

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Desmostérol et physiologie du kératinocyte épidermique

Delescaille, Pauline

Award date:
2007

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

DESMOSTEROL ET PHYSIOLOGIE DU KERATINOCYTE EPIDERMIQUE

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Pauline DELESCAILLE

Juin 2007

Desmostérol et physiologie du kératinocyte épidermique

DELESCAILLE Pauline

Résumé

Les *lipid rafts* sont des microdomaines membranaires riches en cholestérol qui participent à la régulation de la physiologie des kératinocytes épidermiques. Une déplétion du cholestérol membranaire par la méthyl- β -cyclodextrine, un polysaccharide cyclique, modifie la structure des *lipid rafts*, perturbant les voies de signalisation intracellulaires. Etant donné que le cholestérol semble indispensable au bon fonctionnement physiologique des kératinocytes, une inhibition des enzymes nécessaires à sa synthèse doit également perturber leur physiologie. Une déplétion du cholestérol membranaire suivie d'un traitement avec la Lovastatine qui inhibe une des premières enzymes de la voie de synthèse du cholestérol amplifie les perturbations des voies de signalisation et active la différenciation des kératinocytes. Notre étude s'est concentrée sur les effets du Triparanol, un inhibiteur d'une des dernières étapes de la voie de synthèse du cholestérol, sur la physiologie des kératinocytes épidermiques lorsqu'il est combiné ou non avec une déplétion du cholestérol membranaire par la méthyl- β -cyclodextrine.

Le Triparanol et la Lovastatine utilisés seuls n'ont pas d'effets conséquents sur les voies de signalisation intracellulaires. Après une déplétion du cholestérol, un traitement avec la Lovastatine induit une augmentation de la phosphorylation du récepteur de l'EGF et de la MAPK p38, ainsi qu'une production accrue du précurseur proHB-EGF et une déphosphorylation du facteur Akt. Les inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol produisent également des modifications au niveau de la différenciation des kératinocytes qui sont différentes selon l'enzyme ciblée. Une déplétion du cholestérol membranaire combinée avec la Lovastatine produit une différenciation précoce des kératinocytes, alors que le Triparanol n'induit pas de différenciation. Les intermédiaires de la voie de synthèse du cholestérol sont donc importants pour la physiologie des kératinocytes épidermiques. Des études complémentaires des intermédiaires de la voie de synthèse du cholestérol sont envisagées afin de déterminer les intermédiaires indispensables à la différenciation.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2007

Promoteur: Y. Poumay

Co-promoteur: M. Hérin

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, Monsieur le Professeur Yves Poumay pour son accueil au sein du laboratoire, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils donnés lors des réunions hebdomadaires.

Je remercie également mon co-promoteur, Monsieur le Professeur Michel Hérin, pour son accueil.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à :

Frédéric Minner, mon tuteur, pour son aide au laboratoire et ses remarques judicieuses lors de la rédaction de mon mémoire.

Françoise Herphelin pour sa grande disponibilité, ses conseils et sa gentillesse.

Conny Mathay pour son écoute, sa sympathie et ses réponses claires face à mes interrogations.

Sylviane Lambert pour sa disponibilité, son amabilité et sa patience suite à mes questions.

Séverine Giltaire pour sa bonne humeur communicative et sa gentillesse.

Ganka Atanasova, ma voisine de bureau, pour son écoute et son sourire.

Merci aussi à toute l'équipe du laboratoire, et notamment Madame Michèle Leclercq-Smekens, Raphael Deom et Daniel Van Vlaender pour leur bonne humeur, ainsi qu'à tous les autres membres du département.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et particulièrement mes parents pour leur soutien lors des mes quatre années d'étude. Merci à mon papa pour la correction des fautes de français de mon travail écrit, à ma maman pour ses encouragements lors des moments plus difficiles et à ma grande sœur pour sa patience et son aide. Un grand merci également à Lionel pour son aide et à Manu pour sa patience et son soutien.

Table des matières

INTRODUCTION

1. LA PEAU.....	1
1.1. LES FONCTIONS DE LA PEAU.....	1
1.2. LA STRUCTURE ET LA COMPOSITION CUTANEE	1
1.2.1. L'épiderme.....	11
1.2.2. Le derme	2
1.2.3. L'hypoderme.....	2
1.3. LE KERATINOCYTE EPIDERMIQUE	2
1.3.1. La migration, la différenciation et la prolifération des kératinocytes	2
1.3.2. Les marqueurs de différenciation épidermique	3
1.3.3. L'étude in vitro des kératinocytes.....	3
1.3.4. Le contrôle de la physiologie des kératinocytes : les voies de signalisation	4
2. LE CHOLESTEROL MEMBRANAIRE.....	6
2.1. LE CHOLESTEROL ET L'ORGANISATION DES LIPIDES MEMBRANAIRES.....	6
2.2. LA VOIE DE SYNTHÈSE DU CHOLESTEROL	7
2.3. LA REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES ISOPRENOÏDES ET DU CHOLESTEROL	8
3. LES MALADIES CUTANÉES LIÉES A UNE SYNTHÈSE DU CHOLESTEROL DEFECTUEUSE	9
3.1. LE SYNDROME DE SMITH-LEMLI-OPITZ	9
3.2. LA DESMOSTEROLOSE	10
3.3. LA REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES ISOPRENOÏDES ET DU CHOLESTEROL LORS DE SYNTHÈSE DEFECTUEUSE DE CHOLESTEROL	11
4. ETUDES DU RÔLE DU CHOLESTEROL DANS LA PHYSIOLOGIE EPIDERMIQUE....	11
4.1. L'IMPACT D'UNE DEPLETION EN CHOLESTEROL SUR LA PHYSIOLOGIE DES KERATINOCYTES EPIDERMQUES.....	12
4.1.1. L'extraction du cholestérol	12
4.1.2. Les effets de la M β CD sur la physiologie des kératinocytes épidermiques	12
4.2. LES SOURIS KNOCK-OUT POUR LES ENZYMES DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DU CHOLESTEROL	13
4.3. LES INHIBITEURS DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DU CHOLESTEROL	13
4.3.1. La Lovastatine	14
4.3.2. Le Triparanol	14
5. OBJECTIFS.....	15

MATERIEL ET METHODES

1. CULTURE DES KERATINOCYTES EPIDERMQUES HUMAINS	16
1.1. MATERIEL.....	16
1.2. METHODES	16
1.2.1. Culture primaire.....	16
1.2.2. Culture secondaire	17
1.2.3. Culture tertiaire.....	17
2. TRAITEMENTS DES KERATINOCYTES.....	18
2.1. EXTRACTION DU CHOLESTEROL PAR LA METHYL-B-CYCLODEXTRINE	18

2.2. TRAITEMENT DES KERATINOCYTES AVEC LES INHIBITEURS DE LA VOIE DE SYNTHÈSE DU CHOLESTÉROL : TRIPARANOL, LOVASTATINE, NB598 ET BM15766	18
3. TEST MTT.....	18
4. TEST D'INCORPORATION DE LA ³H-THYMIDINE	19
4.1. MATÉRIEL.....	19
4.2. MÉTHODE	19
5. LE DOSAGE DU CHOLESTÉROL	20
5.1. MATÉRIEL.....	20
5.2. PRINCIPE.....	20
5.3. MÉTHODE	20
6. ANALYSE DES PROTÉINES CELLULAIRES PAR WESTERN BLOT	21
6.1. MATÉRIEL.....	21
6.2. MÉTHODES	21
6.2.1. Extraction des protéines.....	21
6.2.2. Electrophorèse et transfert	21
6.2.3. Analyse de la membrane de transfert.....	22
7. ANALYSE DES ARN MESSAGERS PAR RT-PCR QUANTITATIVE	22
7.1. EXTRACTION DES ARN MESSAGERS	22
7.1.1. Matériel.....	22
7.1.2. Méthode	23
7.2. TRANSCRIPTION RÉVERSE	23
7.2.1. Matériel.....	23
7.2.2. Méthode	24
7.3. PCR EN TEMPS RÉEL.....	24
7.3.1. Matériel.....	24
7.3.2. Principe.....	24
7.3.3. Méthode	24

RESULTATS

1. IMPACT DU TRIPARANOL SUR LA VIABILITÉ ET LA PROLIFÉRATION DES KERATINOCYTES.....	26
1.1. EXPERIENCE	26
1.2. ANALYSE DE LA VIABILITÉ.....	26
1.3. ANALYSE DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE	27
1.4. CONCLUSION	27
2. ANALYSE DES VOIES DE SIGNALISATION ET DE LA DIFFÉRENCIATION DES KERATINOCYTES SUITE A UN TRAITEMENT AVEC LE TRIPARANOL.....	28
2.1. EXPERIENCE	28
2.2. ANALYSE MORPHOLOGIQUE.....	28
2.3. ANALYSE PROTÉIQUE	29
2.3.1. Les voies de signalisation intracellulaires	29
2.3.2. La différenciation cellulaire.....	30
2.4. CONCLUSION	30

3. ANALYSE DES VOIES DE SIGNALISATION ET DE LA DIFFERENCIATION DES KERATINOCYTES SUITE A UNE INHIBITION AU PREALABLE DE LA VOIE DE SYNTHESE DU CHOLESTEROL	32
3.1. EXPERIENCE	32
3.2. ANALYSE MORPHOLOGIQUE.....	33
3.3. ANALYSE PROTEIQUE	33
3.3.1. Les voies de signalisation intracellulaires	33
3.3.2. La différenciation cellulaire.....	34
3.4. ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE	34
3.5. CONCLUSION	36
4. EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE DES ENZYMES DHCR24 ET HMGCR APRES TRAITEMENT AVEC L'INHIBITEUR TRIPARANOL	37
4.1. EXPERIENCE	37
4.2. ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE	37
4.3. CONCLUSION	37
5. L'IMPACT DU TRIPARANOL SUR LE CHOLESTEROL CELLULAIRE	38
5.1. EXPERIENCE	38
5.2. ANALYSE DU DOSAGE DU CHOLESTEROL	38
5.3. CONCLUSION	38
6. L'ACTION D'AUTRES INHIBITEURS DE LA VOIE DE SYNTHESE DU CHOLESTEROL	40
6.1. EXPERIENCE	40
6.2. ANALYSE DE LA TOXICITE DES INHIBITEURS.....	40
6.3. ANALYSE DE LA MORPHOLOGIE CELLULAIRE	40
6.4. ANALYSE PROTEIQUE	41
6.5. ANALYSE TRANSCRIPTIONNELLE	41
6.6. CONCLUSION	41
7. CONCLUSION.....	42

DISCUSSION

BIBLIOGRAPHIE

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
APS	Ammonium persulfate
APP	Amyloid protein precursor
AR	Amphiréguline
ARN	Acide ribonucléique
BPE	Bovine Pituitary Extract
BTC	Bétacelluline
cdk	Cyclin-dependant kinase
Ct	Cycle threshold
cPLA2	Phospholipase A2 cyclique
dFCS	Fœtal Calf Serum dialysé
DHCR7	3 β -Hydroxystérol Δ 7-Réductase
DHCR24	3 β -Hydroxystérol Δ 24-Réductase
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétate
EGF	Epidermal Growth Factor
EPR	Epiréguline
EPSK	Epithélium Pavimenteux Stratifié Kératinisé
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
GDP	Guanosine diphosphate
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosine triphosphate
HB-EGF	Heparin-Binding Growth Factor
HER	Human EGF Receptor
HMG-CoA	Hydroxylméthylglutaryl-Coenzyme A
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HRP	Horse Radish Peroxydase
IgG	Immunoglobuline G
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
KGM	Keratinocyte Growth Medium
KBM	Keratinocyte Basal Medium
LDL	Low density lipoprotein
LOV	Lovastatine
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKAP-K2	Mitogen-Activated Protein Kinase Activated Protein Kinase 2
M β CD	Méthyl- β -cyclodextrine
MEKK	MAPK Kinase Kinase
MEK	MAPK Kinase
MSK	Mitogen- and Stress- activated protein Kinase
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NAK	Normal Abdominoplasty Keratinocyte
NF κ B	Nuclear Factor- κ B
NRG	Neuréguline
pb	paire de bases

PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PKB	Protein Kinase B
pRb	Protein Retinoblastoma
Ptch	Patched
ROS	Reactive Oxygen Species
RQ	Relative quantification
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SCAP	SREBP-Cleavage-Activating Protein
SDS	Sodium dodecyl sulfate
seladin-1	Selective Alzheimer disease indicator-1
SH2	Src Homology 2
Shh	Sonic hedgehog
SLOS	Smith-Lemli-Opitz Syndrome
Smo	Smoothened
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
TCA	Trichloroacetic Acid
TGR- α	Transforming Growth Factor- α
TR	Triparanol
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
UVA	Ultraviolet A

INTRODUCTION

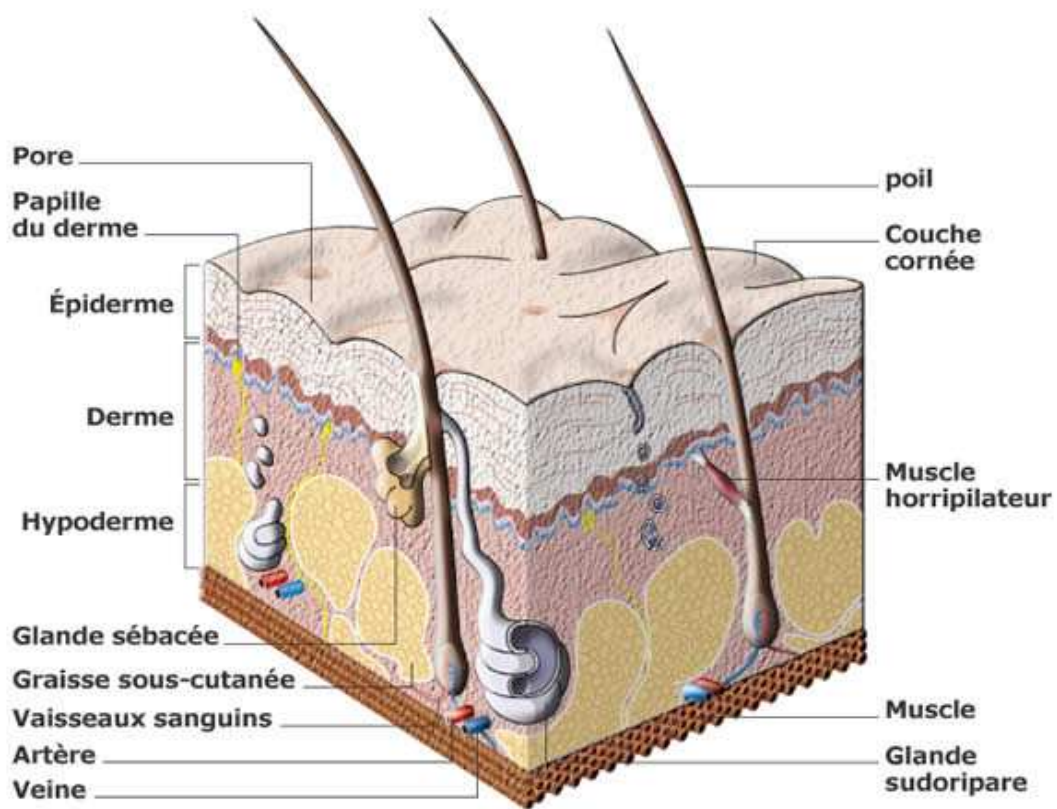


Figure 1-1 : Les trois couches cutanées : l'épiderme, le derme, l'hypoderme et les annexes cutanées.

(www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/imgArt/peau/derme01.html)

1. La peau

1.1. Les fonctions de la peau

La peau, l'enveloppe externe des organismes vertébrés, est l'organe le plus étendu du corps humain. Sa surface est comprise entre 1,5 et 2 m² et sa masse approximative est de 4 kg chez un homme adulte, ce qui représente 7% de la masse corporelle totale.

La composition cutanée permet d'assurer différentes fonctions essentielles. La peau permet de limiter les pertes en eau et de protéger l'organisme contre les stress mécaniques, chimiques, thermiques, radiatifs et infectieux. La couche la plus superficielle de la peau, la couche cornée, constitue cette barrière. La peau garantit également une sensibilité vis-à-vis de l'environnement par la présence de terminaisons nerveuses. Une isolation thermique est le résultat de la présence de tissus adipeux sous-cutanés qui permettent de contrôler la température interne de l'organisme, tandis que les glandes sudoripares dermiques permettent d'éviter que la température corporelle ne s'élève de manière trop importante. L'hypoderme, la couche la plus interne de la peau, représente une réserve énergétique importante notamment grâce aux triglycérides, ainsi qu'à la vitamine D qui est synthétisée au niveau de la peau par photo-réaction.

1.2. La structure et la composition cutanée

La morphologie cutanée permet de distinguer trois zones superposées, de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure 1-1).

1.2.1. L'épiderme

L'épiderme, la couche la plus externe de la peau, est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé (EPSK) dont l'épaisseur varie en fonction de sa localisation au niveau du corps. Un EPSK de type B (ou mince), dont l'épaisseur varie entre 75 et 150 µm, recouvre l'ensemble du corps humain, à l'exception des paumes des mains et des plantes des pieds. Ces zones subissent d'importantes forces de friction et possèdent quant à elles un EPSK de type A (ou épais) caractérisé par une épaisseur qui se situe entre 400 et 600 µm.

L'épiderme comporte quatre types cellulaires : les kératinocytes, les cellules de Langerhans, les cellules de Merkel et les mélanocytes.

Les *kératinocytes* se présentent en couches jointives et constituent le type cellulaire épidermique majoritaire. Les kératinocytes sont essentiels dans l'épiderme car ils forment la barrière entre l'environnement extérieur et intérieur en constituant la couche cornée.

Les *cellules de Langerhans* sont des cellules dendritiques qui forment un réseau de cellules immunitaires. Elles se situent principalement dans les couches épidermiques basale et épineuse de l'épiderme.

Les *cellules de Merkel* présentes dans la couche basale jouent le rôle de récepteur sensoriel qui, suite à une stimulation mécanique, transmet un signal aux fibres nerveuses.

Les *mélanocytes* se localisent dans la couche basale et synthétisent la mélanine dans les mélanosomes. Les mélanosomes, transférés aux kératinocytes, garantissent la photo-protection de l'épiderme.

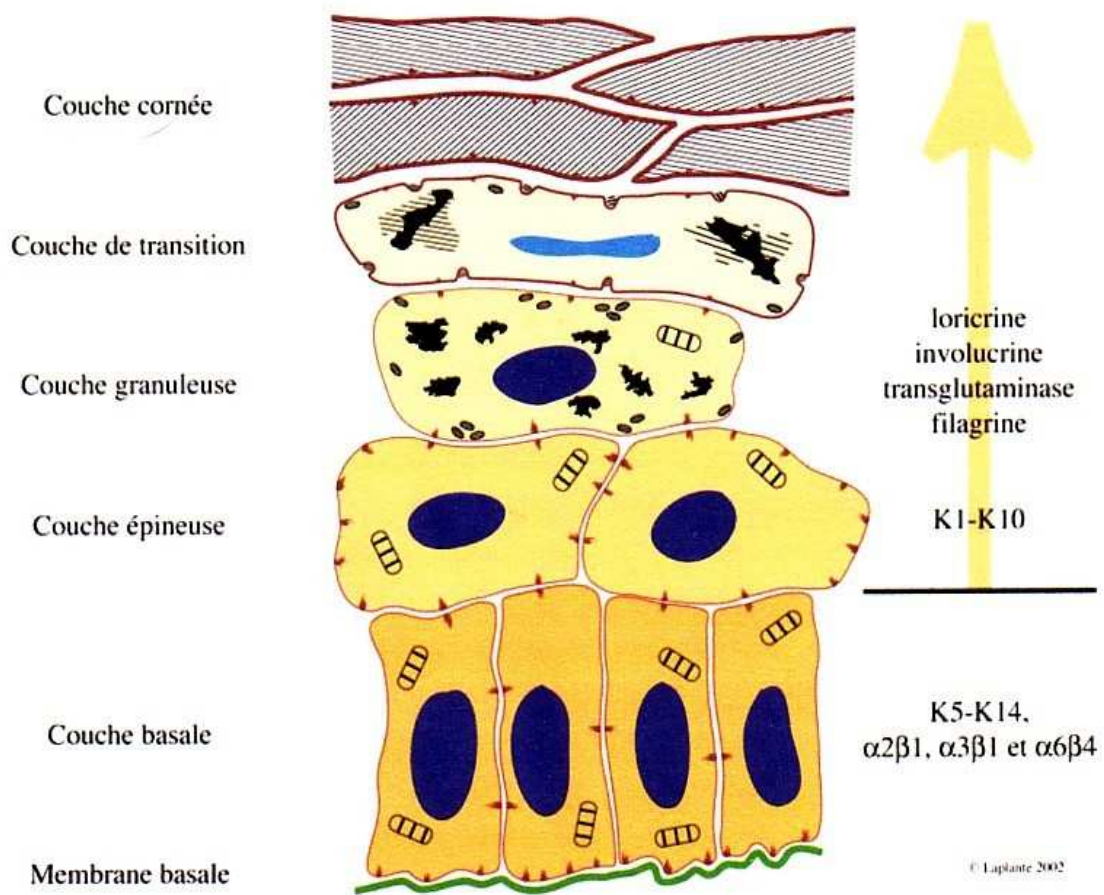


Figure 1-2 : Les différentes couches de l'épiderme.

La prolifération, la différenciation et la migration induisent l'organisation des différentes couches de l'épiderme. Les marqueurs de différenciation épidermique permettent de discriminer ces couches épidermiques.

(www.theses.ulaval.ca)

1.2.2. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif composé de fibroblastes insérés dans une matrice extracellulaire contenant des fibres de collagène, des fibres élastiques, des glycoprotéines ainsi que des protéoglycanes.

La couche dermique contient de nombreuses annexes cutanées, tels que les ongles, les follicules pileux, les glandes sudoripares et sébacées, ainsi que de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, et des fibres nerveuses.

1.2.3. L'hypoderme

L'hypoderme, la couche la plus profonde de la peau, est un tissu conjonctif riche en lobules adipeux. L'hypoderme joue un rôle de protection thermique et mécanique. Il représente également une réserve énergétique par la présence de graisses (acides gras et triglycérides).

1.3. Le kératinocyte épidermique

1.3.1. La migration, la différenciation et la prolifération des kératinocytes

Les kératinocytes épidermiques subissent le processus de différenciation qui aboutit à la mort cellulaire. La mort des kératinocytes est suivie par le phénomène de desquamation à la surface de l'épiderme. La desquamation nécessite le renouvellement des cellules de l'épiderme afin de garantir l'homéostasie tissulaire. Le renouvellement cellulaire débute par un processus de prolifération et de différenciation des cellules souches en contact avec la lame basale. La prolifération et la différenciation sont suivies par la migration des kératinocytes qui s'organisent en couches jointives vers la couche superficielle de l'épiderme. L'organisation en couches jointives induit la stratification et la kératinisation de l'épiderme, ce qui permet de distinguer quatre couches épidermiques superposées : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (figure 1-2).

La couche basale est constituée de kératinocytes cylindriques non différenciés ancrés au niveau du derme par des hémidesmosomes et des contacts focaux. Les cellules sont reliées entre elles par des jonctions de type adhérents et par des desmosomes.

Dans un EPSK de type B, la couche épineuse est composée de 3 à 5 assises de cellules qui possèdent des faisceaux denses de filaments intermédiaires de kératine. La couche épineuse doit son nom à l'observation morphologique de la structure en épine des kératinocytes qui possèdent un nombre important de desmosomes à la surface cellulaire. L'involucrine, qui est utilisée comme marqueur de différenciation, est une protéine riche en glutamine et en lysine qui est exprimée au niveau des couches épineuse et granuleuse.

La couche granuleuse est formée de 1 à 2 assises de petites cellules dont les noyaux deviennent pycnotiques dans un EPSK de type B. Les cellules sont remplies de grains de kératohyaline, composés de profilaggrine. Les kératinocytes de la couche granuleuse contiennent également des corps lamellaires ou corps d'Odland. Ces organites, d'origine golgienne, sont remplis de lamelles lipidiques constituées principalement de glucosylcéramides, de cholestérol sulfate, mais aussi d'un mélange d'hydrolases lysosomales.

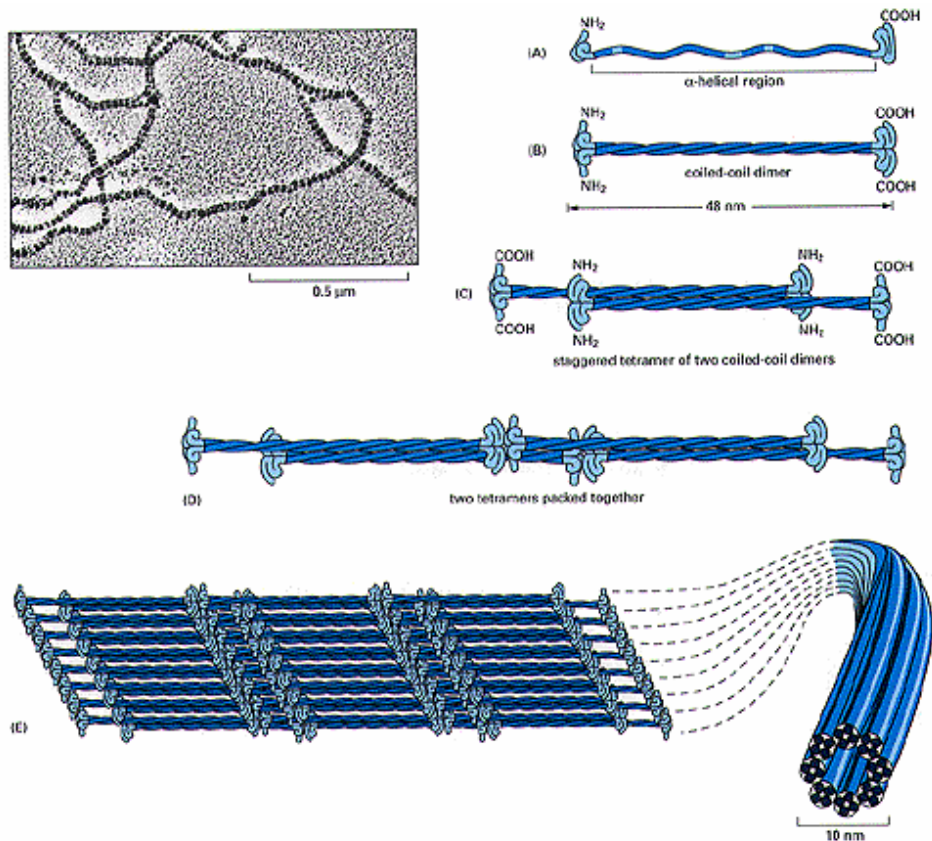
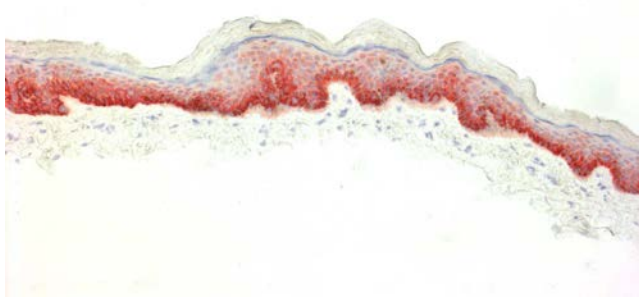


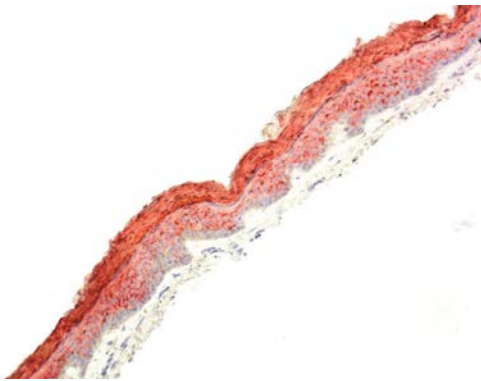
Figure 1-3 : Formation de filaments intermédiaires de kératine.

Deux monomères (A) s'associent pour former un dimère (B). Deux dimères s'assemblent pour former un tétramère, un protofilament (C). L'association de huit tétramères forme le filament intermédiaire de kératine de 10 nm de diamètre (E).

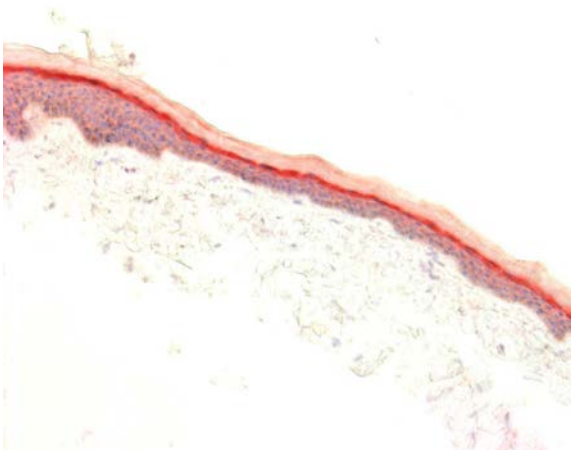
(Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J., The Cytoskeleton. In: Molecular Biology of the Cell, third edition, 1994)



a.



b.



c.

Figure 1-4 : Expression des marqueurs de différenciation cutanés.

a. La kératine 14 est exprimée dans la couche basale. b. La kératine 10 se trouve dans les couches suprabasales. c. L'involucrine est exprimée dans les couches épineuse et granuleuse.

La couche cornée est composée de kératinocytes morts, appelés cornéocytes, saturés en filaments intermédiaires de kératines agrégées. Les corps d'Odland fusionnent avec la membrane plasmique, leur contenu est alors déversé dans l'espace intercellulaire où il joue le rôle de « ciment ». Suite à l'activation des hydrolases acides et à l'acidification de l'épiderme, les liaisons intercellulaires sont rompues et les cornéocytes se détachent à la surface de l'épiderme, donnant lieu au phénomène de desquamation.

1.3.2. Les marqueurs de différenciation épidermique

Il existe des protéines exprimées de manière spécifique dans les différentes couches de l'épiderme. Ces protéines sont considérées comme des marqueurs de différenciation épidermique car elles permettent de discriminer le phénotype des kératinocytes présents dans les différentes couches de l'épiderme.

Les kératines épidermiques sont des marqueurs de la différenciation qui appartiennent à la famille des protéines de filaments intermédiaires. Elles sont classées en kératines acides, ou de type I (K1 à K8), et en kératines basiques, ou de type II (K9 à K20). L'enroulement d'une kératine acide et d'une kératine basique donne un hétérodimère. Deux hétérodimères de kératine s'alignent en position tête-bêche pour former une unité tétramérique de 70 nm de longueur, le protofilament. L'assemblage de protofilaments en octamère donne un filament intermédiaire de 10 nm d'épaisseur (figure 1-3).

Quatre types principaux de kératines sont présents dans l'épiderme ; les kératines K5, K14, K1 et K10. Lors de la différenciation normale des kératinocytes, les kératines K5 et K14 sont retrouvées au niveau de la couche basale épidermique où elles constituent des marqueurs épidermiques de cellules pas ou peu différenciées (figure 1-4a). Les kératines K1 et K10 sont exprimées dans les couches suprabasales épidermiques et sont considérées comme des marqueurs de différenciation épidermique précoces (figure 1-4b). Les kératines représentent 30% du poids sec des cellules basales, et 85% dans les cornéocytes.

Les couches épineuse et granuleuse sont caractérisées par l'expression de l'involucrine (figure 1-4c). Cette protéine, de même que la protéine loricrine retrouvée dans la couche granuleuse, sont indispensables dans la formation de l'enveloppe cornée. Ces deux protéines sont considérées comme des marqueurs de différenciation tardive dans les kératinocytes épidermiques.

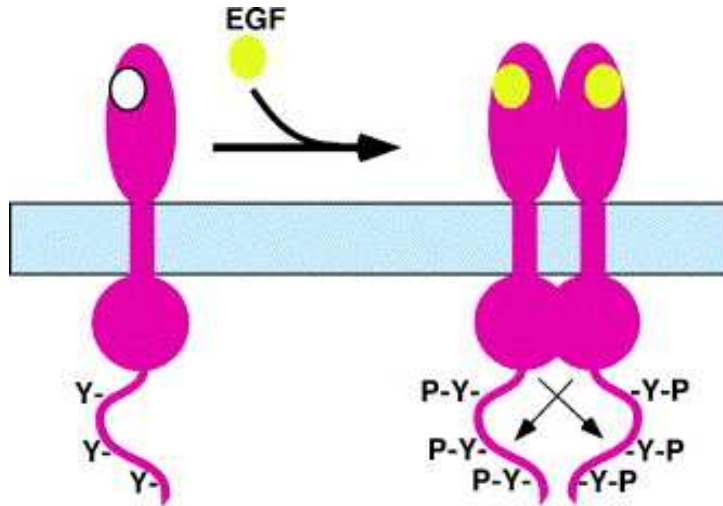
La couche granuleuse est discriminée des autres couches épidermiques par la présence des protéines filaggrine et loricrine. La filaggrine, une protéine basique issue du clivage du précurseur profilaggrine, compacte les filaments intermédiaires de kératine dans la matrice des cornéocytes. Cette protéine est dégradée rapidement en acides aminés par des protéases. Les acides aminés résultant de cette dégradation jouent le rôle de rétention d'eau pour permettre l'hydratation de la couche cornée.

1.3.3. L'étude *in vitro* des kératinocytes

Il existe différents modèles de culture *in vitro* permettant d'étudier les caractéristiques structurales et fonctionnelles des kératinocytes épidermiques humains.

Rheinwald et Green ont établi, en 1975, un premier modèle de culture permettant la multiplication de kératinocytes épidermiques humains *in vitro*. Ils ont utilisé un lit nourricier de fibroblastes 3T3 qui sont irradiés avec des rayons gamma. Les fibroblastes sont mis en

a.



b.

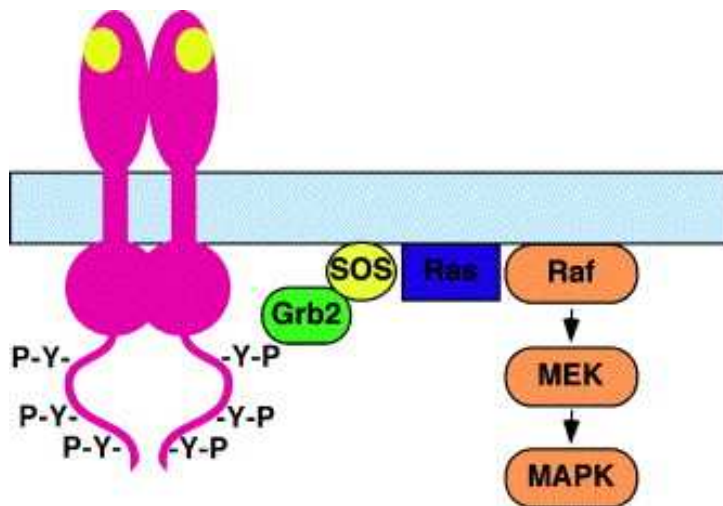


Figure 1-5 : a. Représentation de l'activation, la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur HER suite à la liaison du facteur EGF.

b. Représentation de l'activation de la voie des MAPK suite à l'activation du récepteur de l'EGF. Les tyrosines phosphorylées sur le récepteur recrutent la protéine Grb2 qui est reconnue par le facteur d'échange SOS. Ce facteur permet l'activation de Ras par échange de son GDP en GTP. Ras activé agit alors sur la voie des MAPK en l'activant. (Pike, 2005)

présence de cellules épidermiques qui se multiplient aux dépens des fibroblastes. Ce modèle de culture *in vitro* présente de nombreux désavantages si on souhaite étudier l'effet de différentes signalisations cellulaires sur les kératinocytes. Le milieu de culture utilisé contient du sérum de veau fœtal, ainsi qu'un certain nombre de facteurs de croissance. Vu la composition du milieu de culture, l'étude des facteurs de croissance et des cytokines est donc rendue difficile. Rheinwald et Green ont également observé une différenciation anormale des kératinocytes. En effet, l'involucrine est fortement exprimée dans les premières couches de l'épiderme, ce qui diffère de la situation *in vivo* (Poumay et Coquette, 2007).

Boyce et Ham ont établi, en 1983, un modèle de culture où l'utilisation de cellules nourricières fibroblastiques et de sérum ne sont plus nécessaires. Cependant, le milieu utilisé pour l'ensemencement de la culture cellulaire contient toujours de l'*Epidermal Growth Factor* (EGF), ainsi que de l'extrait pituitaire bovin.

En 1991, Cook et al. ont découvert la possibilité de la croissance autocrine, ou paracrine, des kératinocytes dont la densité cellulaire est supérieure à 40-50% de la surface disponible. Les kératinocytes, à cette densité cellulaire, produisent leurs propres facteurs de croissance et se stimulent eux-mêmes. Les facteurs de croissance exogènes ne sont donc plus nécessaires, excepté pour l'initiation de la culture cellulaire.

La même équipe a démontré que la prolifération autonome des kératinocytes est inhibée par un anticorps dirigé contre le récepteur de l'EGF (Pittelkow et al., 1993). Cet anticorps est un antagoniste pour la liaison du ligand sur le récepteur. L'équipe de Pittelkow montre ainsi l'importance de l'activation du récepteur de l'EGF dans la croissance autocrine des kératinocytes épidermiques.

La prolifération autocrine des kératinocytes permet de contrôler la composition du milieu de culture. Ceci permet d'imiter les mécanismes d'initiation de la différenciation des kératinocytes *in vivo*, vu que, dans ces conditions, les cellules se différencient lorsque la densité cellulaire augmente (Poumay et Pittelkow, 1995).

1.3.4. Le contrôle de la physiologie des kératinocytes : les voies de signalisation

Les protéines de la famille du récepteur de l'EGF sont des glycoprotéines membranaires à activité tyrosine kinase importantes dans la physiologie des kératinocytes épidermiques. La famille des récepteurs *Human EGF Receptor* (HER) comprend quatre membres : HER1, HER2, HER3 et HER4. Les récepteurs HER possèdent une structure comparable : un domaine extracellulaire permettant la liaison des ligands du récepteur ainsi qu'un domaine intracellulaire possédant un domaine tyrosine kinase. A l'état inactif, les récepteurs se trouvent sous forme monomérique en membrane plasmique. Dans les kératinocytes épidermiques humains, le facteur de croissance EGF active le récepteur HER1, ce qui régule la croissance et la différenciation des kératinocytes. Les récepteurs HER2 et HER3 semblent également jouer un rôle durant la différenciation des kératinocytes. Cependant, il semble que le récepteur HER4 ne soit pas présent dans les kératinocytes épidermiques humains (De Potter et al., 2001). Cette absence simplifie les possibilités de signalisation des kératinocytes via les HER car les combinaisons d'hétérodimères sont réduites. De plus, des études montrent qu'un membre de la famille *Epidermal Growth Factor Receptor*, HER3, incubé avec un facteur de croissance tel que l'épiréguine et *Heparin-Binding EGF-like Growth Factor* (HB-EGF) induit la réparation de blessure (Poumay, 2007).

Les ligands des récepteurs HER sont les facteurs de croissance de la famille EGF : EGF, *Transforming Growth Factor- α* (TGF- α), HB-EGF, amphiréguline (AR), épiréguline (EPR), bétacelluline (BTC) et neuréguline (NRG). Ces facteurs de croissance sont synthétisés sous forme de précurseurs membranaires et sont libérés lors du clivage de leur domaine extracellulaire par des protéases.

La liaison d'un ligand sur un récepteur conduit à son homo- ou son hétérodimérisation. La dimérisation des récepteurs active leurs domaines tyrosine kinase intracellulaires et donc induit la transphosphorylation des récepteurs (figure 1-5a). Les résidus tyrosines kinases phosphorylés recrutent des protéines à domaines *Src Homology 2* (SH2) qui initient des cascades d'activation de voies de signalisation intracellulaires. Par exemple, la protéine Grb2, une protéine possédant un domaine SH2, se lie aux récepteurs activés et active la cascade aboutissant aux *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs) (figure 1-5b). Grb2 lie alors le facteur d'échange SOS (*guanine nucleotid exchange factor*) qui active Ras par échange de son GDP en GTP. Ras active la sérine/thréonine kinase raf-1, qui active une série de kinases menant à la phosphorylation, l'activation et la translocation de MAPK dans le noyau. Cette cascade d'activation des MAPK consiste en trois kinases successives. Suite à la phosphorylation du récepteur membranaire, une *MAPK Kinase Kinase* (MEKK) est activée et phosphoryle une *MAPK Kinase* (MEK). Cette MEK phosphoryle à son tour une MAPK, qui est alors dirigée vers le noyau et phosphoryle divers facteurs de transcription. Les facteurs de transcription activés par les MAPK sont importants pour l'activation ou l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi que pour la différenciation (Robinson et Cobb, 1997).

Il existe trois catégories de MAPK :

- *Extracellular signal-Regulated Kinase* (ERK): les protéines de la famille ERK jouent un rôle dans la prolifération et la survie des kératinocytes par transduction du signal des facteurs de croissance dans la couche épidermique.
- *Stress Activated Protein Kinase* (SAPK1) ou c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK) : la MAPK JNK est activée par un stress cellulaire.
- p38 : Il existe différentes isoformes de MAPK p38 : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ . Cependant, seuls les MAPK p38 α , p38 β et p38 δ sont exprimés dans les kératinocytes épidermiques. La protéine p38 est activée par des stress environnementaux ou par d'autres stimuli. Elle est impliquée dans plusieurs processus cellulaires, dont l'inflammation, le cycle cellulaire, la croissance, la différenciation et la mort cellulaire (Ono et Han, 1999).

Les membranes de nombreux types cellulaires comportent des *lipid rafts* qui sont des plateformes de signalisation enrichies en cholestérol. Leur rôle sera explicité au point 2. Une déplétion du cholestérol induit des variations au niveau de la signalisation intracellulaire par une désorganisation de ces *lipid rafts*. Dans le kératinocyte épidermique, une déplétion du cholestérol membranaire induit l'activation du récepteur de l'EGF en l'absence de son ligand et stimule la prolifération cellulaire via un membre de la famille ERK, ERK-2 (Lambert et al., 2006). L'activation du récepteur de l'EGF est due à l'augmentation de la phosphorylation des tyrosines kinases et à l'augmentation de la dimérisation des récepteurs (Chen et Resh, 2002). La perturbation du cholestérol membranaire a également un impact sur la différenciation des kératinocytes. Jans et al. (2004) ont montré qu'une déplétion du cholestérol membranaire induit une diminution de l'expression des kératines K10 et K14, ainsi qu'une augmentation de l'expression du marqueur de différenciation tardif, l'involucrine. Ils ont également suggéré que la MAPK p38 régule l'expression de l'involucrine, via notamment les MAPK p38 α et p38 β . Récemment, des études ont montré qu'une déplétion du cholestérol dans les kératinocytes épidermiques induit l'activation de p38.

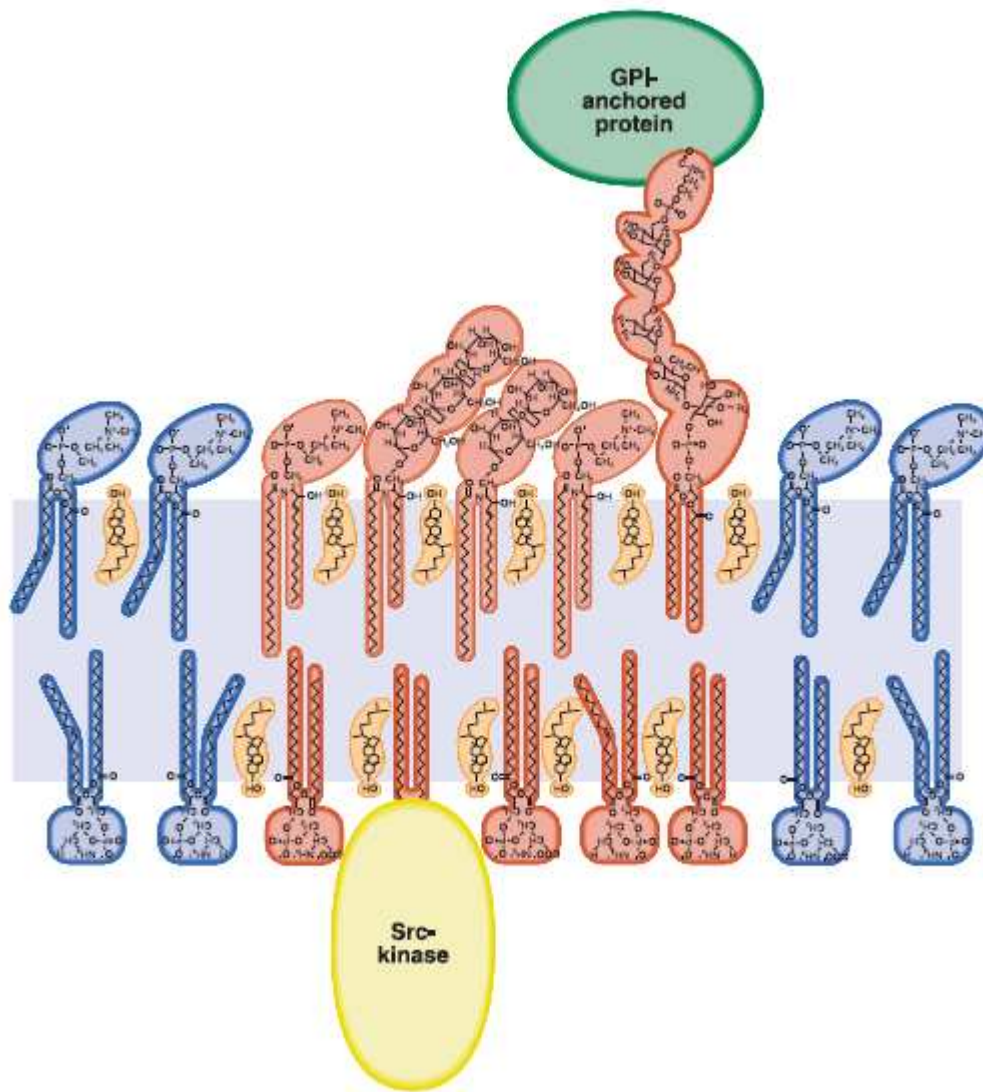


Figure 1-6: Les radeaux lipidiques ou *lipid rafts*.

Ces domaines sont riches en cholestérol, sphingolipides et gangliosides. Le cholestérol réduit la fluidité des membranes en s'intercalant entre les phospholipides. Les protéines à ancre GPI et celles qui portent un groupement acyl, myristate et/ou palmitate sont souvent présentes dans ces microdomaines.

(Simons et Ikonen, 2000)

Cette augmentation de l'activation de p38 est rapidement suivie par une expression rapide et importante du facteur HB-EGF. L'expression précoce d'HB-EGF suggère qu'il est un marqueur de réponse précoce au stress permettant une réparation rapide de l'épiderme (Mathay et al., soumis).

Le cholestérol membranaire influence donc les voies de signalisation dans les kératinocytes épidermiques humains. De plus, des maladies épidermiques comme le psoriasis sont associées à des perturbations des voies de signalisation intracellulaire. L'analyse de la peau de patients atteints de psoriasis indique que le facteur HB-EGF est surexprimé (Stoll et Elder, 1998) et que l'expression des marqueurs de différenciation épidermique est altérée. Ces caractéristiques sont semblables à celles observées par Mathay et al. (soumis) lors d'une déplétion du cholestérol dans des kératinocytes épidermiques humains.

2. Le cholestérol membranaire

2.1. Le cholestérol et l'organisation des lipides membranaires

Le cholestérol est un constituant essentiel des membranes des cellules eucaryotes (Clayton, 1998). Le kératinocyte est un type cellulaire riche en *lipid rafts*, ou radeaux lipidiques (Gniadecki et Bang, 2003). Les *lipid rafts* sont des microdomaines riches en cholestérol, sphingolipides et gangliosides (figure 1-6) (Simons et Toomre, 2000). Le cholestérol présent dans les *lipid rafts* s'intercale entre les phospholipides, ce qui minimise la fluidité membranaire par réduction des mouvements des chaînes acyles. Ces microdomaines forment donc un environnement lipidique plus ordonné qui présente un ratio lipide/protéine plus élevé et une densité plus faible que le reste de la membrane. Des protéines à ancre GPI ainsi que des protéines possédant des groupements acyles, myristate et/ou palmitate, sont enrichies dans ces *lipid rafts* (Pike, 2005).

Les *lipid rafts* régulent de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, l'apoptose et la mobilité cellulaire (Gniadecki et Bang, 2003). L'activité de plusieurs protéines membranaires dépend de leur insertion dans ces radeaux lipidiques. Il s'agit notamment de certaines protéines de signalisation, telles que les protéines G, la protéine hedgehog, la protéine Ras ou le récepteur de l'EGF. Ces protéines ont une affinité importante pour les rafts et leur association à ces domaines est essentielle pour la transduction du signal (Simons et Toomre, 2000). La transduction du signal est souvent altérée lorsque ces microdomaines sont perturbés par une déplétion du cholestérol, ce qui suggère la participation de ces domaines au contrôle de la signalisation intracellulaire (Pike, 2005).

Le cholestérol possède d'autres fonctions que sa fonction membranaire. Il joue notamment le rôle de précurseur des hormones stéroïdiennes et des acides biliaires. Ce stérol joue également un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, par modification des protéines hedgehog (Clayton, 1998).

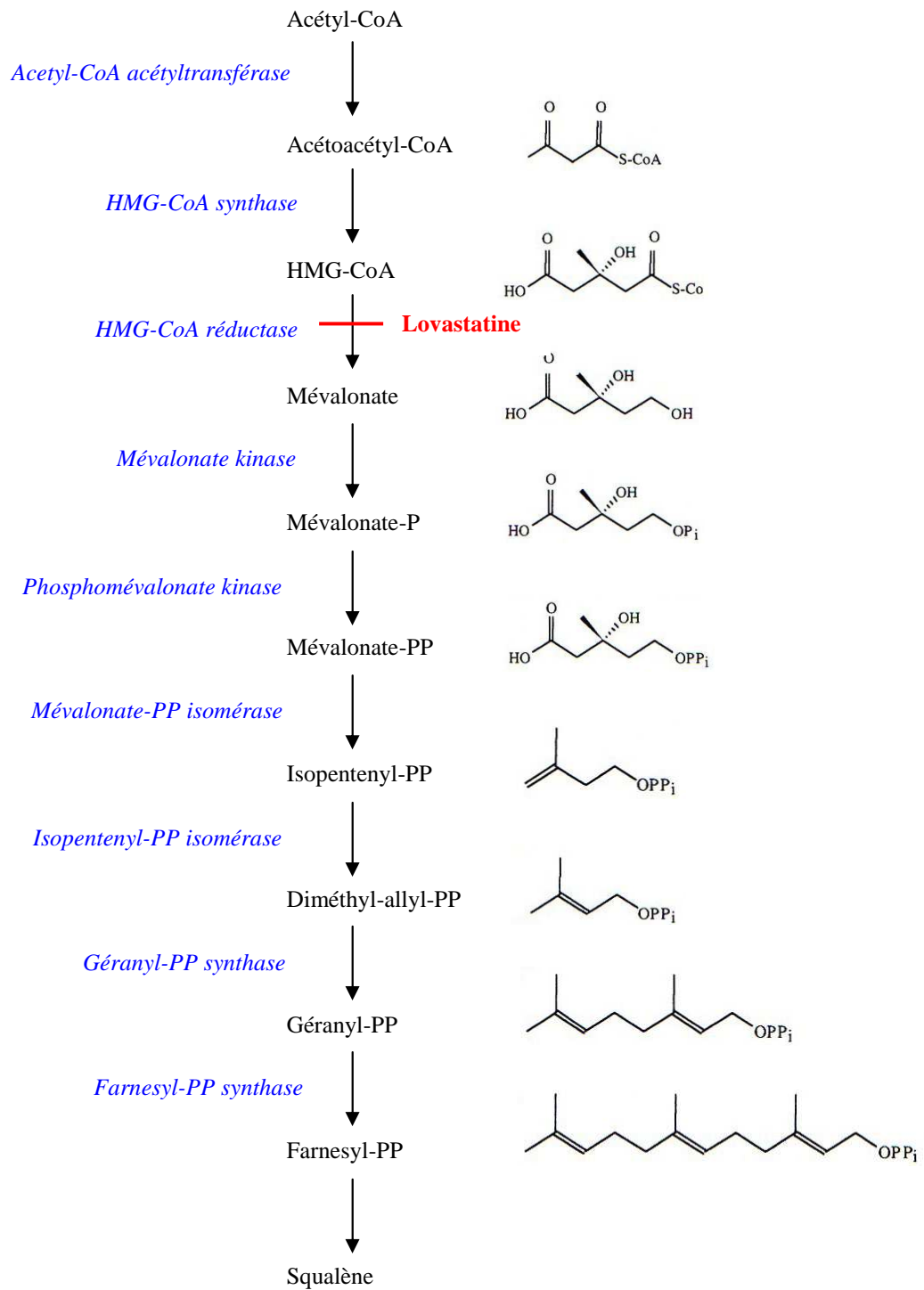


Figure 1-7 : La voie de biosynthèse des isoprénoïdes débute par l'acétyl-CoA et se termine par la synthèse du squalène. L'enzyme HMG-CoA réductase est inhibée par les statines, comme la Lovastatine.

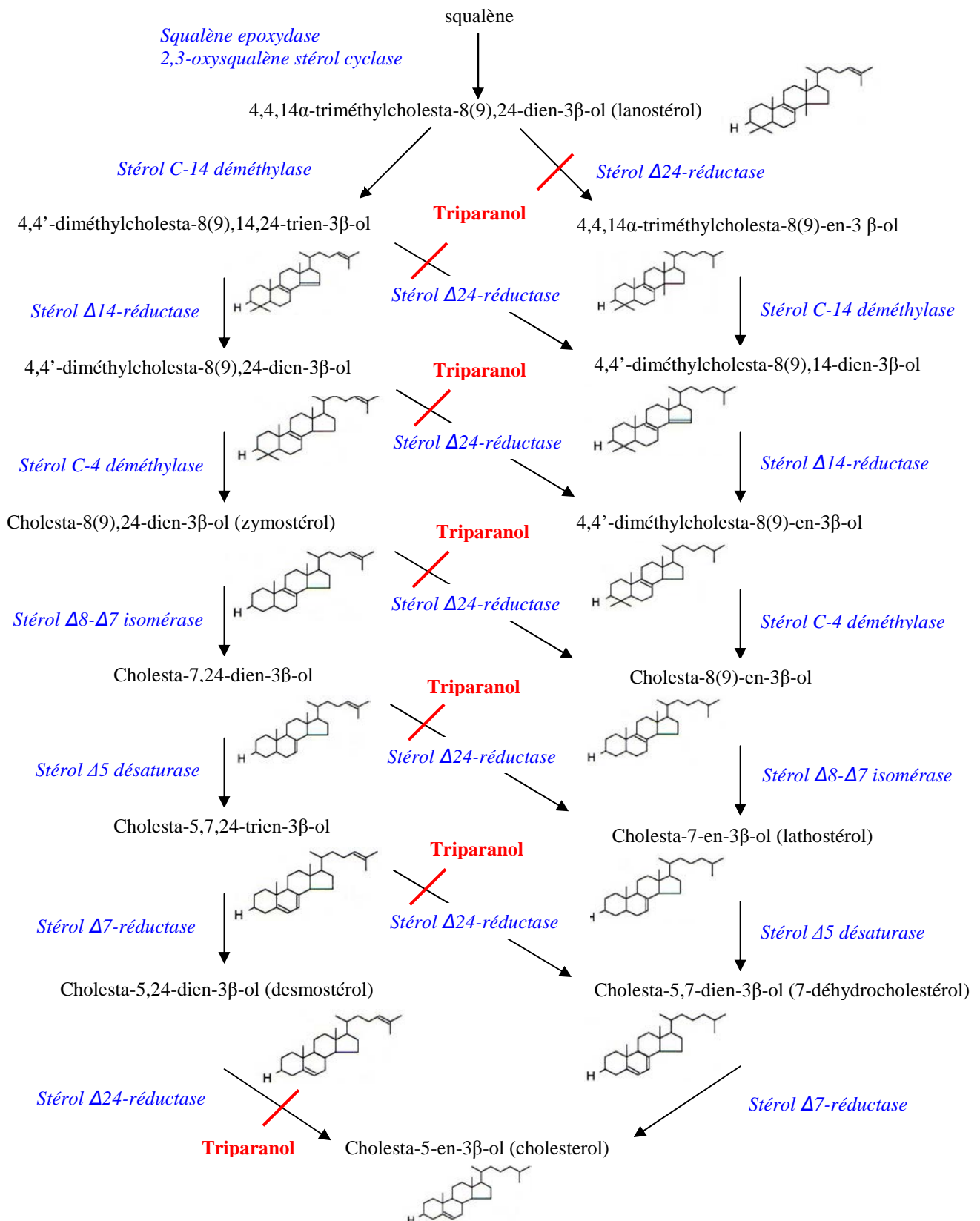


Figure 1-8 : La voie de synthèse du cholestérol. La présence de lanostérol permet la formation de cholestérol suivant deux voies : la voie de Bloch et la voie de Kandutsch-Russel. L'enzyme DHCR24 convertit le dernier intermédiaire de la voie de Bloch, le desmostérol. Elle a aussi la particularité de permettre à chaque étape de la voie de Bloch un retour à la voie de Kandutsch-Russel. L'inhibition de l'enzyme DHCR24 est obtenue par l'utilisation de Triparanol.

2.2. La voie de synthèse du cholestérol

La synthèse de cholestérol débute par la conversion de la molécule acétyl-CoA en isopentenyl-pyrophosphate dans la voie de biosynthèse isoprénoïde. Cette voie de synthèse produit des isoprénoïdes qui jouent un rôle primordial dans la croissance et la différenciation cellulaire, la glycosylation des protéines, la transduction du signal, et dans le transport d'électrons dans les mitochondries. Six réactions enzymatiques successives permettent d'arriver à la molécule isopentenyl-pyrophosphate qui constitue l'unité isoprène à l'origine de toutes les molécules isoprénoïdes (figure 1-7). Dans ces six réactions enzymatiques se trouve notamment l'étape catalysée par l'HMG-CoA réductase, qui convertit l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) en mévalonate et qui est inhibée par les statines (Kita et al., 1980).

Le premier intermédiaire stérol synthétisé est le squalène qui est formé de six unités isoprènes et qui aboutit au lanostérol suite à sa cyclisation. La génération de cholestérol à partir de lanostérol nécessite huit réactions enzymatiques, dont une déméthylation du carbone 14, deux déméthylations sur le carbone 4, une isomérisation de la double liaison $\Delta 8(9)$ à la liaison $\Delta 7$, trois réductions des doubles liaisons $\Delta 24$, $\Delta 14$ et $\Delta 7$, et une désaturation entre les carbones 5 et 6. La conversion du lanostérol en cholestérol peut être réalisée par deux voies différentes : la voie de Bloch et la voie de Kandutsch-Russel (figure 1-8). Ces deux voies diffèrent par l'étape de réduction de la double liaison $\Delta 24$. La voie de Bloch est une succession de réactions enzymatiques, dont le dernier précurseur est le desmostérol. Celui-ci est converti en cholestérol par la 3β -hydroxystérol $\Delta 24$ -réductase (DHCR24), aussi nommée seladine-1. Cette enzyme peut être inhibée par un traitement avec l'inhibiteur Triparanol (Avigan et al., 1960). La voie de Kandutsch-Russel débute par l'action de l'enzyme DHCR24 et se termine par la conversion du 7-déhydrocholestérol en cholestérol par la 3β -hydroxystérol $\Delta 7$ -réductase (DHCR7).

Les enzymes impliquées dans la conversion de l'acétyl-CoA au farnesyl pyrophosphate sont localisées dans le cytosol, excepté l'HMG-CoA réductase. L'HMG-CoA réductase, ainsi que la plupart des autres enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol sont localisées dans le réticulum endoplasmique. Il semble cependant que plusieurs enzymes impliquées dans les étapes de biosynthèse des isoprénoïdes sont également localisées dans les peroxysomes. De plus, certaines enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol sont colocalisées dans les peroxysomes et dans le réticulum endoplasmique. L'hypothèse de l'implication des peroxysomes dans la biosynthèse des isoprénoïdes et du cholestérol a donc été émise (Waterham, 2006).

Le cholestérol présent dans les cellules est acquis soit par synthèse endogène, soit sous forme de cholestérol estérifié par un apport de lipoprotéines à faible densité (LDL) (Clayton, 1998). Les LDL pénètrent dans les cellules par endocytose via un récepteur aux LDL et sont dégradées dans les lysosomes. Le cholestérol libéré par les LDL régule le taux de récepteurs aux LDL ainsi que l'enzyme HMG-CoA réductase (Anderson, 2003). Il semble que les LDL n'ont pas d'effet sur la synthèse intracellulaire de cholestérol chez les kératinocytes. L'hypothèse émise est que les kératinocytes ne possèdent pas de récepteurs aux lipoprotéines à leur surface (Ponec et al., 1983). Plus tard, l'équipe de Ponec (2002) a démontré que les kératinocytes possèdent des récepteurs aux lipoprotéines, mais que l'induction de la différenciation des kératinocytes est accompagnée d'une perte de l'activité de ces récepteurs membranaires et d'un changement dans leur distribution.

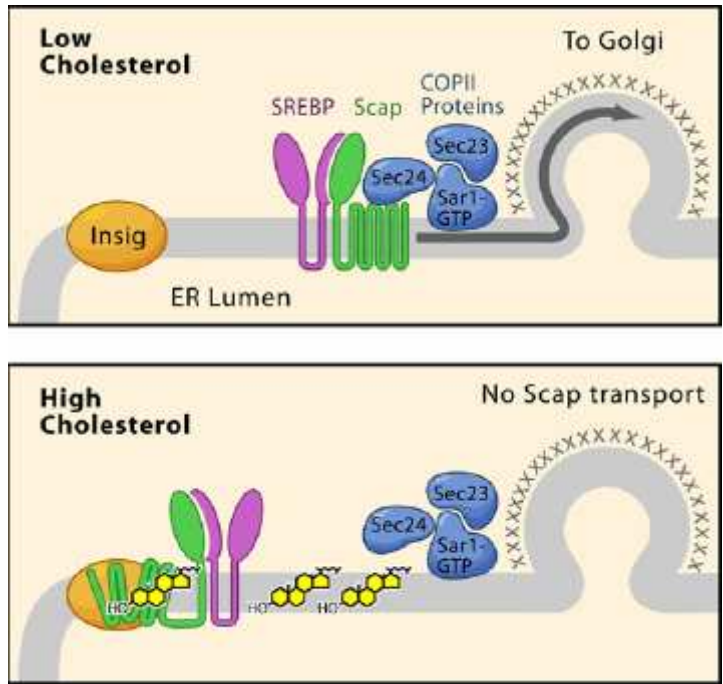


Figure 1-9 : La régulation du transport du complexe SREBP/SCAP par la molécule Insig. Lorsque les membranes cellulaires sont dépourvues de cholestérol, le complexe SREBP/SCAP est escorté par les protéines COPII vers l'appareil de Golgi. Dans l'appareil de Golgi, SREBP est clivé et génère une forme nucléaire qui active les gènes nécessaires à la synthèse et à la prise du cholestérol. Lorsque du cholestérol est présent dans les membranes, le transport du complexe vers l'appareil de Golgi n'est plus possible. Les protéines COPII ne savent en effet plus interagir avec SCAP qui a subi un changement conformationnel. (Goldstein et al., 2005)

2.3. La régulation de la biosynthèse des isoprénoïdes et du cholestérol

L'étape catalysée par l'HMG-CoA réductase est une étape limitant le taux de synthèse de cholestérol et d'isoprénoïdes non stérols dans la cellule (Song et al., 2005). Il existe différents mécanismes qui régulent cette enzyme par feed-back négatif : l'inhibition de la transcription de l'ARN messager de l'enzyme, l'arrêt de la transcription ou la régulation post-traductionnelle par dégradation de l'enzyme (Sever et al., 2003).

La régulation transcriptionnelle du gène de l'enzyme HMG-CoA réductase est catalysée par deux membres de la famille *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP), SREBP2 et SREBP1a. Ces protéines sont des facteurs de transcription synthétisés sous forme inactives en membrane du réticulum endoplasmique où ils sont associés à des protéines *SREBP-Cleavage-Activating Protein* (SCAP). Lorsque la concentration stéroïdienne est faible, la protéine SCAP subit un changement conformationnel et la liaison avec la protéine Insig est rompue. Le complexe SREBP-SCAP quitte alors le réticulum endoplasmique par des vésicules enveloppées de protéines COPII. Le complexe est transféré à l'appareil de Golgi où SREBP est clivé par les protéases S1P et S2P. Par contre, en présence d'une quantité abondante de stérols, le complexe SREBP-SCAP interagit avec la protéine Insig qui maintient le complexe en membrane. Le maintien du complexe en membrane est dû à une inaccessibilité de la protéine SCAP pour les protéines COPII qui forment des vésicules (figure 1-9) (Goldstein et al., 2006). Le clivage est effectué entre l'extrémité N-terminale qui est le domaine de liaison à l'ADN et d'activation de la transcription, et l'extrémité C-terminale régulatrice. L'extrémité N-terminale de SREBP pénètre dans le noyau où elle active la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse isoprénoïde/cholestérol, ainsi que la transcription du gène du récepteur aux lipoprotéines (Waterham, 2006). Le cholestérol exerce donc une action indirecte en bloquant la translocation du complexe SCAP-SREBP vers l'appareil de Golgi (Song et al., 2005).

La protéine Insig module également l'activité de l'enzyme HMG-CoA réductase qui possède, comme la protéine SCAP, un domaine senseur de stérol. Ce domaine senseur lie les stérols lorsqu'ils sont présents en forte concentration. La protéine Insig liée à l'enzyme induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome dans le réticulum endoplasmique (Sever et al., 2003). Le lanostérol, le premier intermédiaire stérol de la voie de biosynthèse de cholestérol, stimule ce processus d'ubiquitination et de dégradation de l'HMG-CoA réductase par liaison de l'enzyme au complexe Insig-1/gp78 (figure 1-10) (Goldstein et al., 2006). Les groupements hydroxyles de la chaîne latérale stérol, ainsi que les groupements méthyles sur les carbone 4 et/ou carbone 14 du lanostérol sont importants pour la dégradation de l'enzyme. Par contre, le lanostérol ne semble pas supprimer le clivage du complexe SCAP-SREBP car il ne peut pas se lier au domaine senseur de stérol de la protéine SCAP (figure 1-11). D'autres intermédiaires de la voie de synthèse de cholestérol comme le zymostérol, le desmostérol et le 7-déhydrocholestérol accélèrent également la dégradation de l'enzyme HMG-CoA réductase mais de manière moins importante que le lanostérol.

De plus, les oxystérols, qui sont des dérivés de la conversion du cholestérol endogène ou dérivés des LDL, diminuent l'activité de l'enzyme HMG-CoA réductase par augmentation de la dégradation par le protéasome ou par suppression de la transcription du gène de cette enzyme en bloquant la sortie du complexe protéique SCAP-SREBP du réticulum endoplasmique (figure 1-12) (Song et al., 2005).

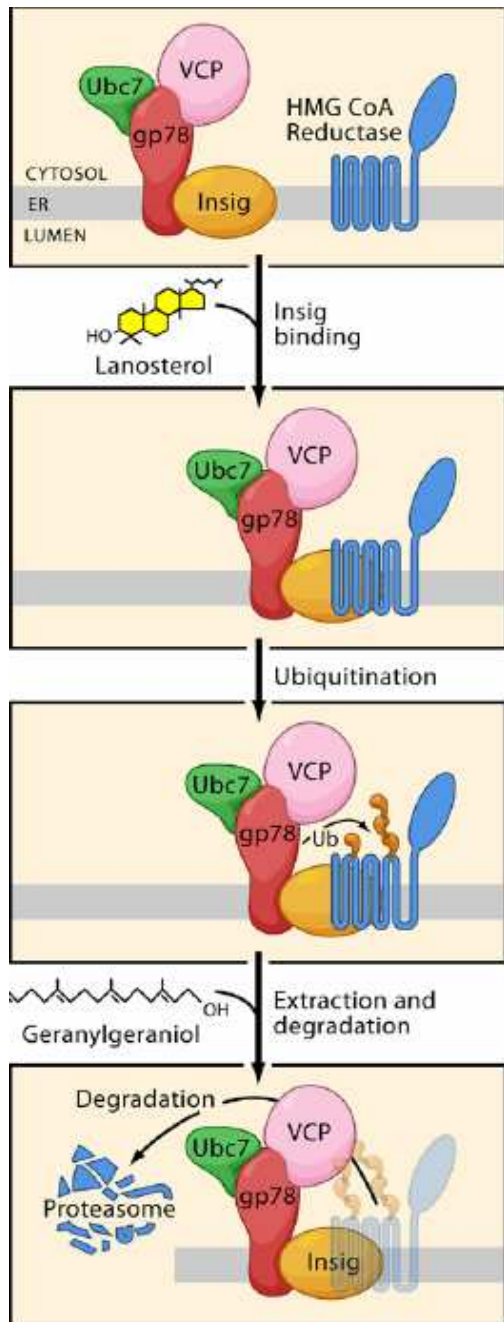


Figure 1-10 : La régulation de la dégradation de l'enzyme HMG-CoA réductase. La protéine Insig induit l'ubiquitination et la dégradation de l'HMG-CoA réductase par le protéasome. Le lanostérol, un précurseur du cholestérol, stimule ce phénomène en liant l'enzyme au complexe Insig-1/gp78. (Goldstein et al., 2005)

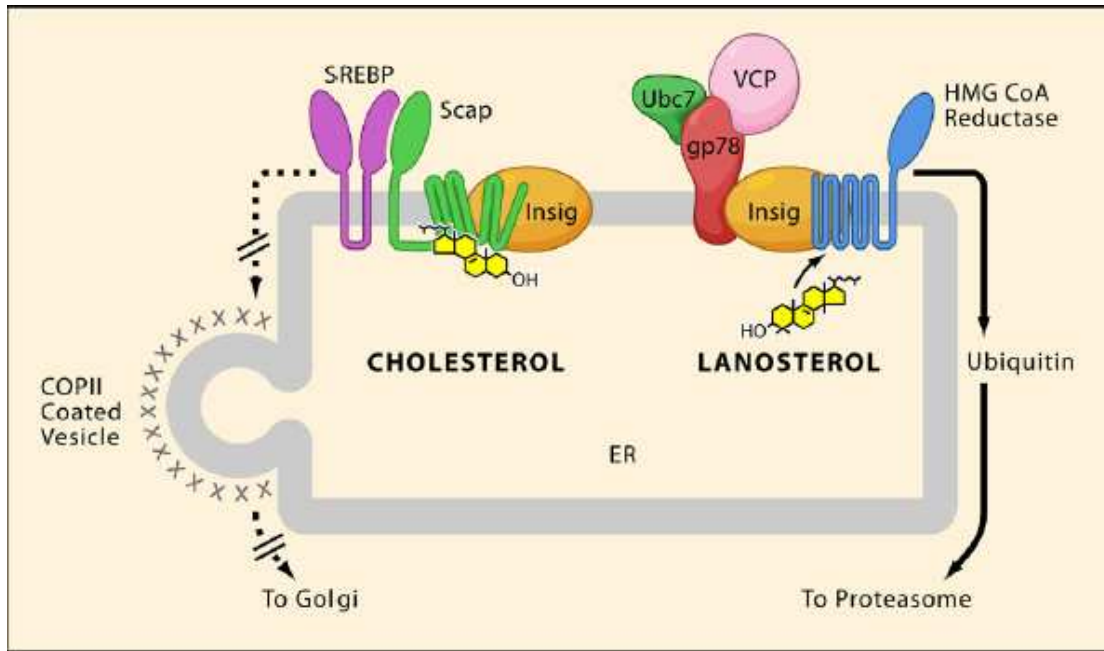


Figure 1-11 : Représentation des deux actions d'Insig sur l'homéostasie du cholestérol. La molécule régule le transport du complexe SREBP/SCAP du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Insig régule également la dégradation par le protéasome de l'enzyme HMG-CoA réductase, un processus stimulé par le lanostérol. (Goldstein et al., 2005)

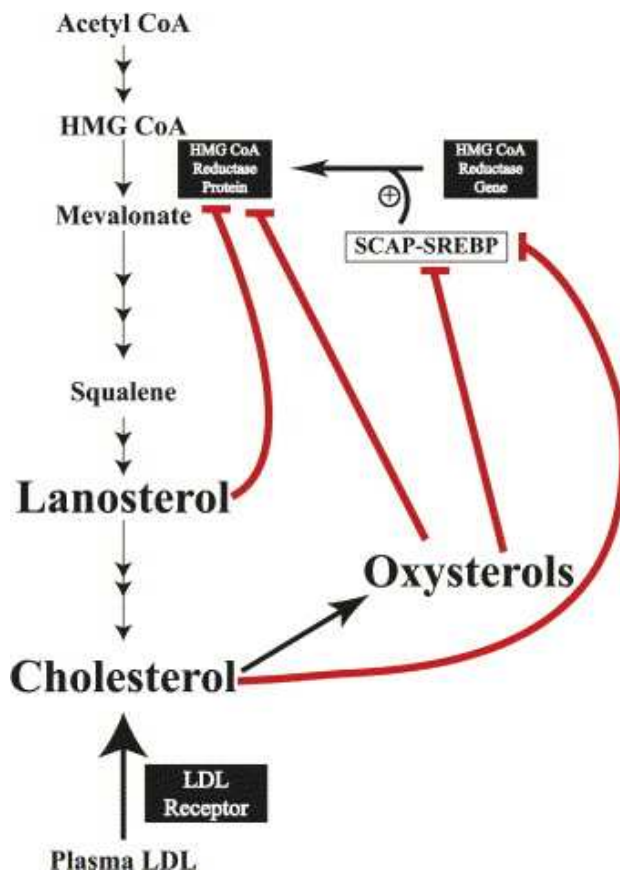


Figure 1-12 : La régulation de l'enzyme HMG-CoA réductase par les stérols. Les oxystérols et les stérols méthylés comme le lanostérol ont une action sur la dégradation de l'enzyme HMG-CoA réductase. L'activité de cette enzyme est également ciblée par suppression de l'activation de SREBP par les oxystérols et le cholestérol. (Song et al., 2005)

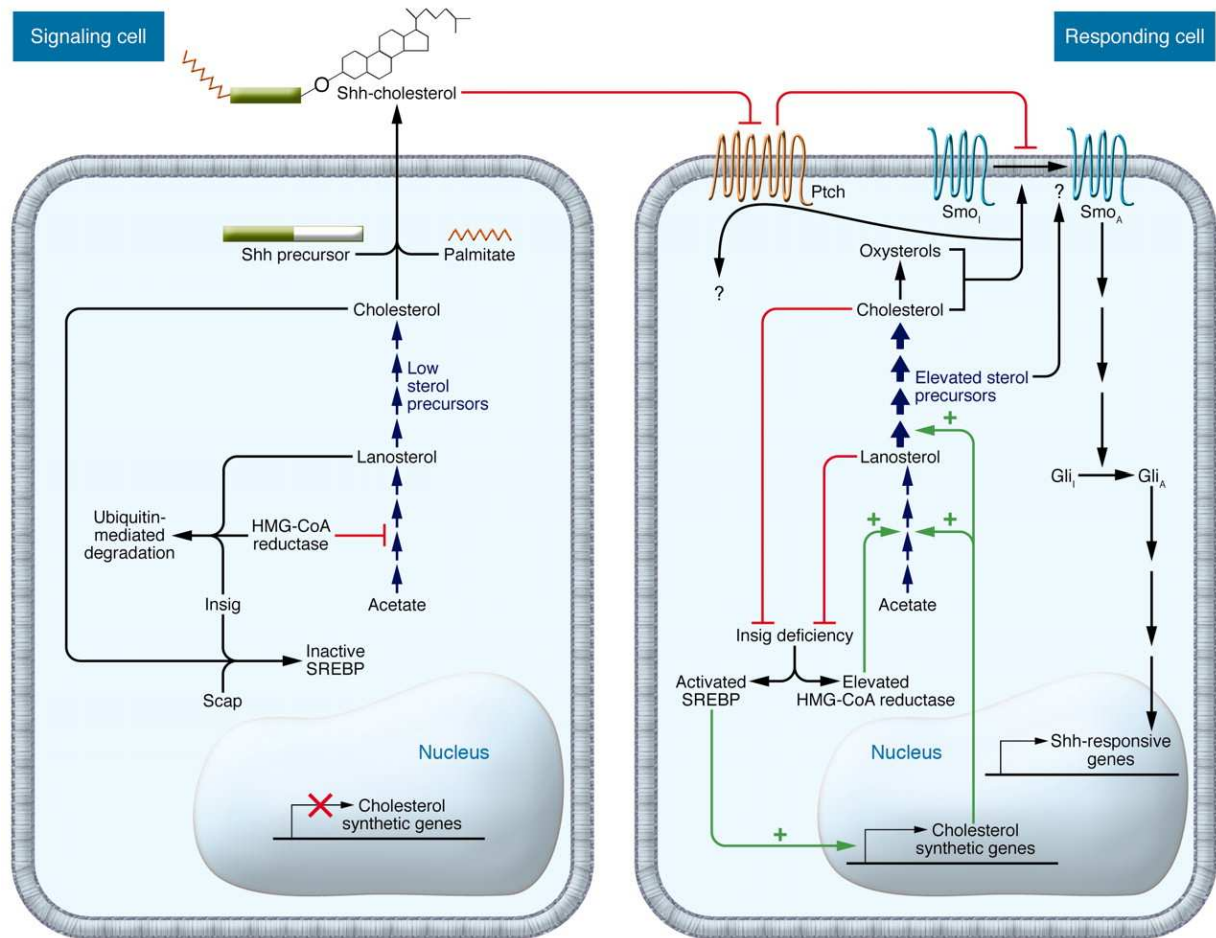


Figure 1-13 : La régulation de la synthèse de cholestérol par Insig et la voie de signalisation de la protéine Shh.

La liaison de la protéine Shh modifiée par le cholestérol à Ptch ôte l'inhibition de Smo. L'activation du facteur Smo induit la transcription de gènes de réponse au facteur Shh par l'intermédiaire de facteurs de transcription de la famille Gli.
(Porter, 2006)

3. Les maladies cutanées liées à une synthèse du cholestérol défectueuse

Huit maladies héréditaires affectant des enzymes spécifiques de la biosynthèse du cholestérol ont été répertoriées. Les maladies sont causées par la mutation des gènes encodant les enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol. Ces anomalies enzymatiques de la voie de biosynthèse du cholestérol ont pour conséquence d'augmenter certains intermédiaires stérols et de diminuer la quantité de cholestérol. Les patients affectés par ces pathologies ont de multiples anomalies morphogénétiques et congénitales, dont des anomalies au niveau des organes internes, du squelette et de la peau (Waterham, 2006). Nous nous focalisons ici sur deux maladies qui ont un impact au niveau de l'épiderme : le syndrome de Smith-Lemli-Opitz et la desmostérolase.

3.1. Le Syndrome de Smith-Lemli-Opitz

Le Syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) est une maladie génétique due à une mutation du gène codant pour l'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase (3β -hydroxy-steroid- Δ 7-reductase) qui permet la conversion du 7-déhydrocholestérol en cholestérol (Roux et al., 2000). Ce syndrome se caractérise par des quantités plasmatiques et tissulaires anormalement élevées de 7-déhydrocholestérol et de 8-déhydrocholestérol, ainsi qu'une hypocholestérolémie sévère. Les patients ont des anomalies morphogénétiques et congénitales, des problèmes comportementaux, ainsi qu'un retard mental et de croissance (Waterham, 2006). Ces malformations sont dues à un dysfonctionnement de la protéine *Sonic hedgehog* (Shh) (Roux et al., 2000).

Les protéines de la famille hedgehog jouent un rôle primordial dans le développement. La protéine subit un clivage autocatalytique suivi de la fixation d'une molécule de cholestérol à son domaine de signalisation. Il semble donc que le cholestérol est nécessaire pour la signalisation de la protéine Shh. La protéine modifiée par le cholestérol se lie alors au récepteur *Patched* (Ptch) qui contient un domaine senseur de stérol. A l'état inactif, le récepteur Ptch maintient la protéine de transduction du signal *Smoothed* (Smo) dans un état inactif. Lorsque la protéine Shh modifiée par le cholestérol se lie au récepteur Ptch, le récepteur Smo devient actif et il induit la transcription des gènes de réponse à la protéine Shh nécessaires au développement grâce aux facteurs de transcription de la famille Gli (figure 1-13) (Porter et al., 2006). Les malformations des patients atteints du syndrome SLOS sont donc induites par une mauvaise signalisation de la protéine Shh, qui conduit à une perte de la transcription de gènes responsables du développement.

Une étude en Grande-Bretagne a montré que 57% des patients atteints du syndrome de Smith-Lemli-Opitz sont anormalement sensibles aux ultraviolets A (UVA) (Anstey et al., 1999). Il semble que les symptômes de photo-sensibilité observés chez ces patients sont amoindris lorsque ceux-ci prennent des suppléments de cholestérol (Azurdia et al., 2001). Les radiations UVA stimulent la formation de *Reactive Oxygen Species* (ROS) et de prostaglandine E2 (PGE2) qui sont impliqués dans la photo-sensibilité cutanée et la formation de tumeurs. Les UVA produisent des ROS, ce qui augmente la concentration de calcium intracellulaire. Le calcium intracellulaire est nécessaire pour l'activation de la phospholipase A2 (cPLA2) et pour la synthèse de PGE2 par un mécanisme de réponse inflammatoire directe induite sur la peau. Les *lipid rafts* des cellules de patients atteints du SLOS sont désorganisés, ce qui altère

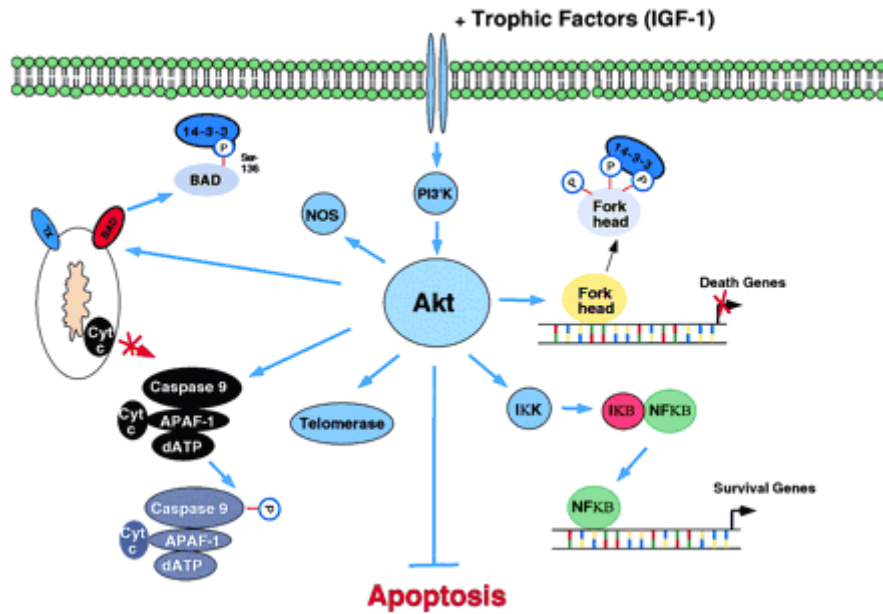


Figure 1-14 : Mode d'action anti-apoptotique du facteur Akt.

La protéine Akt activée phosphoryle et inactive Bad, un facteur pro-apoptotique, par séquestration dans le cytoplasme. Le facteur Bad ne forme donc pas de complexe avec Bcl-xL, il n'y a pas libération de cytochrome C par les mitochondries et la cellule n'entre pas en apoptose.

(www.med.univ-angers.fr/discipline/bio_cel/LicenceUE2/FramedroiteUE2.html)

la signalisation des protéines membranaires. Cette altération conduit à l'augmentation de la formation de ROS induite par les UVA et de la synthèse de PGE2 (Valencia et al., 2006).

Un apport de cholestérol est un traitement fréquemment prescrit aux patients atteints de ce syndrome. Cependant, ce traitement présente de nombreux désavantages, dont celui de ne pas atteindre le système nerveux central. Or, il semble que les problèmes mentaux et comportementaux sont une conséquence de la présence d'intermédiaires stérols anormaux dans le système nerveux central. La simvastatine est une statine qui présente de nombreux avantages pour traiter les patients atteints de SLOS car elle augmente l'expression de la DHCR7, ainsi que d'autres gènes impliqués dans la synthèse de cholestérol comme l'enzyme HMG-CoA réductase, le récepteur des lipoprotéines, la squalène synthase et l'enzyme DHCR24. Un traitement avec cette statine augmente donc paradoxalement la présence de cholestérol (Wassif et al., 2004).

3.2. La desmostérolose

La desmostérolose est une maladie génétique rare qui se caractérise par une augmentation du précurseur desmostérol, suggérant une déficience pour l'enzyme 3 β -hydroxysterol Δ 24-réductase (DHCR24). Les patients atteints de cette pathologie ont en effet des mutations dans la séquence codante du gène de la DHCR24 (Waterham et al., 2001). Le seul patient vivant rapporté à ce jour présente une expression très importante de desmostérol mais curieusement une quantité normale de cholestérol. En effet, l'enzyme DHCR24 de ce patient présente tout de même une activité normale à 20% (Mirza, 2006).

L'équipe de Mirza (2006) a créé des souris knock-out pour le gène DHCR24 (DHCR24 $-/-$) afin de mimer la desmostérolose et d'étudier notamment les effets au niveau cutané. L'histologie cutanée de ces souris révèle une hyperprolifération de kératinocytes indifférenciés. La barrière épidermique semble altérée chez ces souris, et l'hyperprolifération des kératinocytes pourrait essayer de compenser ces défauts épidermiques. L'expression de l'enzyme DHCR24 permettant la réduction de la double liaison sur le carbone 24 est donc essentielle pour le bon développement de la structure cutanée.

Lu et al. (2006) ont étudié la prolifération des fibroblastes embryonnaires de souris préparés à partir des souris DHCR24 $-/-$ de l'équipe de Mirza. Dans les cellules de souris qui possèdent le gène DHCR24 intact, le facteur de croissance insuline, qui possède son récepteur dans les cavéoles, stimule la cascade Akt-Bad. Akt est une sérine/thréonine kinase qui phosphoryle et inactive Bad, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl2. Bad phosphorylé par Akt est séquestré dans le cytoplasme et la cellule n'entre pas en apoptose (figure 1-14). Toutefois, la structure cavéolaire des cellules DHCR24 $-/-$ est altérée, ce qui conduit à un découplage des récepteurs de l'insuline des cavéoles. L'action de l'insuline est alors altérée et les facteurs Akt et Bad ne sont plus phosphorylés. Cette altération de l'action de l'insuline est responsable de l'apoptose chez ces cellules. En effet, Bad non phosphorylé induit la libération du cytochrome C de la mitochondrie et mène à l'apoptose (Scorrano et Korsmeyer, 2003).

Des études d'une équipe allemande montrent que le cholestérol et le desmostérol sont identiques du point de vue biophysique dans les membranes. Le cholestérol peut donc être remplacé par le précurseur desmostérol dans les membranes sans avoir d'impact sur l'homéostasie de l'organisme (Huster, 2005). Cependant, des études réalisées par l'équipe de Vainio au Danemark arrivent à une toute autre conclusion (Vainio et al., 2006).

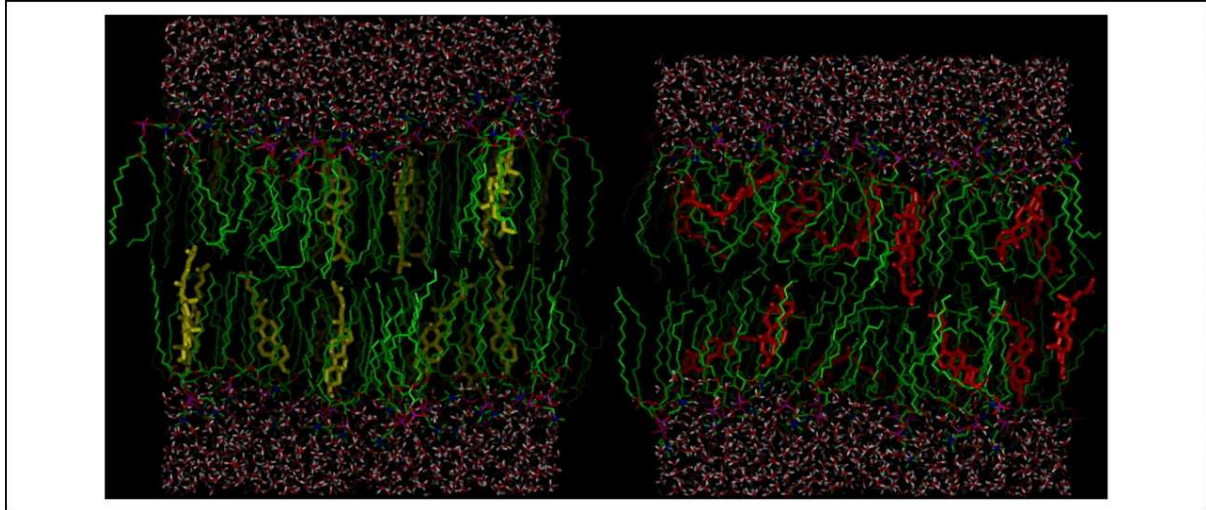


Figure 1-15 : Représentation d'une bicouche lipidique avec le cholestérol et le desmostérol. Les chaînes hydrocarbonées sont représentées en vert. Le cholestérol est coloré en jaune, et le desmostérol en rouge. Des différences d'orientation et de structure sont observées selon la présence de cholestérol ou de desmostérol dans la bicouche lipidique. (Vainio et al., 2006)

Les caractéristiques biophysiques et fonctionnelles diffèrent entre ces deux stérols. Selon eux, la différence est due à la double liaison sur le carbone 24 du desmostérol. La double liaison induit un changement de conformation de la queue stérol qui conduit à des propriétés structurales différentes du cholestérol, notamment de la fluidité membranaire, empêchant l'organisation des *lipid rafts* (figure 1-15) (Vainio et al., 2006).

3.3. La régulation de la biosynthèse des isoprénoïdes et du cholestérol lors de synthèse défectueuse de cholestérol

Les patients ayant une déficience dans l'enzyme mévalonate kinase ont des taux de cholestérol normaux. Ils sont en effet capables de générer des produits isoprénoïdes en quantités suffisantes. Cela se reflète par une augmentation de l'activité de l'enzyme HMG-CoA reductase (Houten et al., 2003).

La plupart des maladies affectant la synthèse du cholestérol sont associées à une diminution de la concentration en cholestérol et à une réduction de la quantité stéroïdienne totale. La régulation de la biosynthèse de stéroïdes est altérée suite à l'accumulation des intermédiaires de la voie de synthèse. Il est possible que la quantité totale stéroïdienne réduite soit due au fait que les intermédiaires inhibent le clivage de SREBP, ce qui résulte dans une transcription diminuée des gènes impliqués dans la synthèse des stéroïdes. Le desmostérol se lie au domaine senseur de SCAP *in vitro*, conduisant aux mêmes changements de conformations de SCAP induits par le cholestérol. Les intermédiaires lanostérol, zymostérol, lathostérol, 7-déhydrocholestérol et le desmostérol n'inhibent pas le clivage de SREBP et n'exercent pas de régulation plus efficace par feed-back via SREBP.

Un autre scénario possible est que les intermédiaires stérols diminuent la synthèse stéroïdienne par régulation post-traductionnelle. Il a notamment été montré que le 7-déhydrocholestérol est un inhibiteur potentiel de l'enzyme HMG-CoA reductase au niveau protéique mais pas au niveau transcriptionnel. Le 7-déhydrocholestérol est un intermédiaire qui accélère la dégradation de l'HMG-CoA réductase. D'autres études ont montré que le 7-déhydrocholestérol, le zymostérol, le lathostérol et le desmostérol n'induisent pas l'ubiquitination et la dégradation de cette enzyme (Waterham, 2006).

4. Etudes du rôle du cholestérol dans la physiologie épidermique

Afin d'étudier l'impact d'une altération de la synthèse de cholestérol sur la physiologie cutanée, plusieurs modèles peuvent être utilisés. L'équipe de Mirza a créé des souris knock-out pour le gène d'une enzyme importante pour la synthèse de cholestérol. *In vitro*, des modèles sont réalisés afin d'étudier l'impact d'une déplétion en cholestérol. Nous proposons que l'inhibition de certaines enzymes de la voie de synthèse du cholestérol *in vitro* soit un modèle expérimental complémentaire.

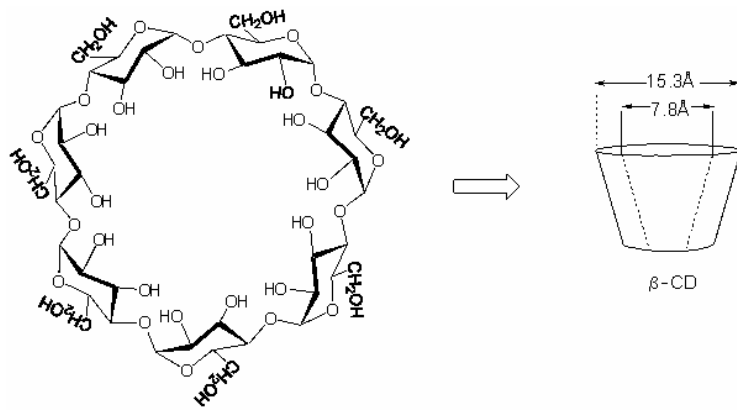


Figure 1-16 : La molécule de méthyl-β-cyclodextrine (MβCD).

La méthyl-β-cyclodextrine est constituée de sept glucoses liés entre eux par des liaisons glycosidiques α-1,4. Cette molécule porte des groupements méthyles en nombre variable. La MβCD forme une cavité en son centre qui permet d'extraire une molécule de cholestérol.

4.1. L'impact d'une déplétion en cholestérol sur la physiologie des kératinocytes épidermiques

4.1.1. L'extraction du cholestérol

La déplétion du cholestérol membranaire se fait par l'utilisation des cyclodextrines qui sont des oligosaccharides à 6, 7 ou 8 unités glucopyranoses respectivement nommés α -, β -, γ -cyclodextrines. Les cyclodextrines possèdent une cavité hydrophobe dont la taille varie avec le nombre d'unités glycopyranoses. La méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) est une molécule composée de 7 résidus glucose reliés par des liaisons glycosidiques α -1,4 et qui porte un nombre variable de groupements méthyles. Le cycle des sept sucres forme une cavité centrale dans laquelle peut se loger une molécule de cholestérol (figure 1-16). La M β CD permet donc d'extraire le cholestérol des membranes, ce qui déstabilise la structure des *lipid rafts* et des cavéoles. Chez les kératinocytes, une diminution du cholestérol membranaire est constatée après un traitement avec la molécule M β CD 7,5mM (ou 1%) pendant une heure (Jans et al., 2004).

4.1.2. Les effets de la M β CD sur la physiologie des kératinocytes épidermiques

L'activation du récepteur de l'EGF est induite en l'absence de son ligand lorsque les kératinocytes sont traités avec la M β CD. Le récepteur activé agit alors sur la prolifération cellulaire en activant la MAPK ERK-2 (Lambert et al., 2006). L'extraction de cholestérol agit également sur la MAPK p38 en l'activant. Jans et al. (2004) ont démontré que l'activation des p38 α et p38 β module l'expression du marqueur de différenciation tardif, l'involucrine. Il semble donc que l'extraction du cholestérol par la M β CD agisse sur la différenciation des kératinocytes. Un traitement avec cette cyclodextrine augmente l'expression de l'involucrine et diminue l'expression des marqueurs de différenciation précoce, les kératines 10 et 14. Récemment, Mathay et al. (soumis) ont montré qu'une déplétion du cholestérol des kératinocytes épidermiques active la MAPK p38 et induit l'expression rapide et importante du facteur HB-EGF. Ces résultats suggèrent que HB-EGF est un facteur de réponse précoce au stress qui permet probablement la réparation rapide de l'épiderme.

Les *lipid rafts* sont importants pour la régulation des stress oxydatifs dans les kératinocytes. La disruption des rafts réduit de manière importante la synthèse de ROS, et notamment de la molécule H₂O₂, qui semble importante pour certaines voies de signalisation. En effet, les protéines de signalisation EGF, Ras et la PI3K produisent la molécule H₂O₂ comme messenger secondaire (Gniadecki et al., 2002).

Les *lipid rafts* semblent également impliqués dans l'activation d'Akt qui est une *Protein Kinase B* (PKB) impliquée dans la voie de survie cellulaire par les facteurs de croissance et les cytokines. Le facteur Akt phosphorylé inactive les molécules pro-apoptotiques dont la caspase-9 et Bad. Ce facteur agit aussi sur l'activation de *Nuclear Factor- κ B* (NF κ B) qui va augmenter la transcription des gènes anti-apoptotiques. La déplétion de cholestérol désorganise les *lipid rafts* et inactive ainsi le facteur Akt. La M β CD induit l'apoptose par voie mitochondriale suite à un changement du potentiel membranaire mitochondrial qui va activer la caspase-3 (Li et al., 2006). Il semble donc que l'intégrité des *lipid rafts* soit indispensable pour la survie des kératinocytes (Bang et al., 2005).

Cependant, on sait que la déplétion de cholestérol par la M β CD induit l'activation du récepteur de l'EGF important dans la voie de signalisation de survie cellulaire (Lambert et al., 2006). L'apoptose est induite par la M β CD malgré l'activation du récepteur de l'EGF et de

ERK. L'équipe de Li (2006) montre que le facteur EGF est capable d'activer le facteur de survie Akt, mais pas dans les cellules ayant reçu le traitement M β CD. Des résultats récents de notre laboratoire montrent que cette induction de l'apoptose est réversible (Lambert et al., 2007).

4.2. Les souris knock-out pour les enzymes de la voie de synthèse du cholestérol

L'équipe de Mirza a créé des souris knock-out pour le gène codant pour l'enzyme 3 β -hydroxysterol Δ 24-réductase (DHCR24). Cette enzyme catalyse la réduction de la double liaison sur le carbone 24 du desmostérol pour donner la molécule de cholestérol. Les souris DHCR24 $-/-$ créées par cette équipe sont mortes quelques heures après leur naissance (Mirza et al., 2006). L'équipe de Wechsler a également créé des souris DHCR24 $-/-$, mais celles-ci sont viables jusqu'à l'âge adulte. Il semble que la différence entre les souris obtenues par l'équipe de Mirza et par l'équipe de Wechsler soit due à une capacité différente des embryons de capter le cholestérol maternel durant la gestation. Les embryons obtenus par l'équipe de Wechsler (2003) présentent en effet durant la gestation un taux significatif de cholestérol, provenant de la mère, qui disparaît rapidement après leur naissance.

L'étude de l'histologie cutanée des souris DHCR24 créées par l'équipe de Mirza révèle que l'expression des kératines, ainsi que des protéines filaggrine, loricrine et involucrine sont aberrantes. La kératine K6 généralement retrouvée dans les kératinocytes hyperprolifératifs, et la kératine K14, marqueur des kératinocytes basaux, sont retrouvées en nombre important dans l'épiderme de ces souris. Cette expression anormalement élevée des kératines dans l'épiderme murin indique qu'il y a hyperprolifération de kératinocytes immatures. De plus, l'expression des protéines loricrine et filaggrine sont réduites, alors que l'involucrine se retrouve de manière précoce dans l'épiderme. La diminution de l'expression de la loricrine, un composant essentiel de l'épiderme, et de la filaggrine, qui permet l'agrégation des kératines, explique que la barrière épidermique et la kératinisation sont altérées. L'hyperprolifération des kératinocytes permettrait probablement de contrecarrer l'altération de la barrière de l'épiderme de ces souris.

L'épiderme des souris DHCR24 $-/-$ présente un phénotype anormal, particulièrement au niveau de sa kératinisation. L'enzyme DHCR24 semble donc essentielle dans le bon développement de la peau (Mirza, 2006).

L'équipe de Lu (2006) a étudié le phénomène de prolifération des fibroblastes embryonnaires murins préparés au départ de ces souris DHCR24 $-/-$. La voie de signalisation induite par l'insuline est altérée car les cavéoles contenant son récepteur sont perturbées. L'altération de la signalisation induit la présence de la forme déphosphorylée de Bad, un facteur pro-apoptotique. Le cytochrome C présent dans les mitochondries est alors libéré, ce qui conduit à l'apoptose. Il semble donc que la biosynthèse de cholestérol soit essentielle pour l'activation et le maintien de la cascade de survie initiée en réponse aux facteurs de croissance.

4.3. Les inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol

Au vu des effets *in vitro* de la M β CD et des effets *in vivo* des souris knock-out pour l'enzyme DHCR24, nous allons tester l'impact des inhibiteurs de la voie du cholestérol sur la physiologie des kératinocytes épidermiques humains en culture.

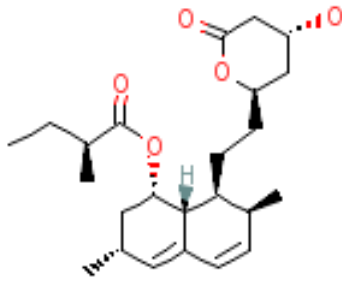


Figure 1-17 : L'inhibiteur Lovastatine.

La Lovastatine inhibe l'étape de conversion de l'HMG-CoA en mévalonate qui est catalysée par l'enzyme HMG-CoA réductase.

(redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/cgi-bin/getCard.cgi?CARD=APRD00370)

4.3.1. La Lovastatine

La Lovastatine est une statine qui inhibe la conversion de l'HMG-CoA en mévalonate induite par l'enzyme HMG-CoA réductase (figure 1-17) (Waterham et al., 2006). Cette enzyme est une protéine transmembranaire ancrée dans le réticulum endoplasmique. Cependant, il existe une seconde isoforme de cette enzyme dans la matrice des peroxysomes. L'activité de l'enzyme dans les peroxysomes est inférieure à 5% de son activité totale. L'enzyme HMG-CoA réductase peroxysomale est encodée par le même gène que l'enzyme présente en membrane du réticulum endoplasmique. Il semble donc qu'une fraction de l'enzyme du réticulum endoplasmique est ciblée vers les peroxysomes (Breitling et Krisans, 2002).

Les statines sont très utilisées pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Cependant, les effets des statines sont limités car elles conduisent à une déficience des produits dérivés du mévalonate qui mène à une augmentation compensatoire de l'enzyme HMG-CoA réductase. Cela implique le besoin pour le traitement de fortes doses de statines (Sever et al., 2003).

Les molécules inhibant l'action de l'HMG-CoA réductase bloquent la synthèse du cholestérol, mais également l'isoprénylation des protéines, la farnésylation et la géranylgeranylation. La Lovastatine inhibe préférentiellement la géranylgeranylation. Cet inhibiteur augmente de plus le nombre de cellules en phase G2/M. Des analyses suggèrent que la Lovastatine inhibe la phosphorylation de la protéine du Rétinoblastome (pRb) via la réduction de l'expression de *cyclin-dependant kinase* (cdk 2) et cdk 4 due à une association accrue aux inhibiteurs de cdk : p21 et p27 (Reszka et al., 2001). Il semble que l'enzyme HMG-CoA réductase soit également impliquée dans la voie de transduction du signal conduisant à l'apoptose. L'inhibition de l'enzyme HMG-CoA réductase conduit à l'apoptose dans les cellules tumorales par diminution de l'isoprénylation des protéines Ras et Rho. Ceci cause une diminution de la phosphorylation de ERK et Akt, qui sont des protéines de signalisation importantes dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire, et mène ainsi à l'activation de Bad qui est pro-apoptotique (Muzio et al., 2006).

4.3.2. Le Triparanol

Le Triparanol inhibe l'enzyme 3β -hydroxysterol Δ 24-reductase (DHCR24) qui convertit dans la voie de Bloch le desmostérol en cholestérol. Le Triparanol induit l'accumulation du précurseur desmostérol et la diminution importante de la quantité de cholestérol (Waterham, 2006). En 1960, l'équipe de Roux a démontré la tératogénicité du Triparanol. Cet inhibiteur induit de nombreuses anomalies chez les embryons obtenus à partir de rattes traitées avec le Triparanol.

L'enzyme *selective Alzheimer disease indicator 1* (seladin-1) est identique à l'enzyme DHCR24 (Waterham et al., 2001). La seladin-1 est un régulateur important de la sénescence et de la réponse cellulaire à des stimuli oncogènes et oxydatifs. L'enzyme seladin-1 a été découverte chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les patients présentent des taux très faibles de seladin-1 dans les neurones affectés, ce qui se traduit par une accumulation de desmostérol et par une réduction de cholestérol membranaire dans le cerveau (Cramer et al., 2006). Or, la seladin-1 confère une résistance aux cellules neuronales contre le stress oxydatif et contre la toxicité des peptides β -amyloïdes qui sont dérivés du clivage protéolytique du précurseur protéique amyloïde APP par la β -sécrétase. La seladin-1 possède une activité anti-apoptotique due à son action inhibitrice sur l'activité de la caspase-3 dans les neurones (Luciani et al., 2004).

La seladin-1 est également impliquée dans la régulation de la transformation et de la sénescence induite par la protéine Ras chez les cellules humaines. L'inactivation du gène de la seladin-1, essentielle pour la sénescence induite par Ras, conduit à une division cellulaire et à la formation éventuelle de cellules transformées (Wu et al., 2004).

5. Objectifs

Le cholestérol est un composant essentiel des *lipid rafts* qui semble indispensable pour les voies de signalisation intracellulaire. Une déplétion du cholestérol membranaire grâce à la M β CD semble modifier ces voies de signalisation *in vitro*. *In vivo*, une synthèse de cholestérol altérée mène à l'accumulation de précurseurs stérols. Cela conduit à des pathologies induisant notamment des anomalies au niveau cutané et particulièrement épidermique.

L'objectif de mon mémoire est de déterminer si l'inhibition d'enzymes responsables de la maturation du cholestérol peut produire des effets semblables à l'extraction du cholestérol par la M β CD dans les kératinocytes épidermiques humains. L'étude se focalise principalement sur l'inhibiteur Triparanol qui inhibe la conversion du desmostérol en cholestérol dans la voie de Bloch.

Dans un premier temps, nous étudierons la cytotoxicité éventuelle de différents inhibiteurs de la voie de biosynthèse du cholestérol. Ensuite, l'effet de l'inhibiteur Triparanol et de la M β CD sera testé sur la prolifération et la différenciation cellulaire. Différentes voies de signalisation vont être examinées dans les kératinocytes épidermiques humains afin de déterminer si le remplacement du cholestérol par le desmostérol en membrane a un impact sur ces voies de signalisation et affecte par conséquent la physiologie de ces cellules.

MATERIEL ET METHODES

1. Culture des kératinocytes épidermiques humains

1.1. Matériel

Milieu complet KGM-2 (keratinocyte growth medium)

- KBM-2 (Keratinocyte Basal Medium) (Clonetics)
- Suppléments:
BPE (Bovine Pituitary Extract) à 0,2%
Hydrocortisone 5×10^{-7} M
EGF (Epidermal Growth Factor) 0,2 ng/ml
Insuline 5 µg/ml
Transferrine 5 µg/ml
Epinéphrine
Pénicilline 50 unités/ml
Streptomycine 50 µg/ml

Milieu complet Epilife+

- Epilife medium (Cascade)
- Suppléments:
BPE à 0,2%
EGF 0,2 g/ml
Insuline 5 µg/ml
Hydrocortisone 5×10^{-7} M
Transferrine 5 µg/ml
Pénicilline G 50 unités/ml
Streptomycine 50 µg/ml

Milieu autocrine Epilife-

- Epilife medium (Cascade)
- Suppléments:
L-histidine $2,4 \times 10^{-4}$ M
L-isoleucine $7,5 \times 10^{-4}$ M
L-méthionine 9×10^{-4} M
L-phénylalanine 9×10^{-4} M
L-tryptophane $4,5 \times 10^{-4}$ M
L-tyrosine $7,5 \times 10^{-4}$ M
Hydrocortisone 5×10^{-7} M
Pénicilline G 50 unités/ml
Streptomycine 50 µg/ml

Solution A

- Glucose 10 mM
- KCl 3 mM
- NaCl 130 mM
- Na_2HPO_4 1 mM
- Rouge phenol 0,0033 mM
- HEPES 30 mM
- pH 7,4
- stérilisation par filtration sur Stérvex-GP 0,22 µm

Trypsine T17

- Solution A
- Trypsine à 0,17%

Trypsine T25

- Solution A
- Trypsine à 0,025%
- Ethylène Diamine Tétracétate (EDTA) 0,01%

Solution dFCS 2% (solution bloquante)

- Solution A
- Fœtal Calf Serum dialysé contre un tampon sans ions calcium et magnésium (dFCS) 2%

Milieu de congélation

- Milieu complet Epilife + 80%
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) 10%
- dFCS 10%

1.2. Méthodes

1.2.1. Culture primaire

Les kératinocytes épidermiques humains sont obtenus à partir de prélèvements de peau humaine provenant d'abdominoplasties. Ce matériel est obtenu après consentement éclairé des patients concernés. Les abdominoplasties sont réalisées par le Docteur Bienfait qui opère à la Clinique Saint Luc à Bouge. Immédiatement après l'opération, la couche superficielle du prélèvement cutané (derme et épiderme) est récupérée à l'aide d'un dermatome et est placée dans du liquide physiologique. Les kératinocytes sont isolés au laboratoire sous hotte à flux laminaire vertical dans des conditions stériles et dans des conditions de biosécurité de classe

2. L'isolation des kératinocytes provenant de l'abdominoplastie d'un patient donne une nouvelle souche : NAK pour *Normal Abdominoplasty Keratinocyte*. Les manipulations qui permettent l'isolation des cellules épidermiques se font à 4°C avec du matériel stérile et le port de gants est obligatoire. Les morceaux de peau sont disposés sur une boîte de Pétri qui contient une solution de trypsine T17 avec 0,25 µg/ml de fungizone et 50 µg/ml de gentamycine. Ces morceaux sont sectionnés en carrés de un centimètre de côté et sont incubés une nuit à 4°C pour permettre l'action de séparation du derme de l'épiderme par la trypsine. Le lendemain, l'épiderme est délicatement détaché du derme à l'aide de pinces. Les morceaux d'épiderme sont placés dans un milieu KGM-2 avec 2% de Fœtal Calf Serum dialysé (dFCS) qui neutralise l'action de la trypsine. Les fractions épidermiques sont ensuite triturées et passées plusieurs fois dans une pipette afin de dissocier les cellules prolifératives de la lame basale. La suspension cellulaire est ensuite filtrée avec un filtre Nylon stérile de 70µm pour récupérer uniquement les cellules isolées. Le filtrat est centrifugé dix minutes à 1000 rpm et à 4°C. Le surnageant est ôté et le culot qui contient les cellules est resuspendu dans du milieu KGM-2.

Les cellules sontensemencées à une densité de 46000 cellules par cm² dans des boîtes T175 avec du milieu complet auquel sont ajoutés 0,1% de dFCS, de la gentamycine, de l'ampicilline et de la fungizone. Les boîtes de culture sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C, avec une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu des cultures cellulaires est renouvelé trois jours plus tard, et par la suite tous les deux jours.

1.2.2. Culture secondaire

Les cellules provenant de la culture primaire sont détachées de la boîte avec de la trypsine T25. Ces cellules doivent être détachées à sous-confluence afin de préserver leur pouvoir prolifératif. L'ajout de trypsine T25 dans les boîtes de culture pendant cinq minutes permet d'abord de décrocher les fibroblastes et les mélanocytes qui ne sont pas intéressants pour notre étude. Suite à un remplacement de la trypsine, la trypsinisation est encore poursuivie pendant dix à quinze minutes pour décrocher les kératinocytes. Suite à cette incubation, l'action de la trypsine est arrêtée par un ajout de solution bloquante. Les cellules détachées par la trypsine sont récupérées et centrifugées cinq minutes à 1000 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu et les cellules sontensemencées à une densité de 10000 cellules par cm² dans du milieu complet Epilife[®]+ contenant une concentration en ions Ca²⁺ de 0,06mM. Le milieu Epilife[®]+ favorise la prolifération des cellules. La culture secondaire est amenée à un état qui se rapproche de la confluence afin d'obtenir le plus grand nombre de cellules possible, mais en évitant la différenciation cellulaire.

Les kératinocytes en phase de prolifération, c'est-à-dire au stade de sous-confluence avancée, sont trypsinisés, centrifugés puis comptés. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu KGM-2 de manière à obtenir le double de la densité cellulaire souhaitée au final. De manière équivalente, du milieu de congélation deux fois concentré (20% DMSO, 20% dFCS, 60% milieu complet Epilife[®]+) est ajouté afin que la concentration finale soit de un ou deux millions de cellules par ml. La suspension de cellules est répartie dans des cryotubes de 1,5 ml (NUNC) qui sont par la suite placés à -80°C pendant une nuit, avant d'être transférés dans une cuve contenant de l'azote liquide à -195°C.

1.2.3. Culture tertiaire

La culture tertiaire est obtenue à partir de cultures secondaires congelées. Le nombre de cryotubes nécessaires à l'expérience est prélevé et placé rapidement dans un bain à 37°C afin que le contenu des tubes soit décongelé rapidement. Les cellules présentes dans les cryotubes

sont ensuite rassemblées dans un tube stérile qui est posé sur glace. Les cellules sont comptées et ensemencées à une densité cellulaire pouvant varier entre 6.10^3 et 10.10^3 de cellules par cm^2 dans du milieu KGM-2. Le lendemain, le milieu est remplacé par du milieu Epilife[®]+ pour éliminer les traces de DMSO qui est toxique pour les cellules en culture. Le milieu est ensuite remplacé tous les deux jours, jusqu'à ce que les cellules recouvrent 60% de la boîte de culture. Dès lors, deux rinçages avec de la solution A sont réalisés afin d'éliminer les facteurs de croissance exogènes et du milieu Epilife[®]- est ajouté. Les cellules sont alors cultivées en culture autocrine. Le milieu Epilife[®]- est également renouvelé tous les deux jours.

2. Traitements des kératinocytes

2.1. Extraction du cholestérol par la méthyl-β-cyclodextrine

Les cellules sont traitées à confluence avec une solution de méthyl-β-cyclodextrine (MβCD) à une concentration de 7,5 mM. La MβCD (Sigma-Aldrich) se présente sous forme de poudre à dissoudre dans du milieu Epilife[®]-. La quantité de poudre nécessaire est pesée. Elle est ensuite dissoute dans le milieu Epilife[®]- et la solution est filtrée avec un filtre de 0,22 μm (Millex-GP, Millipore) afin de la rendre stérile. Le milieu de culture Epilife[®]- présent dans les boîtes de culture cellulaire est aspiré et remplacé par du milieu Epilife[®]- contenant la MβCD. Les cellules sont incubées une heure à 37°C avec la MβCD. Lors d'un prétraitement avec les inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol, la MβCD à la concentration de 45 mM est directement ajoutée au milieu contenant les inhibiteurs afin d'arriver à une concentration finale de 7,5 mM.

2.2. Traitement des kératinocytes avec les inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol : Triparanol, Lovastatine, NB598 et BM15766

Les inhibiteurs Triparanol, Lovastatine, NB598 et BM15766 (Sigma) se trouvent à une concentration stock de 5 mM dans du DMSO. Dans un premier temps, les inhibiteurs sont dilués dans du DMSO pour arriver aux concentrations 500 μM et 50 μM. Afin que chaque traitement soit effectué dans du milieu Epilife[®]- 0,2% DMSO, les inhibiteurs aux concentrations 5 mM, 500 μM et 50 μM sont dilués 500 fois pour obtenir des concentrations finales de 0,1 μM ; 1 μM et 10 μM. Les cultures cellulaires sont alors incubées durant un laps de temps variant entre 2 heures et 48 heures aux différentes concentrations.

3. Test MTT

Le test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) permet d'évaluer la viabilité d'une culture cellulaire. Il permet par exemple d'établir la toxicité d'une molécule utilisée lors des traitements des cultures cellulaires.

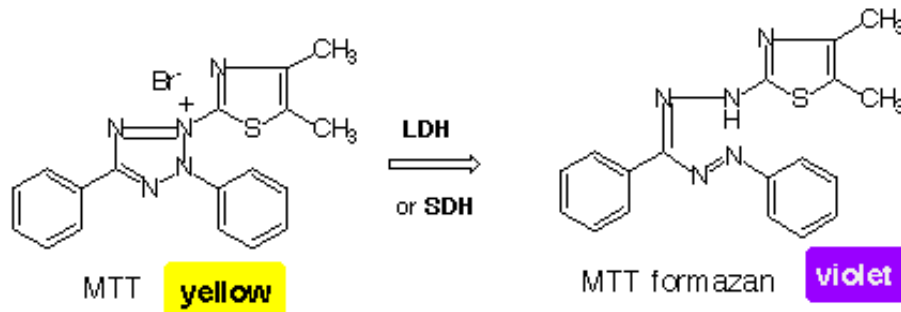


Figure 2-1 : Réaction catalysée lors du test MTT.

Le test MTT est un test colorimétrique basé sur une réaction d'oxydo-réduction par l'enzyme mitochondriale succinate déshydrogénase. Cette enzyme induit la conversion du produit jaune 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium ou MTT en formazan. Le formazan est insoluble dans l'eau et a une couleur bleutée. La quantité de cette molécule est proportionnelle au nombre de cellules vivantes retrouvées dans une culture cellulaire.

Le test MTT est un test colorimétrique basé sur une réaction d'oxydo-réduction qui est catalysée par la succinate déshydrogénase, une enzyme retrouvée au niveau des mitochondries. Cette déshydrogénase mitochondriale permet la conversion du 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT), un substrat jaune soluble dans l'eau, en formazan qui est un produit bleu foncé insoluble dans l'eau (figure 2-1). Cette réaction d'oxydo-réduction est retrouvée dans les cellules vivantes qui possèdent une activité mitochondriale intacte. La quantité de formazan produite est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes. La perte de viabilité cellulaire suite à un traitement se traduit par une coloration bleue plus faible et donc une densité optique réduite.

Le MTT (Sigma), présent sous forme de poudre jaune, est pesé et dissous dans du milieu de culture Epilife® - pour arriver à une concentration finale de 0,5 mg/ml. La solution est filtrée avec un filtre Millex-GP 0,22µm (Millipore) et est maintenue à l'abri de la lumière. Les cellules sont cultivées dans des plaques 24 puits (Greiner). Le milieu de culture est aspiré lorsque les cellules se trouvent à confluence et 500 µl de solution MTT sont ajoutés dans chacun des 24 puits. Les plaques sont ensuite incubées durant une heure à 37°C dans l'obscurité. Suite à cette incubation, le MTT est retiré et 500µl d'isopropanol sont ajoutés dans chacun des puits. L'isopropanol exerce une action de lyse cellulaire qui permet de libérer mais également de dissoudre le formazan produit par la réaction d'oxydo-réduction mitochondriale. Les plaques 24 puits sont placées sur un plateau basculant 30 minutes de manière à obtenir une solution homogène. Ensuite, 50µl de lysat cellulaire contenant le formazan dissous et 150µl d'isopropanol sont déposés dans les puits d'une plaque 96 puits de manière à effectuer chaque mesure en triplicat. La densité optique est alors mesurée à 570 nm (BioRad, Ultramark imaging system).

4. Test d'incorporation de la ³H-thymidine

4.1. Matériel

- ³H-thymidine 1µCi/ml
- TCA (trichloroacetic acid) 10% ice cold
- Solution A
- Solution de lyse : NaOH 0,3 N ; SDS 1%
- Milieu de culture KBM

4.2. Méthode

Les cultures cellulaires de plaques 12 puits sont traitées à sous-confluence avec ou sans inhibiteur lorsque 70% des puits sont recouverts d'un tapis cellulaire. La ³H-thymidine est ajoutée deux heures avant la fin du traitement dans chaque puits afin d'obtenir une concentration finale de 1µCi/ml. Suite à cette incubation à 37°C, le milieu de culture radioactif est aspiré et trois rinçages avec la solution A sont effectués. Une incubation sur glace durant 10 minutes en présence de 2ml de TCA 10% à 4°C permet ensuite de précipiter les protéines et autres macromolécules. Trois rinçages de 5 minutes sont réalisés par la suite sur glace avec du TCA 10% à 4°C afin d'éliminer la ³H-thymidine qui n'a pas été incorporée dans l'ADN. Le TCA est retiré et les cellules sont lysées avec 1ml de NaOH 0.3N + SDS 1%

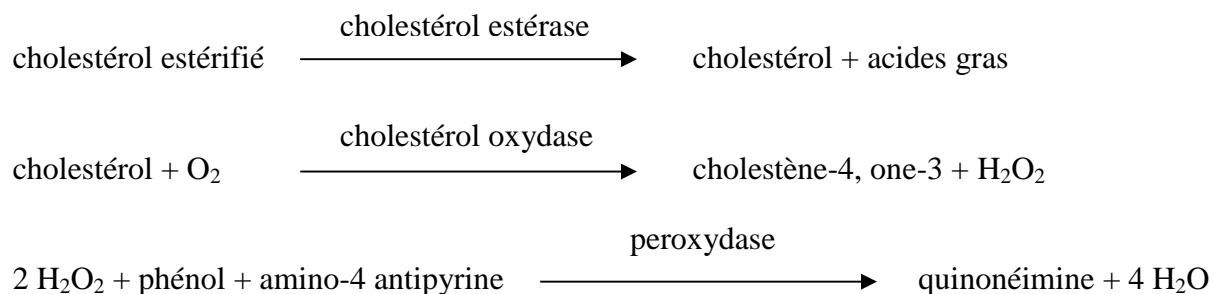


Figure 2-2 : Représentation des réactions catalysées par le réactif du kit de dosage du cholestérol.

Les réactions induites par les enzymes cholestérol estérase et cholestérol oxydase forment de l'H₂O₂ qui est détecté selon une réaction formant la quinonéimine. L'intensité de la coloration induite par cette molécule mesurée à 500 nm est proportionnelle à la présence de cholestérol dans l'échantillon.

durant 30 minutes à température ambiante. Le lysat cellulaire est homogénéisé avant d'en prélever 500µl. A ces 500µl, 3ml de solution de scintillation sont ajoutés dans des tubes adéquats. La solution est laissée toute la nuit à l'abri de la lumière. La scintillation est mesurée à l'aide d'un compteur à radiation β spécifique pour le tritium.

5. Le dosage du cholestérol

5.1. Matériel

- réactif du kit Cholestérol RTU (bioMérieux) :	- réactif A : solution alcaline à base de cuivre
Tampon MOPS pH 7	- réactif B : réactif de Folin dilué
Phénol	- réactif S
Cholate de sodium	
Chlorure de magnésium	
Agent tensio-actif	
Amino-4-antipyrine	
Peroxydase	
Cholestérol oxydase	
Cholestérol estérase	
-tampon de lyse PBS-Triton X100 1%	

5.2. Principe

Le cholestérol cellulaire est dosé au moyen du kit Cholestérol RTU (bioMérieux) en utilisant la séquence cholestérol estérase-cholestérol oxydase-peroxydase-chromogène présente dans le réactif du kit. Ces réactions produisent de l' H_2O_2 qui est dosée selon une réaction formant de la quinonéimine de couleur orangée (figure 2-2). L'intensité de la coloration de cette molécule est mesurée à 500 nm et est proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans l'échantillon. La concentration de cholestérol mesurée dans les lysats est rapportée à la concentration en protéines mesurée en utilisant le kit Dc (Bio-Rad) dont la méthode de détection est basée sur la méthode de Lowry. Une réaction entre les protéines et le cuivre du milieu alcalin est suivie par la réduction du réactif de Folin. Les protéines réduisent le réactif de Folin par perte d'atomes d'oxygène. Les molécules réduites sont alors colorées en bleu et sont détectées à 750 nm.

5.3. Méthode

Les boîtes de culture 6 puits dans lesquelles le milieu de culture a été retiré au préalable sont placées sur glace. Les cellules sont lysées dans 300µl de tampon de lyse PBS-Triton X100 1%. Le contenu de chacun des puits est rassemblé à l'aide d'un racloir. Les lysats cellulaires récupérés sont placés dans des eppendorfs. De chacun de ces eppendorfs, 21µl sont prélevés et déposés dans des cuvettes. Un blanc est également réalisé avec le tampon de lyse PBS-Triton X100. A ces 21µl de protéines, 700µl de réactif du kit de dosage du cholestérol sont ajoutés. Les cuvettes sont ensuite placées durant 5 minutes dans un bain-marie à 37°C. Suite à ces 5 minutes d'incubation, la densité optique est mesurée à 500nm.

Les protéines des lysats cellulaires sont ensuite dosées dans une plaque 96 puits. Les protéines sont diluées 8 fois dans du tampon de lyse PBS-Triton X100 1%. De ces dilutions, 5µl sont déposés dans les puits de manière à effectuer le test en triplicat. Dans chacun des puits, 25µl de mélange constitué de réactif S et de solution alcaline composée de cuivre sont ajoutés. Ensuite, 200µl de réactif de Folin sont additionnés. Après 15 minutes d'incubation, la densité optique est mesurée à 750nm.

6. Analyse des protéines cellulaires par Western blot

6.1. Matériel

Sample buffer 2x (tampon de lyse)

- Tris HCl 62,5mM
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 2%
- Glycérol 8,7%
- Bleu de bromophénol 0,05%
- DTT (dithiothreitol)

Running gel

- Tris base 375mM pH 8,8
- SDS 0,1%
- Acrylamide/bisacrylamide 10%
- APS (persulfate d'ammonium) 0,05%
- TEMED 0,1%

Stacking gel

- Tris base 125mM pH 6,9
- SDS 0,1%
- Acrylamide/bisacrylamide 4%
- APS (persulfate d'ammonium) 0,05%
- TEMED 0,1%

Tampon d'électrophorèse

- Tris base 25mM
- Glycine 192mM
- SDS 0,1%

Tampon de transfert

- Tris base 25mM
- Glycine 192mM
- Méthanol 20%

Tampon PBS/Tween-20

- 0,1% Tween
- NaCl 137mM
- Na₂HPO₄·2H₂O 8mM
- KCl 2,7mM
- KH₂PO₄ 1,5mM

Solution de saturation

- Tampon PBS/Tween
- lait Gloria, Nestlé 5%

6.2. Méthodes

6.2.1. Extraction des protéines

Après traitement, les boîtes de culture six puits dont le milieu a été enlevé sont congelées au minimum durant 24 heures à -80°C. Lors de l'extraction des protéines, les cellules dégèlent sur glace et sont lysées immédiatement dans 100µl de tampon de lyse Sample Buffer 2x. Le contenu des boîtes est rassemblé à l'aide d'un petit racloir et transféré dans un tube eppendorf. Les tubes sont ensuite incubés à 100°C pendant 5 minutes, avant d'être centrifugés à 4°C à 10000 rpm durant 3 minutes. Les échantillons obtenus en tant que surnageant sont alors conservés à -20°C.

6.2.2. Electrophorèse et transfert

Un volume de 15µl de protéines est prélevé des tubes eppendorfs congelés à -20°C auquel est ajouté 1,5 µl de Bleu de bromophénol. Les tubes sont incubés à 100°C durant 5 minutes pour

<u>Anticorps primaire</u>	<u>Dilution</u>	<u>Source</u>	<u>Spécificité</u>
EGFR phosphorylé (Cell Signaling)	1/1000	IgG polyclonal de lapin	Récepteur de l'EGF phosphorylé
EGFR (Biosource)	1/1000	IgG polyclonal de lapin	Récepteur de l'EGF total
MAP kinase p38 phosphorylée (Cell Signaling)	1/1000	IgG polyclonal de lapin	p38 phosphorylé
MAP kinase p38 (Cell Signaling)	1/1000	IgG polyclonal de lapin	p38 total
Akt phosphorylé (Cell Signaling)	1/1000	IgG monoclonal de lapin	Akt phosphorylé
Akt (Cell Signaling)	1/1000	IgG polyclonal de lapin	Akt total
HB-EGF (R&D)	1/2000	IgG polyclonal de chèvre	ProHB-EGF et HB-EGF
Cytokératine 10 (Dakocytomation)	1/1000	IgG monoclonal de souris	Kératine 10
Involucrine (Harbor bio-products)	1/2500	IgG polyclonal de lapin	Involucrine

<u>Anticorps secondaire</u>	<u>Dilution</u>	<u>Source</u>	<u>Spécificité</u>
Ac secondaire anti-lapin HRP (Cell Signaling)	1/1000	IgG de chèvre	IgG de lapin
Ac secondaire anti-chèvre HRP (Dakocytomation)	1/1000	IgG de lapin	IgG de chèvre
Ac secondaire anti-souris (Dakocytomation)	1/1000	IgG polyclonal de chèvre	IgG de souris

Tableau 2-1 : Liste et caractéristiques des anticorps utilisés pour l'immunodétection de protéines par la technique de Western Blot.

dénaturer les protéines. Les échantillons sont alors centrifugés pendant quelques secondes afin de rassembler le liquide à prélever dans le fond du tube. Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide 10% préalablement préparé dans le dispositif adéquat (Biorad). L'électrophorèse se fait en conditions dénaturantes en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS). Le SDS permet de charger les protéines négativement. Les protéines vont alors se repousser car elles portent la même charge, ce qui permet leur déploiement. La séparation des protéines dans le gel se fait en fonction de leur taille et donc de leur poids moléculaire. Le poids moléculaire des protéines séparées peut être estimé à l'aide d'étalons de poids moléculaire, ou *ladder*, qui migrent dans une autre piste simultanément aux échantillons. L'électrophorèse se fait à 120 volts et se termine lorsque le front de migration atteint la fin du gel.

La migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane Hybond-P polyvinylidenedifluoride (PVDF) 0,45µm (Amersham) par la technique de transfert en immersion qui se déroule durant toute une nuit, à 4°C et à 60 volts (Biorad).

Lorsque le transfert est terminé, la membrane est récupérée et déposée dans du tampon de rinçage en veillant à ce que la face portant les protéines soit orientée vers le haut. La membrane peut également être placée dans du cellophane pour être congelée à -20°C avant de réaliser l'analyse.

6.2.3. Analyse de la membrane de transfert

La membrane est placée dans la solution de saturation durant une heure sous agitation légère pour saturer les sites non spécifiques. La solution de saturation est par la suite remplacée par la solution contenant l'anticorps primaire dilué à la concentration voulue dans la solution de saturation pendant 1h30 (tableau 2-1). La membrane est ensuite lavée 4 fois 6 minutes dans la solution de rinçage ou tampon PBS-Tween 20 avant d'être incubée 45 à 60 minutes dans la solution de saturation contenant l'anticorps secondaire couplé à la *Horse Radish Peroxydase* (HRP) (tableau 2-1). Suite à cette incubation, 4 lavages de 6 minutes sont de nouveau réalisés avec la solution de rinçage.

Les protéines d'intérêt présentes sur la membrane sont ensuite révélées suite à une réaction de chémoluminescence (BM Chemoluminescence Blotting Substrate, Roche) dans une chambre noire. Pendant une minute, la membrane est placée dans le substrat de l'enzyme HRP. Ensuite, un film photographique (Hyperfilm[™] ECL, Amersham) est placé sur la membrane durant un temps d'exposition adéquat qui est variable suivant la protéine d'intérêt. Le film exposé est ensuite développé puis scanné pour être digitalisé.

7. Analyse des ARN messagers par RT-PCR quantitative

7.1. Extraction des ARN messagers

7.1.1. Matériel

Kits mini RNeasy et QIAshredder (Qiagen)

- colonnes RNeasy
- colonnes QIAshredder
- tampon RLT
- tampon RW1
- tampon RPE

- eau RNase free
- β-mercaptoéthanol

7.1.2. Méthode

Après traitement, les boîtes de culture six puits dont le milieu a été ôté sont congelées au minimum 24 heures à -80°C. Lors de l'extraction de l'ARN total, les cellules dégèlent sur glace et sont immédiatement lysées dans 350µl de tampon de lyse. Le tampon de lyse est préparé à partir de tampon RLT auquel sont ajoutés 10µl de β-mercaptoéthanol par ml de tampon RLT. Le tampon RLT est constitué de guanidine isothiocyanate et agit comme agent dénaturant et inhibiteur de RNases. Suite à la lyse des cellules, les lysats cellulaires sont déposés sur des colonnes QIAshredder qui ensuite sont centrifugées durant 2 minutes à 13000 rpm. Les colonnes QIAshredder permettent d'homogénéiser les lysats et de retenir les déchets cellulaires. Les colonnes sont ensuite ôtées et 350µl d'éthanol 70% sont ajoutés au filtrat dans chacun des tubes. Les tubes sont bien mélangés afin d'homogénéiser le contenu. Les volumes sont alors redéposés sur des colonnes RNeasy qui possèdent un filtre composé de billes de silice. Les billes de silice fixent l'ARN constitué de plus de 200 paires de bases en présence d'éthanol à 70%. Les colonnes RNeasy sont centrifugées durant 15 secondes. Le contenu des différents tubes est alors éliminé car l'ARN est associé à la membrane de la colonne. Un rinçage est réalisé avec 650µl de RW1 contenant de l'alcool et de la guanidine isothiocyanate, et une centrifugation de 15 secondes est effectuée. Ensuite, 500µl de RPE sont déposés sur les colonnes RNeasy afin de laver la colonne. Une centrifugation de 15 secondes est effectuée et 500µl de RPE sont à nouveau ajoutés sur chaque colonne. Une centrifugation de 15 secondes suivie d'une centrifugation de 2 minutes sont alors réalisées. Une dernière centrifugation d'une minute permet une élimination optimale du tampon RPE. Par après, deux séries de tubes de 1,5ml sont préparées pour recevoir l'ARN qui sera décroché grâce à l'eau RNase free. Les colonnes sont déposées sur la première série de tubes. Dans chacune de ces colonnes, 30µl d'eau RNase free sont déposées et une centrifugation d'une minute permet d'éluer l'ARN avec l'eau. Cette opération est répétée sur la deuxième série de tubes avec 40µl d'eau RNase free.

7.2. Transcription réverse

L'utilisation d'une ADN polymérase ADN dépendante est requise pour la PCR en temps réel. Il est donc nécessaire, avant d'effectuer l'analyse en Real Time PCR, de convertir les ARN messagers en ADN complémentaires grâce à la transcription réverse ou *reverse transcription*.

7.2.1. Matériel

Kit RT (Invitrogen)

- 5x First Strand Buffer (250mM Tris-HCl pH 8,3 ; 375mM KCl ; 15mM MgCl₂)
- DDT 0,1M
- dNTP 10mM
- SuperScript™ II RNase H reverse Transcriptase 2000 unités/µl

Mix RT (pour 20µl)

- 0.5µg d'oligo dT
- 111x First Strand Buffer
- 0.1µg d'ARN poly-A
- 0.01M DTT
- 0.25 mM dNTP Mix
- SuperScript™ II RNase H reverse Transcriptase 100 unités

Nom	Séquence	Amplicon	Référence GenBank
36B4-sense 36B4-antisense	5'-ATCAACGGGTACAAACGAGTC-3' 5'-CAGATGGATCAGCCAAGAAGG-3'	97 pb	NM_001002
Involucrine-sense Involucrine-antisense	5'-TGAAACAGCCAACTCCAC-3' 5'-TTCCTCTTGCTTTGATGGG-3'	83 pb	NM_005547
Keratine10-sense Keratine10-antisense	5'-AATCAGATTCTCAACCTAACAAC-3' 5'-CTCATCCAGCACCTACG-3'	162 pb	NM_000421
Keratine14-sense Keratine14-antisense	5'-CGATGGCAAGGTGGTGTC-3' 5'-GGGTGAAGCAGGGTCCAG-3'	162 pb	NM_000526
DHCR24-sense DHCR24-antisense	5'-ATGGCAGCTTTGTGCGATG-3' 5'-CACCAGGAAACCCAGCGT-3'	89 pb	NM-014762
HMGCR-sense HMGCR-antisense	5'-ACCTTTCCAGAGCAAGCACA-3' 5'-AGGACCTAAAATTGCCATTCCA-3'	101 pb	NM_000859

Tableau 2-2 : Liste des amorces utilisées lors de la PCR en temps réel

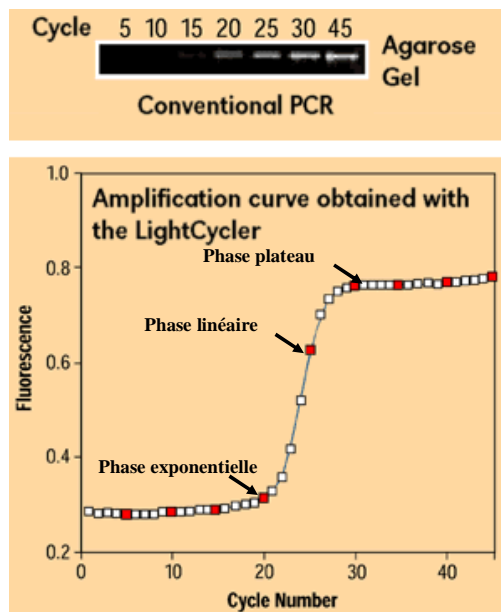


Figure 2-3 : La cinétique d'amplification de l'ADN lors des cycles PCR.

7.2.2. Méthode

Le kit *SuperScript H Reverse transcriptase* (Invitrogen) est l'outil utilisé pour réaliser la transcription inverse. La queue poly-A des ARN messagers est reconnue par les oligo-dT qui servent d'amorces pour l'enzyme reverse transcriptase (*SuperScriptTM II*). L'enzyme synthétise alors les brins d'ADN complémentaires à partir des ARN messagers. La manipulation se déroule ensuite suivant le protocole du fournisseur du kit *SuperScript H Reverse transcriptase* à partir de 1 µg d'ARN total. L'ARN est incubé en présence de dNTP, d'oligo dT et d'eau durant 5 minutes à 65°C. Suite à cette incubation, un mélange contenant du First Strand Buffer, du DTT et l'enzyme *SuperScript* est ajouté à la solution. Deux incubations, respectivement, de 50 minutes à 42°C et de 15 minutes à 70°C sont réalisées pour obtenir de l'ADN complémentaire à la concentration finale de 50 ng/µl.

7.3. PCR en temps réel

7.3.1. Matériel

Mélange PCR

Power Sybr Green PCR Master Mix (2x) (ABI)
Amorces sens et antisens (300mM) (tableau 2-2)

7.3.2. Principe

La *polymerase chain reaction* (PCR) est l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique qui est délimité par des amorces. L'amplification des fragments est représentée par une courbe qui peut être séparée en 2 phases. La première partie de la courbe est la phase exponentielle qui est modélisable. La deuxième partie est la phase de plateau qui est difficilement modélisable et qui correspond à un ralentissement, voire à un arrêt, de l'amplification de l'ADN (figure 2-3).

La PCR en temps réel est une PCR classique dont l'évolution peut être suivie au cours du temps. La quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle peut être mesurée à l'aide d'un marqueur fluorescent. La quantification repose sur la phase exponentielle mais exploite aussi un autre paramètre : le *Cycle Threshold* (Ct). Ce paramètre correspond au nombre de cycles qui sont nécessaires pour que l'amplification produite soit significative et distinguable du bruit de fond.

7.3.3. Méthode

Au laboratoire, le *power Sybr Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) est utilisé pour la réalisation de la PCR en temps réel. Le colorant utilisé est le *Sybr Green* qui devient fluorescent lorsqu'il s'intercale dans l'ADN double brin, ce qui permet la mesure de la quantité d'ADN amplifié (figure 2-4).

Le mélange PCR contenant le *power Sybr Green PCR Master Mix* et les amorces sens et antisens spécifiques du gène à amplifier est préparé et 15µl sont déposés dans chacun des puits d'une plaque 96 puits MicroAmp (Applied biosystems). Dans chacun de ces puits, 5 µl d'ADN complémentaire à la concentration de 0,2 ng/µl sont ajoutés. La plaque 96 puits est ensuite centrifugée à 1000 rpm durant 2 minutes. La plaque est ensuite introduite dans le système d'analyse pour la PCR (Applied Biosystems, 7300 Real Time PCR system).

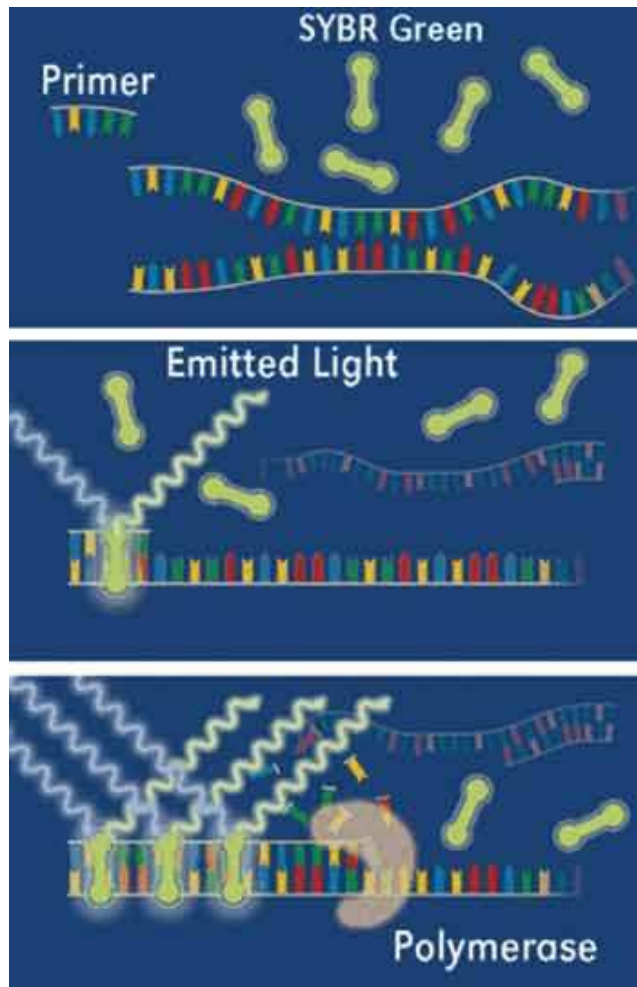


Figure 2-4 : L'insertion du Sybr Green dans l'ADN.
Le Sybr Green devient fluorescent lorsqu'il s'intercale dans l'ADN double brin, permettant de quantifier les produits amplifiés.
(www.thaiscience.com)

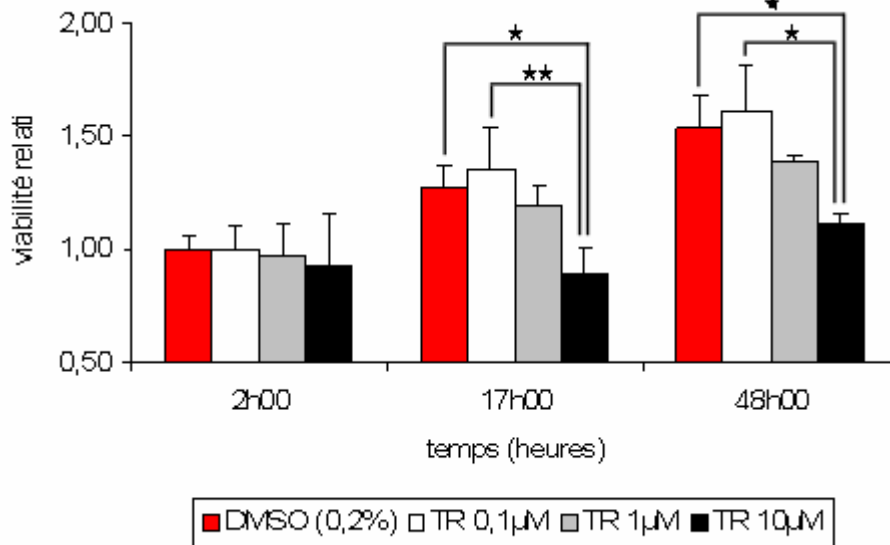
A chacun des quarante cycles PCR réalisés, la quantité du gène ciblé est doublée. De manière générale, lors d'une PCR classique, un cycle est composée de trois phases : le désappariement des brins d'ADN à 95°C, l'hybridation des primers sur l'ADN entre 50 et 60°C, et l'élongation des primers à 72°C.

Préalablement aux 40 cycles, une étape plus longue de désappariement des brins est réalisée à 95°C durant 10 minutes. Lors de chaque cycle, l'étape de désappariement des brins d'ADN complémentaires se fait à 95°C durant 15 secondes. Les étapes d'hybridation et d'élongation des primers se déroulent dans notre cas toutes deux à 60°C. La température de 60°C est maintenue pendant une minute.

Les résultats sont obtenus par comparaison de la variation de l'expression d'un gène d'intérêt et de l'expression d'un *house keeping gene*. Le *house keeping gene* est utilisé comme contrôle car son expression ne varie pas en fonction des conditions soumises à une culture cellulaire. Le *house keeping gene* choisit est le 36B4 (ou RPLP0), une protéine ribosomiale. La valeur de Ct du gène 36B4 est soustraite à celle du gène d'intérêt pour obtenir une variation positive ou négative de Ct, le ΔCt . Un $\Delta\Delta Ct$ est calculé pour un même gène d'intérêt. La valeur est obtenue par soustraction du ΔCt de la condition contrôle, DMSO, au ΔCt de la condition étudiée. La *relative quantification* (RQ) est la valeur prise pour effectuer les graphiques de RT-PCR. Cette valeur est calculée pour chaque condition par le calcul : $2^{-\Delta\Delta Ct \text{ de condition X}}$.

RESULTATS

A.



B.

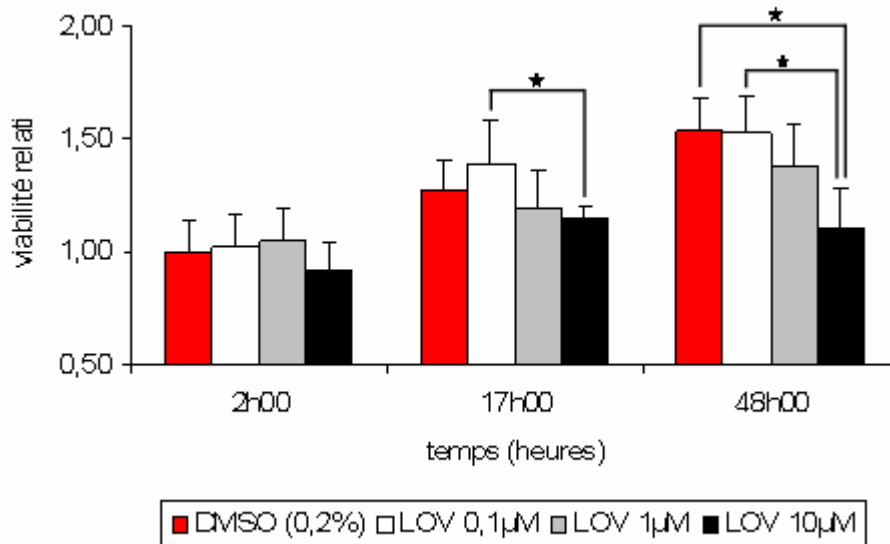


Figure 3-1 : Etude de la viabilité cellulaire suite aux traitements des kératinocytes avec deux inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol, le Triparanol et la Lovastatine. L'analyse des résultats obtenus par le test MTT est opérée par comparaison avec les cellules cultivées en présence de DMSO à 0,2%. Les graphes représentent la moyenne et l'erreur standard à la moyenne de trois expériences indépendantes, réalisées chacune en triplicat (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

A. Graphique représentant la viabilité relative après une incubation de 2 heures, 17 heures et 48 heures avec l'inhibiteur Triparanol (TR) aux concentrations 0,1 μM ; 1 μM et 10 μM . **B.** Visualisation de la viabilité relative après un traitement de 2 heures, 17 heures et 48 heures avec la Lovastatine (LOV) aux concentrations 0,1 μM ; 1 μM et 10 μM .

1. Impact du Triparanol sur la viabilité et la prolifération des kératinocytes

1.1. Expérience

La première partie de notre travail consiste à déterminer les éventuels effets toxiques des inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol par une étude de la viabilité des kératinocytes épidermiques humains en culture. La Lovastatine nous servira de référence lors des expériences car son effet sur les kératinocytes a déjà été caractérisé au laboratoire.

La viabilité cellulaire est étudiée à l'aide d'un test MTT qui nous renseigne sur la quantité de cellules vivantes dans une culture cellulaire. Le test MTT permet ainsi de détecter la toxicité éventuelle des inhibiteurs Triparanol et Lovastatine sur des cultures de kératinocytes humains par une éventuelle perte de viabilité. Le test de viabilité cellulaire est réalisé après 2 heures, 17 heures et 48 heures d'incubation avec le Triparanol et la Lovastatine à trois concentrations différentes : 0,1 μM ; 1 μM et 10 μM . Les résultats obtenus lors du test MTT sont analysés par comparaison à un contrôle obtenu par incubation des cellules avec du DMSO à 0,2%, substance dans laquelle les inhibiteurs sont dilués.

1.2. Analyse de la viabilité

Après deux heures de traitement avec le Triparanol (figure 3-1-A), aucun effet n'est observé sur la viabilité cellulaire, ce qui montre l'absence d'une toxicité immédiate. Il en est de même après 17 heures et 48 heures de traitement avec le Triparanol aux concentrations 0,1 μM et 1 μM . Par contre, après 17 heures et 48 heures d'incubation en présence de cet inhibiteur à la plus forte concentration utilisée, une diminution significative du nombre de cellules vivantes est observée en comparaison au contrôle. Une réduction significative est également constatée après 17 heures et 48 heures d'incubation si l'on compare le Triparanol à la concentration 0,1 μM avec la concentration 10 μM .

Le test de viabilité cellulaire réalisé avec la Lovastatine (figure 3-1-B) révèle que 2 heures d'incubation ne sont pas suffisantes pour affecter la viabilité de la culture cellulaire, quelle que soit la concentration utilisée. Suite à 17 heures de traitement, une perte significative du signal de viabilité est constatée entre les concentrations 0,1 μM et 10 μM de l'inhibiteur. Cependant, une réduction significative est surtout obtenue après 48 heures d'incubation entre la Lovastatine 10 μM et la condition contrôle ou en présence de Lovastatine 0,1 μM .

Remarquons que l'analyse de la viabilité d'une culture cellulaire au cours du temps nous montre une élévation du signal. Ce phénomène est observé essentiellement suite à une incubation avec du DMSO et avec les inhibiteurs aux concentrations 0,1 μM et 1 μM . Ceci suggère que la croissance cellulaire est responsable de cette élévation, et indique que les deux inhibiteurs pourraient altérer la croissance cellulaire à forte concentration sans pour autant induire une mort cellulaire. Un test de prolifération cellulaire est alors accompli afin de déterminer un effet éventuel des inhibiteurs sur la prolifération des kératinocytes en culture.

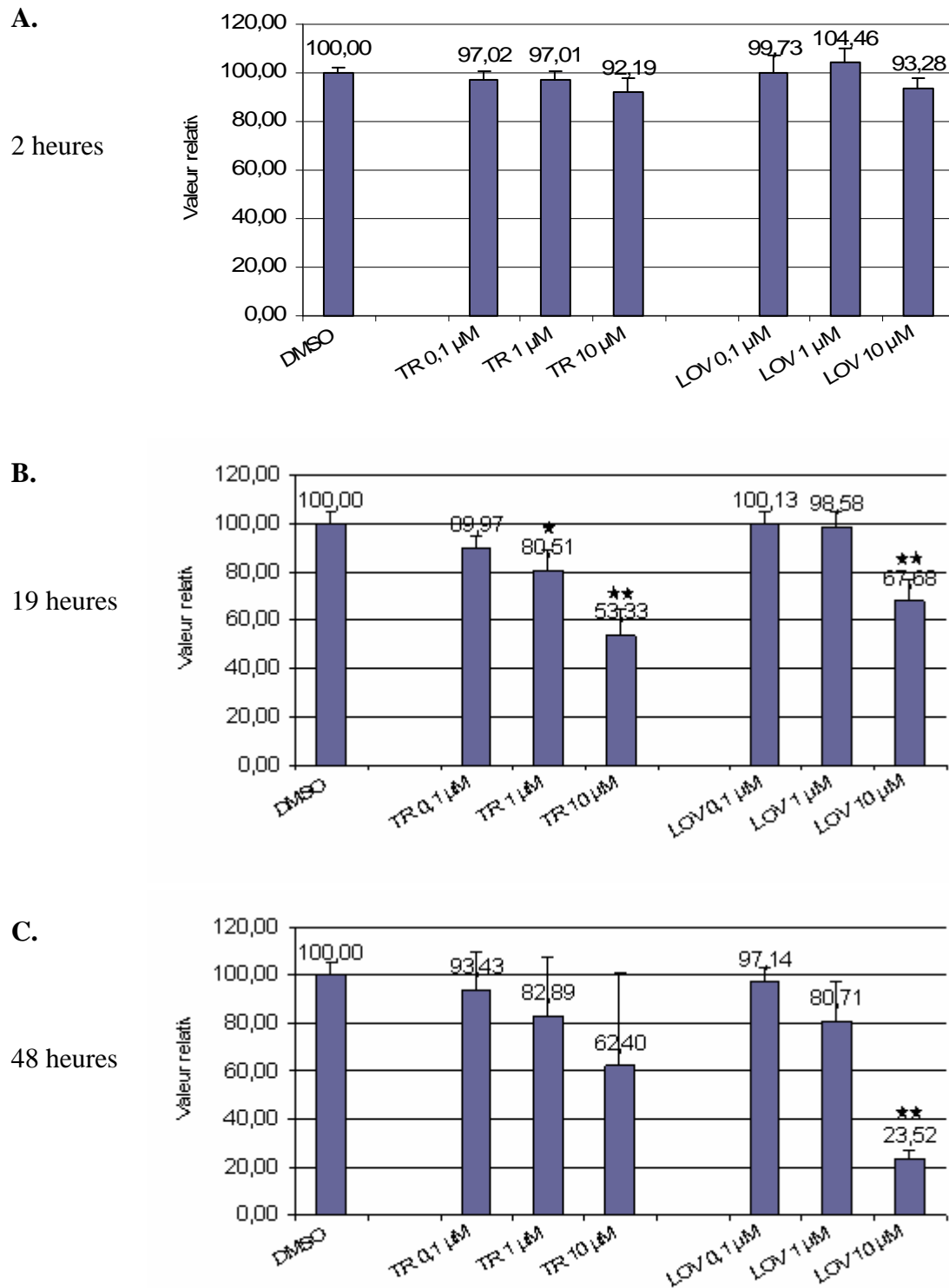


Figure 3-2 : Représentation graphique de l'étude de la prolifération cellulaire réalisée par un test d'incorporation de la ³H-thymidine. La moyenne de deux expériences indépendantes réalisées chacune en triplicat est représentée (* p < 0,05 ; ** p < 0,01 par comparaison au DMSO), ainsi que l'erreur standard à la moyenne.

Les kératinocytes sont traités avec les inhibiteurs Triparanol (TR) et Lovastatine (LOV) aux concentrations 0,1 μM ; 1 μM et 10 μM durant **A.** 2 heures ; **B.** 19 heures ; **C.** 48 heures.

1.3. Analyse de la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est investiguée à l'aide d'un test d'incorporation de la ^3H -thymidine. Ce test repose sur le principe que la ^3H -thymidine présente dans le milieu de culture est incorporée dans l'ADN des cellules qui prolifèrent. L'analyse de la prolifération des cellules en culture est effectuée après 2 heures, 19 heures et 48 heures d'incubation en présence des inhibiteurs Triparanol et Lovastatine à trois concentrations (0,1 μM ; 1 μM et 10 μM).

L'analyse réalisée après 2 heures d'incubation avec les inhibiteurs (figure 3-2-A) ne révèle pas de variation d'incorporation de la ^3H -thymidine en comparaison au contrôle. La prolifération cellulaire ne paraît donc pas affectée par les inhibiteurs Triparanol et Lovastatine.

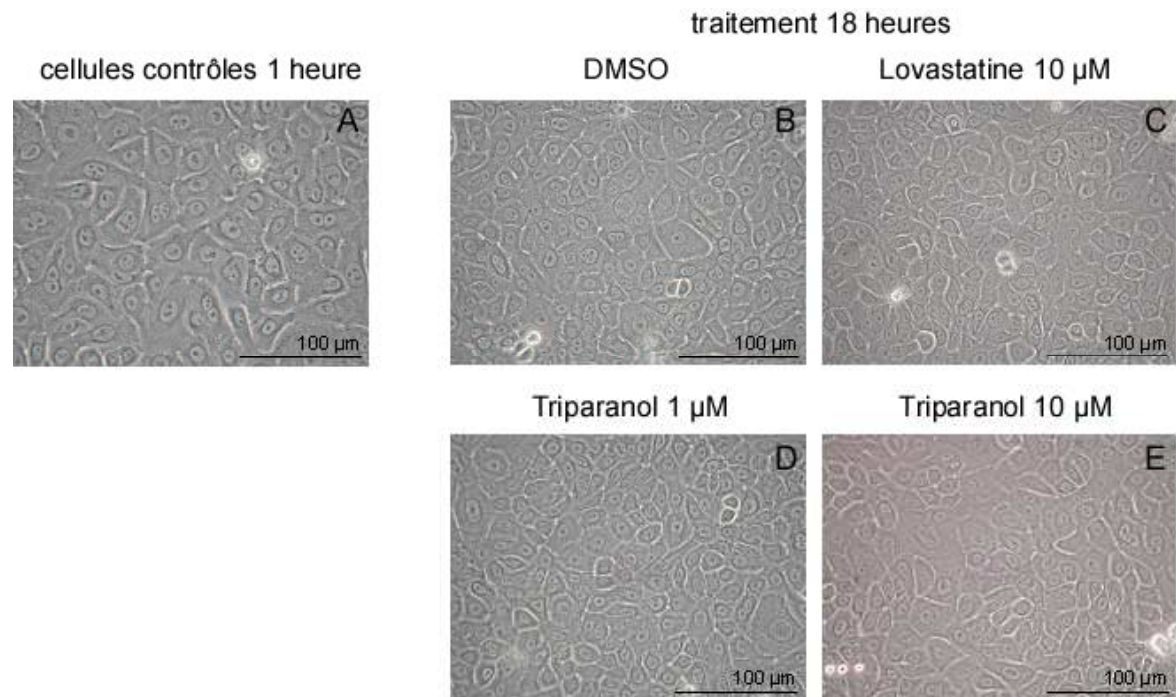
Des différences d'incorporation sont par contre remarquées après 19 heures d'incubation avec les inhibiteurs (figure 3-2-B). Une réduction de l'incorporation de ^3H -thymidine est en effet observée lors de l'incubation des cultures cellulaires avec le Triparanol et la Lovastatine, essentiellement à la concentration 10 μM . Cependant, une réduction significative est déjà obtenue avec le Triparanol à la concentration 1 μM .

Après 48 heures d'incubation (figure 3-2-C) avec la Lovastatine 10 μM , une réduction hautement significative de l'incorporation de ^3H -thymidine est observée. La Lovastatine à la concentration 1 μM induit également une perte de la prolifération des cellules mais celle-ci n'est pas significative. En présence de Triparanol, une réduction moins conséquente de l'incorporation est constatée après 48 heures d'incubation en comparaison aux résultats obtenus après 19 heures de traitement. Il faut savoir que le graphique représente une moyenne de deux expériences réalisées sur deux souches différentes et que ces deux tests ont donné des résultats divergents après 48 heures d'incubation en présence du Triparanol. La première expérience a montré une diminution significative de la prolifération cellulaire, particulièrement avec la concentration 10 μM de l'inhibiteur. Par contre, aucune réduction importante n'a été visualisée lors du second test.

1.4. Conclusion

Le Triparanol et la Lovastatine ne semblent pas à eux seuls induire une diminution de la viabilité des cultures de kératinocytes. Toutefois, une diminution du signal MTT constatée à la concentration 10 μM pour les deux inhibiteurs est observée parallèlement à une réduction de l'incorporation de ^3H -thymidine dans l'ADN des cellules. Le Triparanol et la Lovastatine à la concentration 10 μM , voire déjà à la concentration 1 μM , induisent un arrêt prolifératif mais pas la mort des cellules en culture.

Sans M β CD



Avec M β CD

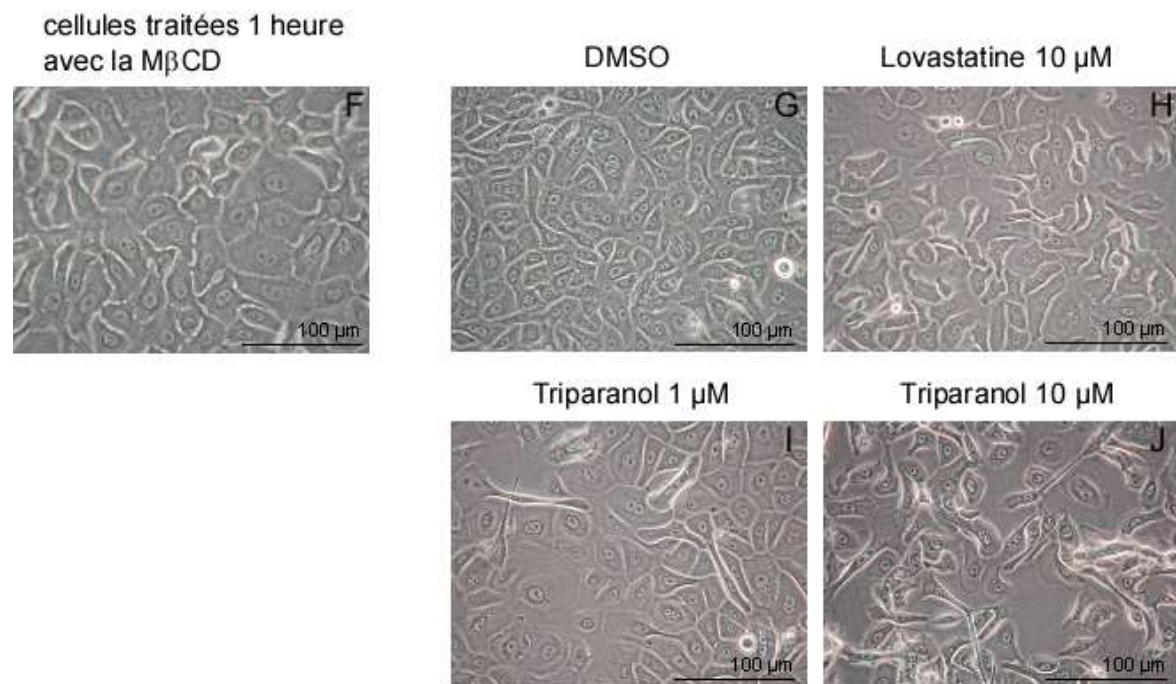


Figure 3-3 : Morphologie des kératinocytes épidermiques humains observés au microscope en contraste de phase au grossissement 40x après différents traitements. Les cellules sont incubées une heure dans du milieu Epilife[®] - seul (photos A-E) ou contenant de la M β CD (photos F-J). Les kératinocytes sont ensuite traités avec du milieu contrôle DMSO ou avec le Triparanol (TR) ou la Lovastatine (LOV) pendant 18 heures.

2. Analyse des voies de signalisation et de la différenciation des kératinocytes suite à un traitement avec le Triparanol

2.1. Expérience

Suite aux résultats obtenus lors des tests MTT et d'incorporation de la ^3H -thymidine, il semble qu'un seuil de sensibilité affectant la prolifération cellulaire est atteint par des concentrations en Triparanol ou en Lovastatine situées entre 1 μM et 10 μM . Nous avons donc décidé d'utiliser ces deux inhibiteurs aux concentrations 1 μM et 10 μM durant 18 heures pour analyser les voies de signalisation et la différenciation des kératinocytes.

Un traitement d'une heure en présence de M β CD à la concentration 7,5 mM suivi d'une incubation de 17 heures avec la Lovastatine 10 μM est un modèle de traitement qui a déjà été étudié dans notre laboratoire. Une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD suivie d'un traitement avec cet inhibiteur produit des modifications des voies de signalisation intracellulaires et de la différenciation dans les cultures de kératinocytes épidermiques humains (Jans et al., 2004). Suite à ces observations, nous voulons savoir si le Triparanol qui inhibe la synthèse du cholestérol mais pas celle du desmostérol induit des modifications de la physiologie des kératinocytes épidermiques humains. Nous avons donc étudié des voies de signalisation et la différenciation lorsque le Triparanol est combiné ou pas avec une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD.

Les kératinocytes sont traités à confluence durant une heure avec du milieu Epilife[®] - seul ou contenant de la M β CD à la concentration 7,5 mM. Suite à cette incubation, les kératinocytes sont incubés pendant 18 heures dans du milieu contrôle contenant du DMSO 0,2% ou en présence des inhibiteurs Triparanol (TR) ou Lovastatine (LOV) aux concentrations 1 μM et 10 μM .

traitement 1 heure
avec/sans M β CD post-traitement 18 heures

DMSO / TR 1 μM / TR 10 μM / LOV 1 μM / LOV 10 μM

2.2. Analyse morphologique

Les kératinocytes se trouvent à confluence (figure 3-3). Ils sont de forme polyédrique et aucun espace intercellulaire n'est visible entre eux. Un traitement de 18 heures avec les inhibiteurs sans déplétion du cholestérol membranaire préalable ne modifie pas la morphologie des kératinocytes (photos A-E).

La déplétion du cholestérol membranaire induite par une heure de traitement en présence de M β CD produit une rétraction des kératinocytes, révélant ainsi des espaces intercellulaires (photo F). La morphologie des kératinocytes est affectée de manière plus conséquente suite à une incubation de 18 heures en présence de Triparanol ou de Lovastatine (photos H, I, J). Les kératinocytes traités avec la Lovastatine à la concentration 10 μM sont rétractés et ne sont plus

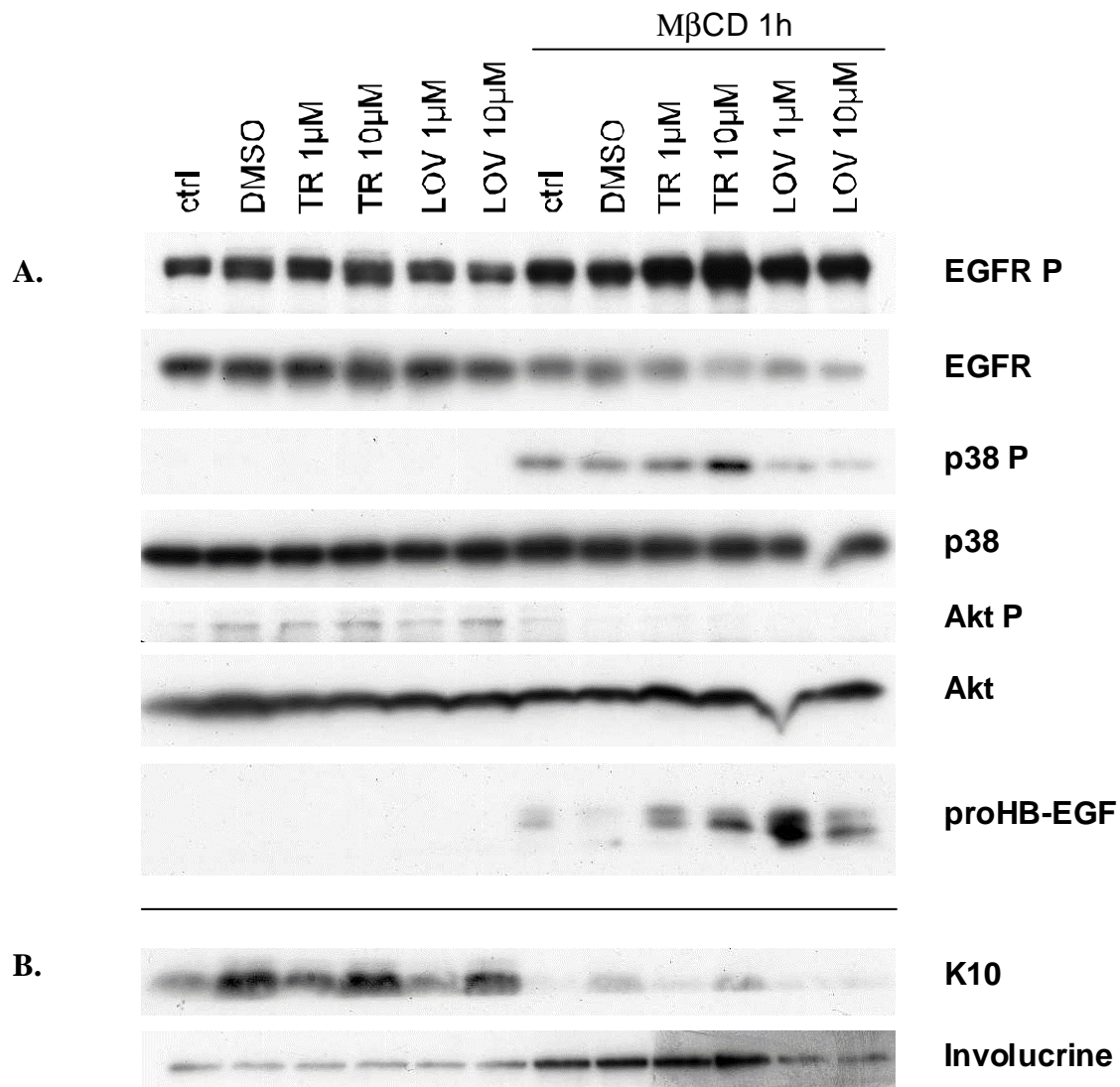


Figure 3-4 : Analyse par Western blot de voies de signalisation intracellulaires et des marqueurs de différenciation épidermique suite à différents traitements sur des cultures de kératinocytes. Une incubation est réalisée une heure dans du milieu Epilife[®] - seul ou contenant de la MβCD. Les kératinocytes sont ensuite traités durant 18 heures avec du milieu Epilife[®] - seul (Ctrl), contenant du DMSO à 0,2% (DMSO) ou les inhibiteurs Triparanol (TR) et Lovastatine (LOV) aux concentrations 1 ou 10 µM. **A.** Lors de l'étude des voies de signalisation intracellulaires, le récepteur de l'EGF (EGFR) et sa forme phosphorylée (EGFR P), la forme totale (p38) et phosphorylée de la MAPK p38 (p38 P), le facteur de survie Akt et sa forme phosphorylée (Akt P) ainsi que le précurseur proHB-EGF sont analysés. **B.** L'étude de la différenciation des kératinocytes épidermiques humains est effectuée par analyse protéique des marqueurs de différenciation kératine 10 (K10) et involucrine.

de forme polyédrique (photo H). Une rétraction cellulaire est également observée suite à un traitement avec le Triparanol combiné à une déplétion du cholestérol, surtout à la concentration 10 μ M. A cette concentration, les kératinocytes se détachent totalement les uns des autres et certains d'entre eux semblent s'étirer (photo J). Les kératinocytes incubés 18 heures dans du milieu contrôle suite à une déplétion du cholestérol retrouvent un profil morphologique assez proche de celui des kératinocytes qui n'ont pas reçu de traitement M β CD (photos B et G). Cela suggère que les kératinocytes soumis à une déplétion du cholestérol peuvent retrouver une morphologie normale lorsque la néosynthèse de cholestérol n'est pas altérée.

2.3. Analyse protéique

Les kératinocytes traités ont été lysés et les protéines sont analysées par la technique du Western blot décrite dans la partie « matériel et méthodes » (figure 3-4).

L'analyse protéique nous permet d'investiguer l'impact du Triparanol sur des voies de signalisation et sur la différenciation dans une culture de kératinocytes dont la structure membranaire est intacte ou altérée. Nous savons que le Triparanol inhibe la néosynthèse de cholestérol et empêchera une réplétion de cholestérol dans les *lipid rafts* désorganisés par la M β CD. Nous voulons savoir si le Triparanol imite les modifications observées suite à une déplétion du cholestérol membranaire induite par la M β CD suivie d'un traitement avec la Lovastatine (Jans et al., 2004).

2.3.1. Les voies de signalisation intracellulaires

Au laboratoire, les effets d'une déplétion du cholestérol membranaire sur les voies de signalisation intracellulaires ont déjà été étudiés sur des cultures de kératinocytes épidermiques humains. Une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD induit la phosphorylation du récepteur de l'EGF en absence de son ligand (Lambert et al., 2006). La forme phosphorylée de la MAPK p38 est également retrouvée suite à une extraction du cholestérol par cette cyclodextrine (Jans et al., 2004). Des expériences récentes en cours de publication démontrent qu'une déplétion du cholestérol induit également une expression rapide du précurseur proHB-EGF (Mathay et al., soumis). Par ailleurs, la déplétion du cholestérol membranaire induit la déphosphorylation de Akt, une protéine contrôlant plusieurs mécanismes cellulaires fondamentaux tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, la transcription, la migration cellulaire,...

La forme phosphorylée de la MAPK p38 et le précurseur du facteur de croissance HB-EGF ne sont pas détectés dans les kératinocytes dont les *lipid rafts* ne sont pas désorganisés par une déplétion du cholestérol membranaire (figure 3-4-A). Le facteur Akt est par contre activé dans ces conditions. Les inhibiteurs Triparanol et Lovastatine ne semblent pas avoir d'impact dans les cellules qui n'ont pas été déplétées en cholestérol. En effet, nous n'observons pas de variation d'expression conséquente selon les différents traitements avec les inhibiteurs (figure 3-4-A).

Suite à une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD, nous observons les mêmes effets que ceux démontrés auparavant au laboratoire. La déplétion du cholestérol membranaire induit la phosphorylation du récepteur de l'EGF et de la MAPK p38. Une

production du facteur proHB-EGF membranaire ainsi qu'une perte de l'activation du facteur Akt sont également observés suite à un traitement avec cette cyclodextrine (figure 3-4-A). Nous remarquons que les inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol semblent avoir un effet suite à une déplétion du cholestérol membranaire. Les modifications des voies de signalisation les plus importantes sont constatées suite à une incubation de 18 heures avec le Triparanol 10 μ M. A cette concentration, le Triparanol accentue les phénomènes observés lors d'une déplétion du cholestérol membranaire. Nous observons une phosphorylation accrue du récepteur de l'EGF et de la MAPK p38 ainsi qu'une augmentation de la quantité de proHB-EGF.

2.3.2. La différenciation cellulaire

Au laboratoire des expériences ont démontré que certaines isoformes de la MAPK p38 modulent l'expression d'un marqueur de différenciation tardif : l'involucrine. Nous savons également que la déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD augmente l'expression de l'involucrine et réduit l'expression de la kératine 10, un marqueur de différenciation précoce (Jans et al., 2004). Afin de tester l'impact du Triparanol sur la différenciation des kératinocytes épidermiques humains, nous avons observé l'expression de la kératine 10 et de l'involucrine au niveau protéique.

Dans les kératinocytes dont le cholestérol membranaire n'a pas été extrait, la kératine 10 est présente de manière importante alors que l'involucrine est retrouvée en faible quantité (figure 3-4-B). Les inhibiteurs Triparanol et Lovastatine semblent faire varier la quantité de kératine 10 retrouvées dans les kératinocytes, cependant ce résultat n'a pu être reproduit lors d'un second test.

Après une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD, on observe une diminution de la quantité de kératine 10 et une augmentation de la présence d'involucrine. Il semble de plus que le Triparanol à la concentration 10 μ M induit une surexpression de l'involucrine. Par contre, une réduction de la quantité de ce marqueur de différenciation est constatée suite à une incubation avec la Lovastatine aux concentrations 1 μ M et 10 μ M (figure 3-4-B). Cette observation est en contradiction avec l'augmentation de la présence d'involucrine observée auparavant au laboratoire suite à une déplétion du cholestérol membranaire combinée à un traitement Lovastatine 10 μ M (Jans et al., 2004).

2.4. Conclusion

Sans déplétion préalable du cholestérol membranaire par la M β CD, la Lovastatine et le Triparanol n'affectent pas les voies de signalisation intracellulaire étudiées dans les kératinocytes épidermiques humains.

Par contre, une déplétion du cholestérol membranaire combinée à un traitement avec le Triparanol à la concentration 10 μ M augmente les phénomènes déjà observés au laboratoire sur les voies de signalisation suite à un traitement avec la M β CD. Le Triparanol 10 μ M induit le précurseur proHB-EGF et augmente le niveau de phosphorylation du récepteur de l'EGF et de la MAPK p38. De plus, l'augmentation de la phosphorylation de la MAPK p38 est observée en parallèle à la présence accrue du marqueur de différenciation tardif, l'involucrine.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de enzymes ciblées par le Triparanol et la Lovastatine est insuffisante pour désorganiser les *lipid rafts* comme le fait l'extraction du cholestérol par la M β CD.

Le cholestérol présent dans les kératinocytes se trouve essentiellement en membrane, et peu dans le milieu intracellulaire. Un renouvellement constant du cholestérol s'opère dans les kératinocytes mais en faible quantité. Afin d'éviter ce renouvellement, nous avons décidé d'inhiber au préalable cette néosynthèse continue par un traitement avec des inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol.

3. Analyse des voies de signalisation et de la différenciation des kératinocytes suite à une inhibition au préalable de la voie de synthèse du cholestérol

3.1. Expérience

Dans les expériences précédentes, un traitement d'une heure avec ou sans M β CD était suivi par une incubation avec les inhibiteurs Triparanol ou Lovastatine aux concentrations 1 μ M et 10 μ M durant 18 heures. Nous nous sommes demandés ce qui pouvait expliquer le peu d'effet obtenu suite à un traitement avec les inhibiteurs sans M β CD par rapport à l'extraction du cholestérol membranaire. Une possibilité serait que lors de l'ajout des inhibiteurs, du cholestérol venant d'être synthétisé vienne remplacer rapidement le cholestérol extrait par la M β CD dans les *lipid rafts*. Pour empêcher cette éventualité, nous avons inhibé la néosynthèse de cholestérol en effectuant des prétraitements durant 24 heures avec les inhibiteurs Triparanol ou Lovastatine à la concentration 1 μ M. Dès lors, du cholestérol ne pourra plus venir s'insérer dans les membranes et restaurer les voies de signalisation suite à une extraction du cholestérol par la M β CD. Les traitements sont réalisés avec les inhibiteurs à la concentration 1 μ M afin de ne pas altérer de manière importante la prolifération cellulaire après 48 heures de traitement.

Les cultures de kératinocytes sont prétraitées durant 24 heures avec du milieu contrôle DMSO ou avec les inhibiteurs Triparanol (TR) ou Lovastatine (LOV) à la concentration 1 μ M. Dans ces milieux, de la M β CD est additionnée ou non durant une heure. Suite à ce prétraitement, les cellules sont incubées 18 heures dans du milieu contrôle ou dans du milieu contenant les inhibiteurs afin d'empêcher le retour de cholestérol en membrane.

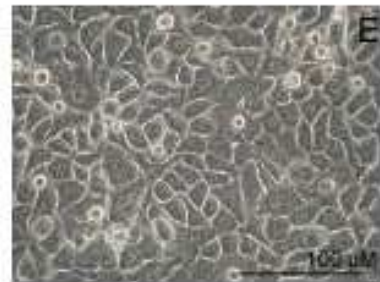
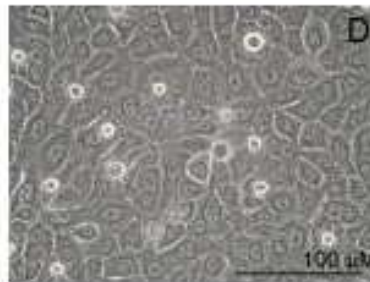
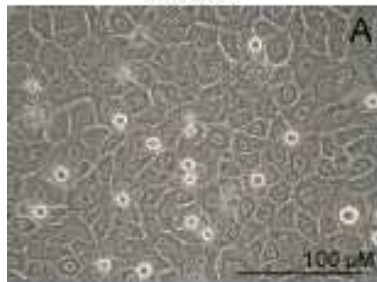
prétraitement 24 heures	traitement 1 heure avec/sans M β CD	post-traitement 18 heures
DMSO		DMSO
TR 1 μ M		DMSO / TR 1 μ M
LOV 1 μ M		DMSO / LOV 1 μ M

prétraitement 24h

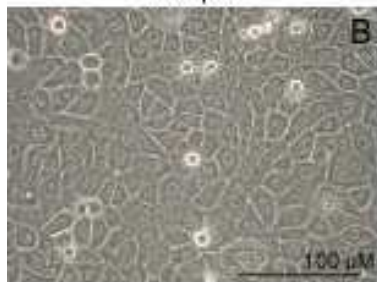
traitement 1h sans M β CD

traitement 1h avec M β CD

DMSO



TR 1 μ M



LOV 1 μ M



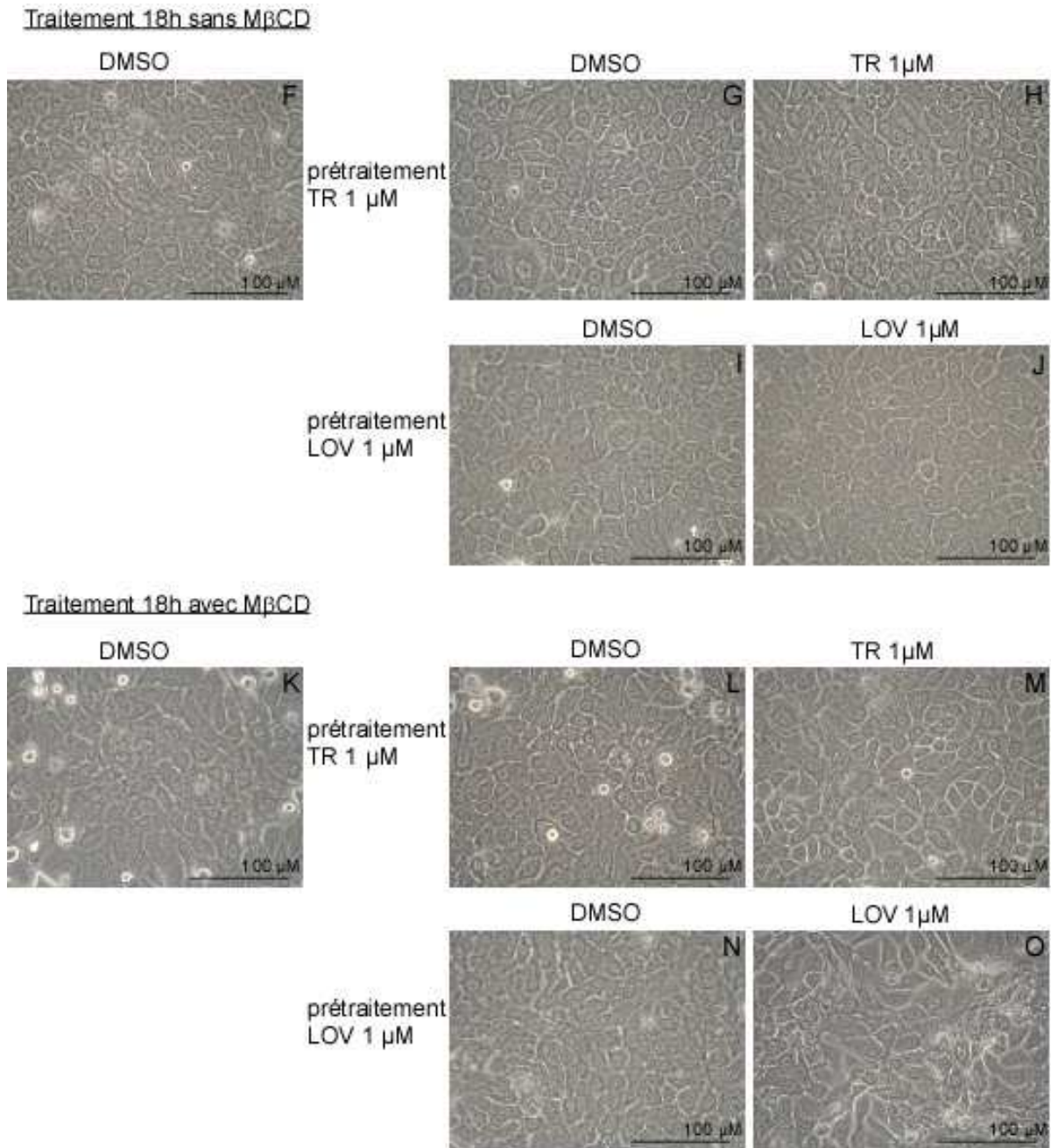


Figure 3-5 : Morphologie des kératinocytes observés au microscope à contraste de phase, au grossissement 40x. Les kératinocytes sont traités durant 24 heures avec du milieu contenant du DMSO (photo A) ou les inhibiteurs Triparanol (TR) (photo B) et Lovastatine (LOV) (photo C). De la M β CD est ensuite ajoutée (photo E) ou non (photo D) au milieu de culture durant une heure. Suite à cette incubation, les kératinocytes sont placés dans du milieu contrôle DMSO (photos F, G, I, K, L et N) ou le traitement avec les inhibiteurs Triparanol (photos H et M) ou Lovastatine (photos J et O) est prolongé durant 18 heures.

3.2. Analyse morphologique

Après un prétraitement avec le milieu contrôle, le Triparanol ou la Lovastatine, aucune variation de la morphologie cellulaire n'est induite (figure 3-5, photos A-D). Les cellules sont serrées les unes contre les autres et présentent une forme polyédrique.

Suite à cette incubation, les cellules placées dans du milieu contrôle ne présentent pas de variation morphologique (photos F, G, I). Sans traitement avec la M β CD, les cellules qui subissent un nouveau traitement de 18 heures avec les inhibiteurs ne sont toujours pas modifiées du point de vue morphologique (photos H et J).

Par contre, les kératinocytes traités une heure avec la M β CD en présence de DMSO ou des inhibiteurs se rétractent et la forme cellulaire est altérée (photo E). Les kératinocytes incubés dans du milieu contrôle durant 18 heures sont encore rétractés (photos K, L, N) mais de moindre manière que lors d'un traitement prolongé avec les inhibiteurs. Le Triparanol et la Lovastatine accentuent cette altération de la morphologie des kératinocytes suite à une extraction du cholestérol par la M β CD (photos M et O). On observe également un étirement cellulaire lors de ces traitements.

3.3. Analyse protéique

Les protéines provenant des kératinocytes traités sont extraites afin de réaliser une analyse par Western blot de la phosphorylation de certains intermédiaires de voies de signalisation et de l'expression de marqueurs de différenciation épidermique (figure 3-6).

3.3.1. Les voies de signalisation intracellulaires

De nouveau, les inhibiteurs ne produisent pas d'effet important sur la phosphorylation des intermédiaires des voies de signalisation intracellulaires si les kératinocytes ne sont pas traités durant une heure avec la M β CD. Ces cultures de kératinocytes présentent un niveau basal de la forme phosphorylée du récepteur de l'EGF, ainsi que du facteur Akt. En absence de M β CD, une légère diminution de Akt est toutefois observée chez les kératinocytes prétraités avec la Lovastatine ou le Triparanol. Ce phénomène est amplifié lorsque les cellules sont soumises à un traitement prolongé avec ces inhibiteurs.

Suite à une déplétion du cholestérol membranaire, les inhibiteurs induisent des différences au niveau de la phosphorylation des facteurs impliqués dans les voies de signalisation. Cependant, la majeure partie de ces phénomènes est induite par la M β CD seule.

- Le récepteur de l'EGF

La forme phosphorylée du récepteur de l'EGF est particulièrement observée suite à une déplétion du cholestérol par la M β CD. Combiné à un traitement prolongé avec la Lovastatine 1 μ M, cette phosphorylation est amplifiée. Par contre, le Triparanol ne produit pas d'augmentation de la phosphorylation de ce récepteur.

- La MAPK p38

Suite aux résultats obtenus précédemment, nous savons déjà que la MAPK p38 est phosphorylée suite à un traitement d'une heure en présence de M β CD. La phosphorylation de cette MAPK est, de plus, augmentée suite à un traitement prolongé en présence de

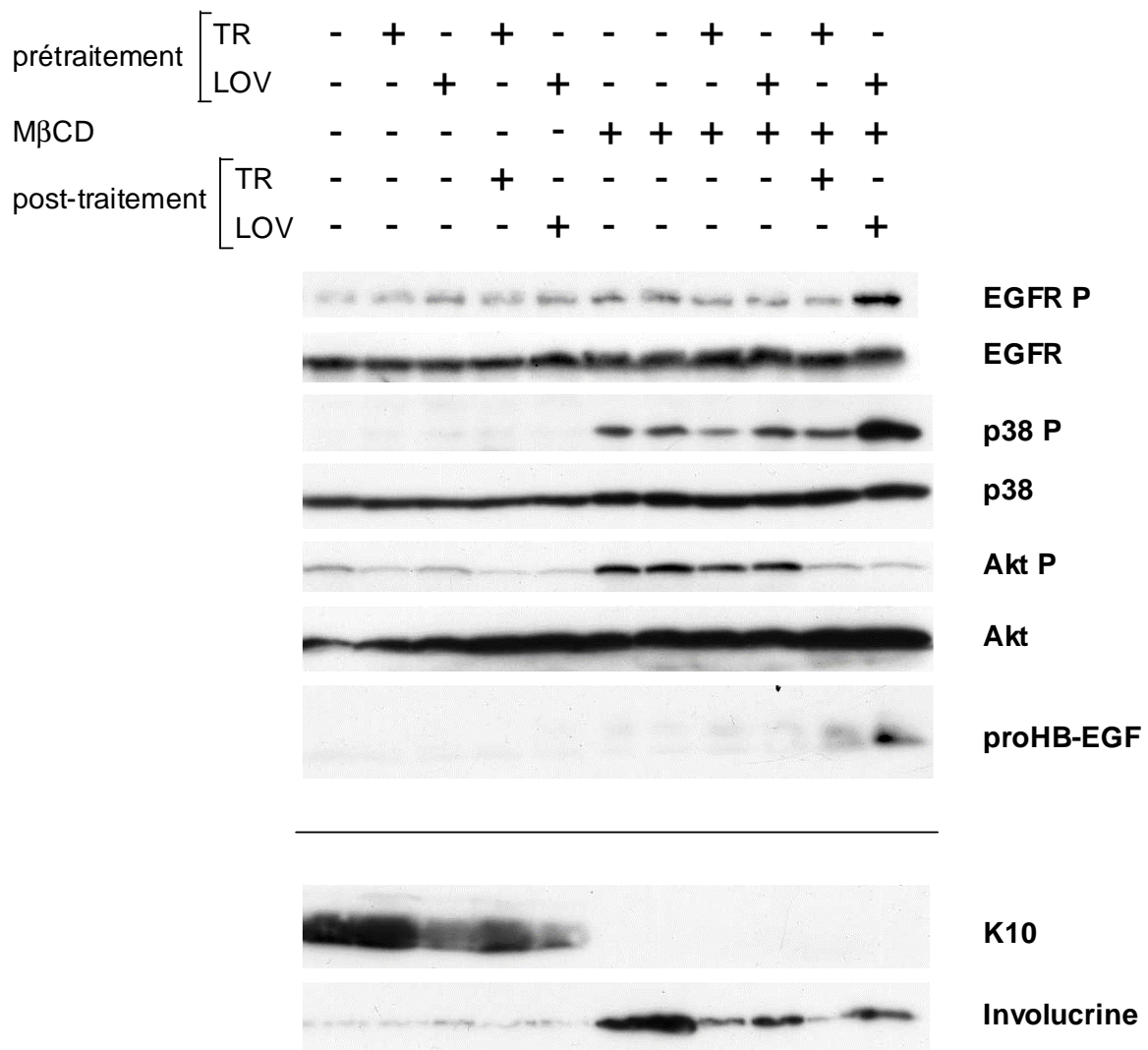


Figure 3-6 : Analyse protéique par Western blot des voies de signalisation intracellulaires et de la différenciation des kératinocytes épidermiques humains. Un prétraitement de 24 heures avec les inhibiteurs à la concentration 1 μ M est suivi d'une heure d'incubation en présence ou non de M β CD. Ensuite les kératinocytes sont placés dans du milieu contrôle durant 18 heures ou sont incubés avec les inhibiteurs. Différents facteurs sont étudiés afin d'élucider l'impact du Triparanol (TR) et de la Lovastatine (LOV) sur les voies de signalisation : le récepteur de l'EGF total (EGFR) et sa forme phosphorylée (EGFR P), la forme totale de la MAPK p38 (p38) et phosphorylée (p38 P), le facteur Akt et sa forme phosphorylée (Akt P) et le précurseur proHB-EGF. L'étude de la différenciation des kératinocytes est réalisée par analyse des marqueurs de différenciation kératine 10 (K10) et involucrine.

Lovastatine à la concentration 1µM. Un prétraitement avec la Lovastatine suivi d'un temps d'incubation sans l'inhibiteur est similaire au contrôle, suggérant une action directe de la Lovastatine sur la voie p38 lorsque le cholestérol membranaire a été déplété.

Le Triparanol n'induit pas de phosphorylation plus conséquente que celle observée dans le contrôle suite à une déplétion du cholestérol membranaire.

- Le précurseur proHB-EGF

La présence du précurseur du facteur de croissance HB-EGF semble corrélée avec la phosphorylation de la MAPK p38, comme suggéré par Mathay et al. (soumis). La présence du précurseur proHB-EGF est détectée lors d'un traitement prolongé avec la Lovastatine suite à une déplétion du cholestérol membranaire.

- Le facteur Akt

Le facteur Akt est particulièrement phosphorylé dans les conditions contrôles suite à une déplétion du cholestérol. La phosphorylation de ce facteur disparaît presque entièrement suite à une incubation prolongée pour les deux inhibiteurs utilisés. Par contre, les kératinocytes incubés dans du milieu contrôle suite à un prétraitement avec les inhibiteurs et la MβCD présentent un niveau de phosphorylation intermédiaire. Cela suggère une action inhibitrice de la Lovastatine et du Triparanol sur la phosphorylation de Akt.

3.3.2. La différenciation cellulaire

Le marqueur de différenciation précoce kératine 10 est détecté uniquement dans les kératinocytes dont le cholestérol n'a pas été extrait par la MβCD. Toutefois, cette kératine est très faiblement observée suite à un traitement prolongé avec la Lovastatine. La présence de la kératine 10 ne semble pas modifiée suite à un traitement avec le Triparanol.

L'involucrine est surtout exprimée chez les kératinocytes traités avec la MβCD. Ce marqueur de différenciation n'est pas présent de manière plus importante avec les inhibiteurs. Cependant, les kératinocytes traités avec la Lovastatine l'expriment d'avantage que lors d'un traitement avec le Triparanol.

Au vu des résultats obtenus sur les marqueurs de différenciation par l'analyse protéique, nous avons effectué une étude plus approfondie des marqueurs de différenciation par analyse des transcrits de ces marqueurs par PCR en temps réel.

3.4. Analyse transcriptionnelle

Les kératinocytes subissent un prétraitement de 24 heures dans du milieu contrôle DMSO ou dans du milieu contenant les inhibiteurs Triparanol (TR) ou Lovastatine (LOV) 1 µM. De la MβCD est ajoutée ou non durant une heure dans le milieu de culture. Un traitement de 18 heures est ensuite procuré aux cultures cellulaires. Durant ces 18 heures, les kératinocytes sont incubés dans du milieu contrôle ou en présence de Triparanol (TR) ou de Lovastatine (LOV) à la concentration 1 µM. Une incubation de 18 heures avec les inhibiteurs sans prétraitement de 24 heures est également un traitement procuré aux cultures de kératinocytes.

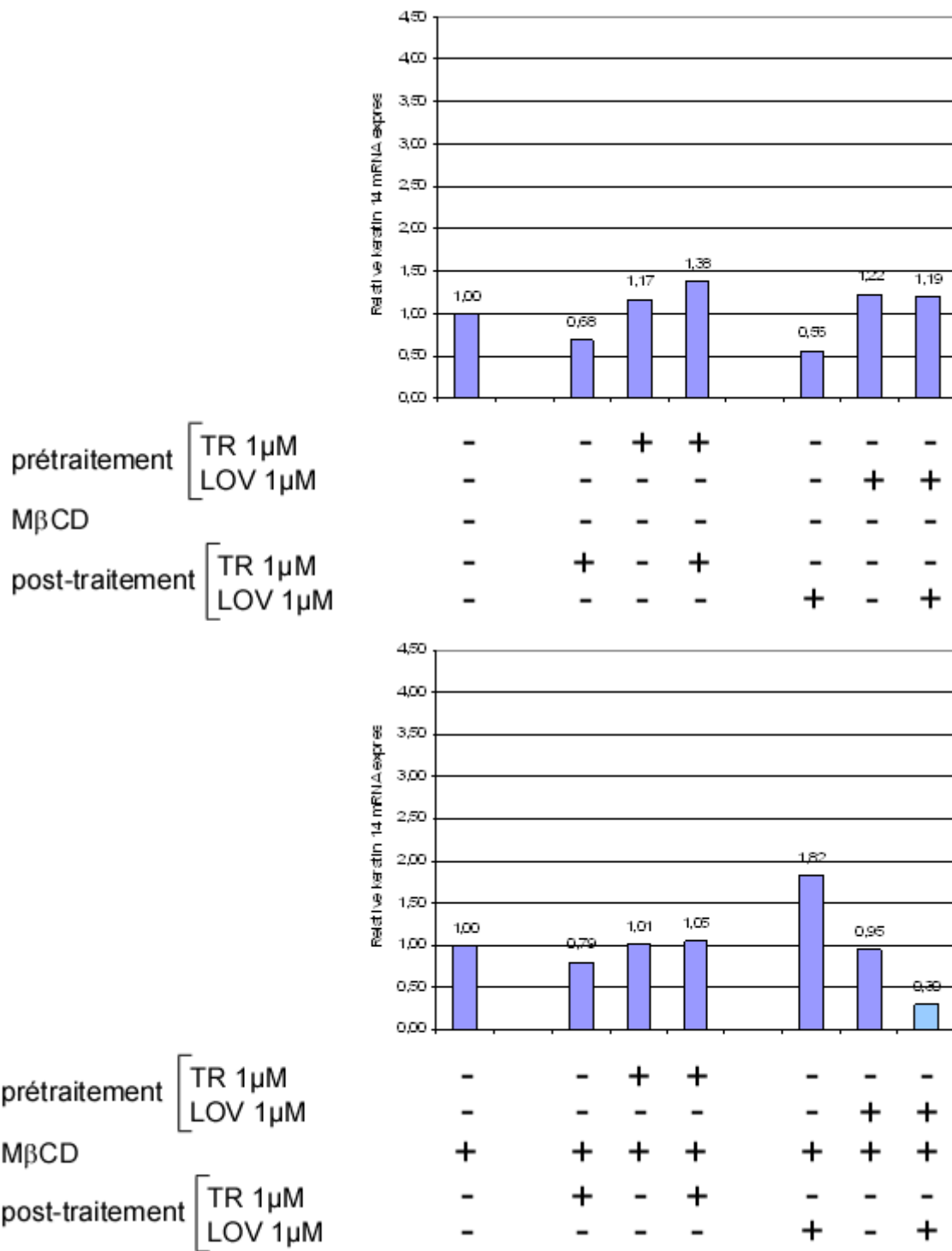


Figure 3-7 : Représentation graphique de l'expression transcriptionnelle relative du marqueur de différenciation kératine 14 après différents traitements. Les kératinocytes subissent un post-traitement avec du milieu contrôle DMSO ou avec du Triparanol (TR) ou de la Lovastatine (LOV) durant 18 heures. Certaines cultures subissent un prétraitement de 24 heures combiné à un post-traitement avec les inhibiteurs ou le milieu contrôle. Le premier graphique représente l'expression relative de la kératine 14 dans des kératinocytes non traités avec la MβCD. Le second graphe illustre l'expression transcriptionnelle relative de ce marqueur suite à une déplétion du cholestérol membranaire par cette cyclodextrine.

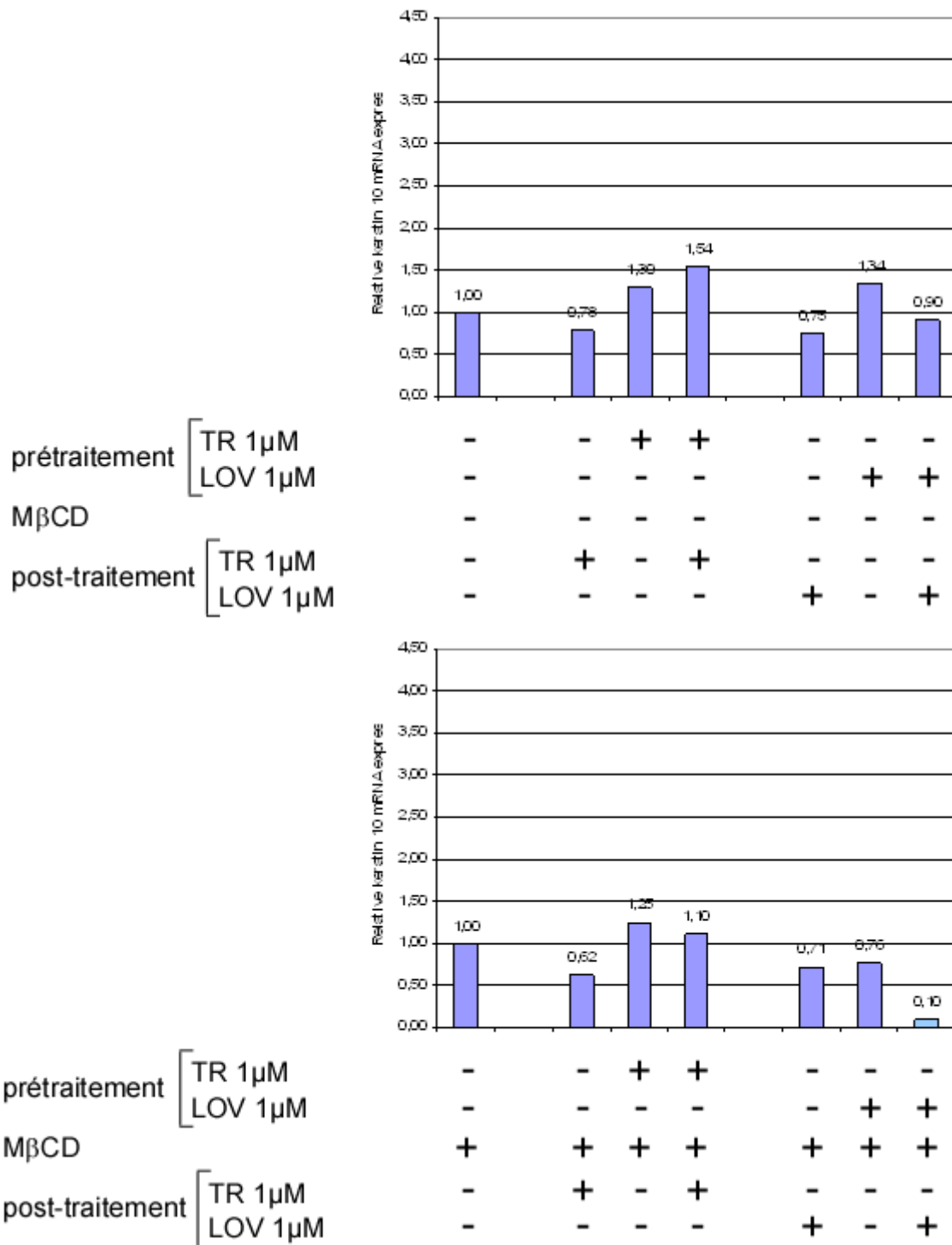
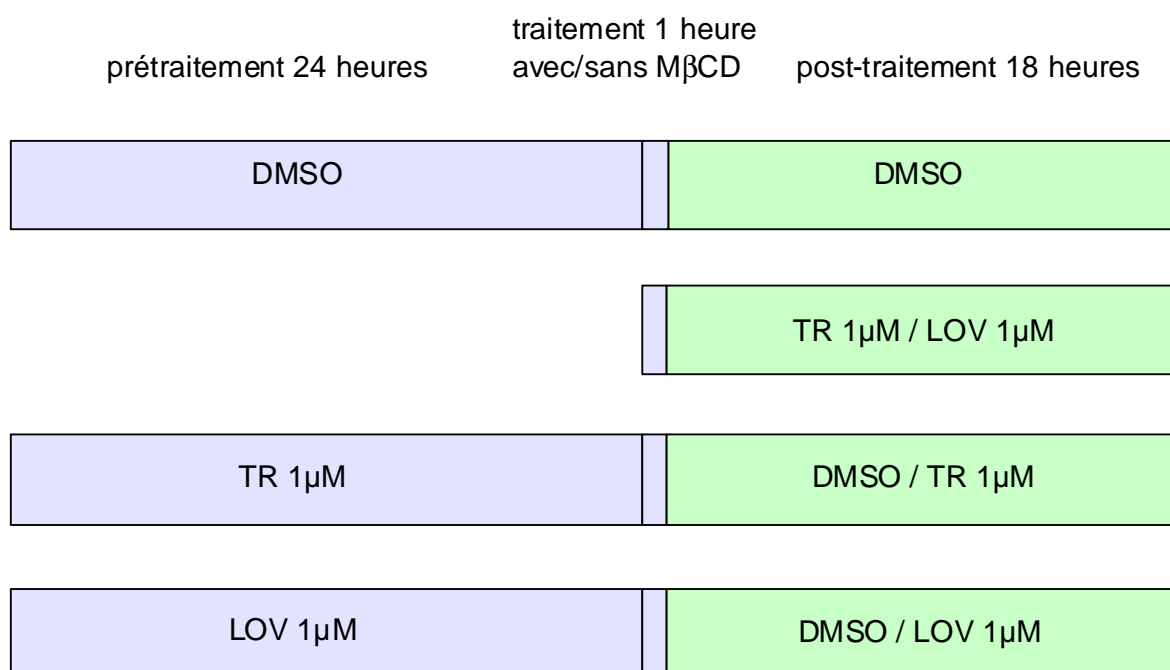


Figure 3-8 : Graphiques représentant l'expression transcriptionnelle relative du marqueur de différenciation précoce, la kératine 10. Les kératinocytes subissent des post-traitements combinés ou non avec des prétraitements en présence des inhibiteurs Triparanol (TR) ou Lovastatine (LOV) ou avec du milieu contrôle. Le premier graphe permet de visualiser l'expression du transcrit dans une culture de kératinocytes non incubés en présence de MβCD. Le second représente l'expression transcriptionnelle cette kératine suite à une déplétion du cholestérol membranaire par un traitement avec la MβCD.



Afin d'analyser les résultats obtenus par PCR en temps réel, nous avons décidé de manière arbitraire qu'une diminution ou une augmentation est prise en compte si l'expression relative du transcrite est divisée ou multipliée par deux par rapport à l'échantillon contrôle DMSO, c'est-à-dire qu'il y a un cycle de différence minimum dans l'établissement du Ct. Afin de visualiser plus aisément les variations d'expression des transcrits considérées comme significatives, les barres d'histogramme du graphique sont présentées en bleu clair pour une valeur relative en deçà de 0,5 et en bleu foncé pour une valeur relative au-delà de 2.

L'impact du Triparanol et de la Lovastatine sur la différenciation des kératinocytes épidermiques humains est investigué par analyse de l'expression transcriptionnelle des marqueurs de différenciation kératine 14, kératine 10 et involucrine. La kératine 14 est un marqueur de kératinocytes de la couche basale qui sont peu ou pas différenciés. Une autre kératine, la kératine 10, est exprimée dans les couches suprabasales et est considérée comme un marqueur de différenciation précoce. L'involucrine est une protéine exprimée dans les couches épineuses et granuleuses et qui est considérée comme un marqueur de différenciation tardif.

L'expression transcriptionnelle de la kératine 14 ne varie pas de manière importante chez les kératinocytes qui n'ont pas reçu de traitement avec la M β CD. Par contre, une déplétion du cholestérol membranaire additionnée à une incubation prolongée avec la Lovastatine à la concentration 1 μ M induit une réduction de trois fois du transcrite de ce marqueur de différenciation (figure 3-7).

Le profil d'expression du transcrite de la kératine 10 est pratiquement similaire à celui de la kératine 14. En effet, seul un traitement de 24 heures avec la Lovastatine suivi d'une incubation d'une heure avec la M β CD et d'encore 18 heures d'incubation avec cet inhibiteur induit un changement de l'expression transcriptionnelle de ce marqueur de différenciation. Suite à ce traitement, l'expression du marqueur de différenciation précoce est diminuée de dix fois (figure 3-8).

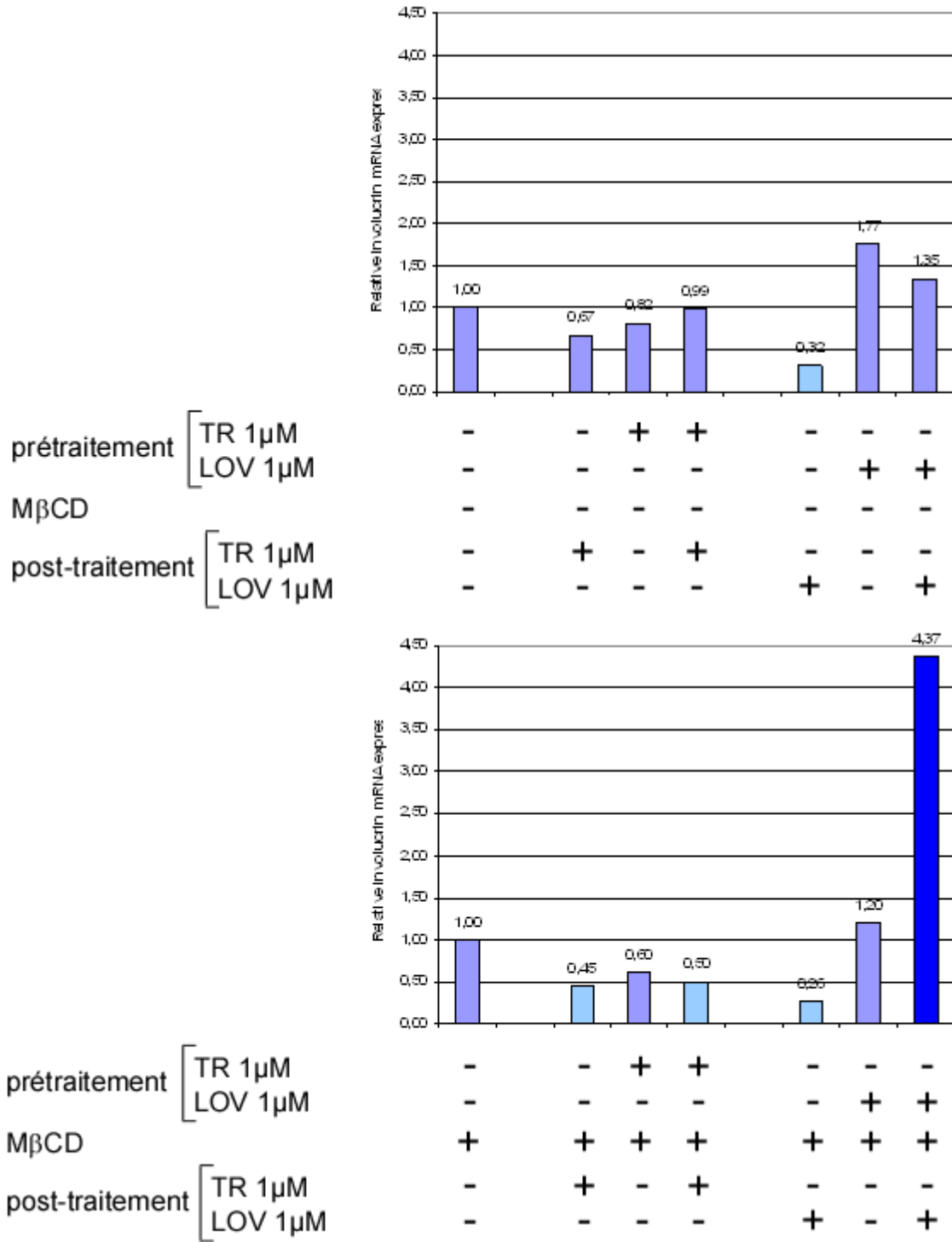


Figure 3-9 : Graphes représentant l'expression du transcrite du marqueur de différenciation tardif, l'involucrine. Les cultures de kératinocytes sont incubées avec du milieu contrôle ou les inhibiteurs Triparanol (TR) ou Lovastatine (LOV) à la concentration 1 μM durant 24 heures et/ou 18 heures. Le second graphique représente l'expression relative de l'involucrine suite à une déplétion du cholestérol membranaire par la MβCD, alors que le premier représente l'expression de ce marqueur dans des kératinocytes non traités avec la MβCD.

L'analyse de l'expression de l'involucrine révèle que son transcrit est réduit de trois fois suite à un post-traitement seul durant 18 heures avec la Lovastatine à la concentration 1 μ M. La déplétion du cholestérol par la M β CD suivie d'un traitement avec la Lovastatine durant 18 heures induit également une diminution de son expression. Cette diminution est également constatée suite à un traitement de 18 heures ou suite à un traitement prolongé avec le Triparanol. Toutefois, une augmentation supérieure à quatre fois est observée chez les kératinocytes qui subissent une déplétion du cholestérol membranaire combiné à un traitement prolongé en présence de Lovastatine 1 μ M (figure 3-9).

3.5. Conclusion

Le Triparanol et la Lovastatine à la concentration 1 μ M ne produisent pas d'effets sur les voies de signalisation intracellulaires chez les kératinocytes sans déplétion préalable du cholestérol membranaire par la M β CD. Si on admet que le cholestérol est responsable des effets observés, cela nous pose la question de l'efficacité des inhibiteurs à cette concentration.

Après une déplétion du cholestérol membranaire, un traitement prolongé avec la Lovastatine à la concentration 1 μ M produit des modifications importantes des voies de signalisation. Ce traitement produit une augmentation de la phosphorylation du récepteur de l'EGF et de la MAPK p38, induit la production du précurseur proHB-EGF et réduit la présence de la forme phosphorylée du facteur de survie Akt. Par contre, le Triparanol à la concentration 1 μ M produit peu d'effets sur les voies de signalisation étudiées par la technique du Western blot. Remarquons de plus que les kératinocytes incubés durant les 18 heures dans du milieu contrôle suite à une déplétion du cholestérol membranaire retrouvent un niveau basal d'expression de ces facteurs. Nous supposons donc que ces 18 heures d'incubation sont suffisantes pour que les kératinocytes « récupèrent » et même surexpriment le facteur Akt suite à ce stress.

La différenciation semble également affectée par un traitement prolongé avec la Lovastatine à la concentration 1 μ M combiné à une déplétion du cholestérol membranaire. L'analyse transcriptionnelle des marqueurs de différenciation des kératinocytes révèle que ce traitement induit une diminution de l'expression des kératines 14 et 10 ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'involucrine, ce qui se traduit par une différenciation précoce. Des résultats similaires ont déjà été obtenus au laboratoire suite à un traitement d'une heure avec la M β CD suivi de 17 heures d'incubation avec l'inhibiteur Lovastatine à la concentration 10 μ M (Jans et al., 2004). Le Triparanol induit par contre une réduction de l'expression de l'involucrine dans les cultures de kératinocytes préalablement soumises à la M β CD et ne modifie pas les expressions des deux marqueurs de différenciation précoces étudiés, les kératines 10 et 14. Cet inhibiteur semble donc ne pas induire de différenciation dans les kératinocytes épidermiques humains en culture suite à un traitement avec la M β CD. Ce résultat avait déjà été observé par Western blot dans la figure 3-7.

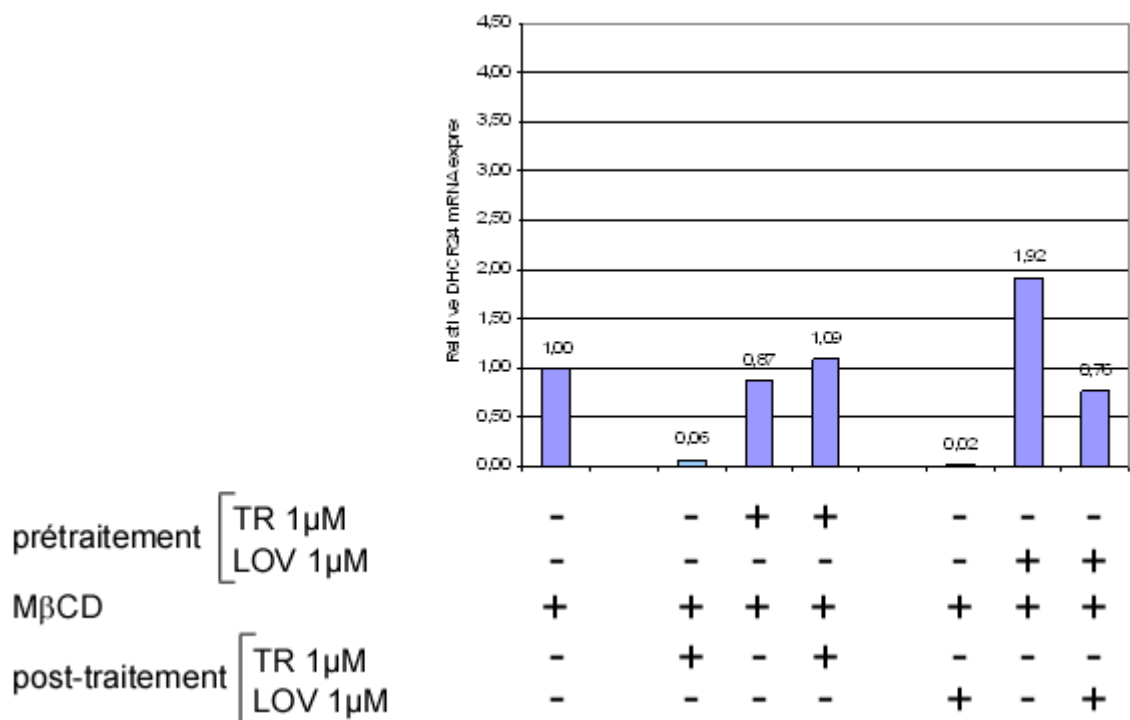
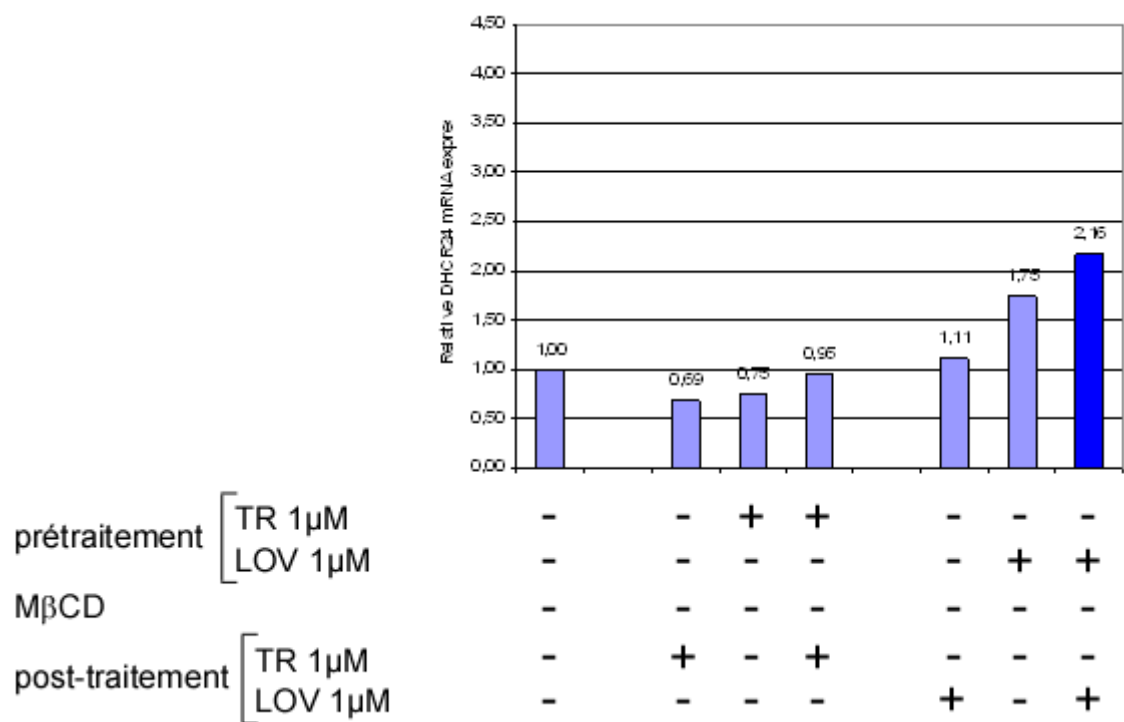


Figure 3-10 : Graphiques représentant l'expression transcriptionnelle relative de l'enzyme 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase (DHCR24). Un traitement de 18 heures est combiné ou non avec un prétraitement avec les inhibiteurs Triparanol (TR) et Lovastatine (LOV) à la concentration 1 μ M ou avec du milieu contrôle. L'expression du transcrite de cette enzyme est étudiée suite à une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD, qui est illustré sur le second graphe, ou sans traitement avec la M β CD, comme visualisé sur le premier graphique.

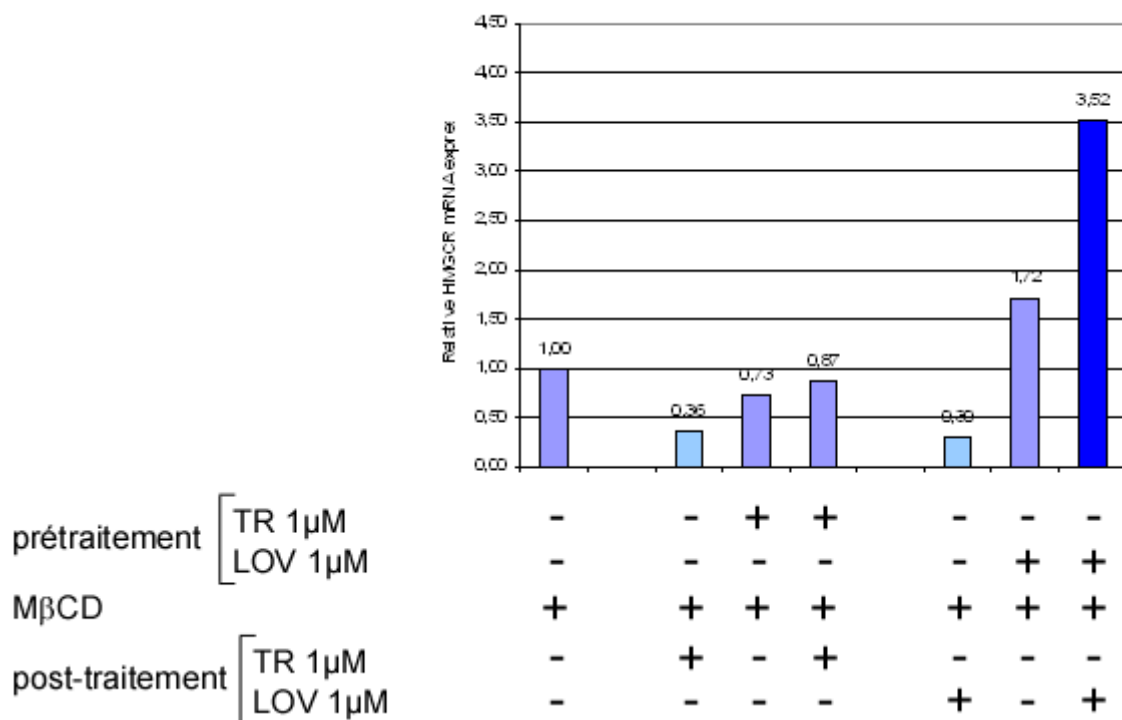
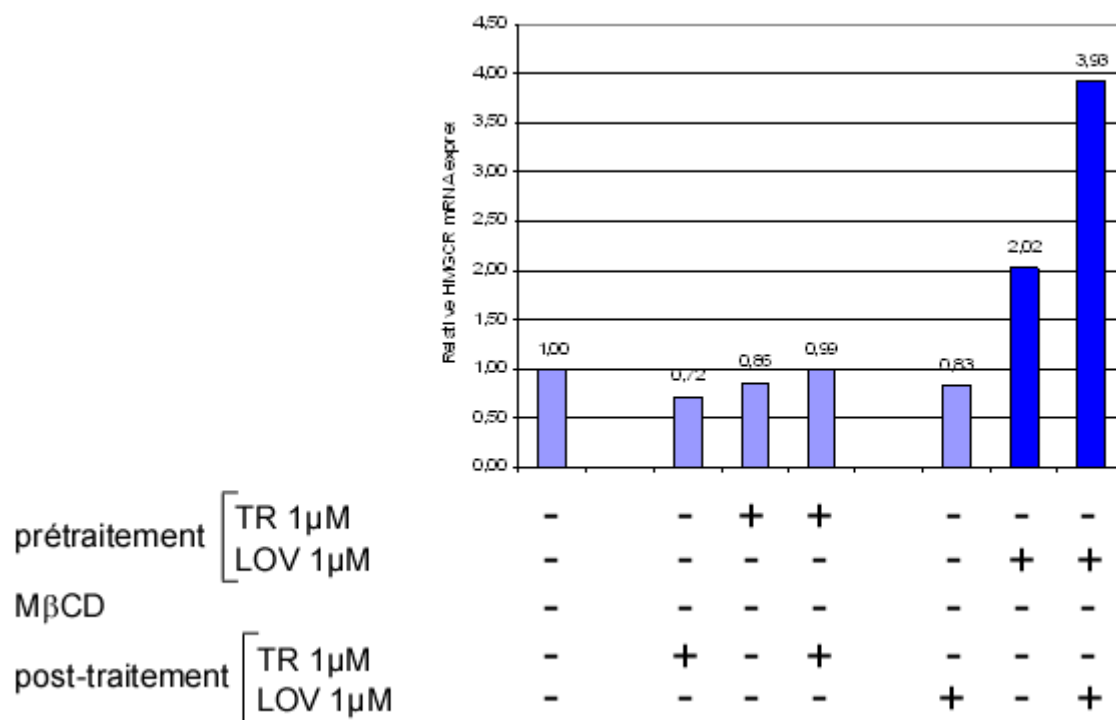


Figure 3-11 : Représentation graphique de l'expression relative du transcrite de l'enzyme hydroxyl-méthyl-glutaryl coenzyme A (HMGCR). Certaines des cultures de kératinocytes subissent un prétraitement avec le Triparanol (TR) ou la Lovastatine (LOV) à la concentration 1 µM. Les kératinocytes sont ensuite déplétés en cholestérol (2^{ème} graphique) ou non (1^{er} graphique) selon qu'ils sont incubés ou pas durant une heure en présence de MβCD. Les cultures sont ensuite incubées dans du milieu contrôle ou contenant les inhibiteurs.

4. Expression transcriptionnelle des enzymes DHCR24 et HMGCR après traitement avec l'inhibiteur Triparanol

4.1. Expérience

Le Triparanol et la Lovastatine sont des inhibiteurs qui agissent sur l'activité des enzymes nécessaires à la biosynthèse du cholestérol. Le Triparanol inhibe la 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase (DHCR24) et la Lovastatine est un inhibiteur de l'hydroxyl-méthyl-glutaryl coenzyme A réductase (HMGCR). Nous voulons savoir si ces inhibiteurs ont un effet sur la transcription des enzymes dont ils inhibent l'activité afin de déterminer s'il existe éventuellement une boucle de rétroaction positive. Cette information est utile dans la perspective de les inhiber un jour par siRNA. Une analyse des transcrits des enzymes DHCR24 et HMGCR est donc effectuée suite à une incubation avec le Triparanol ou la Lovastatine. Les traitements prodigués sont identiques à ceux réalisés pour l'analyse transcriptionnelle des marqueurs de différenciation. Les cultures de kératinocytes sont incubées durant 24 heures et/ou 18 heures en présence de Triparanol ou de Lovastatine à la concentration 1 μ M ou dans du milieu contrôle.

4.2. Analyse transcriptionnelle

L'expression du transcrit de l'enzyme DHCR24, la cible du Triparanol, est augmentée suite à un traitement prolongé avec la Lovastatine 1 μ M (figure 3-10). Un profil différent est obtenu suite à une déplétion du cholestérol membranaire par action de la M β CD. Un traitement combiné de M β CD et de 18 heures d'incubation avec le Triparanol ou la Lovastatine réduit l'expression transcriptionnelle de l'enzyme DHCR24, ce qui est assez surprenant.

L'enzyme HMGCR dont l'activité est affectée par la Lovastatine voit son transcrit augmenté suite à un prétraitement de 24 heures avec cet inhibiteur (figure 3-11). Cette augmentation est d'autant plus grande lorsque le traitement avec la Lovastatine 1 μ M se prolonge encore durant 18 heures. Suite à une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD, les kératinocytes présentent une expression transcriptionnelle de l'enzyme HMGCR réduite de trois fois suite à un traitement de 18 heures, quel que soit l'inhibiteur utilisé. Toutefois, une incubation prolongée avec la Lovastatine induit une augmentation de l'expression relative du transcrit supérieure à trois fois.

4.3. Conclusion

Il semble que l'expression transcriptionnelle de l'enzyme 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase (DHCR24) est régulée par le Triparanol mais également par la Lovastatine. Il est probable qu'un système de régulation joue sur la transcription de cette enzyme.

L'inhibition de l'activité de l'enzyme HMGCR par la Lovastatine augmente sa transcription. La littérature nous apprend que les statines, dont fait partie la Lovastatine, ont des effets limités sur le traitement de l'hypercholestérolémie car elles induisent précisément une augmentation compensatoire de l'expression de l'enzyme HMGCR (Sever et al., 2003).

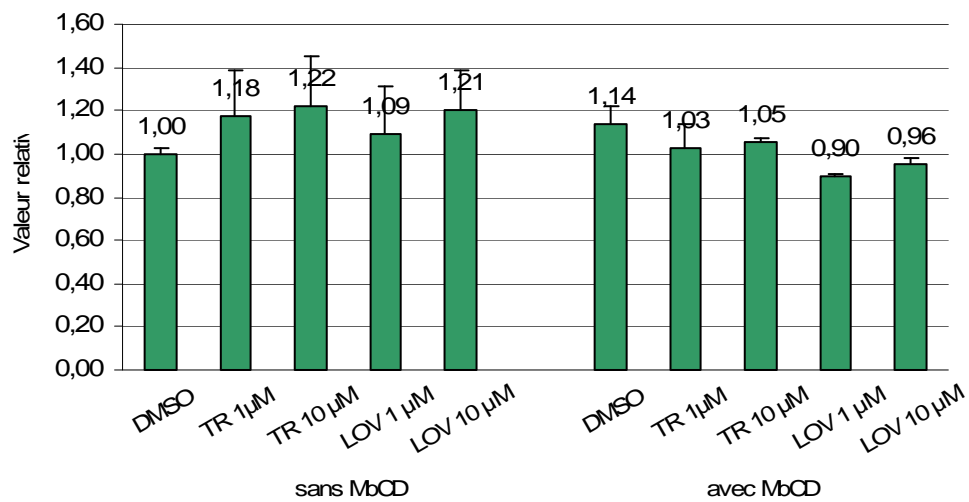


Figure 3-12 : Représentation graphique du dosage du cholestérol cellulaire après différents traitements prodigués aux cultures de kératinocytes épidermiques. Les kératinocytes subissent une incubation d’une heure en présence ou en absence de MβCD et sont ensuite traités 24 heures avec du milieu contrôlé ou avec le Triparanol (TR) ou la Lovastatine (LOV) aux concentrations 1 μM ou 10 μM.

5. L'impact du Triparanol sur le cholestérol cellulaire

5.1. Expérience

Les résultats obtenus suite à un traitement avec les inhibiteurs sans déplétion préalable du cholestérol membranaire par la M β CD nous obligent à nous interroger sur l'efficacité des inhibiteurs utilisés aux concentrations choisies. La littérature nous informe que le Triparanol induit une accumulation du précurseur desmostérol et une diminution de la quantité de cholestérol (Waterham, 2006). Nous avons donc voulu tester la capacité de ces inhibiteurs à agir sur la quantité de cholestérol retrouvée dans les kératinocytes.

Les kératinocytes subissent un traitement d'une heure avec du milieu contenant ou pas de la M β CD à la concentration 7,5mM. A cette concentration, la M β CD produit une diminution du cholestérol cellulaire (Jans et al., 2004). Suite à cette d'incubation, les cellules sont placées dans du milieu contrôle ou sont mises en présence des inhibiteurs Triparanol (TR) ou Lovastatine (LOV) aux concentrations 1 μ M ou 10 μ M. La quantité de cholestérol est ensuite mesurée par une méthode enzymatique sur des extraits cellulaires. Un rapport est alors calculé en associant le cholestérol mesuré et la quantité de protéines mesurée dans les cultures de kératinocytes.

traitement 1 heure
avec/sans M β CD traitement 24 heures

	DMSO / TR 1 μ M / TR 10 μ M / LOV 1 μ M / LOV 10 μ M
--	---

5.2. Analyse du dosage du cholestérol

Le rapport de la quantité de cholestérol sur celle des protéines nous montre que sans déplétion du cholestérol par la M β CD au préalable, les inhibiteurs ne réduisent pas la quantité de cholestérol cellulaire (figure 3-12). Nous observons même une tendance vers l'augmentation de la quantité de cholestérol. Ceci pourrait s'expliquer par des phénomènes d'activation de l'expression des enzymes DHCR24 ou HMGCR.

Suite à une déplétion du cholestérol, une incubation de 24 heures dans du milieu contrôle semble induire une augmentation faible de la quantité de cholestérol cellulaire en comparaison à la condition contrôle sans traitement avec la M β CD. Par contre, suite à un traitement avec la M β CD, le Triparanol et la Lovastatine semblent réduire la présence de cholestérol dans les kératinocytes. Cet effet est essentiellement observé avec l'inhibiteur Lovastatine. Cependant, cette diminution du cholestérol cellulaire est non significative.

5.3. Conclusion

Le Triparanol et la Lovastatine ne semblent pas réduire la quantité de cholestérol cellulaire dans les kératinocytes non traités par la M β CD. Les cellules placées dans du milieu contrôle après une déplétion du cholestérol présentent une quantité de cholestérol un peu plus

importante. Par contre, le Triparanol et la Lovastatine réduisent le cholestérol cellulaire suite à une déplétion du cholestérol mais de manière non significative.

Remarquons cependant que le dosage du cholestérol cellulaire total par le kit utilisé lors de notre expérience n'est pas la technique idéale pour notre travail. De plus, la M β CD est surtout connue pour désorganiser le cholestérol membranaire et pas le cholestérol cellulaire. Il faudrait réaliser un test plus précis et plus spécifique afin d'analyser les différents précurseurs stérols présents suite à un traitement avec les inhibiteurs par chromatographie en phase gazeuse.

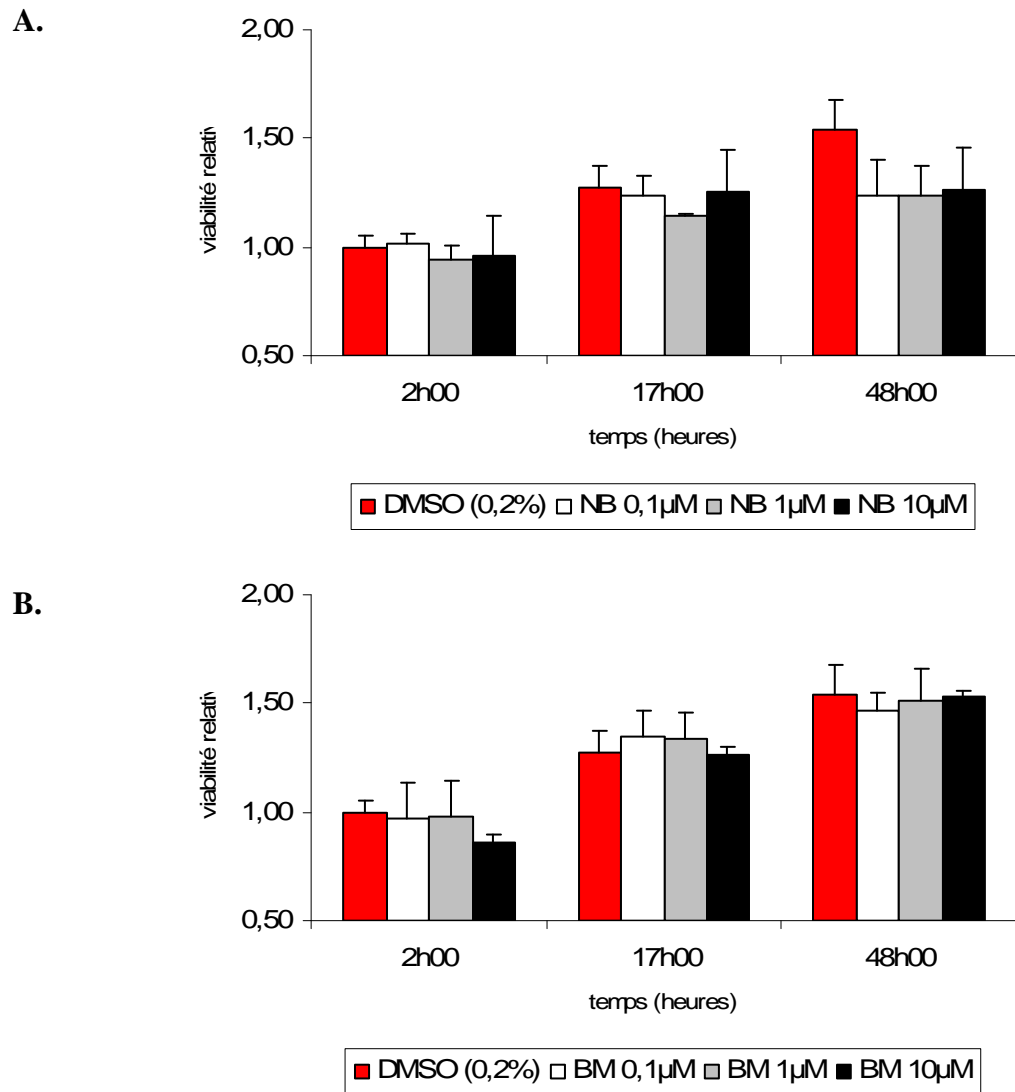


Figure 3-13 : Etude de la viabilité cellulaire suite aux traitements avec les inhibiteurs NB598 et BM15766. L'analyse des résultats obtenus par ce test MTT est effectuée par comparaison à la condition contrôle DMSO 0,2%. **A.** Un traitement de 2 heures, 17 heures et 48 heures avec le NB598 est réalisé aux concentrations 0,1 μM ; 1 μM et 10 μM . **B.** Les cultures de kératinocytes sont traitées avec l'inhibiteur BM15766 aux concentrations 0,1 μM ; 1 μM et 10 μM durant 2 heures, 17 heures et 48 heures.

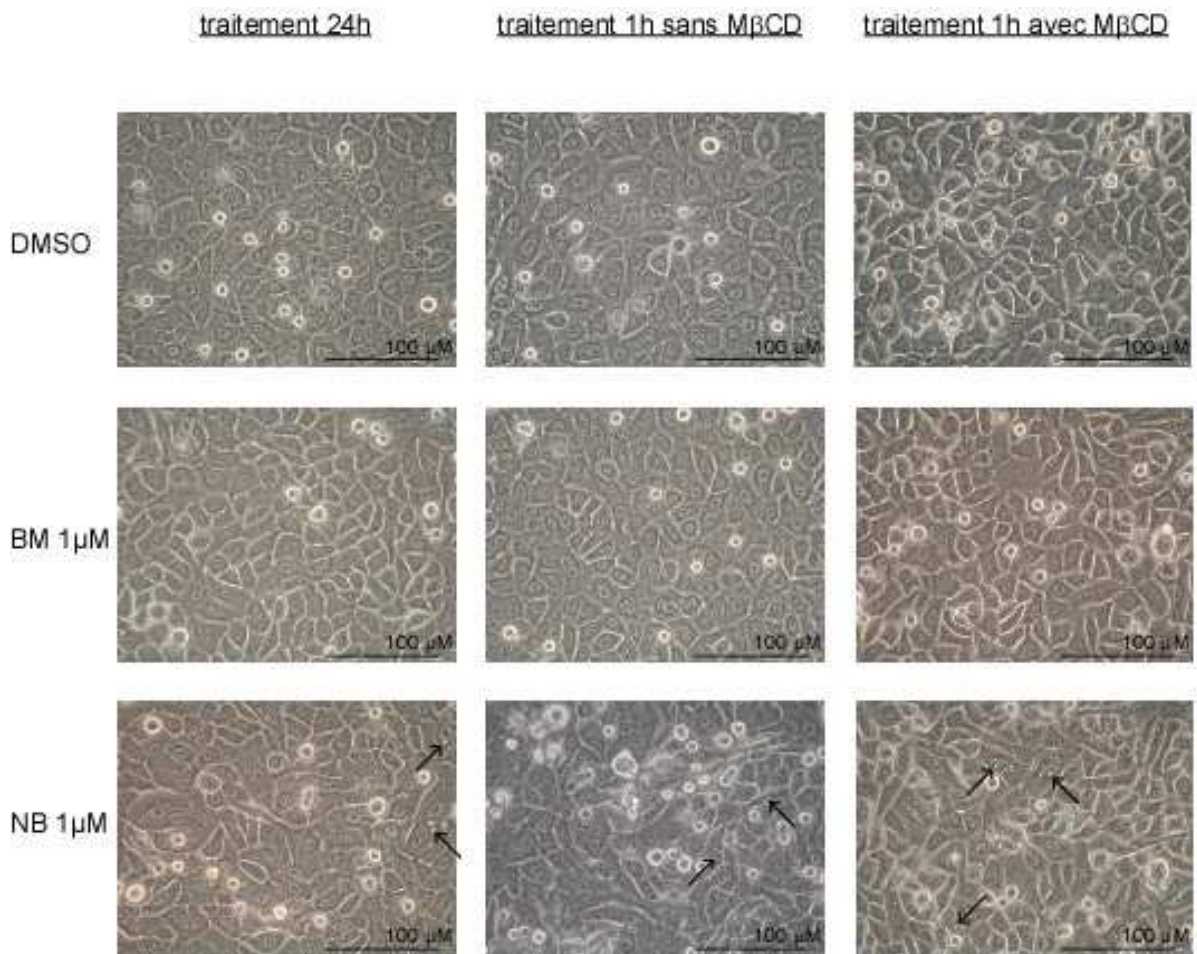


Figure 3-14 : Morphologie des kératinocytes observée au microscope à contraste de phase au grossissement 40x. Les kératinocytes sont traités durant 24 heures avec les inhibiteurs BM15766 et NB598 à la concentration 1 μ M puis sont incubés durant une heure dans du milieu avec/sans M β CD. Les flèches indiquent de petites vésicules périnucléaires de nature inconnue observées suite à l'incubation avec le NB598.

6. L'action d'autres inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol

6.1. Expérience

Des différences sont observées entre les inhibiteurs Lovastatine et Triparanol en terme de différenciation cellulaire. D'autres enzymes de la voie de synthèse du cholestérol pourraient être impliquées dans la différenciation des kératinocytes. Nous avons donc analysé les effets de deux autres inhibiteurs sur la différenciation des kératinocytes, le NB598 et le BM15766. L'inhibiteur NB598 cible l'enzyme squalène époxydase et le BM15766 inhibe l'activité de la 3 β -hydroxystérol Δ 7-réductase (DHCR7).

6.2. Analyse de la toxicité des inhibiteurs

La viabilité cellulaire est investiguée comme précédemment par un test MTT suite à différents temps d'incubation avec les inhibiteurs NB598 et BM15766. Ces inhibiteurs sont testés à trois concentrations différentes : 0,1 μ M ; 1 μ M et 10 μ M. Le NB598 induit une diminution du signal MTT uniquement après 48 heures et quelle que soit la concentration utilisée. L'inhibiteur BM15766 n'affecte pas la viabilité des cultures de kératinocytes, quelles que soient la concentration et la durée d'incubation étudiées (figure 3-13).

6.3. Analyse de la morphologie cellulaire

Les kératinocytes sont incubés durant 24 heures en présence de milieu contrôle DMSO ou avec les inhibiteurs NB598 ou BM15766 à la concentration 1 μ M. Dans le milieu de culture, de la M β CD est ajoutée ou non durant une heure.

traitement 24 heures	traitement 1 heure avec/sans M β CD
DMSO / NB 1 μ M / BM 1 μ M	

Un traitement de 24 heures avec le BM15766 à la concentration 1 μ M ne fait pas varier la morphologie de la culture cellulaire (figure 3-14). Aucune variation morphologique n'est observée suite à un renouvellement du milieu de culture Epilife[®]-. Une heure d'incubation en présence de M β CD induit par contre une rétraction cellulaire.

L'inhibiteur NB598 à la concentration 1 μ M induit une modification de la morphologie des kératinocytes après 24 heures d'incubation. La forme des kératinocytes est altérée, et certaines d'entre eux sont allongés et semblent se chevaucher.

Après une heure d'incubation dans du milieu Epilife[®]-, la morphologie des kératinocytes reste semblable à celle observée après 24 heures d'incubation. Cependant, les cellules traitées avec la M β CD sont, en plus d'être allongées et de formes différentes, rétractées.

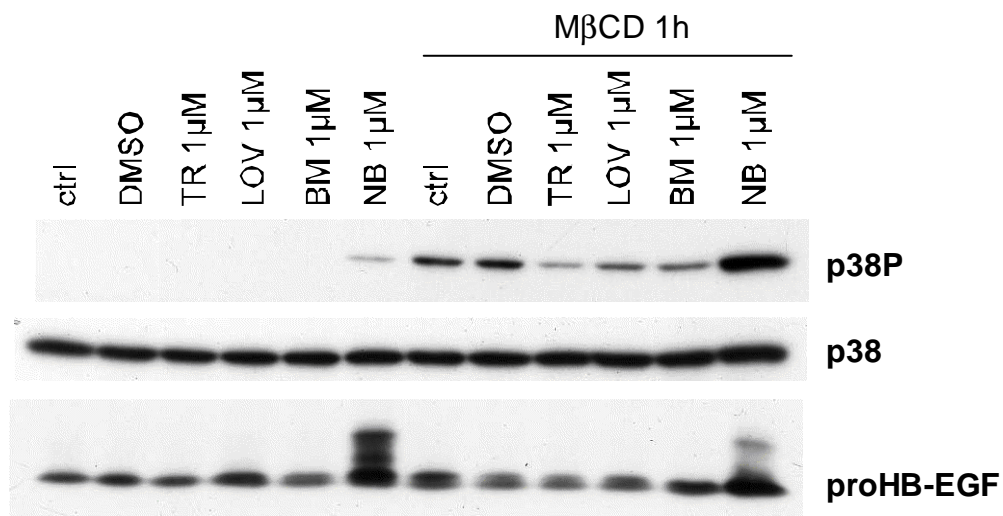
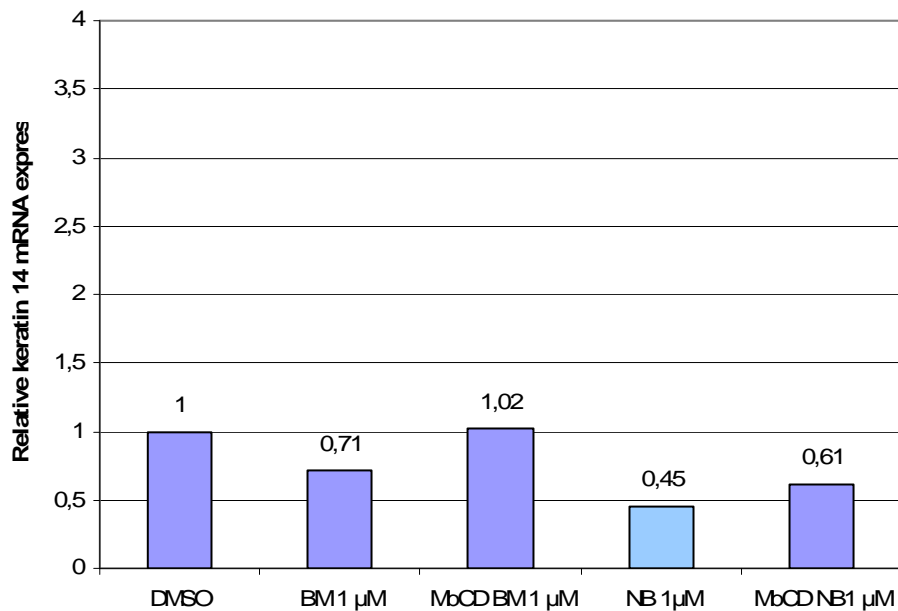


Figure 3-15 : Analyse par Western blot de la présence de la MAPK p38 et de sa forme phosphorylée (p38 P) ainsi que du précurseur proHB-EGF suite à des traitements avec les différents inhibiteurs. Un traitement de 24 heures en présence des inhibiteurs Triparanol (TR), Lovastatine (LOV), BM15766 et NB598 à la concentration 1 μ M est suivi par une incubation durant une heure dans du milieu contenant ou pas de la M β CD.



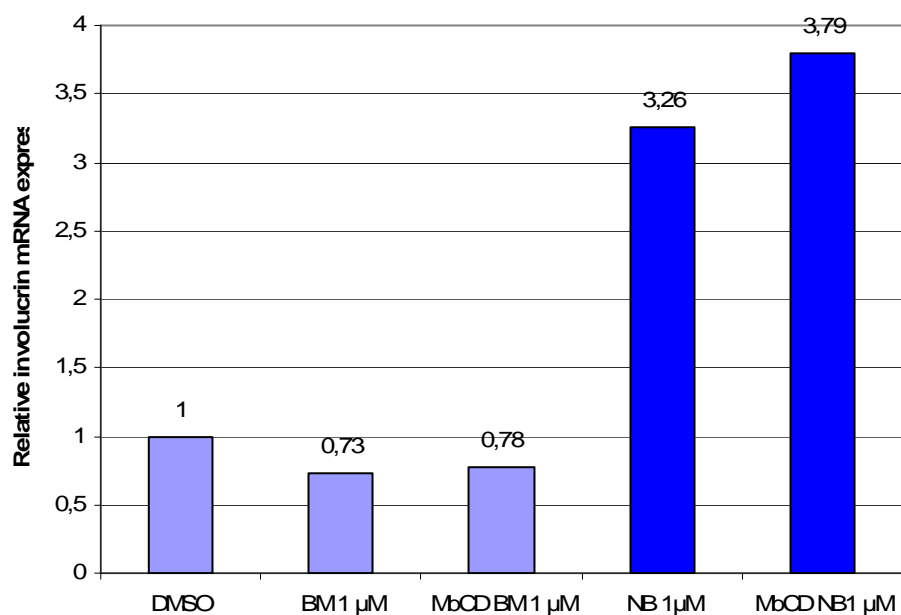
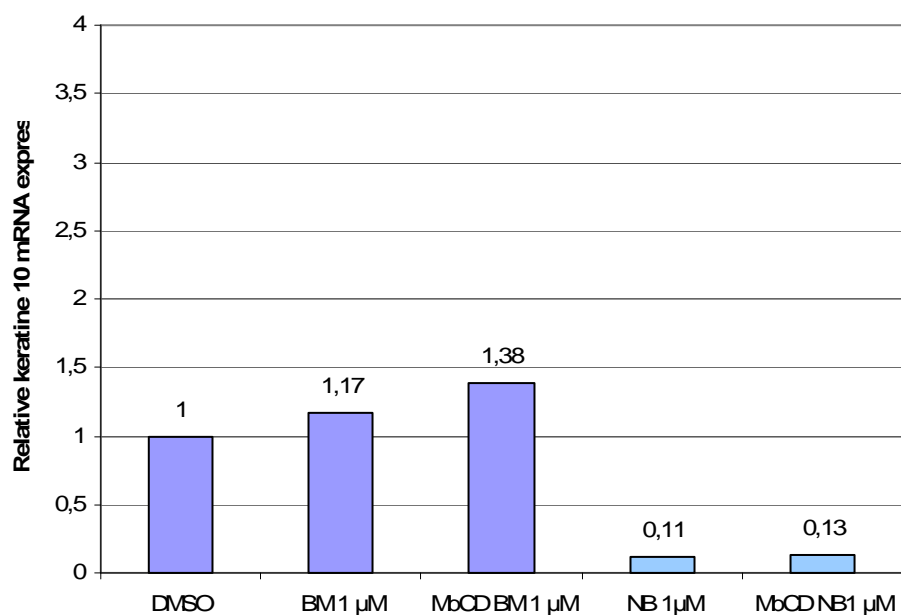


Figure 3-16 : Représentation graphique de l'expression transcriptionnelle des marqueurs de différenciation kératine 14, kératine 10 et involucrine suite à un traitement de 24 heures avec les inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol BM15766 et NB598 1 μ M. Les kératinocytes sont ensuite incubés durant une heure dans du milieu contenant ou non de la M β CD.

Remarquons que de petites vésicules périnucléaires sont observées dans les kératinocytes incubés avec l'inhibiteur NB598. Cependant, l'origine de ces vésicules n'a pas été déterminée.

6.4. Analyse protéique

La MAPK p38 et le précurseur proHB-EGF sont étudiés afin de visualiser les effets des inhibiteurs NB598 et BM15766 sur des voies de signalisation intracellulaires (figure 3-15). L'inhibiteur BM15766 ne produit pas de modifications des voies de signalisation sans déplétion du cholestérol mais réduit légèrement la phosphorylation de p38 dans les cultures de kératinocytes traitées avec la M β CD. L'inhibiteur NB598 induit la phosphorylation de la MAPK p38 et produit le précurseur proHB-EGF sans déplétion du cholestérol au préalable. Lorsque les *lipid rafts* sont désorganisés par action de la M β CD, la phosphorylation de la MAPK p38 et la présence de proHB-EGF sont également accentuées avec cet inhibiteur.

6.5. Analyse transcriptionnelle

Suite à l'observation de la morphologie particulière des cultures cellulaires après un traitement avec l'inhibiteur NB598, nous avons voulu analyser les transcrits de différents marqueurs de différenciation par PCR en temps réel. De manière arbitraire, nous avons à nouveau décidé qu'une réduction ou une augmentation est considérée comme importante si l'expression transcriptionnelle relative est divisée ou multipliée par deux au minimum.

L'inhibiteur BM15766 combiné ou non à une déplétion du cholestérol membranaire n'induit pas de variation conséquente de l'expression transcriptionnelle des marqueurs de différenciation kératine 14, kératine 10 et involucrine. Par contre, une incubation de 24 heures en présence de NB598 sans déplétion du cholestérol membranaire induit une diminution de l'expression des kératines 10 et 14 ainsi qu'une augmentation significative de l'expression du transcrit de l'involucrine. Cet inhibiteur combiné à un traitement avec la M β CD réduit également l'expression de la kératine 10 et augmente l'expression de l'involucrine (figure 3-16).

6.6. Conclusion

L'inhibiteur BM15766, qui inhibe la dernière étape de la voie de Kandutsch-Russel, ne produit pas d'effet sur les voies de signalisation et sur la différenciation des kératinocytes épidermiques humains lorsqu'il est utilisé à la concentration 1 μ M. Par contre, à la même concentration, l'inhibiteur NB598 produit des modifications conséquentes qu'il soit combiné ou non à une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD. Cet inhibiteur est intéressant car c'est le seul jusqu'à présent qui produit des effets lorsqu'il n'est pas combiné à une déplétion du cholestérol. En plus de son action sur les voies de signalisation, le NB598 induit des modifications de la différenciation des kératinocytes épidermiques humains en culture. Il induit une différenciation précoce, qui se caractérise par une augmentation de l'expression de l'involucrine et par une réduction de l'expression des deux kératines. Il semble donc que la squalène époxydase pourrait jouer un rôle important dans la différenciation des kératinocytes.

7. Conclusion

Les inhibiteurs Triparanol et Lovastatine induisent un arrêt prolifératif lorsqu'ils sont utilisés à la concentration 10 μ M. Les analyses des voies de signalisation et de la différenciation sont donc réalisées suite à une incubation à long terme en présence des inhibiteurs à la concentration 1 μ M. A cette concentration, la Lovastatine combinée à une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD induit des modifications des voies de signalisation qui renforcent les résultats obtenus lors d'un traitement avec la M β CD seul. Le Triparanol et la Lovastatine induisent également des changements au niveau de la différenciation des kératinocytes épidermiques humains mais ces modifications sont différentes l'une de l'autre. La Lovastatine induit une différenciation précoce, tandis que le Triparanol n'induit pas la différenciation, lorsqu'ils sont combinés à une déplétion du cholestérol membranaire. Toutefois, aucune modification probante n'est observée avec le Triparanol ou la Lovastatine dans des kératinocytes dont la membrane n'est pas désorganisée par une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD. En effet, le test de dosage du cholestérol cellulaire ne montre pas d'effet de ces inhibiteurs sur la quantité de cholestérol présent dans les kératinocytes. Cela pourrait expliquer les faibles effets observés sur les voies de signalisation et la différenciation lors d'un traitement en présence uniquement de Triparanol ou de Lovastatine. Il est cependant intéressant de remarquer qu'un autre inhibiteur de la voie de synthèse du cholestérol, le NB598 qui inhibe la squalène époxydase, induit des modifications des voies de signalisation et de la différenciation dans les kératinocytes dont le cholestérol n'a pas été extrait par la M β CD. Les effets observés lors d'un traitement avec le NB598 semblent similaires à ceux visualisés lors d'une incubation en présence de Lovastatine et de M β CD.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le cholestérol, un des constituants majoritaires des *lipid rafts*, est essentiel pour la régulation de la physiologie des kératinocytes épidermiques humains. Une déplétion du cholestérol membranaire par la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) altère des voies de signalisation intracellulaires. Nous nous sommes demandés si l'inhibition de certaines enzymes nécessaires à la synthèse du cholestérol par utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques pourrait induire des effets similaires à une déplétion de cholestérol dans les kératinocytes épidermiques. Notre étude s'est dès lors penchée sur l'analyse de l'impact du Triparanol sur la physiologie des kératinocytes épidermiques humains comparativement à l'utilisation de la Lovastatine, suite à une déplétion ou non du cholestérol membranaire par la M β CD. Le Triparanol est un inhibiteur de l'enzyme 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase (DHCR24) qui transforme le précurseur desmostérol en cholestérol dans la voie de Bloch. Le Triparanol induit l'accumulation de ce précurseur et la réduction de la quantité de cholestérol (Waterham, 2006). Par contre, l'inhibiteur Lovastatine cible l'enzyme hydroxyl-méthyl-glutaryl coenzyme A réductase (HMGCR) qui convertit l'hydroxyl-méthyl-glutaryl coenzyme A (HMG CoA) en mévalonate au début de la voie de synthèse du cholestérol (Waterham et al., 2006). Leur efficacité a été mise en doute dans les conditions auxquelles ils ont été utilisés suite aux faibles modifications de la physiologie des kératinocytes observées lors de leur utilisation sans déplétion préalable du cholestérol par la M β CD. Afin d'analyser leur efficacité, un dosage enzymatique du cholestérol cellulaire a été effectué sur base de leur prédisposition à réduire la quantité de cholestérol dans les kératinocytes. Ce dosage révèle que le Triparanol et la Lovastatine ne diminuent pas la quantité de cholestérol dans nos kératinocytes. Cependant, suite à une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD, les inhibiteurs semblent empêcher un retour à la normale de cette quantité de cholestérol.

Des modifications de la physiologie des kératinocytes sont tout de même observées avec les inhibiteurs Triparanol et Lovastatine utilisés seuls, notamment au niveau de la prolifération cellulaire. Le Triparanol et la Lovastatine à forte concentration induisent un arrêt prolifératif des cellules en culture. D'autres études réalisées au laboratoire ont montré que des traitements successifs de Triparanol à forte concentration induisent une mort cellulaire alors que cela n'est pas le cas à plus faible concentration. De plus, la forme phosphorylée du facteur Akt est réduite suite à un traitement prolongé en présence de ces inhibiteurs à concentration plus faible. Cependant, l'arrêt prolifératif n'est pas observé en parallèle avec un phénomène de mort cellulaire : en effet nous n'avons pas détecté de perte de matériel biologique au cours du temps lors de l'utilisation des inhibiteurs.

L'étude des effets de l'inhibition de l'enzyme DHCR24 a déjà été réalisée *in vivo* par une équipe japonaise par création de souris knock-out ciblant le gène codant pour cette enzyme (Mirza et al., 2006). L'étude histologique de la peau de ces souris knock-out met en évidence une hyperprolifération des kératinocytes. L'hypothèse avancée par cette équipe est que l'hyperprolifération cellulaire permettrait de contrecarrer des altérations de la barrière épidermique due à l'absence de l'enzyme DHCR24 (Mirza et al., 2006). Des fibroblastes embryonnaires provenant de ces souris DHCR24^{-/-} ont également été étudiés par une autre équipe japonaise. L'étude de la prolifération cellulaire indique, au contraire de l'expérience de l'équipe de Mirza, que les fibroblastes entrent en apoptose suite à des altérations de la cascade de survie (Lu et al., 2006). La DHCR24, aussi appelée *selective Alzheimer disease indicator 1* (seladin-1), a également été étudiée dans les neurones. Cette enzyme possède une activité anti-apoptotique qui agit par inhibition de l'activité de la caspase-3 dans les neurones (Luciani et al., 2004). Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, cette enzyme est présente en très faible quantité dans les neurones (Cramer et al., 2006).

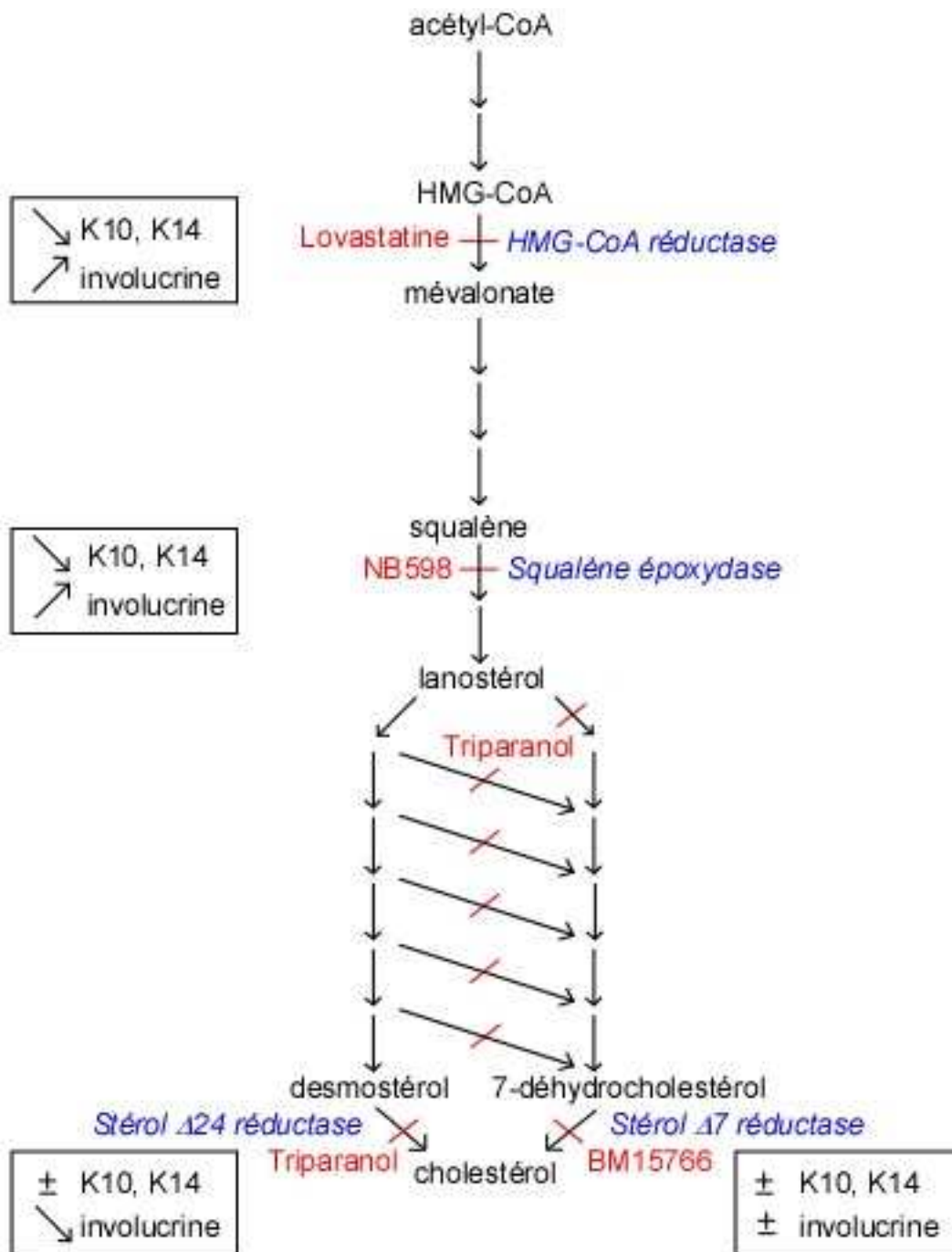


Figure 4-1 : Schéma récapitulatif des effets des inhibiteurs de la voie de synthèse du cholestérol Triparanol, Lovastatine, NB598 et BM15766 sur la différenciation dans les kératinocytes épidermiques humains en culture suite à une déplétion du cholestérol membranaire.

Les statines, dont la Lovastatine, réduisent la prolifération cellulaire par blocage de l'isoprénylation des protéines de la famille Ras dans certaines cellules tumorales. Les statines induisent également l'apoptose dans ces cellules par réduction de la phosphorylation de ERK et Akt qui sont des facteurs de signalisation importants dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire (Muzio et al., 2006). De manière intéressante, des expériences effectuées sur des kératinocytes ont montré que les statines augmentent l'apoptose due à l'inducteur d'apoptose *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) uniquement dans les cellules tumorales, et pas dans les cellules normales. La combinaison de statines avec un inducteur d'apoptose serait donc un traitement thérapeutique potentiel pour le cancer humain (Jin et al., 2006).

Le Triparanol et la Lovastatine induisent également des modifications au niveau de la différenciation des kératinocytes épidermiques (figure 4-1). Cependant, des altérations sont uniquement observées avec ces inhibiteurs après une déplétion du cholestérol membranaire par la M β CD. La Lovastatine induit une différenciation précoce des kératinocytes (Jans et al., 2004). Nous avons également observé une réduction de l'expression des marqueurs de différenciation précoces lors de l'analyse protéique et transcriptionnelle, ainsi qu'une amplification de l'expression du marqueur de différenciation tardif suite à un traitement prolongé avec la Lovastatine combiné à une déplétion du cholestérol membranaire. L'étude *in vitro* de la différenciation des kératinocytes lors de l'inhibition de l'activité de l'enzyme DHCR24 par le Triparanol révèle que le phénomène de différenciation cellulaire ne semble pas enclenché. Une déplétion du cholestérol membranaire combiné à un traitement prolongé avec le Triparanol induit, au niveau protéique et transcriptionnel, une expression normale des marqueurs de différenciation précoces, kératines 10 et 14, et une réduction de l'expression du marqueur de différenciation tardif, l'involucrine. L'analyse histologique de la structure cutanée réalisée sur des souris knock-out pour le gène 3 β -hydroxystérol Δ 24-réductase (DHCR24) par l'équipe de Mirza (2006) nous indique que la kératinisation et la structure de l'épiderme sont altérées chez ces souris. Les kératines 6 et 14, respectivement marqueurs de kératinocytes hyperprolifératifs et basaux, sont retrouvées en quantités importantes dans l'épiderme, révélant une hyperprolifération de kératinocytes immatures. De manière étonnante, l'involucrine qui est un marqueur de différenciation tardif, est retrouvé de manière ubiquitaire dans l'épiderme de ces souris. De plus, la protéine loricrine qui est un composant essentiel de l'épiderme et la protéine filaggrine qui permet l'agrégation des kératinocytes sont présentes en faible quantité dans l'épiderme des souris DHCR24 $^{-/-}$. La sous-expression de ces protéines révèle des altérations de la kératinisation ainsi que de la barrière épidermique. L'hypothèse avancée par cette équipe est que l'hyperprolifération de kératinocytes immatures essaie probablement de contrecarrer les défauts de la barrière épidermique chez les souris DHCR24 $^{-/-}$ (Mirza et al., 2006).

Il semble donc que l'inhibition d'une enzyme au début ou à la fin de la voie de synthèse du cholestérol combinée à une déplétion du cholestérol membranaire produit des modifications différentes au niveau de la différenciation des kératinocytes épidermiques. Certains intermédiaires de la voie menant au cholestérol sont donc essentiels pour la différenciation normale de la structure épidermique. Afin d'identifier ces intermédiaires indispensables à la différenciation, deux autres inhibiteurs ont été étudiés lors de notre travail. L'inhibition de la squalène époxydase par le NB598 produit, comme la Lovastatine, une différenciation précoce se traduisant par une surexpression du marqueur de différenciation tardif et par une réduction de l'expression des marqueurs de différenciation précoces. Par contre, l'inhibiteur BM15766 qui cible la dernière étape de la voie de Kandutsch-Russel, l'enzyme 3 β -hydroxystérol Δ 7-

réductase (DHCR7), n'induit pas de modifications de la différenciation dans nos kératinocytes épidermiques humains (figure 4-1).

Il serait intéressant d'étudier les intermédiaires de la voie de synthèse du cholestérol se situant entre le squalène et le desmostérol qui sont respectivement inhibés par le NB598 et par le Triparanol. En effet, ces deux inhibiteurs produisent des effets différents. Cela nous laisse penser qu'un intermédiaire, entre le squalène et le desmostérol, pourrait être indispensable pour une différenciation normale des kératinocytes épidermiques humains.

Vu l'importance du cholestérol pour les signalisations cellulaires épidermiques, il serait intéressant d'investiguer dans les maladies cutanées se caractérisant par une différenciation épidermique défectueuse, notamment le psoriasis, des altérations de la voie de synthèse du cholestérol. Le psoriasis est une maladie inflammatoire cutanée affectant 0,5 à 4,6% de la population mondiale. Cette pathologie est caractérisée par une infiltration des cellules T et par une production accrue de cytokines pro-inflammatoires au niveau de la peau. Récemment, des études ont montré que les MAPK p38 et ERK1/2 sont impliquées dans la production des cytokines pro-inflammatoires chez les patients atteints de psoriasis. Ces MAPK activent les kinases *mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2* (MAPKAP-K2) et *mitogen- and stress- activated protein kinase* (MSK) qui, par la suite, induisent la production des cytokines. (Arthur et Darragh, 2006 ; Funding et al., 2006). Le psoriasis est caractérisé par une hyperprolifération des kératinocytes épidermiques associée à une augmentation de l'expression d'HB-EGF, ainsi que par une altération de la différenciation cellulaire. Le marqueur de différenciation précoce kératine 10 est peu exprimé, alors que le marqueur de différenciation tardif involucrine est surexprimé dans les cellules cutanées provenant de patients atteints de psoriasis (Mathay et al., soumis). Il est intéressant de noter que l'augmentation de l'expression d'HB-EGF et de l'involucrine, ainsi que la réduction de l'expression de la kératine 10 sont des caractéristiques observées lors d'une déplétion du cholestérol membranaire (Mathay et al., soumis ; Jans et al., 2004). Il semble que la structure des *lipid rafts* des kératinocytes des lésions psoriatiques est différente des cellules normales. Il est possible que les contenus et la distribution du cholestérol dans ces kératinocytes pathologiques soient différents des cellules saines (Nowak et al., 2006). Il pourrait donc y avoir un lien physiologique entre le métabolisme lipidique et le psoriasis (Jacobi et Highet, 2003).

Dans les lésions cutanées de patients atteints de psoriasis et lors de nos expériences par une déplétion du cholestérol membranaire combiné à la présence de certains inhibiteurs de la voie de synthèse de cholestérol, des altérations de la différenciation ainsi qu'une augmentation du précurseur proHB-EGF et de la MAPK p38 sont observées. Ces observations constituent des pistes d'étude des causes de la maladie au niveau de la voie de synthèse du cholestérol se situant dans la voie de Bloch ou juste en amont celle-ci.

Il faut toutefois préciser qu'une étude plus précise et spécifique de la présence de cholestérol membranaire, ainsi que des intermédiaires de la voie de synthèse du cholestérol doit être réalisée à l'avenir, par exemple par un test de chromatographie en phase gazeuse. Nous suggérons également d'effectuer une inhibition des ARN messagers des enzymes impliquées dans la voie de synthèse de cholestérol par une approche utilisant des siRNA afin d'éviter la question de l'efficacité des inhibiteurs pharmacologiques utilisés pour inhiber ces enzymes.

BIBLIOGRAPHIE

- Anderson, R.G. Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. *Trends Cell Biol* **13**, 534-539 (2003).
- Anstey, A.V. *et al.* Characterization of photosensitivity in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: a new congenital photosensitivity syndrome. *The British journal of dermatology* **141**, 406-414 (1999).
- Arthur, J.S.C. & Darragh, J. Signaling downstream of p38 in psoriasis. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 1689-1691 (2006).
- Avigan, J., Steinberg, D., Vroman, H.E., Thompson, M.J. & Mosettig, E. Studies of cholesterol biosynthesis. I. The identification of desmosterol in serum and tissues of animals and man treated with MER-29. *The Journal of biological chemistry* **235**, 3123-3126 (1960).
- Azurdia, R.M., Anstey, A.V. & Rhodes, L.E. Cholesterol supplementation objectively reduces photosensitivity in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *The British journal of dermatology* **144**, 143-145 (2001).
- Bae, S.H. & Paik, Y.K. Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol delta 24-reductase. *Biochem J* **326** (Pt 2), 609-616 (1997).
- Breitling, R. & Krisans, S.K. A second gene for peroxisomal HMG-CoA reductase? A genomic reassessment. *J Lipid Res* **43**, 2031-2036 (2002).
- Chen, X. & Resh, M.D. Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**, 49631-49637 (2002).
- Clayton, P.T. Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch Dis Child* **78**, 185-189 (1998).
- Cook, P.W., Pittelkow, M.R. & Shipley, G.D. Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors. *J Cell Physiol* **146**, 277-289 (1991).
- Crameri, A. *et al.* The role of seladin-1/DHCR24 in cholesterol biosynthesis, APP processing and Abeta generation in vivo. *The EMBO journal* **25**, 432-443 (2006).
- De Potter, I.Y., Poumay, Y., Squillace, K.A. & Pittelkow, M.R. Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation. *Experimental cell research* **271**, 315-328 (2001).
- Funding, A.T. *et al.* Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 is activated in lesional psoriatic epidermis and regulates the expression of pro-inflammatory cytokines. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 1784-1791 (2006).
- Gniadecki, R. & Bang, B. Flotillas of lipid rafts in transit amplifying cell-like keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **121**, 522-528 (2003).

- Gniadecki, R., Christoffersen, N. & Wulf, H.C. Cholesterol-rich plasma membrane domains (lipid rafts) in keratinocytes: importance in the baseline and UVA-induced generation of reactive oxygen species. *The Journal of investigative dermatology* **118**, 582-588 (2002).
- Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A. & Brown, M.S. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**, 35-46 (2006).
- Huster, D., Scheidt, H.A., Arnold, K., Herrmann, A. & Muller, P. Desmosterol may replace cholesterol in lipid membranes. *Biophysical journal* **88**, 1838-1844 (2005).
- Jacobi, T.C. & Hight, A. A clinical dilemma while treating hypercholesterolaemia in psoriasis. *The British journal of dermatology* **149**, 1305-1306 (2003).
- Jans, R., Atanasova, G., Jadot, M. & Poumay, Y. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *The Journal of investigative dermatology* **123**, 564-573 (2004).
- Jin, Z., Dicker, D.T. & El-Deiry, W.S. Enhanced sensitivity of G1 arrested human cancer cells suggests a novel therapeutic strategy using a combination of simvastatin and TRAIL. *Cell Cycle* **Vol. 1 Issue 1**, 82-89 (2002).
- Kita, T., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in livers of mice treated with mevinolin, a competitive inhibitor of the reductase. *J Clin Invest* **66**, 1094-1100 (1980).
- Lambert, S., Vind-Kezunovic, D., Karvinen, S. & Gniadecki, R. Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 954-962 (2006).
- Li, Y.C., Park, M.J., Ye, S.K., Kim, C.W. & Kim, Y.N. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol* **168**, 1107-1118; quiz 1404-1105 (2006).
- Lu, X. *et al.* DHCR24-knockout embryonic fibroblasts are susceptible to serum withdrawal-induced apoptosis because of dysfunction of caveolae and insulin-Akt-Bad signaling. *Endocrinology* **147**, 3123-3132 (2006).
- Luciani, P. *et al.* Expression of the novel adrenocorticotropin-responsive gene selective Alzheimer's disease indicator-1 in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**, 1332-1339 (2004).
- Mathay, C., Giltaire, S., Minner, F., Bera, E., Hérin, M. & Poumay, Y. Heparin-binding EGF-like growth factor is induced by cholesterol depletion and oxidative stress in keratinocytes and is expressed in cutaneous wounds. *The Journal of investigative dermatology* (soumis).

- Mirza, R. *et al.* DHCR24 gene knockout mice demonstrate lethal dermatopathy with differentiation and maturation defects in the epidermis. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 638-647 (2006).
- Muzio, G. *et al.* HMG-CoA reductase and PPARalpha are involved in clofibrate-induced apoptosis in human keratinocytes. *Apoptosis* **11**, 265-275 (2006).
- Nowak, J., Nedoszytko, B., Wozniak, M., Syta, E. & Siedlecka, M. The role of cholesterol in microdomain structure of erythrocytes, lymphocytes and granulocytes membranes in psoriasis. A spin label study. *The Journal of investigative dermatology* **126**, S14 (2006) (abstract).
- Ono, K. & Han, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**, 1-13 (2000).
- Pike, L.J. Growth factor receptors, lipid rafts and caveolae: an evolving story. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 260-273 (2005).
- Pittelkow, M.R., Cook, P.W., Shipley, G.D., Derynck, R. & Coffey, R.J., Jr. Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Differ* **4**, 513-521 (1993).
- Ponec, M., Havekes, L., Kempenaar, J. & Vermeer, B.J. Cultured human skin fibroblasts and keratinocytes: differences in the regulation of cholesterol synthesis. *The Journal of investigative dermatology* **81**, 125-130 (1983).
- Ponec, M. *et al.* LDL receptors in keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **98**, 50S-56S (1992).
- Porter, F.D. Cholesterol precursors and facial clefting. *J Clin Invest* **116**, 2322-2325 (2006).
- Poumay, Y. & Coquette, A. Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch Dermatol Res* **298**, 361-369 (2007).
- Poumay, Y. & Pittelkow, M.R. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *The Journal of investigative dermatology* **104**, 271-276 (1995).
- Poumay, Y.G. The dumb ErbB receptor helps healing. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 995-997 (2007).
- Reszka, A.A., Halasy-Nagy, J. & Rodan, G.A. Nitrogen-bisphosphonates block retinoblastoma phosphorylation and cell growth by inhibiting the cholesterol biosynthetic pathway in a keratinocyte model for esophageal irritation. *Molecular pharmacology* **59**, 193-202 (2001).
- Robinson, M.J. & Cobb, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 180-186 (1997).

- Roux, C. *et al.* Role of cholesterol in embryonic development. *The American journal of clinical nutrition* **71**, 1270S-1279S (2000).
- Scorrano, L. & Korsmeyer, S.J. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 437-444 (2003).
- Sever, N., Yang, T., Brown, M.S., Goldstein, J.L. & DeBose-Boyd, R.A. Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Molecular cell* **11**, 25-33 (2003).
- Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews* **1**, 31-39 (2000).
- Song, B.L., Javitt, N.B. & DeBose-Boyd, R.A. Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab* **1**, 179-189 (2005).
- Stoll, S.W. & Elder, J.T. Retinoid regulation of heparin-binding EGF-like growth factor gene expression in human keratinocytes and skin. *Exp Dermatol* **7**, 391-397 (1998).
- Vainio, S. *et al.* Significance of sterol structural specificity. Desmosterol cannot replace cholesterol in lipid rafts. *The Journal of biological chemistry* **281**, 348-355 (2006).
- Valencia, A., Rajadurai, A., Carle, A.B. & Kochevar, I.E. 7-Dehydrocholesterol enhances ultraviolet A-induced oxidative stress in keratinocytes: roles of NADPH oxidase, mitochondria, and lipid rafts. *Free radical biology & medicine* **41**, 1704-1718 (2006).
- Wassif, C.A. *et al.* Residual cholesterol synthesis and simvastatin induction of cholesterol synthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome fibroblasts. *Molecular genetics and metabolism* **85**, 96-107 (2005).
- Waterham, H.R. Defects of cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* **580**, 5442-5449 (2006).
- Waterham, H.R. *et al.* Mutations in the 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase gene cause desmosterolosis, an autosomal recessive disorder of cholesterol biosynthesis. *Am J Hum Genet* **69**, 685-694 (2001).
- Wechsler, A. *et al.* Generation of viable cholesterol-free mice. *Science (New York, N.Y)* **302**, 2087 (2003).
- Wu, C., Miloslavskaya, I., Demontis, S., Maestro, R. & Galaktionov, K. Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature* **432**, 640-645 (2004).