

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
ANNE-MARIE FORTIER**

**RELATION ENTRE LES KÉRATINES ET LES VOIES DE SIGNALISATION
PRO-APOPTOTIQUE DE FAS ET ANTI-APOPTOTIQUE DE AKT DANS LA
RÉPONSE DES CELLULES HEPG2 AU STRESS TOXIQUE INDUIT PAR LA
GRISÉOFULVINE**

DÉCEMBRE 2007

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé et encouragé dans ce projet. Je remercie spécialement ma directrice de recherche Monique Cadrin Ph.D. qui m'a donné la possibilité de poursuivre mes études à la maîtrise dans son laboratoire et qui m'a permis de me dépasser et d'acquérir une plus grande confiance en mes capacités. Je remercie également mon co-directeur Éric Asselin Ph.D. pour ses conseils judicieux et l'intérêt qu'il a porté à ce projet. Je veux aussi remercier mes collègues de laboratoire Kathleen, Martin, Ingrid, Valérie et tous les autres pour leur patience et leurs conseils. Enfin, je ne saurais oublier le soutien moral et les encouragements de mon conjoint, Stéphane, et de toute ma famille...

RÉSUMÉ

Dans plusieurs pathologies hépatiques, tel que l'hépatite alcoolique, on observe la présence d'inclusions cytoplasmiques à l'intérieur des hépatocytes. Ces amas, appelés corps de Mallory (CMs), sont constitués principalement de protéines de filaments intermédiaires (FIs) qui constituent le cytosquelette, en l'occurrence les kératines 8 et 18 (K8/18) qui sont exprimées par les hépatocytes. On ne sait pas encore si ces agrégats protéiques sont la cause du dysfonctionnement cellulaire ou la conséquence du stress imposé à la cellule. Toutefois, les récentes études tendent à démontrer que les K8/18 peuvent jouer un rôle dans la résistance à différents stress et à l'apoptose. Bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette résistance restent encore à déterminer, plusieurs études ont démontré que certaines modifications post-traductionnelles, tel que la phosphorylation, permettent aux FIs d'interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire. Le premier objectif de cette étude est d'établir un modèle d'étude *in vitro*, par la culture de cellules HepG2 soumises à un stress toxique induit par la griséofulvine (GF). Cet agent chimique, couramment utilisé pour l'étude de la formation des CMs chez la souris, induit la réorganisation du réseau de FIs et la phosphorylation des kératines *in vivo*. Le second objectif de ce projet est de caractériser le processus d'apoptose observé dans notre modèle d'étude, en déterminant si une relation existe entre le récepteur de mort cellulaire Fas et la phosphorylation des K8/18. Le dernier objectif consiste à déterminer si la phosphorylation des K8/18 et le mécanisme de résistance à l'apoptose peut être associée à la protéine Akt, qui est un médiateur important de la survie et de la prolifération cellulaire. Ces objectifs sont réalisés à l'aide de techniques d'immunobuvardage de type Western, d'immunofluorescence, de spectrophotométrie et de RT-PCR. Nos résultats ont montré que l'exposition des cellules HepG2 à la GF induit la réorganisation du réseau de K8/18 et la phosphorylation de la K8 au niveau de la sérine 79 et de la K18 sur la sérine 33. On observe de plus la formation d'agrégats de K8 phosphorylées et d'ubiquitine pouvant s'apparenter aux CMs observés dans les modèles *in vivo*. Le traitement à la GF induit l'apoptose des cellules HepG2 par la présence croissante de la caspase 3 clivée et la

diminution de la prolifération cellulaire au cours du traitement. Nous avons également démontré que le FasR est présent dans les cellules HepG2 au niveau de la membrane plasmique ainsi que dans le cytosol et que le marquage colocalise avec celui des K8/18 phosphorylées dans certaines cellules contrôles et traitées à la GF. Il en est de même pour le marquage de la protéine Akt phosphorylée, dont la localisation est davantage cytosolique, qui colocalise avec le marquage des K8/18 phosphorylées dans les cellules contrôles en cours de mitose et dans certaines cellules exposées à la GF. De plus, nous avons montré que le traitement à la GF n'influence pas l'expression protéique du FasR, mais augmente la phosphorylation de Akt. L'inhibition de cette phosphorylation ne modifie pas les niveaux de phosphorylation des K8, ce qui laisse supposer que les K8 ne sont pas des substrats directs de la kinase Akt. Toutefois, les niveaux d'expression de la caspase 3 clivée augmentent dans les cellules dont la protéine Akt est inactivée, contrairement au FasR et à son ligand dont l'expression reste stable. Ces résultats suggèrent donc que Akt joue effectivement un rôle dans la résistance des cellules HepG2 à l'apoptose induite par la GF, sans toutefois moduler l'expression du FasR et de son ligand. L'ensemble de nos résultats montre que les K8/18 phosphorylées peuvent interagir avec la protéine Akt et le FasR. De plus, il apparaît que le mécanisme de résistance contre l'apoptose implique la protéine Akt, mais n'affecte pas l'expression du FasR ni celle de son ligand. À partir de ces résultats, nous suggérons que les kératines peuvent jouer un rôle dans la translocation ou la séquestration de ces protéines. En réponse au stress induit par la GF, le réseau de K8/18 se désorganise et devient hyperphosphorylé, ce qui permet l'interaction des K8/18 avec ces protéines : l'association des K8/18 avec Akt phosphorylée pourrait donc favoriser la résistance à l'apoptose imputable aux kératines et leur interaction avec le FasR pourrait influencer sa translocation à la membrane plasmique. Les kératines pourraient donc jouer un rôle dans la modulation de la signalisation intracellulaire en réponse à un stress toxique.

Mots-clés : hépatite alcoolique, filaments intermédiaires, kératines 8 et 18, phosphorylation, corps de Mallory, apoptose, Akt, Fas.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES	X
CHAPITRE 1	1
LE FOIE ET LES HÉPATITES ALCOOLIQUE	1
1.1 <i>Le foie</i>	1
1.2 <i>L'hépatite alcoolique</i>	3
1.3 <i>Modèles d'étude de l'hépatite alcoolique</i>	4
CHAPITRE 2	6
LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES	6
2.1 <i>Le cytosquelette et les filaments intermédiaires</i>	6
2.2 <i>Les kératines dans les hépatocytes</i>	10
2.3 <i>Corps de Mallory</i>	16
CHAPITRE 3	21
LES KÉRATINES DANS LA SIGNALISATION CELLULAIRE	21
3.1 <i>La voie de signalisation de Fas/FasL</i>	21
3.2 <i>La voie de signalisation de PI3K/Akt</i>	24
CHAPITRE 4	29
PROJET DE RECHERCHE	29
4.1 <i>Travaux antérieurs et hypothèses</i>	29
4.2 <i>Objectifs du projet de recherche</i>	31
4.3 <i>Méthodologie</i>	32
4.4 <i>Résultats</i>	36
CHAPITRE 5	55
DISCUSSION ET PERSPECTIVES D'AVENIR	55
5.1 <i>Discussion</i>	55
5.2 <i>Perspectives d'avenir</i>	62
BIBLIOGRAPHIE	65

LISTE DES TABLEAUX

2.1	Les protéines de filaments intermédiaires.....	7
2.2	Les kératines et leur distribution dans les différents tissus.....	10
2.3	Principaux constituants des Corps de Mallory.....	18

LISTE DES FIGURES

1.1	Schéma du lobule hépatique.....	1
1.2	Modifications du réseau de kératines dans les hépatocytes de souris lors d'une intoxication prolongée avec la GF.....	4
1.3	Modifications du réseau de kératines dans les cellules HepG2 traitées avec la GF.....	5
2.1	Représentation schématique de la structure des protéines de filaments intermédiaires.....	8
2.2	Modèle représentant l'assemblage et l'architecture du filament intermédiaire.....	9
2.3	Schéma récapitulatif des modèles expérimentaux de souris pour l'étude des kératines 8 et 18.....	12
2.4	Sites de phosphorylation connus au niveau des kératines humaines 8 et 18.....	14
2.5	Schéma récapitulatif des modèles expérimentaux de souris pour l'étude de la phosphorylation des kératines 8 et 18.....	15
2.6	Corps de Mallory à l'intérieur d'hépatocytes humains (A-C) et d'hépatocytes de souris (D-F).....	17
2.7	Schéma des différents composants et processus cellulaires impliqués dans la formation des Corps de Mallory.....	19
3.1	Induction de l'apoptose.....	22
3.2	Représentation schématique des différents composants de la voie de signalisation de Fas/FasL en relation avec le cytosquelette et la membrane plasmique.....	24
3.3	Modèle du mécanisme d'activation de la kinase Akt.....	25
3.4	Inhibition de l'apoptose par Akt.....	26
4.1	Distribution des kératines 8 phosphorylées au niveau de la sérine 79 dans les hépatocytes de souris traitées à la GF durant deux semaines.....	29
4.2	Détection de l'apoptose dans les hépatocytes de souris traitées à la GF durant deux semaines.....	30

4.3	Distribution du réseau de kératines 8 dans les cellules HepG2.....	37
4.4	Distribution du réseau de kératines 18 dans les cellules HepG2.....	38
4.5	Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique des kératines 8 et 18 totales (a), de la kératine 8 phosphorylée (b) et de la kératine 18 phosphorylée (c) dans les cellules HepG2.....	39
4.6	Distribution de la K8 phosphorylée et de l'ubiquitine dans les cellules HepG2.....	41
4.7	Distribution de la K8 phosphorylée et de la caspase 3 clivée dans les cellules HepG2.....	43
4.8	Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique de la caspase 3 totale et clivée (fragments de 17 kD et 19 kD) dans les cellules HepG2.....	44
4.9	Essai de prolifération cellulaire des HepG2 au cours du traitement à la GF.....	44
4.10	Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique du récepteur Fas dans les cellules HepG2.....	45
4.11	Distribution de la K8 phosphorylée et du récepteur Fas dans les cellules HepG2.....	46
4.12	Distribution de la K18 phosphorylée et du récepteur Fas dans les cellules HepG2.....	47
4.13	Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique de Akt totale (a) et phosphorylée (b) dans les cellules HepG2.....	49
4.14	Distribution de la K8 phosphorylée et de la protéine Akt phosphorylée dans les cellules HepG2.....	50
4.15	Distribution de la K18 phosphorylée et de la protéine Akt phosphorylée dans les cellules HepG2.....	51
4.16	Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique de la K8 phosphorylée et de la protéine Akt phosphorylée dans les cellules HepG2 en présence d'un inhibiteur de la PI3K.....	52
4.17	Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique de la caspase 3 totale et clivée (a) et du FasR (b) et analyse par RT-PCR des niveaux d'ARNm du FasL (c) dans les cellules HepG2 en présence d'un inhibiteur de la PI3K.....	53

5.1	Schéma récapitulatif des hypothèses concernant le rôle de la phosphorylation des kératines dans les voies de signalisation d’Akt et de FasR en situation de stress toxique.....	61
5.2	Modèle représentant la capacité des K8 à «absorber» la phosphorylation destinée à d’autres substrats et la conséquence de leur mutation sur cette fonction.....	64

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ala	Alanine
AP-1	Protéine activatrice 1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BSA	Bovine serum albumine
c-FLIP	cellular FLICE-inhibitory protein
CMs	corps de Mallory
C3H	Patrimoine génétique spécifique à une lignée de souris
C57BL/6	Patrimoine génétique spécifique à une lignée de souris
DDC	3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine
DEDD	Death effector domain containing DNA binding protein
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTPs	Deoxynucléotides triphosphates
DR	Death receptor
DTT	Dithiotreitol
EBS	Épidermolyse bulleuse simple
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF	Epidermal growth factor
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1 et 2
FADD	Fas-associated protein with death domain
FasL	Ligand de Fas
FasR	Récepteur de Fas
FBS	Fetal bovine serum
FIs	Filaments intermédiaires
FKHR	Facteur de transcription de la famille forkhead
FLICE	FADD-like ICE

FVB/n	Patrimoine génétique spécifique à une lignée de souris
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GF	Griséofulvine
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
Hsp	Heat shock protein
IAP	Inhibiteur de caspase
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme ou caspase 1
I κ B	inhibiteur de kappa B
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Chlorure de potassium
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Phosphate de potassium
K18	Kératine 18
K8	Kératine 8
K8/18	Paire formée par l'assemblage des kératines 8 et 18
K8 pSer73	Kératine 8 phosphorylée au niveau de la sérine en position 73
K8 -/-	Délétion homozygote du gène de la kératine 8
K8 +/-	Délétion hétérozygote du gène de la kératine 8
K18 -/-	Délétion homozygote du gène de la kératine 18
MAP	Mitogen-activated protein
MFs	Microfilaments
Mm 120-1	Molecular marker 120-1
MPM-2	Mitotic phosphoproteins marker 2
MTs	Microtubules
NaCl	Chlorure de sodium
Na ₂ HPO ₄	Phosphate de sodium disodique
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
PBS	Phosphate buffered saline
PDK	Kinase dépendante des phosphoinositides
PH	Domaine d'homologie avec la plecstrine

PI3K	Phosphatidyl-inositol 3'-kinase
PKC	Protéine kinase C
PMSF	Phénylméthylsulfonylfluorure
PVDF	Polyvinylidène difluorure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SAPK	Stress-activated protein kinases
Ser	Sérine
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMI-31	Neurofilament protein marker 31
TG2	Transglutaminase 2
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Récepteur du tumor necrosis factor
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand

CHAPITRE 1

LE FOIE ET LES HÉPATITES ALCOOLIQUE

1.1 Le foie

Chez l'humain, le foie est l'organe le plus volumineux et le plus complexe métaboliquement. Sur le plan physiologique, il est constitué d'une myriade d'unités fonctionnelles appelées lobules qui sont majoritairement formés de cellules épithéliales spécialisées, les hépatocytes. Chacun des lobules est limité par quatre ou cinq espaces portes, zone d'irrigation formée par de petites branches de la veine porte et de l'artère hépatique, toutes deux responsables de l'apport sanguin au foie. En effet, le foie reçoit du sang de deux sources : il obtient de l'artère hépatique du sang oxygéné et de la veine porte hépatique du sang désoxygéné en provenance du tube digestif. Les ramifications de l'artère hépatique et de la veine porte hépatique acheminent le sang aux sinusoides entre les lames d'hépatocytes où l'oxygène, la plupart des nutriments et certaines substances toxiques sont absorbés par les hépatocytes. Le sang efférent, les substances produites par les hépatocytes et les nutriments dont les autres cellules ont besoin passent dans les sinusoides, recueillis dans la veine centrolobulaire et enfin dans la veine hépatique. Un vaste réseau de vaisseaux lymphatiques draine également le foie.

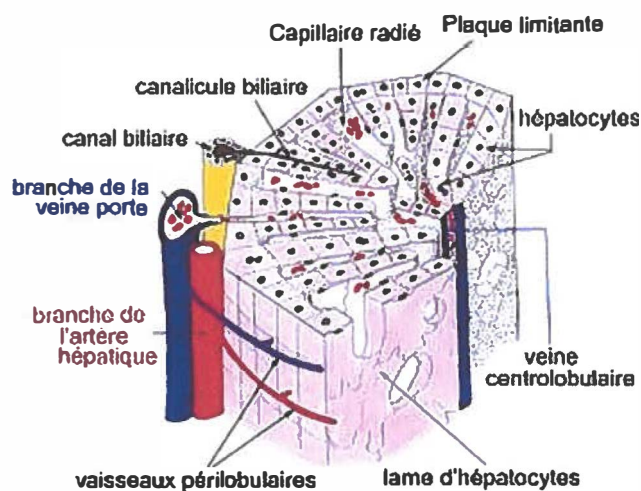


FIGURE 1.1 Schéma du lobule hépatique (Poupon, 2003).

Les hépatocytes constituent la majorité de l'organe. Ils sont disposés en lames qui irradient de chaque espace porte vers les veines centrolobulaires adjacentes. Les canalicules biliaires sont constitués de sillons situés entre des hépatocytes adjacents. La bile sécrétée dans ces canalicules se déverse dans les canaux biliaires interlobulaires. Outre les hépatocytes, on retrouve d'autres types cellulaires dans le foie. Les cellules endothéliales assurent aux hépatocytes un accès facile aux nutriments et aux macromolécules du plasma, du fait qu'elles ne possèdent pas de membrane basale et sont fenestrées. Elles interviennent aussi dans l'endocytose de molécules et dans le métabolisme de lipoprotéines. Les cellules de Kupffer sont des macrophages tissulaires qui permettent la phagocytose et la modulation de la réponse immunitaire. Les cellules périsinusoïdales riches en graisses, appelées aussi cellules d'Ito, emmagasinent la vitamine A et se transforment en fibroblastes en réaction aux lésions hépatiques. Enfin, les cellules à granulation sont de gros lymphocytes granuleux qui agissent comme cellules tueuses naturelles.

Le foie est impliqué dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Il maintient la stabilité des taux de glucose dans le sang en captant et en entreposant le glucose sous forme de glycogène (glycogénèse), en dégradant le glycogène en glucose (glycogénolyse) ainsi qu'en formant du glucose à partir de substances non glucidiques telles que les acides aminés (glyconéogénèse). Il est responsable de la synthèse de l'albumine, de certains facteurs de coagulation et de la majeure partie du cholestérol. Le foie joue aussi un rôle important dans la détoxification des substances telles que l'alcool et d'autres drogues, qui arrivent de la circulation provenant du tube digestif par la veine porte hépatique, les empêchant ainsi de passer dans la circulation générale. Il convertit certains composés lipophiles en agents plus hydrophiles pour en faciliter l'excrétion dans l'urine ou dans la bile et en métabolise d'autres en agents moins actifs. Les sels biliaires, synthétisés en exclusivité par le foie à partir du cholestérol, sont responsables de la formation de la bile. Celle-ci fournit la principale voie d'excrétion des métabolites toxiques, du cholestérol et des déchets lipidiques. Elle est aussi nécessaire à la digestion et à l'absorption efficace des graisses alimentaires.

1.2 L'hépatite alcoolique :

Le mot *hépatite* désigne tout processus inflammatoire du foie. L'alcool demeure la cause la plus courante de l'hépatopathie chronique au Canada. L'éventail des maladies hépatiques s'étend de la stéatose relativement bénigne jusqu'à l'hépatite et la cirrhose alcooliques parfois mortelles.

La stéatose représente l'anomalie hépatique la plus courante chez l'alcoolique. Il s'agit d'une réaction à l'absorption d'alcool qui apparaît quelques jours après l'excès. Les perturbations métaboliques associées sont l'augmentation de la synthèse des triglycérides, la diminution de l'oxydation des lipides et le ralentissement de la sécrétion hépatique. Il en résulte une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes sous forme de vacuoles intracytoplasmiques. La stéatose est totalement réversible ou peut évoluer vers l'hépatite alcoolique.

Au stade hépatite, on observe une nécrose et un ballonnement des hépatocytes, résultat d'une augmentation de l'eau intracellulaire due à une augmentation des protéines cytosoliques. On observe aussi la présence d'inclusions intracytoplasmiques appelées corps de Mallory (CMs), qui correspondent à des agrégats dont les principaux composants sont les filaments intermédiaires du cytosquelette. Quand l'inflammation aigue s'apaise, une fibrose plus ou moins importante persiste, qui peut mener à la cirrhose.

La cirrhose est un processus pathologique irréversible caractérisé par de la fibrose et par la formation de nodules. Des signes d'hypertension portale apparaissent parfois, associés à une splénomégalie, de l'ascite et à la distension des veines de la paroi abdominale. Le foie devient hypertrophié et d'autres systèmes comme le système nerveux et le système rénal peuvent subir des lésions. Le pronostic de la cirrhose alcoolique dépend de la capacité du patient à s'abstenir d'alcool et son traitement vise à contrôler les complications dues à l'insuffisance hépatique et à l'hypertension portale (Diehl, 2002; Archambault A., 1994).

1.3 Modèles d'étude de l'hépatite alcoolique :

Plusieurs modèles animaux ont été élaborés pour étudier plus en détails et sous des conditions définies le développement de l'hépatite alcoolique. L'intoxication prolongée de souris avec le 3,5-diéthoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) (Yokoo et al., 1982; Tsunoo et al., 1987) ou la griséofulvine (GF) (Denk et al., 1975) induit des altérations hépatocellulaires similaires à celles associées à l'hépatite alcoolique, soit le ballonnement des hépatocytes, l'altération du réseau de kératines et l'accumulation de CMs. Le DDC et la GF sont les deux agents chimiques les plus couramment utilisés pour induire la formation de CMs chez la souris.

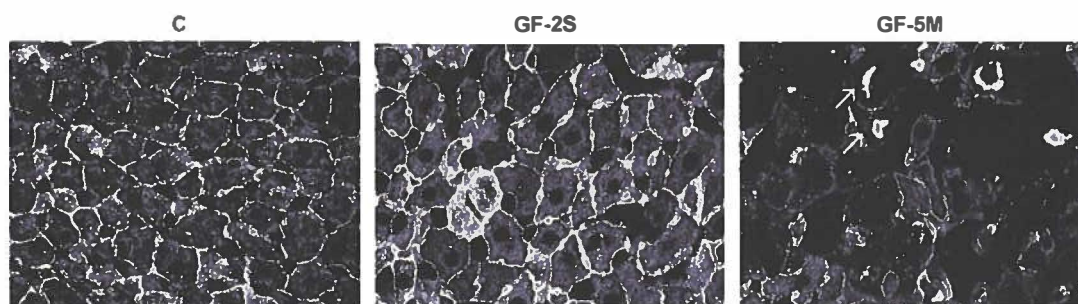


FIGURE 1.2 Modifications du réseau de kératines dans les hépatocytes de souris lors d'une intoxication prolongée avec la GF. C : foie de souris contrôle, GF-2S : foie de souris traitée à la GF durant deux semaines, GF-5M : foie de souris traitée durant cinq mois. Les flèches indiquent la présence de CMs (Fausther et al., 2004).

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse des maladies alcooliques du foie, des modèles cellulaires ont été mis au point. Les modèles cellulaires peuvent être divisés en trois groupes selon l'origine cellulaire : les cultures primaires d'hépatocytes (Cadrin et al., 1995; Nan et al., 2004), les lignées cellulaires d'hépatocytes tel que HepG2 et Huh7 (Zatloukal et al., 2002; Nakamichi et al., 2002; Hanada et al., 2005; Harada et al., 2003) et les lignées cellulaires qui n'expriment pas les K8/18 de façon endogène tel que COS-7 et CHO-K1 (Zatloukal et al., 2002; Hanada et al., 2005). Les cultures primaires d'hépatocytes sont les plus représentatives du modèle *in vivo*. Les lignées cellulaires ont l'avantage de se maintenir

en culture pour de longues périodes. Bien qu'elles ne possèdent pas toutes les caractéristiques de différenciation des hépatocytes, elles sont largement utilisées en toxicologie. Enfin, les lignées cellulaires qui doivent être transfectées par les K8, K18, K8/18 et autres protéines impliquées dans les différentes voies de signalisation permettent d'isoler le rôle de chacun des composants dans le processus de formation des CMs.

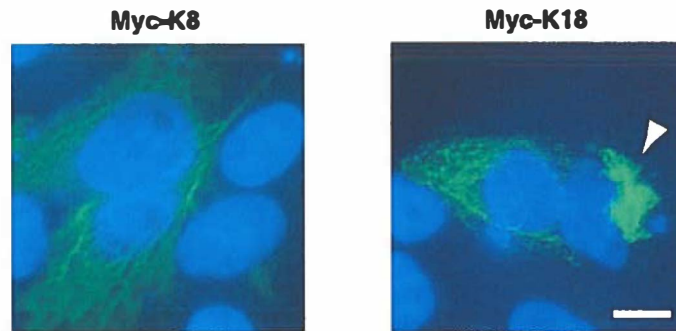


FIGURE 1.3 Modifications du réseau de kératines dans les cellules HepG2 traitées avec la GF. Myc-K8 : marquage des K8 en vert et noyaux cellulaires en bleu. Myc-K18 : marquage des K18 en vert et noyaux cellulaires en bleu. La flèche montre une cellule contenant un large agrégat de K18 adjacent au noyau (Nakamichi et al., 2002).

Des études ont démontré que l'utilisation d'agents chimiques comme la GF permet d'induire la formation de CMs dans des cellules HepG2 (Nakamichi et al., 2002). La formation d'agrégats contenant des kératines et de l'ubiquitine a aussi été observée dans ces cellules après deux jours d'incubation en présence d'éthanol (Bardag-Gorce et al., 2006). De nouveaux modèles d'études continuent à être élaborés, mais la culture primaire d'hépatocytes de souris et la lignée cellulaire HepG2 sont aujourd'hui les modèles *in vitro* les plus couramment utilisés.

CHAPITRE 2

LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

2.1 Le cytosquelette et les filaments intermédiaires :

Le cytosquelette consiste en un ensemble de plusieurs réseaux filamenteux qui s'étendent de la membrane plasmique à la membrane nucléaire, jusqu'à l'intérieur du noyau. Il permet l'ancrage de la cellule avec les cellules environnantes et la matrice extracellulaire, il maintient l'intégrité structurelle des cellules, joue un rôle dans la motilité, la réplication, l'apoptose, la différenciation et la signalisation cellulaire (Ku et al., 1999; Fuchs et Cleveland, 1998). Le cytosquelette est constitué de trois structures filamenteuses qui forment un réseau complexe à l'intérieur du cytosol: les microfilaments d'actine (MFs), les microtubules (MTs) et les filaments intermédiaires (FIs).

Les MFs sont des polymères d'actine dont l'assemblage nécessite la présence d'ATP. Les filaments d'actine sont polarisés et peuvent être organisés en un réseau plus ou moins bien ordonné suivant le type de cellule et la fonction qu'ils occupent. Ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de la structure cellulaire en facilitant les contacts avec les cellules avoisinantes et le milieu extracellulaire via différentes protéines transmembranaires tel que l'occludine, E-cadherine et les connexines (Ku et al., 1999). De plus, les MFs sont essentiels à la contraction et à la motilité de la cellule par leur association avec les myosines, une importante famille de protéines motrices.

Les MTs sont des protofilaments polarisés, formés par la polymérisation de tubuline alpha et bêta en présence de GTP. En raison de leur structure rigide, les MTs représentent un support mécanique considérable pour la cellule. De plus, ils sont impliqués dans la mitose, le maintien de l'organisation interne de la cellule, la motilité et le transport vésiculaire par leur association avec les kinésines et les dynéines, deux autres familles de protéines motrices (Ku et al., 1999).

Contrairement aux MFs et aux MTs, les FIs regroupent un grand nombre de protéines aux propriétés distinctes. Ces protéines sont classées en cinq types selon leur répartition dans les tissus de même que leurs caractéristiques biochimiques et génétiques.

Tableau 2.1
Les protéines de filaments intermédiaires¹

Type	Nom	Distribution	Localisation
I	Kératines acides	Épithéliums	Cytoplasmique
II	Kératines basiques	Épithéliums	Cytoplasmique
III	Vimentine Desmine Protéine acide fibrillaire gliale Périphérine Synemin	Cellules du mésenchyme Muscles Cellules gliales et astrocytes Neurones périphériques Muscles	Cytoplasmique
IV	Neurofilaments Nestine α -Internexine Syncoiline	Neurones Cellules souches neuroépithéliales, muscles Neurones Muscles	Cytoplasmique
V	Lamines	Tous les types de cellules	Nucléaire

¹ Adapté d'après (Ramaekers et Bosman, 2004).

Les protéines de FIs se distinguent aussi par leur insolubilité dans des conditions qui solubilisent aisément les MTs et les MFs (Zackroff et Goldman, 1979). De plus, elles possèdent des propriétés viscoélastiques qui les rendent plus résistantes à la déformation et à la rupture dues aux contraintes mécaniques (Janmey et al., 1991). Sur la base de ces propriétés biochimiques et physiques, le réseau de FIs est considéré comme un système qui maintient l'intégrité physique de la cellule.

Malgré ces propriétés qui les différencient, les protéines de FIs possèdent une structure semblable aux autres protéines du cytosquelette, permettant ainsi la formation

de filaments qui se ressemblent (Fig. 2.1). Le domaine central de la protéine, appelé aussi corps du filament, est constitué de quatre hélices alpha assemblés en spirale (Fuchs, 1994). Le corps du filament est formé de plusieurs segments (1A, 1B, 2A, 2B) séparés par de courtes régions intercalaires (L1, L12, L2) (Fuchs, 1994; Herrmann et Aebi, 1998). Certaines séquences très conservées au niveau de ce domaine central indiquent qu'il est impliqué dans l'assemblage du filament. La région L12 est une de ces régions très conservée. Il est intéressant de noter qu'une séquence d'acides aminés reconnue par les caspases au cours de l'apoptose se retrouve dans cette région intercalaire (Ku et al., 1999).

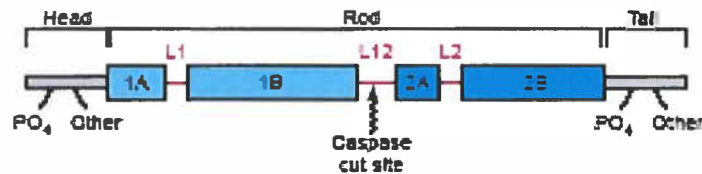


FIGURE 2.1 Représentation schématique de la structure des protéines de filaments intermédiaires (Toivola et al., 2005).

Les extrémités amino-terminale et carboxy-terminale, associées respectivement à la tête et à la queue de la protéine, sont constituées de domaines hétérogènes. Elles varient en longueur et en séquence selon le type de filament et elles sont sujettes à des modifications post-traductionnelles. Il semble donc que la tête et la queue du filament participent à la régulation de la fonction des FIs. Suivant le type de filament intermédiaire, ces monomères s'associent parallèlement en homodimères (vimentine, desmine) ou en hétérodimères (kératine). Par la suite, l'agrégation antiparallèle de deux dimères identiques forme un tétramère non polarisé. L'absence de polarité du FI le distingue des autres éléments du cytosquelette. Le tétramère constitue l'unité de base pour l'assemblage du filament intermédiaire. Alors que les MTs et les MFs se réorganisent lors de cycles d'hydrolyse ATP/GTP, l'organisation des FIs semble principalement régulée par des cycles de phosphorylation/déphosphorylation. D'autres modifications post-traductionnelles peuvent aussi affecter le réseau de FIs, tel que la

transglutamination, la glycosylation, la protéolyse médiée par les caspases, de même que leurs associations à d'autres protéines.

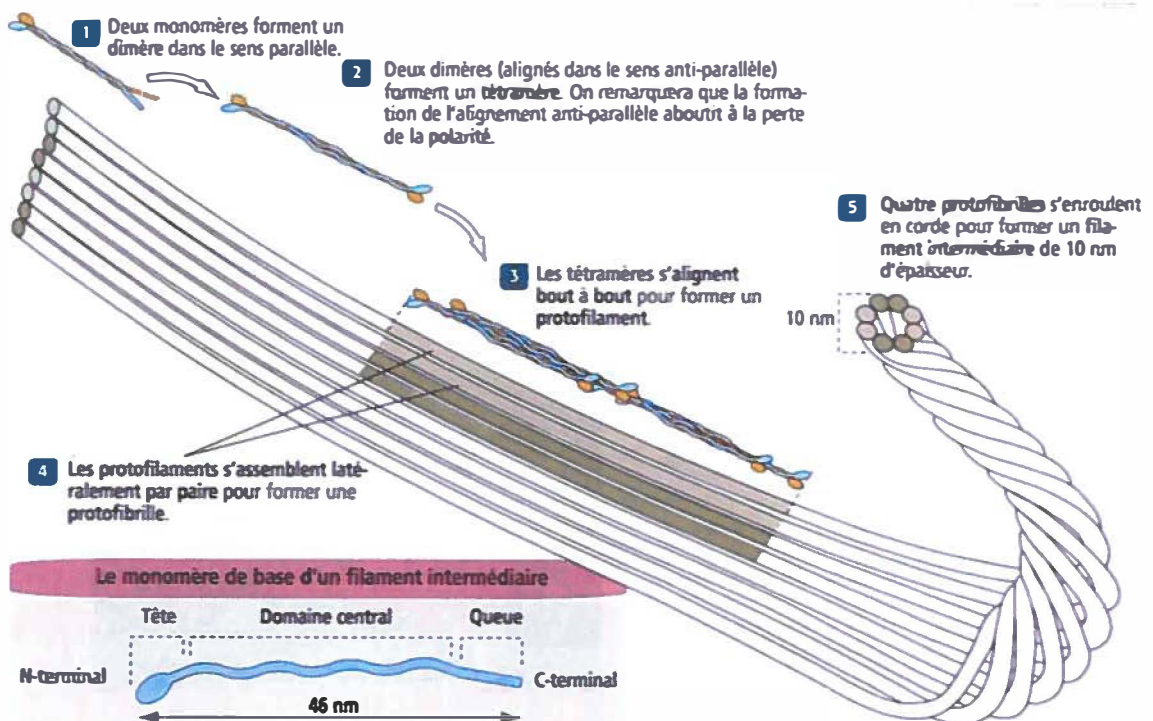


FIGURE 2.2 Modèle représentant l'assemblage et l'architecture du filament intermédiaire (Kierszenbaum, 2006).

La liste des protéines associées aux FIs ne cesse de croître et inclue des kinases, des phosphatases, des protéines adaptatrices, des protéines de jonctions cellulaires et d'autres protéines associées aux organelles. D'un point de vue fonctionnel, les FIs sont les moins bien connus des trois familles de protéines du cytosquelette. En raison de leur diversité et leur distribution spécifique dans plusieurs tissus, on leur a longtemps attribué un rôle dans le maintien de la différenciation des cellules. Des études récentes les associant à un grand nombre de pathologies, incluant diverses maladies de la peau, des cardiomyopathies, des scléroses amyotrophiques latérales et différentes maladies du foie, ont permis de mettre en évidence leur rôle dans le maintien de l'intégrité des tissus soumis à un stress mécanique chronique.

2.2 Les kératines dans les hépatocytes :

Il existe plus de vingt kératines différentes divisées en deux groupes : les kératines acides de type I (K9-K23) et les kératines neutres et basiques de type II (K1-K8). Les cellules épithéliales expriment au moins une kératine de type I et une kératine de type II qui s'associent de façon non-covalente pour former un hétérodimère. Le ratio entre les kératines I et II dans une cellule est de 1 :1. Un épithélium exprime une combinaison caractéristique de kératines qui dépend du type de tissu (Kirfel et al., 2003). Par exemple, les hépatocytes adultes expriment exclusivement les K8/K18, alors que les cellules épithéliales du tube digestif expriment aussi les K4, K6, K7, K13, K19 et K20.

Tableau 2.2

Les kératines et leur distribution dans les différents tissus¹

Épithéliums	Kératines
Épithéliums de l'appareil digestif	
Hépatocytes	K8/K18
Canal biliaire	K8/K19, K7/K18*
Canal pancréatique	K8/K19, K7/K18*
Pancréas acinaire	K8/K18, K19**
Petit intestin	K8/K20, K19, K18
Colon	K8/K18, K19, K20
Œsophage	K4/K13, K6*
Estomac	K8/K18, K19, K20, K7*
Vésicule biliaire	K8/K18, K7/K19*
Autre épithéliums	
Épiderme basal	K5/K14
Épiderme suprabasal	K1/K10
Cornée	K3/K12

¹ Adapté d'après (Ku et al., 1999). * Kératines faiblement retrouvées dans l'épithélium. ** K19 est retrouvée dans le compartiment apical des cellules acinaires mais pas dans le cytoplasme.

Les filaments de kératines forment un réseau complexe qui s'étend de la périphérie du noyau jusqu'à la membrane plasmique où ils s'associent à des structures d'ancrage cellulaire, les desmosomes et les hémidesmosomes (Stappenbeck et Green, 1992; Kouklis et al., 1994). En plus de leurs propriétés viscoélastiques et de leur insolubilité,

l'association des kératines avec les jonctions d'ancrage apporte aux tissus épithéliaux la cohésion nécessaire pour résister aux diverses contraintes mécaniques.

Une des premières fonctions associées aux kératines est le maintien de l'intégrité cellulaire suite à un stress mécanique. Le phénotype le plus évident de cet effet protecteur est observé dans le cas de l'épidermolyse bulleuse simple (EBS), où des mutations au niveau des K5/K14 entraînent une importante fragilité et la cytolysse des kératinocytes (Fuchs et Cleveland, 1998). En effet, différentes études réalisées sur des souris exprimant des mutations au niveau des K5/K14 ont montré qu'il existe une corrélation entre la sévérité des lésions sur la peau et l'impact de la mutation sur la formation d'hétérodimères de K5/K14. Dans les cas sévères de la maladie, on a observé une accumulation d'agrégats de kératines dans le cytoplasme et l'absence d'un réseau de kératines normal (Vassar et al., 1991). Des études subséquentes ont montré que des mutations au niveau des gènes codant pour les différentes kératines entraînaient une fragilité semblable dans différents tissus (Magin, 1998). Des souris surexprimant le transgène muté K18 Arg89→Cys, mutation présente sur le gène de la K14 au cours de plusieurs maladies humaines de la peau (Fuchs et Cleveland, 1998), présentent des filaments de kératine fragmentés et des hépatocytes très fragiles. Les altérations sont associées au développement d'hépatites chroniques (Ku et al., 1995).

Les expérimentations sur des souris déficientes en K8 ont aussi apporté des données intéressantes sur le fonctionnement des kératines. Les souris knock-out homozygotes pour le gène de la K8 (K8^{-/-}) présentent un phénotype différent selon leur patrimoine génétique. Chez les souris K8^{-/-} de la lignée C57BL/6, les embryons subissent un retard de croissance et 94% d'entre eux meurent entre 11 et 13 jours de gestation, suite à une importante hémorragie du foie (Baribault et al., 1993). Chez les souris K8^{-/-} de la lignée FVB/N, environ 50% des embryons vont survivre en présentant toutefois une prédisposition significative aux maladies du foie (Baribault et al., 1994). Ces observations indiquent que le patrimoine génétique exerce une influence sur le fonctionnement des kératines dans les cellules. Les souris knock-out homozygotes pour le gène de la K18 (K18^{-/-}) sont pour leur part viables, bien qu'elles manifestent une plus

grande susceptibilité aux maladies du foie, tel que le diabète insulino-dépendant et l'hépatite chronique. Les pathologies qu'elles développent sont moins importantes en comparaison aux souris déficientes en K8, ce qui suggère que les kératines de type I et II ont des fonctions différentes mais complémentaires au sein de la cellule (Magin et al., 1998). De plus, les hépatocytes de souris K18 $-/-$ plus âgées contiennent des agrégats de K8 qui s'apparente aux CMs (Magin et al., 1998).

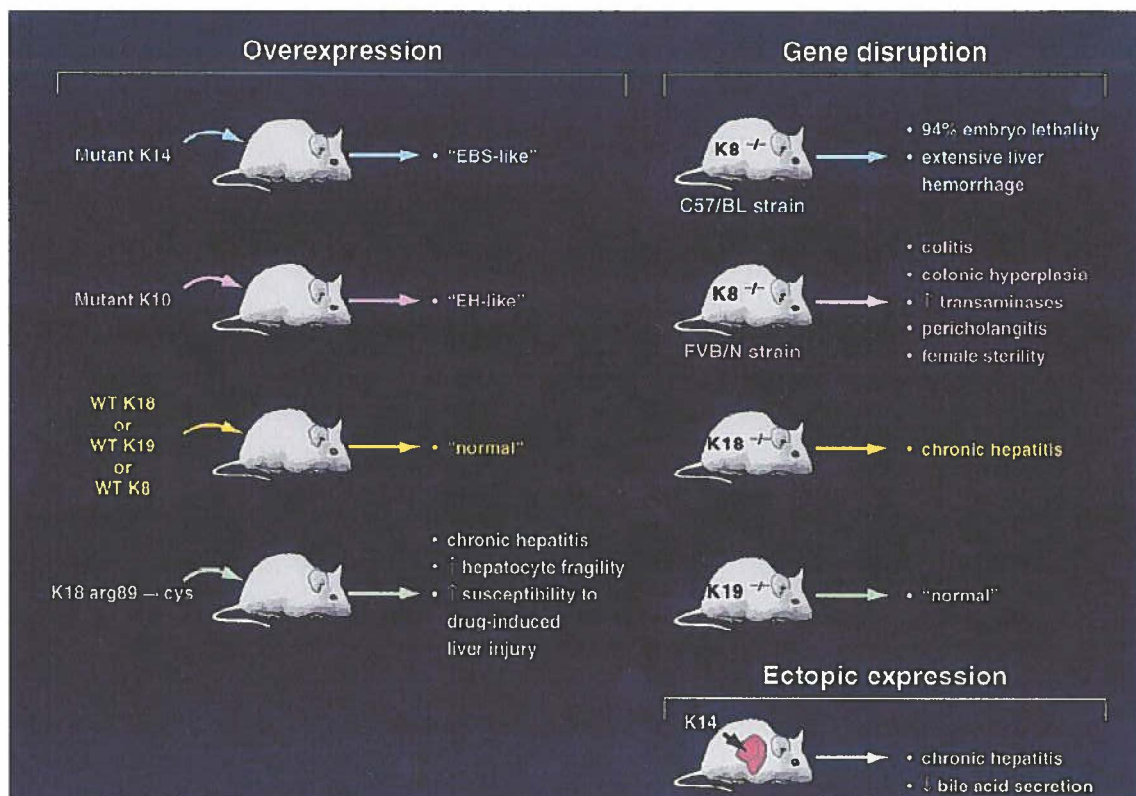


FIGURE 2.3 Schéma récapitulatif des modèles expérimentaux de souris pour l'étude des kératines 8 et 18. Les souris avec un phénotype «normal» sont celles dont l'histologie de l'organe est apparue normale. EBS : épidermolyse bulleuse simple, EH : hyperkératose épidermolytique, WT : type sauvage (Omary et Ku, 1997).

Les kératines protègent la cellule non seulement contre des stress mécaniques, mais aussi contre des stress toxiques. La première évidence de ce rôle protecteur se manifeste par une importante résistance à différents agents toxiques suite à l'expression ectopique des gènes de K8/18 dans des fibroblastes de souris (Bauman et al., 1994). D'autres chercheurs ont démontré que des souris surexprimant la mutation K18

Arg89→Cys sont plus susceptibles au développement de maladies du foie induites par des drogues hépatotoxiques tel que la GF et l'acétaminophène que les souris exprimant le type sauvage de la K18 humaine (Ku et al., 1996). Les souris K8^{-/-} ont aussi montré une plus grande sensibilité au stress toxique induit par le DDC (Zatloukal et al., 2000) de même qu'aux agents anesthésiques lors d'une hépatectomie partielle (Loranger et al., 1997).

Bien que les mécanismes moléculaires associés à la réponse de la cellule face au stress toxique ne soient pas encore bien définis, il apparaît que la protection induite par les K8/18 soit associée à leur phosphorylation sur certains sites spécifiques. L'importance de la phosphorylation des kératines dans différents processus cellulaires a été démontrée par différentes études sur des souris mutantes au niveau des résidus connus pour être phosphorylés en situation physiologique ou sous l'effet d'un stress (Omary et al., 2006). En effet, la phosphorylation est une modification post-traductionnelle qui régule l'organisation et la fonction de plusieurs protéines intracellulaires, par l'ajout enzymatique d'un groupement phosphate au niveau de la chaîne latérale d'un acide aminé. La corrélation entre l'augmentation de la phosphorylation des kératines et la réorganisation des filaments observées dans les cellules en mitose a suggéré que l'organisation des FIs soit régulée en grande partie par la phosphorylation (Izawa et Inagaki, 2006). Ce sont préférentiellement les résidus sérines des extrémités carboxy- et amino-terminales qui sont phosphorylés au niveau des K8/18, plus particulièrement les sérines 23 (Ser23), Ser73 et Ser431 de la K8 et les Ser33 et Ser52 de la K18 (Ku et Omary, 1994; Liao et al., 1997; Ku et Omary, 1997a; Ku et al., 1998; Liao et al., 1995a). La phosphorylation au niveau de ces sites augmente généralement lors de la mitose ou en situation de stress. Outre la réorganisation du réseau de FIs (Ku et Omary, 1994), la phosphorylation affecte aussi la solubilité des filaments de kératines *in vitro* (Liao et al., 1995b) et *in vivo* (Liao et Omary, 1996). Les kératines sont des polymères essentiellement insolubles. Toutefois, la solubilité des kératines peut varier au cours du cycle cellulaire, ainsi le pourcentage de kératines qui sont solubles en phase G0/G1 est augmenté au cours de la mitose, de l'apoptose ou d'un stress cellulaire (Chou et al., 1993; Omary et al., 1998). La Ser23 de la K8 est un site

hautement conservé chez toutes les kératines de type II et phosphorylé en situation physiologique. La phosphorylation de la Ser73 de la K8 est observée dans les cellules en mitose, en apoptose ou en situation de stress (Liao et al., 1997). Plusieurs études ont rapporté l'implication de certaines kinases dans la phosphorylation de ce site, soient JNK (He et al., 2002), p38 (Ku et al., 2002) et PKC (Ridge et al., 2005). Récemment, il a été démontré chez la souris que la mutation de ce site (Ser73→Ala) augmente la susceptibilité des hépatocytes à l'apoptose induite par Fas (Ku et Omary, 2006).

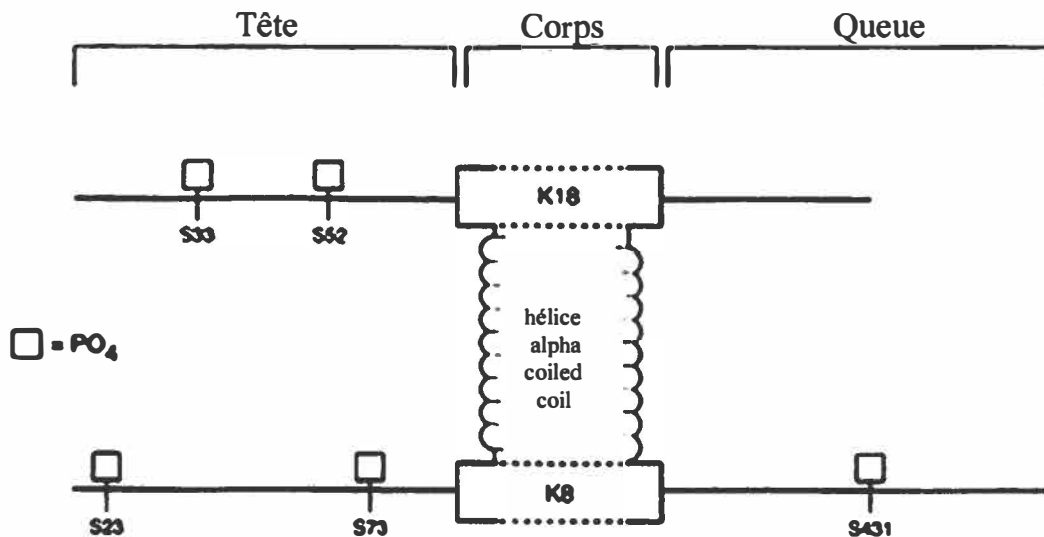


FIGURE 2.4 Sites de phosphorylation connus au niveau des kératines humaines 8 et 18 (Omary et al., 1998).

La Ser431 de la K8 devient hyperphosphorylée par les MAP kinases (mitogen-activated protein) lors d'une stimulation cellulaire par l'EGF (epidermal growth factor) et par les kinases cdc2 lors d'un arrêt mitotique (Ku et Omary, 1997a). La Ser33 de la K18 est faiblement phosphorylée de façon constitutive dans la cellule. La phosphorylation de ce site permet la liaison de la K18 avec les protéines de la famille 14-3-3, qui augmentent la solubilité des kératines au cours de la mitose et en réponse à d'autres stimuli (Ku et al., 2002b; Ku et al., 1998; Liao et Omary, 1996). La transfection d'une K18 mutée au niveau de ce site dans différentes lignées cellulaires inhibe complètement la liaison de la K18 avec les protéines 14-3-3 (Ku et al., 1998). La Ser52 de la K18 est phosphorylée à un niveau basal qui augmente lors de la mitose, de

l'apoptose ou lors d'un stress, situations au cours desquelles on observe une réorganisation du réseau de kératines (Liao et al., 1995a; Ku et al., 1997). Lorsque ce site est muté, par exemple chez une souris transgénique surexprimant la mutation K18 Ser52→Ala, la réorganisation du réseau est moins importante en réponse à un stress induit par des drogues hépatotoxiques (GF et microcystine) et la souris est davantage prédisposée aux lésions du foie que la souris transgénique surexprimant une K18 humaine de type sauvage (Ku et al., 1998b).

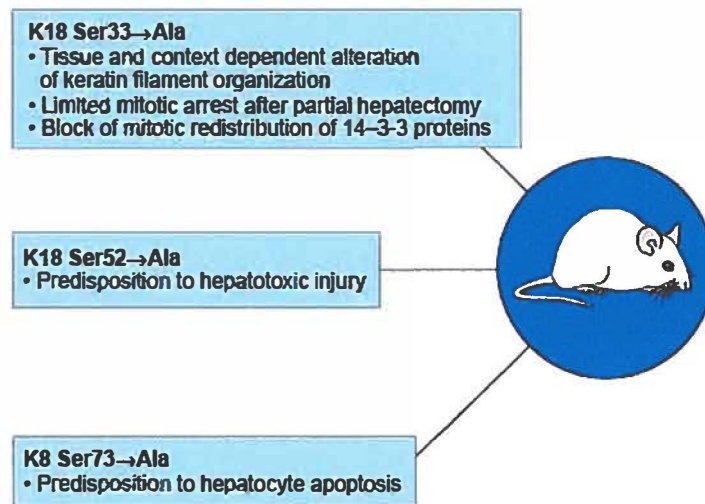


FIGURE 2.5 Schéma récapitulatif des modèles expérimentaux de souris pour l'étude de la phosphorylation des kératines 8 et 18. Sommaire des modèles de souris transgéniques dont les K8/18 ont été mutées au niveau des sites de phosphorylation et conséquences physiologiques de ces altérations. Les références pour les souris transgéniques sont : K18 Ser33→Ala (Ku et al., 2002b), K18 Ser52→Ala (Ku et al., 1998b) et K8 Ser73→Ala (Ku et Omary, 2006). Adapté de (Omary et al., 2006).

L'organisation et la fonction des filaments de kératine peuvent aussi être modulées par le déséquilibre du ratio 1:1 dans l'expression des kératines de type I et de type II qui est observé dans certaines pathologies (Zatloukal et al., 2004). Par exemple, des chercheurs ont révélé *in vivo* et *in vitro* que l'absence de K8 ou de K18 augmente la sensibilité à l'apoptose induite par le TNF (tumor necrosis factor). Les K8/18 peuvent se lier au domaine cytoplasmique du TNFR2 (tumor necrosis factor receptor 2) et modérer ainsi l'activation subséquente de la kinase JNK et du facteur de transcription NF-κB

(Caulin et al., 2000). En absence des K8/18, la cellule est moins résistante à l'apoptose induite par le TNF. De la même façon, il a été démontré que la K18 peut séquestrer l'adaptateur TRADD (TNFR associated death domain protein), empêchant ainsi la cascade de signalisation du TNF de s'enclencher (Inada et al., 2001). D'autres chercheurs ont démontré que les K8/18 conféraient une résistance à l'apoptose induite par le récepteur Fas en modulant sa disponibilité à la surface de la cellule (Gilbert et al., 2001). L'association des kératines avec d'autres protéines impliquées dans la signalisation de l'apoptose a aussi été rapportée, incluant le DEDD (death effector domain containing DNA binding protein) (Lee et al., 2002; Schutte et al., 2006) et la protéine c-FLIP (Gilbert et al., 2004). Enfin, il a aussi été démontré que la K18 est un substrat de la caspase 3 (Ku et al., 1997; Caulin et al., 1997). Mis ensemble ces résultats suggèrent que les K8/18 jouent un rôle dans la modulation des réponses cellulaires à certains signaux apoptotiques en influençant le trafic intracellulaire de différentes protéines (Coulombe et Omary, 2002; Toivola et al., 2005).

2.3 Corps de Mallory

Depuis leur première description par F.B. Mallory en 1911, les CMs ont suscité beaucoup d'interrogations. Les mécanismes impliqués dans leur formation ainsi que les conséquences de leur apparition ne sont pas encore bien définis. La présence des CMs est associée à diverses pathologies humaines de diverses origines tel que la cirrhose infantile indienne, l'hépatite alcoolique, la cirrhose alcoolique, la maladie de Wilson, la cirrhose biliaire primaire, la cirrhose non-alcoolique, le carcinome hépatocellulaire et l'obésité morbide (Jensen et Gluud, 1994). Les CMs peuvent être observés dans des hépatocytes humains suite à une consommation abusive et prolongée d'alcool. Chez la souris, une intoxication chronique à certaines drogues telle que la GF et le DDC induit aussi la formation de CMs qui sont identiques morphologiquement et biochimiquement à ceux observés chez l'humain (Denk et al., 1975; Tsunoo et al., 1987).

Les CMs sont des inclusions cytoplasmiques de taille variable, insolubles et résistantes aux protéases. Ils sont constitués principalement de kératines

hyperphosphorylées et ubiquitinées, de protéines de choc thermique (heat shock protein ou Hsp) et de protéines de stress p62 impliquées dans la dégradation de protéines.

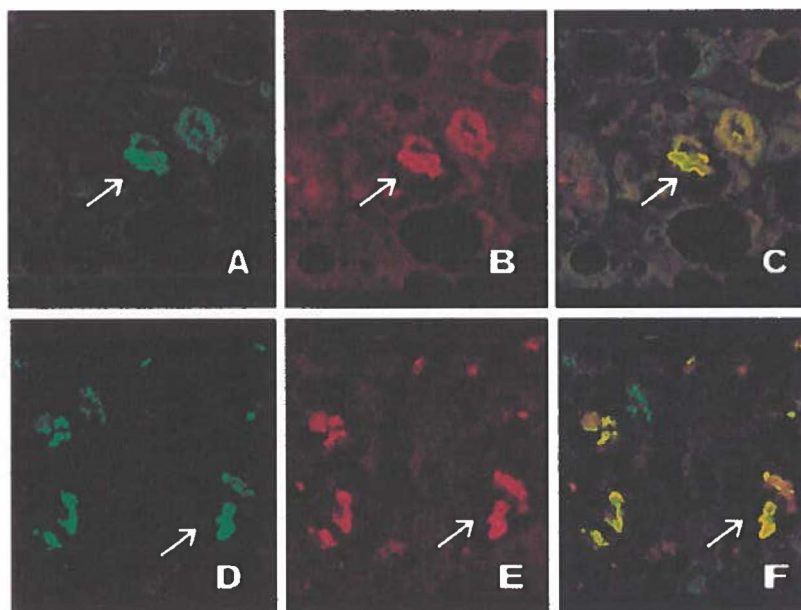


FIGURE 2.6 Corps de Mallory à l'intérieur d'hépatocytes humain (A-C) et d'hépatocytes de souris (D-F). A et D; Hsp70. B et E; ubiquitine. C et F; superposition (Riley et al., 2003).

La formation des CMs est associée tout d'abord à une augmentation de la synthèse des kératines, particulièrement de la K8. En effet, il semblerait que le déséquilibre du ratio 1:1 dans l'expression des kératines de type I et de type II soit crucial dans la formation des CMs. Il a été observé que les souris ayant une délétion du gène de la K8 ne développent pas de CMs dans les hépatocytes (Zatloukal et al., 2000; Magin et al., 1998). On pourrait expliquer cette absence par le fait que le réseau de FIs est inexistant à l'intérieur de la cellule. Toutefois, les hépatocytes de souris K18^{-/-} peuvent contenir des CMs (Magin et al., 1998). Ces observations suggèrent que la K8 est une composante essentielle à la formation des CMs et que la présence d'un réseau de FIs n'est pas nécessaire pour la formation des CMs. En absence de K8, les K18 ne forment pas de structures particulières, alors que les K8 ont tendance à former des agrégats en absence de leur partenaire. Par contre, il n'y a pas formation de CMs dans les hépatocytes de souris K8^{+/-} (Zatloukal et al., 2000). Cette observation s'explique par la réponse de la

cellule qui consiste à enclencher une production relativement excessive de K18. Cet excès diminue la proportion de K8 par rapport aux K18 et donc la capacité à former des CMs. Les K8 semblent donc être essentielles à la formation des CMs. En plus d'être surexprimées, les kératines retrouvées à l'intérieur des CMs sont hyperphosphorylées (Cadrin et al., 1995). Le rôle de la phosphorylation des kératines dans l'induction des CMs a été démontré par l'effet des inhibiteurs de phosphatases, tel que l'acide okadaïque (Yuan et al., 1998b) et la tautomycine (Yuan et al., 1998a), qui amplifient l'apparition des CMs dans les hépatocytes de souris traitées avec le DDC.

Tableau 2.3

Principaux constituants des Corps de Mallory¹

Classes de protéines	Nom de la protéine	Références
Kératines	K8, K18 K9, K17, et K20	(Franke et al., 1979) (Cadrin et al., 1990; Pei et al., 2004)
	Kératines hyperphosphorylées	(Cadrin et al., 1995; Fausther et al., 2004; Stumptner et al., 2000; Toivola et al., 2004)
	Kératines ubiquitinées	(Ohta et al., 1988)
Chaperons	Hsp70	(Zatloukal et al., 2002; Fausther et al., 2004; Riley et al., 2003)
	Hsp25, Hsp90	(Riley et al., 2003)
Épitopes phosphorylés et kinases	MPM-2	(Denk et al., 2000; Stumptner et al., 1999)
	SMI-31	(Denk et al., 2000)
Protéines du système de dégradation cellulaire	Ubiquitine p62	(Cadrin et al., 1992) (Zatloukal et al., 2002; Stumptner et al., 1999; Nan et al., 2004)
	sous unités du protéasome	(Bardag-Gorce et al., 2002)
Autres	Transglutaminase 2 (TG2)	(Bardag-Gorce et al., 2002)
	Tubuline	(Bardag-Gorce et al., 2004)

¹Adapté d'après (Zatloukal et al., 2007)

Outre les kératines, les CMs sont constitués entre autre d'ubiquitine et de protéines de choc thermique (Ohta et al., 1988; Cadrin et al., 1992; Riley et al., 2003; Fausther et al., 2004). Ces protéines font partie des molécules chaperons qui s'associent à d'autres molécules et en protègent la destinée. L'ubiquitine se lie aux protéines qui doivent être dirigées vers des compartiments cellulaires spécifiques ou qui sont destinées à la dégradation via les protéasomes. Le rôle des Hsp est d'empêcher l'accumulation de protéines altérées en assurant le repliement adéquat des polypeptides ou en les dirigeant vers le protéasome qui les détruit. En situation de stress, l'expression de l'ubiquitine et des Hsp est augmentée en réponse au taux élevé de protéines dénaturées dans la cellule (Ciechanover, 1994). Le processus de dégradation par les protéasomes devient alors saturé, ce qui entraîne l'accumulation de ces protéines altérées (Harada et al., 2003). La présence d'ubiquitine et de Hsp70 dans les CMs suggère une altération de l'activité du protéasome dans les hépatocytes suite à l'imposition d'un stress toxique.

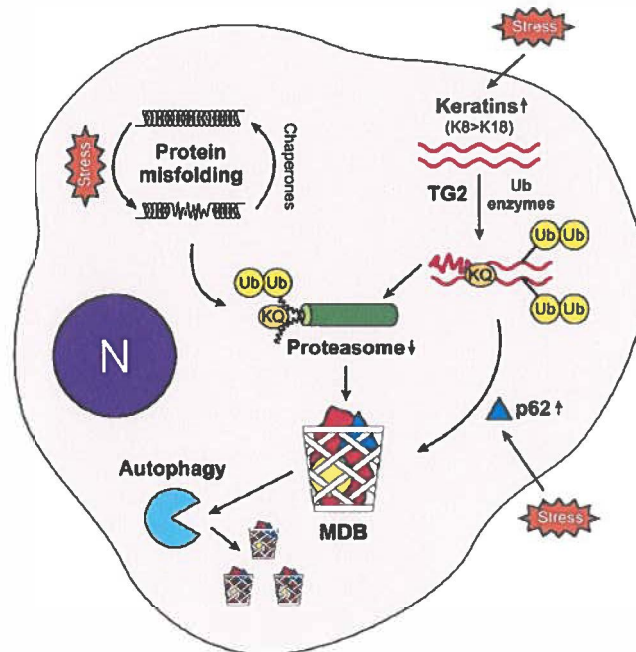


FIGURE 2.7 Schéma des différents composants et processus cellulaires impliqués dans la formation des Corps de Mallory. TG2 : transglutaminase 2, Ub : ubiquitine, MDB : Mallory-Denk body, N : noyau (Zatloukal et al., 2007).

La protéine p62 est aussi présente dans les CMs, puisqu'elle se lie aux protéines altérées préalablement ubiquitinées. Son rôle dans ces agrégats reste à déterminer. Toutefois, une conséquence importante de son accumulation dans les CMs est que ses autres fonctions cellulaires sont influencées par sa redistribution intracellulaire. En effet, p62 n'agit pas seulement comme une protéine de liaison à l'ubiquitine. Elle est aussi impliquée dans différentes voies de signalisation dont celle de NF- κ B. Son rôle dans l'activation de ce facteur de transcription peut devenir particulièrement important dans un contexte de stress oxydatif, en entraînant une hyperstimulation de la voie de NF- κ B (Zatloukal et al., 2002; Nan et al., 2004; Stumptner et al., 1999).

D'autres molécules phosphorylées ont aussi été identifiées à l'intérieur des CMs, soient les antigènes Mm120-1, SMI 31 et MPM-2. L'épitope Mm120-1 est une protéine non caractérisée qui se retrouve exclusivement dans les CMs, alors que les molécules SMI 31 et MPM-2 sont aussi associées aux protéines tau hyperphosphorylées observées dans la dégénérescence neurofibrillaire, qui est une caractéristique neuropathologique de la maladie d'Alzheimer (Denk et al., 2000; Stumptner et al., 1999).

Le rôle précis de chacun des composants des CMs n'est pas encore bien défini. Toutefois, la nature de ceux-ci permet de suggérer que les CMs sont davantage la conséquence du mécanisme de défense de la cellule soumise à un stress que la cause des dysfonctions cellulaires.

CHAPITRE 3

LES KÉRATINES DANS LA SIGNALISATION CELLULAIRE

3.1 Voie de signalisation de Fas/FasL

L'apoptose est un processus important dans l'évolution normale de la cellule. Elle correspond à la principale forme de mort cellulaire et est caractérisée par des changements morphologiques et biochimiques distincts : condensation et fragmentation de la chromatine, condensation des organelles cytoplasmiques, dilatation du réticulum endoplasmique, diminution du volume cellulaire et altération de la membrane plasmique. Ces caractéristiques permettent que la cellule soit phagocytée, en réduisant de beaucoup le déclenchement d'une réponse inflammatoire. L'apoptose peut être initiée suite à une activation intracellulaire, impliquant la mitochondrie, ou extracellulaire par l'activation des récepteurs membranaires de «mort» ou «death receptor» (DR). Les signaux vont être intégrés par la cellule et de nombreuses voies de signalisation vont être ainsi activées aboutissant à l'activation des caspases. Les caspases sont des cystéines-protéases intracellulaires, qui fonctionnent comme des initiateurs et des effecteurs de l'apoptose (Cryns et Yuan, 1998). Au niveau du foie, les DR incluent le récepteur Fas (FasR), le TNFR (tumor necrosis factor receptor), le récepteur du TGF- β (transforming growth factor- β) et le récepteur du TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Le FasR, qui fait l'objet de la présente étude, est considéré comme un récepteur important dans le contrôle de l'apoptose des hépatocytes (Pinkoski et al., 2000).

FasR (CD95/APO-1) est une protéine transmembranaire de 48 kD appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF. FasR possède un domaine cytoplasmique appelé «domaine de mort» ou «death domain» (Stappenbeck et Green, 1992), commun au TNFR, qui est responsable de la transduction du signal (figure 3.1). La liaison du récepteur Fas avec son ligand (FasL) induit le processus d'apoptose. Le FasR se

trimérise et entraîne une modification de conformation du domaine DD. Ce changement de conformation permet la fixation de la protéine TRADD sur le TNFR et l'association de la protéine FADD (FAS associated death domain protein) avec le FasR. Une fois fixée au récepteur, TRADD ou FADD s'associe à la procaspase 8 et l'active. La caspase 8 activée déclenche une cascade d'activation d'autres caspases dont la caspase 3 qui clivent alors certaines protéines cellulaires essentielles à la survie.

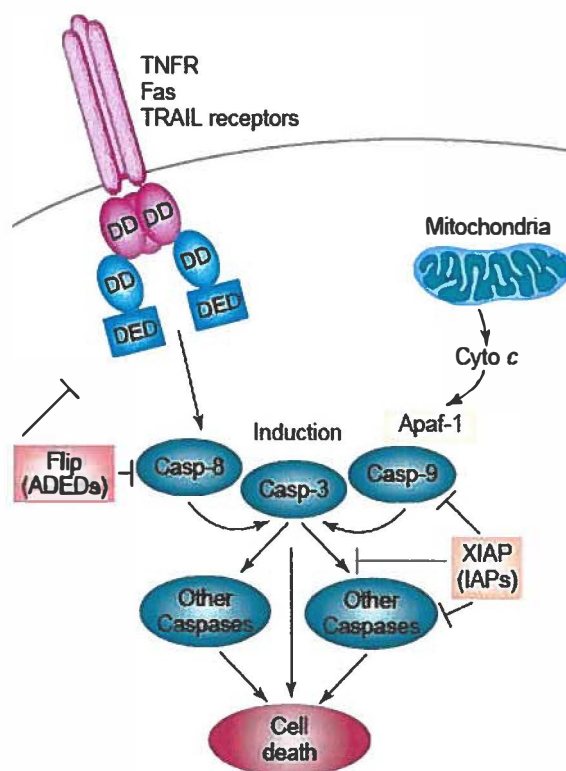


Figure 3.1 Induction de l'apoptose. Représentation schématique des voies extrinsèque (à gauche) et intrinsèque (à droite) d'induction de l'apoptose. DD : protéine associée au domaine de mort tel que FADD ou TRADD, DED : protéine effectrice associée au domaine de mort tel que la procaspase 8, AED : protéine DED anti-apoptotique tel que c-FLIP, Cyto c : cytochrome c, IAP : protéines inhibitrices de l'apoptose (Reed, 2001).

Le FasR est exprimé de façon constitutive principalement dans les tissus lymphoïdes, mais se retrouve aussi au niveau d'autres types cellulaires, dont les hépatocytes (Galle et al., 1995). Certaines pathologies du foie sont associées à une surexpression du récepteur Fas dans les hépatocytes (Hiramatsu et al., 1994). C'est l'appareil de Golgi qui est responsable de la libération des récepteurs Fas nouvellement

synthétisés. Ils sont par la suite dirigés vers la membrane plasmique via les microtubules (figure 3.2). L'intensité de l'activation des récepteurs Fas peut aussi être influencée par la densité de récepteurs au niveau de la membrane cellulaire. Ainsi, une surexpression de récepteurs à la surface de la cellule peut favoriser le processus d'apoptose.

Le FasL est aussi une protéine transmembranaire qui peut cependant être détachée de la membrane par les métalloprotéinases et apparaître sous une forme soluble. Alors que plusieurs types de cellules peuvent exprimer le FasR, l'expression du FasL est limitée aux tissus lymphoïdes, c'est-à-dire les lymphocytes T matures, les cellules NK (natural killer) et les macrophages (Dockrell et al., 1998; Oshimi et al., 1996; Suda et al., 1995). Toutefois, le FasL peut aussi être exprimé par les hépatocytes dans des conditions pathologiques (Galle et al., 1995), ce qui suggère que les hépatocytes qui produisent le FasL pourraient induire l'apoptose de façon paracrine. Suite à la liaison du récepteur Fas avec son ligand, il y a trimérisation du récepteur et formation du complexe DISC (death inducing signaling complex), constitué de la protéine adaptatrice FADD et de la procaspase 8, aussi appelée FLICE (FADD-like ICE). Cette association permet le clivage et l'activation de la caspase 8, qui à son tour peut activer directement la caspase 3 ou agir sur la molécule Bid afin de relarguer le cytochrome *c* de la mitochondrie. L'association Apaf-1/cytochrome *c* active la caspase 9 qui va ensuite activer la caspase 3.

L'implication des microtubules dans la translocation des récepteurs Fas issus de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique est bien connue (Feng et Kaplowitz, 2000). Toutefois, il semble que les FIs pourraient aussi jouer un rôle dans la régulation de l'apoptose induite par Fas. En effet, une étude a démontré que l'apoptose induite par Fas est plus importante dans les hépatocytes de souris déficientes en K8 que dans les hépatocytes de souris de type sauvage. Cette résistance à l'apoptose induite par les K8/18 est associée d'une part à une augmentation de la densité des récepteurs Fas à la membrane plasmique (Gilbert et al., 2001) et d'autre part à la régulation d'une protéine inhibitrice du complexe d'activation de FLICE, appelée c-FLIP (Gilbert et al., 2004). En

effet, il a été démontré que l'absence du réseau de kératines facilite la translocation des récepteurs Fas à la membrane plasmique. Cette hypothèse appuie les distributions anormales des marqueurs de surface cellulaire observées dans les hépatocytes de souris déficientes en K8 (Ameen et al., 2001). De plus, l'absence des K8 est associée à une diminution de l'expression de la protéine c-FLIP et de l'activation de ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 et 2), ce qui favorise le processus apoptotique initié par le FasR (Gilbert et al., 2004).

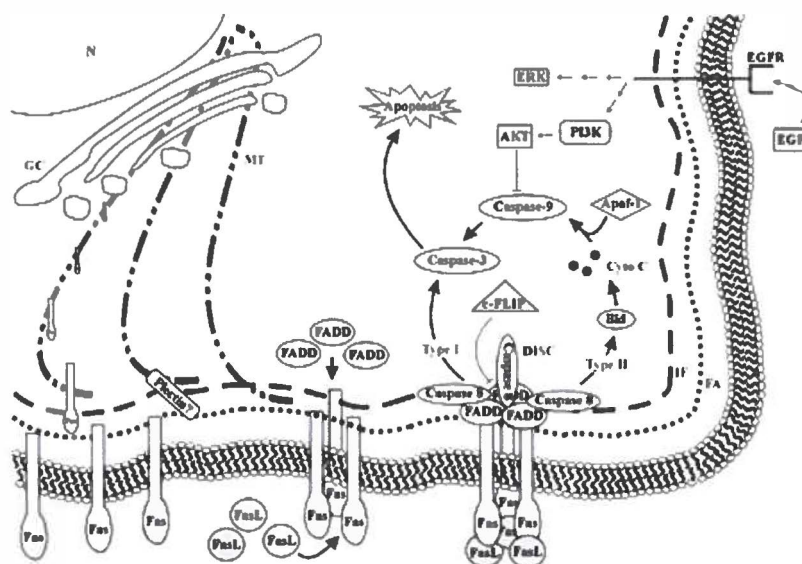


FIGURE 3.2 Représentation schématique des différents composants de la voie de signalisation de Fas/FasL en relation avec le cytosquelette et la membrane plasmique. FA : microfilaments d'actine, MT : microtubules, IF : filaments intermédiaires, GC : appareil de Golgi, N : noyau (Gilbert et al., 2001).

3.2 Voie de signalisation de PI3K/Akt

PKB/Akt est une sérine/thréonine kinase de 57 kD constituée d'un domaine central exerçant une fonction kinase spécifique aux résidus sérine ou thréonine. L'extrémité amino-terminale contient un domaine d'homologie avec la pleckstrine (PH) qui permet à la protéine d'interagir avec des lipides et avec d'autres protéines. L'extrémité carboxy-terminale est constituée d'un domaine hydrophobe riche en proline (Datta et al., 1999). Il est connu que l'activation de la protéine Akt nécessite son attachement à la membrane

plasmique par l'intervention de la PI3-kinase (Tang et al., 2001). Cette relocalisation est une étape importante dans le processus d'activation. La PI3-kinase, activée par des facteurs de croissance ou de survie, phosphoryle les phosphoinositides de la membrane plasmique (Datta et al., 1999). Les produits générés par la kinase, soient $PI3,4-P_2$ et inositol 1,4,5-trisphosphate, participent entre autre à la régulation de l'activité de Akt. La liaison de ces phosphoinositides au domaine PH de la protéine Akt entraîne sa translocation du cytoplasme à la surface interne de la membrane plasmique (Datta et al., 1999). Après un changement de conformation, Akt est phosphorylée au niveau du résidu thréonine 308 par la kinase dépendante des phosphoinositides (PDK I) et au niveau de la sérine 473 par une autre PDK ou par un mécanisme d'autophosphorylation (Alessi et al., 1997; Toker et Newton, 2000). La phosphorylation de Akt induit l'activation de sa fonction kinase.

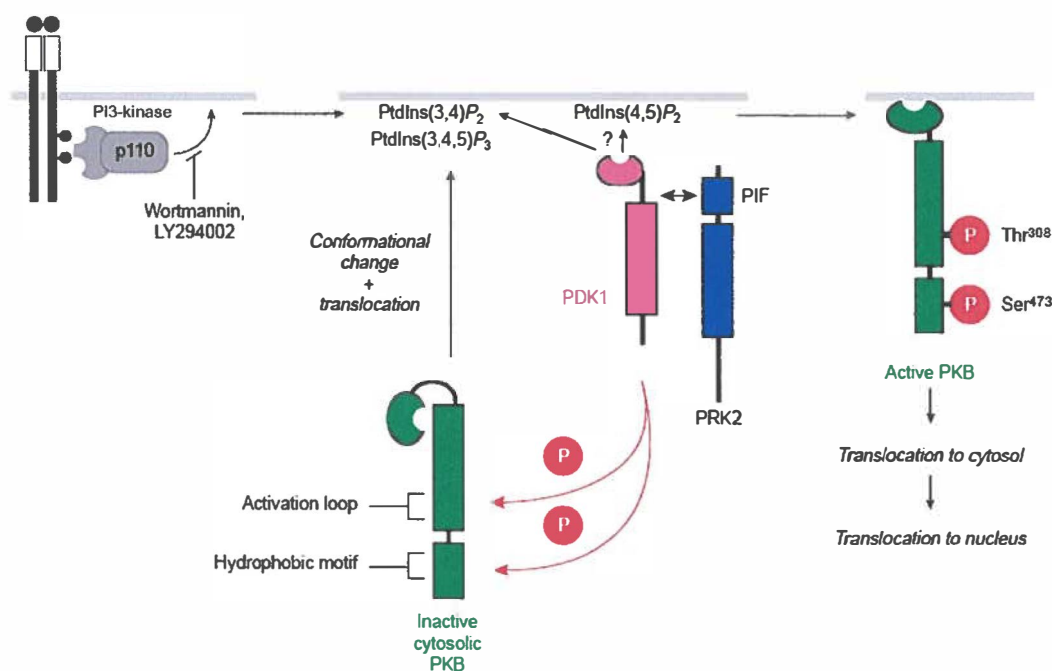


FIGURE 3.3 Modèle du mécanisme d'activation de la kinase Akt. Akt est composée de trois régions distinctes: un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) en N-terminal suivi d'un domaine catalytique et d'une courte région régulatrice en C-terminal. Le domaine catalytique est apparenté à celui de la PKA et de la PKC (Vanhaesebroeck et Alessi, 2000).

Puisque la protéine Akt est une cible de la PI3-kinase et que cette dernière induit la survie cellulaire suite à son activation par les facteurs de croissance, on peut supposer que Akt est un régulateur de la survie cellulaire (Datta et al., 1999). En effet, Akt est largement reconnu comme un médiateur majeur de la survie cellulaire induite par différents facteurs de croissance et cytokines. Plus particulièrement, il a été démontré que l'activation de la voie de PI3K/Akt par le facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor ou EGF) pourrait jouer un rôle protecteur contre l'apoptose induite par Fas (Hatano et Brenner, 2002; Gibson et al., 1999). Cependant, les mécanismes impliqués dans la fonction anti-apoptotique de la kinase Akt ne sont pas encore bien définis, en raison du nombre croissant de ses substrats. Toutefois, certains composants de la machinerie apoptotique sont connus pour être inhibés par Akt activée tel que Bad, la caspase 9, certains membres de la famille des facteurs de transcription forkhead (FKHR, FKHL1 et AFX) ainsi que la kinase IKK, qui régule l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Vanhaesebroeck et Alessi, 2000).

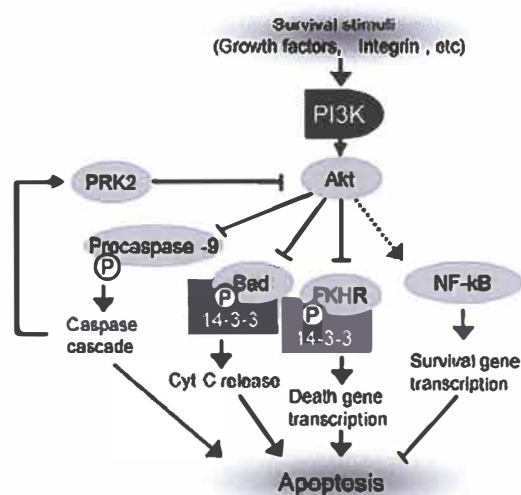


FIGURE 3.4 Inhibition de l'apoptose par Akt. Cyt C: cytochrome c, PRK2: protein kinase C-related kinase. La phosphorylation de Bad et FKHR par Akt entraîne leur séquestration dans le cytosol par les protéines 14-3-3. La phosphorylation de la procaspase 9 inhibe son activation et celle des caspases effectrices. NF- κ B est un substrat indirect de la kinase Akt, qui permet sa translocation au noyau et la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire. Le fragment c-terminal de la PRK2, issu du clivage par les caspases durant l'apoptose, peut se lier à Akt et inhiber son activité (Kim et Chung, 2002).

C'est en séquestrant les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 ou Bcl-X_L que Bad participe à l'induction de l'apoptose. Akt peut phosphoryler Bad au niveau de la sérine 136, l'empêcher de se lier aux protéines anti-apoptotiques et ainsi contribuer à la survie cellulaire (Downward, 1999). La caspase 9 est une protéase cruciale dans l'initiation de l'apoptose. Il a été rapporté que cette caspase peut être phosphorylée et inhibée par Akt (Cardone et al., 1998). En effet, des chercheurs ont démontré que Akt intervient assez tôt dans la cascade apoptotique, soit avant le dégagement du cytochrome *c* de la mitochondrie et l'activation de la caspase 9 (Kennedy et al., 1999). Les facteurs de transcription FKHR, FKHRL1 et AFX sont connus pour être phosphorylés au niveau de trois résidus par Akt (Brunet et al., 1999; Kops et al., 1999; Rena et al., 1999). Dans une cellule en situation physiologique, ces facteurs de transcription sont principalement localisés dans le noyau alors qu'en réponse à une stimulation, ils se retrouvent davantage dans le cytosol. Ces différentes localisations intracellulaires seraient entre autre influencées par l'activité kinase de Akt. Une fois phosphorylés, ces facteurs de transcription peuvent être séquestrés dans le cytosol par les protéines 14-3-3 et la transcription de leurs gènes cibles à l'intérieur du noyau est donc inhibée. Parmi ces gènes cibles, on retrouve celui du FasL, qui peut induire l'apoptose de façon autocrine ou paracrine (Brunet et al., 1999). Suite à leur phosphorylation par Akt, les facteurs de transcription forkhead sont maintenus dans le cytosol et la transcription du FasL est perturbée, ce qui contribue à la survie de la cellule. Le facteur de transcription NF- κ B peut aussi être influencé par l'activité anti-apoptotique de Akt. Ce facteur est maintenu dans le cytosol par son propre inhibiteur cytosolique appelé I κ B. Une fois phosphorylé, l'inhibiteur I κ B est dégradé, ce qui permet la translocation du NF- κ B vers le noyau et la transcription de protéines anti-apoptotiques tel que c-IAP1 et c-IAP2. Il a été démontré que Akt peut jouer un rôle dans la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B et donc dans l'activation de la transcription par le NF- κ B (Kane et al., 1999; Hatano et Brenner, 2002).

En plus d'interagir avec un grand nombre de molécules sollicitées dans les processus de survie cellulaire, il semblerait que la protéine Akt puisse s'associer avec le réseau de FIs dans les kératinocytes (Paramio et al., 2001). Il a aussi été démontré par

co-immunoprécipitation que Akt pouvait s'associer à la K8 dans les cellules MCF-7 issues d'un cancer du sein (Vandermoere et al., 2007). La kinase Akt intervient non seulement dans les mécanismes de survie cellulaire, mais aussi dans la progression de cancers et dans la signalisation cellulaire en réponse à l'insuline. La liste des substrats de la protéine Akt ne cesse de croître grâce aux nombreuses études portant sur la caractérisation de la voie de signalisation PI3K/Akt. L'utilisation d'inhibiteurs de la PI3 kinase a contribué à l'étude des cibles potentielles de la kinase Akt. La wortmannin est un métabolite fongique qui modifie de façon irréversible le domaine catalytique de la PI3 kinase et la rend enzymatiquement inactive (Arcaro et Wymann, 1993; Yano et al., 1993).

CHAPITRE 4

PROJET DE RECHERCHE

4.1 Travaux antérieurs et hypothèses

Les objectifs de ce projet de recherche ont été élaborés suite aux résultats antérieurs obtenus dans notre laboratoire. Les travaux de Fausther et al. ont permis de démontrer que l'intoxication chronique de souris C3H et FVB/n avec la GF entraîne la formation de CMs, qui est associée à une hausse de l'expression de Hsp70 dans les hépatocytes. De plus, ce traitement entraîne une augmentation de la phosphorylation des sérines 79 et 436 de la K8 et de la sérine 33 de la K18. Comme dans le cas de Hsp70, la phosphorylation de la K18 Ser33 est présente et augmentée dans tous les hépatocytes de souris traitées à la GF, suggérant ainsi leur implication active dans la réponse des hépatocytes au stress. Fausther et al. ont émis l'hypothèse que Hsp70 et la K18 Ser33 pourraient participer à la relocalisation ou au recrutement des différentes molécules sollicitées dans la réponse cellulaire au stress toxique. Ils ont aussi observé que l'augmentation de la phosphorylation de la K8 survient bien avant la formation des CMs. La phosphorylation est apparente après 2 semaines de traitement et augmente progressivement jusqu'à 6 semaines de traitement.

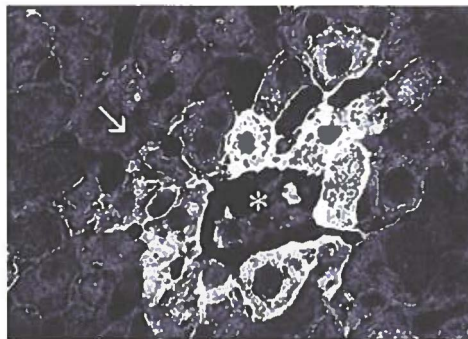


FIGURE 4.1 Distribution des kératines 8 phosphorylées au niveau de la sérine 79 dans les hépatocytes de souris traitées à la GF durant deux semaines. L'astérisque démontre des hépatocytes endommagés au centre de l'amas de cellules dont les K8 Ser79 sont phosphorylées (Fausther et al., 2004).

Les K8 Ser79 et K8 Ser436 phosphorylées sont présentes au niveau de cellules isolées ou de groupes de cellules. Au centre de ces amas de cellules phosphorylées sur la K8, Fausther et al. ont observé la présence de cellules non-phosphorylées à l'aspect endommagé, comme le démontre la figure 4.1 (Fausther et al., 2004). Des études subséquentes réalisées en utilisant d'autres marquages par immunofluorescence ont permis de démontrer que la cellule au centre de ces amas est en cours d'apoptose (Fig.4.2) et que les hépatocytes dont la K8 Ser79 est phosphorylée ne semblent pas affectés par le processus de mort cellulaire (Kathleen Riopel, Martin Désaulniers et Monique Cadrin, article en préparation).

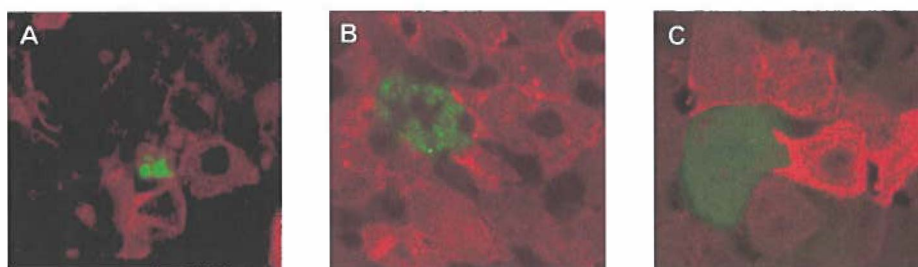


FIGURE 4.2 Détection de l'apoptose dans les hépatocytes de souris traitées à la GF durant deux semaines. Marquages par immunofluorescence des K8 Ser79 phosphorylées (A, B et C en rouge) en combinaison avec le marquage par la méthode de TUNEL (A en vert), le marquage de la caspase 3 active (B en vert) et le marquage des fragments de K18 clivés par la caspase 3 (C en vert). (Kathleen Riopel, Martin Désaulniers et Monique Cadrin, article en préparation).

Les résultats obtenus dans ces études suggèrent que la phosphorylation de la K8 Ser79 joue un rôle dans la protection des hépatocytes contre l'apoptose. À partir de ces observations, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les hépatocytes en apoptose, situés au centre des amas de cellules dont la K8 Ser79 est phosphorylée, pourraient initier un signal destiné aux cellules adjacentes. Ce signal induirait l'activation de kinases spécifiques impliquées dans la phosphorylation des kératines menant à la protection des cellules voisines contre l'apoptose. Afin de mieux caractériser ce signal et les voies de transduction cellulaire qu'il emprunte, il est important d'une part de développer un modèle d'étude qui nous permettra d'identifier les kinases pouvant être impliquées dans la phosphorylation des kératines, particulièrement au niveau de la K8

Ser79. D'autre part, il faudra définir le rôle des différents récepteurs de mort cellulaire sollicités dans le processus d'apoptose observé dans notre modèle et déterminer si les kératines interagissent avec les différentes molécules qui auront été identifiées. Il existe un nombre important de kinases pouvant phosphoryler les K8/18. Des études ayant démontré que les kinases JNK et p38 pouvaient être impliquées dans ce processus en situation de stress (He et al., 2002; Ku et al., 2002), nous avons donc vérifié si tel était le cas dans notre modèle d'étude *in vivo*. Les résultats obtenus suggèrent que ces kinases ne sont pas responsables de la phosphorylation de la K8 Ser79 dans les hépatocytes de souris traitées à la GF (Kathleen Riopel, Martin Désaulniers et Monique Cadrin, article en préparation).

4.2 Objectifs du projet de recherche

Afin de mieux caractériser les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse des hépatocytes au stress toxique et le rôle des K8/18 dans cette réponse, notre premier objectif a été de **mettre au point un modèle d'étude *in vitro*** de la formation des CMs. Nous avons utilisé la lignée cellulaire HepG2 qui provient d'un carcinome hépatocellulaire. Il s'agit d'une lignée cellulaire largement utilisée dans diverses études de cytotoxicité et de stress oxydatif (Chen et Cederbaum, 1998; Bardag-Gorce et al., 2006; Castaneda et Kinne, 2001; Nakamichi et al., 2002; Jimenez-Lopez et Cederbaum, 2005). De plus, la formation de CMs a été observée dans ces cellules suite au traitement à la GF (Nakamichi et al., 2002) et à l'éthanol (Bardag-Gorce et al., 2006). À partir du protocole de Nakamichi et al., nous avons traité les cellules HepG2 avec la GF à une concentration de 0,2 µg/mL qui a été déterminée suite à différents essais de concentrations. Les temps de traitement ont aussi été déterminés après différents essais.

Une fois le modèle d'étude bien établi, notre objectif était de caractériser le processus d'apoptose induit dans les cellules HepG2 par le traitement à la GF. Nous avons décidé de cibler notre étude sur le récepteur de mort cellulaire Fas, reconnu pour son rôle prédominant dans le processus d'apoptose au niveau du foie (Ogasawara et al.,

1993; Ni et al., 1994; Galle et al., 1995). Le second objectif de ce projet était donc de **déterminer si une relation existe entre la voie d'apoptose induite par FasR et la phosphorylation des kératines dans les cellules HepG2 traitées à la GF.**

Dans le même ordre d'idées, nous voulions mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels les K8/18 phosphorylées induisent une résistance au stress et à l'apoptose. Nous avons donc ciblé un médiateur important de la survie et la prolifération cellulaire, la kinase Akt. Nous avons tenté de déterminer si cette dernière peut être responsable de la phosphorylation des kératines ou jouer un rôle dans la protection des hépatocytes contre l'apoptose observée lors du traitement à la GF. Nous avons décidé de cibler notre étude sur la kinase Akt puisque les travaux de Riopel et al. avaient démontré que les kinases JNK et p38 n'étaient pas significativement associées à la phosphorylation de la K8 Ser79 dans le modèle *in vivo*. Le troisième objectif de ce projet était donc de **déterminer si une relation existe entre la kinase Akt et la phosphorylation des kératines dans les cellules HepG2 traitées à la GF.**

4.3 Méthodologie

Réactifs et anticorps Les réactifs utilisés sont les suivants : la griséofulvine (Schering Corporation), le LY294002 (#9901 Cell Signaling Technology), la wortmannin (#W1628 Sigma-Aldrich), le bisbenzimidazole Hoechst 33342 (#2261 Sigma-Aldrich), les inhibiteurs de protéases (#1697498 Roche) et le BSA (#BP1605 Fisher). Nous avons utilisé différents anticorps primaires pour observer tout d'abord les kératines totales, soit un anti-K8 (Troma1) (Brûlet et al., 1980) et un anti-K18 (L2A1) (Chou et Omary, 1991), ainsi que deux épitopes phosphorylés des K8/18, soit la sérine 73 de la K8 (LJ4) (Liao et al., 1997) et la sérine 33 de la K18 (8250) (Ku et al., 1998), une gracieuseté du Dr. MB Omary (Palo Alto, États-Unis). Nous avons aussi utilisé un anticorps reconnaissant la protéine Akt (#610860 BD Biosciences), un anticorps reconnaissant Akt phosphorylée sur la thréonine 308 (#9275 Cell Signaling Technology), un anti-FasR (#610197 BD Biosciences, C20 Santa Cruz Biotechnology), un anti-GAPDH (#8245 Abcam), un anti-ubiquitine (#Z0458 Dakocytomation) et un anti-caspase 3 clivée (#9661 Cell Signaling

Technology). Les anticorps secondaires que nous avons utilisés incluent un anti-IgG de souris ou de rat couplé à la rhodamine ou à la fluorescéine (#715-025-151, #712-025-153, #715-095-151 et #712-095-153 Jackson Immunoresearch), un anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa 488 ou l'Alexa 555 (#A21206 et #A31572 Molecular Probes), un anti-IgG de souris, de rat ou de lapin couplé au horse radish peroxydase (HRP) (#715-035-151, #712-035-153, #711-035-152 Jackson Immunoresearch).

Culture cellulaire La lignée HepG2 est cultivée dans un milieu RPMI-1640 (#SH30027.01 Hyclone) additionné de 10% de FBS (#SH30396.03 Hyclone) et de 50 µg/mL de gentamycine (#G1397 Sigma-Aldrich). À confluence, les cellules sont détachées du plat de culture avec un traitement à la trypsine 0,25%-EDTA (#T4049 Sigma-Aldrich). Les cultures sont maintenues dans une atmosphère 5% CO₂ à une température de 37°C.

Traitement avec la GF Les cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits de 9,5 cm² avec lamelles de verre à une densité de 2 X 10⁵ cellules/puits pour l'immunofluorescence et dans des plats de culture de 10 cm à une densité de 3 X 10⁶ cellules/plats pour l'extraction des protéines. Après 24 heures de croissance, les cellules sont traitées avec 0,2 µg/ml de GF dans 0,1% DMSO pour 8h, 24h, 48h, 60h et 72h, sans changement du milieu de culture durant le traitement.

Traitement avec l'inhibiteur de la PI3K Les cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits de 9,5 cm² à une densité de 2,5 X 10⁶ cellules/puits pour l'extraction des protéines. Après 24 heures de croissance, les cellules sont traitées avec la wortmannin pour 24h à 50 µM dans 0,1% DMSO en présence ou non de 0,2 µg/ml de GF dans 0,1% DMSO.

Essai de prolifération La prolifération des cellules au cours des différents traitements est mesurée par un essai colorimétrique (#1465007 Roche) basé sur le clivage du bromure de zolium ou MTT (jaune) en cristaux de formazan (bleu) par les cellules

métaboliquement actives. Les cristaux sont ensuite solubilisés selon les recommandations du fabricant et la lecture se fait par spectrophotométrie.

Immunofluorescence Différents marquages par fluorescence ont été effectués sur les cellules HepG2 fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4% dans du PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 4,29mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,2) durant 10 minutes. Après la fixation et entre chaque incubation, les cellules sont lavées à deux reprises avec du PBS. Les anticorps primaires sont dilués à différentes concentrations dans le PBS et hybridés pendant différentes périodes de temps : Troma [1:2] 45 min, L2A1 [1:100] 1 h, LJ4 [1:100] 30 min, 8250 [1:100] 45 min, anti-Akt [1:25] 1 nuit à 4°C, anti-phospho-Akt [1:50] 1 nuit à 4°C, anti-Fas [1:100] 1 h, anti-ubiquitine [1:150] 1 h et anti-caspase 3 clivée [1:100] 1 nuit à 4°C. Les anticorps secondaires couplés à la fluorescéine et à la rhodamine sont dilués [1:50] dans le PBS et l'incubation est de 30 min, ceux couplés à l'Alexa 488 et 555 sont dilués [1:100] et [1:250] respectivement et l'incubation est de 30 min. Le Hoechst est dilué dans le PBS à [1:10 000] et l'incubation est d'une durée de 30 min. La lamelle sur laquelle se retrouve l'échantillon est ensuite montée sur une lame dans du milieu de montage (0,1% P-phénylène diamine dilué dans 50% (v/v) de glycérol/PBS). L'observation des cellules a été effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus BX60 relié à une caméra digitale Coolsnap-Pro CF (Carsen Group).

RT-PCR L'ARN total est isolé avec le TRIzol[®] (#15596-026 Invitrogen) et les « reverse-transcription polymérase chain reactions » (RT-PCR) sont réalisés à l'aide du « Human Fas Ligand Primer Set kit » (#SP-10215 Maxim Biotech Inc) selon les indications du fabricant. L'ARN total (0,2 µg/µL) est utilisé pour la préparation du premier brin d'ADNc par la transcriptase inverse (RT). Les échantillons d'ARN sont incubés (65°C, 5 min) avec 1 µL d'amorces oligodéoxythymidine pour un volume final de 10 µL. Les échantillons sont ensuite incubés (37°C, 60 min) dans 20 µL de tampon réactif (first strand buffer; 1X) contenant 100 mM de DTT, 5mM de dNTPs et la transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Muloney (MMLV-RT; 10 U). Après la synthèse de l'ADNc, on ajuste le volume des échantillons à 50 µL avec de l'eau

autoclavée. Un contrôle négatif est effectué pour confirmer l'absence de contaminants d'ADN. L'ADNc est synthétisé et amplifié avec les amorces suivantes (10 μ M) :

FasL 5'GGTTCTGGTTGCCTTGGTAGGAT

3'CAGAAAGCAGGACAATTCCATAGGT

GAPDH 5'-TGAGCTTGACAAAGTCGTCG

3'-TCCAGTCCAGGTGGTGACTION

Les réactions de RT-PCR se déroulent dans les conditions suivantes à l'aide d'un appareil LightCycler[®] : synthèse de l'ADNc (1 cycle à 94°C durant 5 min); amplification de l'ADNc du FasL (40 cycles à 94°C durant 30 sec, 58°C pour 1 min et 72°C pendant 30 sec) et de la GAPDH (26 cycles à 94°C durant 30 sec, 58°C pour 30 sec et 72°C pendant 30 sec). Les produits de PCR sont alors analysés sur gel d'agarose 2% contenant du SYBR[®] Safe (# Invitrogen). Finalement, l'analyse densitométrique des niveaux d'ADNc est réalisée à l'aide du logiciel Quantity One 4.5.1 (Bio-Rad Laboratories).

Immunobuvardage de type Western Les cellules sont détachées par raclage et lysées dans 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 contenant 2.3% SDS, 50 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM DTT, 1 mM PMSF et un mélange d'inhibiteurs de protéases (#1697498 Roche). La concentration des protéines est déterminée selon une méthode de Lowry modifiée par la présence de SDS (Lowry OH et al., 1951). La séparation des protéines (30-50 μ g) se fait par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) 10-15% à 200 mvolts durant environ 1,5 heure dans le tampon de migration. Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose préalablement équilibrée dans le tampon de transfert. La saturation des sites non spécifiques s'effectue en incubant les membranes dans une solution de PBS-Tween-20 (PBS-T) (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 4,29mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, 0,05% à 0,2% Tween-20, pH 7,2) contenant 5% de lait en poudre ou 5% de BSA pour une période de 1 h. Les membranes sont par la suite incubées avec les anticorps primaires dilués dans le même PBS-T à différentes concentrations pour 1 h: Troma [1:2000], L2A1 [1:3000], LJ4 [1:1000], 8250 [1:1000], anti-Akt [1:1000], anti-Fas [1:1000], anti-GAPDH [1:50000] et anti-phospho-Akt [1:1500] pour 1 nuit à 4°C. Une fois l'incubation complétée, la membrane est lavée trois fois durant 15 minutes avec le PBS-

T. L'hybridation du deuxième anticorps conjugué au HRP s'effectue dans la solution de PBS-T contenant l'agent bloquant utilisé pour la dilution de l'anticorps primaire (lait en poudre ou BSA), dilué de [1:5000] à [1: 10000] pendant 45 min. La membrane est de nouveau lavée trois fois avec le PBS-T. La révélation se fait avec un réactif chemiluminescent, soit le Super Signal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate (#34095 Pierce) selon les indications du fabricant. L'analyse densitométrique des niveaux d'expression protéique est réalisée à l'aide du logiciel Quantity One 4.5.1 (Bio-Rad Laboratories).

Statistiques Les données ont été soumises à une analyse de la variance à un facteur ANOVA (logiciel PRISM version 3.03; GraphPad, San Diego, CA). Les différences entre les groupes expérimentaux ont été déterminées par le test de Turkey. Le niveau de significativité statistique acceptable est de $p < 0,05$.

4.4 Résultats

Objectif 1 : Mettre au point un modèle d'étude in vitro pour la formation des CMs

Le traitement des cellules HepG2 avec la GF induit une réorganisation du réseau de FIs et la phosphorylation des kératines

Au cours de ce projet, nous avons élaboré un nouveau modèle d'étude du rôle de la phosphorylation des kératines dans la réponse cellulaire au stress toxique. Puisque la GF est connue pour induire une hyperphosphorylation des kératines et la formation de CMs dans les hépatocytes de souris (Cadrin et Martinoli, 1995; Denk et al., 1975), nous avons étudié par immunofluorescence l'effet de la GF sur le réseau de FIs des cellules HepG2 en culture. Les marquages par immunofluorescence ont été réalisés en triplicata. Les figures 4.3 et 4.4 montrent que seulement quelques cellules contiennent des K8/18 phosphorylées dans les cultures de cellules contrôles. Le marquage du noyau par le Hoechst permet de constater que ces cellules sont en mitose, processus au cours duquel la phosphorylation de la Ser73 de la K8 (Liao et al., 1997) et de la Ser33 de la K18

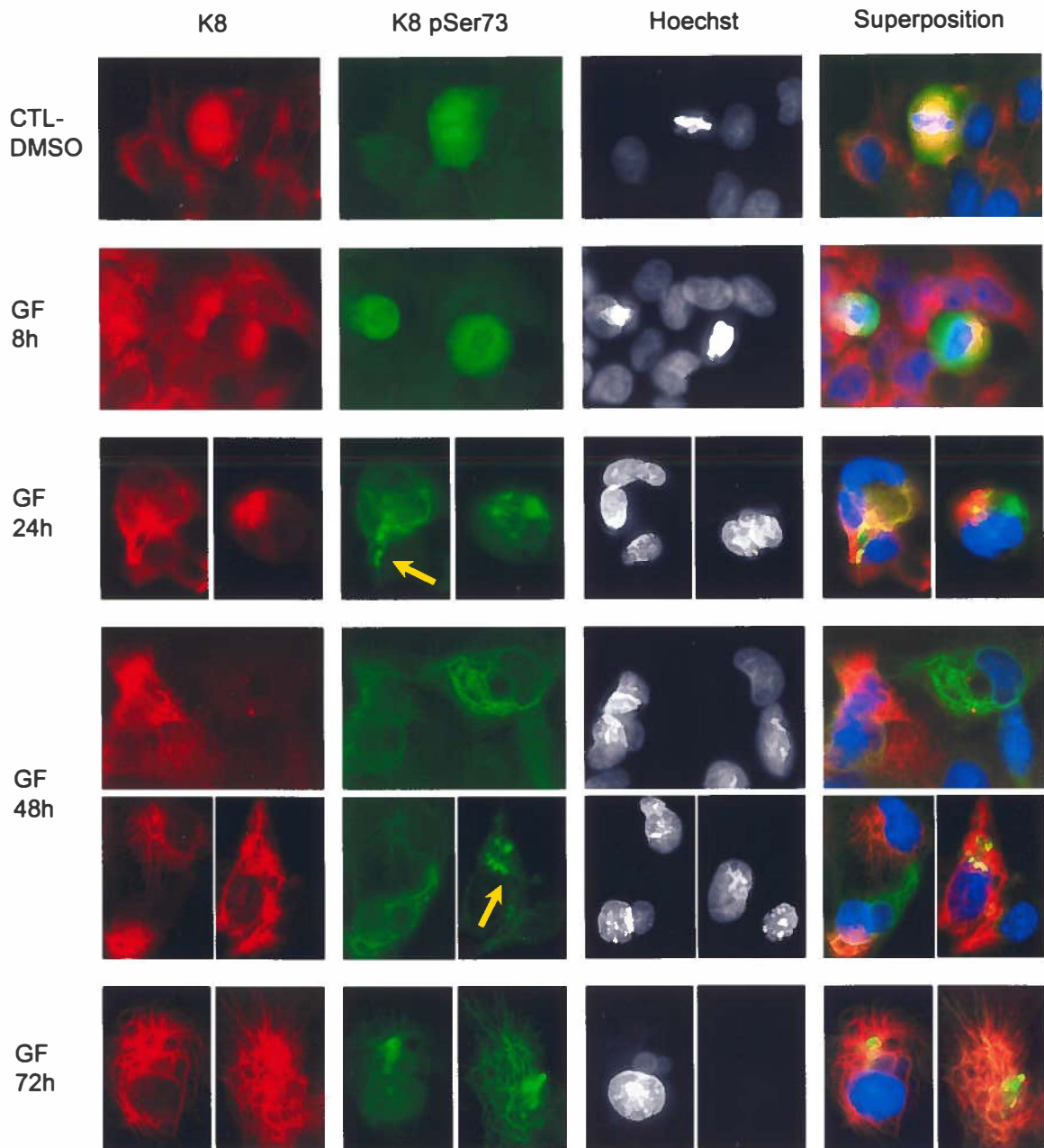


FIGURE 4.3 Distribution du réseau de kératines 8 dans les cellules HepG2. Double marquage par immunofluorescence des kératines 8 totales (en rouge), des kératines 8 phosphorylées sur la sérine 73 (en vert) et du noyau cellulaire (blanc ou bleu). Les flèches jaunes montrent la présence d'agrégats de kératines phosphorylées dans les cellules traitées à la GF. CTL-DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. 40X

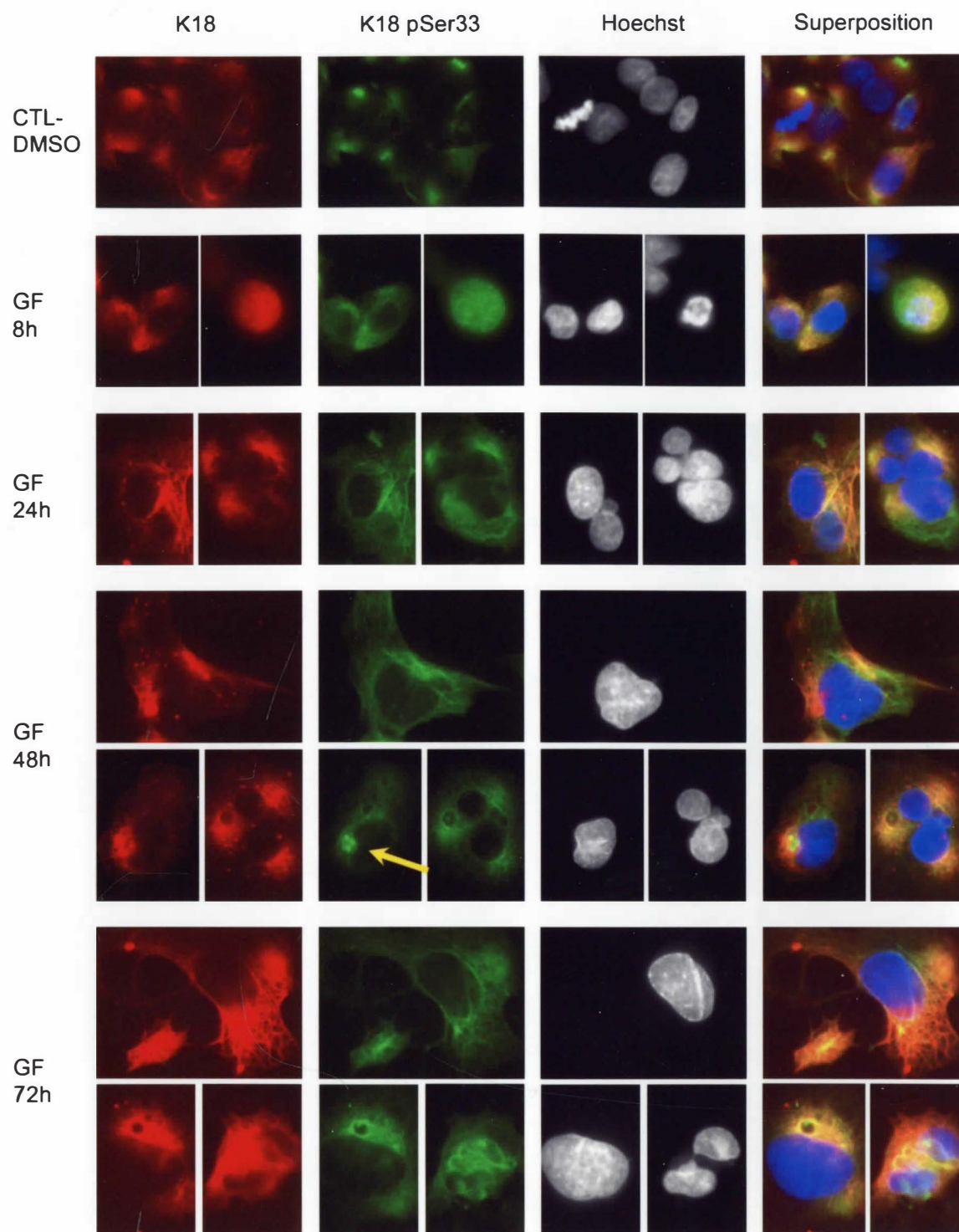


FIGURE 4.4 Distribution du réseau de kératines 18 dans les cellules HepG2. Double marquage par immunofluorescence des kératines 18 totales (en rouge), des kératines 18 phosphorylées sur la sérine 33 (en vert) et du noyau cellulaire (blanc ou bleu). Les flèches jaunes montrent la présence d'agrégats de kératines phosphorylées dans les cellules traitées à la GF. CTL-DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. 40X

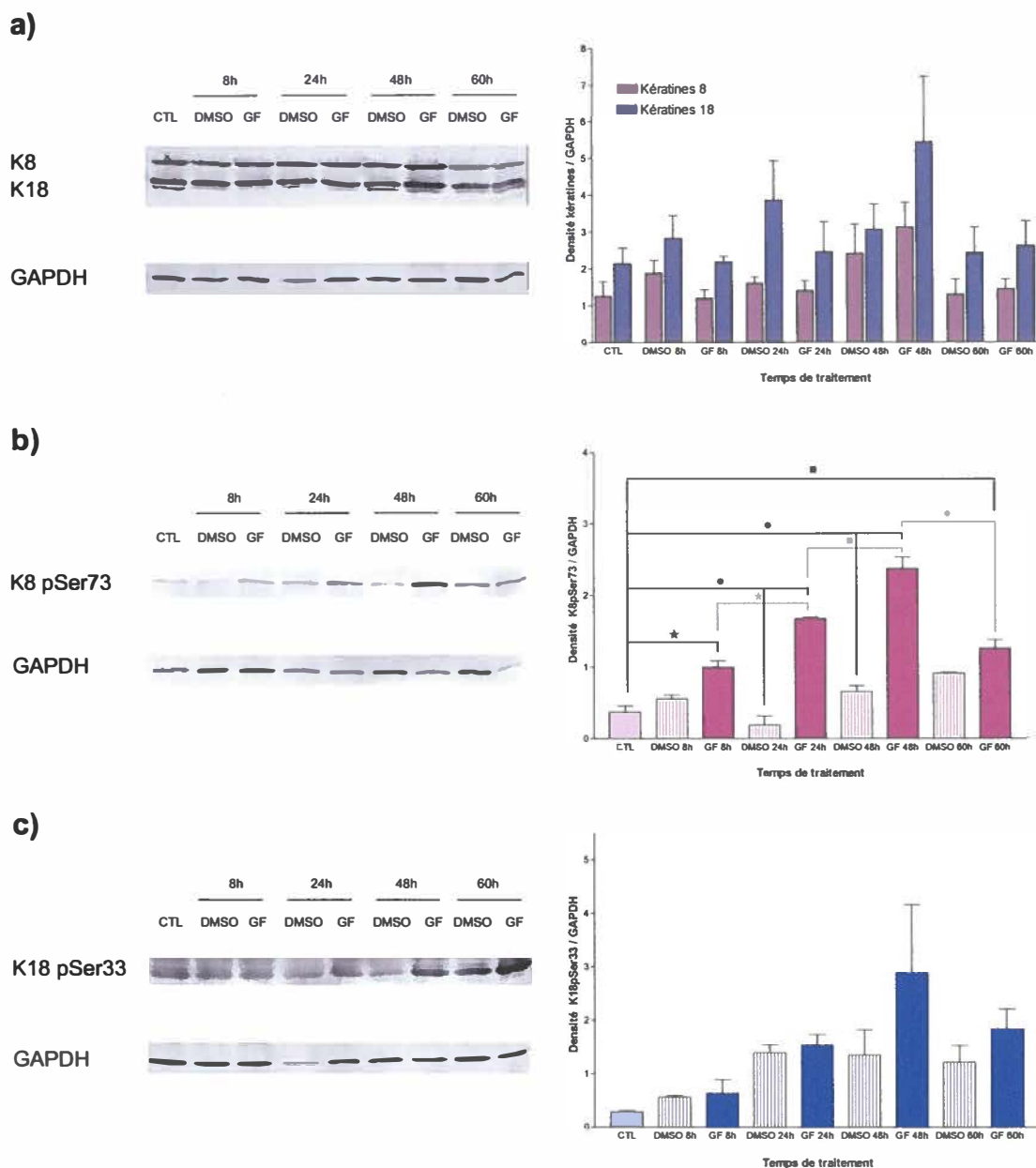


FIGURE 4.5 Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique des kératines 8 et 18 totales (a), de la K8 phosphorylée (b) et de la K18 phosphorylée (c) dans les cellules HepG2. À gauche, western blot représentatif de l'expérience et à droite, représentation graphique de l'expérience répétée trois fois. K8 pSer73 : kératine 8 phosphorylée sur la sérine 73, K18 pSer33 : kératine 18 phosphorylée sur la sérine 33, GAPDH : protéine utilisée comme contrôle, CTL : cellules en présence de milieu de culture, DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. ● p < 0,001; ■ p < 0,01; ★ p < 0,05.

(Coulombe et Omary, 2002; Ku et al., 1998) sont bien connues. La phosphorylation des K8/18 augmente en fonction de la durée de l'exposition des hépatocytes à la GF. De plus, on note l'apparition d'agrégats de kératines phosphorylées dans les cellules après 24h d'exposition à la GF (figure 4.3), mais leur présence est davantage marquée après 48h (figure 4.3 et 4.4).

Les analyses par western blot indiquent que le niveau d'expression des kératines totales ne varie pas de façon significative au cours du traitement à la GF. Toutefois, nos résultats confirment l'augmentation de la phosphorylation des K8/18 dans les cellules exposées à la GF par rapport aux cellules contrôles (figure 4.5). On note une augmentation significative de la phosphorylation de la K8 sur la Ser73.

Afin de déterminer si les agrégats observés suite au traitement à la GF pouvaient correspondre aux CMs, nous avons observé la localisation intracellulaire d'un de leurs constituants, l'ubiquitine. Cette protéine chaperon est exprimée de façon constitutive dans la cellule. Toutefois, son expression est augmentée en situation de stress. De plus, elle s'associe avec les amas de kératines observés dans les hépatocytes soumis à un stress toxique (Ohta et al., 1988; Ciechanover, 1994; Cadrin et al., 1992). Nous avons donc effectué un double-marquage par immunofluorescence des K8 phosphorylées sur la sérine 73 et de l'ubiquitine afin d'observer l'effet de la GF sur les interactions de cette protéine chaperon (figure 4.6). Dans la majorité des cellules contrôles, le marquage de l'ubiquitine est diffus dans le cytoplasme. Il en est de même dans les cellules en mitose, ce qui suggère que la phosphorylation des K8 n'influence pas la distribution intracellulaire de l'ubiquitine. Bien que le marquage de cette protéine soit cytoplasmique, il ne colocalise pas avec le marquage du réseau de K8 phosphorylées dans les cellules contrôles. Toutefois, les amas de K8 observés dans certaines cellules exposées à la GF pour 8h, 24h et 72h contiennent aussi de l'ubiquitine. Ce résultat suggère que ces amas sont destinés à la protéolyse cellulaire. On peut supposer que les agrégats contenant la K8 phosphorylée et l'ubiquitine s'apparentent au CMs présents dans les hépatocytes de souris traitées à la GF (Denk et al., 1975).

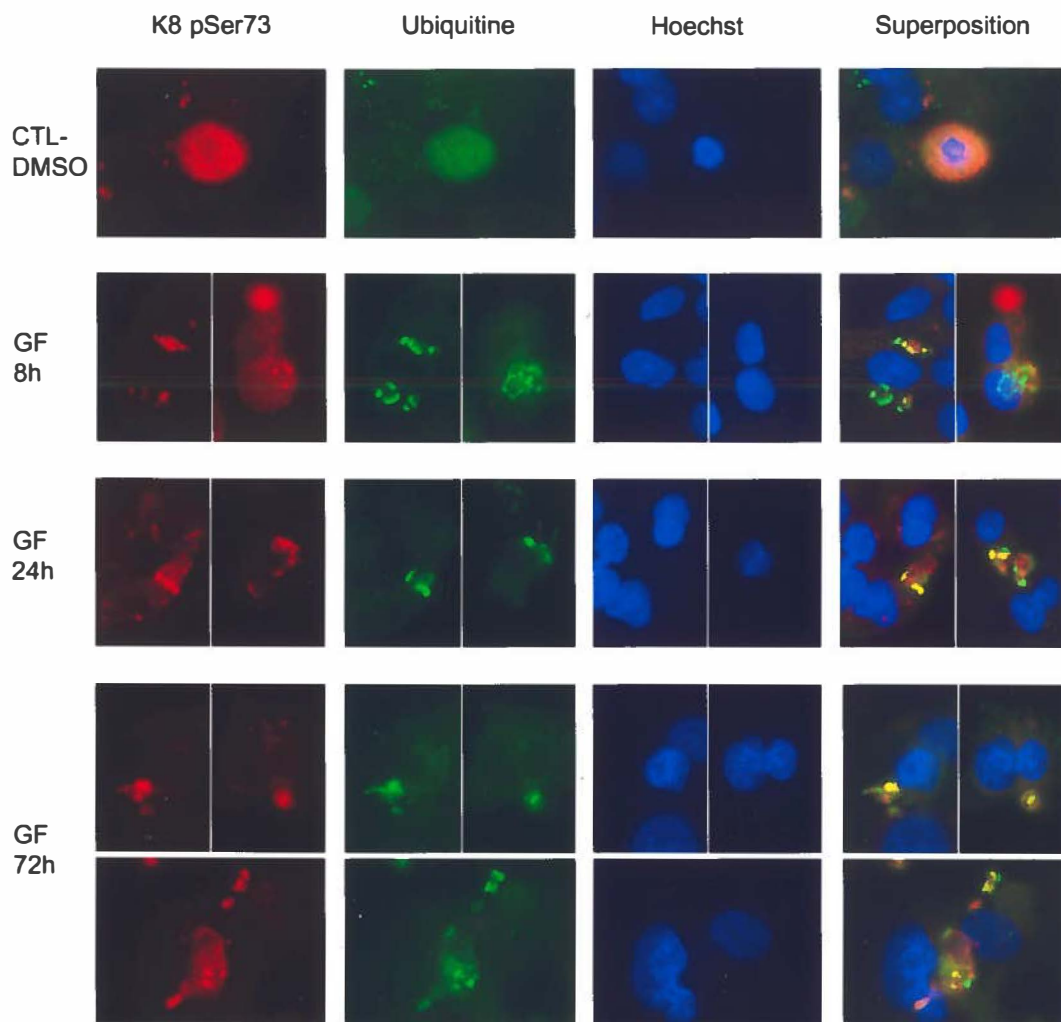


FIGURE 4.6 Distribution de la kératine 8 phosphorylée et de l'ubiquitine dans les cellules HepG2. Double marquage par immunofluorescence de la kératine 8 phosphorylée sur la sérine 73 (en rouge), de l'ubiquitine (en vert) et du noyau cellulaire (bleu). CTL-DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. 40X.

Le traitement des cellules HepG2 avec la GF induit l'apoptose

Toujours dans le but de mettre au point un bon modèle d'étude *in vitro*, nous avons voulu vérifier si la toxicité de la GF sur les cellules HepG2 était assez importante pour induire l'apoptose, tel qu'observé dans plusieurs modèles animaux. Nous avons tout d'abord étudié la présence de caspase 3 clivée dans les cellules traitées à la GF par immunofluorescence ainsi que par des analyses de type western blot. Nous avons effectué un double marquage par immunofluorescence pour la caspase 3 clivée de même que pour la K8 pSer73. Nos résultats indiquent que la K8 pSer73 est présente dans les cellules en mitose. Nous n'avons pas observé de cellules contenant de la caspase 3 clivée dans les cellules contrôles. Les mêmes résultats ont été obtenus après 8h de traitement. Après 24h de traitement, la caspase 3 clivée est présente dans plusieurs cellules. Ces cellules peuvent contenir des K8 phosphorylées sous forme d'agrégats. Toutefois, la majorité des cellules dont la caspase 3 est clivée ne contiennent pas de K8 phosphorylées. Les résultats sont les mêmes pour les cellules traitées 48h et 72h. Il est important de noter que les noyaux sont fragmentés dans les cellules qui contiennent de la caspase 3 clivée (figure 4.7). Les analyses par western blot démontrent que les cellules traitées avec la GF durant 24h, 48h et 60h contiennent les fragments de 17 et 19 kD de la procaspase 3, dont le clivage est nécessaire à son activation lors de l'apoptose, alors que les cellules contrôles ne contiennent pas ces peptides (figure 4.8). Nos résultats indiquent que la GF induit l'apoptose dans les cultures de cellules HepG2 par l'activation de la caspase 3, et ce après 24h d'exposition. La présence de caspase 3 clivée est aussi observée après 48h et 60h de traitement. On observe très peu de caspase 3 clivée dans les cellules exposées à la GF pendant 8h.

La caspase 3 étant un effecteur important où convergent plusieurs voies de signalisation pro-apoptotique, on peut conclure que l'exposition des cellules HepG2 à la GF induit l'apoptose. Afin de confirmer les résultats obtenus avec la caspase 3 clivée, nous avons procédé à un essai de prolifération au MTT. Nos résultats démontrent que le traitement à la GF entraîne une diminution de la prolifération cellulaire de façon dose-dépendante et en fonction de la durée de l'exposition à la drogue (figure 4.9).

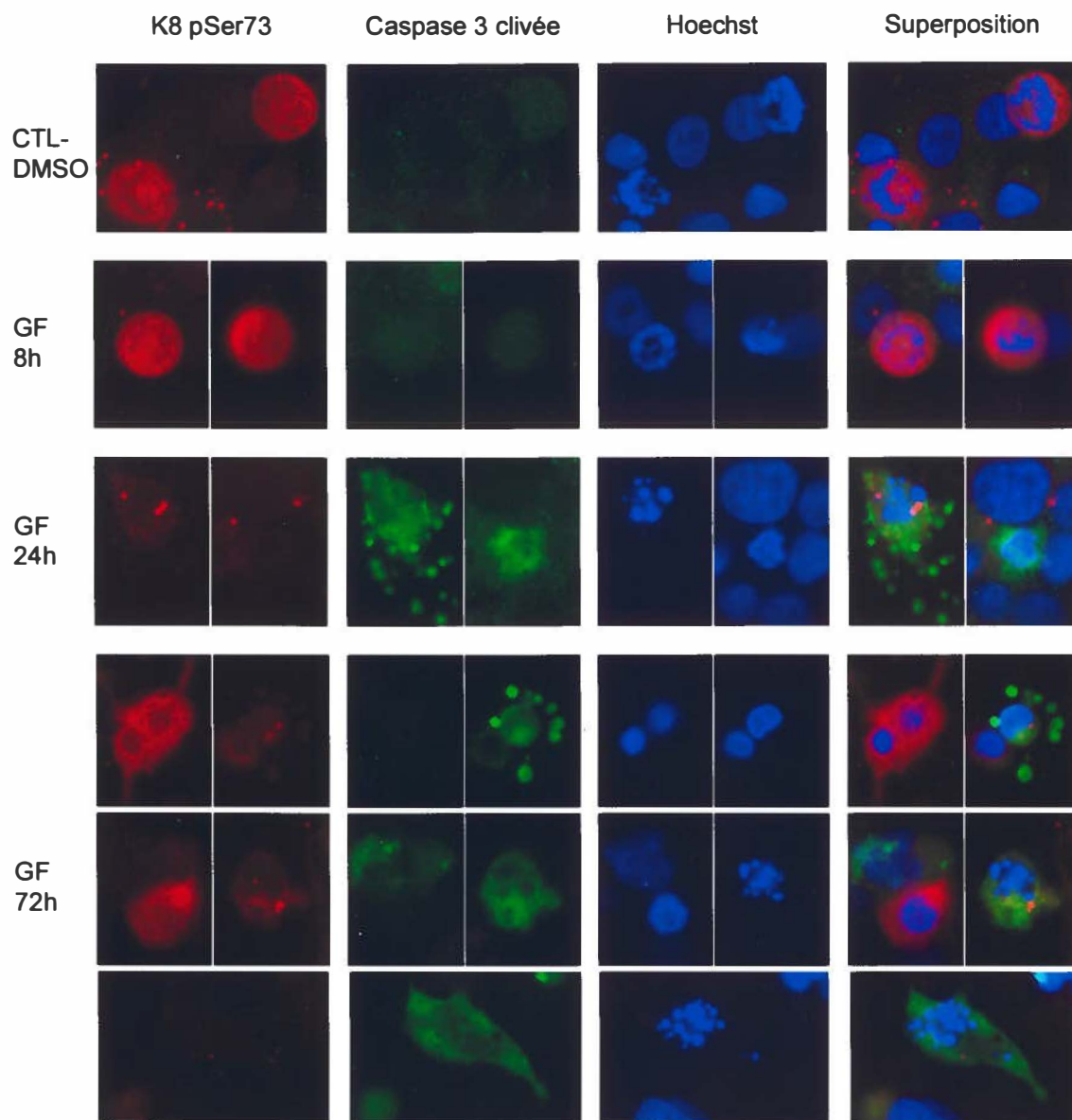


FIGURE 4.7 Distribution de la K8 phosphorylée et de la caspase 3 clivée dans les cellules HepG2. Double marquage par immunofluorescence de la kératine 8 phosphorylée sur la sérine 73 (en rouge), de la caspase 3 clivée (en vert) et du noyau cellulaire (bleu). CTL-DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. 40X.

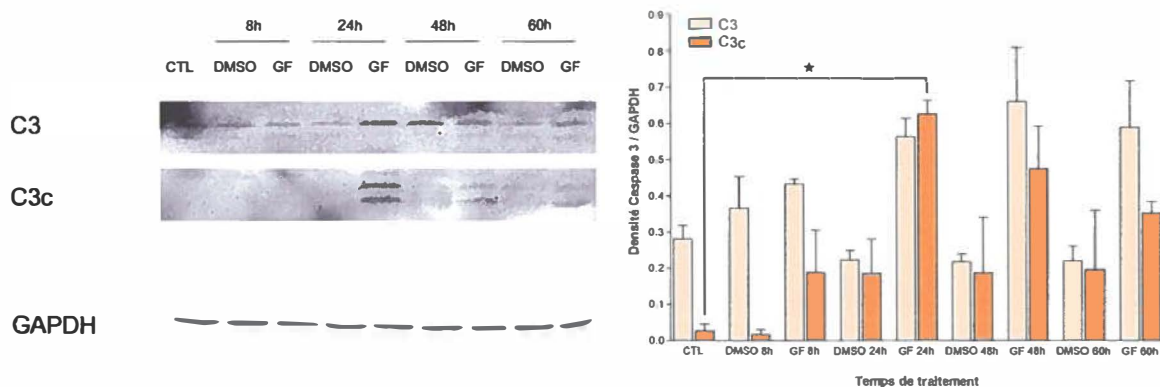


FIGURE 4.8 Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique de la caspase 3 totale et clivée (fragments de 17 kD et 19 kD) dans les cellules HepG2. À gauche, western blot représentatif de l'expérience et à droite, représentation graphique de l'expérience répétée trois fois. C3 : procaspase 3, C3c : caspase 3 clivée, GAPDH : protéine utilisée comme contrôle, CTL : cellules en présence de milieu de culture, DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. * p < 0,05.

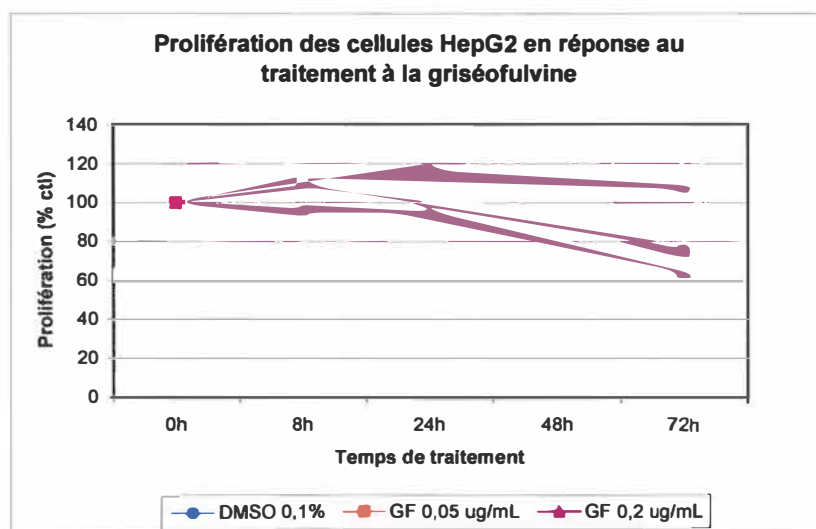


FIGURE 4.9 Essai de prolifération cellulaire des HepG2 au cours du traitement à la GF. CTL-DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,05 et 0,2 µg/mL.

Objectif 2 : Déterminer si une relation existe entre la voie d'apoptose induite par Fas et la phosphorylation des kératines dans les cellules HepG2 traitées à la GF

Le traitement à la GF n'influence pas l'expression du FasR mais plutôt sa distribution intracellulaire

Il est connu que, au niveau du foie, l'apoptose est principalement attribuable au récepteur de mort cellulaire FasR fortement exprimé par les hépatocytes (Galle et al., 1995; Hiramatsu et al., 1994). Nous avons donc voulu vérifier l'implication du FasR dans l'apoptose des cellules HepG2. L'analyse par western blot des niveaux d'expression du FasR n'a démontré aucune variation statistiquement significative entre les cellules contrôles et celles exposées à la GF et ce, indépendamment de la durée d'exposition à la drogue (figure 4.10).

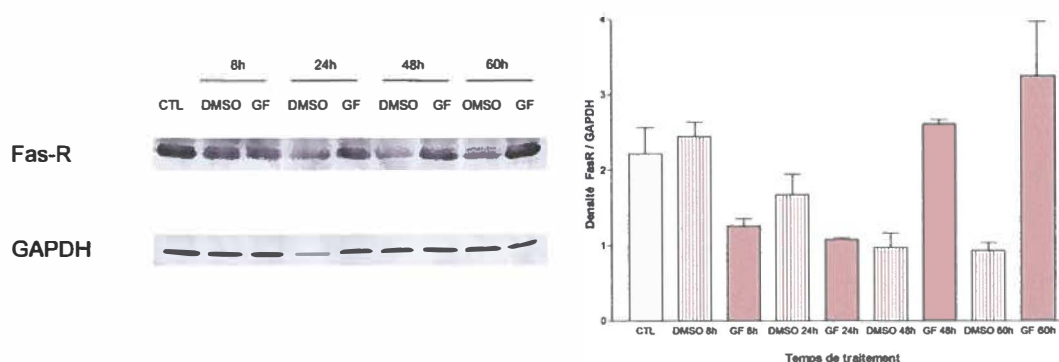


FIGURE 4.10 Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique du récepteur Fas dans les cellules HepG2. À gauche, western blot représentatif de l'expérience et à droite, représentation graphique de l'expérience répétée trois fois. FasR: récepteur Fas, GAPDH: protéine utilisée comme contrôle, CTL: cellules en présence de milieu de culture, DMSO: cellules en présence de DMSO 0,1%, GF: cellules en présence de GF 0,2 µg/mL.

Les marquages par immunofluorescence du FasR ont permis d'observer un phénomène de relocalisation du récepteur à l'intérieur de la cellule suite au traitement (figures 4.11 et 4.12). En effet, dans les cellules contrôles, le FasR se retrouve dans le cytoplasme de façon diffuse ou agrégé près du noyau, possiblement au niveau de l'appareil de Golgi. Dans les cellules mises en présence de GF, le FasR se retrouve non

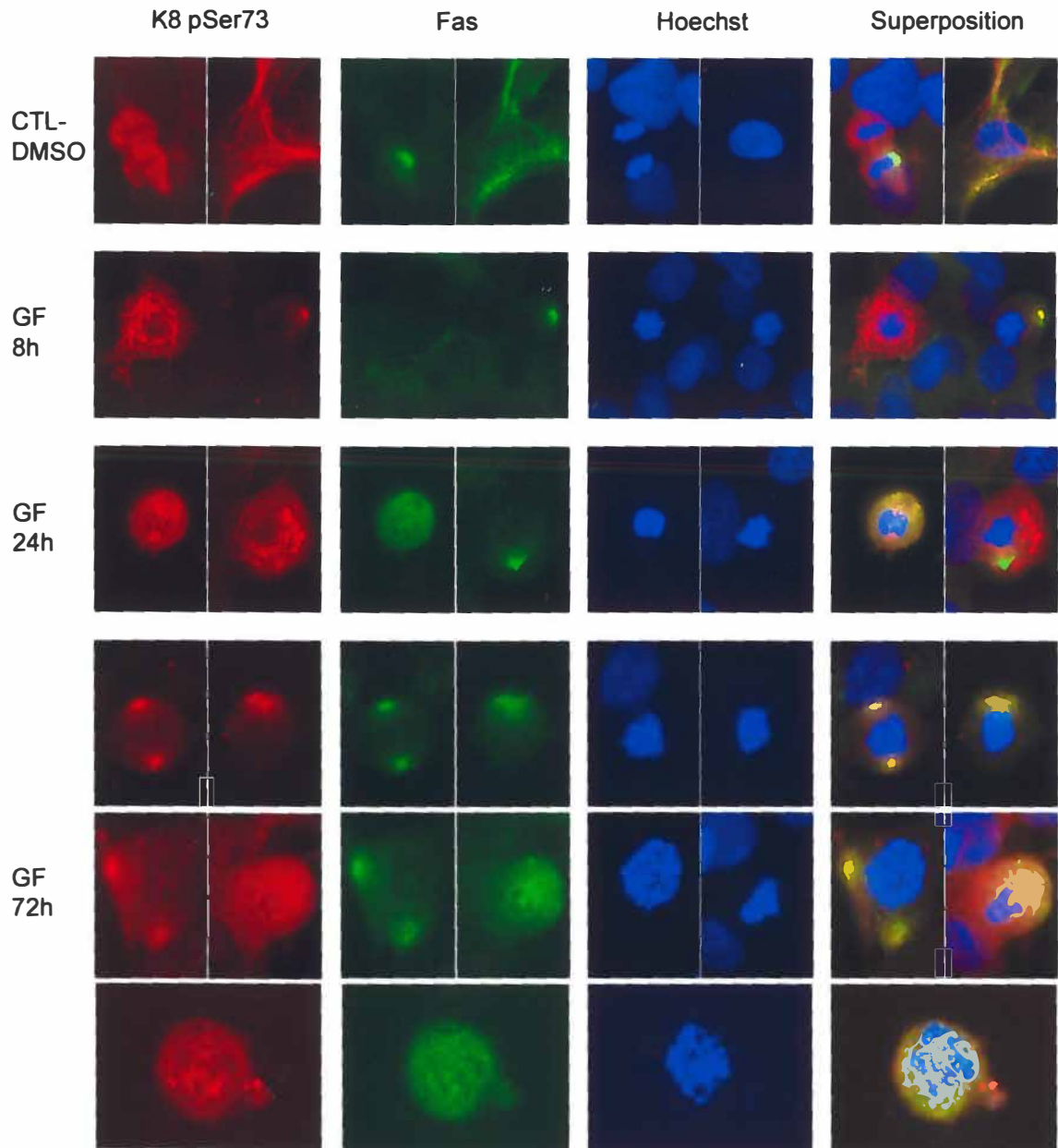


FIGURE 4.11 Distribution de la K8 phosphorylée et du récepteur Fas dans les cellules HepG2. Double marquage par immunofluorescence de la kératine 8 phosphorylée sur la sérine 73 (en rouge), du récepteur Fas (en vert) et du noyau cellulaire (bleu). CTL-DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. 40X

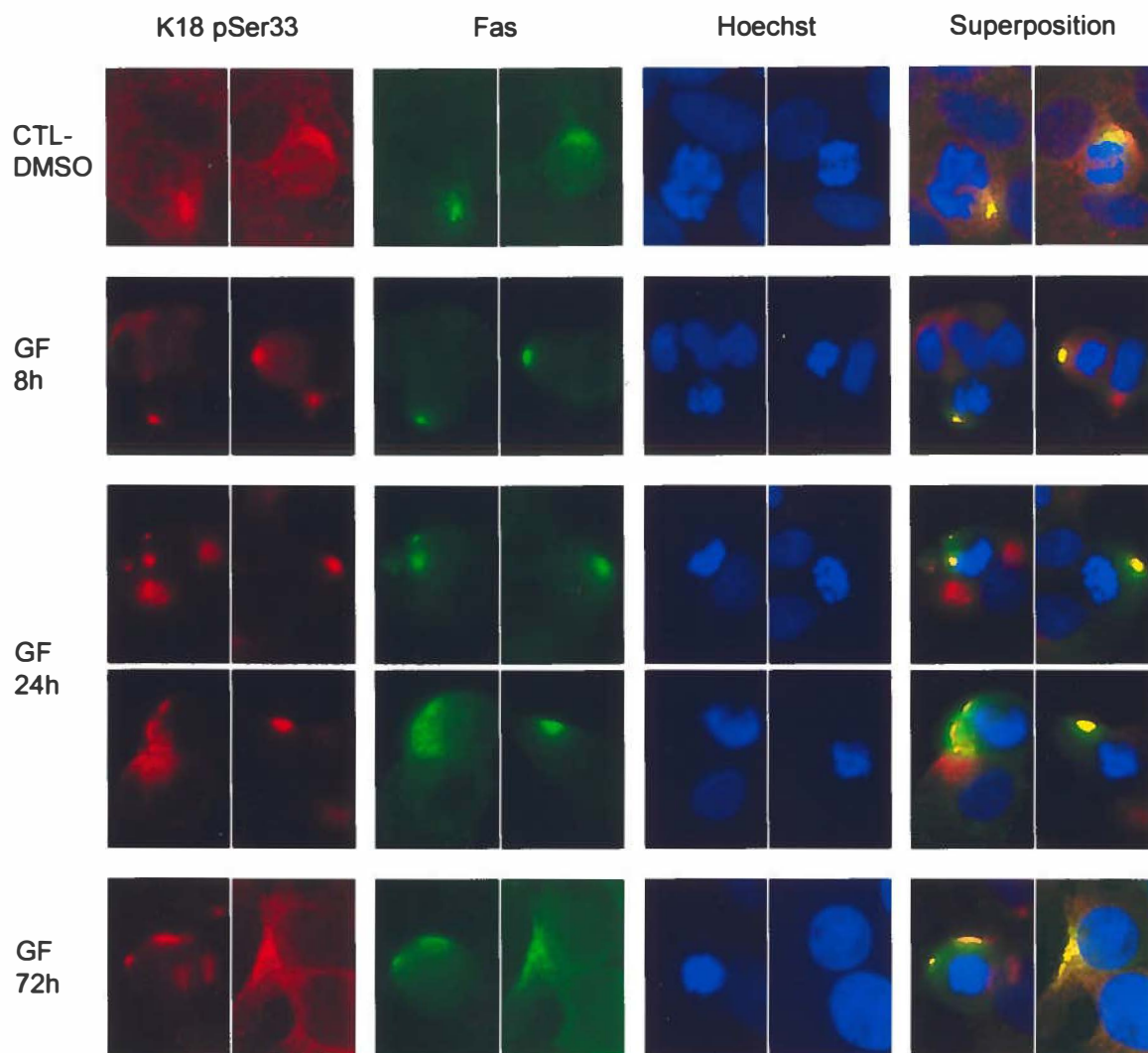


FIGURE 4.12 Distribution de la K18 phosphorylée et du récepteur Fas dans les cellules HepG2. Double marquage par immunofluorescence de la kératine 18 phosphorylée sur la sérine 33 (en rouge), du récepteur Fas (en vert) et du noyau cellulaire (bleu). CTL-DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. 40X.

seulement dans le cytoplasme, mais aussi de façon ponctuelle au niveau de la membrane plasmique et ce, particulièrement dans les cellules qui présentent des caractéristiques morphologiques de cellules en apoptose. De plus, dans bon nombre de cellules, le marquage du FasR colocalise avec celui des K8/18 phosphorylées, indépendamment de sa localisation intracellulaire.

Objectif 3 : Déterminer si une relation existe entre la kinase Akt et la phosphorylation des kératines dans les cellules HepG2 traitées à la GF

Le traitement à la GF influence la phosphorylation de la protéine Akt

Puisque la kinase Akt joue un rôle central dans la survie et la prolifération cellulaire, on peut s'attendre à ce qu'elle soit particulièrement active lorsque les cellules sont soumises à un stress toxique. Nous avons donc analysé par western blot les niveaux d'expression de cette protéine, sous sa forme constitutive et fonctionnelle, dans les cellules HepG2 contrôles et traitées à la GF. On observe très peu de variation dans les quantités de protéines Akt au cours du traitement (figure 4.13). Toutefois, la phosphorylation de cette protéine est augmentée dans les cellules exposées à la GF, et plus particulièrement après 48h d'exposition.

Il est intéressant de noter que le profil d'activation de la protéine Akt est similaire à celui observé pour la phosphorylation de la K8 sur la Ser73. Cette comparaison suggère que la protéine Akt phosphorylée puisse être associée à la phosphorylation des K8/18. Nous avons donc marqué par immunofluorescence la protéine Akt phosphorylée sur la Thr308 en combinaison avec la K8 phosphorylée sur la Ser73 (figure 4.14) et la K18 phosphorylée sur la Ser33 (figure 4.15). Le marquage par immunofluorescence nous permet de mettre en évidence que toutes les cellules ne contiennent pas Akt phosphorylée. Dans les cellules contrôles, le marquage pour Akt phosphorylée est diffus dans le cytoplasme et colocalise avec le marquage pour les kératines phosphorylées, plus spécifiquement dans les cellules en mitose. Dans les hépatocytes exposés à la GF, la protéine Akt phosphorylée est présente dans le cytoplasme et le marquage colocalise avec celui pour les K8/18 phosphorylées. On observe aussi la présence d'Akt

phosphorylée au niveau de la membrane plasmique de certaines cellules. À noter que dans certaines de ces cellules, les K8 phosphorylées apparaissent sous forme d'agrégats (figure 4.14).

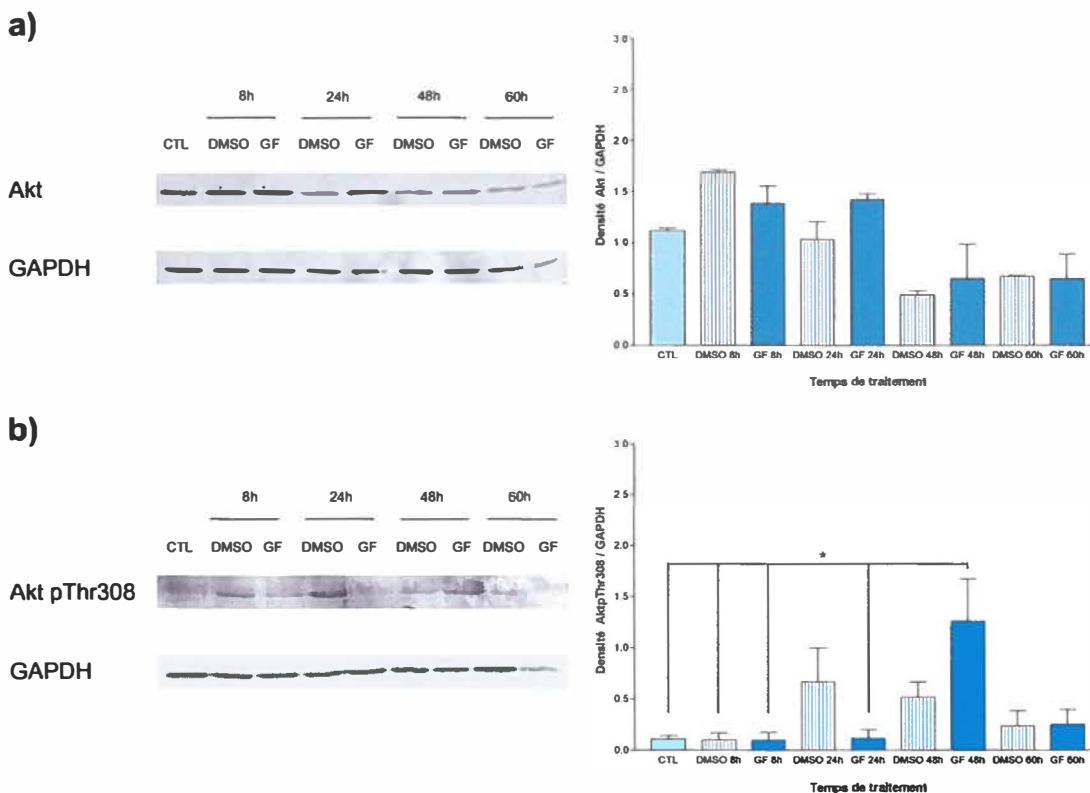


FIGURE 4.13 Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique de Akt totale (a) et phosphorylée (b) dans les cellules HepG2. À gauche, western blot représentatif de l'expérience et à droite, représentation graphique de l'expérience répétée trois fois. Akt : protéines totales, Akt pThr308 : Akt phosphorylée sur la thréonine 308, GAPDH : protéine utilisée comme contrôle, CTL : cellules en présence de milieu de culture, DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. ★ $p < 0,05$.

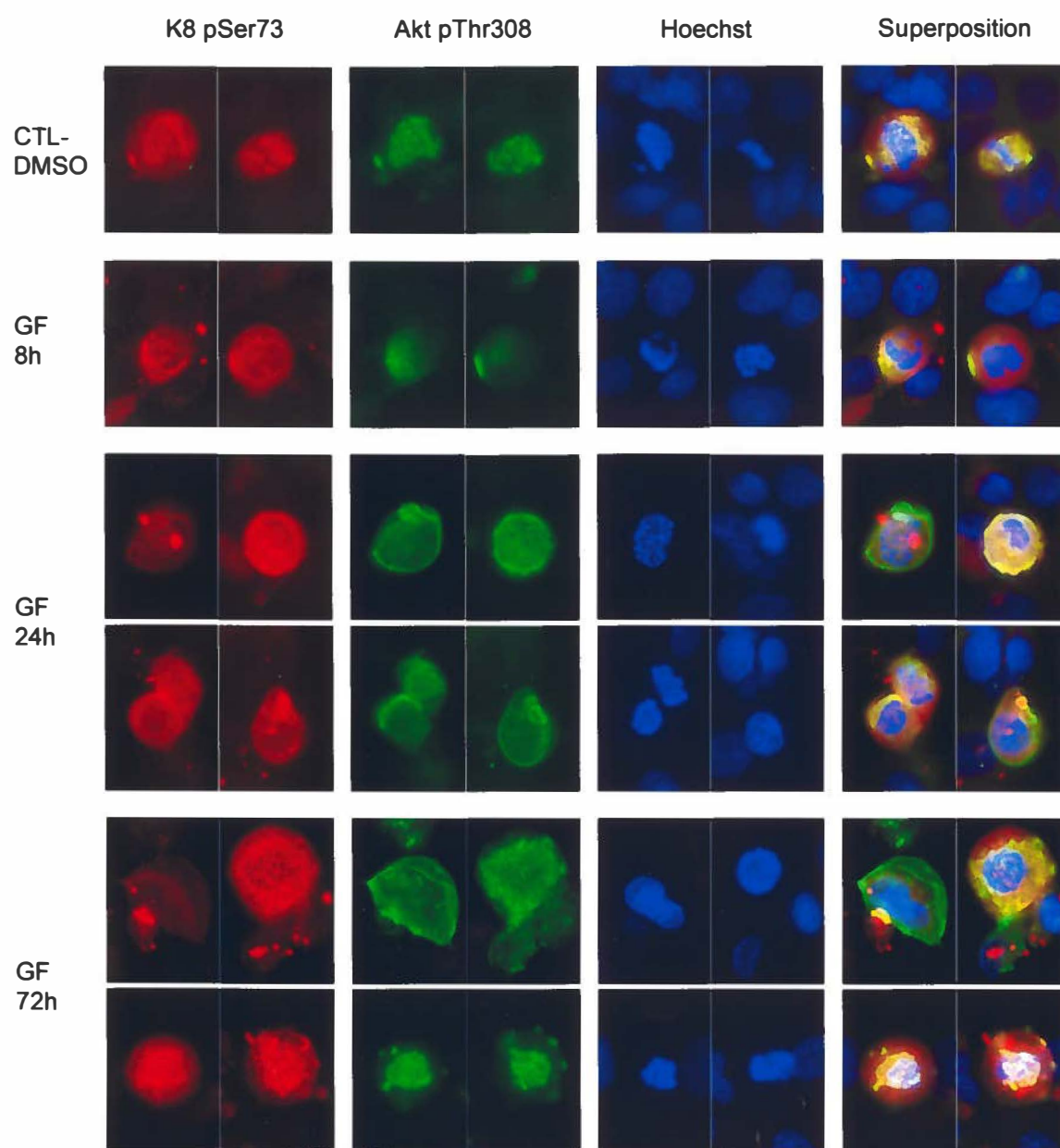


FIGURE 4.14 Distribution de la K8 phosphorylée et de la protéine Akt phosphorylée dans les cellules HepG2. Double marquage par immunofluorescence de la kératine 8 phosphorylée sur la sérine 73 (en rouge), de la protéine Akt phosphorylée sur la thréonine 308 (en vert) et du noyau cellulaire (bleu). CTL-DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. 40X.

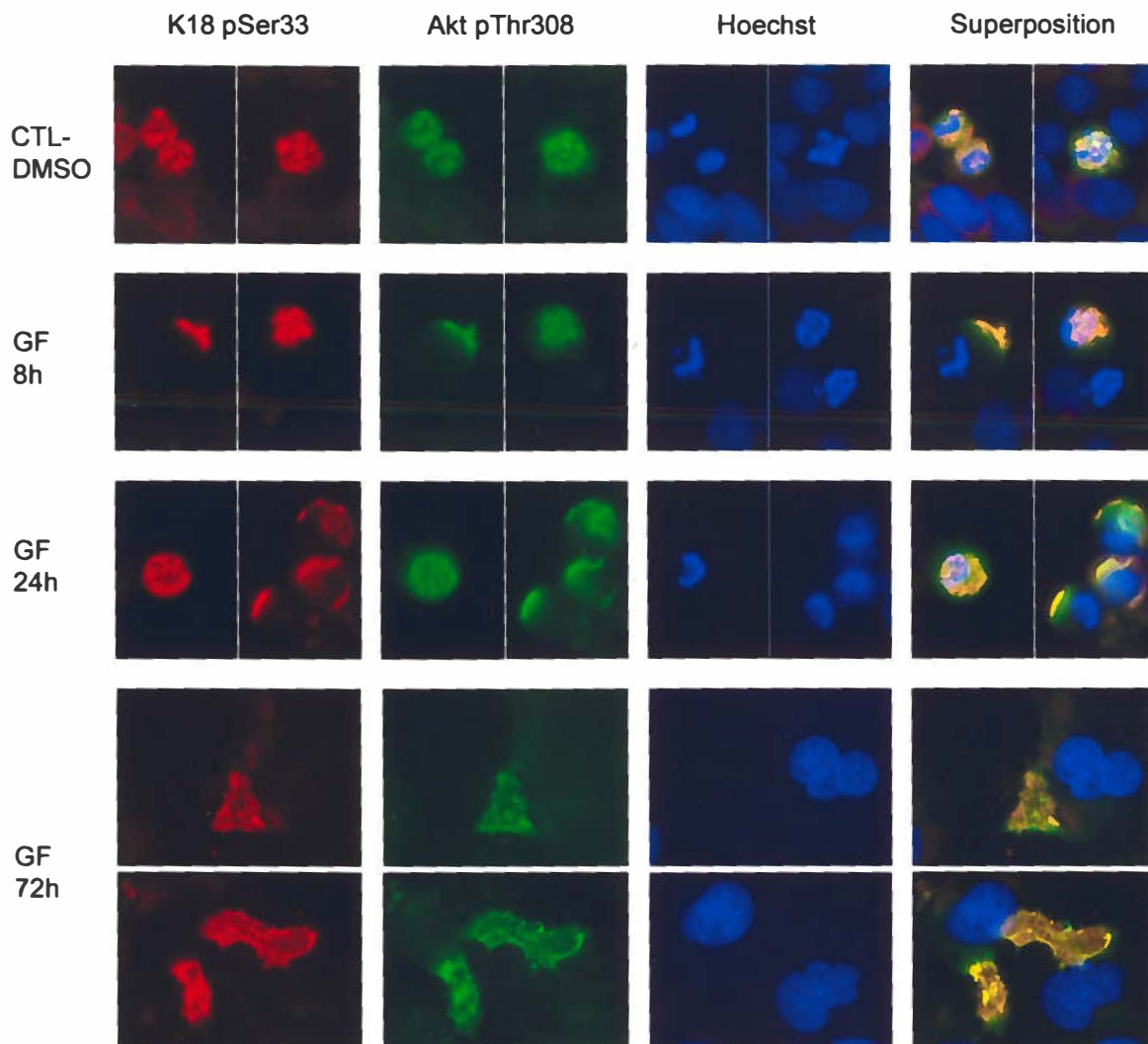


FIGURE 4.15 Distribution de la K18 phosphorylée et de la protéine Akt phosphorylée dans les cellules HepG2. Double marquage par immunofluorescence de la kératine 18 phosphorylée sur la sérine 33 (en rouge), de la protéine Akt phosphorylée sur la thréonine 308 (en vert) et du noyau cellulaire (bleu). CTL-DMSO : cellules en présence de DMSO 0,1%, GF : cellules en présence de GF 0,2 µg/mL. 40X.

L'inhibition de la phosphorylation de Akt n'influence pas la phosphorylation des kératines

Afin de vérifier si la kinase Akt pouvait être impliquée dans la phosphorylation des kératines, nous avons utilisé un inhibiteur de la voie de signalisation de PI3K, la wortmannin, qui a pour effet d'empêcher la phosphorylation de Akt. Les cellules sont traitées avec la wortmannin à une dose de 50 μM durant 24h, un traitement suffisant pour l'inhibition sélective de la PI3K (Nakanishi et al., 1992; St-Germain et al., 2004), en présence ou non de GF. Par des analyses de type western blot, nous avons ensuite observé l'effet de cette inhibition sur la phosphorylation des K8 (figure 4.16). Nos résultats montrent que le niveau de K8 phosphorylée tend à diminuer lorsque la kinase Akt est inactivée par l'inhibiteur. Cependant, cette variation n'est pas statistiquement significative car il s'agit d'un résultat préliminaire. Toutefois, cela suggère que la kinase Akt puisse jouer un rôle dans la phosphorylation des kératines. La diminution de la phosphorylation de la K8 sur la Ser73 est davantage marquée dans les cellules soumises au stress toxique induit par la GF, comparativement aux cellules en situation physiologique. Cela suggère que la phosphorylation des K8 par Akt serait davantage associée à une situation de stress toxique plutôt qu'au processus physiologique de mitose.

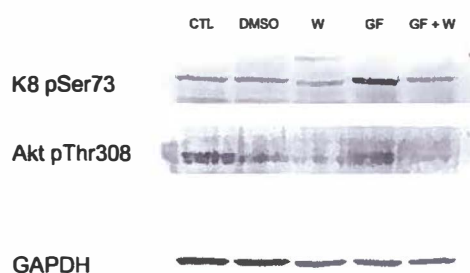


FIGURE 4.16 Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique de la K8 phosphorylée et de la protéine Akt phosphorylée dans les cellules HepG2 en présence d'un inhibiteur de la PI3K. Western blot représentatif de l'expérience répétée deux fois. K8 pSer73 : kératine 8 phosphorylée sur la sérine 73, Akt pThr308 : Akt phosphorylée sur la thréonine 308, GAPDH : protéine utilisée comme contrôle, CTL : cellules en présence de milieu de culture, DMSO : cellules en présence de DMSO 0,2% durant 24h, W : cellules en présence de wortmannin 50 μM durant 24h, GF : cellules en présence de GF 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durant 24h, GF+W : cellules en présence de wortmannin et de GF durant 24h.

Akt joue un rôle dans la protection des cellules contre l'apoptose induite par la GF, mais n'influence pas l'expression des FasR et FasL

L'implication d'Akt lors d'un traitement à la GF a été vérifiée dans les cellules HepG2. À l'aide du même inhibiteur de la phosphorylation d'Akt, la wortmannin, nous avons analysé par western blot les niveaux d'expression protéique de la caspase 3 clivée et du récepteur Fas afin de déterminer si l'activité anti-apoptotique d'Akt pouvait influencer ces médiateurs de l'apoptose dans notre modèle. La figure 4.17a montre que dans les hépatocytes ayant été traités avec la wortmannin, la caspase 3 est clivée, donc active. Il en est de même dans les cellules exposées à la GF, où la caspase 3 clivée semble augmenter en présence de l'inhibiteur. Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires, cela suggère qu'Akt joue un rôle dans la protection contre l'apoptose induite par la GF dans les cellules HepG2, en modulant l'activation de la caspase 3.

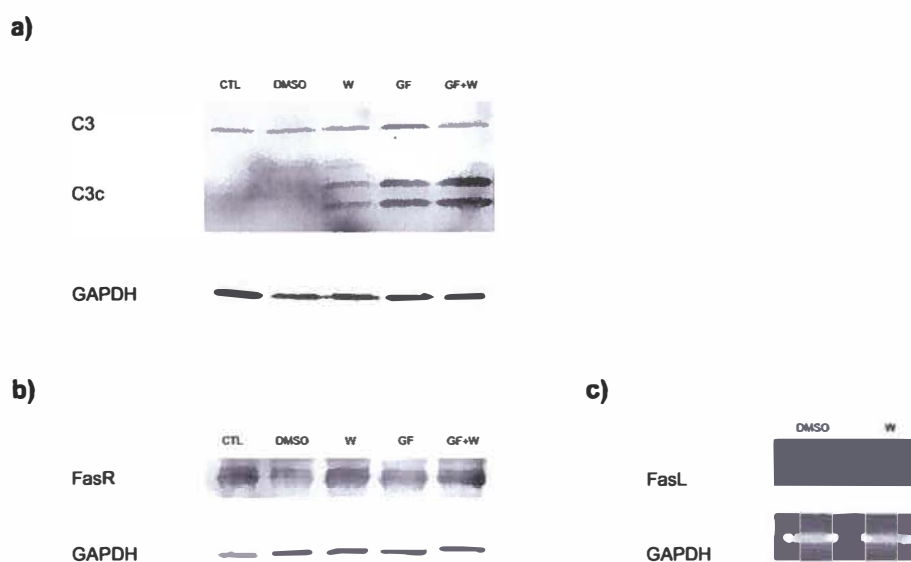


FIGURE 4.17 Analyse par western blot des niveaux d'expression protéique de la capase 3 totale et clivée (a) et du FasR (b) et analyse par RT-PCR des niveaux d'ARNm du FasL (c) dans les cellules HepG2 en présence d'un inhibiteur de la PI3K. Western blot et RT-PCR représentatifs de l'expérience répétée deux fois. C3 : procaspase 3, C3c : caspase 3 clivée, FasR : récepteur Fas, FasL : ligand du FasR, GAPDH : protéine utilisée comme contrôle, CTL : cellules en présence de milieu de culture, DMSO : cellules en présence de DMSO 0,2%, W : cellules en présence de wortmannin 50 μ M durant 24h, GF : cellules en présence de GF 0,2 μ g/mL durant 24h, GF+W : cellules en présence de wortmannin et de GF.

Toutefois, l'expression du FasR n'est pas influencée par l'inhibition de Akt, ni par le traitement à la GF tel que démontré précédemment à la figure 4.10 (figure 4.17b). Plusieurs études ont démontré que la protéine Akt peut influencer la transcription du FasL par la phosphorylation de certains facteurs de transcription. Nous avons voulu vérifier si ce processus pouvait s'appliquer à notre modèle d'étude. Les analyses RT-PCR montrent qu'il n'y a pas de variations dans les niveaux d'ARNm entre les cellules contrôles et celles dont la protéine Akt a été inactivée (figure 4.17c). Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires, Akt ne semble pas impliquée dans la modulation de la transcription du FasL dans notre modèle d'étude.

CHAPITRE 5

DISCUSSION ET PERSPECTIVES D'AVENIR

5.1 Discussion

Les protéines de FIs sont un des composants du cytosquelette et forment un réseau complexe qui s'étend de la périphérie du noyau jusqu'à la membrane plasmique. Parmi ces protéines, on retrouve les kératines qui sont exprimées exclusivement dans les épithéliums. En plus d'assurer le maintien de l'intégrité structurale de la cellule (Fuchs et Cleveland, 1998), le réseau de kératines joue un rôle important dans la protection contre les stress toxiques (Ku et al., 1996; Loranger et al., 1997; Zatloukal et al., 2000). Sous l'effet du stress oxydatif, comme dans le cas de l'hépatite alcoolique, le réseau de kératine se désorganise et forme dans certains hépatocytes des agrégats appelés CMs. La fonction cellulaire de ces agrégations n'est pas encore déterminée et l'issue de la formation des CMs dans les hépatocytes reste controversée. Plusieurs modèles d'études *in vivo* ont été utilisés pour mieux comprendre le rôle des kératines dans les hépatocytes soumis à un stress. En effet, les souris déficientes en K8 ou en K18 de même que les souris exprimant une K18 humaine mutée (Arg89→Cys) sont davantage prédisposées aux lésions hépatiques induites par les drogues que les souris de type sauvage (Zatloukal et al., 2000; Ku et al., 1996; Loranger et al., 1997). L'intoxication de souris avec la GF ou le DDC a révélée l'importance de la phosphorylation des kératines dans la réorganisation du réseau de FIs (Salmhofer et al., 1994; Cadrin et al., 1995; Stumptner et al., 2000; Ku et al., 2002), dans la mitose (Ku et al., 2002b) et dans la protection des hépatocytes (Ku et al., 1998b; Ku et Omary, 2006).

Ces études n'ont cependant pas permis d'élucider les mécanismes moléculaires dans lesquels les kératines sont impliquées pour assurer la protection des hépatocytes contre l'apoptose. Au cours des dernières années, les études concernant le réseau de kératines dans les cellules épithéliales, et plus particulièrement dans les hépatocytes, ont

révélé que les protéines de FIs interagissent avec différentes molécules impliquées dans la signalisation cellulaire. Plusieurs kinases sont impliquées dans la phosphorylation des kératines, tel que PKC (Omary et al., 1992; Ridge et al., 2005), JNK (He et al., 2002) et p38 (Ku et al., 2002). Il a été démontré que la K18 phosphorylée s'associe avec les protéines 14-3-3 durant la mitose (Liao et Omary, 1996; Ku et al., 2002b; Ku et al., 1998) et qu'un réseau de kératines désorganisé module la progression du cycle cellulaire de même que la formation des desmosomes (Toivola et al., 2001). Les kératines de type I sont des substrats précoces des caspases dans le processus d'apoptose (Caulin et al., 1997; Ku et al., 1997) et l'association des K8/18 avec le récepteur au TNF- α (Caulin et al., 2000), l'effecteur TRADD (Inada et al., 2001), le DEDD (Lee et al., 2002; Schutte et al., 2006) et la protéine c-Flip (Gilbert et al., 2004) module l'activation de différentes voies de signalisation menant à l'apoptose.

La présente étude nous a permis de mettre au point un modèle *in vitro* pour l'étude de la phosphorylation des kératines et la formation des CMs. En effet, nous avons démontré que l'exposition des cellules HepG2 à la GF induit la réorganisation du réseau de FIs et la phosphorylation des kératines, tel qu'observé dans les hépatocytes de souris intoxiquées au même agent chimique (Denk et al., 1975). De plus, le traitement des cellules avec la GF entraîne la formation d'agrégats de K8/18 phosphorylées qui pourraient s'apparenter aux CMs. En effet, nous avons démontré la présence d'ubiquitine à l'intérieur de ces amas, qui est une protéine impliquée dans la dégradation cellulaire et composante des CMs (Ohta et al., 1988; Cadrin et al., 1992). De plus, nos résultats montrent que le traitement des cellules HepG2 avec la GF diminue la prolifération cellulaire et entraîne l'apoptose des cellules par la présence de la caspase 3 clivée.

Les travaux de Gilbert et al. ont démontré que l'absence de K8 dans les hépatocytes de souris modulait la distribution intracellulaire des FasR. Ils ont de plus rapporté une diminution de l'expression de la protéine c-Flip, qui régule la voie de signalisation du FasR (Gilbert et al., 2001; Gilbert et al., 2004). Ces résultats suggèrent donc que les kératines peuvent intervenir dans la cascade de signalisation initiée par le

FasR. Une étude récente a rapporté que la K17 phosphorylée joue un rôle dans l'activation de la voie de signalisation Akt/mTor, la synthèse des protéines et la prolifération des kératinocytes (Seyun et al., 2006). Il a aussi été démontré que les K10 et K16 peuvent moduler la translocation de la kinase Akt dans les kératinocytes (Paramio et al., 1999; Paramio et al., 2001). De plus, l'association de la K8 avec Akt dans les cellules MCF-7 a été démontré par co-immunoprécipitation (Vandermoere et al., 2007). Dans le présent travail, nous avons donc décidé de regarder si les K8/18 interagissent avec ces voies de signalisation dans notre modèle.

Le FasR est un récepteur de mort cellulaire exprimé de façon constitutive dans les hépatocytes et impliqué dans le processus d'apoptose lors de différentes maladies du foie, tel que les hépatites virales et les dommages induits par l'alcool (Galle et al., 1995; Hiramatsu et al., 1994; Ribeiro et al., 2004). Nos résultats montrent que les cellules HepG2 expriment le FasR et que le traitement à la GF n'affecte pas son niveau d'expression. Les FasR nouvellement synthétisés sont issus de l'appareil de Golgi et transportés vers la membrane plasmique par les microtubules. Il a été démontré dans une culture primaire d'hépatocytes de souris que lorsqu'on perturbe le réseau de microtubules avec un agent chimique tel que la colchicine, on observe une diminution de la densité de FasR à la surface de la cellule (Feng et Kaplowitz, 2000). Toutefois, des études récentes ont démontré que le réseau de kératines pouvait aussi intervenir dans la régulation de la translocation du FasR à la membrane cellulaire. Une augmentation de la densité des FasR à la membrane cellulaire a été observée dans des cultures primaires d'hépatocytes de souris déficientes en K8 (Gilbert et al., 2001). Ces résultats suggèrent que les kératines pourraient protéger la cellule contre l'apoptose induite par Fas en modulant sa translocation à la membrane. Nos résultats de marquages par immunofluorescence ont démontré que le FasR se situe à différents endroits dans la cellule. On le retrouve principalement de façon diffuse dans le cytoplasme ou à la périphérie du noyau, mais on l'observe aussi au niveau de la membrane plasmique de certaines cellules. Ces résultats suggèrent que le phénomène de translocation des FasR se produit dans notre modèle cellulaire. Cependant, puisque la GF est un agent antimicrotubulaire, il est possible que cet agent chimique influence la relocalisation du FasR

à la membrane cellulaire de la même façon que la colchicine. Alors qu'on aurait pu s'attendre à une diminution de la densité des FasR à la membrane suite au traitement à la GF, on observe au contraire une présence accrue des FasR au niveau de la membrane plasmique au cours du traitement. Ces résultats suggèrent donc que les kératines puissent jouer un rôle dans la translocation des FasR. Cependant, le mécanisme par lequel les kératines modulent la relocalisation des FasR n'est pas encore déterminé. Toutefois, nos résultats suggèrent qu'il existe une association entre les filaments de kératines et les FasR. En effet, notre étude montre que les FasR colocalisent avec les K8/18 phosphorylées dans les cellules HepG2 contrôles et traitées à la GF, ce qui supporte l'hypothèse de leur implication dans la translocation des FasR. L'activation du FasR par le FasL entraîne l'induction de l'apoptose dans les hépatocytes. En effet, le FasL est exprimé principalement par les tissus lymphoïdes, mais est aussi exprimé par les hépatocytes dans certaines conditions. Dans un foie sain, l'expression de l'ARNm du FasL n'est pas détectable, mais atteint des niveaux importants dans les hépatocytes ayant subi un stress toxique (Galle et al., 1995). Dans le cas de cirrhoses associées aux hépatites virales, cette surexpression d'ARNm est localisée dans la région d'infiltration des lymphocytes. Toutefois, dans le cas de cirrhoses alcooliques, une très forte présence de l'ARNm du FasL est principalement détectée dans des zones où on retrouve davantage d'hépatocytes que de lymphocytes (Galle et al., 1995). Puisque la voie de signalisation de Fas semble activée dans notre modèle d'étude, de par la translocation des FasR à la membrane, nous avons émis l'hypothèse que **les cellules HepG2 puissent exprimer le FasL et que le processus d'apoptose soit donc enclenché de façon paracrine.**

Akt est un médiateur important de la survie cellulaire, en stimulant la prolifération et la croissance des cellules ou en inhibant le processus d'apoptose. Il a d'ailleurs été démontré que Akt joue un rôle protecteur contre l'apoptose induite par Fas dans des cultures primaires d'hépatocytes (Hatano et Brenner, 2002; Gibson et al., 1999). Nous avons donc voulu vérifier si la protéine Akt pouvait jouer un rôle dans la réponse au stress des cellules HepG2 et la phosphorylation des kératines, par sa fonction kinase. Nos résultats démontrent que la kinase Akt est phosphorylée dans les cellules soumises

au stress induit par la GF. La présence d'Akt phosphorylée dans les cellules contrôles de 8h et 24h s'explique par son implication dans la croissance et la prolifération cellulaire. En effet, la courbe de croissance des cellules HepG2 que nous avons obtenue par un essai de prolifération au MTT nous indique que les cellules prolifèrent jusqu'à 24h après l'ensemencement. Les marquages par immunofluorescence montrent la présence de la protéine Akt phosphorylée dans le cytoplasme des cellules contrôles en cours de mitose. Dans les cellules traitées à la GF, Akt phosphorylée se retrouve principalement dans le cytoplasme des cellules, mais aussi au niveau de la membrane plasmique. De plus, le marquage pour Akt phosphorylée colocalise avec celui pour les K8/18 dans certaines cellules. Les analyses biochimiques confirment que la kinase Akt est exprimée dans les cellules HepG2 et que sous l'effet du stress toxique induit par la GF, sa phosphorylation augmente et ce de façon similaire à la phosphorylation des K8.

Puisque la kinase Akt est responsable de la phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire, nous avons voulu vérifier si la phosphorylation des kératines pouvait lui être attribuée. Nous avons utilisé un inhibiteur de la voie de signalisation de PI3K/Akt, la wortmannin, afin d'empêcher la phosphorylation et l'activation de Akt. Les analyses biochimiques démontrent que l'inactivation d'Akt n'influence pas la phosphorylation des K8 dans les cellules HepG2 contrôles. Par contre, on observe une certaine diminution de la phosphorylation des K8 dans les cellules exposées à la GF. Cela suggère que la kinase Akt puisse jouer un rôle dans la phosphorylation des K8 en situation de stress toxique. De plus, nos résultats montrent que la kinase Akt participe à la survie des cellules HepG2 en réponse au stress induit par la GF. En effet, les fragments issus du clivage de la caspase 3 augmentent dans les cellules HepG2 en présence de l'inhibiteur de PI3K par rapport aux cellules contrôles. Cette augmentation est aussi observée dans les cellules traitées à la GF, qui montrent déjà un certain niveau de caspase 3 clivée. À partir de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle **la kinase Akt pourrait jouer un rôle dans la protection des cellules HepG2 contre l'apoptose induite par la GF.**

Nous avons donc voulu vérifier si cette protection contre l'apoptose intervenait dans le processus d'apoptose induite par Fas. La kinase Akt n'influence pas les niveaux d'expression du FasR, comme l'ont démontré plusieurs études, mais peut réguler l'expression de son ligand (Kasibhatla et al., 1998; Brunet et al., 1999; Suhara et al., 2002). La régulation de l'expression du FasL nécessite l'implication de différents facteurs de transcription, incluant le FKHRL1 (Suhara et al., 2002; Brunet et al., 1999), le NF- κ B et le AP-1 (Kasibhatla et al., 1998). Des études ont démontré que le FKHRL1 est un substrat direct de la kinase Akt (Brunet et al., 1999). La phosphorylation de FKHRL1 par Akt entraîne sa séquestration dans le cytoplasme suite à son association avec les protéines de la famille 14-3-3. La translocation du FKHRL1 au noyau est alors empêchée et la transcription de différents gènes de mort cellulaire est inhibée, dont celui codant pour le FasL. En effet, Brunet et al. ont démontré que le FKHRL1 interagit avec l'ADN et qu'il possède plusieurs séquences consensus pouvant se lier au promoteur du gène du FasL. D'autres facteurs de transcription tel que le NF- κ B et le AP-1 sont aussi connus pour jouer un rôle dans la transcription du FasL lors de stress induits par l'etoposide, le teniposide et les radiations ultra-violetes (Kasibhatla et al., 1998). Puisque le NF- κ B est connu comme substrat direct (Ozes et al., 1999; Romashkova et Makarov, 1999; Kane et al., 1999) ou indirect (Sizemore et al., 1999) de la protéine Akt, la voie de signalisation de PI3K/Akt pourrait donc jouer un rôle dans la régulation de l'expression du FasL via certains facteurs de transcription. Nos résultats par western blot montrent que l'inactivation de Akt n'influence pas de façon significative les niveaux d'expression du FasR dans les cellules HepG2. Il en est de même pour les niveaux d'ARNm du FasL qui ne semblent pas varier entre les cellules contrôles et celles dont la protéine Akt a été inactivée. Le rôle de la protéine Akt dans la survie des cellules HepG2 soumises au stress induit par la GF ne semble donc pas associé à l'inhibition de la voie pro-apoptotique de Fas/FasL. Il serait toutefois intéressant de vérifier les niveaux d'expression des facteurs de transcription FKHRL1, NF- κ B et AP-1 dans les cellules HepG2 exposées à la GF et/ou à la wortmannin, afin de déterminer leur implication dans la réponse cellulaire au stress toxique.

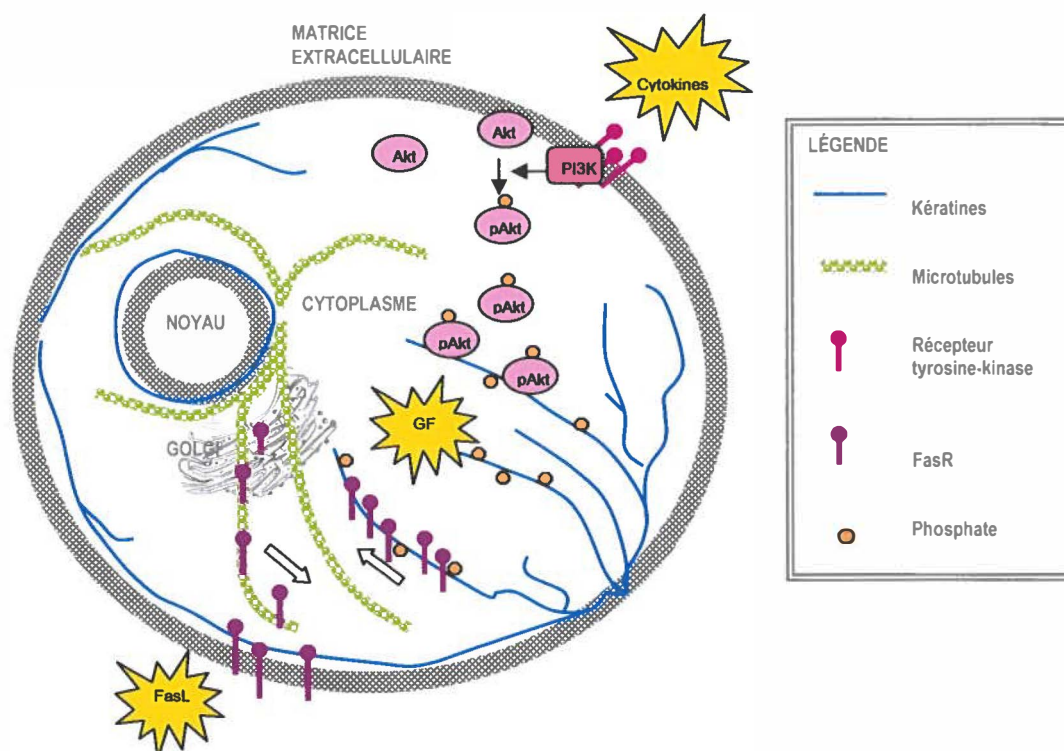


FIGURE 5.1 Schéma récapitulatif des hypothèses concernant le rôle de la phosphorylation des kératines dans les voies de signalisation d'Akt et de FasR en situation de stress toxique. La griséofulvine (GF) induit la phosphorylation des kératines, permettant leur association avec Akt phosphorylée (pAkt) et le récepteur Fas (FasR). Les kératines phosphorylées modulent la localisation de pAkt afin de favoriser son activité kinase dans le cytoplasme. Les FasR issus de l'appareil de Golgi sont transportés à la membrane plasmique par les microtubules. Les kératines phosphorylées modulent la translocation des FasR afin de diminuer leur densité au niveau de la membrane plasmique. Selon ces hypothèses, la protection contre l'apoptose induite par la phosphorylation des kératines serait la conséquence de leur implication dans la signalisation cellulaire anti-apoptotique, en favorisant l'activité kinase de Akt et en modulant la translocation des FasR à la membrane plasmique.

Dans certaines cellules, il y a colocalisation du réseau de kératines avec la protéine Akt phosphorylée ainsi qu'avec le FasR. Ces résultats montrent qu'il existe une interaction entre les filaments de kératines et ces protéines. Cependant, ils ne nous permettent pas de spécifier s'il s'agit d'une interaction directe ou indirecte via d'autres protéines. Des études ont déjà démontré que le réseau de kératines peut influencer la translocation et la densité des FasR à la membrane cellulaire (Gilbert et al., 2001), mais l'association directe des FasR avec le réseau de kératines reste à déterminer. D'autres chercheurs ont montré que les K10 et K16 pouvaient s'associer à la protéine Akt et influencer sa translocation intracellulaire (Paramio et al., 2001; Paramio et al., 1999). De

plus, il a été démontré récemment que la K8 co-immunoprécipite avec Akt dans les cellules MCF-7 (Vandermoere et al., 2007). Toutefois, aucune étude n'a rapporté que les K8/18 peuvent interagir avec le FasR et Akt dans les hépatocytes en situation de stress toxique. À partir des études antérieures et des résultats que nous avons obtenus, nous suggérons que **les filaments de kératine puissent jouer un rôle dans la translocation ou la séquestration du FasR et de la kinase Akt.**

5.2 Perspectives d'avenir

Les résultats obtenus dans cette étude nous ont permis d'émettre de nouvelles hypothèses quant au rôle des kératines dans la réponse cellulaire au stress toxique induit par la GF. Nous avons démontré que le traitement à la GF pouvait moduler la distribution intracellulaire du FasR dans les cellules HepG2, ce qui suggère que l'apoptose des cellules observée dans notre modèle soit médiée par la voie de signalisation de Fas/FasL. Afin de vérifier si les cellules HepG2 peuvent exprimer le FasL en situation de stress induit par la GF, il serait intéressant d'effectuer des analyses par RT-PCR pour détecter la présence d'ARNm du FasL dans les cellules HepG2 et déterminer si le traitement à la GF peut moduler la transcription du gène. La technique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) pourrait être un autre moyen de déterminer si les cellules HepG2 peuvent sécréter le FasL sous forme soluble dans le milieu de culture et ainsi enclencher le processus d'apoptose de façon paracrine.

Le traitement à la GF influence aussi la phosphorylation de la kinase Akt. En effet, nos résultats ont montré une augmentation de la phosphorylation de Akt dans les cellules HepG2 exposées à la GF, ce qui suggère son implication dans la réponse cellulaire face au stress induit par la GF. De plus, l'inhibition de l'activité kinase de Akt entraîne le clivage de la caspase 3, confirmant ainsi le rôle anti-apoptotique de Akt phosphorylée dans notre modèle. Pour déterminer si la kinase Akt peut effectivement jouer un rôle dans la protection des cellules HepG2 contre l'apoptose induite par la GF, il serait intéressant d'exprimer dans les cellules HepG2 un ARN interférent avec l'ARNm de Akt, afin de diminuer sa traduction en protéine. Il serait alors possible de déterminer son

implication dans la réorganisation et la phosphorylation du réseau de FIs, de même que dans la réponse cellulaire au stress toxique. De plus, il faudrait vérifier les niveaux d'expression des substrats de la kinase Akt qui peuvent être impliqués dans l'apoptose des cellules HepG2 tel que la procaspase 9, dont l'activation précède celle de la procaspase 3 dans le processus d'apoptose par voie intrinsèque, ainsi que FKHRL1, AP-1 et NF- κ B, qui peuvent moduler la transcription du gène du FasL.

Nos résultats par immunofluorescence nous ont aussi permis de démontrer une association entre le récepteur Fas et les K8/18 phosphorylées, de même qu'entre la kinase Akt phosphorylée et les K8/18 phosphorylées dans les cellules HepG2. En effet, les marquages colocalisent dans la majorité des cellules contrôles. De plus, on remarque une relocalisation intracellulaire du FasR et de la protéine Akt phosphorylée au cours du traitement à la GF, dont le marquage colocalise avec les K8/18 phosphorylées. Ces résultats suggèrent qu'une association existe entre le réseau de kératines et ces protéines de signalisation intracellulaire. Il serait donc intéressant d'effectuer une co-immunoprécipitation afin de déterminer si les filaments de kératine peuvent interagir avec ces protéines et jouer un rôle dans la translocation ou la séquestration du FasR et de la kinase Akt.

De récentes études ont permis de soulever un rôle possible des kératines dans la protection contre l'apoptose par leur capacité à prévenir la phosphorylation et l'activation de différents médiateurs de l'apoptose, en servant « d'éponge à phosphate » qui absorbe l'activité kinase des SAPK. En agissant comme amortisseur de l'activité des SAPK et par leur capacité à positionner et séquestrer différentes molécules signalisatrices, les kératines peuvent jouer un rôle déterminant dans la régulation des processus cellulaires (figure 5.1). D'autres études ont démontré que les kératines peuvent influencer l'assemblage et la distribution membranaire des desmosomes, importantes structures d'adhésion intercellulaire, ce qui suggère un rôle pour les kératines dans la transduction de signal entre les cellules (Toivola et al., 2001; Loranger et al., 2006).

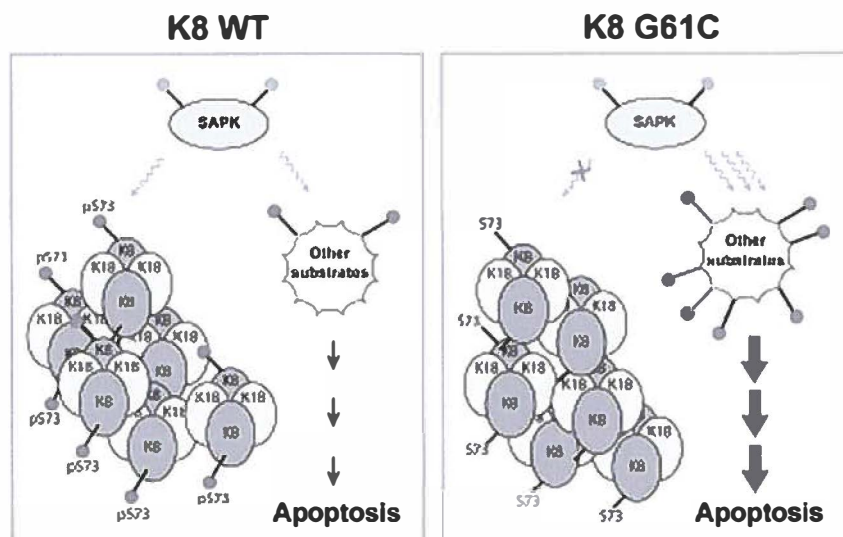


FIGURE 5.2 Modèle représentant la capacité des K8 à «absorber» la phosphorylation destinée à d'autres substrats et la conséquence de leur mutation sur cette fonction. K8 WT : kératine 8 de type sauvage, K8 G61C : kératine 8 mutée au niveau de la glycine 61, SAPK : stress-activated kinases, S73 : sérine 73 de la kératine 8, pS73 : sérine 73 phosphorylée (Ku et Omary, 2006).

Bien que les FIs aient été à l'origine considérés comme un réseau statique du cytosquelette, les différentes études effectuées au cours des dernières années ont démontré qu'il s'agit de protéines hautement dynamiques. Par leur interaction avec différentes molécules de signalisation cellulaire et leur capacité à séquestrer et à positionner ces protéines, les kératines pourraient jouer un rôle dans la modulation de la réponse cellulaire au stress par son implication dans la signalisation intracellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current Biology* 7:261-269.
- Ameen NA, Figueroa Y, Salas PJ (2001) Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *Journal of Cell Science* 114:563-575.
- Arcaro A, Wymann MP (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochemical Journal* 296(2):297-301.
- Archambault A. TABReSEA (1994) *Principes fondamentaux de gastro-entérologie : états pathologiques et démarches thérapeutiques*. Association Canadienne de Gastro-Entérologie et Astra Pharma ed Mississauga.
- Bardag-Gorce F, French BA, Nan L, Song H, Nguyen SK, Yong H, Dede J, French SW (2006) CYP2E1 induced by ethanol causes oxidative stress, proteasome inhibition and cytokeratine aggresome (Mallory body-like) formation. *Experimental and Molecular Pathology* 81:191-201.
- Bardag-Gorce F, Leeuwen F, Nguyen V, French BA, Li J, Riley NE, McPhaul L, Lue YH, French SW (2002) The role of the ubiquitin-proteasome pathway in the formation of Mallory bodies. *Experimental and Molecular Pathology* 73:75-83.
- Bardag-Gorce F, Vu J, Nan L, Riley NE, French SW (2004) Proteasome inhibition induces cytokeratin accumulation in vivo. *Experimental and Molecular Pathology* 76:83-89.
- Baribault H, Penner J, Iozzo R, Wilson-Heiner M (1994) Colorectal hyperplasia and inflammation in keratin 8-deficient FVB/N mice. *Genes & Development* 8(24):2964-2973.
- Baribault H, Price J, Miyai K, Oshima R (1993) Mid-gestational lethality in mice lacking keratin 8. *Genes & Development* 7(7A):1191-1202.
- Bauman PA, Dalton WS, Anderson JM, Cress AE (1994) Expression of cytokeratin confers multiple drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(12):5311-5314.
- Brûlet P, Babinet C, Kemler R, Jacob F (1980) Monoclonal antibodies against trophectoderm-specific markers during mouse blastocyst formation. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America 77(7):4113-4117.

- Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylation and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.
- Cadrin M, Kawahara H, Ohta M, Katsuma Y, Marceau N, French SW (1990) Mallory bodies in hepatomas and hyperplastic nodules: in vitro and in vivo studies, in *Mouse liver carcinogenesis: mechanisms and species comparisons*, pp 231-248.
- Cadrin M, Marceau N, French SW (1992) Cytokeratin of apparent high molecular weight in livers from griseofulvin-fed mice. *Journal of Hepatology* 14:226-231.
- Cadrin M, Martinoli M-G (1995) Alterations of intermediate filaments in various histopathological conditions. *Biochemistry of cell biology* 73:627-634.
- Cadrin M, McFarlane-Anderson N, Aasheim L, Kawahara H, Franks D, French SW (1995) Modifications in cytokeratin and actin in cultured liver cells derived from griseofulvin-fed mice. *Laboratory Investigation* 72(4):453-460.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321.
- Castaneda F, Kinne RKH (2001) Apoptosis induced in HepG2 cells by short exposure to millimolar concentrations of ethanol involves the Fas-receptor pathway. *Journal of Cancer Research in Clinical Oncology* 127:418-424.
- Caulin C, Salvesen GS, Oshima R (1997) Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *Journal of Cell Biology* 138(6):1379-1394.
- Caulin C, Ware C, Magin TM, Oshima R (2000) Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Journal of Cell Biology* 149(1):17-22.
- Chen Q, Cederbaum AI (1998) Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P450 2E1 in HepG2 cells. *Molecular Pharmacology* 53:638-648.
- Chou C-F, Omary MB (1991) Phorbol acetate enhances the phosphorylation of cytokeratins 8 and 18 in human colonic epithelial cells. *FEBS Letters* 282(1):200-204.
- Chou C-F, Riopel CL, Rott LS, Omary MB (1993) A significant soluble keratin fraction in 'simple' epithelial cells. Lack of an apparent phosphorylation and glycosylation role in keratin solubility. *Journal of Cell Science* 105:433-444.

- Ciechanover A (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79:13-21.
- Coulombe PA, Omary MB (2002) 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current opinion in cell biology* 14:110-122.
- Cryns V, Yuan J (1998) Proteases to die for. *Genes & Development* 12(11):1551-1570.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & Development* 13:2905-2927.
- Denk H, Gschnait F, Wolff K (1975) Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation. *Laboratory Investigation* 32:773-776.
- Denk H, Stumptner C, Zatloukal K (2000) Mallory bodies revisited. *Journal of Hepatology* 32:689-702.
- Diehl AM (2002) Liver disease in alcohol abusers: clinical perspective. *Alcohol* 27:7-11.
- Dockrell DH, Badley AD, Villacian JS, Heppelmann CJ, Algeciras A, Ziesmer S, Yagita H, Lynch DH, Roche PC, Leibson PJ, Paya CV (1998) The expression of Fas Ligand by macrophages and its upregulation by human immunodeficiency virus infection. *Journal of Clinical Investigation* 101(11):2394-2405.
- Downward J (1999) How Bad phosphorylation is good for survival. *Nature Cell Biology* 1:E33-E35.
- Fausther M, Villeneuve L, Cadrin M (2004) Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory Body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice. *Comparative Hepatology* 3(5).
- Feng G, Kaplowitz N (2000) Colchicine protects mice from the lethal effect of an agonistic anti-Fas antibody. *Journal of Clinical Investigation* 150(3):329-339.
- Franke WW, Denk H, Schmid E, Osborn M, Weber K (1979) Ultrastructural, biochemical and immunologic characterization of Mallory bodies in livers of griseofulvin-treated mice. Fimbriated rods of filaments containing prekeratin-like polypeptides. *Laboratory investigation* 40:207-220.
- Fuchs E (1994) Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength. *Journal of Cell Biology* 125(3):511-516.
- Fuchs E, Cleveland DW (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279:514-519.

- Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L (1995) Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *Journal of Experimental Medicine* 182:1223-1230.
- Gibson S, Tu S, Oyer R, Anderson SM, Johnson GL (1999) Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *Journal of Biological Chemistry* 274(25):17612-17618.
- Gilbert S, Loranger A, Daigle N, Marceau N (2001) Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *Journal of Cell Biology* 154(4):763-773.
- Gilbert S, Loranger A, Marceau N (2004) Keratins modulate c-Flip/extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 antiapoptotic signaling in simple epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology* 24(16):7072-7081.
- Hanada S, Harada M, Kumemura H, Omary MB, Kawaguchi T, Taniguchi E, Koga H, Yoshida T, Maeyama M, Baba S, Ueno T, Sata M (2005) Keratin-containing inclusions affect cell morphology and distribution of cytosolic cellular components. *Experimental Cell Research* 304:471-482.
- Harada M, Kumemura H, Omary MB, Kawaguchi K, Maeyama N, Hanada S, Taniguchi E, Koga H, Saganuma T, Ueno T, Sata M (2003) Proteasome inhibition induces inclusion bodies associated with intermediate filaments and fragmentation of the Golgi. *Experimental Cell Research* 288:60-69.
- Hatano E, Brenner DA (2002) Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis through NK-kappa B activation. *American Journal of Physiology* 282:G1357-1368.
- He T, Stepulak A, Holmstrom TH, Omary MB, Eriksson JE (2002) The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase. *Journal of Biological Chemistry* 277(13):10767-10774.
- Herrmann H, Aebi U (1998) Structure, assembly and dynamics of intermediate filaments, in *Subcellular Biochemistry, volume 31: Intermediate Filaments*, (Harris Ha ed, pp 319-355. Plenum Press, New York.
- Hiramatsu N, Hayashi N, Katayama K, Mochizuki K, Kawanishi Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T (1994) Immunohistochemical detection of Fas antigen in liver tissue of patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 19:1354-1359.
- Inada H, Izawa I, Nishizawa M, Fujita E, Kiyono T, Takahashi T, Momoi T, Inagaki M (2001) Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. *Journal of Cell Biology* 155(3):415-425.

- Izawa I, Inagaki M (2006) Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: A study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Science* 97(3):167-174.
- Janmey PA, Euteneuer U, Traub P, Schliwa M (1991) Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *Journal of Cell Biology* 113(1):155-160.
- Jensen K, Gluud C (1994) The Mallory body: morphological, clinical, and experimental studies (part 1 of a literature survey). *Hepatology* 20(4):1061-1077.
- Jimenez-Lopez JM, Cederbaum AI (2005) CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity: role in ethanol-induced liver injury. *Expert opinion on drug metabolims & toxicology* 1(4):671-685.
- Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A (1999) Induction of NF- κ B by the Akt/PKB kinase. *Current Biology* 9:601-604.
- Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR (1998) DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Molecular cell* 1:543-551.
- Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N (1999) Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome *c* from mitochondria. *Molecular and Cellular Biology* 19:5800-5810.
- Kierszenbaum AL (2006) *Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique*. 1st ed. De Boeck Université, Bruxelles.
- Kim D, Chung J (2002) Akt : versatile mediator of cell survival and beyond *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35(1):106-115.
- Kirfel J, Magin T, Reichelt J (2003) Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cellular and Molecular Life Science* 60:56-71.
- Kops GJ, de Rooter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature (London)* 398:630-634.
- Kouklis PD, Hutton E, Fuchs E (1994) Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *Journal of Cell Biology* 127(4):1049-1060.
- Ku N-O, Azhar S, Omary MB (2002) Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization. *Journal of Biological Chemistry* 277(13):10775-10782.

- Ku N-O, Liao J, Omary MB (1997) Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *Journal of Biological Chemistry* 272(52):33197-33203.
- Ku N-O, Liao J, Omary MB (1998) Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO Journal* 17(7):1892-1906.
- Ku N-O, Michie S, Oshima RG, Omary MB (1995) Chronic hepatitis, hepatocyte fragility, and increased soluble phosphoglycokeratins in transgenic mice expressing a keratin 18 conserved arginine mutant. *Journal of Cell Biology* 131(5):1303-1314.
- Ku N-O, Michie S, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB (2002b) Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(7):4373-4378.
- Ku N-O, Michie S, Soetikno RM, Resurreccion EZ, Broome RL, Omary MB (1998b) Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice. *Journal of Cell Biology* 143(7):2023-2032.
- Ku N-O, Michie S, Soetikno RM, Resurreccion EZ, Broome RL, Oshima R, Omary MB (1996) Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice that express a dominant-negative keratin 18 mutant. *Journal of Clinical Investigation* 98(4):1034-1046.
- Ku N-O, Omary MB (1994) Identification of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 18: potential kinases and a role in filament reorganization. *Journal of Cell Biology* 127(1):161-71.
- Ku N-O, Omary MB (1997a) Phosphorylation of human keratin 8 *in vivo* at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431. *Journal of Biological Chemistry* 272(11):7556-7564.
- Ku N-O, Omary MB (2006) A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *Journal of Cell Biology* 171(1):115-125.
- Ku N-O, Zhou X, Toivola DM, Omary MB (1999) The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *American Journal of Physiology* 277:G1108-G1137.
- Lee JC, Schickling O, Stegh AH, Oshima RG, Dinsdale D, Cohen GM, Peter ME (2002) DEDD regulates degradation of intermediate filaments during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 158(6):1051-1066.

- Liao J, Ku N-O, Omary MB (1997) Stress, apoptosis and mitosis induce phosphorylation of human keratin 8 at ser-73 in tissues and cultured cells. *Journal of Biological Chemistry* 272(28):17565-17573.
- Liao J, Lowthert LA, Ku N-O, Fernandez R, Omary MB (1995a) Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. *Journal of Cell Biology* 131(5):1291-1301.
- Liao J, Lowthert LA, Omary MB (1995b) Heat stress or rotavirus infection of human epithelial cells generates a distinct hyperphosphorylated form of keratin 8. *Experimental Cell Research* 219(2):348-357.
- Liao J, Omary MB (1996) 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *Journal of Cell Biology* 133(2):345-357.
- Loranger A, Duclos S, Grenier A, Price J, Wilson-Heiner M, Baribault H, Marceau N (1997) Simple epithelium keratins are required for maintenance of hepatocyte integrity. *American Journal of Pathology* 151(6):1673-1683.
- Loranger A, Gilbert S, Brouard J-S, Magin TM, Marceau N (2006) Keratin 8 modulation of desmoplakin deposition at desmosomes in hepatocytes. *Experimental Cell Research* 312(20):4108-4119.
- Lowry OH, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-275.
- Magin T, Schroder R, Leitgeb S, Wanninger F, Zatloukal K, Grund C, Melton DW (1998) Lessons from keratin 18 knockout mice: formation of novel keratin filaments, secondary loss of keratin 7 and accumulation of liver-specific keratin 8-positive aggregates. *Journal of Cell Biology* 140(6):1441-1451.
- Magin TM (1998) Lessons from keratin transgenic and knockout mice, in *Subcellular Biochemistry, volume 31: Intermediate Filaments*, (Harris Ha ed, vol 31, pp 141-172. Plenum Press, New York.
- Nakamichi I, Hatakeyama S, Nakayama KI (2002) Formation of Mallory Body-like inclusions and cell death induced by deregulated expression of keratin 18. *Molecular Biology of the Cell* 13:3441-3451.
- Nakanishi S, Kakita S, Takahashi I, Kawahara K, Tsukuda E, Sano T, Yamada K, Yoshida M, Kase H, Y M (1992) Wortmannin. a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *The Journal of biological chemistry* 267(4):2157-2163.

- Nan L, Wu Y, Bardag-Gorce F, Li J, French BA, Fu AN, Francis T, Vu J, French SW (2004) p62 is involved in the mechanism of Mallory body formation. *Experimental and Molecular Pathology* 77:168-175.
- Ni R, Tomita Y, Matsuda K, Ichihara A, Ishimura K, Ogasawara J, Nagata S (1994) Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Experimental Cell Research* 215(2):332-337.
- Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature (London)* 364:806-809.
- Ohta M, Marceau N, Perry G, Manetto V, Gambetti P, Auttilo-Gambetti L, Metzuzals J, Kawahara H, Cadrin M, French SW (1988) Ubiquitin is present on the cytokeratin intermediate filaments and Mallory Bodies of hepatocytes. *Laboratory Investigation* 59(6):848-856.
- Omary MB, Baxter GT, Chou C-F, Riopel CL, Lin WY, Strulovici B (1992) PKC ϵ -related kinase associates with and phosphorylates cytokeratin 8 and 18. *Journal of Cell Biology* 117(3):583-593.
- Omary MB, Ku N-O (1997) Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions. *Hepatology* 25(5):1043-1048.
- Omary MB, Ku N-O, Liao J, Price D (1998) Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and *in vitro*, in *Subcellular Biochemistry, volume 31: Intermediate Filaments*, (Harris Ha ed, vol 31, pp 105-140. Plenum Press, New York.
- Omary MB, Ku N-O, Tao G-Z, Toivola DM, Liao J (2006) "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends in Biochemical Sciences* 31(7):383-394.
- Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S (1996) Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *Journal of Immunology* 157(7):2909-2915.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401:82-85.
- Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, Mitnacht S, Lane EB, Jorcano JL (1999) Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. *Molecular and Cellular Biology* 19(4):3086-3094.

- Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, Jorcano JL (2001) Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKC γ mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Molecular and Cellular Biology* 21(21):7449-7459.
- Pei RJ, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Tsubura A (2004) Immunohistochemical profiles of Mallory body by a panel of anti-cytokeratin antibodies. *Medical electron microscopy* 37:114-118.
- Pinkoski MJ, Brunner T, Green DR, Lin T (2000) Fas and Fas ligand in gut and liver. *American Journal of Physiology* 278(3):G354-G366.
- Poupon R (2003) Association nationale des déficients et transplantés hépatiques. <http://pagesperso.aol.fr/transhepat/TH-Transhepate.html>.
- Ramaekers FC, Bosman FT (2004) The cytoskeleton and disease. *Journal of Pathology* 204:351-354.
- Reed JC (2001) Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends in Molecular Medicine* 7(7):314-319.
- Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG, Cohen P (1999) Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry* 274:17179-17183.
- Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CMP (2004) Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF- κ B in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *American Journal of Gastroenterology* 99:1708-1717.
- Ridge K, Linz L, Flitney F, Kuckmarski E, Chou Y, Omary MB, Sznajder J, Goldman RD (2005) Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 280(34):30400-30405.
- Riley NE, Li J, McPhaul L, Bardag-Gorce F, Lue YH, French SW (2003) Heat shock proteins are present in Mallory bodies (cytokeratin aggregates) in human liver biopsy specimens. *Experimental and Molecular Pathology* 74:168-172.
- Romashkova JA, Makarov SS (1999) NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401:86-90.
- Salmhofer H, Rainer I, Zatloukal K, Denk H (1994) Posttranslational events involved in griseofulvin-induced keratin cytoskeleton alterations. *Hepatology* 20(3):731-740.
- Schutte B, Henfling M, Ramaekers FC (2006) DEDD association with cytokeratin filaments correlates with sensitivity to apoptosis. *Apoptosis* 11(9):1561-1572.

- Seyun K, Wong P, Coulombe PA (2006) A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* 441(18):362-365.
- Sizemore N, Leung S, Stark GR (1999) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Molecular and cellular biology* 19(7):4798-4805.
- St-Germain M-E, Gagnon V, Mathieu I, Parent S, Asselin É (2004) Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *International Journal of Oncology* 24:1311-1324.
- Stappenbeck TS, Green KJ (1992) The desmoplakin carboxyl terminus coaligns with and specifically disrupts intermediate filament networks when expressed in cultured cells. *Journal of Cell Biology* 116(5):1197-1209.
- Stumptner C, Heid H, Fuchsbichler A, Hauser H, Mischinger H-J, Zatloukal K, Denk H (1999) Analysis of intracytoplasmic hyaline bodies in a hepatocellular carcinoma. *American Journal of Pathology* 154(6):1701-1710.
- Stumptner C, Omary MB, Fickert P, Denk H, Zatloukal K (2000) Hepatocyte cytokeratins are hyperphosphorylated at multiple sites in human alcoholic hepatitis and in a Mallory body mouse model. *American Journal of Pathology* 156(1):77-90.
- Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S (1995) Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *Journal of Immunology* 154(8):3806-3813.
- Suhara T, Kim H-S, Kirshenbaum LA, Walsh K (2002) Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation *Molecular and Cellular Biology* 22(2):680-691.
- Tang D, Okada H, Ruland J, Liu L, Stambolic V, Mak TW, Ingram AJ (2001) Akt is activated in response to an apoptotic signal. *Journal of Biological Chemistry* 276(32):30461-30466.
- Toivola DM, Ku N-O, Resurreccion EZ, Nelson DR, Wright TL, Omary MB (2004) Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology* 40:459-466.
- Toivola DM, Nieminen MI, Hesse M, He T, Baribault H, Magin TM, Omary MB, Eriksson JE (2001) Disturbances in hepatic cell-cycle regulation in mice with assembly-deficient keratins 8/18. *Hepatology* 34(6):1174-1183.

- Toivola DM, Tao G-Z, Habtezion A, Liao J, Omary MB (2005) Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends in Cell Biology* 15(11):608-617.
- Toker A, Newton AC (2000) Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *Journal of Biological Chemistry* 275(12):8271-8274.
- Tsunoo C, Harwood T, Arak S, Yokoo H (1987) Cytoskeletal alterations leading to Mallory body formation in livers of mice fed 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine. *Journal of Hepatology* 5:85-97.
- Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Demon Y, Slomianny C, Antol J, Lemoine J, Hondermarck H (2007) Proteomics exploration reveals that actin is a signaling target of the kinase Akt. *Molecular & Cellular Proteomics* 6(1):114-124.
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochemical Journal* 346:561-576.
- Vassar R, Coulombe PA, Degenstein L, Albers K, Fuchs E (1991) Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64(2):365-380.
- Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y (1993) Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *Journal of Biological Chemistry* 268(34):25846-56.
- Yokoo H, Harwood T, Racker D, Arak S (1982) Experimental production of Mallory bodies in mice by diet containing 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine. *Gastroenterology* 83:109-113.
- Yuan Q, French BA, French SW (1998a) Tautomycin induces extensive Mallory body formation in drug primed mouse livers *Hepatology* 28:256A.
- Yuan QX, Nagao Y, Gaal K, Hu B, French SW (1998b) Mechanism of Mallory body formation induced by okadaic acid in drug-primed mice *Experimental and Molecular Pathology* 65:87-103.
- Zackroff RV, Goldman RD (1979) In vitro assembly of intermediate filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(12):6226-6230.
- Zatloukal K, French SW, Stumptner C, Strnad P, Harada M, Toivola DM, Cadrin M, Omary MB (2007) From Mallory to Mallory-Denk bodies: What, how and why? *Experimental Cell Research (submitted for publication)*.

- Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Fickert P, Lackner C, Trauner M, Denk H (2004) The keratin cytoskeleton in liver diseases. *Journal of Pathology* 204:367-376.
- Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsbichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, Kleinert R, Prinz M, Aguzzi A, Denk H (2002) p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *American Journal of Pathology* 160(1):255-263.
- Zatloukal K, Stumptner C, Lehner M, Denk H, Baribault H, Eshkind LG, Franke WW (2000) Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory Bodies. *American Journal of Pathology* 156(4):1263-1274.