. P. et R. J. Davis (2002). "Analysis of c-Jun N-terminal kinase regulation and function." Methods Enzymol **345**: 413-25.
- Hamm-Alvarez, S. F. et M. P. Sheetz (1998). "Microtubule-dependent vesicle transport: modulation of channel and transporter activity in liver and kidney." Physiol Rev **78**(4): 1109-29.
- Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs et R. J. Ulevitch (1994). "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." Science **265**(5173): 808-11.
- Hatzfeld, M. et K. Weber (1991). "Modulation of keratin intermediate filament assembly by single amino acid exchanges in the consensus sequence at the C-terminal end of the rod domain." J Cell Sci **99** ( Pt 2): 351-62.
- Hazan, R., H. Denk, W. W. Franke, E. Lackinger et D. L. Schiller (1986). "Change of cytokeratin organization during development of Mallory bodies as revealed by a monoclonal antibody." Lab Invest **54**(5): 543-53.
- He, T., A. Stepulak, T. H. Holmstrom, M. B. Omary et J. E. Eriksson (2002). "The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase." J Biol Chem **277**(13): 10767-74.
- Heidenreich, O., A. Neininger, G. Schratt, R. Zinck, M. A. Cahill, K. Engel, A. Kotlyarov, R. Kraft, S. Kostka, M. Gaestel et A. Nordheim (1999). "MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo." J Biol Chem **274**(20): 14434-43.
- Heins, S., P. C. Wong, S. Muller, K. Goldie, D. W. Cleveland et U. Aebi (1993). "The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation." J Cell Biol **123**(6 Pt 1): 1517-33.

- Herrmann, H. et U. Aebi (1998). "Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions." Curr Opin Struct Biol **8**(2): 177-85.
- Herrmann, H. et U. Aebi (1998). "Structure, assembly, and dynamics of intermediate filaments." Subcell Biochem **31**: 319-62.
- Herrmann, H., M. Haner, M. Brettel, S. A. Muller, K. N. Goldie, B. Fedtke, A. Lustig, W. W. Franke et U. Aebi (1996). "Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains." J Mol Biol **264**(5): 933-53.
- Herrmann, H., M. Hesse, M. Reichenzeller, U. Aebi et T. M. Magin (2003). "Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation." Int Rev Cytol **223**: 83-175.
- Holmstrom, T. H., I. Schmitz, T. S. Soderstrom, M. Poukkula, V. L. Johnson, S. C. Chow, P. H. Krammer et J. E. Eriksson (2000). "MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly." Embo J **19**(20): 5418-28.
- Holmstrom, T. H., S. E. Tran, V. L. Johnson, N. G. Ahn, S. C. Chow et J. E. Eriksson (1999). "Inhibition of mitogen-activated kinase signaling sensitizes HeLa cells to Fas receptor-mediated apoptosis." Mol Cell Biol **19**(9): 5991-6002.
- Huang, J. D., S. T. Brady, B. W. Richards, D. Stenolen, J. H. Resau, N. G. Copeland et N. A. Jenkins (1999). "Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors." Nature **397**(6716): 267-70.
- Hutter, H., K. Zatloukal, G. Winter, C. Stumptner et H. Denk (1993). "Disturbance of keratin homeostasis in griseofulvin-intoxicated mouse liver." Lab Invest **69**(5): 576-82.
- Inada, H., I. Izawa, M. Nishizawa, E. Fujita, T. Kiyono, T. Takahashi, T. Momoi et M. Inagaki (2001). "Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD." J Cell Biol **155**(3): 415-26.
- Iordanov, M., K. Bender, T. Ade, W. Schmid, C. Sachsenmaier, K. Engel, M. Gaestel, H. J. Rahmsdorf et P. Herrlich (1997). "CREB is activated by UVC through a p38/HOG-1-dependent protein kinase." Embo J **16**(5): 1009-22.

- Ip, Y. T. et R. J. Davis (1998). "Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development." Curr Opin Cell Biol 10(2): 205-19.
- Jensen, K. et C. Gluud (1994). "The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies (Part 1 of a literature survey)." Hepatology 20(4 Pt 1): 1061-77.
- Jensen, K. et C. Gluud (1994). "The Mallory body: theories on development and pathological significance (Part 2 of a literature survey)." Hepatology 20(5): 1330-42.
- Jiang, Y., C. Chen, Z. Li, W. Guo, J. A. Gegner, S. Lin et J. Han (1996). "Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)." J Biol Chem 271(30): 17920-6.
- Jiang, Y., H. Gram, M. Zhao, L. New, J. Gu, L. Feng, F. Di Padova, R. J. Ulevitch et J. Han (1997). "Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta." J Biol Chem 272(48): 30122-8.
- Joshi-Barve, S., S. S. Barve, W. Butt, J. Klein et C. J. McClain (2003). "Inhibition of proteasome function leads to NF-kappaB-independent IL-8 expression in human hepatocytes." Hepatology 38(5): 1178-87.
- Juo, P., C. J. Kuo, S. E. Reynolds, R. F. Konz, J. Raingeaud, R. J. Davis, H. P. Biemann et J. Blenis (1997). "Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases." Mol Cell Biol 17(1): 24-35.
- Kachi, K., M. Cadrin et S. W. French (1993). "Synthesis of Mallory body, intermediate filament, and microfilament proteins in liver cell primary cultures. An electron microscopic autoradiography assay." Lab Invest 68(1): 71-81.
- Karp, G. (2004). *Biologie cellulaire et moléculaire*. DeBoeck. Paris. 2<sup>e</sup> ed.
- Kaufmann, E., K. Weber et N. Geisler (1985). "Intermediate filament forming ability of desmin derivatives lacking either the amino-terminal 67 or the carboxy-terminal 27 residues." J Mol Biol 185(4): 733-42.
- Kawasaki, H., T. Morooka, S. Shimohama, J. Kimura, T. Hirano, Y. Gotoh et E. Nishida (1997). "Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in

- glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells." J Biol Chem **272**(30): 18518-21.
- Kikuchi, M., L. Tenneti et S. A. Lipton (2000). "Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells." J Neurosci **20**(13): 5037-44.
- Kirfel, J., T. M. Magin et J. Reichelt (2003). "Keratins: a structural scaffold with emerging functions." Cell Mol Life Sci **60**(1): 56-71.
- Knasmuller, S., W. Parzefall, C. Helma, F. Kassie, S. Ecker et R. Schulte-Hermann (1997). "Toxic effects of griseofulvin: disease models, mechanisms, and risk assessment." Crit Rev Toxicol **27**(5): 495-537.
- Kouklis, P. D., M. Hatzfeld, M. Brunkener, K. Weber et S. D. Georgatos (1993). "In vitro assembly properties of vimentin mutagenized at the beta-site tail motif." J Cell Sci **106** ( Pt 3): 919-28.
- Ksontini, R., D. B. Colagiovanni, M. D. Josephs, C. K. Edwards, 3rd, C. L. Tannahill, C. C. Solorzano, J. Norman, W. Denham, M. Clare-Salzler, S. L. MacKay et L. L. Moldawer (1998). "Disparate roles for TNF-alpha and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis." J Immunol **160**(8): 4082-9.
- Ku, N. O., S. Azhar et M. B. Omary (2002). "Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation." J Biol Chem **277**(13): 10775-82.
- Ku, N. O., J. M. Darling, S. M. Krams, C. O. Esquivel, E. B. Keeffe, R. K. Sibley, Y. M. Lee, T. L. Wright et M. B. Omary (2003). "Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 6063-8.
- Ku, N. O., R. Gish, T. L. Wright et M. B. Omary (2001). "Keratin 8 mutations in patients with cryptogenic liver disease." N Engl J Med **344**(21): 1580-7.
- Ku, N. O., J. Liao, C. F. Chou et M. B. Omary (1996). "Implications of intermediate filament protein phosphorylation." Cancer Metastasis Rev **15**(4): 429-44.
- Ku, N. O., J. Liao et M. B. Omary (1997). "Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins." J Biol Chem **272**(52): 33197-203.

- Ku, N. O., J. Liao et M. B. Omary (1998). "Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins." Embo J **17**(7): 1892-906.
- Ku, N. O., S. Michie, R. G. Oshima et M. B. Omary (1995). "Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant." J Cell Biol **131**(5): 1303-14.
- Ku, N. O., S. Michie, E. Z. Resurreccion, R. L. Broome et M. B. Omary (2002). "Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4373-8.
- Ku, N. O., S. A. Michie, R. M. Soetikno, E. Z. Resurreccion, R. L. Broome, R. G. Oshima et M. B. Omary (1996). "Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice that express a dominant-negative human keratin 18 mutant." J Clin Invest **98**(4): 1034-46.
- Ku, N. O. et M. B. Omary (1994). "Expression, glycosylation, and phosphorylation of human keratins 8 and 18 in insect cells." Exp Cell Res **211**(1): 24-35.
- Ku, N. O. et M. B. Omary (1995). "Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18." J Biol Chem **270**(20): 11820-7.
- Ku, N. O. et M. B. Omary (1997). "Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431." J Biol Chem **272**(11): 7556-64.
- Ku, N. O. et M. B. Omary (2000). "Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion." J Cell Biol **149**(3): 547-52.
- Ku, N. O. et M. B. Omary (2001). "Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation." J Biol Chem **276**(29): 26792-8.
- Ku, N. O., T. L. Wright, N. A. Terrault, R. Gish et M. B. Omary (1997). "Mutation of human keratin 18 in association with cryptogenic cirrhosis." J Clin Invest **99**(1): 19-23.
- Ku, N. O., X. Zhou, D. M. Toivola et M. B. Omary (1999). "The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease." Am J Physiol **277**(6 Pt 1): G1108-37.

- Kuan, C. Y., D. D. Yang, D. R. Samanta Roy, R. J. Davis, P. Rakic et R. A. Flavell (1999). "The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development." Neuron **22**(4): 667-76.
- Kumar, S., P. C. McDonnell, R. J. Gum, A. T. Hand, J. C. Lee et P. R. Young (1997). "Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles." Biochem Biophys Res Commun **235**(3): 533-8.
- Kummer, J. L., P. K. Rao et K. A. Heidenreich (1997). "Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **272**(33): 20490-4.
- Kurata, S. (2000). "Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress." J Biol Chem **275**(31): 23413-6.
- Kyriakis, J. M. et J. Avruch (1996). "Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation." J Biol Chem **271**(40): 24313-6.
- LaVia, M. F. et R. B. J. Hill (1975). Principles of Pathobiology. New York.
- Lavoie, J. N., G. L'Allemain, A. Brunet, R. Muller et J. Pouyssegur (1996). "Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway." J Biol Chem **271**(34): 20608-16.
- Lazarides, E. (1980). "Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space." Nature **283**(5744): 249-256.
- Lazebnik, Y. A., A. Takahashi, R. D. Moir, R. D. Goldman, G. G. Poirier, S. H. Kaufmann et W. C. Earnshaw (1995). "Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9042-6.
- Lechner, C., M. A. Zahalka, J. F. Giot, N. P. Moller et A. Ullrich (1996). "ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 4355-9.
- Lee, D. H. et A. L. Goldberg (1998). "Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists." Trends Cell Biol **8**(10): 397-403.
- Leers, M. P., W. Kolgen, V. Bjorklund, T. Bergman, G. Tribbick, B. Persson, P. Bjorklund, F. C. Ramaekers, B. Bjorklund, M. Nap, H. Jornvall et B. Schutte

- (1999). "Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis." J Pathol **187**(5): 567-72.
- Lenczowski, J. M., L. Dominguez, A. M. Eder, L. B. King, C. M. Zacharchuk et J. D. Ashwell (1997). "Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis." Mol Cell Biol **17**(1): 170-81.
- Liao, J., N. O. Ku et M. B. Omary (1997). "Stress, apoptosis, and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at Ser-73 in tissues and cultured cells." J Biol Chem **272**(28): 17565-73.
- Liao, J., L. A. Lowthert et M. B. Omary (1995). "Heat stress or rotavirus infection of human epithelial cells generates a distinct hyperphosphorylated form of keratin 8." Exp Cell Res **219**(2): 348-57.
- Liao, J. et M. B. Omary (1996). "14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor." J Cell Biol **133**(2): 345-57.
- Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore et J. E. Darnell (2000). Molecular Cell Biology. New York.
- Loranger, A., S. Duclos, A. Grenier, J. Price, M. Wilson-Heiner, H. Baribault et N. Marceau (1997). "Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity." Am J Pathol **151**(6): 1673-83.
- Lu, H. T., D. D. Yang, M. Wysk, E. Gatti, I. Mellman, R. J. Davis et R. A. Flavell (1999). "Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice." Embo J **18**(7): 1845-57.
- Magin, T. M. (1998). "Lessons from keratin transgenic and knockout mice." Subcell Biochem **31**: 141-72.
- Magin, T. M., R. Schroder, S. Leitgeb, F. Wanninger, K. Zatloukal, C. Grund et D. W. Melton (1998). "Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates." J Cell Biol **140**(6): 1441-51.
- Makarova, I., D. Carpenter, S. Khan et W. Ip (1994). "A conserved region in the tail domain of vimentin is involved in its assembly into intermediate filaments." Cell Motil Cytoskeleton **28**(3): 265-77.

- Mallory, F. B. (1911). "Cirrhosis of the liver: five different lesions which it may arise." Bull Johns Hopkins Hospital(22): 69-75.
- Marceau, N., A. Loranger, S. Gilbert, N. Daigle et S. Champetier (2001). Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease. Biochem Cell Biol. 79: 543-55.
- Martin-Blanco, E. (2000). "p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions." Bioessays 22(7): 637-45.
- McCormick, M. B., P. Kouklis, A. Syder et E. Fuchs (1993). "The roles of the rod end and the tail in vimentin IF assembly and IF network formation." J Cell Biol 122(2): 395-407.
- McGowan, K. et P. A. Coulombe (1998). "The wound repair-associated keratins 6, 16, and 17. Insights into the role of intermediate filaments in specifying keratinocyte cytoarchitecture." Subcell Biochem 31: 173-204.
- McLean, W. H. (2003). "Genetic disorders of palm skin and nail." J Anat 202(1): 133-41.
- Mermall, V., P. L. Post et M. S. Mooseker (1998). "Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction." Science 279(5350): 527-33.
- Merritt, C., H. Enslen, N. Diehl, D. Conze, R. J. Davis et M. Rincon (2000). "Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells." Mol Cell Biol 20(3): 936-46.
- Mielke, K., S. Brecht, A. Dorst et T. Herdegen (1999). "Activity and expression of JNK1, p38 and ERK kinases, c-Jun N-terminal phosphorylation, and c-jun promoter binding in the adult rat brain following kainate-induced seizures." Neuroscience 91(2): 471-83.
- Moll, R., W. W. Franke, D. L. Schiller, B. Geiger et R. Krepler (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." Cell 31(1): 11-24.
- Molnar, A., A. M. Theodoras, L. I. Zon et J. M. Kyriakis (1997). "Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK." J Biol Chem 272(20): 13229-35.



- Morooka, T. et E. Nishida (1998). "Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells." J Biol Chem **273**(38): 24285-8.
- Muller, M., S. Wilder, D. Bannasch, D. Israeli, K. Lehlbach, M. Li-Weber, S. L. Friedman, P. R. Galle, W. Stremmel, M. Oren et P. H. Krammer (1998). "p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs." J Exp Med **188**(11): 2033-45.
- Nakamichi, I., S. Hatakeyama et K. I. Nakayama (2002). "Formation of Mallory body-like inclusions and cell death induced by deregulated expression of keratin 18." Mol Biol Cell **13**(10): 3441-51.
- Nebreda, A. R. et A. Porras (2000). "p38 MAP kinases: beyond the stress response." Trends Biochem Sci **25**(6): 257-60.
- Nemoto, S., Z. Sheng et A. Lin (1998). "Opposing effects of Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy." Mol Cell Biol **18**(6): 3518-26.
- Neznanov, N., A. Kondratova, K. M. Chumakov, B. Angres, B. Zhumabayeva, V. I. Agol et A. V. Gudkov (2001). "Poliovirus protein 3A inhibits tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis by eliminating the TNF receptor from the cell surface." J Virol **75**(21): 10409-20.
- Omary, M. B., N. O. Ku, J. Liao et D. Price (1998). "Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro." Subcell Biochem **31**: 105-40.
- Omary, M. B., N. O. Ku et D. M. Toivola (2002). "Keratins: guardians of the liver." Hepatology **35**(2): 251-7.
- Oshima, R. G. (2002). "Apoptosis and keratin intermediate filaments." Cell Death Differ **9**(5): 486-92.
- Oshima, R. G., J. L. Millan et G. Cecena (1986). "Comparison of mouse and human keratin 18: a component of intermediate filaments expressed prior to implantation." Differentiation **33**(1): 61-8.
- Oxford, A. E., H. Raistrick et p. Simonart (1939). "Griseofulvin, C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>O<sub>6</sub>Cl, a metabolic product of penicillium griseofulvum Dierks." Biochem J **33**: 240-8.

- Paramio, J. M., C. Segrelles, S. Ruiz et J. L. Jorcano (2001). "Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKC $\zeta$  mediates keratin K10-induced cell cycle arrest." Mol Cell Biol **21**(21): 7449-59.
- Parker, L. L., S. A. Walter, P. G. Young et H. Piwnica-Worms (1993). "Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase." Nature **363**(6431): 736-8.
- Parry, D. A. et P. M. Steinert (1999). "Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism." Q Rev Biophys **32**(2): 99-187.
- Porter, R. M. et E. B. Lane (2003). "Phenotypes, genotypes and their contribution to understanding keratin function." Trends Genet **19**(5): 278-85.
- Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki et J. R. Woodgett (1991). "Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases." Nature **353**(6345): 670-4.
- Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch et R. J. Davis (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-6.
- Raingeaud, J., A. J. Whitmarsh, T. Barrett, B. Derijard et R. J. Davis (1996). "MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway." Mol Cell Biol **16**(3): 1247-55.
- Reynolds, C. H., J. C. Betts, W. P. Blackstock, A. R. Nebreda et B. H. Anderton (2000). "Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ." J Neurochem **74**(4): 1587-95.
- Reynolds, C. H., M. A. Utton, G. M. Gibb, A. Yates et B. H. Anderton (1997). "Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein." J Neurochem **68**(4): 1736-44.
- Rincon, M., H. Enslen, J. Raingeaud, M. Recht, T. Zapton, M. S. Su, L. A. Penix, R. J. Davis et R. A. Flavell (1998). "Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway." Embo J **17**(10): 2817-29.

- Rudel, T. et G. M. Bokoch (1997). "Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2." Science **276**(5318): 1571-4.
- Ruebner, B. H., C. K. Montgomery et S. W. French (1991). Diagnostic Pathology of the Liver and Biliary Tract. United States.
- Saklatvala, J., L. Rawlinson, R. J. Waller, S. Sarsfield, J. C. Lee, L. F. Morton, M. J. Barnes et R. W. Farndale (1996). "Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue." J Biol Chem **271**(12): 6586-9.
- Santos, M., J. M. Paramio, A. Bravo, A. Ramirez et J. L. Jorcano (2002). "The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis." J Biol Chem **277**(21): 19122-30.
- Steinert, P. M., L. N. Marekov, R. D. Fraser et D. A. Parry (1993). "Keratin intermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly." J Mol Biol **230**(2): 436-52.
- Steinert, P. M. et D. R. Roop (1988). "Molecular and cellular biology of intermediate filaments." Annu Rev Biochem **57**: 593-625.
- Stokoe, D., K. Engel, D. G. Campbell, P. Cohen et M. Gaestel (1992). "Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins." FEBS Lett **313**(3): 307-13.
- Strelkov, S. V., H. Herrmann et U. Aebi (2003). "Molecular architecture of intermediate filaments." Bioessays **25**(3): 243-51.
- Stumptner, C., A. Fuchsbichler, M. Lehner, K. Zatloukal et H. Denk (2001). "Sequence of events in the assembly of Mallory body components in mouse liver: clues to the pathogenesis and significance of Mallory body formation." J Hepatol **34**(5): 665-75.
- Tagawa, Y., S. Kakuta et Y. Iwakura (1998). "Involvement of Fas/Fas ligand system-mediated apoptosis in the development of concanavalin A-induced hepatitis." Eur J Immunol **28**(12): 4105-13.

- Takagi, M., M. Yamauchi, G. Toda, K. Takada, T. Hirakawa et K. Ohkawa (1999). "Serum ubiquitin levels in patients with alcoholic liver disease." Alcohol Clin Exp Res **23**(4 Suppl): 76S-80S.
- Takahashi, A., E. S. Alnemri, Y. A. Lazebnik, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, R. D. Moir, R. D. Goldman, G. G. Poirier, S. H. Kaufmann et W. C. Earnshaw (1996). "Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8395-400.
- Tan, Y., J. Rouse, A. Zhang, S. Cariati, P. Cohen et M. J. Comb (1996). "FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2." Embo J **15**(17): 4629-42.
- Tao, G. Z., D. M. Toivola, B. Zhong, S. A. Michie, E. Z. Resurreccion, Y. Tamai, M. M. Taketo et M. B. Omary (2003). "Keratin-8 null mice have different gallbladder and liver susceptibility to lithogenic diet-induced injury." J Cell Sci **116**(Pt 22): 4629-38.
- Toivola, D. M., M. B. Omary, N. O. Ku, O. Peltola, H. Baribault et J. E. Eriksson (1998). "Protein phosphatase inhibition in normal and keratin 8/18 assembly-incompetent mouse strains supports a functional role of keratin intermediate filaments in preserving hepatocyte integrity." Hepatology **28**(1): 116-28.
- Toivola, D. M., Q. Zhou, L. S. English et M. B. Omary (2002). "Type II keratins are phosphorylated on a unique motif during stress and mitosis in tissues and cultured cells." Mol Biol Cell **13**(6): 1857-70.
- Tournier, C., A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett et R. J. Davis (1997). "Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7337-42.
- Tournier, C., A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, T. Barrett et R. J. Davis (1999). "The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases." Mol Cell Biol **19**(2): 1569-81.
- Vacheret, N. (1999). Histologie fonctionnelle des organes, <http://cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/FrameAccueil.html>.

- Vassar, R., P. A. Coulombe, L. Degenstein, K. Albers et E. Fuchs (1991). "Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease." Cell **64**(2): 365-80.
- Verheij, M., R. Bose, X. H. Lin, B. Yao, W. D. Jarvis, S. Grant, M. J. Birrer, E. Szabo, L. I. Zon, J. M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks et R. N. Kolesnick (1996). "Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis." Nature **380**(6569): 75-9.
- Wang, X., A. Flynn, A. J. Waskiewicz, B. L. Webb, R. G. Vries, I. A. Baines, J. A. Cooper et C. G. Proud (1998). "The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways." J Biol Chem **273**(16): 9373-7.
- Wang, X., C. H. McGowan, M. Zhao, L. He, J. S. Downey, C. Fearn, Y. Wang, S. Huang et J. Han (2000). "Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation-induced cell cycle arrest." Mol Cell Biol **20**(13): 4543-52.
- Wang, X. Z. et D. Ron (1996). "Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase." Science **272**(5266): 1347-9.
- Whitmarsh, A. J. et R. J. Davis (1996). "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways." J Mol Med **74**(10): 589-607.
- Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe et G. L. Johnson (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev **79**(1): 143-80.
- Wong, P. et P. A. Coulombe (2003). "Loss of keratin 6 (K6) proteins reveals a function for intermediate filaments during wound repair." J Cell Biol **163**(2): 327-37.
- Wysk, M., D. D. Yang, H. T. Lu, R. A. Flavell et R. J. Davis (1999). "Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3763-8.
- Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis et M. E. Greenberg (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." Science **270**(5240): 1326-31.

- Yamada, S., D. Wirtz et P. A. Coulombe (2003). "The mechanical properties of simple epithelial keratins 8 and 18: discriminating between interfacial and bulk elasticities." J Struct Biol **143**(1): 45-55.
- Yang, D. D., C. Y. Kuan, A. J. Whitmarsh, M. Rincon, T. S. Zheng, R. J. Davis, P. Rakic et R. A. Flavell (1997). "Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene." Nature **389**(6653): 865-70.
- Yang, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang et D. Baltimore (1997). "Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis." Cell **89**(7): 1067-76.
- Yokoo, H., R. M. Craig, T. R. Harwood et C. Cochrane (1979). "Griseofulvin-induced cholestasis in Swiss albino mice." Gastroenterology **77**(5): 1082-7.
- Zatloukal, K., C. Stumptner, A. Fuchsbichler, H. Heid, M. Schnoelzer, L. Kenner, R. Kleinert, M. Prinz, A. Aguzzi et H. Denk (2002). "p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases." Am J Pathol **160**(1): 255-63.
- Zatloukal, K., C. Stumptner, M. Lehner, H. Denk, H. Baribault, L. G. Eshkind et W. W. Franke (2000). "Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies." Am J Pathol **156**(4): 1263-74.
- Zhang, H., J. Cook, J. Nickel, R. Yu, K. Stecker, K. Myers et N. M. Dean (2000). "Reduction of liver Fas expression by an antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis." Nat Biotechnol **18**(8): 862-7.
- Zhao, M., L. New, V. V. Kravchenko, Y. Kato, H. Gram, F. di Padova, E. N. Olson, R. J. Ulevitch et J. Han (1999). "Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38." Mol Cell Biol **19**(1): 21-30.