

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
CHRISTIAN NDOFUSU MAYEMBA

RÔLE DE LA PHOSPHORYLATION DES KÉRATINES 8/18 DANS
LA MODULATION DE LA VOIE DE SURVIE PI3K/AKT/NF-κB
EN RÉPONSE AU STRESS CYTOTOXIQUE

JANVIER 2019

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

C'est avec beaucoup de gratitude que je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce projet et de m'initier tant soit peu à la recherche. Premièrement, je pense à ma directrice de recherche Monique Cadrin Ph.D. pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe et m'avoir donné par votre encadrement la possibilité d'accroître mes connaissances scientifiques et techniques. Je remercie également mon co-directeur Eric Asselin PhD. pour ses orientations qui m'ont permis de découvrir mes limites et de parfaire continuellement mon apprentissage. J'aimerais aussi remercier de tout cœur Sophie Parent pour ses conseils judicieux et l'intérêt pour ce travail. Mes remerciements s'en vont également à Nadeem, Kevin, François, Dadou, Stéphanie, France-Hélène, Pascal et Laurence pour l'aide et le soutien technique. Je ne saurais finir ses mots sans remercier ma conjointe Mariette Atshongya pour sa présence et son soutien affectif tout au long de ce parcours d'études, avec elle je pense spécialement à nos enfants, Alvaro et Roxanne, pour le courage qu'ils m'ont donné aux moments difficiles.

RÉSUMÉ

Les kératines 8/18 sont les principales protéines de filaments intermédiaires exprimées au niveau des cellules d'épithéliums simples. Plusieurs modifications post-traductionnelles affectant leurs résidus d'acides aminés ont été caractérisées et rapportées pour réguler l'organisation ainsi que les fonctions de ces filaments. Par exemple, la phosphorylation des résidus sérine des kératines 8/18 est associée à la protection des hépatocytes contre l'apoptose induite par des agents cytotoxiques. La phosphorylation des kératines 8/18 serait aussi impliquée dans certains processus physiologiques comme la croissance et la migration cellulaires. Des études récentes suggèrent que la phosphorylation des kératines 8/18 joue un rôle dans la régulation de certaines voies de signalisation cellulaire. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus sont loin d'être clairement élucidés. Dans la présente étude, nous avons exploré la dynamique d'expression et de phosphorylation des kératines 8/18 en réponse à un stress cytotoxique de type chimique ainsi que leurs interactions avec les protéines de la voie de survie PI3K/Akt/NF-κB. Dans cette étude, nous avons utilisé deux lignées cellulaires hépatiques, les HepG2 et Hep3B. Après induction chimique du stress cellulaire par deux composés pharmacologiques activant la p38 MAPK, nous montrons qu'il y a augmentation de la phosphorylation des kératines 8/18 qui s'accompagne d'une activation transitoire de la protéine de survie Akt (p-Akt-S473) au cours du temps ainsi que de l'augmentation de l'expression nucléaire de NF-κB de manière dose-dépendante. On note également que les traitements affectent l'interaction des kératines 8/18 avec la forme active de Hsp-27 (pS82), alors qu'on observe une abolition de l'association entre NF-κB et les kératines 8/18 comparées aux conditions basales. De plus, la chaperonne Hsp27 semble influencer ces interactions réciproques probablement à travers ses liens aussi bien avec les kératines 8/18 qu'avec NF-κB en situation de stress. Ces événements sont associés à une augmentation de la phosphorylation des kératines 8/18. Ces résultats supportent l'hypothèse que la phosphorylation des kératines 8/18 jouerait un rôle dans la modulation de l'activation des protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB en conditions de stress cytotoxique par leur association avec ces protéines de signalisation cellulaire.

Mots-clés : Kératines 8/18 ; phosphorylation ; stress cytotoxique ; signalisation cellulaire ; PI3K/Akt ; NF-κB ; Hsp27.

ABSTRACT

Keratin 8/18 are the main intermediate filament proteins expressed in single epithelial cells. Several post-translational modifications affecting their amino acid residues have been characterized and reported to regulate the organization as well as the functions of these filaments. For example, the phosphorylation of keratin 8/18 serine residues is associated with the protection of hepatocytes against apoptosis induced by toxic agents. Phosphorylation of keratin 8/18 is also implicated in some physiological processes such as cell growth and migration. Recent studies suggest that phosphorylation of keratin 8/18 plays a role in the regulation of certain cell signaling pathways. However, the molecular mechanisms involved in these processes are far from being clearly elucidated. In the present study, we explored the dynamics of expression and phosphorylation of keratin 8/18 in response to chemical-based cytotoxic stress as well as their interactions with proteins of the PI3K / Akt / NF-κB pathway. In this study, we used two hepatic cell lines, HepG2 and Hep3B. After chemical induction of cellular stress by two pharmacological compounds activating p38 MAPK, we show that the increase in phosphorylation of keratin 8/18 is accompanied by a transient activation of the Akt survival protein (p-Akt-S473) over time as well as the increase in nuclear expression of NF-κB in a dose-dependent manner. It is also noted that the treatments affect the interaction of keratin 8/18 with the active form of Hsp-27 (pS82), whereas the association between NF-κB and keratin 8/18 is observed to be abolished compared to basal conditions. In addition, the Hsp27 chaperone appears to influence these interactions, probably through its binding to both keratin 8/18 and NF-κB under stress. These events are associated with an increase in phosphorylation of keratin 8/18. These results support the hypothesis that keratin 8/18 phosphorylation plays a role in modulating the activation of PI3K / Akt / NF-κB pathway proteins under toxic stress conditions by their association with these cellular signaling proteins.

Mots-clés : Keratins 8/18; phosphorylation; cytotoxic stress; cell signaling; PI3K/Akt; NF-κB ; Hsp27.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	VIII
CHAPITRE I.....	1
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE II	26
1.1 Contribution des auteurs	26
1.2 Résumé de l'article	26
1.3 Introduction.....	28
1.4 Matériels et méthodes	31
1.5 Résultats.....	35
1.6 Discussion.....	38
1.7 Remerciements	41
1.8 Références.....	41
1.9 Légende des figures	45
1.10 Figures	48
CHAPITRE III.....	53
CONCLUSION.....	53
1.11 Discussion générale	53
1.12 Conclusion et Perspectives de Recherche.....	59
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1. Expression des kératines dans les tissus épithéliaux humains.....	17
Tableau 2. Résidus de kératines phosphorylés et kinases impliquées.....	19

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1. A. Représentation tridimensionnelle du lobule hépatique. B. Aspect histologique du parenchyme hépatique.....	2
Figure 2. A. Représentation graphique de l'acinus hépatique. B. Schéma de l'anatomie microscopique du foie.....	3
Figure 3. Représentation schématique du parenchyme hépatique (hépatocytes et sinusoïdes)	5
Figure 4. Différents types d'hépatotoxicité médicamenteuse selon les cellules atteintes	7
Figure 5. Principales voies du métabolisme oxydatif de l'éthanol.....	9
Figure 6. A. Nécrose hépatocytaire (flèche) entourée d'un infiltrat inflammatoire accompagnant une vacuolisation hépatocytaire. B. Corps de Mallory-Denk faits d'une touffe éosinophile intra-hépatocytaire et séparés d'une trame fibreuse (coloration de Masson)	10
Figure 7. Eléments du cytosquelette.....	11
Figure 8. Réseau de microtubules identifié par immunofluorescence indirecte ciblant la tubuline dans les fibroblastes de souris.....	12
Figure 9. Micrographies électroniques de l'actine musculaire.....	13
Figure 10. Types et distribution des protéines de FIs chez l'homme.....	15
Figure 11. Structure des FIs de Kératines.....	15
Figure 12. Assemblage et réorganisation des FIs.....	16
Figure 13. Activation de la voie de p38 MAPK après induction du stress cellulaire par différents agents cytotoxiques.....	22
Figure 14. Rôle de la voie oncogénique PI3K/Akt/NF-κB dans la modulation de l'apoptose.....	23

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
c-FLIP	cellular FLICE-inhibitory protein
CMs	Corps de Mallory-Denk
DEDD	Death effector domain containing DNA binding protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle high glucose medium
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas-associated protein with death domain
Fas-L	Ligand du récepteur Fas
Fas-R	Récepteur Fas
Fas/Fas-L	Voie de signalisation du récepteur Fas et de son ligand
FBS	Fetal bovine serum
FIs	Filaments Intermédiaires
FITC	Fluoresceine Iso Thio Cyanate
GF	Griséofulvine
GTP	Guanosine triphosphate
Hsp 25	Heat Shock Protein 25
Hsp 70	Heat Shock Protein 70
IκB	Inhibiteur de kappa B
JNK	c-jun-N-terminal Kinase
kDa	Kilo Dalton

K8	Kératine 8
K8 S73	Sérine en position 73 sur la kératine 8
K8 pS73	Phosphorylation de la sérine 73 sur la kératine 8
K8 S73A	Substitution de la sérine en position 73 par l'alanine sur la kératine 8
K8 S73D	Substitution de la sérine en position 73 par l'acide aspartique sur la kératine 8
K8 S79	Sérine en position 79 sur la kératine 8
K8 S431	Sérine en position 431 sur la kératine 8
K8 pS431	Phosphorylation de la sérine 431 sur la kératine 8
K8 S431A	Substitution de la sérine en position 431 par l'alanine sur la kératine 8
K8 S431D	Substitution de la sérine en position 431 par l'acide aspartique sur la kératine 8
K8 S436	Sérine en position 436 sur la kératine 8
K8/18	Couple formé par l'assemblage des kératines 8 et 18
K18	Kératine 18
K18 S33	Sérine en position 33 sur la kératine 18
K18 pS33	Phosphorylation de la sérine 33 sur la kératine 18
K18 S52	Sérine en position 52 sur la kératine 18
K18 pS52	Phosphorylation de la sérine 52 sur la kératine 18
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MFs	Microfilaments d'actine
MK-2	MAPK-activated protein kinase
MTs	Microtubules
NF-κB	Nuclear factor kappa B
p-Akt-S473	Protéine Akt phosphorylée sur la sérine 473
p-Akt-T308	Protéine Akt phosphorylée sur la thréonine 308
PBS	Phosphate buffered saline
PDK	Kinase dépendante des phosphoinositides
PH	Domaine d'homologie avec la plecstrine
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidyl-inositol-3,4-diphosphate

PIP3	Phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B ou Akt
PKC	Protéine kinase C
p70 RSK	p70 ribosomal protein S6 kinase 1
SAPK	Stress-activated protein kinases
SDS	Dodécylsulfate de sodium
siARN	Petit ARN interférent
shARN	ARN tige-boucle
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TGF β	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Récepteur du tumor necrosis factor
TRADD	TNFRI-associated death domain protein
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRITC	Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate
UPR	Unfolded Protein Response
UPS	Ubiquitin–proteasome system
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

CHAPITRE I

INTRODUCTION

I. FOIE, HISTOPHYSIOLOGIE ET HÉPATOTOXICITÉ

1.1 Micro-anatomie du foie

Le foie est la plus volumineuse glande du corps humain avec un poids moyen d'environ 2500 g chez le vivant adulte. Il est associé à plusieurs fonctions métaboliques indispensables à la vie. Situé à l'hypochondre droit dans la cavité abdominale, il fait partie des glandes annexes du tube digestif. Le foie est irrigué par l'artère hépatique, branche du tronc cœliaque, et qui représente son réseau nourricier. Il reçoit également la veine porte qui est un confluent de la grande veine mésentérique et de la veine splénique drainant dans le foie tout le sang pauvrement oxygéné provenant des viscères (1).

L'organisation classique du foie est basée sur une structure parenchymateuse délimitée par les prolongements de la capsule fibreuse de Glisson et nommée lobule hépatique. Chaque lobule de forme polyédrique de 1-2 millimètre de large est formé par une veine centro-lobulaire à partir de laquelle s'étendent de façon radiaire des travées de cellules hépatocytaires vers la périphérie du lobule (Fig. 1). Ces hépatocytes sont irrigués par un réseau des sinusoïdes qui confluent dans la veine centro-lobulaire. Au carrefour de trois ou quatre lobules, des septa fibreux délimitant ces lobules convergent un espace appelé Espace Porte de Kiernan. Cet espace porte est constitué par une branche de la veine porte, une branche de l'artère hépatique et un canalicule bilaire donnant au lobule hépatique son propre apport sanguin (artériel et porte) et son propre drainage bilaire et veineux (2).

A cette organisation classique morphologique du foie fait suite une description fonctionnelle fondée sur la vascularisation intra-parenchymateuse du foie et basée sur une unité fonctionnelle du foie ou acinus hépatique de Rappaport. Cet acinus hépatique a été décrit en suivant l'activité métabolique des hépatocytes afin de mieux comprendre la pathogénie et la progression des affections hépatiques (3). Il est défini comme une surface de limite morphologique imprécise située entre deux ou trois veines-centro-lobulaires et centrée par un espace porte (Fig. 2) contenant le réseau vasculaire. Chaque veinule et chaque artéiole portes donnent des collatérales qui sont toutes des branches terminales dont dépend cet acinus hépatique. Trois zones sont ainsi décrites au sein de l'acinus : la zone 1 au centre de l'acinus et proche de l'espace porte dont les hépatocytes reçoivent le sang le plus riche en oxygène et en nutriments ; la zone 3 proche de chaque veine centro-lobulaire dont les hépatocytes reçoivent un sang pauvrement oxygéné (et donc plus sensibles aux effets délétères des toxines dans le sang) ; enfin une zone 2 intermédiaire entre les deux premières (4).

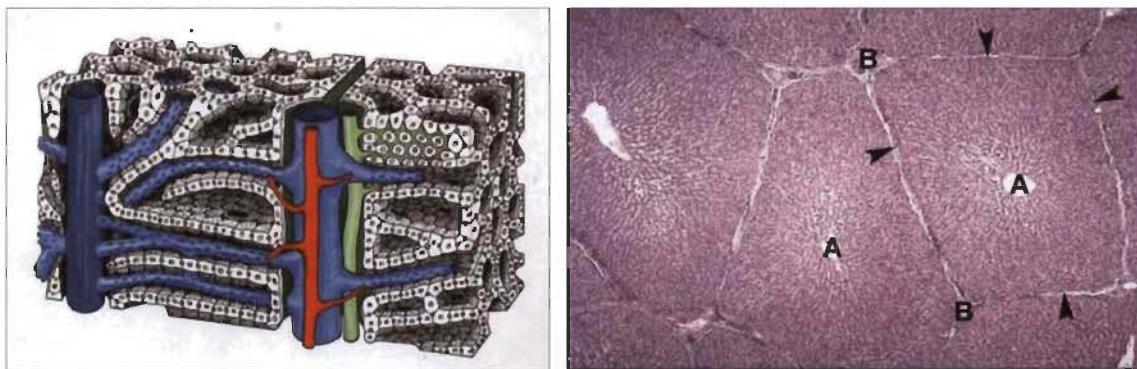


Figure 1. A. Représentation tridimensionnelle du lobule hépatique : les travées hépatocytaires forment progressivement des lames hépatocytaires séparées par des sinusoïdes veineuses en provenance de la veine centro-lobulaire. B. Aspect histologique du parenchyme hépatique : le lobule hépatique est démontré par une veine centro-lobulaire (A) délimité par des prolongements fibreux (flèche) qui convergent vers l'espace porte (B). Tiré de F.J. Wilson *et al.* (1997).

Les hépatocytes sont les cellules principales du foie. Ils représentent 80 % de la population cellulaire du foie humain et sont responsables de diverses fonctions qui sont spécifiques au foie. Un hépatocyte est classiquement décrit comme une volumineuse cellule polyédrique de 20 µm de long sur 30 µm de large environ, parfois binucléée, avec un noyau rond souvent tétraploïde pauvre en hétérochromatine, et une abondante quantité de mitochondries et de lysosomes témoignant d'une grande activité métabolique (5). On y trouve également de nombreuses inclusions de glycogène. Ils possèdent trois domaines spécialisés de la membrane plasmique leur permettant d'entrer en contact avec les hépatocytes adjacents de la même travée (membranes latérales), avec le canalicle biliaire (membrane caniculaire) et avec l'espace de Disse (membrane sinusoïdale) (Fig. 3).

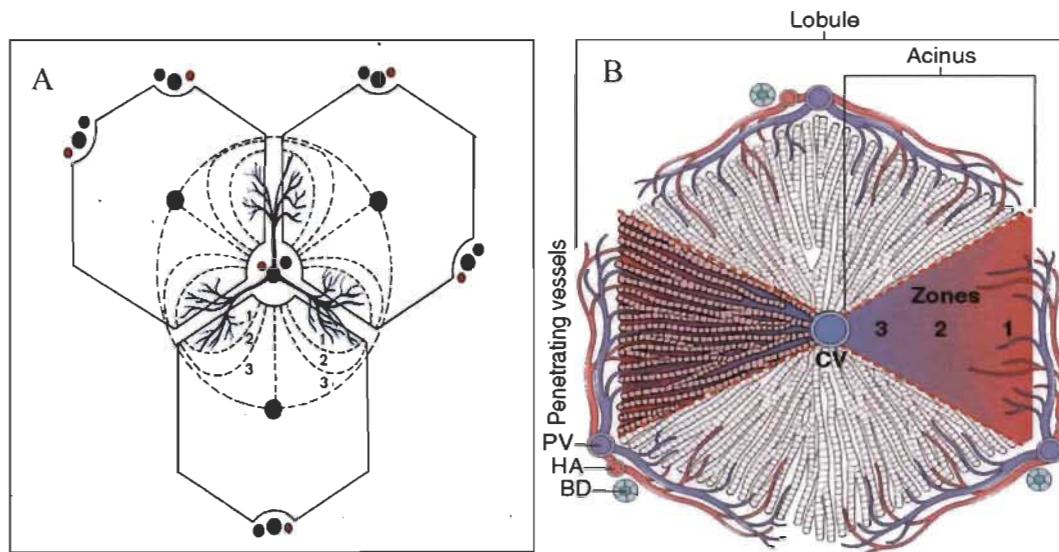


Figure 2. A. Représentation graphique de l'acinus hépatique. Tiré du cours d’Histologie Spéciale de l’UCL, Inédit. B. Schéma de l’anatomie microscopique du foie. Tiré de Kumar et al. Robbins and Cotran (ed) (2010).

Outre les hépatocytes, le parenchyme hépatique contient d’autres types cellulaires à différentes localisations. Parmi elles, on trouve les cellules de Kupffer ou macrophages hépatiques qui proviennent des monocytes sanguins et sont localisés soit dans les sinusoïdes hépatiques soit dans l’espace de Disse. L’espace de Disse contient un autre type cellulaire, les cellules étoilées ou d’Ito qui émettent de longs prolongements entre les

hépatocytes. Leurs cytoplasmes renferment des inclusions lipidiques ; ils interviendraient dans le métabolisme des lipides et de la vitamine A. Enfin, on retrouve également des cellules endothéliales qui sont associées directement aux sinusoides en formant leurs parois fenestrées (6).

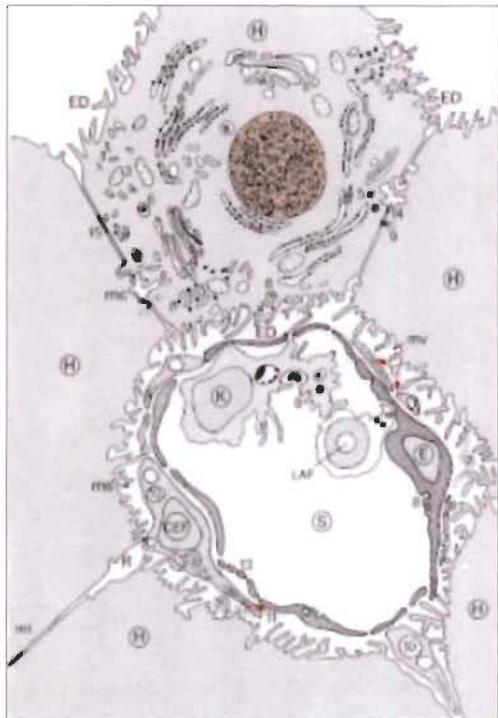


Figure 3. Représentation schématique du parenchyme hépatique (hépatocytes et sinusoides). Tiré de Blanc JF, et al. (2002).

H : hépatocyte (ms : membrane sinusoïdale ; ml : membrane latérale ; mc : membrane caniculaire ; mv : microvillosités) ; K : cellule de Kupffer ; CEF : cellule étoilée du foie ; E : cellule endothéliale sinusoïdale ; LAF : lymphocyte associé du foie ; ED : espace de Disse (contient la matrice extracellulaire avec les collagènes, les glycoprotéines de structure et les protéoglycanes) ; R : récessus de l'espace de Disse ; S : sinusoïde.

1.2 Histophysiologie du foie

Le foie intervient dans l'homéostasie cellulaire par ses différentes fonctions qui sont principalement la synthèse du cholestérol et des protéines plasmatiques, le stockage, la transformation et la détoxicification de certaines molécules organiques, la sécrétion de la bile, et la participation au métabolisme énergétique des macromolécules. Ces fonctions sont le fait d'une organisation structurale particulière représentée par différents éléments: une double vascularisation veineuse et artérielle (apports nutritifs, hormones) ; une disposition en travées unicellulaires des hépatocytes le long des sinusoides (facilitation des échanges) ; une séparation du compartiment biliaire hépatocytaire de la circulation sanguine (cycle entérohépatique) ; une organisation hépatocytaire intracellulaire spécifique (fonction métabolique et sécrétion exocrine) ; enfin une exposition des cellules

de Kupffer et des cellules endothéliales sinusoïdales aux différentes particules étrangères et substances immunogènes (7).

Il existe une zonation métabolique au niveau du lobule hépatique, ou mieux une hétérogénéité intra-lobulaire des hépatocytes, qui détermine la différence d'activités physiologique et métabolique exercées par les hépatocytes en fonction de leur position (8). Ainsi, plusieurs différences structurales et fonctionnelles des hépatocytes ont été identifiées entre les zones péri-portales et péri-veineuses grâce à diverses techniques biochimiques et physiologiques. Par exemple, la perfusion du foie isolé permet de mesurer à l'aide de micro-capteurs des variations de la consommation d'oxygène ou d'autres substrats dans les différentes zones du lobule hépatique et estimer ainsi leur activité métabolique (9). La zone péri-portale est caractérisée par l'oxydation, la glycogénolyse et la néoglycogénèse, la béta-oxydation des acides gras, la synthèse du cholestérol, le catabolisme des acides aminés, l'uréogenèse et la protection contre l'oxydation (glutathion peroxydase), alors que la zone péri-veineuse est spécialisée dans la glycogénosynthèse et la glycolyse, la lipogenèse, la cétogenèse, la synthèse de glutamine, la biotransformation, la protection contre l'oxydation (xanthine oxydase) et le métabolisme de l'alcool. Cette hétérogénéité intra-lobulaire des hépatocytes est modifiée de façon rapide en réponse aux variations physiologiques ou pathologiques du milieu intérieur (10).

Divers facteurs influencent le maintien de la zonation métabolique du lobule hépatique, parmi lesquels on peut citer comme facteur extrinsèque la perfusion sanguine qui est orientée de façon unidirectionnelle dans le lobule hépatique en partant de la zone périphérique vers la zone centrale, entraînant une distribution en oxygène et nutriments en faveur de la première zone perfusée. Un autre facteur important est le micro-environnement hépatocytaire qui présente une composition cellulaire différente et fonctionnellement diversifiée (cellules endothéliales sinusoïdales, cellules de Kupffer, etc.). L'architecture trabéculaire et quelques facteurs intrinsèques aux hépatocytes, comme le flux hépatocytaire intra-lobulaire, contribuent également à cette différenciation particulière des hépatocytes d'une zone lobulaire à l'autre (11,12). C'est ainsi que la

zonation métabolique prédispose certaines zones du lobule hépatique à être plus sensibles que d'autres face à certaines agressions infectieuses ou cytotoxiques. La zone péri-veineuse du lobule hépatique est souvent le siège des lésions cytotoxiques dues à la présence de nombreuses enzymes (alcool-déshydrogénase, xanthine oxydase) qui produisent plusieurs métabolites secondaires comme les radicaux libres responsables des atteintes centro-lobulaires (13,14).

2.3 Hépatotoxicité

Les atteintes cytotoxiques du foie, d'origine médicamenteuse ou environnementale, constituent un réel problème de santé publique. La fréquence de l'hépatotoxicité médicamenteuse par exemple représente environ 10% des lésions secondaires induites par les médicaments aux USA, avec une incidence globale entre 10 et 40 sur 100000 patients (15). D'autre part, la métabolisation de l'éthanol aboutit à l'acétaldéhyde, un métabolite très cytotoxique pour le foie, qui est normalement oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase. En cas de consommation excessive d'alcool, l'acétaldéhyde entraîne progressivement des lésions chroniques très caractéristiques au niveau du foie et qui sont responsables d'une morbi-mortalité significative dans la population (16).

Le tableau clinique des atteintes médicamenteuses hépatiques est très varié et dépend pour beaucoup de la variabilité génétique individuelle. Ainsi, plusieurs lésions sont décrites au niveau hépatique dont principalement une toxicité directe sur les hépatocytes ou les autres types cellulaires entraînant une nécrose ou une apoptose précédée d'une perturbation de la fonction hépatique (17). L'expression clinique est dominée par les hépatites aiguës, avec un risque d'hépatite fulminante, mais on retrouve également des aspects plus chroniques pouvant conduire à la cirrhose (figure 4) (18). Divers agents médicamenteux ou chimiques sont incriminés dans la survenue des lésions hépatiques pour lesquelles le surdosage est souvent responsable des lésions prévisibles : l'acétaminophène, le tétrachlorure de carbone, l'alcool et une exposition à la toxine *Amanita phalloïdes* (19). D'autres agents xénobiotiques sont généralement responsables

des lésions idiosyncrasiques quel que soit le dosage. L'acétaminophène est la principale cause d'atteintes médicamenteuses hépatiques, soit 50 % de lésions aiguës hépatiques aux États-Unis suite aux médicaments, avec une mortalité autour de 30% (20). Il est à noter que ces lésions hépatiques sont souvent réversibles après élimination de l'agent thérapeutique ou cytotoxique et que le diagnostic de ces lésions se fait par élimination d'autres causes plus connues d'atteintes hépatiques.

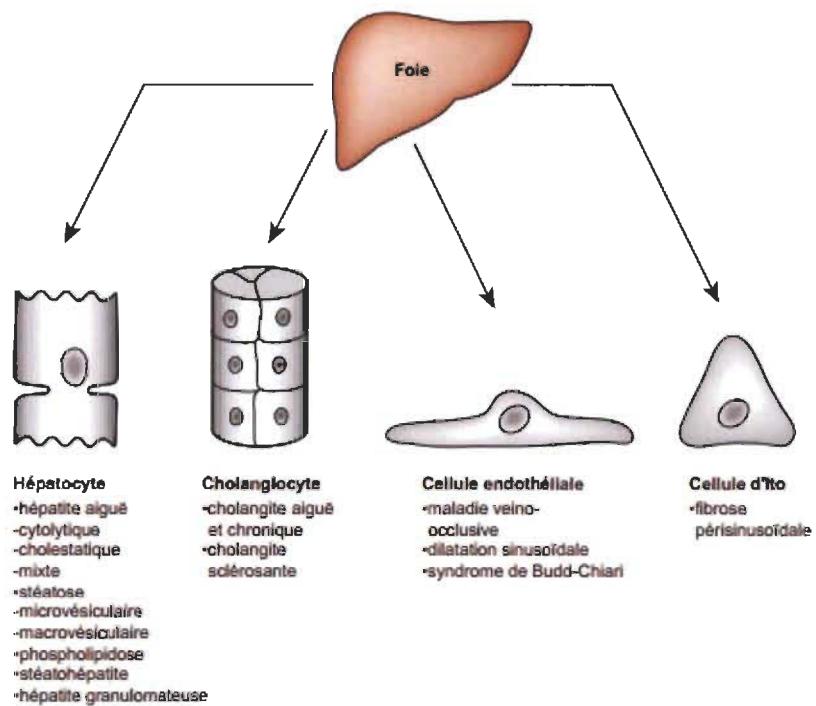


Figure 4. Différents types d'hépatotoxicité médicamenteuse selon les cellules atteintes.
Tiré de Larrey, D. (2003).

L'acétaminophène est métabolisé dans la plupart des cas par les enzymes hépatiques de conjugaison (glutathion-S-transférases, UDP-glucuronosyl-transférases et sulfo-transférases) pour sa désintoxication et son excrétion rénale sous forme de conjugués de glucuronate ou de sulfate. Moins de 5 % de l'acétaminophène est métabolisé par les enzymes hépatiques de fonctionnalisation, parmi lesquels on trouve principalement le cytochrome CYP2E1, entraînant la formation d'un métabolite réactif qu'est le N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) (21). Habituellement, le NAPQI réagit

avec le groupe sulphydryle de la cystéine dans le glutathion aboutissant à sa détoxification. A forte dose, le NAPQI n'est pas conjugué au glutathion (GSH) et conduit à son accumulation intra-hépatocytaire pour provoquer une nécrose centro-lobulaire avec une insuffisance hépatique (22). Il se lie de façon covalente aux protéines hépatiques entraînant des dommages au niveau des membranes cellulaires et un dysfonctionnement mitochondrial, avec comme effet d'accroître le stress oxydatif (23). Il s'en suit une activation d'un certain nombre de kinases dont essentiellement les MAPK (mitogen activated protein kinase), particulièrement la c-Jun N-terminal kinase (JNK), qui participent à la formation des pores de transition de perméabilité de la membrane mitochondriale (MPT). L'effondrement progressif du potentiel membranaire mitochondrial induit une nécrose hépatocytaire (24).

Hormis les médicaments, la consommation excessive d'alcool (éthanol) est responsable des lésions hépatiques caractéristiques regroupées en trois types à savoir la stéatose hépatique, l'hépatite alcoolique aiguë et la cirrhose alcoolique. Ces lésions pouvant s'associer ou se succéder sans ordre chez un même patient (25). Plus de la moitié des adultes dans les pays occidentaux consomme l'alcool et 5-10% d'entre eux développeront l'alcoolisme chronique (26). En France, l'éthanol reste la substance psychoactive la plus consommée dans la population avec environ 9 litres d'alcool pur/habitant/an (27). L'absorption de l'alcool se fait au niveau gastrique et intestinal, puis il est distribué à partir du sang dans tous les tissus de l'organisme. La majeure partie de l'alcool ingéré subit une transformation dans le foie (Fig. 5) (28).

La principale voie de métabolisation de l'éthanol est celle de l'alcool déshydrogénase (ADH) alors que le système d'oxydation microsomal intervient à des doses élevées d'éthanol dans le sang (29). L'acétaldehyde produit est normalement oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase, lequel est ensuite oxydé en dioxyde de carbone et en eau par les tissus périphériques. En cas de consommation excessive d'alcool (2,0 g/l) et chez les alcooliques chroniques, l'acétaldehyde affecte les fonctions de nombreux tissus de l'organisme mais ses effets seront plus marqués au niveau hépatique. L'acétaldehyde semble donc être le facteur cytotoxique responsable de l'atteinte hépatique causée par

l'alcool (30). L'acétaldéhyde produit des adduits stables et instables par sa fixation covalente aux macromolécules cellulaires. Ces adduits vont entraîner entre autres effets une modification des propriétés biologiques des protéines perturbant ainsi le transport intracellulaire et la sécrétion des protéines avec comme conséquence une rétention intracellulaire anormale (31). De même, la formation d'adduits d'acétaldéhyde et de collagènes peut favoriser la formation des néo-anticorps responsables des réactions immunologiques fibrogéniques ou empêcher la dégradation normale du collagène et conduire *in fine* à la cirrhose (32,33).

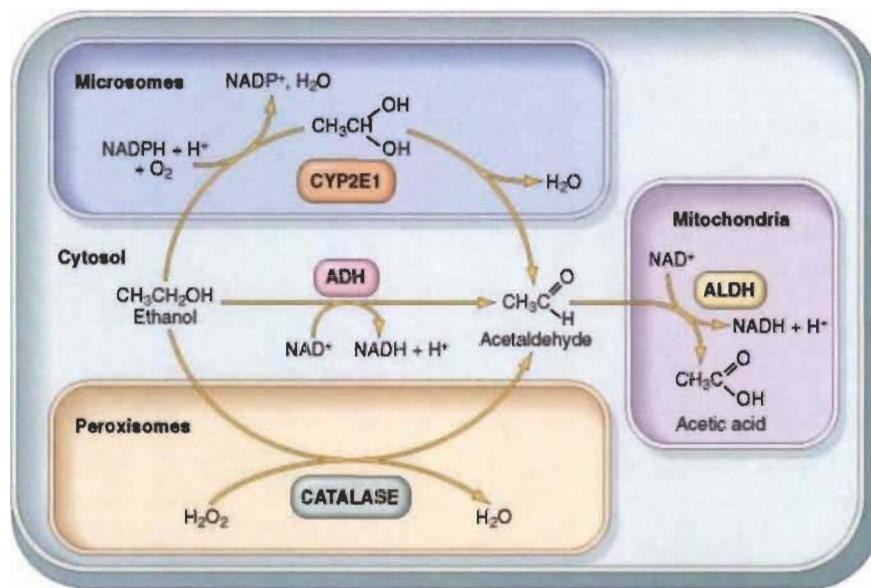


Figure 5. Principales voies du métabolisme oxydatif de l'éthanol. ADH : alcool déshydrogénase ; ALDH : acétaldéhyde déshydrogénase ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide-phosphate ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide-phosphate hydrogéné. Tiré de Kumar et al. Robbins and Cotran (ed) (2010).

Histologiquement, l'hépatite alcoolique est caractérisée par des lésions pathognomoniques qui ne sont pas spécifiques, car on les retrouve dans d'autres pathologies hépatiques. On peut citer premièrement une vacuolisation des hépatocytes accompagnée de foyers de nécrose centro-lobulaire. Il y a ensuite la formation des Corps

de Mallory-Denk (Fig. 6) qui sont décrits comme des inclusions intra-hépatocytaires d'agrégats de filaments intermédiaires de kératine 8 et 18 (K8/18), associés à d'autres protéines comme l'ubiquitine. D'autres lésions sont décrites, soit une réaction inflammatoire faite principalement des polynucléaires neutrophiles qui pénètrent dans le lobule hépatique et s'accumulent autour des hépatocytes dégénérés, en particulier ceux contenant des corps de Mallory-Denk (MDB), et enfin une fibrose hépatique qui est souvent sinusoïdale et périveineuse suite à une activation des cellules étoilées (34,35).

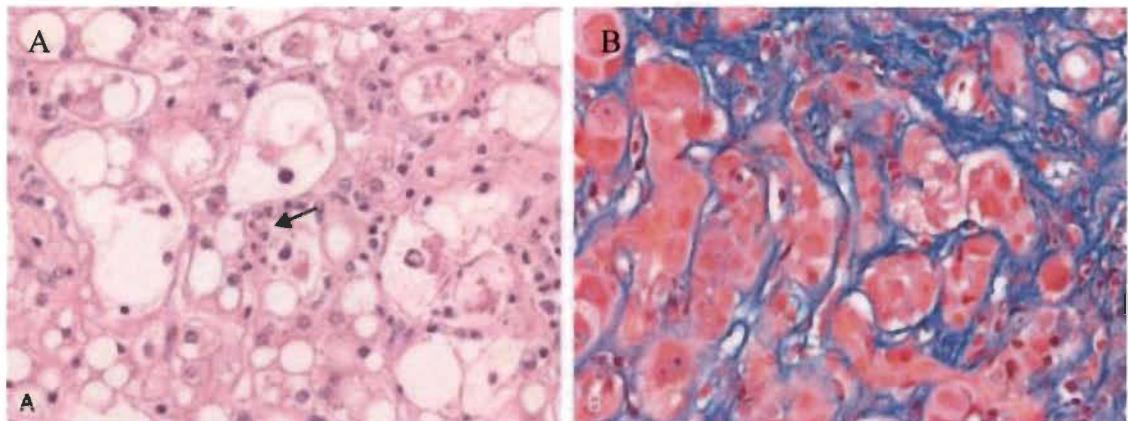


Figure 6. A. Nécrose hépatocytaire (flèche) entourée d'un infiltrat inflammatoire accompagnant une vacuolisation hépatocytaire. B. Corps de Mallory-Denk faits d'une touffe éosinophilique intra-hépatocytaire et séparés d'une trame fibreuse (coloration de Masson). Tirée de Kumar et al. Robbins and Cotran (ed), 2010.

La cirrhose hépatique représente l'évolution ultime et irréversible de l'atteinte hépatique alcoolique avec une mortalité globale due à la cirrhose de 47% tel que rapporté dans beaucoup d'études auprès des groupes de patients présentant une atteinte clinique ou biologique du foie (36,37). Cette mortalité par la cirrhose est souvent associée au carcinome hépato-cellulaire (38). Plusieurs facteurs de risque sont associés au développement et à la gravité des complications de la maladie alcoolique du foie dont principalement le sexe féminin, l'origine ethnique, et des facteurs purement génétiques (39,40).

II. CYTOSQUELETTE ET FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

2.1 Généralités sur le cytosquelette

Le cytosquelette est une structure subcellulaire constituée de réseaux de filaments protéiques interconnectés et regroupés en trois types, à savoir les microtubules (MTs), les filaments intermédiaires (FIs) et les microfilaments d'actine (MFs), ainsi que leurs protéines régulatrices (Fig. 7). Il joue un rôle majeur dans la cellule en déterminant l'architecture cellulaire, en contrôlant le transport intracellulaire, et en assurant l'ancre de la cellule aux cellules voisines et à la matrice extracellulaire (41). Ces filaments protéiques sont formés à la suite d'une polymérisation régulée d'unités monomériques qui sont soit des protéines globulaires formant des filaments polarisés (MTs et MFs), soit des protéines fibreuses formant des filaments non polarisées (FIs). Ils se répartissent de la membrane plasmique au noyau. Ils subissent des remaniements dynamiques suite à des changements physiologiques et passent d'un type stable en un type peu stable et soluble (42,43). Les protéines régulatrices des polymères du cytosquelette contrôlent leur organisation architecturale et comprennent essentiellement des facteurs favorisant la nucléation des filaments, des facteurs polymérisants et dépolymérisants, des protéines coiffantes et des protéines stabilisatrices (44).

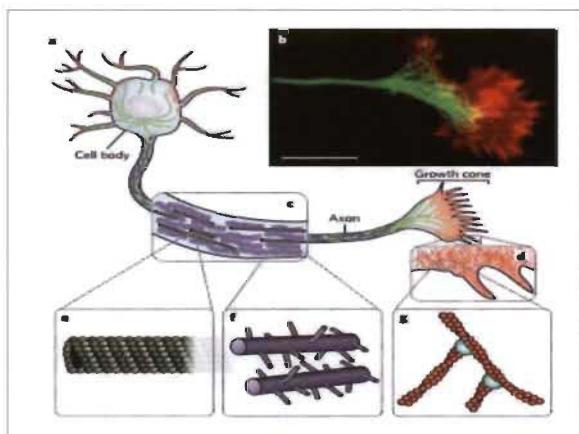


Figure 7. Eléments du cytosquelette : a. Neurone ; b. Micrographie en fluorescence du cône de croissance neuronal ; c. Axone neuronal ; d. Cône de croissance ; e. MTs ; f. FIs (neurofilaments) ; g. MFs. Tiré de Fletcher, DA (2010).

Les MTs sont des protéines en forme de tubes creux et rigides, de 25 nm de diamètre, formées par la polymérisation de protéines globulaires de 52 kDa appelées α et β tubulines. Les deux types de tubulines s'associent pour former des hétérodimères, lesquels s'auto-assemblent à leur tour pour donner des protofilaments. Chaque microtubule contient 13 protofilaments agencés de sorte que les molécules de tubuline α et β de deux protofilaments voisins sont décalées d'une unité. La structure globale prend une disposition hélicoïdale avec une extrémité liée à un centre organisateur des microtubules (MTOC) qui dans les cellules animales est appelé centrosome (Fig. 8). Les MTs sont caractérisées en plus par une instabilité dynamique passant facilement d'un état de croissance stable en un rétrécissement rapide en réponse aux protéines régulatrices et aux changements physiologiques de la cellule. Les polymères de tubuline- $\alpha\beta$ sont par ailleurs associées à certaines protéines motrices appelées MAP (Microtubule Associated Proteins : dynéine, nexine, kinésine, etc.) qui contribuent au succès de leur assemblage et du mouvement des molécules et des organelles (45). Les MTs sont les filaments les plus rigides du cytosquelette. Lorsqu'elles sont associées au MTOC elles irradient vers la membrane plasmique. Elles peuvent aussi s'étendre tout le long du cytoplasme des cellules (46). Les MTs jouent plusieurs rôles essentiels dans la cellule. Elles contrôlent le trafic intracellulaire des organites et des vésicules, déterminent la polarité et la taille des cellules, sont impliquées dans la croissance cellulaire par la formation du fuseau achromatique lors de la mitose, et permettent le déplacement des cellules pourvues de flagelles, (47,48).

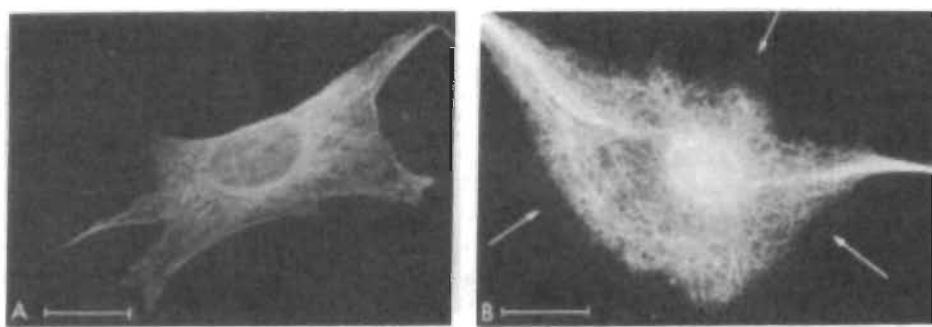


Figure 8 : Réseau de microtubules identifié par immunofluorescence indirecte ciblant la tubuline dans les fibroblastes de souris. A. Cellules normales ; B. Cellules exposées à 10

μmol de Taxol pendant 22h. Le taxol empêche la dépolymérisation des microtubules. Tiré de Schiff, PB and Horwitz, B (1979).

Les MFs sont des polymères de 5-7 nm de diamètre formés d'une protéine globulaire nommée actine G. Ils sont constitués de deux chaînes hélicoïdales d'un des trois types d'actine (α , β , γ). Les monomères d'actine-G s'associent en dimères instables qui peuvent être rapidement dissociés ou formés après une phase d'elongation des polymères plus stables appelés Actine-F (Fig. 9). Un petit pool reste cependant dans un état globulaire en équilibre avec les filaments d'actine. La dépolymérisation des filaments d'actine est liée à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP qui leur est associée alors que l'actine-G contient l'ADP (49,50). Les MFs sont associés à certaines protéines qui jouent un rôle dans la régulation de leurs fonctions. Plusieurs protéines peuvent s'associer à l'actine les ABPs (Actin Binding Proteins) : la thymosine, la profilin, la myosine, le caldesmon, la tropomyosine, la cofilin, la gelsoline, etc. (51,52). Ces protéines jouent des rôles dans la polymérisation des MFs et contrôlent leur fonction.

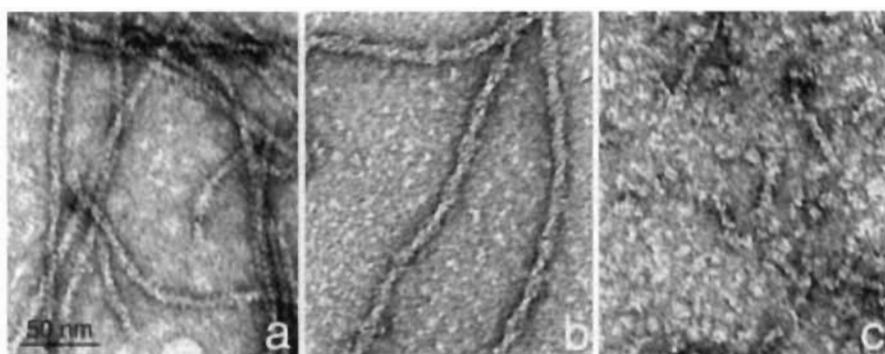


Figure 9. Microographies électroniques de l'actine musculaire : a. Actine-F ; b. Actine-F + cofiline. La cofiline déstabilise l'actine-F ; c. Actine-F + gelsoline. La gelsoline entraîne la dislocation de l'actine-F. Tiré de Dos Remedios, et al. (2003).

Les MFs sont des structures polarisées instables qui participent à de nombreuses fonctions cellulaires. Ils sont très abondants dans les cellules et représentent 5 à 20% des protéines totales de cellules musculaires ou non. On retrouve les MFs au niveau du cortex cellulaire où ils sont disposés sous la membrane plasmique et déterminent des points

d'ancrage des cellules à un support, permettant ainsi des mouvements d'expansion et de rétraction cellulaire (53,54). Au niveau du front de migration pendant le mouvement cellulaire, le cortex cellulaire d'actine présente des prolongements cytoplasmiques appelés filopodes. Au cours de la mitose, ils forment l'anneau contractile qui permet la séparation de la cellule mère en deux cellules filles. Les MFs forment également l'appareil contractile des cellules musculaires. En effet, en association avec la myosine, la tropomyosine et la troponine, les MFs permettent la contraction musculaire (55). Quelques fonctions régulatrices ont été décrites plus en détail en rapport avec les ABP dans la dynamique organisationnelle des MFs. Par exemple, la tropomoduline lie l'extrémité (-) et stabilise les MFs en inhibant la polymérisation/dépolymérisation, la profilin lie l'ADP-G-actine et permet l'élongation de l'extrémité (+) des MFs en catalysant la formation de l'ATP, l'Arp2/3 initie la formation du noyau du nouveau filament au départ d'un autre (branched filament) alors que la formine initie la formation du noyau d'un unique nouveau filament (unbranched filament) (56).

2. 2 Filaments Intermédiaires

Les FIs sont formés par une grande famille de protéines qui sont très conservées au cours de l'évolution et qui sont exprimées de façon spécifique dans les différents tissus. Ils sont de taille intermédiaire (10 -12 nm de diamètre), entre les MTs (25 nm) et les MF (7 nm), et sont codés par près de 70 gènes dont l'expression dépend du stade de différenciation embryonnaire et du type de cellules (57,58). Les FIs sont classifiés en six types principaux suivant l'homologie de leurs séquences en acides aminés (59). Ainsi, on retrouve le type I, formé de kératines acidiques, et le type II, formé de kératines basiques ou neutres; le type III est composé de quatre protéines différentes formant des homodimères ou des hétérodimères (la vimentine, la desmine, la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) et la périphérine); le type IV comporte comme protéines les neurofilaments, l' α -internexine, la nestine, la syncoline et la synemine; le type V est formé par les lamines nucléaires ; enfin le type VI est composé de la phakinine et de la filensine qui ne se retrouvent que dans les fibres cristalliniennes différencierées (Fig. 10).

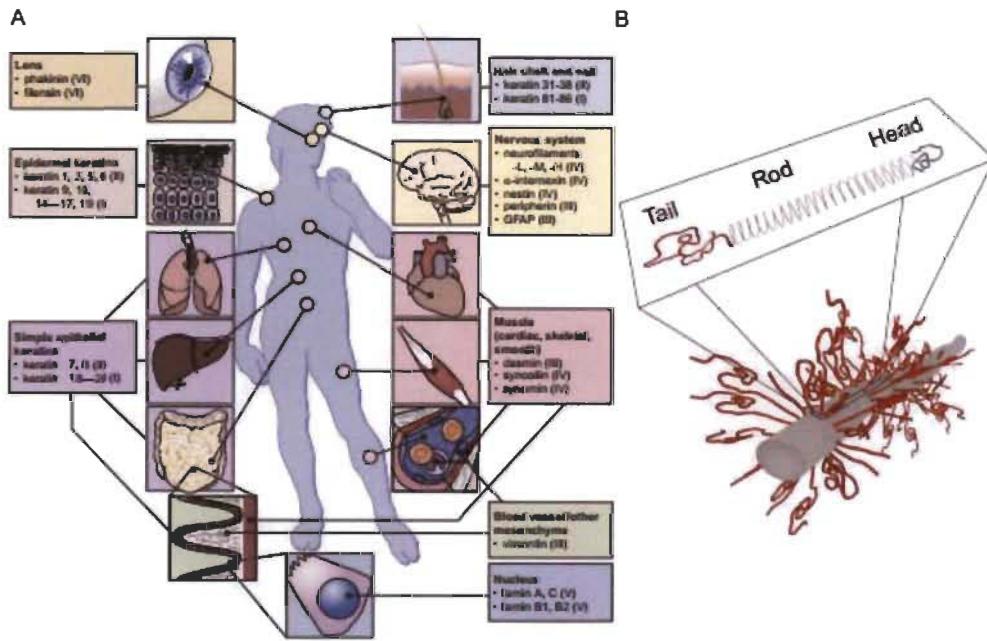


Figure 10. A. Types et distribution des protéines de FIs chez l'homme. B. Schéma de la structure des FIs. Tiré de Kornreich, M *et al.* (2015).

La structure commune des protéines de FIs est un domaine central appelé **Tige**, très conservé au cours de l'évolution et fait d'une hélice α , sur lequel sont flanquées deux extrémités hétérogènes dont un domaine amino-terminal appelé **Tête** et un domaine carboxy-terminal nommé **Queue** (Fig. 11). Le domaine central est subdivisé en quatre segments (IA, IB, IIA et IIB) par trois régions intercalaires (L1, L12 et L2) et regroupe les sous-domaines **coil1** (1A et 1B) et **coil2** (2A et 2B), formés de certaines séquences très conservées pour tous les FIs, et qui sont responsables de l'assemblage des FIs (60,61). La région intercalaire certaines protéines de FIs comme la kératine 18 porte une séquence d'acides aminés qui est reconnue par les caspases au cours de l'apoptose. Les deux extrémités hétérogènes sont marquées par des modifications post-traductionnelles (62,63).

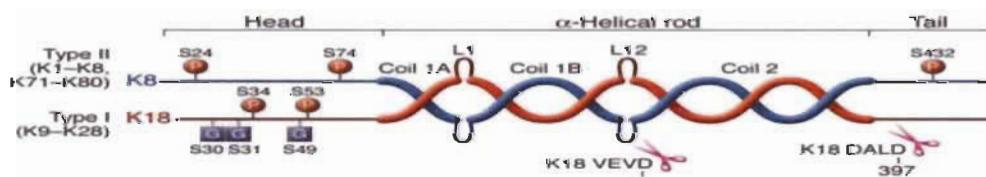


Figure 11. Structure des FIs de Kératines. Tirée de Omary, MB *et al.* (2009).

L'assemblage des FIs se fait par la formation d'homo ou hétérodimères dépendamment du type de FIs. Les kératines forment des hétérodimères obligatoires composés d'un partenaire de type I acide et de type II basique dans un rapport équimolaire 1 : 1, alors que les FIs de type III et IV forment soit des homodimères ou des hétérodimères (64). Les différents dimères forment ensuite des tétramères dans une disposition anti-parallèle expliquant l'absence de polarité des FIs. Ces tétramères solubles constituent des sous-unités de base pour la formation des FIs *in vivo*. L'association latérale de huit tétramères forment une unité de longueur de filament (ULF : Unit Length Filament) de 16 nm de diamètre dont l'assemblage donnera successivement des filaments courts, puis des filaments matures de 10 nm de diamètre après un alignement longitudinal et une compaction radiale (65). L'élongation finale se fera de bout-en-bout de chaque filament mature pour aboutir à une organisation cytoplasmique des FIs s'étendant de la membrane plasmique à la membrane nucléaire, hormis pour les lamines qui se retrouvent uniquement dans le noyau (66).

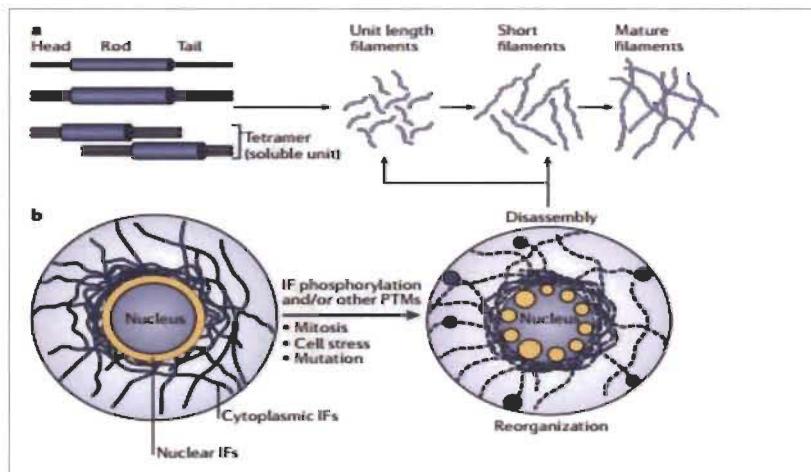


Figure 12. Assemblage et réorganisation des FIs. Tiré de Snider, N. *et al.* (2014).

La dynamique d'assemblage des protéines de FIs ou leur désassemblage en tétramères solubles est liée à l'état physiologique de la cellule et répond aussi à certains facteurs de régulation de la fonction des FIs. Cela a bien été étudié avec le cycle de réorganisation des kératines qui est déterminé par certaines modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, et qui entraîne soit une nucléation des

tétramères solubles en vue de la formation des FIs matures, soit une dissolution du réseau des FIs en ULF pour un nouveau cycle (Fig. 12) (67). Les FIs remplissent diverses fonctions dans l'organisme aussi bien celles liées à l'intégrité cellulaire par leurs propriétés physico-élastiques, que celles non mécaniques associées à la croissance et la migration cellulaire, ainsi que la régulation de la réponse cellulaire à certains stimuli extérieurs (68).

2.3 Kératines

Les kératines sont des protéines de 40-70 kD de poids moléculaire qui sont spécifiques aux cellules épithéliales. Elles sont réparties en deux groupes dont les kératines acidiques de type I (K9, K10, K12 -K20, K23 et K24) codés par 28 gènes et celles basiques de type II (K1 - K8, K76 à K80) codées par 26 gènes (60). Les différents couples de kératines formés par un partenaire de chaque type se répartissent dans toutes les cellules qui composent les tissus épithéliaux. Ainsi, on retrouve généralement le couple des kératines 8/18 au niveau des cellules de l'épithélium simple, mais aussi au niveau des cellules des épithéliums pseudostratifiés (épithélium respiratoire) ; les K5/14 au niveau de l'épithélium malpighien ou encore les K4/13 au niveau de l'épithélium supra-basale de l'œsophage (Tableau 1) (69,70).

Tableau 1. Expression des kératines dans les tissus épithéliaux humains*.

Épithéliums	Kératine type II	Kératine type I
Epithélium simple	K7, <u>8</u> , 80	K18, 19, 20, 23
Epithélium pseudostratifié (respiratoire)	K8	K18
Epithélium stratifié (kératinocytes basaux)	K5, K80 -	<u>K14</u> , K15, K19
Epithélium stratifié (kératinocytes supra-basaux)	K80, K1 -3	K9, <u>10</u> , 12
Epithélium stratifié non kératinisé (couche supra-basale)	K4, K6, K76 -	K13, K16, K17
Epithélium stratifié (kératinocytes cornifiés)	K1, 2, 3	K10, 12
Kératinocytes embryonnaires ou en culture	K6	K16, 17
Epithélium épais des plantes et paumes	K5, K1, K2, K6, K80	K14, K10, K9, K16, K17

* Modifié de Loschke et al. (2015) et Clément, S. (2004).

2.4 Régulation et implication fonctionnelle des kératines

La régulation de la fonction des kératines se fait principalement par le biais de leurs modifications post-traductionnelles (MPTs) et leur liaison à différentes protéines (71). Plusieurs MPTs comme la phosphorylation, la glycosylation, la sumoylation, l'acetylation, l'ubiquitylation, et la protéolyse médiée par les caspases affectent les kératines (65). Ces MPTs affectent la dynamique d'assemblage ou la réorganisation des kératines et déterminent leurs interactions moléculaires avec diverses composantes cellulaires en réponse à différents états physiopathologiques (60,71). La phosphorylation est la plus étudiée des MPTs. Elle permet l'association des kératines avec des kinases/phosphatases ainsi que des protéines jonctionnelles et adaptatrices (70). Divers résidus de kératines ont été identifiés comme des sites de phosphorylation par diverses kinases (Tableau 2.) (70).

Les kératines sont connues pour participer à l'ancrage des cellules épithéliales à la matrice extra-cellulaire à travers les hémidesmosomes, en plus de participer à la cohésion inter-cellulaire par leurs liaisons aux desmosomes (72). Outre ces fonctions structurales, les kératines émergent actuellement comme des modulateurs des signaux intra-cellulaires principalement par leurs interactions avec des molécules effectrices de différentes voies de signalisation, aussi bien dans les conditions physiologiques que pathologiques (60,69). Ainsi, il est admis que les kératines influencent la réponse aux signaux intra et extracellulaires, de même que l'adaptation aux différents types de stress physico-chimique (41,73). L'importance des kératines dans les cellules a été démontrée par l'existence de mutations qui sont associées au développement de pathologies congénitales ou expérimentales. On sait par exemple que des mutations faux-sens des gènes de K5/14 sont responsables du développement de l'épidermolyse bulleuse congénitale une maladie qui entraîne une fragilité épidermique et une instabilité mécanique des kératinocytes (74,75). De plus, des mutations des gènes codant pour les K8/18 et K19 dans les épithéliums simples sont associées à une prédisposition aux maladies hépatiques (76). Ces mutations altèrent les propriétés physico-chimiques des kératines et entraînent un déséquilibre du cycle de leur phosphorylation/déphosphorylation qui affecte leurs fonctions régulatrices.

ce qui conduit à un défaut de l'intégrité cellulaire ainsi qu'une plus grande susceptibilité à l'apoptose (77,78).

Tableau 2. Résidus de kératines phosphorylés et kinases impliquées*

Kératines	Résidus phosphorylés	Kinases	Références
K8	Ser-8	PKA, PKC δ	(Akita, et al., 2007 ; Ando, et al., 1996)
	Ser-12	PKA	(Ando, et al., 1996)
	Ser-23	PKA, PKC δ	(Akita, et al., 2007 ; Ando, et al., 1996)
	Ser-33	PKA	(Ando, et al., 1996)
	Ser-36	PKA	(Ando, et al., 1996)
	Ser-42	PKA	(Ando, et al., 1996)
	Ser-50	PKA	(Ando, et al., 1996)
	Ser-73	P38, JNK, PKC δ	(Ku, N.O. et al., 2002 ; Menon, et al., 2010)
	Ser-416	PKA	(Ando, et al., 1996)
	Ser-423	PKA	(Ando, et al., 1996)
	Ser-425	PKA	(Ando, et al., 1996)
	Ser-431	ERK, JNK	(Busch, et al., 2012 ; Park, et al., 2012)
K17	Ser-44	RSK1	(Pan, et al., 2011)
K18	Ser-33	PKC δ	(Sivaramakrishnan, et al., 2009)
	Ser-52	MK2	(Menon, et al., 2010)
K19	Ser-35	Non déterminé	(Zhou, et al., 1999)
	Tyr-391	Src kinase	(Zhou, et al., 2010)
K20	Ser-13	MK2, PKC δ	(Menon, et al., 2010 ; Zhou, et al., 2006)

*Modifié de Kim, H.J., et al. (2015).

Dans les conditions basales, les kératines sont faiblement phosphorylées. Dans des conditions d'hyperactivité cellulaire ou en présence d'agents cytotoxiques menant à un stress physico-chimique, on observe une augmentation de leur phosphorylation sur des sites spécifiques (68). En ce qui concerne la K8, la phosphorylation du résidu K8 Ser-23 est très conservée et s'observe en situation physiologique, alors que les résidus Ser-73 et Ser-431 de K8 sont phosphorylés au cours de la mitose, en réponse aux stress cytotoxiques et au cours de l'apoptose (79). Pour sa part, la K18 est faiblement phosphorylée de façon constitutive au niveau du résidu Ser-33 tandis que son résidu Ser-52 voit sa phosphorylation augmentée au cours de la mitose et de l'apoptose (80,81). Il est actuellement admis que la phosphorylation des K8/18 permet la réorganisation du réseau des FIs et est impliquée dans la formation d'agrégats insolubles intra-cytoplasmiques tels

que ceux composants les MDB (corps de Denk Mallory) dans les hépatocytes (82). La modification de la phosphorylation joue un rôle dans la régulation de la réponse cellulaire suite à l'activation de différentes protéines kinases. Par exemple que la protéine kinase C δ (PKC δ) phosphoryle la K8 sur le résidu Ser-73 dans les cellules alvéolaires A549 entraînant l'effondrement du réseau de kératine (83). De même, p38 MAPK est impliquée dans la phosphorylation de la Ser-73 de la K8 après exposition des cellules à l'acide okadaïque alors que c-Jun N-terminal Kinase (JNK) serait responsable de la phosphorylation des résidus Ser-73 et Ser-431 après son induction dans des conditions expérimentales (84,85). La phosphorylation du résidu Ser-33 de K18 par PKC δ est associée à son interaction avec la protéine adaptatrice 14-3-3 ce qui favorise la progression du cycle cellulaire dans les hépatocytes (86,87). Par contre, la phosphorylation du résidu Ser-52 de K18 est impliquée dans la protection des hépatocytes au cours du stress cytotoxique (88) ; l'hyper phosphorylation des deux résidus Ser-33 et Ser-52 de K18 est associée à la progression de l'hépatite virale B (89).

Différentes protéines de diverses voies de signalisation cellulaire ciblent le réseau des FIs de kératine qui leur offre une plate-forme d'activité à travers des interactions directes ou indirectes. Les modifications post-traductionnelles des kératines, par la régulation de leurs fonctions, participent de cette coopération moléculaire en favorisant l'association des kératines avec des molécules clés de signalisation pour le bon fonctionnement cellulaire (65). Par exemple, la protéine adaptatrice 14-3-3 se lie à la K18 après sa phosphorylation sur le résidu Ser33, ce qui a pour effet la translocation nucléaire de la phosphatase cdc25 qui active la kinase CDK1 et permet la progression du cycle cellulaire (87). D'autre part, K17 régule la ré-épithérialisation au niveau des épithéliums malpighiens lésés en se liant à 14-3-3 σ dans le cytoplasme, ce qui favorise l'activation subséquente de la voie Akt/mTOR responsable de la croissance cellulaire (90,91).

2.5 Kératines, stress et voie de survie PI3K/AKT

Les kératines des épithéliums simples, en particulier K8/18, ont été identifiées dans plusieurs études comme des protéines associées à la réponse au stress cellulaire de types

mécanique et cytotoxique. En réponse à un stress cytotoxique par exemple, les kératines seules ou associées à d'autres protéines telle que Hsp70 forment des agrégats intracytoplasmiques. Les kératines se présentent dans ces agrégats sous formes hyperphosphorylées et subissent une réorganisation périnucléaire de leur architecture telle qu'observée au cours d'une hépatite alcoolique (80). Aussi, il est actuellement admis que les kératines médient la résistance à l'apoptose ou à la nécrose cellulaire à la suite d'un stress cytotoxique ou mécanique par divers mécanismes au niveau des cellules épithéliales (92). Leurs propriétés visco-élastiques les rendent plus résistantes aux stress mécaniques générés aux points d'adhésion focaux (PAF) que les autres membres du cytosquelette, et déterminent l'intégrité physique de la cellule (93). Ainsi, une mutation au niveau des K8/18 par exemple accroît la fragilité des hépatocytes face au stress mécanique, et les prédispose à une susceptibilité accrue aux lésions hépatiques induites par les médicaments (94).

Plusieurs auteurs ont proposé des mécanismes moléculaires associés à la résistance au stress physico-chimique médiée par les K8/18 bien que la fonction des kératines dans ce processus ne soit pas encore clairement élucidée. Par exemple, la résistance des cellules épithéliales simples aux contraintes mécaniques fait intervenir des mécano-senseurs comme les intégrines $\alpha 5\beta 1$ liant la fibronectine et une modulation des composantes du cytosquelette, parmi lesquelles les FIs de K8/18, pour aboutir à une activation de FAK (Focal Adhésion Kinase) et le recrutement de Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) (92,93). Par ailleurs, divers agents environnementaux conduisant au stress cytotoxique comme les alkylants, activent la voie des MAPK en aval de Grb2 via Rac1par un mécanisme indépendant du récepteur de facteur de croissance, et aboutissent à une cascade de phosphorylation de différentes MAPK (95). L'activation subséquente de p38 MAPK est quant à elle impliquée dans le régulation de Hsp27 (figure 13) et la phosphorylation de K8 dans ces mêmes conditions de stress (84).

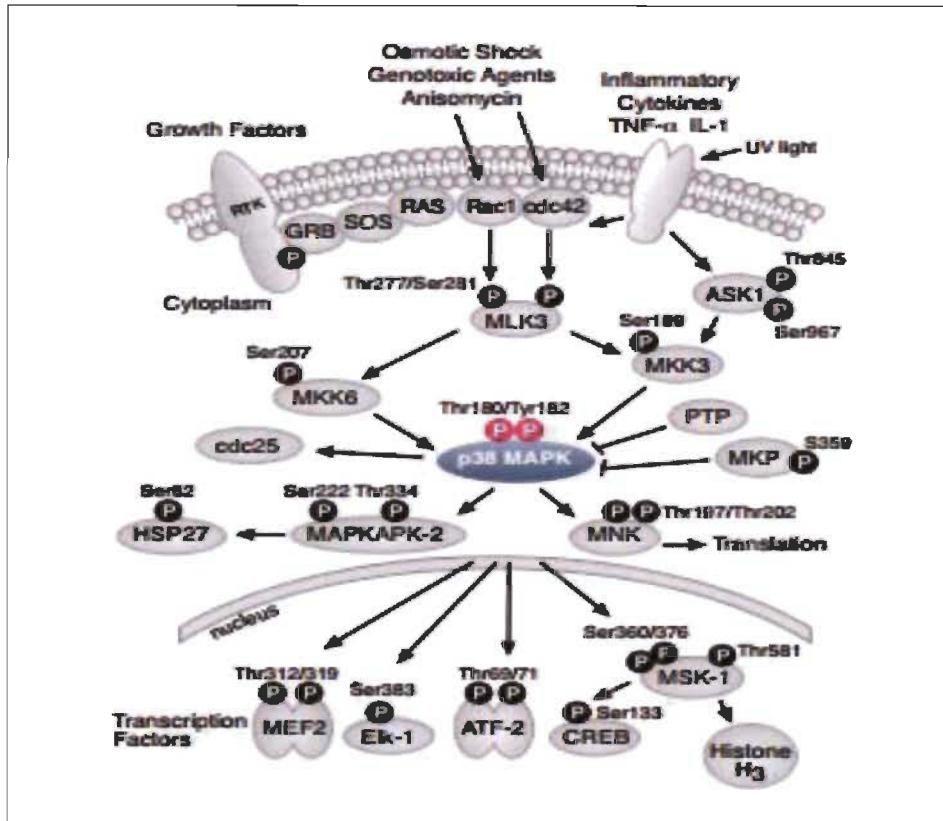


Figure 13 : Activation de la voie de p38 MAPK après induction du stress cellulaire par différents agents cytotoxiques. (2013, Cell Signaling Technology, Inc.).

La kinase Akt (protéine kinase B ou PKB) est impliquée dans la régulation de la survie cellulaire en réponse à divers stimuli qui induisent la production de phosphatidylinositol (3,4,5) tris-phosphates (PIP3) par la phospho-inositide 3-kinase (PI3K) (96). PIP3 est inséré dans la membrane plasmique et contribue au recrutement membranaire d'Akt en se liant à son domaine PH (pleckstrine-homologie) suivi de l'activation de sa fonction kinase. Son activation finale dépend de sa double phosphorylation d'une part par PDK1 (phosphatidyl inositol 3 dependent kinase 1) au niveau de la Thr308 et d'autre part au niveau de la Ser473 par mTORC2 (97). Certaines études ont montré que la stimulation des intégrines suite à une contrainte mécanique due à l'étirement membranaire active la kinase Akt par une voie dépendante des modifications des kératines, suggérant que les kératines sont nécessaires à la transmission du signal transactivateur (98,99). De plus, Akt joue un rôle dans la régulation de l'apoptose via la signalisation de NF-κB en activant IKK α qui conduit à la libération de NF-κB après la

phosphorylation de son inhibiteur cytoplasmique I κ B- α . L'activation de NF- κ B par des modifications post-traductionnelles à la suite de sa dissociation d'I κ B conduit à sa translocation nucléaire pour la transcription de ses gènes cibles dont FLIP et XIAP qui inhibent l'apoptose, participant ainsi à la survie cellulaire médiée par exemple par les kératines en réponse au stress cytotoxique (100).

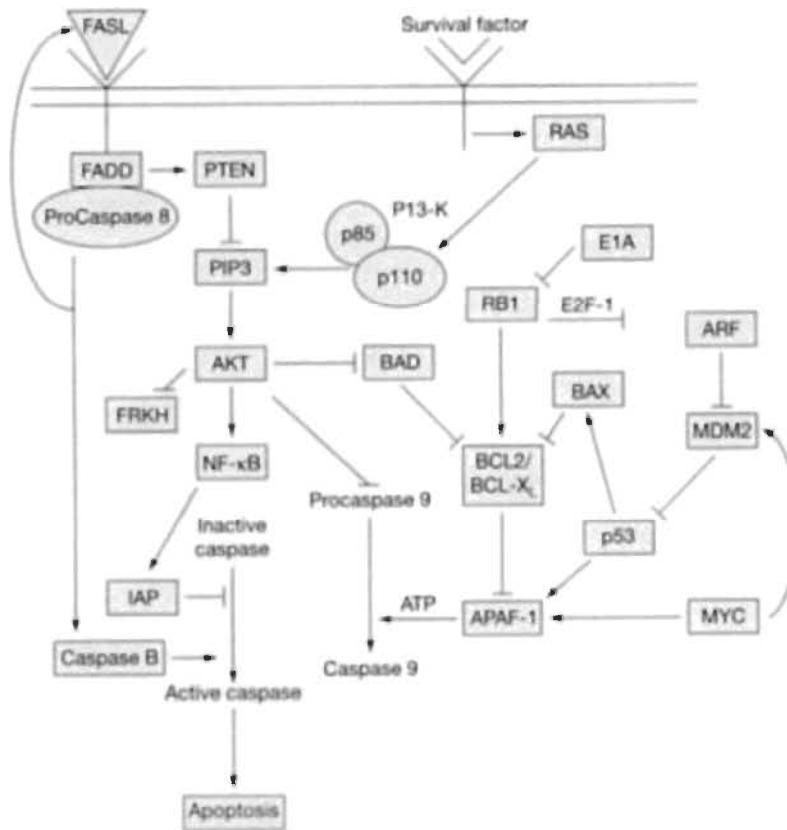


Figure 14 : Rôle de la voie oncogénique PI3K/Akt/NF-κB dans la modulation de l'apoptose. Tiré de Macdonald, F. et al. (2005).

III. Projet de Recherche

3.1 Contexte du Projet

Comme mentionné plus haut, les kératines 8/18 sont les protéines de FIs reconnues pour jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie des cellules épithéliales simples

(81,101). Leur niveau d'expression dépend aussi bien de l'état de différenciation du tissu qu'elles forment, que de l'activité physiologique en réponse à certains stimuli externes. La phosphorylation des K8/18 sur des sites spécifiques est essentielle pour la protection des cellules contre les stress mécaniques et cytotoxiques. Les mécanismes moléculaires par lesquels les kératines jouent ce rôle sont encore très mal connus. (82,102).

Des études menées dans notre laboratoire ont permis de démontrer que lors de l'intoxication des souris à la griséofulvine, un agent hépatocytotoxique, il y avait au niveau des hépatocytes une augmentation immédiate de l'expression des kératines, de leur phosphorylation, et de l'expression de la protéine de choc thermique Hsp70. À long terme, ces travaux ont montré qu'il y avait formation d'agrégats de FIs aussi appelés les MDBs (80). D'autres études ont montré, dans un modèle *in vitro* d'intoxication à la griséofulvine de cellules hépatiques HepG2, que les K8/18 co-localisaient aussi bien avec Fas qu'avec p-Akt (Ser-473) suggérant un rôle de protection des hépatocytes contre le stress cytotoxique par la modulation directe de ces voies de signalisation (103). Plus récemment, Lamontagne, S. a montré par immunoprecipitation que les K8/18 étaient directement associées à la protéine de survie Akt et au facteur de transcription NF-κB dans les cellules épithéliales hépatiques. Nous avons donc cherché à étudier le rôle de la phosphorylation des K8/18 dans les mécanismes de survie observés dans un contexte de stress cytotoxique. Plus précisément, nous avons cherché à déterminer si la modulation de la phosphorylation des K8/18 affecte leur interaction avec les protéines de la voie de survie PI3K/Akt/NF-κB.

3.2 Objectifs de l'étude

L'objectif à long terme de nos travaux est de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels les kératines protègent les cellules épithéliales simples contre le stress cytotoxique en analysant les voies de signalisation dans lesquelles elles semblent être impliquées. Comme mentionné plus haut, les K8/18 interagissent avec les protéines Akt et NF-κB. Notre hypothèse est que suite à une situation de stress cytotoxique, la phosphorylation des kératines 8/18 jouerait un rôle dans le contrôle de l'activation d'Akt

et de NF-κB. L'objectif principal de ce projet de recherche est de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels les K8/18 protègent les cellules épithéliales simples contre le stress cytotoxique de type chimique. Pour atteindre cet objectif, nous nous proposons les objectifs spécifiques suivants. Premièrement, élucider les voies de signalisation impliquées dans la réponse au stress cytotoxique dans les cellules épithéliales hépatiques ; et secondairement analyser l'interaction entre les kératines 8/18 phosphorylées et les protéines de la voie de survie PI3K/Akt/NF-κB.

3.3 Modèle expérimental

Pour mener à bien ces objectifs, nous avons basé notre étude expérimentale sur deux modèles *in vitro* soit une culture de cellules HepG2 et Hep3B. Ces deux lignées cellulaires, dérivées respectivement d'hépatomes et hépatocarcinome humains, sont utilisées par plusieurs auteurs dans des études de cytotoxicité et de métabolisme hépatiques comme alternatives de culture d'hépatocytes primaires (104,105). Nous avons adapté le protocole de Ku N-O en utilisant deux agents cytotoxiques, soit l'anisomycine et le méthyl-méthane sulfonate, après plusieurs essais de concentration et de temps de traitement. Ces deux agents ont été utilisés par cet auteur pour activer la p38 MAPK dans les cellules HT29 du colon avec la dose de 10 µg/ml pendant 0-20 heures pour l'anisomycine ou 0.1 à 1 mg/ml pendant 0-24 heures pour le méthyl-méthane sulfonate (79).

L'anisomycine est un antibiotique pyrrolidine isolé à partir de la bactérie *Streptomyces griseolus* et qui a comme propriété d'activer les SAPK, en particulier la p38 MAPK. Par ailleurs, il peut interférer partiellement avec la synthèse de l'ADN, et donc celle des protéines, en inhibant le peptidyl-transferase ou le système 80S des ribosomes (106,107). Le méthyl-méthane sulfonate est un agent alkylant qui agit par interférence avec l'ADN des cellules entraînant ainsi des dommages irréversibles. Ses propriétés pharmacologiques passent par ses métabolites qui activent plusieurs kinases dont p38 MAPK et ERK 1/2 ainsi que la voie de transduction du signal de mort cellulaire via l'acétylation des protéines (108,109).

CHAPITRE II

Phosphorylation des kératines 8/18 et modulation de la voie de survie PI3K/Akt/NF-κB dans les cellules HepG2 et Hep3B suite à un stress cytotoxique

Christian Mayemba, Eric Asselin, et Monique Cadrin¹

*Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire, Département de Biologie Médicale,
Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec G9A 5H7, Canada*

Le contenu de ce chapitre fera l'objet d'une publication en anglais dans une revue scientifique à déterminer.

1.1 Contribution des auteurs

Christian N. Mayemba a réalisé la totalité des expériences exposées dans le présent travail de recherche avec la collaboration technique de Stéphanie Lamontagne et de Nadeem Muhammad Asghar. Christian N. Mayemba a été supervisé au cours de son travail en laboratoire par la directrice de recherche Monique Cadrin et son co-directeur Éric Asselin pour diverses questions de réflexion et d'orientations méthodologiques. Monique Cadrin a contribué à la conception du projet d'étude et en a assuré la bonne réalisation. Christian N. Mayemba et Monique Cadrin ont participé à la rédaction de l'article scientifique présenté dans le présent mémoire.

1.2 Résumé de l'article

Les kératines 8/18 sont des protéines de filaments intermédiaires exprimées au niveau des cellules des épithéliums simples. Elles jouent un rôle dans la protection des cellules contre

¹ Toute correspondance peut être adressée à : Dr Monique Cadrin, Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire, Département de Biologie Médicale, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec G9A 5H7, Canada. Tél. : 819-376-5011 ; Téléc. : 819-376-5057 ; E-mail : monique.Cadrin@uqtr.ca.

les stress mécaniques et cytotoxiques. Par exemple, la phosphorylation des résidus sérine des K8 (S73 et S431) /18 (S33 et S52) est associée à la protection des hépatocytes contre l'apoptose. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus restent à déterminer. Pour étudier le rôle de la phosphorylation des K8/18 en situation de stress cytotoxique, nous avons exposé les cellules d'hépatocarcinome (HepG2 et Hep3B) à deux composés pharmacologiques (anisomycine et méthyl-méthane sulfonate) qui ont la propriété d'activer la p38 MAPK dont la K8 est un des substrats. Nous avons étudié l'expression des K8/18, et la phosphorylation de la K8 sur la sérine S73 et sur la sérine 431 suite aux différents traitements. Nous avons analysé leurs interactions respectives avec les protéines de la voie PI3K/Akt/NF-κB. Nos résultats montrent que la phosphorylation de la K8 sur les résidus serine (73 et 431) suite à l'activation de la voie p38 MAPK s'accompagne d'une augmentation de la forme active d'Akt (p-Akt-S473) en fonction du temps de traitement. Une baisse de la quantité d'IκB-α, ainsi que l'augmentation de la translocation nucléaire de NF-κB est observée en fonction de la dose et du temps de traitement. La localisation nucléaire de NF-κB est associée à une abolition de l'association entre NF-κB et K8/K18 comparée aux conditions basales. Les traitements affectent aussi l'interaction des kératines 8/18 avec la forme active de Hsp-27 (pS82), alors Ces résultats suggèrent que la phosphorylation des kératines jouerait un rôle dans la modulation de l'activation des protéines de la voie Akt/NF-κB. Nos résultats supportent donc l'hypothèse que les kératines seraient directement associées à la régulation de la voie de survie PI3K/Akt/NF-κB en réponse à un stress cytotoxique et ce afin de maintenir l'homéostasie cellulaire.

Liste des abréviations : PI3K, phosphatidyl-inositol-3 kinase ; Akt, protéine kinase B ; NF-κB, nuclear factor kappa light polypeptide gene enhacer in B-cells ; IκB-α, inhibitor alpha of nuclear factor kappa light polypeptide gene enhacer in B-cells ; IKK, IκB kinases ; FIs, filaments intermédiaires ; MF, microfilaments ; MT, microtubules ; K, kératine ; p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase ; SAPK, stress activated protein kinase ; JNK, c-Jun N-terminal kinase ; EGFR, epidermal growth factor receptor ; PKCδ, protéine kinase C delta ; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase-1 ; IGF-1, insulin growth factor-1 ; mTOR, mammalian target of rapamycine.

1.3 Introduction

Les filaments intermédiaires (FIs) constituent avec les microfilaments d'actine (MF) et les microtubules (MT) le cytosquelette de la plupart des cellules de mammifères. Ils ont une taille de 10 à 12 nm de diamètre qui est intermédiaire entre les MT (25 nm) et les MF (7 nm). Ils sont formés par une grande famille de protéines qui sont exprimées de façon spécifique durant la différenciation des cellules et dans les divers tissus (1). Les protéines de FIs sont codées par près de 70 gènes (2,3). Les kératines sont des protéines de 40 à 70 kD de poids moléculaire qui sont spécifiques aux cellules épithéliales. Elles sont réparties en deux groupes dont les kératines acidiques de type I (K9, K10, K12 à K20, K23 et K24) codés par 28 gènes et celles neutres basiques de type II (K1 à K8, K76 à K80) codées par 26 gènes (4). Elles s'associent en hétérodimères non covalents obligatoires composés d'un partenaire de chaque type dans un rapport 1 : 1 équimolaire (5). Les kératines primaires des épithéliums simples sont composées du couple K8 (type II) et K18 (type I) (K8/18). Leur organisation structurale est faite d'une partie centrale α -hélicoïdale conservée le domaine Tige flanquée de deux extrémités hétérogènes dont un domaine amino-terminal Tête et un domaine carboxy-terminal Queue (6,7). Ces extrémités sont le siège de modifications post-traductionnelles qui sont responsables de la régulation de leurs fonctions. La phosphorylation est de loin la plus étudiée et la plus importante de ces modifications post-traductionnelles (8). La phosphorylation des kératines conduit à la réorganisation du réseau de FIs et permet leur liaison à d'autres protéines (9). Ces protéines de liaison comprennent des kinases, des phosphatases, des protéines jonctionnelles et adaptatrices impliquées dans différentes voies de signalisations (10).

Alors qu'il est admis que les FIs participent à l'organisation structurale de la cellule en soutenant la membrane plasmique (11), des études récentes se sont intéressées à leurs fonctions potentielles dans le maintien de l'homéostasie cellulaire tant dans les situations normales que pathologiques (12,13). On note par exemple que des souris nourries avec une diète contenant une drogue hépatocytotoxique, la griséofulvine, présentent, au niveau des hépatocyte une augmentation rapide (premiers jours de traitement) du niveau d'expression et de la phosphorylation des kératines. À long terme, ces modifications sont associées à une désorganisation du réseau de FIs et la formation d'amas de FIs (14). Ces

amas protéiques intra-hépatocytaires connus sous le nom de Corps de Mallory-Denk sont également retrouvés au cours du développement des hépatites alcooliques chez l'homme suite à l'intoxication à l'éthanol (15). Il a aussi été montré que les hépatocytes de souris knock-out en K8 étaient beaucoup plus sensibles à la présence d'agents cytotoxiques. Ces souris développaient une hyperplasie du côlon en raison d'une hausse des gènes pro-survie et une diminution de l'activation des caspases (16). Par ailleurs, plusieurs études incriminent directement ou indirectement l'hyper-phosphorylation des K8/18 dans la migration et le pouvoir invasif de certains types de cellules cancéreuses (17). De plus, il a été démontré que des mutations dans les gènes K8/18 représentent des facteurs de prédisposition pour le développement d'hépatopathies chroniques (19). Ces mutations entraînent un défaut de l'intégrité cellulaire et de protection contre l'apoptose, ainsi qu'un déséquilibre du cycle de phosphorylation/déphosphorylation et de solubilité des kératines (20). Il apparaît ainsi que les FIs, particulièrement ceux présents dans les épithéliums simples, en plus de leur rôle structurel, auraient une fonction de protection contre l'apoptose au cours de stress de type physico-chimiques. Suite à des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, leurs interactions avec certaines protéines différentes voies de signalisation cellulaire seraient modifiées ce qui affecterait ces voies de signalisation (21,22). Les mécanismes moléculaires précis de cette protection des kératines contre l'apoptose, en particulier en réponse à un stress chimique, sont encore très mal connus.

En situation physiologique (conditions basales), les kératines sont faiblement phosphorylées alors qu'en situation d'hyperactivité cellulaire telle que la mitose ou en présence d'un agent menant au stress oxydatif ou physico-chimique les kératines deviennent phosphorylées sur des sites spécifiques (23). Ainsi, en réponse aux stimuli cytotoxiques la K8 devient phosphorylée sur le résidu sérine 73 par la p38 MAPK alors que le site K8 Serine-431 peut devenir phosphorylé suite à l'activation de la voie des MAPK dépendante de l'EGFR ou encore par la kinase JNK (24). De façon constitutive, la phosphorylation de la K18 Serine-33 est faible alors que l'apoptose et le stress cellulaire affectent la phosphorylation de Serine-52 (25). D'autres kinases comme la protéine kinase C δ (PKC δ) et la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) peuvent aussi phosphoryler les

kératines (26). Des études récentes ont montré que la perte des kératines 8/18 des cellules cancéreuses épithéliales était associée à une modulation de l'apoptose par une modification de la localisation membranaire des récepteurs Fas, de même que l'hyperactivation de la voie oncogénique PI3K/Akt/NF-κB favorisant ainsi la migration collective et l'invasion cancéreuse (27). L'activation d'Akt via la phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) après stimulation d'un récepteur à tyrosine kinase par l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) entraîne la phosphorylation de l'inhibiteur de NF-κB (IκB-α) et la translocation nucléaire de NF-κB qui induit la transcription des gènes pro-survie (28). Il a donc été suggéré que les kératines participent activement au maintien de l'homéostasie cellulaire tant dans la régulation de l'apoptose que dans la survie cellulaire par le biais de leurs liaisons avec certaines molécules importantes de signalisation cellulaire (29,30). Nous émettons ainsi l'hypothèse que les protéines Akt et/ou NF-κB seraient liées directement aux kératines 8/18 et que cette interaction serait dépendante de la phosphorylation.

Dans la présente étude, nous avons analysé l'interaction entre la phosphorylation des kératines 8 (Ser73 et Ser431) /18 et les protéines de la voie de signalisation de la phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K/Akt/NF-κB) afin de comprendre les influences réciproques menant à la modulation de l'apoptose en réponse à un stress cytotoxique de type chimique. Dans une situation basale, Akt et NF-κB sont directement liées aux kératines. Nos résultats démontrent que l'exposition des cellules HepG2 et Hep3B à des agents cytotoxiques (anisomycine et méthyl-méthane sulfonate) entraîne la phosphorylation de la K8 sur les résidus Ser-73 et Ser-431 et une activation de la protéine Akt en fonction du temps de traitement. Nous avons aussi observé que ces kératines phosphorylées interagissent avec la forme activée d'Hsp27 (pS82). Les traitements entraînent aussi une activation de NF-κB et sa translocation au niveau du noyau. Ces résultats supportent l'hypothèse que la phosphorylation des kératines pourrait moduler l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB. De par son interaction avec les kératines, la chaperonne moléculaire Hsp27 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de cette voie de signalisation.

1.4 Matériels et méthodes

Réactifs et anticorps

L'anisomycine (AN, #A9789), le Méthyl-méthane sulfonate (MMS, #129925), les inhibiteurs de phosphatases PhosSTOP (#4906845001) et le bisbenzimide Hoechst 33342 (#2261) proviennent de Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON, Canada) ; la solution de révélation SuperSignal West Pico Kit (#34080) provient de Pierce (Rockford, IL, USA); les inhibiteurs de protéases (#11 836 153 001) proviennent de Roche (Mannheim, Germany). Le Bovine Serum Albumine (BSA) (#B14), les billes d'agarose-couplées à la protéine G (#20397) et les billes magnétiques couplées à la protéine G (#88848) proviennent de ThermoFisher Scientific™ (Rockford, IL, USA).

Nous avons utilisé différents anticorps primaires dont un anti-K8 (Troma I) (Brûlet et al., 1980) et un anti-KI8 (L2Al) (Chou et Omary, 1991), anti-K8 contre deux épitopes phosphorylés de K8, soit contre K8p sérine 73 (LJ4) (Liao et al., 1997) et la sérine 431 (5B3) (Ku et Omary, 2001), ainsi qu'un anti-K18 phosphorylé sur la sérine 52 (3055), une gracieuseté du Dr. M.B. Omary (Ann Arbor, MI, USA). Tous les autres anticorps primaires utilisés proviennent de Cell Signaling Technology (New England Biolabs, Ltd., Whitby, ON, Canada). Les anticorps secondaires utilisés sont respectivement 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) de Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA, USA), un anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa 488 ou l'Alexa 555 (#A21206 et #A31572) de Molecular Probes (Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) pour l'immunofluorescence, et un anti-IgG de souris, de rat ou de lapin couplé au horseradish peroxydase (HRP) (#715-035-151, #712-035-153, #711-035-152) de Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA, USA) pour le western blot.

Culture cellulaire

Les lignées cellulaires HepG2 (#HB-8065,) et Hep3B (#HB-8064), dérivées d'hépatocarcinome, en provenance d'ATCC (Burlington, ON, Canada), ont été cultivées dans le milieu Dulbecco's Minimum Essential Medium (#SH30023.02) de Hyclone (Rockford, IL, USA) supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin (#SH30071, Hyclone) et

de 50 µg/ml de gentamicine (#SV30080.01, Hyclone), et maintenues dans une atmosphère humidifiée comprenant 5% de CO₂ à une température de 37°C. Les expériences ont été réalisées avec des cellules à 15 passages au plus. Les cellules ont été ensemencées sur des plaques de 6 trous de 9,5 cm² à raison de 10⁶ cellules par trou en vue de l'extraction protéique ou des plaques de 12 trous pour l'immunofluorescence. Pour étudier les interactions protéiques, les cellules ont été cultivées dans des boîtes de Pétri de 100 mm à raison de 5 x 10⁶ cellules par Pétri pendant 24 heures avant le traitement expérimental.

Traitements expérimentaux

Pour induire la phosphorylation des K8/18, nous avons activé la kinase p38 par une incubation des cellules avec l'anisomycine, un composé antimycosique, (2.5-10 µg/ml/2h ; 5 µg/ml 15min – 4 h) ou avec un agent alkylant, le méthyl-méthane Sulfonate, (0,25-1 mg/ml/2h ; 0,1 mg/ml 15min-4 h). Ce dernier active en plus la p42/44 MAPK. Les cellules ont été récoltées après trypsinisation puis rincées avec la solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, et un pH de 7.4), lysées avec le tampon RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate) additionné d'inhibiteurs de protéases (Complete Roche, Mannheim, Germany) et de phosphatases (PhosSTOP, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) suivi de trois séries de congélation/décongélation. L'extrait protéique a été conservé à -20°C pour immuno-buvardage de type Western.

Fractionnement cyto-nucléaire

La trousse « NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic (Thermo Scientific™, Rockford, IL, USA) » nous a permis d'extraire les fractions protéiques cytoplasmiques et nucléaires. Les cellules ont été centrifugées (500 g) pendant trois minutes le culot a été suspendu dans 100 µl de réactif CER 1 glacé contenant les inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Après une légère agitation du tube et une incubation de 10 minutes, 5,5 ml du deuxième réactif CER II a été ajouté afin de fragiliser les membranes. Après 5 minutes de centrifugation (16000 g) le surnageant contenant le cytosol a été recueilli. Le culot a été suspendu dans le troisième réactif NER de lyse complet et incubé pendant 40 minutes sur la glace, interrompu par de légères agitations à toutes les 10 minutes. Après une

centrifugation (16000 g) de 10 minutes, le surnageant (fraction nucléaire) a été recueilli et stocké à – 20°C.

Immunoprecipitation

L’analyse des interactions entre les différents complexes protéiques d’intérêt a été réalisée par immunoprecipitation. Les cellules ont été lysées avec le Wash Buffer 1 (50 mM Tris-base pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate) additionné d’inhibiteurs de protéases et de phosphatases, homogénéisées à l’aide d’une seringue (23G) puis centrifugées à 12000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Afin d’éliminer les interactions non spécifiques, les protéines ont été suspendues avec des billes d’agarose-protéine G pendant 1 heure à 4° C. Après centrifugation, le surnageant a été incubé avec un de ces anticorps primaires (p-Akt-Ser473, p-Akt-T308, NF-kBp65, K8 pSer73 ou K8 pSer431) toute la nuit sous agitation lente à 4° C, incubées avec les billes d’agarose-protéine G pendant au moins 5 heures, puis lavés avec du tampon, soit 2 fois avec Wash Buffer 2 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 0.05 sodium deoxycholate) et une fois avec Wash Buffer 3 (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Nonidet P-40, 0.05% sodium deoxycholate), et centrifugés entre chaque lavage (1 min à 12 000 g). Les billes ont été resuspendues dans un ratio 1 : 1 [billes : Tampon de chargement échantillon 1X (125 mM Tris-HCL pH 6.8, 4% SDS, 15% glycérol, 0,1% bleu de bromophénol et 1M DTT)], ensuite chauffées 5 minutes à 95°C, puis brièvement centrifugées. Le surnageant contenant les protéines immunoprecipitées a été récolté pour analyse par un immuno-buvardage de type western.

Immunobuvardage de type western

La concentration protéique a été déterminée en utilisant la trousse « Pierce™ BCA Protein Assay » suivant la méthode de Lowry modifiée (31). La séparation des protéines (30 µg/puit) a été réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) 10% (375 mM Tris pH 8,8, 5 %, 7.5 % ou 10 % acrylamide-bisacrylamide (28 : 2), 0,1 % SDS, APS et TEMED) à 200 volts durant environ 1,5 heure dans le tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1 % SDS). Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose préalablement équilibrée dans le tampon de transfert (25 mM

Tris, 192 mM glycine, 0,01 % SDS, 20 % MetOH). Le transfert a été réalisé en utilisant un appareil Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) à 15 volts pour une période de 15 minutes par membrane dans le tampon de transfert maintenu à 4 °C. Une coloration au Rouge de Ponceau a permis de vérifier le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose. La membrane a ensuite été lavée au PBS 1X pendant 5 minutes, suivi d'une saturation des sites non spécifiques avec une solution de PBS- 0,06% Tween 20 contenant 5% de lait en poudre (PBS 1X pH 7.4-5 % Lait-0,06% Tween-20) pendant 1 heure. Ensuite, les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires dilués dans le PBS-Tween-20-Lait à 1 : 1000 pour une nuit à 4°C sous légère agitation : Troma 1 (anti-K8), L2A1 (anti-K18), LJ4 (anti-K8 pSer73), 5B3 (anti-K8 pSer431), anti-Akt-totale, anti-Akt1, anti-Akt2, anti-Akt3, anti-phospho-Akt-Ser473, anti-phospho-Akt-T308, anti-NF-κBp65, anti-IkB-α, anti-phospho- I kB-α, anti-p38, anti-phospho-p38, anti-Hsp27 et anti-phospho-Hsp27-Ser82. Les membranes ont par la suite été lavées à trois reprises avec le PBS-Tween-20 durant 15 minutes. L'hybridation du deuxième anticorps conjugué à la peroxydase de Horse (HRP) a été faite dans la solution de PBS-Tween-20-Lait, dilué de [1 :5000] à [1 : 10000] pendant 45 min. Les membranes ont été lavées pendant 15 minutes avec le PBS-Tween puis une fois avec le PBS 1X. Un contrôle de charge a été effectué en utilisant l'anticorps anti-β-actine (Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) couplé à la peroxydase dans le PBS-T 20-Lait 5% pendant 45 minutes. La révélation a été faite avec un réactif chémiluminescent (Super Signal® : West Pico Kit #34095 Pierce) qui produit un signal lumineux pouvant être détecté à l'aide du système UVP Bioimaging Biodoc-it G125285. L'analyse densitométrique des images a été effectuée à l'aide du logiciel Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

Immunofluorescence

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre, traitées selon le protocole établi, lavées à 2 reprises avec du PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 4,29mM Na₂HP04, 1,47 mM KH₂P04, pH 7,2) et fixées au paraformaldehyde 3.7 %, dissout dans du PBS pour 15 minutes. Après deux lavages au PBS, les cellules ont été perméabilisées pendant 10 minutes avec le Triton 0.01% dissout dans du PBS. Les cellules ont ensuite été incubées avec au plus deux anticorps primaires dilués à différentes concentrations dans le PBS

pendant 24 heures à 4°C: Troma [1 :2], L2AI [1 :100], LJ4 [1 :100], 3055[1:100] ,anti-Akt [1:200], anti-phospho-Akt [1:200], anti-NF-κB [1:200]. Les cellules ont par la suite été incubées pendant 60 minutes avec les anticorps secondaires couplés à la fluorescéine isothiocyanate ou à la rhodamine dilués [1 :100] dans le PBS ou encore couplés à l'Alexa 488 et 555 dilués [1 :200] et [1:250] respectivement. Le Hoechst a été dilué dans le PBS à [1 :10 000] pour une incubation de 5 minutes. Les lamelles ont été montées sur une lame de verre en utilisant le milieu de montage Immuno-mount (#89261-452, VWR, Bridgeport, NJ, USA). L'observation des cellules a été effectuée à l'aide d'un microscope confocal à balayage Laser de type Leica TCS SP8.

Analyses statistiques

Le logiciel Prism GraphPad (La Jolla, Canada), version 6.0 a permis de réaliser des analyses statistiques. Les données ont été soumises à une analyse de la variance ANOVA unilatérale. Les différences entre les variances des groupes expérimentaux ont été déterminées en utilisant le test de Brown Forsythe. La signification statistique a été acceptée lorsque la valeur de p était inférieure à 0,05. Les expériences ont été répétées trois fois.

1.5 Résultats

Effet du Méthyl méthane sulfonate et de l'Anisomycine sur la phosphorylation des K8/18 et la voie de signalisation Akt et NF-κB chez les cellules HEPG2

La p38 MAPK et les kinases MK2/3 (MAPK-activated protein kinases) ont la capacité de phosphoryler les K8/18 et ainsi jouer un rôle dans la régulation de leurs fonctions (32). Pour évaluer le rôle de la phosphorylation des kératines 8/18 dans la modulation de l'activité des protéines de survie cellulaire Akt et NF-κB au cours d'un stress cytotoxique, nous avons activé la p38 MAPK par l'exposition des cellules HepG2 au méthyl-méthane sulfonate (0,25 – 1 mg/ml), un agent alkylant reconnu pour son rôle dans l'activation des voies de stress cellulaire. La Fig. 1A montre qu'une hausse de la concentration du méthyl-méthane sulfonate entraîne une augmentation de la phosphorylation de la protéine p38 MAPK, ce qui la rend active (33). Nos résultats montrent que le traitement entraîne aussi une augmentation de la quantité de la K8 et

affecte son état de phosphorylation. En effet, les résidus K8 Ser73 et K8Ser431 sont très peu phosphorylés en situation de contrôle. Le traitement avec le méthyl-méthane sulfonate entraîne une augmentation de la phosphorylation de la K8 S73 en fonction de la concentration. Le résidu K8 Ser431 montre une augmentation de phosphorylation aux doses de 0.25 à 0.5 mg/ml et une diminution par la suite. L'expression de la protéine Akt et sa phosphorylation ne sont pas affectées par ces traitements de 2h. L'exposition des cellules HepG2 à une dose croissante d'anisomycine (2.5-10 µg/ml), un antifongique induisant un stress cytotoxique de type chimique, entraîne une augmentation significative de l'expression totale de K8/18 ainsi que la phosphorylation des résidus Ser73 et Ser431 de K8, comparé aux cellules contrôles non exposées (Fig. 1B). Comme démontré ci-haut, le traitement des cellules HepG2 à dose croissante d'anisomycine ne modifie pas l'expression totale d'Akt ni n'influence sa phosphorylation.

Nous avons analysé la localisation de NF-κB entre les compartiments cytosolique et nucléaire en fonction du temps de traitement à l'anisomycine. Sous sa forme inactive NF-κB est associé à IκB et est localisé au niveau du cytoplasme. À la suite de la phosphorylation de son inhibiteur (IκB), NF-κB devient libre et se relocalise au niveau du noyau. Comme facteur de transcription, NF-κB contribue activement à la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire comme XIAP et c-FLIP (34). Nos résultats montrent que l'inhibiteur de NF-κB, IκB, devient brièvement phosphorylé après l'exposition des cellules à l'anisomycine. La phosphorylation de IκB conduit à la libération de NF-κB qui se relocalise alors au niveau du noyau. Ainsi la Fig. 1C montre une phosphorylation d'IκB suivie de la baisse de la quantité de cette fraction phosphorylée, probablement à la suite de sa dégradation par le protéasome. On note aussi une augmentation du niveau de la quantité nucléaire de NF-κB comparé au contrôle nucléaire (PARP) contrairement à sa fraction cytosolique qui décroît progressivement en comparaison à la β-tubuline cytoplasmique.

Effets de l'exposition au Méthyl méthane sulfonate et à l'Anisomycine sur l'activation des voies de survie cellulaire au cours du temps

Pour poursuivre notre étude sur l'activation de p38 MAPK et de la phosphorylation des K8/18, nous avons soumis les cellules aux deux agents cytotoxiques, soit le méthyl-méthane sulfonate ou l'anisomycine, à une dose constante en fonction du temps. Ainsi, la Fig. 2A montre qu'un traitement au méthyl-méthane sulfonate 0.1 mg/ml entraîne l'activation de p38 MAPK après 15 à 30 minutes de traitement. La p38 MAPK demeure activée pendant toute la période de traitement étudiée. L'activation de p38 MAPK est associée à une augmentation de la phosphorylation de K8 (Ser73). En effet, après 15 à 30 minutes de traitement, on note une augmentation de K8 pS73 et un accroissement de la quantité de K8 pS73 en fonction du temps. En ce qui concerne la K8 (Ser431) il y a une augmentation de la phosphorylation marquée après 15 minutes de traitement. Cependant après 2 heures d'exposition, la phosphorylation du résidu Ser431 de K8 baisse à son niveau basal. La protéine Akt dont l'expression totale reste stable voit sa phosphorylation augmenter après 15 à 30 minutes de traitement, soit au même moment où la phosphorylation de K8 est augmentée. La forme activée de Akt disparaît assez rapidement soit après 1h d'exposition au méthyl-méthane sulfonate. La protéine chaperonne Hsp27 une fois activée s'associe aux kératines 8/18 et participe dans l'activation de voies de survie cellulaire devient phosphorylée et active suite au traitement (Fig. 2A).

Le traitement avec l'anisomycine 5 μ g/ml (15 minutes à 4 heures) donne essentiellement les mêmes résultats que ceux observés suite au traitement au méthyl-méthane sulfonate (Fig. 2B). De plus suite à ce traitement les résultats concernant la phosphorylation et la dégradation de l'inhibiteur de NF- κ B qui permettent à NF- κ B d'entrer dans le noyau reproduisent le même profil que ce qui a été observé au cours de l'augmentation de la dose de l'agent cytotoxique.

Interaction entre les protéines de la voie Akt/NF- κ B et des K8/18 phosphorylés

Pour examiner s'il existe un lien entre la phosphorylation des K8/18 et l'activation de la voie Akt/NF- κ B en situation de stress cytotoxique, nous avons analysé si la phosphorylation des kératines entraînait une modification dans l'interaction des protéines

de la voie Akt/NF-κB et les kératines. Dans des études récentes nous avons montré par immunoprecipitation que Akt et NF- κB interagissaient avec les K8/18 (mémoire de maîtrise de Stéphanie Lamontagne). On observe en outre les interactions entre d'une part les protéines K8/18 et NF-κB en absence de traitement (Fig. 3A), d'autre part entre la protéine chaperonne Hsp27 (ainsi que sa forme activée) et NF-κB dans les cellules exposées au Méthyl-méthane sulfonate (Fig. 3B) ; des expériences similaires ont été obtenues aussi avec l'anisomycine (données non présentées). Il est important de noter que l'interaction entre NF-κB et son inhibiteur IκB- α , mise en évidence dans les échantillons contrôles, disparaît à la suite de l'induction du stress cytotoxique (Fig. 3B). Ceci suggère une libération de NF-κB par son inhibiteur en vue d'une translocation nucléaire et la transactivation de ses gènes cibles. Nos résultats montrent aussi que les K8/18 phosphorylés (K8 sur la Ser73 et 431) suite au traitement au Méthyl-méthane sulfonate 0.1 mg/ml/4h interagissent avec la protéine chaperonne HSP27 (pSer82) comme illustrés sur les figures 4A et 4B. Le fait que la forme active de Hsp27 induite au cours du stress se lie à NF-κB nous oriente vers une coordination d'actions impliquant d'un côté la phosphorylation des K8/18 en réponse à l'induction du stress cytotoxique, et de l'autre l'activation de NF-κB. Nos résultats ne permettent pas d'arriver à des conclusions concernant Akt puisque nous n'avons pas réussi à montrer que Akt interagit avec les kératines. Différentes études montrent que Akt interagit avec les kératines. Les expériences concernant Akt devront être répétées.

Parallèlement, les expériences d'immunofluorescence sur les cellules Hep3B exposées à l'anisomycine à la dose de 10 µg/ml pendant 2 heures démontrent que le traitement entraîne une réorganisation périnucléaire du réseau de K8/18. Ces expériences confirment aussi la nette augmentation de la forme phosphorylée de K8 S73 dans les cellules traitées à l'anisomycine comparée aux cellules contrôles (Fig. 5).

1.6 Discussion

Il est de plus en plus admis que les kératines jouent un rôle dans la régulation de certaines voies de signalisation cellulaire et plus particulièrement celles impliquées dans le processus visant à répondre à une agression de type physico-chimique (8, 17). De plus

la phosphorylation de la K8 sur les séries 73 et 431 est nécessaire pour protéger les hépatocytes contre les stress cytotoxiques (12). Dans la présente étude, nous avons donc tenté de déterminer si la phosphorylation des K8/18 joue un rôle dans la régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB. Les cellules HepG2 et Hep3B ont été traitées avec du méthyl-méthane sulfonate ou de l'anisomycine. Nos résultats montrent que ces traitements entraînent l'activation de la MAPK 38 et la phosphorylation de la K8 sur les résidus Sérine-73 et 431, aussi bien avec les cellules HepG2 que les Hep3B quel que soit l'agent toxique utilisé. Ces résultats sont en accord avec les résultats de l'équipe de Bishr Omary (3, 24) qui a montré que la K8 est un substrat de la pP38. Ces résultats indiquent que le traitement de cellules avec le méthyl-méthane sulfonate ou l'anisomycine représente deux modèles similaires qui permettent d'étudier l'effet de la phosphorylation de la K8 sur la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB.

L'activation de p38 MAPK est connue pour entraîner l'activation de la voie PI3K/Akt (35) menant à la résistance à l'apoptose via plusieurs sentiers, dont l'activation de NF-κB. Il a été montré que l'activation de la voie de signalisation NF-κB est associée à l'activation de Hsp27 (pS82) (36). Nos résultats sont en accord avec cette donnée et montrent la présence de Hsp27 (pS82) suite aux traitements avec le méthyl-méthane sulfonate et l'anisomycine. Nos résultats suggèrent aussi que la K8 phosphorylée au niveau des résidus Sérine-73 et Sérine-431 pourrait être associée à l'interaction de K8/18 avec la protéine de stress Hsp27 activée (pS82) après induction d'un stress cytotoxique. Lors de courts traitements avec le méthyl-méthane sulfonate et l'anisomycine la protéine Akt est activée. La phosphorylation précoce des K8 (S73 ; S431) /18 dans ces conditions de stress cytotoxique, s'accompagne donc d'une activation de la protéine de survie Akt. Une augmentation de la présence dans le noyau du facteur de transcription NF-κB est aussi observée. Nous avons démontré que l'induction du stress cytotoxique entraîne l'augmentation de l'expression protéique des K8/18, proportionnelle tant avec l'augmentation de la dose de l'agent cytotoxique (anisomycine ou méthyl-méthane sulfonate) que de la durée d'exposition. En outre, l'augmentation de la phosphorylation de K8 (S73 ; S431) au cours du temps est associée de façon similaire à l'activation la protéine chaperonne Hsp27. Dans plusieurs situations de stress les FIs forment des

agrégats. L'association des kératines avec Hsp27 (pS82), suggère que Hsp27 protège le réseau de FIs de K8/18 et permet de maintenir intact le réseau de FIs suite au stress cytotoxique. En accord avec ce qui précède, l'interaction entre la K8 phosphorylée (S73 ; S431) et la chaperonne Hsp27 activée (p-S82) pourrait favoriser la coopération des kératines 8/18 avec les protéines de survie Akt et/ou NF-κB, étant donné qu'il est connu que Hsp27 médie l'activation des voies de survie en situation de stress cellulaire (37,38). En effet, les kératines pourraient servir de plateforme de transport pour NF-κB et le diriger vers le noyau (39).

La phosphorylation de K8 sur le résidu S73 est impliquée aussi bien dans la régulation et la stabilisation de la protéine que dans son interaction avec certaines molécules (40), alors que celle de K8 S431, en coopération avec K8 pS73, est requise dans la réorganisation du réseau des FIs et la motilité cellulaire (41). L'augmentation du niveau de phosphorylation de ces deux sites dans nos expériences (Fig. 4), en réponse à l'induction des voies de stress dépendantes de p38, est en accord avec certaines études qui suggèrent que ces kératines réorganisées agissent comme des « éponges à phosphates » en séquestrant les molécules des SAPKs (stress activated protein kinases) (10). Ce processus permettrait d'inhiber l'activation des voies de mort cellulaire en empêchant le recrutement et l'activation des pro-caspases (25) en vue de rétablir l'équilibre rompu par l'agression. Nous avons démontré que cette phosphorylation des K8/18 s'accompagne d'une baisse d'expression de l'inhibiteur cytoplasmique de NF-κB ($I\kappa B-\alpha$), et de l'augmentation de la fraction nucléaire de NF-κB inversement à sa fraction cytosolique. On sait que la libération cytoplasmique de NF-κB est précédée par la phosphorylation de $I\kappa B-\alpha$ par un complexe kinasique IKK α ($I\kappa B$ kinases), suivie de sa rapide dégradation par le protéasome (42). Ainsi, la baisse de quantité de $I\kappa B-\alpha$ après traitement soit avec l'anisomycine ou le méthyl-méthane sulfonate correspondrait à sa dégradation suite à sa phosphorylation. En plus, l'activation concomitante de la protéine de survie Akt (p-Akt-S473), bien que de façon transitoire, supporte le concept d'une action coordonnée de modulation de cette voie de survie cellulaire par les K8/18 phosphorylées en réponse aux effets nocifs de l'agression, probablement via l'activation de Hsp27.

Se fondant sur ces observations, il est fort probable que dans les cellules étudiées, la phosphorylation de K8/18 joue un rôle direct ou indirect dans l’activation de la protéine Akt, et dans la modulation de son effet en rapport avec l’établissement du nouvel équilibre cellulaire. Cette interprétation est basée entre autres sur le fait que p-Akt-S473 voit sa quantité décroître peu de temps après son activation. Cette explication est aussi en accord avec les résultats de Wang et al. qui ont montré qu’une collaboration moléculaire permettait aux FIs de kératines et à Akt de réguler l’autophagie et la tumorigénèse (43). Dans le même ordre d’idées Kim, S. et al. ont démontré que la K17 régulait la synthèse protéique et la croissance cellulaire, en se liant avec l’adaptateur moléculaire 14-3-3 σ , stimulant de ce fait la voie Akt/mTOR (44, 45). Pris ensemble, nos résultats démontrent que les kératines sont des modulateurs de la signalisation cellulaire. Les modifications post-traductionnelles joueraient un rôle essentiel dans le contrôle de cette fonction.

En conclusion, nos résultats supportent le mécanisme moléculaire de modulation de la signalisation pro-survie par lequel la phosphorylation des K8 (S73 ; S431) / 18 est associée à l’activation des protéines Akt et NF- κ B régulant ainsi la réponse cellulaire au stress cytotoxique. Cette modulation passerait probablement par l’intermédiaire de l’activation de la protéine chaperonne Hsp27 qui jouerait un rôle dans le maintien des kératines sous forme filamenteuse et de NF- κ B. Cette constatation pourrait offrir de nouveaux marqueurs pronostiques pour les patients atteints d’hépatite chronique alcoolique ou médicamenteuse.

1.7 Remerciements

Nous remercions Stéphanie Lamontagne et Sophie Parent pour l’aide et le support technique. Ce travail est supporté par le fond de recherche du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (à M.C.). C.N.M. est bénéficiaire d’une bourse du Programme Canadien de Bourses de la Francophonie (PCBF).

1.8 Références

1. Kornreich, M., Avinery, R., Malka-Gibor, E., Laser-Azogui, A., and Beck, R. (2015) Order and disorder in intermediate filament proteins. *FEBS Lett.* **30**, 1-13.
2. Toivola, D. M., Tao, G.-Z., Habtezion, A., Liao, J., and Omary, B. M. (2005) Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* **15**, 608-617.
3. Ku, N. O., and Omary, M. B. (2006) A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J Cell Biol.* **174**, 115-125.
4. Magin, T. M., Vijayaraj, P., and Leube, R. E. (2007) Structural and regulatory functions of keratins. *Exp. Cell. Res.* **313**, 2021-2032.
5. Pan, X., Hobbs, R. P., and Coulombe, P. A. (2013) The expanding significance of keratins intermediates filaments in normal and disease epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 47-56.
6. Eriksson, J. E., and al. (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J. Clin. Invest.* **119**, 1763-1771.
7. Herrmann, H., Strelkov, S. V., Burkhard, P., and Aebi, U. (2009) Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J. Clin. Invest.* **119**, 1772-1783.
8. Snider, N. T., and Omary, M. B. (2014) Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 163-177.
9. Fortier, A.-M., and Cadrin, M. (2011) Simple epithelial keratins 8 and 18: from structural to regulatory protein. In Keratin: Structure, Properties and Applications, Ed: Dullaart R. & Mousques J. *Nova Science Publishers, Inc.*, 1-35.
10. Hyder, C. L., Pallari, H. M., Kochin, V., and Eriksson, J. E. (2008) Providing cellular signposts — post-translational modifications of intermediate filaments. *FEBS Lett.* **582**, 2140-2148.
11. Bragulla, H., and Homberger, D. G. (2009) Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J. Anat.* **214**, 516-559.
12. Omary, M. B., Ku, N.-O., Strnad, P., and Hanada, S. (2009) Toward unravelling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *J. Clin. Invest.* **119**, 1794-1805.
13. Chung, B. M., Rotty, J. D., and Coulombe, P. A. (2013) Networking galore: intermediate filaments and cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 600-612.
14. Fausther, M., Villeneuve, L., and Cadrin, M. (2004) Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice. *Comp Hepatol.* **3**, 1-15.
15. Mallory, F. B. (1911) Cirrhosis of the liver: five different lesions which it may arise. *Bull Johns Hopkins Hospital.* **22**, 69-75.

16. Habtezion, A., and al. (2010) Absence of keratin 8 confers a paradoxal micro-flora-dependant resistance to apoptosis in the colon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 1445-1450.
17. Kim, H. J., Choi, W. J., and Lee, C. H. (2015) Phosphorylation and Reorganization of Keratin Networks: Implications for Carcinogenesis and Epithelial Mesenchymal Transition. *Biomol Ther Seoul.* **23**, 301-312.
18. Jerabkova, and al. (2010) Keratin mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex: correlations between phenotype severity and disturbance of intermediate filament molecular structure. *Br. J. Dermatol.* **162**, 1004-1013.
19. Ku, N. O., Strnad, P., Zhong, B. H., Tao, G. Z., and Omari, M. B. (2007) Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology* **46**, 1639-1649.
20. Zupancic, T., and al. (2014) Intestinal Cell Barrier Function In Vitro Is Severely Compromised by Keratin 8 and 18 Mutations Identified in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* **9**, 1-8.
21. Dinsdale, D., Lee, J. C., Dewson, G., Cohen, G. M., and Peter, M. E. (2004) Intermediate filaments control the intracellular distribution of caspases during apoptosis. *Am. J. Pathol.* **164**, 395-407.
22. Ku, N. O., and Omari, M. B. (2001) Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* **276**, 26792-26798.
23. Izawa, I., and Inagaki, M. (2006) Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.* **97**, 167-174.
24. Ku, N.-O., Azhar, S., and Omari, M. B. (2002) Keratin 8 Phosphorylation by p38 Kinase Regulates Cellular Keratin Filament Reorganization. *J. Biol. Chem.* **277**, 10775-10782.
25. Schutte, B., and al. (2004) Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp. Cell. Res.* **297**, 11-26.
26. Ridge, K. M., and al. (2005) Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 30400-30405.
27. Fortier, A.-M., Asselin, E., and Cadrin, M. (2013) Keratin 8 and 18 Loss in Epithelial Cancer Cells Increases Collective Cell Migration and Cisplatin Sensitivity through Claudin1 Up-regulation. *J. Biol. Chem.* **288**, 11555-11571.
28. Dreyer, C., Raymond, E., and Faivre, S. (2009) La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. *Cancéro dig.* **1**, 187-189.
29. Gilbert, S., Loranger, A., Daigle, N., and Marceau, N. (2001) Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J. Cell. Biol.* **154**, 763-773.

30. Fortier, A.-M., Asselin, E., and Cadrin, M. (2011) Functional specificity of Akt isoforms in cancer progression. *Bio Mol Concepts.* **2**, 1-11.
31. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
32. Menon, M. B., Schwermann, J., Singh, A. K., Franz-Wachtel, M., Pabst, O., Seidler, U., Omary, M. B., Alexey Kotlyarov, and Gaestel, M. (2010) p38 MAP Kinase and MAPKAP Kinases MK2/3 Cooperatively Phosphorylate Epithelial Keratins. *J. Biol. Chem.* **285**, 3242-33251.
33. Zarubin, T., and Jiahuai, H. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research* **15**, 11-18.
34. Domachowske, J. B., Bonville, C. A., and Roseberg, H. F. (2000) Cytokeratin 17 Is Expressed in Cells Infected with Respiratory Syncytial Virus via NF-κB Activation and Is Associated with the Formation of Cytopathic Syncytia. *J Infect Dis.* **182**, 1022-1821028.
35. Horowitz, J. C., Lee, D. Y., Waghray, M., Keshamouni, V. G., Thomas, P. E., Zhang, H., Cui, Z., and Thannickal, V. J. (2004) Activation of the Pro-survival Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Pathway by Transforming Growth Factor-β1 in Mesenchymal Cells Is Mediated by p38 MAPK-dependent Induction of an Autocrine Growth Factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 1359-1367.
36. Lu, S., Yan, L., Nan, K., Kun, G., Lin, G., Feng, C., Mei, G., and Kun, L. (2009) Regulation of HSP27 on NF-κB pathway activation may be involved in metastatic hepatocellular carcinoma cells apoptosis BMC Cancer **9**, 100.
37. Ruan, J., Qi, Z., Shen, L., Jiang, Y., Xu, Y., Lan, L., Luo, L., and Yin, Z. (2015) Crosstalk between JNK and NF-κB signaling pathways via HSP27 phosphorylation in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **456**, 122-128.
38. Havasi, A., Li, Z., Wang, Z., Martin, J. L., Botla, V., Ruchalski, K., Schwartz, J. H., and Borkan, S. C. (2008) Hsp27 inhibitions Bax Activation et Apoptose via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Mechanism. *J Biol Chem.* **18**, 12305 - 12313.
39. Kim, S., and Coulomb, P.A. (2007) Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. *Genes & Dev.* **21**, 1581-1597.
40. Jaitovich, A., Mehta, S., Na, N., Ciechanover, A., Goldman, R. D., and Ridge, K. M. (2008) Ubiquitin-Proteasome-mediated Degradation of Keratin Intermediate Filaments in Mechanically Stimulated A549 Cells. *J Biol Chem.* **283**, 25348 – 25355.
41. Parc, M. K., and Lee, C. H. (2015) Effets de céruléine sur la kératine 8 phosphorylation et la réorganisation périnucléaire dans les cellules du cancer du pancréas : Implication de la régulation négative de la protéine phosphatase 2A et alpha4. *Environ Toxicol.* **1**, 1-10.

42. Kanarek, N., London, N., Schueler-Furman, O., and Ben-Neriah, Y. (2010) Ubiquitination and Degradation of the Inhibitors of NF- κ B. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**, 1-12.
43. Wang, R. C., Wei, Y., Zou, Z., Un, Z., Bhagat, G., Blanc, M., Reichelt, J., and Levine, B. (2012) Akt and Intermediates filaments of keratins collabore to regulate autophagy and tumorigenesis. *J Invest Dermatol.* **132**, 24-34.
44. Kim, S., Wong, P., and Coulombe, P. A. (2006) A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature Lett.* **44**, 362-365.
45. Kim, S., and Coulombe, P. A. (2010) Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nature Rev.* **11**, 75-82.

1.9 Légende des figures

Figure 1. Expression des kératines et de différentes protéines de signalisation cellulaire suite à l'induction dose-dépendante d'un stress cytotoxique. A. Traitement des cellules HepG2 au méthyl-méthane sulfonate aux doses de 0.25 à 1 mg/ml pendant 2 heures. Western blot montrant l'expression des kératines 8/18 totales ; K8 pSer73 ; K8 pSer431 et les modifications de différentes protéines (p38 et phospho-p38 ; Akt et phospho-Akt-Ser473) B. Traitement des cellules HepG2 à l'anisomycine aux doses de 2.5 à 10 μ g/ml pendant 2 heures. Le milieu de culture avec le diméthylsulfoxyde (DMSO) est utilisé comme contrôle. Western blot montrant les variations d'expression des K8/18, K8pSer73, K8pS43. C. Western blot montrant la localisation cyto-nucléaire de NF- κ B après traitement des cellules HepG2 à l'anisomycine à la dose de 2.5-10 μ g/ml pendant 2 heures. Le milieu de culture avec le DMSO est utilisé comme contrôle.

Figure 2. Expression des kératines et de différentes protéines de signalisation cellulaires suite à l'induction d'un stress cytotoxique en fonction du temps. A. Profil d'expression de différentes protéines de la voie PI3K/Akt et des protéines induites à la suite du stress (p38 ; phospho-p38 ; Hsp27 ; phospho-Hsp27-Ser82) après traitement des cellules HepG2 au méthyl-méthane sulfonate à la dose de 0.1 mg/ml pendant 15min-4h, avec le milieu de culture seul (DMEM) comme contrôle. B. Modulation de l'expression des K8/18 totales et phosphorylées (K8 pSer73 ; K8 pSer431), et de la protéine Akt (totale et activée) suite au traitement des cellules HepG2 à l'anisomycine à la dose de 2.5-10 μ g/ml pendant 2 heures, avec le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme contrôle. On observe

clairement que la réponse au stress est dynamique et varie au cours du temps. En outre, on note une augmentation transitoire de l'expression de la forme active d'Akt associée à la durée d'exposition de l'agent cytotoxique et une induction d'expression de la forme active de la protéine de choc thermique Hsp27.

Figure 3. Dynamique de l'interactions entre NF-κB avec les kératines 8/18, et ses autres protéines cibles avant et après induction d'un stress cytotoxique dans les cellules Hep3B. A. Western blot montrant l'interaction entre K8/18 et NF-κB dans les échantillons contrôles, après immunoprécipitation de NF-κB, alors qu'on observe une absence de cette association avec l'induction du stress cytotoxique à la suite du traitement des cellules au méthyl-méthane sulfonate à la dose de 0.1 mg/ml pendant 4h. B. Western blot montrant l'interaction entre la protéine chaperonne Hsp27 ainsi que sa forme activée (p-Hsp27-S82) avec NF-κB au cours du stress cytotoxique (traitement au méthyl-méthane sulfonate 0.1 mg/ml pendant 4h) comparé aux cellules contrôles (DMEM seul). On note également l'absence d'interaction habituelle de NF-κB avec son inhibiteur IκB-α dans les conditions expérimentales comparé aux échantillons contrôles, suggérant une libération de NF-κB en situation de stress cytotoxique en vue de sa translocation nucléaire. Notez que pour la validité de l'immunoprécipitation, l'IgG de la même espèce que l'anticorps précipité a été utilisée comme contrôle interne et le lysat total représente le pool de protéines présentes dans l'échantillon avant l'immunoprécipitation de la protéine d'intérêt.

Figure 4. Interactions de kératine 8 phosphorylée (Serine-73 et Serine-431) avec la forme active de la chaperonne Hsp27 (p-Serine-82) suite à l'induction d'un stress cytotoxique dans les cellules Hep3B. A. Western blot montrant l'interaction de K8 pSer73 avec Hsp27 pS82, après immunoprécipitation de K8 pSer73, suite au traitement des cellules Hep3B au méthyl-méthane sulfonate à la dose de 0.1 mg/ml pendant 4h, alors qu'on observe aucune interaction dans le milieu de culture seul (DMEM) utilisé comme contrôle. B. Western blot montrant l'interaction entre K8 pSer431 et Hsp27 pS82, après immunoprécipitation de K8 pS431, à la suite du traitement des cellules Hep3B au méthyl-méthane sulfonate à la dose de 0.1 mg/ml pendant 4h, comparé avec le milieu de culture

seul (DMEM) utilisé comme contrôle. Notez que pour la validité de l'immunoprecipitation, l'IgG de la même espèce que l'anticorps précipité a été utilisée comme contrôle interne.

Figure 5. Distribution des kératines 8/18 et de leurs formes phosphorylées dans les cellules Hep3B avant et après induction du stress cytotoxique. A. Des cellules Hep3B ont été traitées avec l'anisomycine à la dose de 10 µg/ml pendant 2h ou non (contrôle avec diméthylsulfoxyde seul) ; l'acquisition des images après immunofluorescence montre une réorganisation périnucléaire des K8/18 après exposition des cellules à l'anisomycine contrairement aux cellules non traitées dans lesquelles le réseau de kératines 8/18 est reconnu par son organisation cytoplasmique. K8 (Troma I) est marquée par TRITC (anti-rat), K18 marquée par Alexa 488 (anti-mouse) et les noyaux par Hoesch. B. Images d'immunofluorescence des cellules Hep3B montrant une phosphorylation de K8 Ser73 en réponse à l'anisomycine à la dose de 10 µg/ml pendant 2h, comparé aux cellules contrôles exposées au diméthylsulfoxyde seul. K8 pS73 est marquée par Alexa 555 (anti-rabbit) et les noyaux sont colorés par Hoesch.

1.10 Figures

Fig. 1. A. Methyl-méthane sulfonate 2h

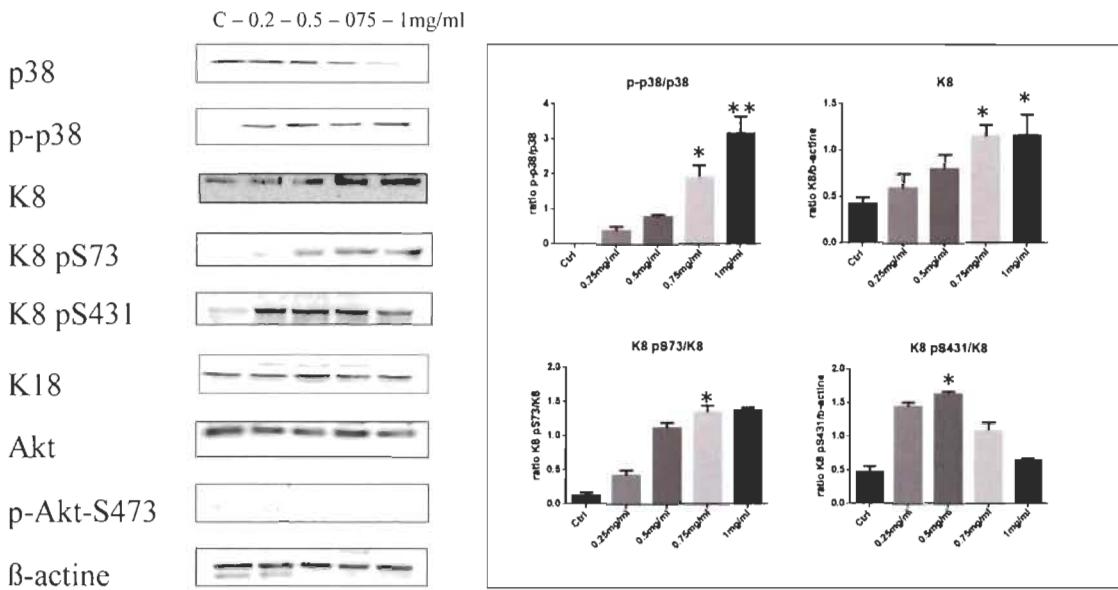


Fig. 1. B. Anisomycine 2h

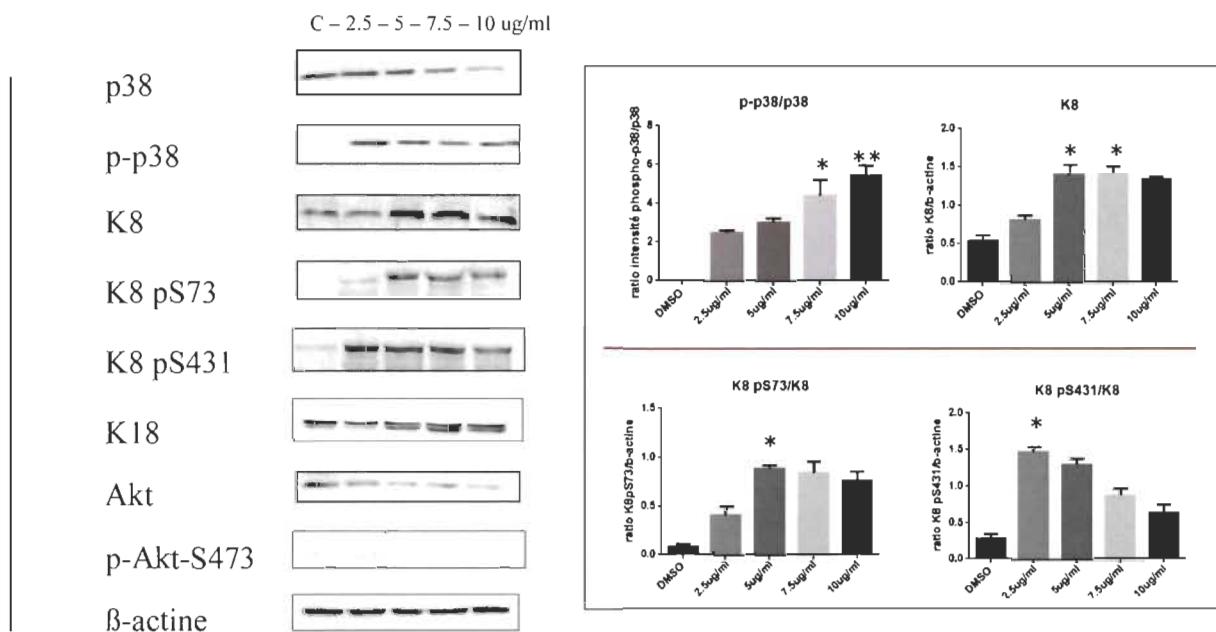


Fig. 1. C. Anisomycine 2h

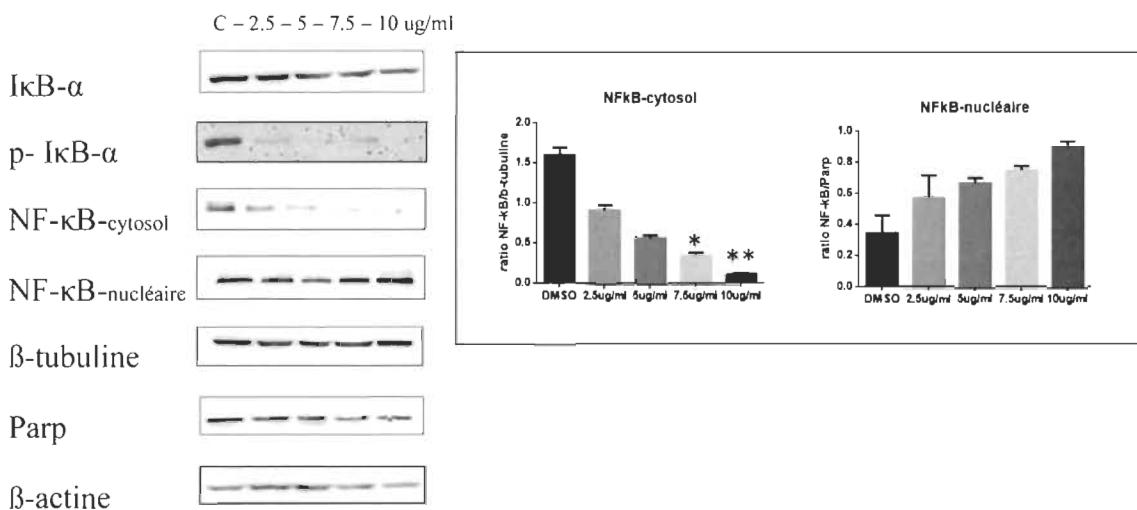


Fig. 2. A. Méthyl-méthane sulfonate 0.1 mg/ml

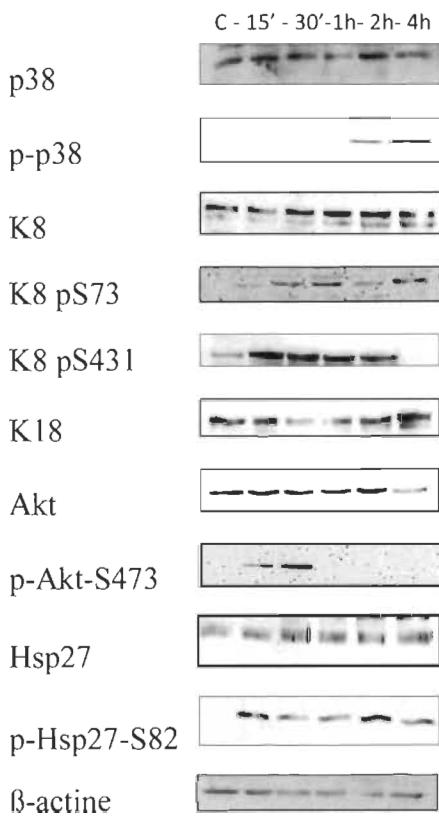


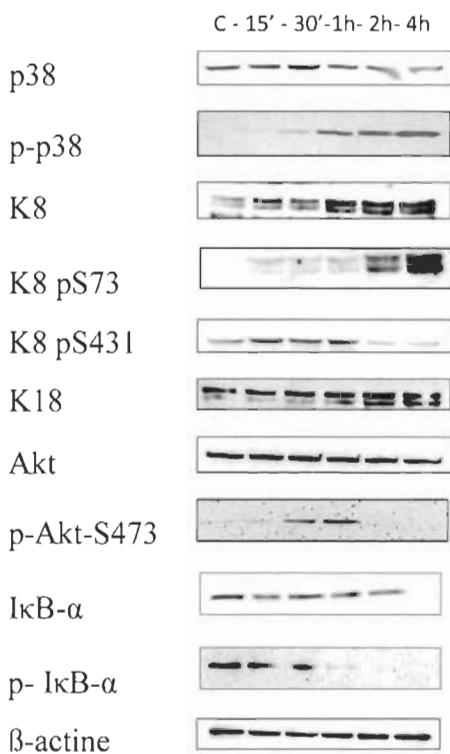
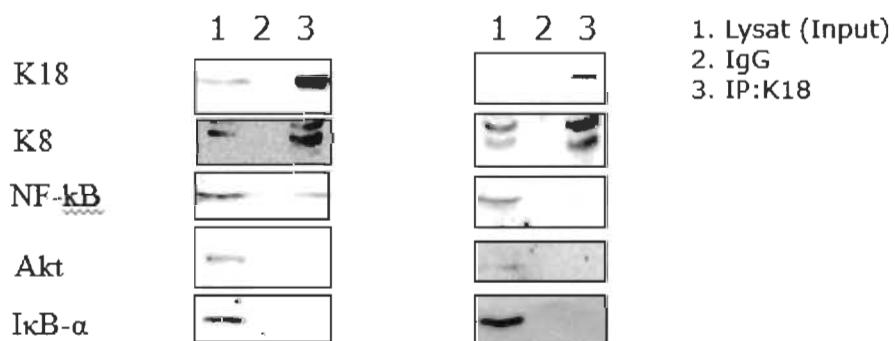
Fig. 2. B. Anisomycine 5µg/mlFig. 3. A. IP: K18Contrôle (DMEM)Méthyl-méthane sulfonate 0.1 mg/ml//4hA

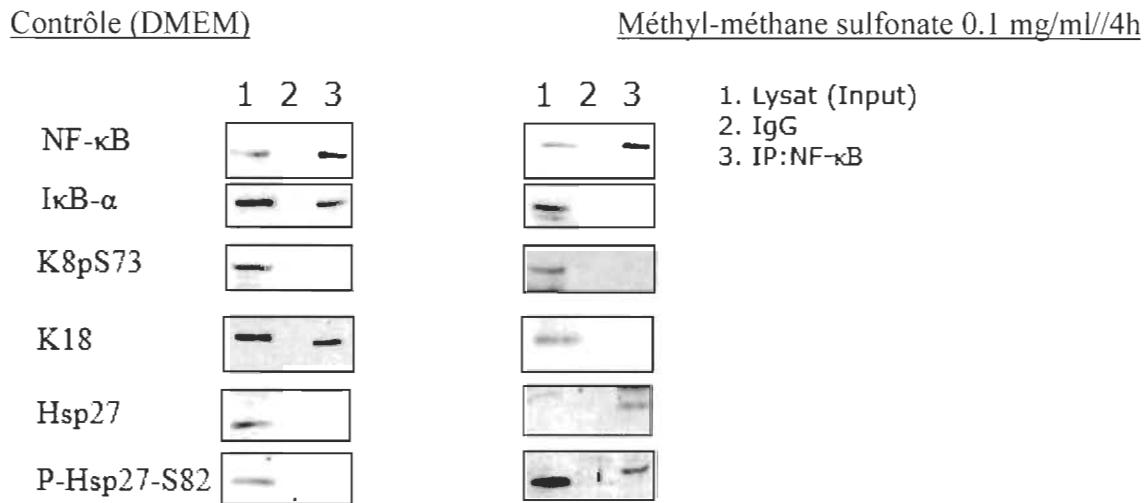
Fig. 3. B. IP: NF- κ B

Fig. 4. A. IP : K8 pS73

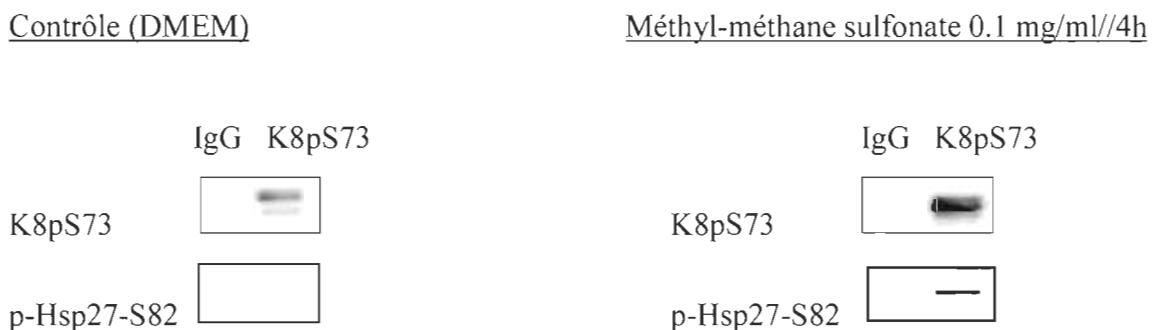


Fig. 4. B. IP : K8 pS431

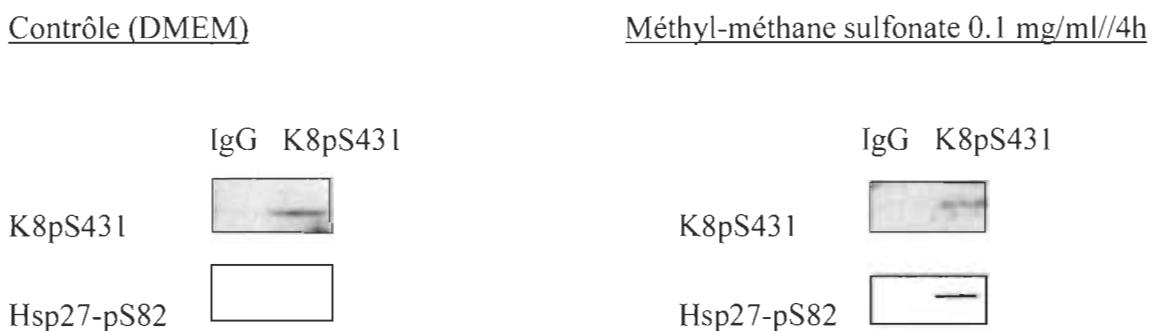


Fig. 5. A. Réorganisation des K8/18 après exposition des cellules Hep3B à l'Anisomycine (10 µg/ml/2h)

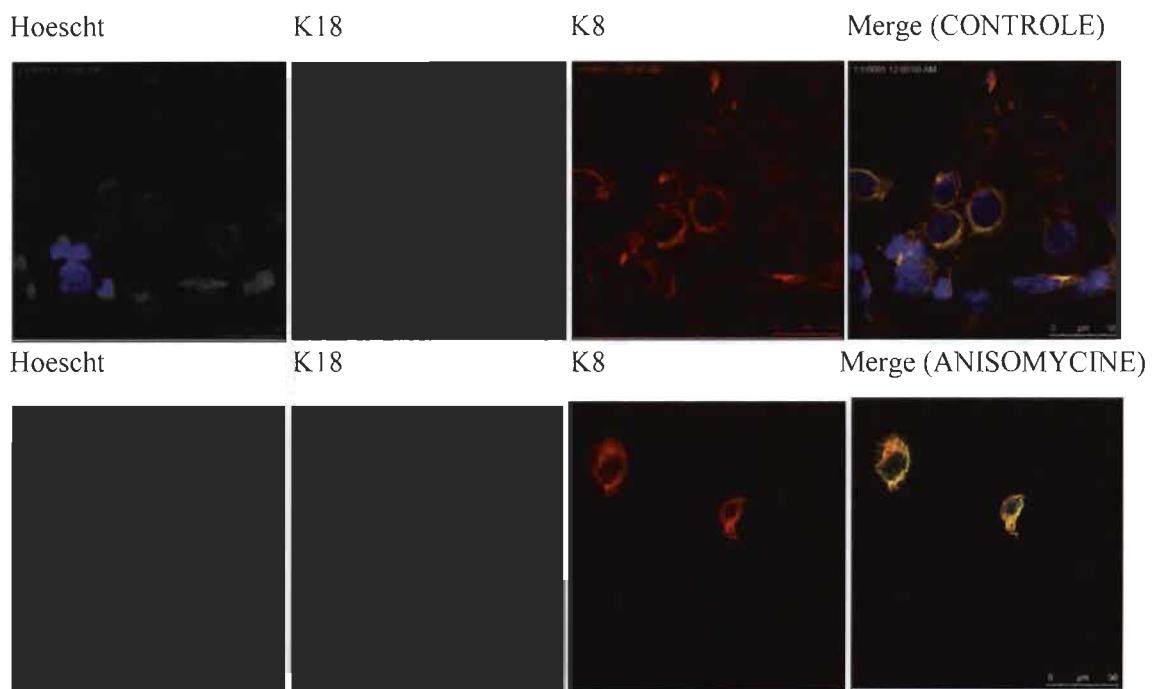
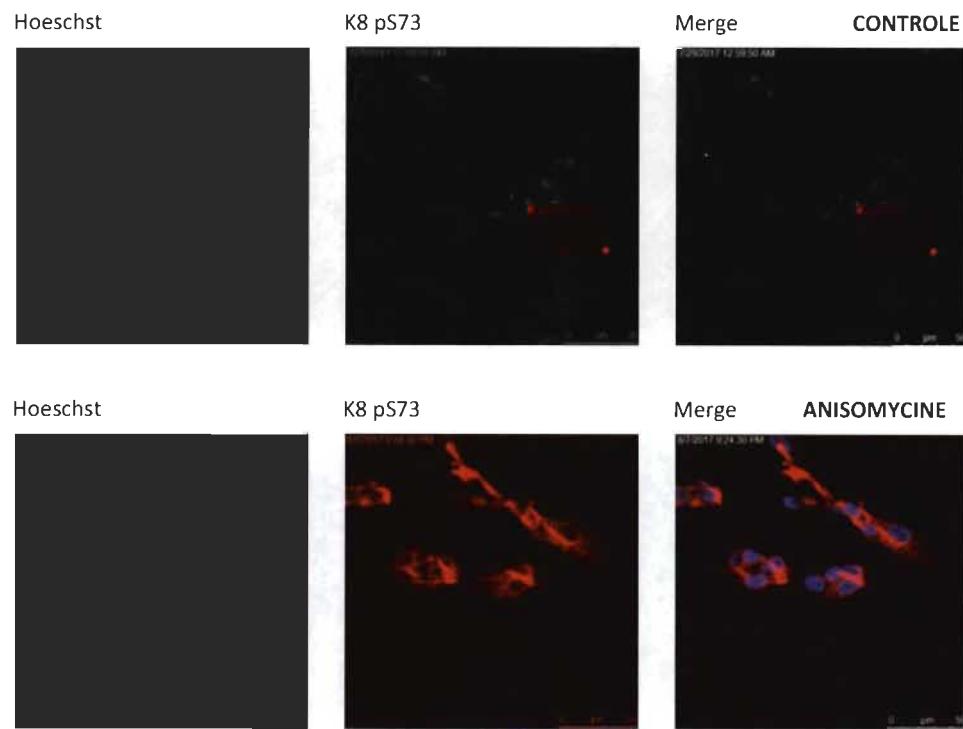


Fig. 5. B. Phosphorylation de K8 Ser73 en réponse à l'exposition des cellules Hep3B à l'Anisomycine (10 µg/ml pendant 2h)



CHAPITRE III

CONCLUSION

1.11 Discussion générale

Nos résultats montrent que l'induction chimique du stress cytotoxique dans les cellules s'accompagne d'une augmentation progressive de l'expression totale des K8/18 et leur phosphorylation de manière dose et temps dépendants. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans notre laboratoire et dans d'autres laboratoire à savoir que les kératines sont impliquées dans la réponse des cellules épithéliales au stress cytotoxique. De plus, on note que l'induction du stress cytotoxique est aussi marquée par une activation de la protéine de choc thermique Hsp27 (pS82) qui s'associe avec les K8/18. Dans ces mêmes conditions NF- κ B se détache de son inhibiteur I κ B- α et se retrouve dans le noyau. Par ailleurs, l'activation transitoire de la protéine de survie Akt (pS473) dans les expériences réalisées en fonction du temps de traitement est corrélée avec la phase initiale d'augmentation du niveau de phosphorylation des K8/18 en réponse à l'induction du stress cytotoxique, alors que la phosphorylation d'Hsp27-S82 reste constante. Il est connu que les protéines de choc thermique (Heat Shock Protein) jouent un rôle déterminant dans le maintien de l'homéostasie cellulaire au cours du stress, en particulier par la prévention du mauvais repliement des protéines qui conduit à leur agrégation (110,111). Parmi elles, la petite protéine de choc thermique Hsp27 est impliquée dans la dynamique d'assemblage des FIs en plus de co-localiser avec les kératines *in vivo*, suggérant une fonction de régulation des interactions moléculaires des kératines dans leurs réseaux cellulaires (112). Donc, dans cette étude, nous avons induit un stress cytotoxique en activant la voie p38MAPK par deux composés pharmacologiques (anisomycine et méthyl-méthane sulfonate). La cascade de signalisation conduit respectivement à la phosphorylation de la chaperonne Hsp27 (pS82) par p-MAPKAPK-2 (pMK2) et à la phosphorylation de K8 qui est un substrat de p38MAPK (84).

Pour analyser les effets de l'induction du stress cytotoxique sur l'organisation de filaments de K8/18 et leur mode d'assemblage, nous avons déterminé la dynamique d'expression de K8/18 ainsi que leur principale modification post-traductionnelle qu'est la phosphorylation. Nos données démontrent qu'en association avec la phosphorylation de p38MAPK, on observe une augmentation de l'expression des K8/18 et de leurs fractions phosphorylées (K8pS73 et K8pS431). Alors que le niveau de phosphorylation de K8 sur le résidu Ser-73 est croissante en proportion de l'augmentation de la dose de l'agent cytotoxique, celle du résidu Ser-431 atteint un pic avant de décroître. On sait par exemple que p38 phosphoryle K8 au niveau du résidu Ser-73 entraînant une résistance cellulaire à l'apoptose induite par Fas et une inhibition de la dégradation subséquente de K8 par le protéasome dans un contexte de stress cellulaire (113,114). Ainsi, on peut considérer que l'augmentation du niveau d'expression et de phosphorylation de K8 (S73) dans nos cellules participe au processus de résistance aux dommages causés par les agents cytotoxiques. Étant donné que la phosphorylation du résidu Ser-431 de K8 fait intervenir les protéines activées par divers types de stress environnementaux SAPK/ JNK (Stress Activated Proteins kinases/c-Jun N-terminal Kinase), de même que la liaison d'un ligand EGF (Epidermal growth factor) sur son récepteur (EGFR)(115), leur régulation peut expliquer la différence de réponse à l'agent cytotoxique. Aussi, la phosphorylation accrue de K8 S73 agit comme une éponge à phosphates dans les cellules subissant le stress, permettant ainsi de séquestrer les SAPK avec une baisse d'activation de certains de leurs substrats spécifiques (57). Ceci est mieux illustré avec nos expériences d'induction du stress cytotoxique en fonction du temps de traitement, où on observe une augmentation rapide de la phosphorylation du résidu Ser-431 de K8 suivie d'une décroissance alors que la phosphorylation de K8 S73 s'accroît de plus en plus.

La réorganisation périnucléaire des filaments de K8/18 après induction du stress cytotoxique dans nos expériences (microscopie confocale) est en accord avec de nombreuses études qui ont montré que la phosphorylation des K8/18 régule l'assemblage des FIs de kératines ainsi que leurs interactions avec les autres membres du cytosquelette (84,101). La phosphorylation du réseau des K8/18 est ainsi connue pour conduire à la

réorganisation des filaments sous forme des tétramères solubles, offrant une plate-forme d'interaction avec diverses molécules en fonction de l'état physiologique de la cellule (87). Bien que des kinases différentes soient probablement impliquées dans la phosphorylation de K18, comparé à celle de son partenaire K8, il existe plusieurs évidences qui plaident en faveur d'une réponse coordonnée aux différents stimuli tant en conditions physiologiques que pathologiques (62). Lors du stress cytotoxique, parallèlement à la phosphorylation des résidus sérine de K8, beaucoup d'études ont noté également la phosphorylation du résidu Ser-52 de K18, qui est associée particulièrement à la modulation de la réponse cellulaire initiale par l'induction des protéines de choc thermique (88).

Dans le but de démontrer le rôle de ces K8/18 phosphorylées dans la réponse cellulaire au stress cytotoxique, nous avons premièrement étudié l'expression des protéines cibles de la voie de survie PI3K/Akt/NF-κB à la suite de l'action des composés pharmacologiques de manière dose dépendante. Nos résultats montrent que l'expression totale de la protéine de survie Akt reste stable, sans activation notable, en réponse à l'augmentation de la dose de l'agent cytotoxique. Cependant, on note une légère baisse d'expression de l'IκB-α de manière dose dépendante accompagnée d'une perte progressive de sa fraction phosphorylée. On sait que l'activation d'IκB-α conduit à son ubiquitination rapide et sa dégradation subséquente par le protéasome (116). Nous pensons donc que ce profil d'expression de p-IκB-α correspond clairement à un mode de libération du facteur de transcription NF-κB de son inhibiteur cytoplasmique. Fait intéressant, le fractionnement subcellulaire montre qu'en réponse à l'effet cytotoxique, la localisation nucléaire du facteur de transcription s'accroît de manière dose-dépendante par rapport à sa fraction cytoplasmique, suggérant son activation et sa translocation nucléaire subséquente. Il a été décrit que la susceptibilité à l'apoptose médiée par Fas des hépatocytes K8-nul est due à une déplétion nucléaire de NF-κB p65 à la suite de l'inhibition de sa phosphorylation/activation (117). Ainsi, la présence des K8/18 est indispensable pour l'activation de NF-κB p65 et la transcription de ces gènes cibles dont ceux régulant l'apoptose dans les conditions de stress chimique cytotoxique. Une des protéines en amont de la phosphorylation du complexe kinasique IKK, activateur d'IκB-

α , est la protéine Akt. En analysant la réponse cellulaire au stress cytotoxique par rapport au temps d'exposition, nos données illustrent une activation transitoire d'Akt (pS473) dès 15 minutes d'exposition à l'agent cytotoxique pour disparaître respectivement après 1 heure pour l'anisomycine et 30 minutes pour le méthyl-méthane sulfonate. Nous pensons que la petite différence dans l'activation d'Akt des deux agents est due au fait que méthyl-méthane sulfonate active JNK en plus de p38 MAPK et que JNK est décrit pour avoir des effets pro-survie ou parfois apoptotiques (84,118).

Ensuite, nous avons étudié l'expression des autres protéines associées à la réponse au stress et à la survie cellulaires en fonction du temps d'exposition à l'agent cytotoxique. Notamment, nous avons observé une activation de la petite protéine de choc thermique Hsp27 (pS82) à l'instar de la phosphorylation progressive de p38 MAPK. Bien que la localisation subcellulaire de NF- κ B p65 en fonction du temps d'exposition de l'agent cytotoxique n'ait pas été évaluée, la similitude d'expression de la forme active de son inhibiteur cytoplasmique (p-I κ B- α) comparée à son profil d'expression de manière dose-dépendante, plaide pour la libération cytoplasmique de NF- κ B p65 et son activation subséquente. En outre, nous avons noté une interaction spécifique entre K18 et NF- κ B p65 ainsi qu'entre I κ B- α et NF- κ B p65 dans les conditions de base, et une dissociation de ces interactions après induction du stress cytotoxique par le méthyl-méthane sulfonate. Étant donné que ces conditions de stress cellulaire sont caractérisées dans nos expériences par une phosphorylation des K8/18, nous pouvons postuler que la libération et l'activation subséquente de NF- κ B p65 dans nos conditions de stress cytotoxique dépendent de la phosphorylation des K8/18. La réorganisation périnucléaire de K8/18 phosphorylées pouvant offrir un réseau de transport du NF- κ B p65 vers le noyau. En accord avec ces résultats, la démonstration faite par d'autres auteurs que l'inactivation et la déplétion nucléaire de NF- κ B p65 dans les souris K8-null étaient impliquées dans la susceptibilité à l'apoptose des hépatocytes en situation de stress cytotoxique (117).

Pris ensemble, ces résultats suggèrent une fonction active liée à la réorganisation architecturale des K8/18 phosphorylées dans la modulation de la réponse des protéines pro-survie, en particulier Akt et NF- κ B, en situation de stress cytotoxique. Il a été décrit

que l'inhibition de la phosphorylation des K8/18 en réponse au stress du réticulum endoplasmique (ER) et de l'ubiquitination des protéines par le sorafénib, un inhibiteur multi-kinase, s'accompagnait d'une augmentation de la mort cellulaire dans les cellules dérivées de l'hépatome et des hépatocytes immortalisés (119). Le mécanisme de défense hépatocytaire face au stress cytotoxique passerait donc par la phosphorylation des K8/18 sur des sites spécifiques en vue de coordonner l'activation des kinases pro-survie par des mécanismes probablement indirects. Étant donné que le stress cytotoxique entraîne une agrégation des K8/18 hyper-phosphorylées et ubiquitinées (120), et que l'accumulation des protéines mal repliées active une réponse cellulaire adaptative (unfolded protein response : UPR) (121), il y a lieu de s'interroger sur l'implication des chaperonnes moléculaires comme Hsp27 sur ces K8/18.

Nous avons réalisé une immunoprecipitation des fractions phosphorylées de K8 (pS73 et pS473) aussi bien dans les conditions basales qu'en présence de l'agent cytotoxique, en l'occurrence le méthyl-méthane sulfonate. Nos résultats montrent qu'après induction du stress cytotoxique, K8 phosphorylée (aussi bien sur le résidu Ser-73 que Ser-473) interagit avec la forme active de la petite protéine de choc thermique (Hsp27 pS82). Cette association moléculaire n'est pas visible dans les conditions basales, alors que dans le même état de stress cytotoxique NF-κB p65 interagit aussi avec Hsp27 (formes totale et activée). Puisqu'il a été proposé que l'association des petites protéines de choc thermique avec les protéines de FIs régulent leurs interactions cellulaires (112), nous pouvons postuler que Hsp27 pS82 stabilise les agrégats de K8/18 phosphorylées en même temps qu'il contribue indirectement à l'activation de NF-κB p65. Nos expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une association éventuelle entre les isoformes d'Akt et K8/18 phosphorylées dans les conditions de stress cytotoxique (données non présentées). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la phosphorylation de Hsp27 médie indirectement l'activation des protéines pro-survie, en particulier NF-κB et Akt, et inhibe les protéines pro-apoptotiques dans les conditions de stress cellulaire (122,123). Dans notre contexte, K8 phosphorylée et son association avec Hsp27, dont l'expression est inducible par une agression physico-chimique (57,82), peut être considérée comme

un élément majeur dans la modulation de la réponse cellulaire en situation de stress cytotoxique.

D'autre part, comme il est connu que l'inhibition du protéasome induit la phosphorylation des K8/18 sur leurs principaux sites et régule positivement les marqueurs de l'UPR (119), nous pouvons aussi considérer, tel que suggéré par d'autres (124), que l'accumulation des K8/18 participe du mécanisme de défense cellulaire en situation de stress. Il apparaît donc clairement que ce processus de défense en réponse au stress cytotoxique dépend de la stabilité des interactions moléculaires des K8/18 phosphorylées médierée par l'action des chaperonnes moléculaires comme Hsp27 et l'inhibition du protéasome (114). Car une dégradation précoce de ces kératines solubles et ubiquitinées via le protéasome contrebalancerait l'effet de pool de phosphates indispensables pour empêcher l'hyperphosphorylation de certaines kinases (57). Ainsi, une bonne coordination des cascades d'événements moléculaires est nécessaire pour moduler l'apoptose induite par ces agents cytotoxiques et permettre la restauration des équilibres physiologiques altérés (62).

En résumé, la phosphorylation des K8 (S73 et S431) /18 est un facteur déterminant dans la modulation de la réponse cellulaire face au stress cytotoxique médiée par la voie de survie PI3K/Akt/NF-κB. Notre recherche a montré que les hépatocytes exposés au stress cytotoxique de type chimique présentent une réorganisation périnucléaire de son réseau de K8/18 dont on note une augmentation significative de la phosphorylation. De plus, l'expression cyto-nucléaire de NF-κB plaide pour son activation et sa translocation nucléaire subséquente en conditions expérimentales, alors qu'on observe son association avec K18 dans les conditions basales. L'expression de la forme active de la petite protéine de choc thermique Hsp27 en plus de son interaction avec les fractions phosphorylées de K8, ainsi que l'activation transitoire d'Akt en réponse à l'exposition cytotoxique, orientent vers une action coordonnée initiée à la suite de l'altération des filaments de K8/18. Ensemble, ces résultats suggèrent un nouveau rôle de la phosphorylation des K8/18 dans la signalisation cellulaire par la modulation de l'activation des protéines pro-survie Akt et NF- κB en situation de stress cytotoxique.

1.12 Conclusion et Perspectives de Recherche

Nos résultats indiquent que la phosphorylation des K8/18 au cours d'un stress cytotoxique de type chimique joue un rôle crucial dans l'adaptation physiologique des cellules par la modulation de l'activité des protéines pro-survie Akt/NF-κB. La phosphorylation des K8/18 est un élément de régulation essentiel dans ces conditions et permet des interactions moléculaires avec la petite protéine de choc thermique Hsp27, ce qui détermine une coopération moléculaire avec la voie de signalisation PI3K/Akt/NF-κB. La dissociation moléculaire à la suite du stress cytotoxique entre d'une part K18 et NF κB et d'autre part NF-κB et son partenaire IκB-α, alors que s'accumule des fractions de K8/18 phosphorylées, suppose une fonction de modulation des activités physiologiques médiée par les kératines. La réorganisation périnucléaire du réseau cytoplasmique des filaments de K8/18 après leur phosphorylation pourrait ainsi offrir une plate-forme facilitant le transport et la translocation nucléaire NF-κB en vue de la transactivation des gènes pro-survie. Une association entre NF-κB et Hsp27 après exposition à l'agent cytotoxique suggère que l'action des chaperonnes moléculaires est nécessaire aux fonctions physiologiques des K8/18 phosphorylées.

Malgré tous ces résultats, il est indispensable de poursuivre les études afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels les modifications post-traductionnelles des K8/18 protègent les cellules contre les stress cytotoxiques. Particulièrement, en essayant de comprendre quels facteurs déterminent l'intensité de l'interaction entre les K8/18 phosphorylées et les différentes protéines spécifiques activées dans des conditions de stress. L'impact des chaperonnes moléculaires et du système ubiquitine-protéasome dans la stabilisation des K8/18 phosphorylées doit être approfondi dans ces conditions de stress cytotoxique, ainsi que la formation éventuelle des complexes trimériques menant à une activité commune. Il serait aussi intéressant d'étudier les marqueurs de l'UPR dans ces conditions pathologiques pour savoir clairement si la phosphorylation des K8/18 dans les hépatocytes agressés répond directement à cette réponse adaptative liée à un stress du réticulum endoplasmique.

Pour mieux comprendre comment la phosphorylation des K8/18 interagit avec d'autres modifications post-traductionnelles les affectant, telle que l'*O*-GlcNAcylation, et leurs rôles synergiques dans la régulation des voies de survie cellulaire, des études futures basées sur des techniques avancées et récentes devront être complétées dans diverses conditions de stress cellulaire. Parmi elles, l'utilisation des lignées cellulaires dont les kératines sauvages ne sont pas exprimées, qui seront transfectées par des gènes mutés et qui exprimeront de façon stable des phosphomutants de K8 (K8S73A, K8S73D, K8S431A, K8S431D) ou de K18 (K18S52A, K18S52D). Ces cellules contenant des kératines mutantes permettront de directement déterminer l'importance de la phosphorylation des kératines dans leur association avec des protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire. Des interactions éventuelles pourront être mises en évidence avec des co-immunoprécipitations de phosphomutants de K8/18 dans une banque d'ADNc des cellules HepG2 ou Hep3B exposées à l'agent cytotoxique. Ces études permettront d'identifier les résidus critiques pour la régulation des propriétés fonctionnelles des kératines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Yoshizumi, T., Gondolesi, G. E., Bodian, C. A., Jeon, H., Schwartz, M. E., Fishbein, T. M., and al. (2003) A simple new formula to assess liver weight. *Transplant Proc* **35**, 1415-1420.
2. Wilson, F. J., Kestenbaum, M. G., Gibney, J. A., and Matta, S. (1997) Histology Image Review: A complete illustrated review course in basic histology. *Appleton & Lange*.
3. Rappaport, A. M. (1963) Acinar units and the pathophysiology of the liver. In: Rouiller CH, editor. *The liver, morphology, biochemistry, physiology*. Academic Press, 265-328.
4. Castaing, D., and Veilha, L.-A. (2008) Anatomie du foie et des voies biliaires In: *Hépatologie III. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Hépatologie 7-001-A-10*, 1-14.
5. Bioulac-Sage, P., Le Bail, B., and Balabaud, C. (1999) Liver and biliary tract histology. In : Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizetto M, Rodes J eds. *Oxford textbook of clinical hepatology*. Oxford : Oxford Medical Publications, 13-21.
6. Jones, A., and Schmucker, D. L. (1999) Electron microscopy of the liver. In : Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizetto M, Rodes J eds. *Oxford textbook of clinical hepatology*. Oxford: Oxford Medical Publications, 23-31.
7. Blanc, J. F., Lepreux, S., Balabaud, C., and Bioulac-Sage, P. (2002) Histophysiologie hépatique. *Encycl Méd Chir, Hépatologie 7-005-A-10*, 50-63.
8. Gumucio, J. (1989) Hepatocyte heterogeneity: the coming of age from the description of a biological curiosity to a partial understanding of its physiological meaning and regulation. *Hepatology* **9**, 154-160.
9. Thurman, R. G., and Kauffman, F. C. (1986) Sublobular compartmentation of pharmacologic events (SCOPE) : metabolic fluxes in periportal and pericentral zones of the liver lobule. *Hepatology* **5**, 144-151.
10. Scoazec, J. (2003) Physiologie du lobule hépatique. *Encycl Méd Chir, Hépatologie. 7-005-A-12*, 94-100.
11. Zajicek , G., Oren, R., and Weinreb, M. J. (1985) The streaming liver. *Liver* **5**, 293-300.
12. Fellous, T., Islam, S., Tadrous, n., Elia, G., Kocher, H., Bhattacharya, S., Mears, L., Turnbull, D., Taylor, R., Greaves, L., Chinnery, P., Taylor, G., McDonald, S., Wright, N., and Alison, M. (2009) Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology* **49**, 1655-1663.
13. Kato, Y., Tanaka, J.-I., and Koyama, K. (2001) Intralobular Heterogeneity of Oxidative Stress and Cell Death in Ischemia-Reperfused Rat Liver. *Journal of Surgical Research* **95**, 99-106.
14. Broughan, T. A., Naukam, R., Tan, T., Van De Wiele, C. J., Refai, H., and Teague, T. K. (2008) Effects of Hepatic Zonal Oxygen Levels on Hepatocyte Stress Responses. *145*, 150-160.

15. Arundel, C., and Lewis, J. H. (2007) Drug-induced liver disease in 2006. *Curr Opin Gastroenterol* **23**, 240-244.
16. Livero, F., and Acco, A. (2016) Molecular basis of alcoholic fatty liver disease: From incidence to treatment. *Hepatol Res.* **46**, 111-123.
17. Bleibel, W., and al. (2007) Drug-induced liver injury: review article. *Dig. Dis. Sci.* **52**, 2463.
18. Larrey, D. (2003) Maladies hépatiques médicamenteuses. Aspects épidémiologiques, diagnostiques et cliniques. . *Encycl Méd Chir, Hépatologie* **7-015-M-40**, 1-10.
19. Wahington, K. (2005) Metabolic and toxic conditions of the liver. In Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA (eds): Gastrointestinal and Liver Pathology. *Philadelphia, Churchill Livingstone*.
20. Aithal, G. (2007) Dangerous liaisons: drug, host and the environment. *J. Hepatol.* **46**, 1995.
21. Bessems, J. G., and Vermeulen, N. P. (2001) Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit. Rev. Toxicol.* **31**, 55-138.
22. Chun, L. J., Tong, M. J., Busuttil, R. W., and Hiatt, J. R. (2009) Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. *Journal of Clinical Gastroenterology*. **43**, 342-349.
23. McGill, M. R., and Jaeschke, H. (2014) Mechanistic biomarkers in acetaminophen-induced hepatotoxicity and acute liver failure: from preclinical models to patients. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **10**, 1005-1017.
24. Kon, K., Kim, J., Jaeschke, H., and Lemasters, J. (2004) Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* **40**, 1170-1179.
25. Valla, D. C. (1999) Épidémiologie des atteintes alcooliques du foie. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Hépatologie* **7-035-A-10**, 1-3.
26. Picherot, G., Urbain, J., Dreno, L., Caldagues, E., Caquard, M., Pernel, A.-S., and Amar, M. (2010) L'alcoolisation des adolescents : une précocité inquiétante ? *Arch Pediatr.* **17**, 583-587.
27. Kintz, P. (2013) Interprétation des marqueurs de l'éthanol dans les cheveux (EtG et FAEE) en regard des paramètres sanguins usuels et de leurs fenêtres de détection. *La revue de médecine légale*. **4**, 107—111.
28. Silvain, C., and Chagneau-Derrode, C. (2006) Métabolisme de l'éthanol. *EMC (Elsevier SAS, Paris), Hépatologie* **7-005-C-10**, 1-8.
29. Salaspuro, M. S. (1999) Epidemiological aspects of alcoholic liver disease, ethanol metabolism, and pathogenesis of alcoholic liver injury. In: Oxford textbook of clinical hepatology. *Oxford University Pres*.
30. Shepard, B. F., Fernandez , D. J., and Tuma, P. L. (2010) Alcohol consumption impairs hepatic protein trafficking: mechanisms and consequences. *Genes Nutr* **5**, 129-140.
31. Kaplowitz, N., and Ji, C. (2006) Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **21**, S7-S9.

32. Yang, Y., Yang, F., Wu, X., Lv, X., and Liab, J. (2016) EPAC activation inhibits acetaldehyde-induced activation and proliferation of hepatic stellate cell via Rap1. *Can J Physiol Pharmacol.* **94**, 498-507.
33. Reyes-Gordillo, K., Shah, R., Arellanes-Robledo, J., Hernández-Nazara, Z., Rincón-Sánchez, A., Inagaki, Y., Rojkind, M., and Lakshman, M. (2014) Mechanisms of Action of Acetaldehyde in the Up-Regulation of the Human alpha-2 (I) Collagen Gene in Hepatic Stellate Cells, Key Roles of SkI, SMAD3, SMAD4, and SMA 7. *Am J Pathol.* **184**, 1458-1467.
34. Mallory, F. B. (1911) Cirrhosis of the liver: five different lesions which it may arise. *Bull Johns Hopkins Hospital.* **22**, 69-75
35. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., and Aster, J. C. (2010) Drug- and Toxin-Induced Liver Disease. In: Robbins and Cotran (eds) *Pathologic Basis of Disease*, Eighth Edition. Saunders Elsevier.
36. Asrani, S., and Sanchez, W. (2014) Epidemiology of alcoholic liver disease. In: Nicholas J. Talley et al. (eds) *GI Epidemiology: Diseases and Clinical Methodology*, Second Edition. 332-343.
37. Britton, E., and Lombard, M. (2015) Epidemiology of alcohol-related liver disease. In: Neuberger, J. and DiMartini, A. (eds) *Alcohol Abuse and Liver Disease*, First Edition. John Wiley & Sons, Ltd, 11-21.
38. Jepsen, P., Ott, P., Andersen, P., Sørensen, H., and Vilstrup, H. (2012) Risk for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Alcoholic Cirrhosis. A Danish Nationwide Cohort Study. *Ann Intern Med* **156**, 841-847.
39. Kendrick, S., and Day, C. (2015) Risk factors for alcohol-related liver disease. In: Neuberger, J. and DiMartini, A. (eds) *Alcohol Abuse and Liver Disease*, First Edition. John Wiley & Sons, Ltd, 47-53.
40. Nault, J.-C., and Nahon, P. (2014) Prédisposition génétique au carcinome hépatocellulaire dans la cirrhose alcoolique : la connexion NCAN-PNPLA3-lipide? *J Hepatol.* **61**, 971-972.
41. Kim, S., and Coulombe, P. A. (2010) Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**, 75-82
42. Parsons, J. T., Horwitz, A. R., and Schwartz, M. A. (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**, 633-643.
43. Windoffer, R., Beil, M., Magin, T. M., and Leube, R. E. (2011) Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J. Cell Biol.* **194**, 669-678.
44. Fletcher, D. A., and Mullins, R. D. (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485-492.
45. Wittmann, T., Hyman, A., and Desai, A. (2001) The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol.* **3**, E28–E34.
46. Yoge, S., Cooper, R., Fetter, R., Horowitz, M., and Shen, K. (2016) Microtubule Organization Determines Axonal Transport Dynamics. *Neuron* **92**, 449-460.
47. Aranson, I., and Tsimring, L. (2005) Pattern formation of microtubules and motors: Inelastic interaction of polar rods. *Phys. Rev. E* **71**, 050901, 1-6.

48. Karsenti, E., Nédélec, F., and Surrey, T. (2006) Modelling microtubule Patterns. *Nature Cell Biology* **8**, 1204-1211.
49. De La Cruz, E. M., Mandinova, A., Steinmetz, M. O., Stoffler, D., Aebi, U., and Pollard, T. D. (2000) Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. *J. Mol. Biol.* **295**, 517-526.
50. Franz, C., and Müller, D. (2005) Analyzing focal adhesion structure by atomic force microscopy. *Journal of Cell Science* **118**, 5315-5323.
51. Brown, S. (1999) Cooperation between microtubule- and actin-based motor proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 63-80.
52. Dos Remedios, C., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I., Tsubakihara, M., Berry, D., and Nosworthy, N. (2003) Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiological Reviews* **83**, 433-473.
53. Doshi, B., Hightower, L., and Lee, J. (2010) HSPB1, actin filament dynamics, and aging cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1197**, 76-84.
54. Lacayo, C. I., Pincus, Z., VanDuijn, M., Wilson, C. A., Fletcher, D. A., Gertler, F. B., Mogilner, A., and Theriot, J. A. (2007) Emergence of Large-Scale Cell Morphology and Movement from Local Actin Filament Growth Dynamics. *PLoS Biol.* **5**, 2035-2052.
55. Gunning, P., O'Neill, G., and Hardeman, E. (2007) Tropomyosin-Based Regulation of the Actin Cytoskeleton in Time and Space. *Physiological Reviews* **88**, 1-35.
56. Gieni, R., and Hendzel, M. (2009) Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochem. Cell Biol.* **87**, 283-306.
57. Ku, N. O., and Omary, M. B. (2006) A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. *J. Cell Biol.* **174**, 115-125.
58. Pan, X., Hobbs, R. P., and Coulombe, P. A. (2013) The expanding significance of keratins intermediate filaments in normal and disease epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 47-56.
59. Kornreich, M., Avinery, R., Malka-Gibor, E., Laser-Azogui, A., and Beck, R. (2015) Order and disorder in intermediate filament proteins. *FEBS Lett* **30**, 1-13.
60. Magin, T. M., Vijayaraj, P., and Leube, R. E. (2007) Structural and regulatory functions of keratins. *Exp. Cell. Res.* **313**, 2021-2032.
61. Eriksson, J. E., and al. (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J. Clin. Invest.* **119**, 1763-1771.
62. Schutte, B., and al. (2004) Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp. Cell. Res.* **297**, 11-26.
63. Herrmann, H., Strelkov, S. V., Burkhard, P., and Aebi, U. (2009) Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J. Clin. Invest.* **119**, 1772-1783.
64. Parry, D. A. D., Strelkov, S. V., Burkhard, P., Aebi, U., and Herrmann, H. (2007) Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Exp. Cell Res.* **313**, 2204-2216.

65. Snider, N. T., and Omary, M. B. (2014) Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 163-177.
66. Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V., and Aebi, U. (2007) Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 562-573.
67. Lee, C. H., Kim, M. S., Chung, B. M., Leahy, D. J., and Coulombe, P. A. (2012) Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments *Nature Struct. Mol. Biol.* **19**, 707-715.
68. Izawa, I., and Inagaki, M. (2006) Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.* **97**, 167-174
69. Loschke, F., Seltmann, K., Bouameur, J.-E., and Magin, T. M. (2015) Regulation of keratin network organization. *Curr Opin Cell Biol.* **32**, 56-65.
70. Kim, H. J., Choi, W. J., and Lee, C. H. (2015) Phosphorylation and Reorganization of Keratin Networks: Implications for Carcinogenesis and Epithelial Mesenchymal Transition. *Biomol Ther Seoul.* **23**, 301-312
71. Hyder, C. L., Pallari, H. M., Kochin, V., and Eriksson, J. E. (2008) Providing cellular signposts — post-translational modifications of intermediate filaments. *FEBS Lett.* **582**, 2140-2148
72. Seltmann, K., Roth, W., Loschke, F., Lederer, M., Hüttelmaier, S., and Magin, T. M. (2013) Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility. *J Invest Dermatol.* **131**, 181-190.
73. Khan, J., Davy, C. E., McIntosh, P. B., Jackson, D. J., Hinz, S., Wang, Q., and Doorbar, J. (2011) Role of calpain in the formation of human papillomavirus type 16 E1-E4 amyloid fibers and reorganisation of the keratin network. *J. Virol.* **85**, 9984 - 9997.
74. Jerabkova, and al. (2010) Keratin mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex: correlations between phenotype severity and disturbance of intermediate filament molecular structure. *Br. J. Dermatol.* **162**, 1004-1013.
75. Beriault, D. R., Haddad, O., McCuaig, J. V., Robinson, Z. J., Russell, D., Lane, E. B., and Fudge, D. S. (2012) The Mechanical Behavior of Mutant K14-R125P Keratin Bundles and Networks in NEB-1 Keratinocytes. *PLoS One.* **7**, e31320.
76. Omary, B. M. (2009) "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J. Clin. Invest.* **119**, 1756-1762.
77. Ku, N. O., Strnad, P., Zhong, B. H., Tao, G. Z., and Omary, M. B. (2007) Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology* **46**, 1639-1649.
78. Ku, N. O., and Omary, M. B. (2001) Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* **276**, 26792-26798.
79. Ku, N.-O., Azhar, S., and Omary, M. B. (2002) Keratin 8 Phosphorylation by p38 Kinase Regulates Cellular Keratin Filament Reorganization-Modulation by a keratin 1-like disease-causing mutation. *J. Bio Chem* **277**, 10775-10782.

80. Fausther, M., Villeneuve, L., and Cadrin, M. (2004) Heat shock protein 70 expression, keratin phosphorylation and Mallory body formation in hepatocytes from griseofulvin-intoxicated mice. *Comp Hepatol.* **3**, 1-15.
81. Fortier, A.-M., and Cadrin, M. (2012) Simple epithelial keratins 8 and 18: from structural to regulatory protein. In Keratin: Structure, Properties and Applications. Ed: Dullaart R. & Mousques J. *Nova Science Publishers, Inc.*, 1-35.
82. Kwan, R., Hanada, S., Harada, M., Strnad, P., Li, D. H., and Omary, M. B. (2012) keratin 8 phosphorylation regulates its transamidation and hepatocyte Mallory-Denk body formation. *FASEB J.* **26**, 2318-2326.
83. Ridge, K. M., and al. (2005) Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 30400-30405.
84. Ku, N.-O., Azhar, S., and Omary, M. B. (2002) Keratin 8 Phosphorylation by p38 Kinase Regulates Cellular Keratin Filament Reorganization. *J. Biol. Chem.* **277**, 10775–10782
85. Menon, M. B., Schwermann, J., Singh, A. K., Franz-Wachtel, M., Pabst, O., Seidler, U., Omary, M. B., Alexey Kotlyarov, and Gaestel, M. (2010) p38 MAP Kinase and MAPKAP Kinases MK2/3 Cooperatively Phosphorylate Epithelial Keratins. *J Biol Chem.* **285**, 3242–33251
86. Omary, M. B., Ku, N. O., Tao, G. Z., Toivola, D. M., and Liao, J. (2006) 'Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. . *Trends Biochem. Sci.* **31**, 383-394.
87. Ku, N. O., Michie, S., Resurreccion, E. Z., Broome, R. L., and Omary, M. B. (2005) Keratin binding to 14-3-3 proteins modulates keratin filaments and hepatocyte mitotic progression. *PNAS* **99**, 4373–4378.
88. Ku, N. O., Michie, S. A., Soetikno, R. M., Resurreccion, E. Z., Broome, R. L., and Omary, M. B. (1998) Mutation of a major keratin phosphorylation site predisposes to hepatotoxic injury in transgenic mice. *J. Cell Biol.* **143**, 2023-2032.
89. Ying, S., Shihui, S., Yali, L., Junfeng, L., Tong, Z., Hao, W., Xinyue, C., Dexi, C., and Yusen, Z. (2010) Keratin 18 phosphorylation as a progression marker of chronic hepatitis B. *Virology Journal* **7**, 70-78.
90. Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., and Blenis, J. (2002) Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* **16**, 1472-1487.
91. Klm, S., Wong, P., and Coulombe, P. A. (2006) A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature.* **44**, 362-365.
92. Marceau, N., Loranger, A., Gilbert, S., Daigle, N., and Champetier, S. (2001) Keratin-mediated resistance to stress and apoptosis in simple epithelial cells in relation to health and disease. *Biochem Cell Biol* **79**, 543-555.
93. Bordeleau, F., Bessard, J., Sheng, Y., and Marceau, N. (2008) Keratin contribution to cellular mechanical stress response at focal adhesions as assayed by laser tweezers. *Biochimie et biologie cellulaire* **86**, 352-359.

94. Ku, N.-O., Soetikno, R. M., and Omary, M. B. (2003) Keratin mutation in transgenic mice predisposes to Fas but not TNF-induced apoptosis and massive liver injury. *Hepatology* **37**, 1006-1014.
95. Coulthard, L. R., Blanc, D. E., Jones, D. L., McDermott, M. F., and Burchill, S. A. (2009) p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends Mol Med* **15**, 369-379.
96. Manning, B. D., and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* **129**, 1261-1274.
97. Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W., and Leal, J. F. (2008) The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* **8**, 187-198.
98. Kippenberger, S., Hofmann, M., Zöller, N., Thaçi, D., Müller, J., Kaufmann, R., and Bernd, A. (2010) Ligation of β 4 integrins activates PKB/Akt and ERK1/2 by distinct pathways-relevance of the keratin filament. *Mol Cell*. **1803**, 940-950.
99. Kippenberger, S., Kleemann, J., Meissner, M., Steinhorst, K., Müller, J., Zouboulis, C. C., Kaufmann, R., and Zöller, N. (2017) Activation of PKB/Akt and p44/42 by mechanical stretch utilizes desmosomal structures and the keratin filament. *J Dermatol Sci*. **1811**, 30983-33100.
100. Brumatti, G., Salmanidis, M., and Ekert, P. G. (2010) Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals. *Cell. Mol. Life Sci*. **67**, 1619-1630.
101. Busch, T., Armacki, M., Eiseler, T., Joodi, G., Temme, G., Jansen, J., Wichert, G. V., Omary, M. B., Spatz, J., and Seufferlein, T. (2012) Keratin 8 phosphorylation regulates keratin reorganization and migration of epithelial tumor cells. *Journal of Cell Science* **121**, 2148-2159.
102. Wang, R. C., Wei, Y., Zou, Z., Un, Z., Bhagat, G., Blanc, M., Reichelt, J., and Levine, B. (2012) Akt and Intermediates filaments of keratins collabore to regulate autophagy and tumorigenesis. *J Invest Dermatol*. **132**, 24-34
103. Fortier, A., Asselin, É., and Cadrin, M. (2005) Localization of Keratin Intermediate filaments, Fas-receptor and Phospho-Akt in Griseofulvin Treated Hepatocellular Carcinoma Cells HepG2. *The American Society for Cell Biology. 45th Annual Meeting*, (Poster 2528).
104. Donato, M. T., Tolosa, L., and Gómez-Lechón, M. J. (2015) Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. in *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (Vinken, M., and Rogiers, V. eds.), Springer New York, New York, NY. pp 77-93
105. Hammad, S., Ellethy, T., Othman, A., and Mahmoud, H. Y. A. H. (2018) Highlight report: hepatotoxicity prediction with Hep3B cells. *Arch Toxicol* **92**, 2403-2403.
106. Sun, M., Xing, F., Pan, S., Di, J., Zeng, S., and Liu, J. (2013) Low-dose anisomycin is sufficient to alter the bio-behaviors of Jurkat T cells. *Cent. Eur. J. Biol.* **12**, 1230-1240.
107. Nikaido, M., Otani, T., Kitagawa, N., Ogata, K., Iida, H., Anan, H., and Inai, T. (2018) Anisomycin, a JNK and p38 activator, suppresses cell-cell junction formation in 2D

- cultures of K38 mouse keratinocyte cells and reduces claudin-7 expression, with an increase of paracellular permeability in 3D cultures. *Histochem Cell Biol.*, 1-16.
108. Sun, B., Ross, S. M., Rowley, S., Adeleye, Y., and Clewell, R. A. (2017) Contribution of ATM and ATR kinase pathways to p53-mediated response in etoposide and methyl methanesulfonate induced DNA damage. *Environ Mol Mutagen.* **58**, 72-83.
 109. Lee, M. Y., Kim, M. A., Kim, H. J., Bae, Y. S., Park, J. I., Kwak, J. Y., Chung, J. H., and Yun, J. (2007) Alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) induces a wave of global protein hyperacetylation: implications in cancer cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* **360**, 483-489.
 110. Agashe, V. R., and Hartl, F. H. (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Cell & Developmental Biology* **11**, 15-25.
 111. Voisine, C., Pedersen, J. S., and Morimoto, R. I. (2010) Chaperone networks: Tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiol Dis.* **40**, 12-20.
 112. Perng, M. D., Cairns, L., van den IJssel, P., Prescott, A., Hutcheson, A. M., and Quinlan, R. A. (1999) Intermediate filament interactions can be altered by HSP27 and α B-crystallin. *J Cell Sci.* **112**, 2099-2112.
 113. Jiang, S., Zhao, L., Lu, Y., Wang, M., Chen, Y., Tao, D., Liu, Y., Sun, H., Zhang, S., and Ma, Y. (2014) Piwil2 Inhibits Keratin 8 Degradation through Promoting p38-Induced Phosphorylation To Resist Fas-Mediated Apoptosis. *Mol Cell Biol* **34**, 3928–3938.
 114. Ku, N. O., and Omari, M. B. (2000) Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion. *J. Cell Biol.* **149**, 547-552.
 115. Park, M. K., Lee, H. J., Shin, J., Noh, M., Kim, S. Y., and Lee, C. H. (2011) Novel participation of transglutaminase-2 through c-Jun N-terminal kinase activation in sphingosylphosphorylcholine-induced keratin reorganization of PANC-1 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1811**, 1021-1029.
 116. Kanarek, N., London, N., Schueler-Furman, O., and Ben-Neriah, Y. (2010) Ubiquitination and Degradation of the Inhibitors of NF- κ B. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, 1-12.
 117. Lee, J., Jang, K.-H., Kim, H., Lim, Y., Kim, S., Yoon, H.-N., Chung, I. K., Roth, J., and Ku, N. O. (2013) Predisposition to apoptosis in keratin 8-null liver is related to inactivation of NF- κ B and SAPKs but not decreased c-Flip. *Biology Open* **2**, 695-702.
 118. Wagner, E. F., and Nebreda, A. R. (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 537-549.
 119. Honma, Y., and Harada, M. (2013) Sorafenib enhances proteasome inhibitor-mediated cytotoxicity via inhibition of unfolded protein response and keratin phosphorylation. *Experimental Cell Research* **319**, 2166-2178.
 120. Fortier, A.-M., Riopel, K., Désaulniers, M., and Cadrian, M. (2010) Novel insights into changes in biochemical properties of keratins 8 and 18 in griseofulvin-induced toxic liver injury. *Experimental and Molecular Pathology*, **89**, 177-125.
 121. Cao, S. S., and Kaufman, R. J. (2012) Unfolded protein response. *Current biology* **22**, 622-626.

122. Ruan, J., Qi, Z., Shen, L., Jiang, Y., Xu, Y., Lan, L., Luo, L., and Yin, Z. (2015) Crosstalk between JNK and NF-kB signaling pathways via HSP27 phosphorylation in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **456**, 122-128
123. Havasi, A., Li , Z., Wang , Z., Martin, J. L., Botla, V., Ruchalski, K., Schwartz, J. H., and Borkan, S. C. (2008) Hsp27 inhibits Bax Activation and Apoptosis via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Mechanism. *J Biol Chem.* **18**, 12305 -12313.
124. Harada, M., Strnad, P., Resurreccion, E. Z., Ku, N. O., and Omary, B. M. (2007) Keratin 18 overexpression but not phosphorylation or filament organization blocks mouse Mallory body formation. *Hepatology* **45**, 88-96.